

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение  
«Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

На правах рукописи

**Исаева Ольга Владиславовна**

**Гепатит дельта в эндемичных регионах Российской Федерации**

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени  
доктора биологических наук

**03.02.02. - вирусология**

Научные консультанты:

Доктор биологических наук, профессор РАН

К.К. Кюрегян

Доктор медицинских наук, профессор

Л.Ю. Ильченко

Москва, 2022

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	7
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	24
1.1. Вирус гепатита дельта.....	24
1.1.1. Общая характеристика вируса и структура вириона .....	26
1.1.2. Жизненный цикл вируса гепатита дельта.....	29
1.2. Эпидемиология гепатита дельта.....	33
1.3. Генотипы вируса гепатита дельта и вируса гепатита В.....	41
1.4. Происхождение вируса гепатита дельта и дельта-подобные вирусы животных.....	48
1.4.1. Дельта-подобные вирусы животных.....	49
1.4.2. Биологические свойства новых дельта-подобных вирусов.....	52
1.4.3. Возможные вирусы-помощники новых дельта-подобных вирусов.....	55
1.4.4. Происхождение HDV человека.....	56
1.5. Лабораторная диагностика гепатита дельта.....	57
1.6. Течение и исходы хронического гепатита дельта .....	64
1.7. Экспериментальные модели инфекции, вызываемой вирусом гепатита дельта.....	67
1.7.1. Модели инфекции <i>in vivo</i> .....	68
1.7.2. Модели инфекции <i>in vitro</i> .....	70
1.8. Лечение гепатита дельта.....	71
1.8.1. Интерферонотерапия.....	72
1.8.2. Новые направления в лечении гепатита дельта.....	73
1.8.3. Факторы вируса гепатита дельта и макроорганизма, определяющие стратегии лечения .....	78
1.9. Профилактика гепатита дельта.....	80

2. Глава 2. МАТЕРИАЛЫ и МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	83
2.1. Обследованные группы лиц.....	83
2.1.1. Лица, относящиеся к группе условно-здорового населения Республик Тыва и Саха (Якутия).....	83
2.1.2. Когорта для проведения анализа охвата вакцинацией против гепатита В новорожденных в Республике Саха (Якутия).....	86
2.1.3. Пациенты с диагнозом хронический вирусный гепатит В (Республика Саха (Якутия)).....	87
2.1.4. Пациенты с хроническим вирусным гепатитом дельта (Республика Тыва).....	87
2.1.5. Пациенты с хроническим вирусным гепатитом дельта (Республика Саха (Якутия)).....	89
2.1.6. Пациенты с хроническим вирусным гепатитом дельта (Республика Дагестан).....	90
2.2. Сбор и хранение образцов.....	91
2.2.1. Образцы сывороток крови.....	91
2.2.2. Образцы слюны и сухой капли крови.....	92
2.3. Методы исследований.....	92
2.3.1. Определение серологических маркёров гепатитов В и дельта.....	92
2.3.2. Выделение нуклеиновых кислот из образцов сыворотки крови.....	93
2.3.3. Молекулярные маркеры вирусов гепатитов В и дельта.....	94
2.3.4. Выявление ДНК HBV.....	94

2.3.5. Филогенетический анализ полученных последовательностей ДНК вируса гепатита В.....	95
2.3.6. Выявление РНК HDV.....	95
2.3.7. Филогенетический анализ полученных последовательностей участка R0 РНК вируса гепатита дельта.....	97
2.3.8. Стратегия амплификации полного генома вируса гепатита дельта.....	97
2.3.9. Филогенетический анализ с временной шкалой.....	100
2.3.10. Методы статистического анализа.....	102
3. Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	103
3.1. Динамика показателей распространенности серологических маркеров инфицирования вирусами гепатита В и дельта среди условно здорового населения эндемичных регионов Российской Федерации.....	103
3.1.1. Динамика показателей заболеваемости гепатитом В за период 2008 – 2019 годы в Республике Тыва и Республике Саха (Якутия).....	104
3.1.2. Динамика выявления HBsAg среди различных возрастных групп условно здорового населения Республики Тыва за период 2008-2019 годы.....	106
3.1.3. Динамика выявления HBsAg среди различных возрастных групп условно здорового населения Республики Саха (Якутия) за период 2008-2019 годы.....	108
3.1.4. Выявление HBsAg в группах населения Республики Саха (Якутия) и Республики Тыва среди вакцинированных и невакцинированных против гепатита В .....	109
3.1.5. Динамика выявления анти-HBc среди различных возрастных групп условно-здорового населения Республики Тыва за период 2008-2019 годы.....	111
3.1.6. Динамика выявления anti-HBc среди различных возрастных групп условно здорового населения Республики Саха (Якутия) за период 2008-2019 годы.....	113
3.1.7. Анализ охвата вакцинацией против гепатита В новорожденных в Республике Саха (Якутия).....	116

3.1.8. Частота выявления анти-HDV у лиц с наличием HBsAg в различных возрастных группах условно здорового населения Республики Тыва и Республики Саха (Якутия) в 2008 и 2019 годы .....	119
3.2. Выявление маркеров инфицирования вирусами гепатитов В и D в биологических средах и сухой капле крови.....	121
3.3. Генотипы HDV и HBV у пациентов из эндемичных регионов РФ.....	126
3.3.1. Генотипы HDV.....	126
3.3.2. Генотипы вируса гепатита В у HBV-моноинфицированных и HBV/HDV-коинфицированных пациентов из эндемичных регионов РФ.....	129
3.3.3. Определение взаимосвязи между генотипами вирусов гепатита В и дельта у и HBV/HDV- инфицированных пациентов из Республики Саха (Якутия).....	135
3.4. Реконструкция истории распространения вируса гепатита дельта в мире и на территории Российской Федерации.....	136
3.4.1. Реконструкция истории распространения и длительности циркуляции вируса гепатита дельта в мире.....	142
3.4.2. Реконструкция истории распространения и анализ генетического разнообразия вируса гепатита дельта в эндемичных регионах Российской Федерации.....	148
3.4.3. Реконструкция истории распространения вируса гепатита В на территории Республики Тыва.....	159
3.5. Определение механизмов формирования семейных очагов HDV-инфекции в эндемичном регионе .....	164
3.6. Течение хронического вирусного гепатита дельта у жителей эндемичного региона.....	184
3.7. Летальные исходы хронического гепатита дельта.....	195
ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.....	203
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	235

ВЫВОДЫ.....	238
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	241
ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ.....	243
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	244
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	246
ПРИЛОЖЕНИЯ.....	291

## ВВЕДЕНИЕ

### Актуальность исследования

С момента открытия вируса гепатита дельта (Hepatitis Delta Virus, HDV) прошло более 40 лет. С тех пор было опубликовано множество работ, посвященных изучению биологии этого вируса, а также эпидемиологии и диагностике HDV-инфекции. Совершенствование методов детекции, от иммунофлуоресценции и первых шагов в создании диагностических иммуноферментных тест-систем до современных возможностей молекулярно-генетических исследований, позволило получить комплексное представление о проблеме вирусного гепатита D. 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.

В настоящее время из парентеральных вирусных гепатитов только гепатит В может быть предупрежден средствами специфической профилактики [305]. 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 [230]. 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) [231]. 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 (ХГD) 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 [17]. 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. Известно, что у больных гепатитом D фиброз печени прогрессирует быстрее, чем у пациентов с моноинфекцией гепатита В [33]. Механизмы патогенного действия HDV, связанные с более тяжелым течением заболевания печени и ускоренным развитием фиброза по сравнению с моноинфекцией HBV, остаются неясными [334].

Как и HBV, HDV передается при контакте с кровью или другими физиологическими жидкостями инфицированного человека [273]. Существуют свидетельства о половой передаче HDV [274], лица с рискованным сексуальным поведением являются группой повышенного риска инфицирования [334]. Возможна внутрисемейная передача HDV, являющаяся скрытой формой парентеральной передачи инфекции; она, по-видимому, широко распространена в эндемичных по HDV регионах [154]. При этом необходимо отметить, что вертикальная передача от матери ребенку происходит крайне редко. Как правило, заражение детей HDV происходит в раннем возрасте в виде суперинфекции на фоне полученной перинатально HBV-инфекции [275], хотя механизмы формирования семейных очагов HDV-инфекции мало изучены.

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, где частота коинфекции достигает 35% среди больных ХГВ [166, 276].

Причины широкой распространенности HDV в определенных регионах РФ остаются до сих пор невыясненными, так же как неизвестна история распространения вируса на этих территориях. После длительного периода недооценки значимости этой инфекции в настоящее время пришло понимание ее актуальности. Это связано с ростом миграции населения из эндемичных регионов, сохранением в мире широкой распространенности HBV и отсутствием специфической защиты от суперинфицирования HDV, а также ограниченными возможностями терапии этого тяжелого заболевания печени.

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 [48]. Массовая вакцинация против гепатита В приводит к уменьшению числа лиц, инфицированных HBV, и, как следствие, восприимчивых к HDV. В странах, где давно внедрена массовая иммунизация новорожденных против HBV, случаи заражения HDV среди детей и подростков практически не регистрируются, а большинство случаев инфекции относятся к лицам старших возрастных групп [48].

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 Российской Федерации 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 В, 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 В 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 филодинамического и филогеографического анализа.

5. Определить механизмы формирования семейных очагов HDV-инфекции в эндемичных регионах.
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 коинфицированных пациентов. Показано, что нет каких-либо предпочтений в преимущественном сочетании HBV и HDV у коинфицированных 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 филогенетических методов 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 геноизолята, так и в следствие 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 эндемичных регионах 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.

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, существует 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% 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 Ig ME/мл), аспартатаминотрансфераза (АСТ). Наличие детектируемой ДНК HBV и динамика биохимических маркеров: аланинаминотрансферазы (АЛТ), гаммаглутамилтранспептидазы (ГГТП), щелочной фосфатазы (ЩФ) и 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 В, 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 В 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 В, 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 В 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 инфекцией 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 прогностический фактор, определяющий 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» (2021 год).

### **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:

- 13<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (Washington, USA, 2009);
- 16-ая Российская гастроэнтерологическая неделя (Москва, 2010г.);
- EASL Monothematic Conference: Delta Hepatitis (Istanbul, Turkey, 2010);
- 16-й Конгресс «Гепатология сегодня» (Москва, 2011);
- 17-ая Российская гастроэнтерологическая неделя (Москва, 2011г.); IX Российская научно-практическая конференция «Гепатит В, С и D – проблемы диагностики, лечения и профилактики» (Москва, 2011);

- 13-ый Международный Славяно-Балтийский научный форум «Санкт-Петербург - Гастро-2011» (Санкт-Петербург, 2011);
- 17-й Конгресс «Гепатология сегодня» (Москва, 2012); Международная научно-практическая конференция «Фармацевтические и медицинские биотехнологии» (Москва, 2012);
- 14<sup>th</sup> International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (Shanghai, China, 2012);
- 15th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (ISVHLD). June 26-28, 2015, Berlin, Germany;
- VI Межрегиональная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы инфекционных болезней» 23 -24 июля 2016 г. (г. Кызыл, Республика Тыва)
- VII Межрегиональная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы инфекционных болезней» 25 июля 2017 г. (г. Кызыл, Республика Тыва)
- V Всероссийская междисциплинарная научно-практическая конференция с международным участием Сочи, РФ, 30 октября-2 ноября, 2018г;
- IX Межрегиональная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы инфекционных болезней» 6 августа 2018 г. (г. Кызыл, Республика Тыва)
- XI Ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням, Москва, РФ, 2019г;
- XII Всероссийская научно-практической конференция с международным участием «Вирусные гепатиты – достижения и новые перспективы», 19–20 сентября 2019г, (г. Москва);
- XXI Всероссийская научно – практическая конференция с международным участием «Актуальные вопросы эпидемиологии и инфекционных болезней «Шамовские чтения», 11-12 октября 2019 года, (г. Махачкала, Республика Дагестан);

- Первый конгресс инфекционистов СФЗО, 2-3 июня 2020 года (г. Санкт-Петербург);
- 20-я Российско-Итальянская конференция "Актуальные вопросы социально-значимых инфекционных и паразитарных заболеваний", 17-18 сентября 2020 года (г. Великий Новгород);
- XII Ежегодный Всероссийский интернет-конгресс по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: диагностика, лечение и профилактика», 7-9 сентября 2020 года (г. Москва);
- XIII Всероссийская научно-практической конференция с международным участием «Вирусные гепатиты – достижения и новые перспективы», 18–20 ноября 2021 года, (г. Москва);
- XIII Ежегодный Всероссийский конгресс по инфекционным болезням имени академика В.И. Покровского «Инфекционные болезни в современном мире: текущие и будущие угрозы» 24-26 мая 2021 года, (г. Москва)
- IX Межрегиональная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы инфекционных болезней - 2021 г.» 23 -24 июня 2021 года, (г. Кызыл, Республика Тыва);
- "Молекулярная диагностика 2021" 9-11 ноября 2021 года, (г. Москва);
- Бюро отделения профилактической медицины РАН 24 февраля 2022 года, (г. Москва).

Апробация диссертационной работы состоялась на конференции отдела вирусологии ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова 7.04. 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.

**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.

## Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1. Вирус гепатита дельта

В 1977 году группа ученых под руководством М. Rizzetto сообщила об обнаружении нового вирусного агента у пациентов с хроническим гепатитом В [254]. Проведенные спустя три года эксперименты на шимпанзе позволили установить, что дельта-антиген гепатита (HDAg) является структурным компонентом трансмиссивного патогена, которому необходим вирус гепатита В (HBV) для обеспечения его жизненного цикла [255]. Было показано, что вирусная частица состоит из белков оболочки HBV, окружающих структуру, подобную рибонуклеопротеину, содержащую HDAg и молекулу рибонуклеиновой кислоты РНК [256]. Дельта-агент получил статус отдельного вируса в 1983 году под официальным названием вирус гепатита дельта или HDV (hepatitis delta virus).

В 80-х годах было установлено, что геномная РНК HDV является одноцепочечной и кольцевой. В экспериментах на животных было показано, что печень инфицированных животных (шимпанзе, сурков) может содержать около 300 000 копий геномной цепи РНК в среднем на клетку, и по крайней мере часть этой РНК имеет кольцевую форму. В клетках печени также присутствовали виды РНК, которые были комплементарны РНК, содержащейся в вирионе. Геномной РНК было в несколько раз больше, чем антигеномной цепи. Некоторая часть антигеномной РНК образовывала комплекс с геномной РНК и имела кольцевую конформацию [56].

В 1986 году в журнале *Nature* была опубликована работа о структуре, нуклеотидной последовательности и экспрессии вирусного генома. На основании данных биохимических и электронно-микроскопических исследований авторы установили, что вирусный агент гепатита D человека содержит ковалентно замкнутый кольцевой и одноцепочечный геном РНК, который имеет определенное сходство с вириодоподобными агентами из растений. Тогда же определена последовательность вирусного генома (1678 нуклеотидов), и показано, что открытая рамка считывания в цепи, комплементарной геномной,



кодирует антиген, который специфически связывается с антителами от пациентов с хроническим гепатитом D [56, 335].

В 1987 году также в журнале *Nature* были представлены данные о клонировании и секвенировании геномной РНК HDV, выделенной после пассажей вируса в шимпанзе. Авторы задались вопросом, не привели ли пассажи в шимпанзе к изменению последовательности генома HDV человека, и выполнили клонирование и секвенирование РНК, выделенной непосредственно от пациента с острым гепатитом D. Полученная последовательность продемонстрировала значительное (на 11%) отклонение от последовательности HDV, адаптированной к шимпанзе.

Открытая рамка считывания (Open Reading Frame, ORF) в антигеномной РНК, которая кодирует 214 аминокислот, соответствует нуклеопротеину, или антигену HDV – HDAg [210]. После этого HDV был выделен в отдельный род *Deltavirus* [211].

Одним из важных вопросов оставался вопрос о механизме взаимодействия HDV с HBsAg. Известно, что HDAg представлен двумя формами, малой и большой, состоящими из 195 и 214 аминокислот, соответственно. Они идентичны по последовательности, за исключением того, что большой HDAg имеет дополнительные 19 аминокислот на своем С-конце и пренилирован [140].

Для того чтобы понять молекулярный механизм морфогенеза вириона HDV, в 1993 году S.B. Hwang с соавт. исследовали возможное прямое межбелковое взаимодействие между HDAg и HBsAg. Были сконструированы рекомбинантные бакуловирусы, экспрессирующие S-HBsAg и различные мутантные HDAg, которые затем использовали для анализа связывания белков. Авторы продемонстрировали, что HBsAg специфически взаимодействует с большим, а не с малым HDAg. Используя мутантные HDAg с нарушенным или aberrантным пренилированием, S.B. Hwang с соавторами показали, что для этого взаимодействия требуются изопренилаты цистеина на С-конце большого

HDAg. Одного изопренилирования без наличия С-концевых аминокислот большого HDAg оказалось недостаточно для взаимодействия с HBsAg [140].

Таким образом, уже к середине 1990-х годов была установлена структура вириона HDV и основные характеристики вирусного генома.

### 1.1.1. Общая характеристика вируса и структура вириона

HDV – единственный представитель рода *Deltavirus* и возбудитель хронического гепатита D представляет собой один из наименьших из известных вирусов человека и демонстрирует особые характеристики как в своей морфологии, так и в цикле репликации.

HDV - это сателлитный вирус HBV, так как для образования его вирусных частиц требуются белки оболочки HBV (HBsAg). Соответственно, инфекция HDV устанавливается либо как суперинфекция HBV, либо в результате одновременного контакта восприимчивого организма с HBV и HDV (коинфекция). В таблице 1 представлены обобщенные характеристики HBV и HDV. Важно отметить, что вследствие одинакового строения оболочки оба вируса используют одни и те же клеточные рецепторы: гепарансульфат протеогликан (HSPG) в качестве низкоаффинного рецептора и котранспортирующий таурохолат натрия полипептид человека (hNTCP) в качестве высокоаффинного рецептора [188, 232].

HDV — уникальный вирус, размножение которого в организме человека зависит от присутствия вируса-помощника — HBV [257]. Вирусная частица HDV состоит из нуклеокапсида, сформированного единственным собственным белком вируса, покрытого оболочкой, состоящей из поверхностных белков HBV (большого, среднего и малого S-белков, или HBsAg) [306]. Внутри нуклеокапсида находится геномная РНК HDV длиной всего примерно 1700 нт. [208].

Геном HDV представлен кольцевой одноцепочечной РНК отрицательной полярности, состоит в зависимости от штамма из 1672–1697 нуклеотидов и содержит одну ORF, кодирующую малый и большой дельта-антигены гепатита (S-HDAg, 24 кДа и L-HDAg, 27 кДа), которые транслируются с одного и того же

транскрипта [120, 336]. Изоформы HDАg различаются на 19 аминокислотных остатков, расположенных на С-конце L-HDАg, которые транслируются в результате редактирования стоп-кодона в мРНК ферментом аденозин дезаминаза ADAR1 [57].

Таблица 1. Характеристика вирусов гепатитов В и D

	Вирус гепатита В (HBV)	Вирус гепатита дельта (HDV)
Семейство	<i>Hepadnaviridae</i>	<i>Kolmioviridae</i>
Род	<i>Orthohepadnavirus</i>	<i>Deltavirus</i>
Геном	кольцевая частично двухцепочечная ДНК длиной 3200 нт.	одноцепочечная (-) РНК 1700 нт.
Белки, кодируемые вирусами	HBcAg, HBeAg, pol, HBx, L- / M- / S-HBsAg	L- / S-HDАg
Клеточные рецепторы	<i>HSPG, hNTCP</i>	<i>HSPG, hNTCP</i>

Обе формы антигена HDV, S-HDАg (195 аминокислотных остатков) и L-HDАg (214 аминокислотных остатков), связываются с геномной РНК, образуя комплекс вирусного рибонуклеопротеина [139, 256, 306]. Этот рибонуклеопротеин покрывается липидным бислоем, происходящим из эндоплазматического ретикулума клетки, несущим три оболочечных белка HBV: малый (S-) HBsAg, средний (M-) HBsAg и большой (L-) HBsAg, которые формируют внешнюю оболочку инфекционной частицы HDV (рисунок 1). Белки оболочки и рибонуклеопротеин (RNP) связываются через липидную фарнезильную группу на L-HDАg, которая напрямую связывается с цитоплазматической петлей S-HBsAg [56, 167].

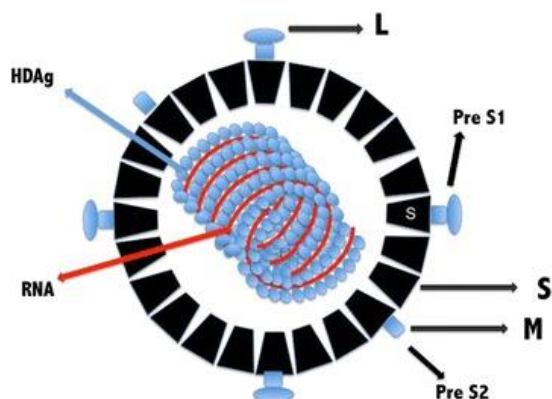


Рисунок 1. Структура вируса гепатита дельта [48].

Вирионы HDV представляют собой частицы примерно сферической формы диаметром 36 нм [35], содержащие рибонуклеиновую структуру, окруженную белками оболочки HBV и клеточными липидами. Показано, что S-HBsAg необходим для сборки частиц, а L-HBsAg определяет инфекционность, так как содержит домен, отвечающий за связыванием с рецептором на поверхности гепатоцита [295], в то время как M-HBsAg не критичен для сборки вириона или инфекционности HDV [278].

Показано, что S-HDAg активирует эффективность упаковки РНК HDV в капсид [337].

Схематическое изображение вирионов HBV и HDV представлено на рисунке 2. Оба вириона имеют одни и те же белки оболочки, S-, M- и L-HBsAg. L-HBsAg, состоит из S-HBsAg с двумя N - терминальными концами: preS2 и N -терминальный миристилированный preS1 [18]. В целом диаметр вириона HDV (36 нм) немного меньше диаметра инфекционной частицы HBV (42 нм), но значительно больше диаметра субвирусных частиц HBV (22 нм), которые обнаруживаются в избытке в сыворотке крови пациентов, инфицированных HBV.

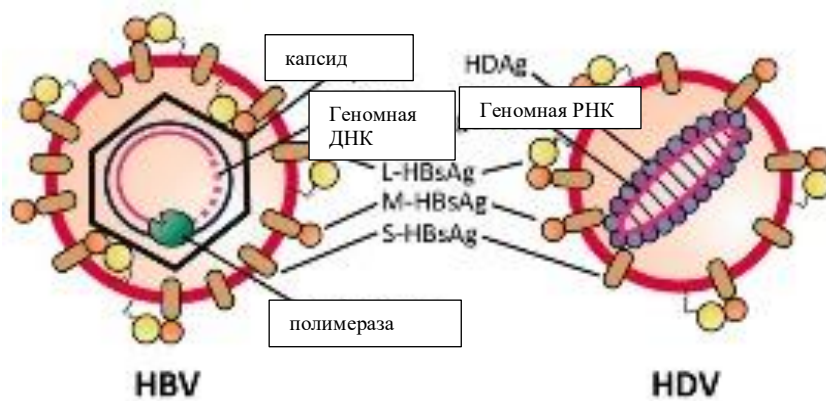


Рисунок 2. Схематическое изображение вирионов HBV и HDV [18].

Многие черты HDV — малый размер частицы (36 нм), геномная кольцевая РНК отрицательной полярности, репликация по типу «катящегося кольца», осуществляемая клеточной РНК-полимеразой, наличие рибозима в вирусной РНК, делают его подобным вироидам растений. Благодаря тому, что 74% пар оснований в геномной РНК HDV комплементарны, эта молекула имеет способность складываться в виде неразветвленной, двухцепочечной, стержнеобразной структуры [168]. Нуклеотид номер один при нумерации нуклеотидных позиций в геноме HDV был выбран произвольно с использованием уникального сайта рестрикции *Hind* III [210].

Геном содержит рибозимный домен, охватывающий нуклеотиды 680–780 и предполагаемый промоторный сайт для мРНК HDAg [36]. В то же время HDV принципиально отличается от вироидов наличием собственного белка (HDAg) [102, 307, 308].

### 1.1.2. Жизненный цикл вируса гепатита дельта

HDV и HBV демонстрируют отчетливый тропизм к клеткам печени за счет использования одних и тех же рецепторов на поверхности гепатоцита. После проникновения в пространство Диссе вирионы прикрепляются к клеточным гепаран-сульфатным протеогликанам (HSPG) с помощью домена preS1 L-HBsAg, а также антигенной петли S-домена, имеющегося у всех трех форм HBsAg [190, 202, 279, 280]. После взаимодействия с HSPG вирион связывается с высокоаффинным

гепатоцит-специфичным рецептором hNTCP с помощью миристилированного N-концевого участка preS1 L-HBsAg. Являясь гепатоцит-специфичным переносчиком солей желчных кислот с базолатеральной локализацией, hNTCP не только обеспечивает восприимчивость клеток печени как к HBV, так и HDV, но также является причиной строгой видоспецифичности этих двух вирусов, т.е. их неспособности инфицировать клетки печени других видов животных [232, 363].

HDV попадает в гепатоцит посредством пока плохо изученных процессов, и вирусная мембрана, скорее всего, сливается с плазматической мембраной, высвобождая рибонуклеопротеин (RNP). Попав в цитоплазму, геномный комплекс RNP транспортируется в ядро, руководствуясь сигналом ядерной локализации внутри HDAg [58, 309].

Репликация РНК происходит исключительно в ядре и осуществляется клеточными РНК-полимеразами (вероятно, РНК-полимераза II), поскольку HDV не кодирует собственную РНК-зависимую РНК-полимеразу [119, 59].

На рисунке 3 представлена общая схема жизненного цикла HDV. Репликация HDV происходит по механизму «катящегося кольца» [303, 310]. Первым этапом является синтез мультимерных линейных транскриптов кольцевой геномной матрицы. Впоследствии эти мультимерные линейные транскрипты расщепляются на мономеры автокаталитическими последовательностями саморасщепления, называемыми рибозимами. Далее мономерные РНК лигируются рибозимом в антигеномную мономерную кольцевую РНК, которая служит матрицей для нового цикла репликации по механизму «катящегося круга». Готовый продукт представляет собой кольцевую геномную РНК HDV [191].

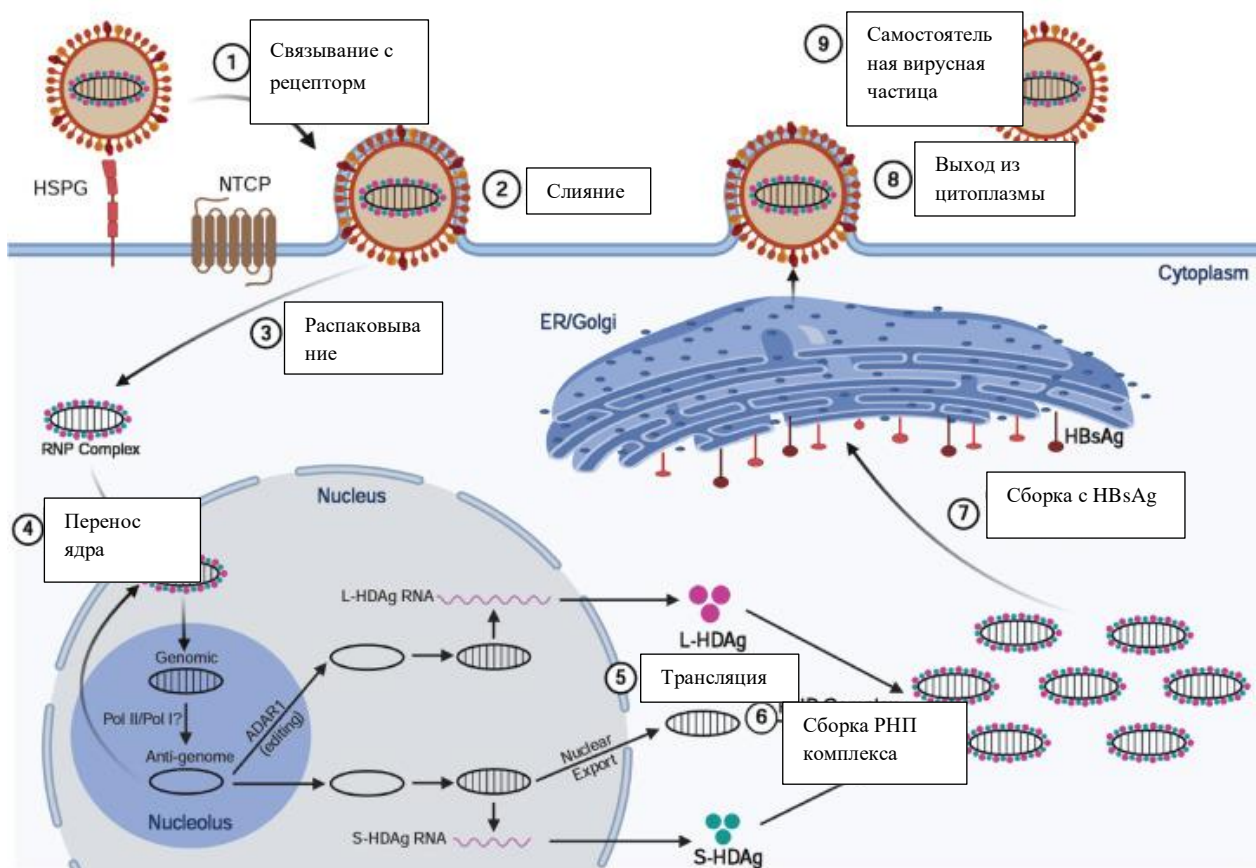


Рисунок 3. Общая схема жизненного цикла вируса гепатита D (ад. по [83])

ER – эндоплазматический ретикулум; NTCP – котранспортирующий полипептид таурохолата натрия; HSPG – гепаран-сульфат протеогликан; RNP – рибонуклеопротеин.

В ходе жизненного цикла HDV синтезируются три формы РНК: геномная, антигеномная и третья, меньшая по длине молекула, комплементарная фрагменту геномной РНК. Эта РНК содержит ORF, кодирующую HDAg [59]. Во время репликации геном и антигеном HDV складываются в характерную неразветвленную палочковидную структуру [57].

Обе формы HDAg транслируются в эндоплазматическом ретикулуме с ORF, расположенной на антигеномной цепи РНК HDV [338]. S-HDAg играет важную роль в репликации, поскольку он необходим для синтеза РНК, в то время как L-HDAg ингибирует синтез РНК и необходим для упаковки. Клеточная аденозиндезаминаза, действующая на РНК (ADAR), редактирует стоп-кодон,



превращая его в кодон триптофана. В связи с этим количество L-HDAg становится больше, в результате чего жизненный цикл вируса переключается с репликации на упаковку [57]. РНК HDV и белки HDAg взаимодействуют с образованием частицы рибонуклеопротеина (RNP) в молярном соотношении 1:200 [118, 273].

Посттрансляционная модификация изоформ HDAg важна для репликации HDV и сборки HDV [141, 192].

Одним из процессов посттрансляционной модификации является фарнезилирование, которое имеет решающее значение для сборки вириона HDV и послужило мишенью для разработки и испытания препарата лонафарниб. Находящийся на С-конце L-HDAg полипептид из 19 аминокислот включает С-концевой мотив CXXX (где С = цистеин и Х = любая аминокислота), который является субстратом для пренилтрансфераз [121, 122]. Фарнезил является одной из пренильных групп, которые могут быть добавлены с помощью фермента фарнезилтрансферазы в процессе, называемом фарнезилированием. Фарнезилирование способствует прикреплению RNP к мембране эндоплазматического ретикулума, где синтезируются белки оболочки HBV, а затем делает RNP более липофильным и более подверженным взаимодействию с HBsAg. С-концевой участок L-HDAg в значительной степени вариабелен в зависимости от генотипа HDV, что может играть ключевую роль в различной эффективности сборки вириона HDV разных генотипов. Возможно, с этим обстоятельством связаны различия в патогенности разных генотипов вируса [142, 193, 258]. Интересно, что белки оболочки HBV производятся в инфицированном гепатоците в избытке, поэтому, даже когда репликация HBV подавлена, новые вирионы HDV могут собираться в значительном количестве [60].

После сборки вирион HDV готов к высвобождению через сеть аппарата Гольджи и к инфицированию здоровых клеток печени. Однако точный механизм высвобождения вириона HDV остается неизвестным [121].



## 1.2. Эпидемиология гепатита дельта

Инфицирование HDV может происходить одновременно с заражением HBV (коинфекция), или в виде суперинфекции на фоне уже существующего хронического гепатита В. Одновременное инфицирование HBV и HDV может приводить к 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) [273].

Суперинфекция HDV при ХГВ, как правило, принимает хроническую форму, и ускоряет развитие более тяжелого заболевания в любом возрасте у 70-90% людей [17].

Дополнительным уникальным осложнением процесса инфицирования является то, что HDV может персистировать внутри печени в отсутствие HBV (данные получены при исследованиях *in vivo*). Такая моноинфекция HDV может сохраняться не менее 6 недель, а суперинфицирование HBV приводит к быстрому развитию виремии (до  $10^8$  копий РНК HDV и  $10^7$  копий ДНК HBV/мл). Этот процесс был экспериментально продемонстрирован на гуманизированных мышах, несущих гепатоциты человека [123]. Возможность моноинфекции HDV также подтверждают исследования, в которых описано присутствие антигена HDV в некоторых гепатоцитах человека в отсутствие детектируемых маркеров HBV-инфекции. Хотя репликация HDV в отсутствие HBV возможна, она не приводит к успешной продукции новых вирионов HDV. Однако даже такая непродуктивная HDV-инфекция может вызывать изменения в гепатоцитах, а именно - индукцию генов, определяющих снижение образования интерферона, что может способствовать развитию болезни [124]. По-видимому, моноинфекция HDV является скорее исключением из правила и происходит в случаях спонтанной элиминации вируса-хелпера (HBV) из организма, инфицированного HDV. Для циркуляции HDV в человеческой популяции наличие HBV является ключевым условием.

Как и HBV, HDV передается при контакте с кровью или другими физиологическими жидкостями инфицированного человека [273]. Эксперименты на шимпанзе продемонстрировали, что для инфицирования требуется незначительное количество инокула [248]. Существуют свидетельства о половой передаче HDV, лица с рискованным сексуальным поведением являются группой повышенного риска инфицирования [274]. Также возможна внутрисемейная передача вируса, являющаяся скрытой формой парентерального инфицирования; она, по-видимому, широко распространена в эндемичных по HDV регионах [154]. При этом необходимо отметить, что вертикальная передача от матери ребенку случается крайне редко.

Как правило, заражение детей HDV происходит в раннем возрасте в виде суперинфекции на фоне полученной перинатально HBV-инфекции [275]. В то же время, данные о внутрисемейной передаче HDV крайне ограничены, механизмы формирования семейных очагов инфекции требуют дальнейших исследований.

Данные о распространенности HDV в мире в целом и на отдельных территориях носят в значительной степени оценочный характер и основываются на результатах сероэпидемиологических исследований на ограниченных выборках. Так в 2012 году по примерным оценкам около 15 миллионов человек в мире имели хроническую коинфекцию HBV и HDV [259].

Показателем широты распространения HDV-инфекции служит частота выявления анти-HDV среди HBsAg-позитивных лиц. Именно на основании выявления суммарных анти-HDV (классов IgG и IgM) у HBsAg-позитивных лиц основана первичная диагностика гепатита D.

По уровню распространённости HDV-инфекции среди пациентов с хроническим гепатитом В регионы мира могут быть условно отнесены к одной из четырех зон:

- зоны высокой эндемичности — частота анти-HDV составляет свыше 50%;
- зоны средней эндемичности — частота анти-HDV составляет 30–50%;
- зоны низкой эндемичности — частота анти-HDV колеблется от 10 до 30%;

- зоны очень низкой эндемичности — частота анти-HDV не превышает 10% [244].

Географическое распределение зон эндемичности и распространенность в них генотипов HDV приведены на рисунке 4. По данным ВОЗ, районы с широкой распространенностью включают Средиземноморье, Ближний Восток, Пакистан, Центральную и Северную Азию, Японию, Тайвань, Гренландию, некоторые части Африки (в основном, Африканский Рог и Западную Африку), бассейн Амазонки и некоторые части Тихого океана. В Северной Америке, Северной Европе, Южной Африке и Восточной Азии распространенность невысокая [312].

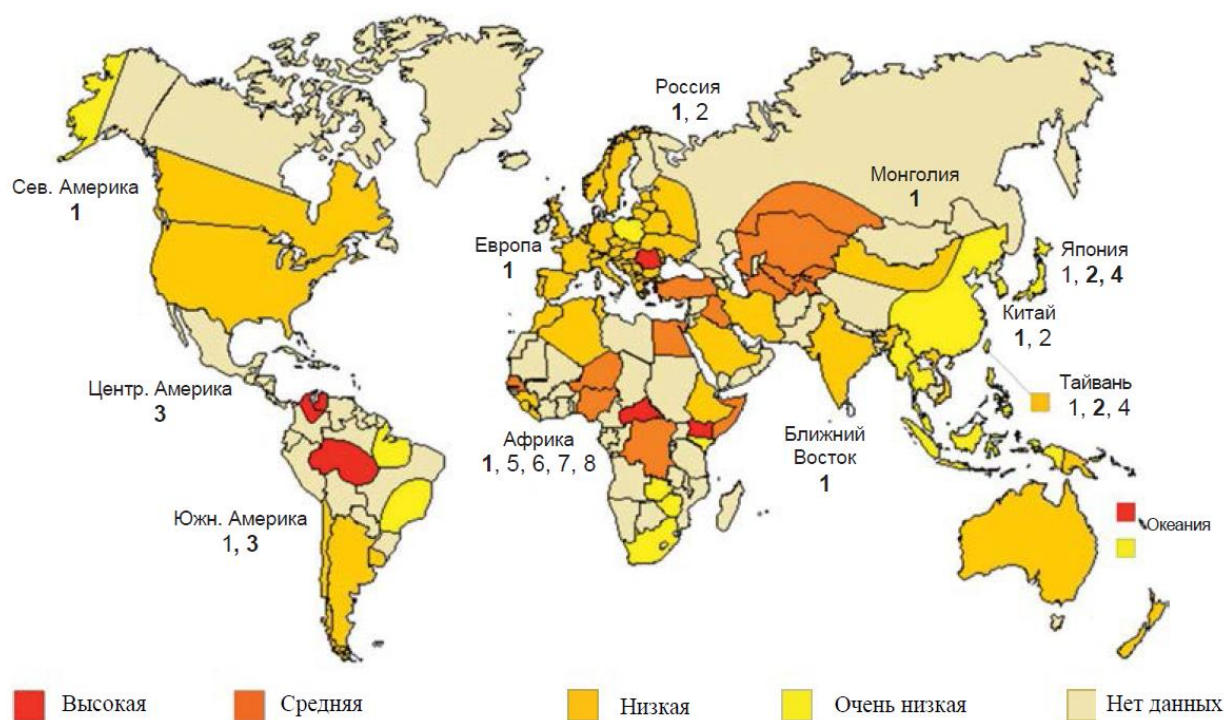


Рисунок 4. Распространенность вируса гепатита D в мире. Для каждого региона указаны встречающиеся генотипы вируса, доминирующие выделены жирным шрифтом (адаптировано из [260]).

Благодаря повышению настороженности медицинских работников в отношении гепатита D и улучшению возможностей лабораторной диагностики в настоящее время появляются данные о распространенности этой инфекции в развивающихся странах [312, 261].

В Монголии, где заболеваемость гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК) является самой высокой в мире [91], в последнее время была отмечена чрезвычайно высокая частота выявления анти-HDV – 67% среди HBsAg-положительных лиц, что составляет, по оценочным данным, 136 000 случаев заболевания гепатитом дельта по всей стране [212].

Схожие показатели частоты выявления антител обнаружены среди «носителей» HBsAg в Габоне, Камеруне и Нигерии. В последние годы анти-HDV были найдены более чем у 30% HBsAg-положительных лиц в Мавритании, у 50% HBsAg-положительных пациентов с циррозом печени (ЦП) из Центральной Африканской Республики и среди 11,4% HBsAg-положительных беременных женщин на севере Бенина [260].

Западный бассейн Амазонки, включая Бразилию, Перу, Эквадор, Венесуэлу и Колумбию, имеет один из самых высоких показателей инфицированности населения HDV в мире [61]. В Бразилии вспышки заболевания регистрируют преимущественно среди коренного населения страны [103, 326]. Недавнее исследование, проведенное в этой стране, показало, что почти треть (29,5%) пациентов с гепатитом В были коинфицированы HDV [61].

В таблице 2 представлены сводные данные по оценке распространенности анти-HDV среди HBsAg-положительных лиц в различных регионах мира. Необходимо отметить, что разработка новых методов диагностики (новый количественный анализ методом захвата антител с использованием микрочипов (Q-МАС) позволяет не пропустить 7,1% ложноотрицательных образцов, полученных при проведении исследования традиционным методом иммуноферментного анализа (ИФА) [62]. Эти результаты получены при проведении исследований по выявлению анти-HDV среди «носителей» HBsAg в Монголии.

Для оценки распространенности HDV с использованием модели случайных эффектов был проведен анализ баз данных с 1977 по 2016 годы [63]. Размер выборки составил около 40 млн. человек, проанализировано 182 статьи из 61

страны. Авторами показано, что в среднем в мире распространенность HDV-инфекции составила 0,98%; среди HBsAg – позитивных - 14,57%.

Таблица 2. Распространенность HDV-инфекции среди лиц, инфицированных HBV, в разных регионах мира

<b>Регион мира</b>	<b>Частота выявления анти-ВГD среди HBsAg (+), (%)</b>	<b>Источник</b>
<b>Бассейн Амазонки</b>	22,37%	C. Scarponi, 2019 [281]
<b>Западная Африка</b>	25% (Габон), 46,73% (Камерун) (из них 34,2% РНК+)	S. Gros, 2019 [125]; E.K. Butler, 2018 [37]
<b>Средиземноморский бассейн</b>	14,74 – 36,57% (в различных группах: ЦП/ГЦК)	N. Amini, 2013 [20 ]
<b>Восточная Европа</b> (Румыния)	23,1% (из них 16,4% РНК+)	L.Gheorghe, 2015[138]
<b>Западная Европа:</b>		
Италия	9,9%	T.Stroffolini, 2020 [282]
Испания	4%	V. Soriano, 2018 [283]
Франция	0,85% (из них 22,9% РНК+)	A. Servant-Delmas, 2014 [284 ]
<b>США</b>	3,4%	T. Kushner, 2015 [169]
<b>Монголия</b>	<b>67%</b>	X. Chen, 2017 [62]

Серопревалентность составила:

- в смешанной популяции без факторов риска – 10,58% (в 2 раза выше, чем оценивалось ранее),
- среди потребителей инъекционных препаратов (Intravenous drug users, IDU) – 37,57%,
- среди лиц с рискованным сексуальным поведением – 17,01%.

Глобальная распространенность инфекции, вызываемой HDV, неизвестна из-за применения разнородных и нестандартизованных методов скрининга и ограниченной доступности тестирования на многих территориях.

Зарегистрированные показатели распространенности занижены в связи с отсутствием проведения обязательного тестирования на наличие маркёров инфицирования HDV пациентов, инфицированных HBV, что приводит к отсутствию верификации диагноза.

В общенациональном исследовании, проведенном в США с участием 25 603 пациентов с HBV, только 8,5% пациентов когда-либо проходили тестирование на HDV [169].

Е.К. Manesis с соавт. сообщили, что только треть греческих пациентов с хроническим гепатитом В были тестированы на наличие анти-HDV [213].

По данным Е.Ι. Vouzidi с соавт., только у 40% британских пациентов с ХГВ определяли анти-HDV [96].

Если ранее считалось, что 248–292 млн. человек в мире инфицированы HBV и из них 15–20 млн. имеют хроническую HDV-инфекцию [259], то на основании опубликованного мета-анализа Н.Υ. Chen с соавт. становится очевидным, что 62–72 млн. человек в мире инфицированы HDV, что в 2 раза превышает распространенность (вируса иммунодефицита человека, ВИЧ), которая по данным ВОЗ в 2017 году составила 36,9 млн человек [63, 312].

Вероятно, распространение HDV, вероятно, можно было бы практически полностью предотвратить среди населения индустриальных стран, в которых

высок охват вакцинацией населения против гепатита В, но вирус возвращается в Западную Европу с мигрантами, прибывающими из эндемичных районов инфицирования, главным образом из Румынии, Турции, республик бывшего Советского Союза и Северной Африки.

Многочисленные исследования показали увеличение распространенности, вследствие миграционных потоков из эндемичных стран HDV в странах, где ранее вирус не был распространен [64, 65, 285]. Например, в Австралии у иммигрантов, родившихся в Африке, был отмечен более высокий риск инфицирования HDV, чем у коренных австралийцев [64]. По сообщению Т.Д. Cross и соавт., более половины пациентов с HDV в Великобритании являются выходцами из эндемичных регионов мира, включая Южную и Восточную Европу (28,1%), Африку (26,8%) и Ближний Восток (7,3%) [65]. В исследовании А. Servant-Delmas, проведенном среди доноров крови во Франции, также показан рост распространенности хронической HDV-инфекции, связанный с миграцией населения из эндемичных стран [284].

Эти данные свидетельствуют о сохранении актуальности HDV-инфекции даже для стран, традиционно считающихся благополучными по HBV и HDV.

В Российской Федерации об эпидемиологической ситуации в отношении HDV-инфекции можно судить только по результатам отдельных научных исследований, в стране отсутствует официальная регистрация гепатита D, а рекомендации по обязательному определению анти-HDV у лиц, инфицированных HBV, появились только в 2021 году [11]. Данные о широте распространения HDV в Российской Федерации, основанные на частоте выявления анти-HDV среди лиц, положительных по HBsAg, ограничены. Представленные ниже результаты исследований касаются определения частоты выявления анти-HDV в общей популяции и у больных ХГВ лишь в некоторых регионах РФ. Исследования, проведенные в Кабардино-Балкарии ещё в 1992 году, продемонстрировали, что распространенность HDV-инфекции среди больных ХГВ составила 6,4% [15].

В настоящее время в южных регионах РФ такие работы не ведутся, за исключением Республики Дагестан. В 2018 году на учёте в регистре по вирусным гепатитам в регионе состоял 2291 больной ХГВ, из них - 66 детей; анти-HDV среди HBsAg позитивных взрослых больных были выявлены в 5,3%, у детей – в 1,7% [10].

К началу данного исследования считалось, что HDV относительно редко встречается на территории Европейской части РФ, и широко распространен на отдельных территориях Азиатской части страны – в Республике Тыва, Саха (Якутия), на Чукотке, где частота коинфекции достигает 35% среди больных хроническим гепатитом В [16, 166, 170, 276].

К настоящему времени в исследованиях, проведенных в Республике Саха (Якутия) доктором В.Г. Кривошапкиным с соавт. отмечается, что 69% больных вирусным гепатитом D – это лица молодого возраста и прогрессирование в цирроз печени у таких пациентов составляет 53% [171].

Исследования по изучению эпидемиологии HDV проводят и в странах бывшего СССР (Республики Молдова и Узбекистан). Так, в Республике Молдова ежегодно фиксируется 1700 новых случаев выявления HBsAg, 3000 летальных исходов, 200 случаев ГЦК. При этом отмечен высокий процент выявления анти-HDV (25-27%) среди HBsAg-позитивных больных. [21]. М. Khodjaeva с соавт. при анализе баз данных за 2016–2018гг. в республике Узбекистан показали, что среди 3694 пациентов, имевших положительный результат выявления HBsAg, у 2984 (80,7%) обнаружены анти-HDV. В этой же работе отмечено увеличение числа пациентов с ЦП (HBsAg (+)) с 76,6% (834/1089) в 2016 году до 84,1% (1224/1455) – в 2018 году.

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



### 1.3. Генотипы вируса гепатита дельта и вируса гепатита В

Генетическое разнообразие HDV связано с географическим происхождением изолятов. В настоящее время на основании различий более 15-20% в последовательности геномной РНК выделяют 8 генотипов вируса, обозначаемых цифрами (от HDV-1 до HDV-8). Некоторые генотипы имеют от двух до четырех субгенотипов, обозначаемых как HDV-(X) a, b, c, d. [194].

Генотип HDV-1 распространен повсеместно, он часто выделяется в США, Европе и на Ближнем Востоке, а также встречается в России, Африке, Азии и Бразилии [260]. Субгенотип HDV-1d также распространен повсеместно и часто встречается в Европе и Азии, в то время как HDV-1a и -1b были идентифицированы только в странах Африки к югу от Сахары [194].

HDV-2, ранее известный как генотип ПА, встречается в Японии, Тайване и России [260, 157].

HDV-3 был выделен в Южной Америке (Перу, Колумбия, Эквадор и Бразилия). С этим генотипом связаны вспышки острого гепатита D с тяжелым течением среди коренного населения Амазонии. По-видимому, HDV-3 ассоциирован с более агрессивным характером инфекции [22].

HDV-4 встречается на Тайване и в Японии, генотипы 5, 6, 7 и 8 - в Африке [260].

В качестве мишени для молекулярно-биологических тестов качественного и количественного определения РНК используются наиболее консервативные участки генома – последовательность рибозима, а также область, кодирующую HDAg. Фрагмент R0 генома вируса гепатита D, выбранный для создания данных тест-систем и в настоящее время является «золотым стандартом» определения РНК HDV. На основании филогенетического анализа области генома R0 HDV для 2152 штаммов вируса и 116 полногеномных последовательностей F. Le Gal и соавт. показали, что существуют высококонсервативные функциональные нуклеотидные и аминокислотные мотивы во всех (под) генотипах вируса. Этот факт указывает на консервативные ограничения в структуре и функции генома и белка, что позволяет

подробно охарактеризовать генотипы и субгенотипы HDV. Авторы также утверждают, что в Африке отмечается наибольшее генетическое разнообразие HDV, и, предположительно, этот континент является центром происхождения данного вируса [194].

В настоящее время до начала наших исследований о распространении различных генотипов HDV на территории Российской Федерации известно очень мало. При исследовании данной проблемы практически 20 лет назад была установлена циркуляция HDV-1 в г. Самара [104]. На территории РФ в Республике Саха (Якутия) описана совместная циркуляция вариантов вируса HDV-1 и HDV-2 [157].

Однако генетические особенности HDV остаются плохо изученными, а существующие системы молекулярной классификации противоречивы [84].

Для уточнения молекулярной классификации HDV в настоящее время предложены стандартизованные эталонные геномы [214]. На основании филогенетического и генетического анализа, Z. Miao и соавт. предложили критерии идентификации нового генотипа и подтипа HDV. Во-первых, рекомендовано использовать стандартизованную полноразмерную антигеномную последовательность HDV. Во-вторых, должна быть исключена потенциальная рекомбинация. Наконец, филогенетическое группирование должно подкрепляться нуклеотидным сходством и генетическим расстоянием между генотипом или субгенотипом.

Отличительной чертой нового генотипа является сходство нуклеотидной последовательности с другими генотипами в диапазоне 60,0–81,5% и соответствующее межгенотипическое генетическое расстояние (p-distance) в диапазоне 0,200-0,360. Для нового субгенотипа сходство нуклеотидной последовательности и генетическое расстояние при сравнении с последовательностями других субгенотипов находятся в диапазоне от 81,5-91,0% и 0,090-0,200, соответственно).

Также необходимо отметить существование рекомбинантных форм вируса гепатита D [339, 66, 67]. События рекомбинации были обнаружены среди нескольких генотипов, но чаще встречались в HDV-1 и HDV-5. Для HDV-1 это можно объяснить его глобальным распределением в мире (рисунок 5). События рекомбинации для HDV-5 связаны с тем, что на Африканском континенте циркулируют практически все известные генотипы вируса (кроме HDV-3) и это обеспечивает возможность межгенотипных эволюционных отношений [194].

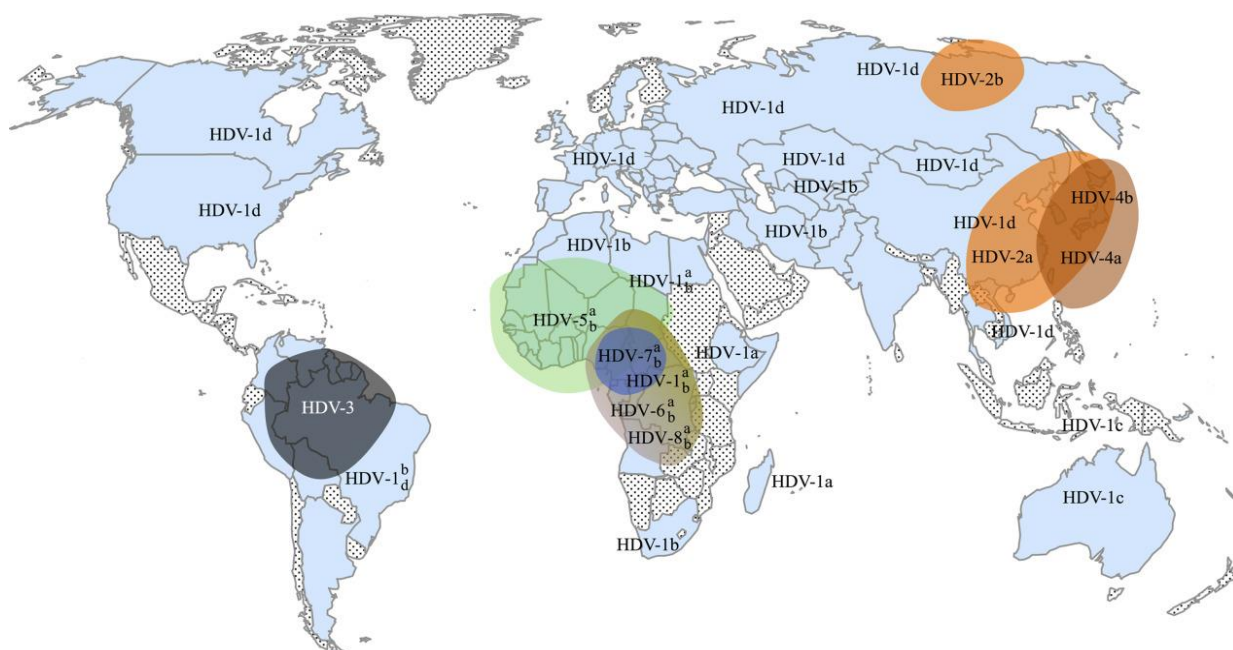


Рисунок 5. Распространение генотипов и подтипов HDV в мире. Страны, где распространен HDV-1 показаны голубым цветом. HDV-1a и HDV-1b распространены только в Африке и на Мадагаскаре, HDV-1c — на островах Океании, HDV-1d обнаружен на Ближнем Востоке, в Восточной и Западной Европе, Азии и Северной Америке. HDV-2 (оранжевый цвет) встречается в Азии, в том числе на Тайване и в Японии – HDV-2a, в Сибири – HDV-2b. HDV-3 (черный цвет) присутствует на севере Южной Америки. HDV-4a и HDV-4b (светло-коричневые) циркулируют на Дальнем Востоке. HDV-5, HDV-6, HDV-7 и HDV-8 (зеленый, пурпурный, синий и коричневый, соответственно) обнаружены в

западной, южнее Сахары и Центральной Африке. Пунктирные области обозначают регионы, в которых данные о HDV отсутствуют. Адаптировано из [194].

Карта распространения генотипов HDV в мире (рисунок 5) показывает, что доступные в настоящее время данные о генетическом разнообразии HDV остаются ограниченными и существующая классификация, вероятно, будет пересматриваться и дополняться по мере их накопления. В целом, представление о циркулирующих на тех или иных территориях вариантах/генотипах HDV необходимы для дальнейших исследований в области эпидемиологии, диагностики вирусного гепатита D и понимания эволюции самого вируса.

Хотя до сих пор всестороннее изучение клинической значимости генотипов HDV в больших когортах не проводилось, исследования на небольших группах пациентов показали, что генотипы HDV могут по-разному влиять на тяжесть коинфекции HDV/HBV [270].

J.C. Wu и соавт. в своих работах показали, что генотип HDV-2 реже ассоциировался с фульминантным гепатитом в острой стадии или с неблагоприятным отдаленным клиническим исходом в хронической стадии, чем генотип HDV-1 [340].

Механизмы, связывающие генотипы HDV с клиническими исходами, еще не выяснены. Генотипические вариации неравномерно распределены по последовательностям HDAg. Из этих вариаций сигнал упаковки на С-конце имеет расхождение в 74% между генотипами HDV-1 и HDV-2. В исследовании S.C. Hsu и соавт. оценивается влияние различий между генотипами на эффективность сборки частиц HDV и эффективность редактирования РНК. Вирусные системы трансфекции экспрессионными плазмидами поверхностного белка HBV и HDAg или целыми геномами HDV неизменно показывают, что эффективность сборки HDV-1 выше, чем у HDV-2. Замена сегментов L-HDAg указывает на то, что С-концевая область из 19 остатков играет ключевую роль в различной эффективности сборки. Кроме того, эффективность редактирования РНК для HDV-1 выше, чем у

HDV-2. Авторы показали, что нуклеотидные и структурные изменения, окружающие сайт редактирования, могут объяснить, почему HDV-2 имеет низкую эффективность редактирования РНК. Результаты систем сборки *in vitro* были дополнительно подтверждены наблюдениями, свидетельствующими о значительно более низких уровнях аланинтрансаминазы (АЛТ) у инфицированных HDV-2, более благоприятных исходах и тенденциях к более низким уровням РНК HDV в сыворотке крови по сравнению с инфицированными HDV-1. Таким образом, при инфекции, вызванной HDV-2, секретируется меньше вирусных частиц, чем при инфекции, вызванной генотипом HDV-1 [142].

Актуальность определения генотипа HBV обусловлена его возможной взаимосвязью с тяжестью течения, вариантами лечения и прогнозом исхода заболевания [38, 172, 243].

В результате эволюции HBV сформировались десять известных в настоящее время генотипов (А - J), отражающих особенности географии возбудителя и различающихся по геномной последовательности более чем на 8% [38, 173, 174, 195].

Генотипы HBV связаны с различными клиническими особенностями инфекции и прогнозом заболевания. Так, некоторые исследования показали, что, по сравнению с генотипами В и С, инфекция, вызванная HBV-А, преимущественно прогрессирует до хронического гепатита В [216], генотипом D - вызывает острый гепатит [68]. При генотипе В чаще развивается резистентность к антивирусным препаратам, чем при генотипе С, в то же время с генотипом С связан более высокий риск развития ГЦК по сравнению с генотипом В [143].

На основании вышесказанного становится очевидным вопрос о возможности предпочтительного сочетания генотипов HBV и HDV при инфицировании организма. В исследовании значительной группы пациентов (1590 человек) V. Williams и соавт. идентифицировали шесть генотипов HBV: HBV/А (11,8%), HBV/В (1,7%), HBV/С (0,6%), HBV/Д (42%), HBV/Е (42,2%) и HBV/Г (1,7%) из

разных регионов мира, большинство из них (50,8%) из стран Африки к югу от Сахары. Они были ассоциированы с семью генотипами HDV: HDV-1 (78,9%), HDV-2 (0,4%), HDV-3 (0,2%), HDV-5 (13,7%), HDV-6 (1,3%), HDV-7. (4%) и HDV-8 (1,5%). Обнаружены некоторые неожиданные ассоциации, такие как: европейский генотип HBV/A2, ассоциированный с африканским генотипом HDV-8 у пациента из Габона; азиатский HBV/C – с африканским HDV-5 у пациента из Сьерра-Леоне и HBV/G – с африканским HDV-7 у камерунского пациента. Точно также генотипы HDV, такие как африканский HDV-1 и HDV-5-8, происходящие из Африки, обнаруживаются в европейских восточных или западных странах, и, наоборот, европейские генотипы HDV-1 наблюдаются у африканских пациентов, что отражает миграцию популяций.

Необходимо отметить, что из 1590 HDV-положительных образцов коллекции V. Williams только 526 ампликонов HBV (33,1%) удалось получить с помощью чувствительной вложенной ПЦР. Низкая эффективность амплификации ДНК HBV, вероятно, связана с ингибированием репликации HBV, вызванным коинфекцией HDV. Показано, что малый (p24) и большой (p27) белки ВГД подавляют репликацию ВГВ, снижая активность двух энхансерных участков генома ВГВ, а также за счет трансактивации индуцируемого интерфероном гена MxA, подавляющего репликацию ВГВ путем уменьшения экспорта вирусных мРНК из ядра. При элиминации ВГД, спонтанной или в результате интерферонотерапии, репликация ВГВ восстанавливается [341].

Совсем недавно было показано, что все известные комбинации генотипов HBV и HDV (от HBV/A до H и от HDV-1 до -8) функциональны *in vitro* [105]. Также при исследовании в модели *in vitro* было описано, что разные пары генотипов HBV и HDV различаются с точки зрения уровня активности инфекции, однако наиболее продуктивные комбинации не коррелировали с естественным географическим распределением генотипов обоих вирусов, что свидетельствует против

эволюционной адаптации рибонуклеопротеинового комплекса HDV к белкам оболочки HBV [342].

Таким образом, еще предстоит оценить с помощью более крупных исследований как *in vivo*, так и *in vitro*, являются ли продемонстрированные *in vitro* более адапционно удачные комбинации генотипов HBV/HDV прогностическим фактором тяжести заболевания. В случае моноинфекции HBV генотипы С, D и F связаны с более высоким пожизненным риском развития цирроза печени и ГЦК по сравнению с генотипами А и В [196].

HBV/F часто описывается как генотип, ассоциированный с агрессивным течением инфекции, что отражается в морфологических изменениях ткани печени и в высоком риске развития ГЦК, а также в увеличении смертности [217].

Интересно, что HDV-3, часто связанный с HBV/F, приводит к развитию фульминантного гепатита [218].

Определение генотипа HBV молекулярными методами в образцах крови пациентов с гепатитом D может быть затруднено в связи с недетектируемой концентрацией ДНК HBV, поскольку при коинфекции HDV/HBV зачастую происходит подавление репликации HBV при сохранении высоких уровней экспрессии HBsAg [286, 313].

Описаны три различных типа хронической инфекции HBV/HDV. У большинства пациентов наблюдается активная репликация HDV при подавленной репликации HBV; при этом они являются HBeAg-отрицательными [343]. Подобный феномен присутствует и у пациентов с коинфекцией HCV/HDV/HBV: присутствие HDV способствует подавлению репликации HCV [144]. У многих пациентов с преобладающей репликацией HDV вирусная нагрузка HBV может быть даже неопределяемой, что зависит от чувствительности метода детекции. Так, в когорте из 126 пациентов с хроническим гепатитом D ДНК HBV не была

выявлена у 67% пациентов [233] при достаточно высоких концентрациях HBsAg в этих образцах [376].

Предсказать генотип HBV в HBsAg-положительных образцах можно с помощью определения серотипа HBsAg методом иммуноферментного анализа с панелью моноклональных антител (МАТ) [324].

Отечественные реагенты (лабораторные версии тестов), позволяющие определять основные циркулирующие на территории РФ генотипы HBV (A, C, D), разработаны относительно недавно [39] и нуждаются в валидации на представительных выборках клинических образцов, что явилось одной из задач настоящего исследования. Данный подход позволит восполнить пробел в знаниях о генотипах HBV и о возможном их влиянии на течение и исходы HDV-инфекции.

#### **1.4. Происхождение вируса гепатита дельта и дельта-подобные вирусы животных**

Вопрос происхождения и распространения HDV в человеческой популяции на сегодняшний день остается открытым. До недавнего времени отсутствовали данные о существовании каких-либо вирусов, подобных HDV человека. Это оказало большое влияние на теории его происхождения и эволюции [145, 344]. Ещё в 1996 году обсуждался вопрос о том, что капсидный белок HDV (HDAg) имеет сходство последовательностей с белками человека [40]. В 2006 году К. Salehi-Ashtiani с соавт. предположили, что HDV, возможно, возник как ускользнувший человеческий ген [287]. Также было высказано предположение, что рибозим HDV произошел от интрона в гене белка 3, связывающего цитоплазматический элемент полиаденилирования человека, или что он произошел от кольцевой клеточной РНК, обнаруженной в гепатоцитах [314]. Однако обнаружение в последние годы последовательностей новых дельта-подобных вирусов у широкого спектра видов позвоночных и беспозвоночных [69] позволило пересмотреть взгляды на



происхождение HDV и способствовало пониманию места этого уникального вируса среди вирусов животных. Ниже приведен анализ недавно опубликованных данных, посвященных новым HDV-подобным вирусам и их биологической характеристике.

#### **1.4.1. Дельта-подобные вирусы животных**

Первым шагом на пути к изучению разнообразия дельтавирусов стало открытие HDV-подобных вирусов у птиц в 2018 году [344] и у змей в 2019 году [146]. M.Wille с соавт. проанализировали данные, полученные при анализе смешанных образцов из ротоглоток и клоак уток, отобранных в 2012 -2013 годы при отлове водоплавающих птиц Австралии. В результате методом сборки полноразмерного транскриптома из данных секвенированных РНК без использования эталонного генома были получены 15 последовательностей РНК HDV-подобного вируса птиц (avHDV). Авторы представили сравнительные характеристики геномов HDV человека и дельта-подобного вируса птиц, показали сходства и различия в их строении. Также авторами была высказана гипотеза о возможности непарентеральной передачи вируса. Важно отметить, что в наборе последовательностей, содержащем геном avHDV, отсутствовали последовательности ортогепаднавируса уток, который, исходя из аналогии с HDV человека и HBV, казалось бы, был необходим в качестве вируса-помощника для дельта-вируса птиц.

U. Hetzel с соавт. открыли HDV-подобный вирус у змей (sHDV) [146]. В качестве образцов для исследования были взяты мозг, кровь и печень пары удавов и их потомства, а также водяного питона из той же колонии змей. Было установлено, что РНК sHDV длиной 1711 нуклеотидов имеет кольцевую структуру, напоминающую таковую HDV человека. Аминокислотная последовательность антигена sHDV (sHDAg) имела 55% и 37% сходства с антигенами HDV (HDAg) и

avHDV (avHDAg), соответственно. Доказательством активной репликации sHDV послужили следующие данные: вирусная РНК обнаруживалась в различных количествах в разных тканях; вирус обнаруживался у некоторых, но не у всех потомков (вертикальная передача <100%); уровень экспрессии sHDAg варьировал в положительных клетках, при этом экспрессия sHDAg наблюдалась не в каждой клетке; большая и малая формы sHDAg (L- и S-) присутствовали в печени, но только L-sHDAg обнаруживался в головном мозге. Выявление авторами РНК sHDV у потомства водяного питона, содержащегося вместе с инфицированными удавами, позволили сделать предположение как о вертикальной, так и о горизонтальной передаче вируса.

Новые HDV-подобные вирусы позвоночных и беспозвоночных были описаны в 2019 году W.S. Chang с соавт. [69]. Авторами был проведен скрининг на HDV-подобные вирусные последовательности в обедненных рибосомальной РНК (рРНК) библиотеках кДНК амфибий, рыб, рептилий и беспозвоночных, полученных ранее [288, 289]. Все идентифицированные HDV-подобные последовательности образовывали самокомплементарные, неразветвленные палочковидные структуры. Поиск консервативных доменов продемонстрировал, что предсказанные дельта-антигены в HDV-подобных вирусах тритона (amHDAg), жабы (tfHDAg), рыб (fiHDAg) и термитов (tHDAg) кодировали белки из 225, 186, 180 и 184 аминокислотных остатков, соответственно.

В 2021 году список HDV-подобных вирусов был расширен еще больше – М. Iwamoto с соавт. идентифицировали новые дельтавирусы у воробьиных птиц, сурков и белохвостых оленей с помощью мета-транскриптомного анализа [158]. Всего авторами было описано 5 вирусов – tgDeV (вирус зебровой амадины (*Taeniopygia guttata*)), scDeV (вирус домашней канарейки (*Serinus canaria*)), egDeV (вирус Гульдовой амадины (*Erythrura gouldiae*)), mmDeV (вирус восточного сурка (*Marmota monax*)) и vDeV (вирус белохвостого оленя (*Odocoileus virginianus*)). Кроме того, подобные tgDeV последовательности были идентифицированы

авторами еще у нескольких воробьиных птиц - черноголовой овсянки (*Emberiza melanocephala*) и желтобрюхой синицы (*Pardaliparus venustulus*). Последовательности tgDeV, mmDeV и ovDeV, содержавшие приблизительно 1700 нуклеотидов, кодировали одну открытую рамку считывания с последовательностью, аналогичной последовательностям генов DAg известных дельтавирусов. Аминокислотные последовательности, транслируемые из полученных нуклеотидных последовательностей, были на 36,0–66,7% идентичны белкам DAg известных дельтавирусов. Авторами было установлено, что глубина считывания предсказанных транскрибируемых областей (участков, кодирующих DAg) была намного больше, чем у других участков генома, что указывает на то, что большинство прочтений вирусного генома происходило из вирусных мРНК. Эти данные являются косвенным подтверждением того, что новые дельтавирусы реплицируются в своих хозяевах.

Выполненный авторами филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей HDV человека и новых HDV-подобных вирусов опроверг первоначальное предположение о длительной коэволюции дельтавирусов и их хозяев. Так, нуклеотидные последовательности tgDeV, выделенные от разных видов воробьиных птиц, отделившихся от общего предка более 40 миллионов лет, оказались схожими между собой более чем на 98%. Для дельтавирусов млекопитающих также было показано несоответствие топологии филогенетических деревьев с эволюцией предполагаемых видов-хозяев. Так, выявленный у оленей вирус ovDeV оказался наиболее близким HDV человека, а выявленный у сурков вирус mmDeV продемонстрировал значительную эволюционную дистанцию от другого дельтавируса, обнаруженного ранее S. Paraskevopoulou с соавт. у грызунов [249]. Эти данные указывают на вероятную передачу дельтавирусов среди разных видов животных и их эволюцию в результате межвидового перехода.

Таким образом, в настоящее время описано значительное количество вирусов, подобных HDV человека. Это привело к необходимости классифицировать дельтавирусы. В результате Р.Д. Walker с соавт. предложили выделить все дельтавирусы в новое семейство *Kolmioviridae*, включающее в себя род *Deltavirus* и семь новых родов, содержащих 15 видов [345].

#### 1.4.2. Биологические свойства новых дельта-подобных вирусов

Следует отметить, что новые HDV-подобные вирусы выявляются не только в клетках печени. Они были обнаружены одновременно в разных органах и в крови животных, и продемонстрировали способность реплицироваться в клетках разных типов [290]. По-видимому, дельтавирусы способны инфицировать ткани разных типов и вызывать системную инфекцию и виремию. Кроме того, змеиный sHDV оказался способным реплицироваться в клетках млекопитающих [290], а дельтавирусы tgDeV и mmDeV - в клетках человека [158]. В таблице 3 представлены характеристики геномов известных в настоящее время дельта-подобных вирусов в сравнении с геномом HDV человека.

Таблица 3. Сравнительная характеристика геномов HDV человека и HDV-подобных вирусов.

Хозяин	Год открытия вируса	Вирус	Размер генома (нт)	Содержание GC (%)	Сходство аминокислотных последовательностей с HDV (%)	Тип рибозима
Человек ( <i>Homo sapiens</i> )	1977	<i>HDV</i>	1700	60	-	HDVR
Водоплавающие птицы ( <i>Anseriformes</i> )	2018	<i>avHDV</i>	1706	51	32,2	ННР типа I, II
Ложноногие змеи ( <i>Boidae</i> )	2019	<i>sHDV</i>	1711	53,3	55	нет данных

Хозяин	Год открытия вируса	Вирус	Размер генома (нт)	Содержание GC (%)	Сходство аминокислотных последовательностей с HDV (%)	Тип рибозима
Карликовый тритон ( <i>Cynops orientalis</i> )	2019	<i>amHDAg</i>	1735	53,8	23	Атипичный ННР типа III,
Жаба ( <i>Bufo</i> )	2019	<i>tfHDAg</i>	1547	54,3	26	Атипичный ННР типа III,
Рыбы (лучеперые, хрящевые и бесчелюстные) ( <i>Actinopterygii</i> , <i>Chondrichthyes</i> , <i>Agnatha</i> )	2019	<i>fiHDAg</i>	1606	46,3	23	Атипичный ННР типа III,
Термиты ( <i>Insecta</i> )	2019	<i>tHDAg</i>	1591	56,8	26	Атипичный ННР типа III,
Восточный сурок ( <i>Marmota monax</i> )	2021	<i>mmDeV</i>	1712	53,4	60	ННР I, II класса
Белохвостый олень ( <i>Odocoileus virginianus</i> )	2021	<i>ovDeV</i>	1690	56,4	66,7	ННР I, II класса
Зебровая амадина ( <i>Taeniopygia guttata</i> )	2021	<i>tgDeV</i>	1706	56,6	63,3	ННР I, II класса
Домашняя канарейка ( <i>Serinus canaria</i> )	2021	<i>scDeV</i>	761*	54,4	36	ННР I, II класса
Гульдова амадина ( <i>Erythrura gouldiae</i> )	2021	<i>egDeV</i>	596*	59,4	62,4	ННР I, II класса
Желтобрюхая синица ( <i>Pardaliparus venustulus</i> )	2021	<i>pvDeV</i>	1708	55,8	62,4	ННР I, II класса
Бенгальский зяблик <i>Lonchura striata</i> var. <i>domestica</i>	2021	<i>IsDev</i>	1708	56,2	62,9	ННР I, II класса

\*- известна только частичная нуклеотидная последовательность генома

Для всех выявленных в настоящее время геномных последовательностей HDV-подобных вирусов характерны черты, присущие HDV человека – одноцепочечная РНК длиной 1500-1700 нуклеотидов, кольцевая палочковидная структура, самокомплементарность, наличие одной открытой рамки считывания, кодирующей DAg, и присутствие последовательности, кодирующей рибозим.

Первоначально HDV-подобные рибозимы были описаны только у дельтавирусов амниот [145, 249, 344], но не у вирусов амфибий, рыб и беспозвоночных [69]. Однако позднее М. de la Peña с соавт. обнаружили характерные для HDV последовательности рибозимов у дельтавирусов тритонов и рыб [85]. Кроме того, у HDV-подобных вирусов жаб и термитов этой группой авторов были обнаружены рибозимы другого класса (hammerhead-рибозимы III типа), характерные для растений и виридов растений. Полученные в условиях *in vitro* транскрипты последовательностей, кодирующих предполагаемые рибозимы, продемонстрировали способность к самонарезанию, что подтвердило функциональность обнаруженных мотивов.

Таким образом, у всех описанных к настоящему времени HDV-подобных вирусов обнаружены рибозимы.

Для HDV человека характерно наличие двух форм DAg – малой (S-HDAg величиной 24 кДа) и большой (L-HDAg величиной 27 kDa). Обе формы транслируются с одной мРНК, при этом L-HDAg синтезируется в результате редактирования клеточным белком ADAR1 стоп-кодона, заменяемого на кодон триптофана. Дополнительные 19 аминокислотных остатков на С-конце L-HDAg содержат сайт пренилирования, необходимый для связывания с поверхностным белком HBV [315]. В отличие от HDV человека, у большинства HDV-подобных вирусов, в том числе наиболее эволюционно близкого HDV человека дельтавируса оленя (ovDeV), не обнаружено редактирование РНК, приводящее к образованию L-HDAg, способного связываться с поверхностными белками гепаднавирусов [158, 249, 289, 344].

### 1.4.3. Возможные вирусы-помощники новых дельта-подобных вирусов

HDV человека требует обязательной вспомогательной функции для сборки, репликации и инфекции *in vivo*, обеспечиваемой поверхностными белками HBV, которые формируют внешнюю оболочку рибонуклеопротеина HDV [208]. HBV не является единственным вирусом, белки которого могут использоваться HDV человека для формирования инфекционной вирусной частицы, по крайней мере в экспериментальных условиях. Эту функцию могут выполнять поверхностные белки другого гепаднавируса - вируса гепатита сурков (Woodchuck Hepatitis Virus, WHV), что обеспечивает возможность экспериментальной коинфекции HDV/WHV [106]. Более того, в экспериментах *in vitro* было показано, что белки оболочки вирусов из нескольких родов, включая везикуловирусы, флавивирусы и гепацивирусы, могут образовывать внешнюю оболочку рибонуклеопротеина HDV, обеспечивать успешную продукцию вирионов HDV в коинфицированных клетках и последующее проникновение в клетки, экспрессирующие соответствующие рецепторы [250].

До сих пор не обнаружено какой-либо связи между HDV-подобными вирусами животных и гепаднавирусами. Несмотря на то, что связь с HBV считается ключевым явлением в биологии HDV человека, ни один из недавно описанных дельтавирусов не был выявлен в связи с коинфекцией гепаднавирусов. Даже дельтавирус сурков (mmDeV) был обнаружен у животных, не имевших инфекции WHV, что исключает возможность функционирования данного гепаднавируса в качестве вируса-помощника [158]. Вместо этого ряд последовательностей других вирусов был выявлен в соответствующих библиотеках, где присутствовали последовательности дельтавирусов. Так, с последовательностями HDV-подобного вируса рыб были ассоциированы аренавирусы, хантавирусы и реовирусы; астровирусы присутствовали в библиотеках, содержащих последовательности HDV-подобного вируса тритонов, а вместе с последовательностями дельтавируса

жабы были идентифицированы последовательности вируса гриппа и астровируса [289].

Содержащие последовательности дельтавируса библиотеки термитов также содержали множество других вирусов (таких как вирус, подобный вирусу Мононега-Чу, вирус, подобный Нарна-Леви и флави-подобный вирус), в отношении которых в настоящее время проводятся углубленные исследования [69]. Пока неизвестно, помогают ли какие-либо из этих вирусов репликации новых HDV-подобных агентов.

U. Hetzel с соавт. показали, что белки вирусной оболочки двух вирусов - рептаренавируса и хартмановируса, но не гепаднавируса, придают инфекционность дельтавирусу змеи (sHDV) [146]. Для других дельтавирусов животных вирусы-помощники пока не установлены. Кроме того, не исключается возможность того, что некоторые HDV-подобные вирусы могут обходиться без вирусов-помощников и осуществлять выход и вход в клетку через неизвестные пока механизмы или использовать для этого внеклеточные везикулы.

Таким образом, гепаднавирусы не служат в качестве вспомогательных для дельтавирусов, отличных от HDV человека, и взаимоотношения дельтавирус-гепаднавирус, по-видимому, были приобретены HDV человека уже после отделения его от линии дельтавирусов животных.

#### **1.4.4. Происхождение HDV человека**

Накопленные к настоящему времени данные свидетельствуют, что HDV человека входит в довольно обширную группу дельтавирусов и, очевидно, произошел от дельтавирусов млекопитающих. В то же время, эволюция дельтавирусов намного сложнее, чем считалось ранее, и не всегда является результатом параллельного развития вируса и хозяина. Различия в топологии филогенетических деревьев дельтавирусов и макроорганизмов позволяют



предполагать, что межвидовые переходы являются значимой движущей силой в эволюции дельтавирусов.

На основании имеющихся в настоящее время данных невозможно предположить, от какой группы животных человек приобрел HDV. Дельтавирусы до сих пор не обнаружены у приматов, в том числе у человекообразных, что указывает на вероятность возникновения HDV в результате смены хозяина [234]. Наиболее эволюционно близкими HDV человека из известных в настоящее время вирусов являются дельтавирусы оленя (*Odocoileus virginianus*), сурка (*Marmota monax*) и летучей мыши вампира (*Desmodus rotundus*) [41], однако нельзя исключить возможность возникновения HDV в результате заражения человека неизвестными дельтавирусами млекопитающих, филогенетически расположенными между этими вирусными линиями.

Таким образом, открытие дельтавирусов животных позволило определить место HDV среди РНК-содержащих вирусов животных и предположить, что этот уникальный вирус был приобретен человеком в результате межвидового перехода. Вместе с тем, понимание возникновения и эволюции HDV еще крайне ограничено.

### **1.5. Лабораторная диагностика гепатита дельта**

На первых этапах после открытия HDV в 1977 году диагностика данной инфекции основывалась на иммуногистохимическом окрашивании HDAg в биоптатах печени [254]. В настоящее время этот метод исследования считается недостаточно информативным, а также слишком сложным и инвазивным для использования в целях диагностики.

Вскоре после открытия вируса стало доступным определение антител к HDAg (анти-HDV) классов IgM и IgG в сыворотке крови, что позволило выделить две стадии инфекции HDV: острую и хроническую [260]. Однако определение сывороточных анти-HDV IgM и IgG с целью дифференциации стадии инфекции

оказалось неэффективным, поскольку анти-HDV IgG могут обнаруживаться при острой HDV-инфекции, а антитела класса IgM зачастую обнаруживают при хронической HDV [233, 264, 316].

Необходимо отметить, что высокий уровень анти-HDV IgM в крови пациента свидетельствует о высокой репликативной активности вируса и прогрессировании заболевания [346].

В настоящее время основным инструментом серологической диагностики гепатита D является определение суммарных анти-HDV (IgG+IgM). Именно этот маркер является скрининговым для первичной лабораторной диагностики HDV-инфекции у HBsAg-позитивных лиц.

Известно, что в инфицированном HDV организме больного ХГВ одновременно циркулируют антитела к антигенам обоих возбудителей - анти-HDV, анти-HBc, а также обязательно наличие HBsAg. Можно предположить, что анти-HDV, наряду с маркерами ГВ, присутствуют и в образцах слюны и сухой капли крови (СКК) больных ХГВ и D, однако исследования по выявлению анти-HDV в таких образцах ранее не проводились. Очевидно, что биологический материал инфицированного человека (например, образцы слюны или СКК) могут служить объектом исследования как в серологических, так и в молекулярных тестах. Эти альтернативные типы образцов преимущественно используются для диагностики и мониторинга терапии хронических вирусных заболеваний, таких как вирусные гепатиты В и С, ВИЧ в регионах, где дорогостоящая лабораторная медицинская инфраструктура на местах не может быть использована по экономическим причинам, а также в силу удаленности от крупных лабораторий [147, 220, 304, 332].

Тестирование с использованием образцов СКК намного проще и не требует удаления клеточных компонентов [304, 220]. HBsAg и анти-HBc успешно выявляются и в слюне, однако результаты могут различаться в зависимости от методики сбора ротовой жидкости и метода обнаружения маркера [77, 149, 317, 377].

В РФ подобные исследования впервые были проведены еще в 1997 году [23], их результаты продемонстрировали, что HBsAg и анти-HBc стабильно выявляются в парных образцах слюны и сыворотки крови при хранении при температуре +4°C в течение одного месяца. L.Villar с соавт. показали, что результаты выявления HBsAg и анти-HBc в слюне и ССК могут зависеть и от срока хранения образцов. Однако результаты данного исследования представляют период хранения, не превышавшим 200 дней [328].

Применение молекулярных методов для лабораторной диагностики в течение десяти лет после открытия HDV ограничивалось тестированием на наличие РНК вируса, что было неоптимальным и основывалось на методе гибридизации [221]. В начале 1990-х годов были разработаны тесты на основе обратной транскрипции с последующей амплификацией методом полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) для выявления РНК HDV, которые позволили эффективно и точно диагностировать HDV-инфекцию у HBsAg-положительных пациентов [86, 161, 221].

Однако эти первые ПЦР-тесты позволяли провести только качественное определение РНК HDV и не могли количественно определять вирусную РНК в сыворотке. Появление в начале 2000-х годов количественных тестов, основанных на ОТ-ПЦР в реальном времени, позволило измерять уровень виремии HDV [200, 364].

Определение РНК HDV позволяет диагностировать активную виремию в случае выявления анти-HDV у пациентов с HBV-инфекцией [222].

Количественное определение РНК HDV при мониторинге терапии является еще более важным диагностическим подходом, поскольку продолжительность лечения основывается на кинетике РНК HDV во время лечения [175].

Метод ОТ-ПЦР в реальном времени был разработан для количественного определения нагрузки РНК HDV в сыворотке крови. В исследовании F. Le Gal с соавт. эффективность применения данного метода оценивали на 160 образцах сыворотки,

76 из которых были взяты у 11 хронически инфицированных пациентов, получавших лечение пегилированным интерфероном. Чувствительность данного метода оценивали на уровне 100 копий/мл сыворотки и показали его эффективность для всех типов HDV, включая HDV-3 и HDV- 5, 6 и 7. Определение вирусной нагрузки у пролеченных пациентов позволило определить различные профили вирусологического ответа на проводимую интерфероно-терапию (ИФН-терапию) с большей точностью, чем это возможно при применении качественного теста [200].

Количественное определение РНК HDV крайне важно для наблюдения за возникновением и развитием заболевания и оценки терапевтического эффекта. Поэтому в настоящее время остается актуальным вопрос разработки чувствительного и специфичного, калиброванного относительно международного стандарта вирусной РНК, теста для обнаружения РНК HDV в биологических жидкостях организма.

Несмотря на достижения в разработке молекулярных методов диагностики, из-за отсутствия стандартизации диагностических тестов по-прежнему сохраняется высокая степень вариации в чувствительности и специфичности тест-систем для определения вирусной нагрузки HDV. Предпринятые ВОЗ усилия привели недавно к появлению Первого международного стандарта, что является важным шагом на пути к внешнему контролю качества для количественного определения РНК HDV [70, 201]. Несмотря на существенные улучшения в этой области, сохраняется значительная неоднородность имеющихся тест-систем, чувствительность которых значительно варьирует для разных генотипов HDV.

Следует подчеркнуть, что в РФ отсутствуют зарегистрированные тест-системы для количественного определения РНК HDV. В таблице 4 представлена характеристика диагностических методов, применяемых для выявления маркеров инфицирования HDV.

Таблица 4. Серологические и молекулярные диагностические тесты для выявления маркеров инфицирования вирусом гепатита D (адаптировано из [87]).

Диагностический тест	Интерпретация результата	Возможные ограничения применения
Определение HDAg в ткани печени иммуногистохимическим методом	Указывает на активную инфекцию	Низкая доступность. Низкая чувствительность
Определение HDAg в сыворотке крови	Указывает на активную инфекцию	Выполняется редко. Ложноотрицательные результаты при хроническом ГД
Определение антител класса IgM к HDV в сыворотке крови	Указывают на активную инфекцию, обычно обнаруживаемую в острой форме, но могут обнаруживаться при хроническом HDV	Часто отрицательный результат при хроническом ГД, но может быть положительным в периоды повышенной репликации HDV
Определение антител класса IgG к HDV в сыворотке крови	Обычно указывают на хроническую инфекцию HDV или на перенесенную инфекцию	Появляются поздно при остром ГД, но персистируют при хронической инфекции HDV
Определение РНК HDV (качественное) с помощью ПЦР в сыворотке крови	Указывает на активную инфекцию, может быть обнаружена при острой или хронической инфекции HDV	Чувствительность выявления варьирует в зависимости от тест-системы
Определение РНК HDV (количественное) с помощью ПЦР в сыворотке крови	Указывает на активную инфекцию, может быть обнаружена при остром или хроническом HDV	Чувствительность варьирует в зависимости от тест-системы. Тестирование целесообразно для мониторинга лечения
Генотипирование HDV (только секвенирование)	Выявление конкретного генотипа HDV (1–8) с оценкой возможного прогностического значения для прогрессирования и исхода заболевания	Отсутствие коммерческих тестов в клинической практике

Важным вопросом является определение категорий пациентов, среди которых целесообразно проводить скрининг на маркеры HDV. У пациентов с HBV со стабильно повышенными биохимическими показателями, несмотря на подавление вирусной нагрузки HBV аналогами нуклеоз(т)идов (АН) или в их отсутствии, без значительного употребления алкоголя или метаболического синдрома в анамнезе, следует серьезно подозревать HDV-инфекцию. Это связано с прямым подавлением

репликации HBV на фоне HDV-инфекции и сохранением патогенного действия HDV даже при успешном подавлении репликации HBV противовирусными препаратами [64].

По данным Н. Sakugawa и соавт., вирусная нагрузка HBV не коррелирует с уровнями АЛТ в сыворотке крови при хроническом гепатите дельта [291].

Чаще всего неопределяемые уровни HBV отмечаются у HBeAg-негативных пациентов, а пациенты, которые являются HBeAg-положительными, могут по-прежнему иметь высокую вирусную нагрузку HBV, несмотря на присутствие HDV. В настоящее время Американская ассоциация по изучению заболеваний печени (AASLD) рекомендует рассматривать как претендентов для тестирования HDV HBsAg-положительных пациентов с низким или неопределяемым уровнем ДНК HBV, но высоким уровнем АЛТ, в то время как Европейская ассоциация по изучению печени (EASL) и Азиатско-Тихоокеанская Ассоциация по изучению печени (APASL) не дают конкретных указаний относительно того, какие пациенты с HBV должны пройти тестирование [305, 97, 292].

Рекомендуемый скрининговый тест на HDV - это определение IgG к HDV в сыворотке крови с последующей ОТ-ПЦР на РНК HDV в случае положительного результата серологического теста. Скрининг также рекомендуется ВИЧ-инфицированным пациентам; пациентам, применяющим внутривенное использование лекарственных препаратов (IVDU), и мужчинам, практикующим секс с мужчинами (МСМ); лицам с риском заболеваний, передающихся половым путем, и иммигрантам из эндемичных регионов [305].

В соответствии с Клиническими рекомендациями Минздрава РФ, опубликованными в 2021 году [11] в РФ в настоящее время рекомендуется обязательное скрининговое серологическое исследование на наличие анти-HDV у всех лиц с наличием HBsAg (независимо от уровня ДНК HBV и наличия симптомов), прежде всего при повышенном уровне активности АЛТ и факторов риска заражения HDV в анамнезе.

На рисунке 6 представлен диагностический алгоритм лабораторных исследований с показаниями к лечению, рекомендованный в настоящее время в РФ.

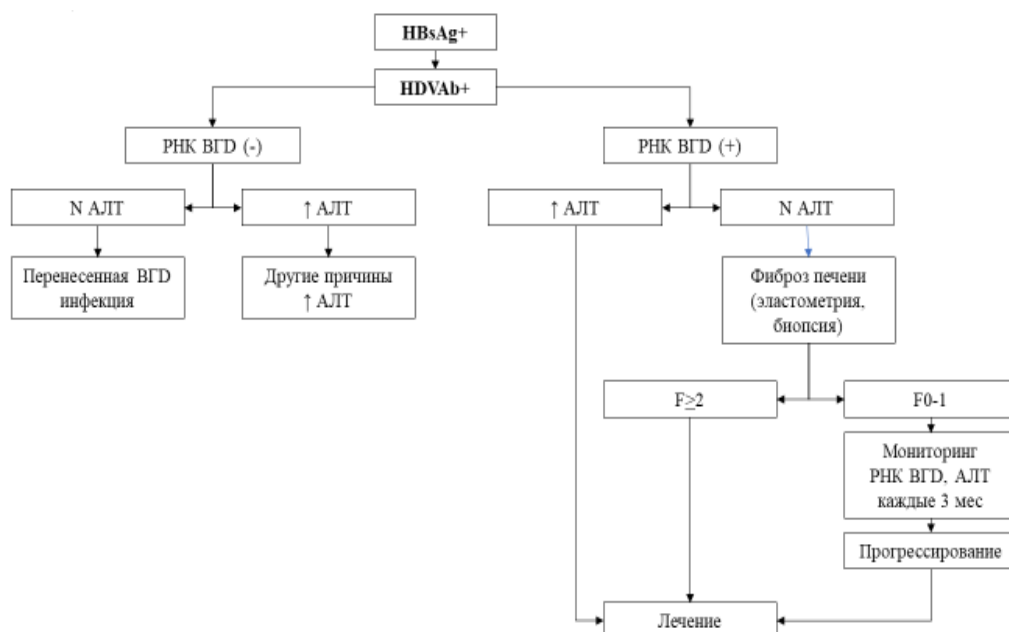


Рисунок 6. Алгоритм диагностики и показания к лечению вирусного гепатита дельта в Российской Федерации [11].

Очевидно, что выявление серологических маркеров инфицирования HBV и HDV у пациента диктует необходимость проведения дальнейших лабораторных исследований, которые включают в себя как молекулярные тесты (определение активности вирусной репликации), так и клинико-биохимические и инструментальные методы. Выявление у пациента выраженного фиброза, повышенных показателей ферментов, и РНК HDV определяют необходимость его лечения.

## 1.6. Течение и исходы хронического гепатита дельта

К началу наших исследований уже было известно, что течение и исход гепатита D характеризуются изменением клинико-биохимических и вирусологических показателей [159]. Однако, как отмечают А. Wranke с соавт. клиническое течение заболевания, его тяжесть и скорость прогрессирования сильно варьируют [347]. В современной литературе данные о факторах макроорганизма, а также HBV и HDV, влияющих на профиль инфекционного процесса у больных хроническим вирусным гепатитом D, ограничены [293].

Реестр международной сети по гепатиту D (HDIN) был создан в 2011 году центрами в Европе, Азии, Северной и Южной Америке. При исследовании 1576 пациентов с инфекцией, включенных в базу данных до октября 2016 года, было показано, что регион рождения пациентов является независимым фактором, связанным с клиническим исходом инфекции и выявляемостью РНК HDV [348].

Хорошо известно, что пациенты, хронически инфицированные HBV/HDV, имеют значительно более тяжелое заболевание печени по сравнению с пациентами с хронической моноинфекцией HBV [349, 107]. У пациентов с хронической коинфекцией HBV/HDV отмечается ускоренное прогрессирование заболевания печени в ЦП [264, 319, 108], повышенный риск декомпенсации [109], повышенный риск развития гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) [264, 319, 109, 316, 169, 162, 24], таким пациентам с большей вероятностью потребуются трансплантация печени [64] и они имеют повышенный риск смертности [264, 109, 162] по сравнению пациентами с моноинфекцией HBV. После развития тяжелого фиброза преобладающим его осложнением является декомпенсация цирроза, а не ГЦК [109, 264]. Наблюдения за больными, инфицированными HDV, показали, что у пациентов с хроническим гепатитом D ЦП развивается на 10 лет ранее, чем у пациентов с моноинфекцией HBV, и быстрее формируется ГЦК, несмотря на то, что HDV подавляет репликацию онкогенного HBV [65].

Известно, что у больных ХГД фиброз печени прогрессирует быстрее, чем у пациентов с моноинфекцией HBV [33]. Механизмы патогенного действия HDV,



связанные с более тяжелым течением заболевания печени и ускоренным развитием фиброза по сравнению с моноинфекцией HBV, остаются неясными [334].

Интересно, что ГЦК, связанная с HBV/HDV, может отличаться от карциномы, связанной только с моноинфекцией HBV. Z. Abbas и соавт. сравнивали течение ГЦК у пациентов с коинфекцией HBV/HDV и у пациентов с моноинфекцией HBV [30]. Особенности течения ГЦК у этих пациентов, по-видимому, определяются различием основных механизмов патогенеза, приводящих к ГЦК при коинфекции HBV/HDV по сравнению с ГЦК при моноинфекции HBV. Считается, что HBV вызывает ГЦК через хроническое воспаление, интеграцию ДНК HBV в клеточную ДНК хозяина, которая нарушает или способствует экспрессии клеточных генов, а также посредством прямого влияния белков HBV на клеточные функции [52].

Между тем, основными факторами развития ГЦК при HDV-инфекции являются тяжелое некровоспаление, приводящее к окислительному стрессу, а также эпигенетические механизмы (метилование ДНК и модификации гистонов, индуцированные L-HDAg) [35]. L-HDAg также может быть медиатором в путях окислительного стресса [150].

В целом, было описано, что риск развития ГЦК у пациентов с HDV увеличивается приблизительно в 3-6 раз по сравнению с пациентами с моноинфекцией HBV [109, 162, 169, 319].

Подобно пациентам с моноинфекцией HBV, пациенты с HDV-ассоциированным ЦП, ответившие на терапию пегилированным интерфероном альфа (ИФН- $\alpha$ ) исчезновением HBsAg и сероконверсией по анти-HBs, продолжают подвергаться риску развития ГЦК [264]. Хотя первоначальные исследования не установили связи между HDV и летальностью [316], более поздние исследования описали повышенный риск смерти при ХГД. G. Fattovich и соавт. в когорте 2000 западноевропейских HBV-позитивных пациентов выявили, что анти-HDV-позитивные пациенты имели повышенный риск смерти (в два раза) по сравнению с анти-HDV-негативными пациентами с HBV [109].

Основной причиной смерти от HDV-инфекции чаще всего является печеночная недостаточность. Это наблюдение было подтверждено G.A. Niro и соавт., которые обнаружили, что у более половины пациентов HDV-инфекцией развивается ЦП, печеночная недостаточность [233].

Предикторы худших исходов при ХГД, как правило, включали развитие ЦП на момент обращения [33], возраст [33, 347, 302], мужской пол, генотип HDV-1 [302], страну происхождения [347] и наличие сывороточных анти- HDV класса IgM [346].

Данная патология печени трудно излечима и, вследствие этого, любые попытки более детально исследовать прогностические факторы исхода заболевания очень важны. Течение хронической HBV-инфекции обычно включает различные клинические фазы, каждая из которых потенциально длится десятилетиями. Четко определенные и верифицированные диагностические маркеры сыворотки крови и биопсии печени позволяют оценить тяжесть заболевания, состояние репликации вируса, стратификацию риска для пациента и решения о лечении [365].

Было обнаружено, что различные генотипы и мутации в геноме HBV могут быть связаны с прогрессированием заболевания печени. Однако наши знания о генотипах HBV и генетических вариациях у пациентов с ХГВ весьма ограничены из-за противоречивых данных из разных регионов [127, 128, 366].

Многочисленные исследования подтвердили, что величина вирусной нагрузки HBV значимо не влияет на течение HDV, хотя это, возможно, связано с ингибирующим эффектом HDV на репликацию HBV [42, 65, 285]. Известно, что HBeAg-положительные пациенты с HDV обычно имеют более высокую биохимическую активность заболевания. Однако, как показали В. Heidrich и соавт., уровни HBsAg, вирусная нагрузка HBV и отдаленные клинические исходы не различаются при сравнении между HBeAg-положительными и HBeAg-отрицательными пациентами, инфицированными HDV [151]. Эти данные отличаются от результатов, полученных при исследовании С.Ж. Chen с соавт.,

которые утверждают, что при моноинфекции HBV отмечается значительная связь между вирусной нагрузкой HBV и тяжестью клинической картины, также высокая вирусная нагрузка HBV связана с высоким риском развития ЦП и ГЦК [71, 72].

Что касается данных о значении вирусной нагрузки и уровня репликации HDV, то результаты исследования J.H. Vockmann с соавт. свидетельствуют, что высокая частота развития ГЦК у пациентов с гепатитом D в основном вызвана быстрым прогрессированием до ЦП как такового, а не активностью вирусной репликации [54].

В долгосрочном наблюдении T.Y. Jang с соавт. последовательно продемонстрировали, что виремия HDV увеличивает риск ГЦК. Такие данные были получены при исследовании значительного числа пациентов (1349 человек) на Тайване [163].

Этот вывод также согласуется с результатами другого недавнего исследования. H. Kamal с соавт. предположили, что виремия HDV может значительно повышать частоту таких исходов заболевания хроническим гепатитом D, как ГЦК, печеночная декомпенсация и смерть. По данным авторов, виремия РНК HDV связана с увеличением в 3,8 раз риска неблагоприятных исходов заболевания. Прогноз был довольно неблагоприятным для пациентов с виремией HDV без ЦП на момент включения в исследование. Такие выводы могут иметь значение при принятии решений о лечении и оценке возможных результатов применения противовирусных препаратов против HDV [176].

### **1.7. Экспериментальные модели инфекции, вызываемой вирусом гепатита дельта**

Разработка и испытания противовирусных препаратов, активных в отношении HDV, а также изучение патогенеза данной инфекции невозможны без адекватных экспериментальных моделей инфекции. Ниже мы попытались представить

имеющиеся в арсенале исследователей возможности для моделирования HDV-инфекции на лабораторных животных и в клеточной культуре.

### 1.7.1. Модели инфекции *in vivo*

Для HBV и HDV не характерна способность преодолевать межвидовой барьер и инфицировать каких-либо животных. В связи с этим HDV-инфекция не может быть воспроизведена на стандартных лабораторных животных, таких как мыши, крысы или макаки. Основной моделью HDV-инфекции *in vivo* для исследований по передаче вируса и анализа инфекционности клонированной кДНК HDV стали шимпанзе [235, 294].

Хотя эти животные остаются единственной иммунокомпетентной экспериментальной моделью *in vivo* для HDV и HBV, все эксперименты с шимпанзе для биомедицинских исследований были остановлены по этическим соображениям. Еще в 1984 году A. Ponzetto и соавт. показали, что восточные сурки могут быть инфицированы HDV [251]. Это раннее наблюдение согласуется с недавно полученными данными о том, что NTCP сурков определяет низкие уровни инфекции HDV [110]. Хотя эта модель подходит для решения некоторых конкретных вопросов, например, связанных с разработкой HDAg-специфических терапевтических вакцин [111], она основана на использовании в качестве вируса-хелпера вируса гепатита сурков (WHV), а не HBV человека. Одно из основных различий между вирусами гепатита В человека и вируса гепатита сурков заключается в том, что проникновение WHV в гепатоцит, вероятно, возможно через рецептор, отличный от NTCP, и поэтому данная модель не может применяться для изучения естественной инфекции/коинфекции HBV и HDV человека.

S. Guilhot с соавт. были созданы модели трансгенных мышей, которые кодируют в своих геномах либо ORF HDAg [129], либо несут интеграты с обеспечивающим репликацию димером полной геномной последовательности HDV [252]. Ни экспрессия HDAg, ни репликация HDV в трансгенных мышях не

привели к развитию гепатита и появлению каких-либо гистопатологических свидетельств болезни. Интересным аспектом этого исследования явились данные о том, что геном HDV способен реплицироваться во многих различных тканях с наивысшими уровнями репликации даже не в печени, а в скелетных мышцах, что указывает на то, что естественный тканевой тропизм HDV преимущественно определяется белками оболочки HBV.

Репликация HDV в печени также может быть достигнута путем гидродинамической инъекции плазмиды, кодирующей геном HDV [73]. Посредством совместной инъекции плазмид, кодирующих геном HDV и HBsAg, можно наблюдать сборку и высвобождение частиц HDV, которое может подавляться ингибиторами пренилирования [367]. Однако распространение вирусов в этих системах не происходит, поскольку HBsAg не способен связываться с NTCP мыши.

После открытия hNTCP как высокоаффинного рецептора проникновения HBV [152, 232], были получены трансгенные мыши, экспрессирующие человеческий NTCP, которые показали высокую чувствительность к HDV и восприимчивость к HBV-инфекции [152, 153].

Вместе с тем, эти исследования выявили несколько дополнительных ограничений. Одним из этих ограничений стало то, что в настоящее время наиболее часто для экспериментального воспроизведения HDV-инфекции используют химерных мышей. Эти мыши либо имеют генетический дефект, приводящий к нарушению роста собственных гепатоцитов, либо обладают выраженной чувствительностью к токсическим агентам, специфически влияющим на гепатоциты. Это делает возможным частичное повторное заселение печени мыши гепатоцитами человека, восприимчивыми к HBV и HDV [88]. Поскольку химерные мыши восприимчивы к обоим вирусам, на этой модели можно изучить моноинфекцию HDV, коинфекцию HDV/HBV и даже суперинфекцию [123]. Именно с помощью экспериментальной инфекции на химерных мышах было

показано, что HDV является мощным активатором врожденного иммунитета хозяина [124].

### 1.7.2. Модели инфекции *in vitro*

До открытия клеточного рецептора hNTCP модели клеточных культур для HDV были ограничены либо клетками, трансфицированными плазмидами, несущими последовательности HDV, либо восприимчивыми к инфицированию клетками НераRG и первичными гепатоцитами человека (PHH), мало доступными и демонстрировавшими высокую степень гетерогенности в зависимости от донора [105, 130, 295].

Обычные линии клеток гепатомы, такие как HuH7 и HepG2, не восприимчивы к заражению HDV, поскольку они утратили экспрессию hNTCP. После клонирования и секвенирования полного генома HDV в 1980-х годах клетки, трансфицированные плазмидами, кодирующими HDV, стали первыми моделями *in vitro* для изучения репликации вируса. HDV реплицируется как в клетках гепатомы, так и в других линиях клеток при трансфекции плазмидой, несущей кДНК HDV [177].

Первоначально выделенная от пациента, инфицированного HCV, клеточная линия НераRG была первой иммортализованной клеточной линией, которая показала восприимчивость к инфекции HBV и HDV [131]. Клетки НераRG использовались для выяснения процесса проникновения вируса [189, 164], оценки противовирусной активности потенциальных лекарственных препаратов и анализа активации врожденного иммунитета при HDV-инфекции [25].

Идентификация hNTCP привела к получению клеточных линий клеток гепатомы, стабильно экспрессирующих рецептор (HepG2-hNTCP, HuH7-hNTCP), ставших благодаря этому восприимчивыми как к HBV, так и к HDV [232]. С этими клеточными линиями легко обращаться, они демонстрируют восприимчивость к инфекции HDV и даже в некоторой степени поддерживают активацию врожденного иммунитета (например, клетки HepG2). Все линии клеток,

экспрессирующие hNTCP, чувствительны к моноинфекции HDV. Вирус может проникать в клетки, запускать репликацию и экспрессировать HDAg в ядре. Последующие шаги, включая сборку и выпуск потомства вируса, блокируются, поскольку в них отсутствует HBsAg. Клетки HepG2, стабильно экспрессирующие как hNTCP, так и HBsAg (большую и малую формы белка), поддерживают полный цикл репликации HDV, включая выход новых вирионов, которое можно количественно оценить с помощью экспериментов по повторному заражению [203].

Гепатоциты, полученные из стволовых клеток, были описаны как ещё одна инфекционная система для HBV [236, 296]. Основным преимуществом гепатоцитов, полученных из стволовых клеток, по сравнению с РНН является воспроизводимость и возможность их получения от доноров с определенным, представляющим интерес, полиморфизмом. Однако протоколы дифференцировки сложны и требуют длительного времени, а в некоторых странах действуют этические ограничения, касающиеся работы с эмбриональными стволовыми клетками.

Успех в разработке перевиваемых клеточных линий, позволяющих воспроизводить в экспериментальных условиях все этапы жизненного цикла HDV, позволяет ожидать появление новых лекарственных препаратов, активных в отношении HDV. Определенные результаты в данном направлении уже достигнуты, хотя терапия HDV-инфекции по-прежнему остается нерешенной проблемой мирового здравоохранения.

## **1.8. Лечение гепатита дельта**

Клинико-вирусологические характеристики пациентов с HBV/HDV-инфекцией и подходы к лечению этой инфекции в различных регионах мира определены недостаточно. Хронический вирусный гепатит D требует эффективной терапии из-за неблагоприятного течения инфекции, быстрого прогрессирования в

ЦП, повышенной частоты печеночной декомпенсации и более высоких показателей смертности по сравнению с моноинфекцией HBV [139].

Лечение ХГД представляет собой серьезную проблему, так как специфического ингибитора, способного подавлять репродукцию вируса, не существует. Противовирусные препараты, влияющие на репликацию HDV, могут воздействовать на специфические факторы человека или вируса, причем последние действуют либо специфически на HDV, либо опосредованно за счет снижения высвобождения частиц HBsAg. Препараты, способные действовать непосредственно на клеточные ферменты, катализирующие многие стадии цикла репликации HDV (такие как РНК-полимераза II или фарнезилтрансфераза), малоизучены. Кроме того клеточная система, поддерживающая репликацию HDV, была разработана совсем недавно, после открытия рецептора hNTCP [203]

Вероятно, эффективные противовирусные вещества будут определены в будущем с помощью систем скрининга в системе клеток гепатомы человека, экспрессирующих hNTCP [329].

### **1.8.1. Интерферонотерапия**

В течение 30 лет единственным препаратом, применяемым для лечения ХГД, оставался интерферон  $\alpha$  (ИФН- $\alpha$ ) [368], а с 2006 года начато применение пегилированного интерферона- $\alpha$  (ПЭГ-ИФН- $\alpha$ ) [350]. Однако, как показывают клинические исследования, устойчивый вирусологический ответ (УВО) после применения препарата как в виде монотерапии, так и в сочетании с аналогами нуклеоз(т)идов (АН), развивается не более чем в 23-47% случаев [74, 98, 178, 237, 246].

Однако необходимо отметить, что исследования по оценке эффективности интерферонотерапии проводились среди очень ограниченного числа больных (группы составили от 7 до 38 человек). Согласно отечественному наблюдению, при



терапии ПЭГ-ИФН- $\alpha$ -2а (180 мкг/нед.) в течение 56–72 недель среди 10 пациентов с хроническим ГД в Республике Тыва УВО развился только в 1 случае [179].

В исследовании эффективности ПЭГ-ИФН- $\alpha$  (NIDIT-1 -The Hep-Net International Delta Hepatitis Interventional Trial) включение в схему лечения ингибитора репликации HBV адефовира привело к тому, что у 28% пациентов РНК HDV не определялась до 24 недель после лечения, но при более длительном наблюдении отмечены поздние рецидивы с репликацией РНК у половины пациентов [351].

Для контроля прогрессирования заболевания, связанного с HBV, АН (например, тенофовир или энтекавир) могут рассматриваться как возможный вариант лечения пациентов со значительной репликацией HBV [204]. Однако действие этих препаратов непосредственно на HDV минимально. Поскольку АН не влияют напрямую на вспомогательную функцию HBV (экспрессия белка оболочки с матрицы кзкДНК или интегрированной ДНК HBV), они не могут подавлять сборку вирионов HDV в инфицированных клетках. Более того, поскольку эти препараты специфически действуют на обратную транскриптазу HBV, они не оказывают прямого действия на репликацию РНК HDV, осуществляемую клеточной РНК-полимеразой.

В настоящее время подведены итоги второго исследования (NIDIT II), которое показало, что применение ПЭГ-ИФН- $\alpha$ , продленное до 24 месяцев в комбинации с тенофовиром, не улучшило вирусологический ответ (ВО) и не предотвратило поздние рецидивы [352]. Показано, что добавление энтекавира к ПЭГ-ИФН- $\alpha$  не способствует повышению частоты ВО за 24 недели лечения [26].

### **1.8.2. Новые направления в лечении гепатита дельта**

Принимая во внимание серьезные побочные эффекты, вызванные ИФН- $\alpha$ , появилась альтернатива - использовать ИФН- $\lambda$  для лечения пациентов с HDV, не отвечающих критериям назначения ИФН- $\alpha$ . Клинические испытания по оценке

активности этого цитокина были недавно начаты у пациентов с коинфекцией HDV/HBV. Обоснованием для применения ИРФ-λ явилось:

- ✓ локализация цели - печень (рецептор ИФН-λ (IFNLR1) экспрессируется в эпителиальных тканях легких, печени и кишечника, в отличие от ИФН-α, рецептор которого (IFNAR1/2) повсеместно экспрессируется на содержащих ядро клетках);
- ✓ переносимость (менее выраженные системные побочные эффекты);
- ✓ результаты исследования LIMT-HDV (фаза I) ПЭГ-ИФН -λ (180 мкг в неделю) продемонстрировали снижение уровней РНК HDV в сыворотке в среднем на 2,3 lg на 48 неделе терапии и отсутствие определяемой РНК HDV через 24 недели после прекращения терапии.

Результаты исследования LIMT-HDV (фаза II) в сочетании с лонафарнибом и ритонавиром - 25 из 26 (96%) пациентов продемонстрировали снижение РНК HDV > 2 lg, а 58% пациентов -УВО через 24 недели [27, 353].

Тем не менее, как правило, невысокая частота ответа на лечение ИФН-α и ограниченная приверженность многих пациентов этому лечению ставит задачу разработки более специфических новых терапевтических подходов для длительного контроля или, в лучшем случае, функционального лечения инфекции HDV. Такие методы лечения, в основном, нацелены на контроль секреции HBsAg, на предотвращение образования репликативных промежуточных продуктов кзкДНК HBV или РНК HDV для прямого или косвенного воздействия на жизненный цикл HDV.

Новое направление в терапии ХГД — это разработка препаратов, ингибирующих связывание рибонуклеопротеина HDV с поверхностным белком HBV, а также блокирующих проникновение в клетку HDV и HBV.

Булевиртид (Myrcludex B) — первый синтезированный ингибитор проникновения в гепатоциты вирусных частиц, в состав которых входит поверхностный белок HBV, миристилированный пептид длиной 47 аминокислот, полученный из оптимизированной консенсусной последовательности preS1-

домена L-белка HBV, который эффективно блокирует hNTCP, рецептор HDV/HBV. Предполагаемый механизм действия данного препарата заключается в его способности прочно связываться со специфическими рецепторами к HBV, что ингибирует проникновение вирусных частиц внутрь клетки и предотвращает распространение инфекции

Способность препарата в очень низких концентрациях полностью предотвращать проникновение вируса показана *in vitro* и *in vivo* [238].

Предотвращение входа HBV и HDV в клетку приводит к снижению следующих параметров:

- числа инфицированных гепатоцитов,
- концентрации РНК HDV в печени и крови,
- цитолиза (нормализация уровня АЛТ),
- воспаления и фиброза [274].

К концу 2011 года были завершены доклинические исследования *in vitro* и *in vivo* безопасности препарата булевиртида и проведена оценка его противовирусной эффективности [44, 297].

Клинические исследования II фазы препарата булевиртида в сочетании с ПЭГ-ИФН- $\alpha$  в течение 24 недель показали УВО лишь у 1 из 7 пациентов [45]. Значительной проблемой оказался способ введения препарата (подкожно), ввиду выработки антител, препятствующих его эффективности, а также незначительное снижение концентрации HBsAg в сыворотке крови [265].

В настоящее время завершено многоцентровое исследование с более высокими дозами булевиртида: в исследовании Myr-202 ( $n=120$ ) булевиртид вводят в течение 24 недель в 3 различных дозах (2 мг, 5 мг и 10 мг) в комбинации с тенофовиrom по сравнению с монотерапией тенофовиrom [46, 354].

Второе исследование (Myr-203) сочетает две дозы булевиртида (2 мг и 5 мг) с ИФН- $\alpha$  в течение 48 недель по сравнению с монотерапиями булевиртидом или ИФН- $\alpha$ . Двойная терапия булевиртидом 2 мг в течение 48 недель продемонстрировала впечатляющие показатели вирусологического ответа (у 100%

пациентов, медиана снижения уровня HDV РНК  $-5,21 \log_{10}$  МЕ/мл по сравнению с исходным уровнем, исчезновение HDV РНК у 80% пациентов, сохранение вирусологического ответа через 24 недели после завершения лечения у 73% пациентов). При этом отмечено снижение уровня HBsAg у 47% пациентов, исчезновение HBsAg – у 20%, HBsAg-сероконверсия – у 13% пациентов, сохранявшиеся через 24 недели после завершения лечения у 40%, 31%, 23% пациентов, соответственно, свидетельствующие о функциональном излечении гепатита В в результате двойной терапии и отражающие синергизм препаратов с разным механизмом действия при совместном применении (усиление иммуномодулирующего эффекта интерферона при снижении концентрации вируса в клетке под влиянием булевиртида) [2].

Хорошая безопасность, постоянная противовирусная эффективность и быстрая нормализация уровня АЛТ во время терапии, продемонстрированные при клинических исследованиях, послужили тому, что в июле 2020 года было зарегистрировано разрешение на продажу булевиртида (2 мг) в РФ. Многоцентровое исследование фазы III (Myr-301), изучающее лечебный потенциал длительного лечения булевиртида в дозе 10 мг, продолжается в настоящее время [355].

Исследуется ещё одна группа лекарственных средств, влияющих на процессы посттрансляционной модификации антигенов HDV, в частности, на процессы пренилирования. Представитель этой группы препаратов - лонафарниб - ингибитор фарнезилтрансферазы (фермент клетки, позволяющий изопренилированному L-HDAg присоединиться к эндоплазматической сети) [99]. Лонафарниб предотвращает фарнезилирование С- концевых остатков Cys211 в L-HDAg за счет ингибирования фарнезилтрансферазы, ключевого фермента в пути пренилирования [369]. Последующее блокирование формирования оболочки приводит к накоплению в гепатоцитах репликативных промежуточных продуктов HDV без остановки репликации [266].

Таким образом, снижение уровней РНК HDV в сыворотке напрямую связано со сборкой HDV и не приводит к снижению числа инфицированных гепатоцитов. Одним из эффектов лонафарниба может быть ускорение оборота инфицированных гепатоцитов за счет прямого цитотоксического действия накапливающихся репликативных промежуточных продуктов или усиленного иммуноопосредованного уничтожения инфицированных клеток. Такие возможные способы действия и их безопасность должны быть проверены в будущих исследованиях [47, 223, 253, 370].

Первоначально разработанный в качестве противоракового препарата лонафарниб был исследован в нескольких клинических испытаниях (фазы I и II) с декабря 2011 года по июнь 2016 года. Пациенты (14 человек) получали препарат 4 недели, 100 или 200 мг лонафарниба в сутки. Снижение вирусной нагрузки составило 0,75 и 1,25 log ME/мл, в зависимости от дозы препарата. Значительным побочным эффектом стали выраженные и дозозависимые желудочно-кишечные осложнения [180]. В исследованиях III фазы введение ритонавира (фармакокинетического усилителя) позволило форсировать дальнейшее увеличение противовирусного действия лонафарниба и снизить частоту нежелательных побочных эффектов [370].

Еще одной группой соединений, потенциально обладающей активностью в отношении HDV, являются полимеры нуклеиновых кислот (NAP). NAP представляют собой разнообразную группу олигонуклеотидов, которые были описаны как агенты с широким спектром антимикробной активности, включая ингибирование ВИЧ, вируса простого герпеса (HSV) или вируса лимфоцитарного хориоменингита (LCMV) [330]. Первоначально предложенный способ действия заключался в вмешательстве NAP в молекулы, участвующие в обеспечении проникновения вируса (например, гепарансульфат-протеогликаны). NAP были протестированы на экспериментальной модели инфекции вируса гепатита В уток (DHBV). Эти исследования показали, что одно соединение (REP2006) влияет преимущественно на проникновение вируса, в то время как другое соединение

(REP2055) влияет на DHBV даже после установления инфекции, что приводит к накоплению препарата в гепатоцитах утки и подавлению секреции S-Ag DHBV [239, 240].

Основываясь на результатах модели DHBV, первые два клинических исследования были проведены на пациентах с моноинфекцией HBV [89]. Поскольку результаты этих испытаний показали выраженное снижение уровней HBsAg в сыворотке крови, полимер нуклеиновых кислот REP2139-Са был протестирован у пациентов с хронической HDV-инфекцией (REP301). 12 пациентов с коинфекцией HBV/HDV получали монотерапию 500 мг REP2139-Са (внутривенно один раз в неделю) в течение 15 недель с последующей комбинацией 250 мг препарата с 180 мкг ПЭГ-ИФН- $\alpha$  в течение еще 15 недель. Терапия ПЭГ-ИФН- $\alpha$  продолжалась еще 33 недели, а пациенты наблюдались в течение 24 недель. Промежуточные результаты показали выраженное снижение как сывороточной РНК HDV, так и уровней HBsAg [330, 100].

### **1.8.3. Факторы вируса гепатита дельта и макроорганизма, определяющие стратегии лечения**

Поскольку HDV использует клеточную РНК-полимеразу II в качестве фермента репликации [199], разработка лекарств, непосредственно направленных на репликацию РНК, не достижима. Однако известно, что расщепление и лигирование мономерной РНК HDV зависит от активности двух рибозимов, кодируемых РНК. Ингибирование рибозимов небольшими молекулами может представлять собой возможный способ прямого воздействия на репликацию HDV. Однако такие ингибиторы пока не вошли в клиническую разработку.

Альтернативный подход может заключаться в опосредованном терапевтическом подавлении промежуточных продуктов РНК HDV (например, путем нацеливания на мРНК HDАg) у пациентов. Возможность и эффективность

таких стратегий была продемонстрирована на животных моделях HBV и в клинических исследованиях [359, 372].

На данный момент описаны лишь некоторые из многих, вероятно, неизвестных факторов организма человека, связанных с жизненным циклом HDV [303]. Только два из трех новых терапевтических агентов, которые в настоящее время тестируются в клинических исследованиях (булевиртид - Myrcludex B и Лонафарниб), влияют на эти факторы. Как было описано выше, Myrcludex B специфически блокирует функцию рецептора HDV/HBV – HNTCP [297, 373] и, тем самым, предотвращает вирусозависимое внутрипеченочное распространение. Лонафарниб подавляет пренилирование L-HDAg посредством ингибирования фарнезилтрансферазы [99].

HDV, в отличие от HBV, вызывает выраженный врожденный иммунный ответ [25, 124, 420]. Активация происходит преимущественно через ИФН-β и ИФН-λ [379].

Таким образом, HDV эволюционно адаптировался к репликации в условиях активации продукции интерферонов, в связи с чем возникает вопрос: с помощью каких механизмов ИФН-α терапия пациентов с HDV приводит к снижению уровней РНК HDV в сыворотке?

Частичная эффективность ИФН-α у пациентов с коинфекцией HDV/HBV может быть объяснена двумя механически различимыми способами активности ИФН-α. Во-первых, ИФН-α может до некоторой степени напрямую подавлять репликацию HDV с помощью еще не определенного механизма, как было показано в исследованиях *in vitro* (неопубликованные данные) и в клинических испытаниях [154, 360, 361]. Во-вторых, в клиническом контексте ИФН и ПЭГ-ИФН-α могут (в очень редких случаях) вызывать снижение продукции HBsAg, возможно, за счет элиминации гепатоцитов, продуцирующих HBsAg. Это могут быть клетки, содержащие кзкДНК HBV, или клетки с интегрированной ДНК HBV, кодирующей HBsAg. Это устойчивое подавление продукции HBsAg определяется как

«функциональное излечение» HBV-, так и HDV-инфекции и достигается менее чем у 1% HBeAg-отрицательных пациентов при лечении АН [380].

Что касается будущих подходов к лечению с использованием ИФН-λ, необходимо учитывать, что этот цитокин уже постоянно индуцируется самим HDV. Таким образом, преимуществом использования ИФН-λ может быть его высокая специфичность в отношении клеток печени по сравнению с другими интерферонами и возможность его сочетания с другими лекарствами, направленными на устранение HDV [100].

Таким образом, современные противовирусные препараты снижают вирусную нагрузку, но практически не приводят к полной элиминации вируса и, как следствие, излечению хронического вирусного гепатита В и D [271].

### **1.9. Профилактика гепатита дельта**

В условиях отсутствия эффективных терапевтических препаратов, позволяющих добиваться элиминации вируса из организма, единственным надежным средством для управления HDV является вакцинация против гепатита В. Поскольку в состав вирусной частицы HDV, как и HBV, входит HBsAg, гуморальный иммунный ответ на вакцину против гепатита В в полной мере защищает восприимчивых к HBV людей и от инфицирования HDV [209].

Массовая вакцинация против гепатита В приводит к уменьшению числа лиц, инфицированных HBV, и, как следствие, восприимчивых к HDV. Противопоказанием к вакцинации против гепатита В является беременность, СПИД и злокачественные заболевания. В странах, где давно внедрена массовая иммунизация новорожденных против HBV, случаи заражения HDV среди детей и подростков практически не регистрируются, а большинство случаев инфекции относятся к старшим возрастным группам [298]. В то же время, данные об эпидемиологической эффективности вакцины против гепатита В в отношении



HDV в эндемичных странах, где число потенциальных источников этого вируса велико, отсутствуют.

Еще одним нерешенным вопросом является профилактика инфицирования HDV у лиц с наличием HBV-инфекции. Специфическая вакцина против гепатита D отсутствует, несмотря на попытки создать пептидные и ДНК-вакцины, основанные на антигене HDV. Гуморальный и Т-клеточный ответ на эти вакцинные препараты оказался недостаточным для защиты от суперинфицирования HDV в экспериментальной модели на сурках [117, 272].

Необходимо отметить, что представления о гепатите D как об относительно редком заболевании не соответствуют реальности. Так, данные мета-анализа, проведенного Н.У. Chen с соавт., показали, что хроническую HDV-инфекцию имеют не 20 млн. человек, как представлялось ранее, а более 70 млн., что превышает распространенность ВИЧ-инфекции в мире более, чем в 2 раза [80].

Данные по распространенности HDV в России остро нуждаются в актуализации. По имеющимся данным, на Европейской территории страны HDV встречается примерно у 5% лиц с HBV-инфекцией. В то же время, в российских исследованиях показано, что в Азиатской части РФ встречаются эндемичные по HDV регионы, где этим вирусом инфицировано до 20-45% лиц с HBV [166, 276], т.е. распространение HDV на территории РФ (как и во всем мире) является мозаичным. Известно, что в Монголии, которая непосредственно граничит с Республикой Тыва, распространенность HDV-инфекции очень велика и 60% HBsAg-позитивных пациентов имеют анти-HDV [212].

Причины и история формирования эндемичных по HDV регионов, равно как и особенности циркуляции вируса в них (ведущие пути передачи, факторы риска, формирование семейных очагов) до сих пор не изучены. Более того, гепатит D не является регистрируемой инфекцией, все случаи этого заболевания учитываются в статистике по заболеваемости вирусным гепатитом В, что скрывает реальную картину инфицирования населения и нагрузку этой инфекции на систему здравоохранения.

Таким образом, гепатит D по-прежнему остается нерешенной проблемой мирового здравоохранения. После длительного периода недооценки значимости этой инфекции в настоящее время пришло понимание ее актуальности. Это связано с ростом миграции населения из эндемичных регионов, сохранением в мире широкой распространенности HBV и отсутствием специфической защиты от суперинфицирования HDV, а также ограниченными возможностями терапии этого тяжелого заболевания печени. Наличие в мире и, в частности, в Российской Федерации регионов с широкой распространенностью HDV указывает на необходимость разработки специальных программ по диагностике, терапии и профилактике этой опасной инфекции.

## **ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ**

### **2.1. Обследованные группы лиц**

Все исследования были проведены в соответствии с принципами, изложенными в Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации в отношении этических медицинских исследований с участием людей в лаборатории вирусных гепатитов Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

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

Все биологические образцы, собранные от пациентов для исследования, транспортировали с использованием холодной цепи и хранили в аликвотах при  $-70^{\circ}\text{C}$  перед тестированием.

#### **2.1.1. Лица, относящиеся к группе условно здорового населения Республик Тыва и Саха (Якутия)**

Для оценки распространенности и динамики циркуляции HBV и HDV за 10 и 20 лет, прошедших с момента внедрения программы вакцинации новорожденных против гепатита В, были протестированы на маркеры этих инфекций сыворотки от условно здорового населения Республик Тыва и Саха (Якутия).

В 2008 году были собраны и исследованы образцы сывороток крови, полученные от лиц из группы условно здорового населения Республики Тыва ( $N=1154$ ), от новорожденных до лиц старше 60 лет. Все обследованные были разделены на следующие возрастные группы: до 1 года, 1–4 года, 5–9, 10–14, 15–19, 20–29, 30–39, 40–49, 50–59 и старше 60 лет; каждая группа включала 100 человек. Исключение составили группа детей до 1 года – 88 человек и группа

взрослых старше 60 лет – 123 человека. Соотношение мужчин и женщин в исследовании – 1:1,8 (35,5%, 386/1086 и 64,5%, 700/1086, соответственно). На 01.01.2008 год, по данным Росстата, численность населения Республики Тыва составила 303 783 человека, доля городского населения - 53,9 %. Таким образом, доля обследованного населения составила 0,36 % от общего населения региона.

В 2019 году среди различных возрастных групп условно здорового населения этого же региона обследовано 1170 человек, что также составило 0,36% от общего числа жителей (население региона – 324 423 человека по данным Росстата на 2019 год). В исследование включены десять возрастных групп: до 1 года, 1–4 года, 5–9, 10–14, 15–19, 20–29, 30–39, 40–49, 50–59 и старше 60 лет; в состав каждой группы входило в среднем 123 человека (минимум 77, максимум 169). Средний возраст участников составлял 24,2 года, соотношение мужчин и женщин варьировалось от 1:0,3 до 1:3, в зависимости от возрастной группы, а соотношение сельского/городского населения составляло 1:9.

Сбор образцов сывороток крови лиц условно-здорового населения проводился при участии сотрудников Роспотребнадзора Республики Тыва (Ооржак Н.Д.)

В 2008 году нами исследовано 968 образцов сывороток крови из когорты условно здорового населения Республики Саха (Якутия), что составило 0,1% населения (951 436 человек по данным Росстата на 2008 год), от новорожденных до лиц старше 60 лет. В исследование включены восемь возрастных когорт, от детей до 1 года до пожилых людей старше 60 лет (до 1 года, 1–4 года, 5–9, 10–14, 15–19, 20–29, 30–39, 40–49, 50–59 и старше 60 лет). Средний размер популяционной выборки в каждой возрастной группе составил около 100 человек.

В 2019 году мы исследовали 1072 образца сывороток крови из когорты условно здорового населения Республики Саха (Якутия), что составило 0,11% населения (964 330 человек по данным Росстата на 2019 год), от новорожденных до лиц старше 60 лет. В исследование включены восемь возрастных когорт, от детей до 1 года до пожилых людей старше 60 лет (0–9, 10–14, 15–19, 20–29, 30–39,

40–49, 50–59, и  $\geq 60$  лет). Средний размер популяционной выборки в каждой возрастной группе составил 153 (99–402) человека. Соотношение мужчин и женщин варьировало от 1:0,8 до 1:2 в зависимости от возрастной группы. Средний возраст обследуемых в регионе составил 27,9 года. Соотношение сельского и городского населения – 1:6.

Сбор образцов сывороток крови лиц условно-здорового населения проводился при участии сотрудников Роспотребнадзора Республики Саха (Якутия) (Игнатьева М.Е.)

При сборе образцов сывороток крови каждым обследуемым заполнялась анкета, которая включала демографические данные, характеристику социального статуса, данные о наличии острого ГВ, вакцинации ГВ; сведения о факторах риска инфицирования HBV и HDV (Приложение 1, 2).

В исследование включались лица, проходящие рутинную диспансеризацию; посетители вакцинного кабинета, проходящие рутинную вакцинацию; пациенты, посещающие поликлинику по причинам, не связанным с инфекционными заболеваниями.

Критерии включения в исследование:

- пациент подписал и датировал форму информированного согласия, одобренного локальным этическим комитетом;
- пациент является субъектом мужского или женского пола, в возрасте от 1 до 95 лет;
- пациент относит себя к здоровой категории граждан и на момент включения в исследование не имеет симптомов острого заболевания (со слов пациента или родителя (законного представителя) ребенка);
- постоянное проживание в населенном пункте региона, выбранного для изучения.

Критерии не включения в исследование:

- лечение препаратами крови или выделенными из крови препаратами в течение 3-х месяцев до включения в исследование (со слов пациента или родителя (законного представителя) ребенка);

- лихорадка (температура  $> 37,1$  °C) или острое заболевание;
- любая вакцинация в течение 4-х недель до взятия крови на исследование.

У каждого участника исследования был произведен однократный забор крови в объеме около 8 мл у взрослых лиц и около 3 мл - у детей моложе 15 лет. Каждый образец сыворотки крови был разделен на аликвоты (4 аликвоты по 1 мл каждая для взрослых лиц; 4 аликвоты по 0,5 мл каждая - для детей моложе 15 лет). Все аликвоты образцов хранились при температуре - 70 °C до проведения тестирования.

В образцах определяли серологические маркеры инфицирования HBV и HDV.

### **2.1.2. Когорта для проведения анализа охвата вакцинацией против гепатита В новорожденных в Республике Саха (Якутия)**

В исследовании проанализирован охват своевременным введением трех доз вакцины против гепатита В в течение первого года жизни у детей, рожденных в Республике Саха (Якутия) в 2017–2018 годы. Сведения о прививках получали из индивидуальных карточек прививочного анамнеза или из отдельных экземпляров формы № 63 (документ, формируемый на каждого ребенка при первом обращении в детскую поликлинику). Письменные согласия на участие в исследовании были подписаны всеми родителями детей, принявших участие в исследовании.

Данные были собраны по трем типам поликлиник, которые были разделены на категории в зависимости от местоположения: (1) поликлиники в областном центре, (2) поликлиники в районных центрах и (3) поликлиники в сельской местности. Всего в исследовании приняли участие 16 центров (4 областные поликлиники, 7 районных и 5 сельских). Были собраны данные о вакцинации против гепатита В 1000 новорожденных в регионе. Для всех случаев пропуска дозы вакцины против гепатита В, вводимой в первые 24 часа после рождения (НерВ-ВD), причины отсутствия были выявлены в медицинских картах испытуемых и проанализированы (отказ родителей или медицинские противопоказания).

Сбор материала проводился при участии сотрудников Роспотребнадзора Республики Саха (Якутия) (Игнатьева М.Е.)

### **2.1.3. Пациенты с хроническим вирусным гепатитом В (Республика Саха (Якутия))**

Для анализа распределения генотипов у моноинфицированных и для валидации метода генотипирования по предсказанному в ИФА серотипу HBV, определённого с использованием панели моноклональных антител (МАТ) к HBsAg использовали 82 образца сывороток крови, полученных от HBsAg-положительных пациентов, моноинфицированных вирусом гепатита В из Республики Саха (Якутия), предоставленных нам профессором Слепцовой С.С. Возраст пациентов с моноинфекцией HBV составил в среднем – 44 года (минимум – 16 лет, максимум – 82 года). Соотношение мужчин и женщин в представленной выборке было практически равным и составляло – м/ж: 65/75 (1:1,15).

Для каждого образца генотипы HBV определяли методом ИФА в лабораторной версии теста с панелью МАТ и сравнивали с результатами, полученными молекулярно-биологическими методами, включающими выделение ДНК, амплификацию участка генома S-гена (713 нт), секвенирование по Сэнгеру, филогенетический анализ полученных ДНК последовательностей данных вирусных изолятов, как описано ниже.

### **2.1.4. Пациенты с хроническим вирусным гепатитом дельта (Республика Тыва)**

Среди 786 пациентов из Республики Тыва, находящихся на учете с диагнозом хронический вирусный гепатит D, полные медицинские карты были доступны для 514 пациентов, которые были включены в регистр в период с 2008 по 2020 годы. Для 493 из этих пациентов мы использовали для тестирования архивные образцы

сыворотки крови, собранные в ходе наших экспедиционных работ в 2008 – 2020 годах в Республику Тыва и хранившиеся при  $-70^{\circ}\text{C}$ .

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, щелочная фосфатаза (ЩФ), гаммаглутамилтранспептидаза (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. По впервые установленному диагнозу на момент включения в исследование и исходу заболевания сформированы три группы инфицированных HDV пациентов: 1 группа - 61 человек с прогрессированием заболевания от хронического гепатита до цирроза печени (ЦП) (класс А-С по Чайл-Пью), 2 группа - 49 человек с непрогрессирующим хроническим гепатитом дельта и 3 группа - 11 человек с непрогрессирующим ЦП (класс А-С по Чайл-Пью). При этом, за весь период наблюдения в группе 1 от декомпенсированного цирроза печени (ЦП) и гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) скончались 14 человек. Далее проанализированы клинико-биохимические и вирусологические данные лабораторных исследований этих 14 больных. Все пациенты с летальным исходом состояли на учёте в Консультативном кабинете (КК) ГБУЗ Инфекционной больницы Республики Тыва с 2009 года по 2019 год и наблюдались в динамике. Количество обследований на протяжении периода наблюдения варьировало от 1 до 9. Для них также анализировали следующие показатели - демографические (пол, возраст на момент включения в исследование), количество лет, прошедшее от включения пациента в



исследование до формирования ЦП и ГЦК, а также до летального исхода. Также анализировали в динамике показатели активности перечисленных выше маркеров функционального состояния печени.

Сбор образцов сывороток крови пациентов с хроническим вирусным гепатитом D проводился при участии гл. врача 1-й Инфекционной больницы г. Кызыла, к.м.н. Сарыглар А.А.

В образцах сыворотки крови этих пациентов определяли серологические и молекулярные маркёры инфицирования вирусами гепатита В и дельта: HBsAg, количественное содержание HBsAg, анти – HDV, РНК HDV, ДНК HBV, а также генотипы вирусов.

Для того, чтобы оценить частоту выявления основных маркёров инфицирования HBV и HDV в сыворотке крови, слюне и сухой капле крови (СКК) как возможного варианта для серологических исследований среди населения эндемичного региона в условиях ограниченных лабораторных ресурсов исследованы 289 архивных парных образцов сывороток крови, 92 образца слюны и 197 образцов сухой капли крови (СКК), собранных в 2016- 2018 годы от больных ХГД. Образцы сыворотки крови (2016-2018годы) и слюны (2017 год) были доставлены в лабораторию с соблюдением холодовой цепи и хранились при температуре -70 °С, а образцы СКК, собранные в 2016 году и 2018 году – при комнатной температуре (22-25 °С) 3 года и 1 год, соответственно.

### **2.1.5. Пациенты с хроническим вирусным гепатитом дельта (Республика Саха (Якутия))**

В 2019 году исследованы 59 образцов сывороток крови пациентов с хроническим вирусным гепатитом D, проживающих на территории Республики Саха (Якутия). К сожалению, в этой когорте больных отсутствовали данные об их

возрасте. Соотношение мужчин и женщин практически одинаковое и составило: м/ж: 28/31 человек (1:1,1).

Сбор образцов сывороток крови пациентов с хроническим вирусным гепатитом D проводился при участии д.м.н. Слепцовой С.С.

Для этой группы пациентов проведены исследования по определению генотипа HBV методом ИФА с использованием МАТ, как единственно возможного метода для определения генотипа в образцах сывороток крови с недетектируемым уровнем ДНК HBV.

Эти же 59 образцов сывороток крови использованы для получения как частичных, так и полных последовательностей генома HDV и затем данные последовательности были использованы для генотипирования изолятов и филогенетического анализа с целью реконструкции истории распространения HDV на территории Республики Саха (Якутия) и Российской Федерации в целом.

#### **2.1.6. Пациенты с хроническим вирусным гепатитом дельта (Республика Дагестан)**

Из Республики Дагестан доктором С.А. Магомедовой нам для исследования предоставлены данные когорты пациентов, состоящих на учете в инфекционном кабинете г. Махачкала с диагнозом ХГД. Всего в анализ включено 58 больных. Возраст пациентов в исследуемой группе: медиана – 30, минимум – 13, максимум – 57 лет. Соотношение мужчин и женщин составило 1,1:1.

Сбор образцов сывороток крови пациентов с хроническим вирусным гепатитом D проводился к.м.н. Магомедовой С.А.

В анализ включен 41 образец для генотипирования HBV на основании серотипирования HBsAg методом ИФА с использованием серотип-специфичных МАТ, как единственно возможного метода для определения генотипа в образцах

сывороток крови с недетектируемым уровнем ДНК HBV с целью определения основных циркулирующих в регионе генотипов вируса гепатита В.

Также во всех 58 образцах выявляли анти-HDV методом ИФА. Затем в данных образцах определяли РНК HDV методом ОТ-ПЦР с последующей амплификацией фрагментов РНК и секвенированием полного генома для того, чтобы определить основные циркулирующие в регионе генотипы HDV и реконструировать историю распространения вируса в регионе и на территории РФ в целом.

## **2.2. Сбор и хранение образцов**

### **2.2.1. Образцы сывороток крови**

Для получения образцов проводили забор крови из локтевой вены с использованием одноразовых систем для забора крови «Вакутейнер». Образцы крови в пробирках «Вакутейнер» инкубировали в течение часа при комнатной температуре, затем центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут для отделения сыворотки от сгустка. Полученную сыворотку крови отбирали дозаторами с наконечниками, снабженными аэрозольным барьером, и переносили образцы в пробирки марки «Эппендорф» объемом 1,5 мл. Каждый образец сыворотки крови был разделен на аликвоты (4 аликвоты, по 1 мл каждая для взрослых лиц; 4 аликвоты, по 0,5 мл каждая - для детей моложе 15 лет).

Для предотвращения многократного размораживания – оттаивания образцов, способного привести к деградации генетического материала, все образцы хранились в аликвотах в низкотемпературном холодильнике при температуре - 80 °С.

### **2.2.2. Образцы слюны и сухой капли крови**

Для сбора слюны использовали стерильные чашки Петри индивидуально для каждого пациента, с которых затем дозаторами с наконечником с аэрозольным барьером переносили жидкое отделяемое в пробирку марки «Эппендорф» объёмом 1,5 мл.

Для сбора сухой капли крови готовили лист фильтровальной бумаги (Whatman) размером 10 см<sup>2</sup>, на который при стандартном взятии венозной крови у пациента для серологических и молекулярно-генетических исследований наносили одну каплю.

Образцы сывороток крови (2016-2018 годы) и слюны (2017 год) были доставлены в лабораторию с соблюдением холодовой цепи и хранились при температуре -70 °С, а образцы СКК, собранные в 2016 году и 2018 году – при комнатной температуре (22-25 °С) 3 года и 1 год, соответственно.

Для проведения исследования образцы слюны после оттаивания центрифугировали при 4 000 об/мин в течение 5 минут, супернатант переносили в чистую пробирку и использовали для проведения ИФА.

Для работы с СКК вырезали из листа фильтровальной бумаги с сухой каплей крови участок площадью примерно 1 см<sup>2</sup>. Помещали образец СКК в чистую пробирку с 1 мл фосфатно-солевого буфера с твином. Затем проводили ночную инкубацию при комнатной температуре на шейкере. Центрифугировали при 10 000 оборотах в течение 2 минут. Супернатант использовали для проведения ИФА.

## **2.3. Методы исследований**

### **2.3.1. Определение серологических маркёров вирусов гепатитов В и дельта**

Серологические маркёры инфицирования вирусами гепатитов В и D определяли с использованием коммерческих тест-систем иммуноферментного анализа с использованием наборов реагентов производства АО «Вектор-Бест» г.

Новосибирск, согласно инструкции производителя. Использованные нами в работе тест-системы представлены в таблице 5.

Таблица 5. Тест-системы для проведения иммуноферментного анализа, применявшиеся для выявления серологических маркеров вирусных гепатитов в образцах крови и биологических жидкостей пациентов.

<b>Маркер</b>	<b>Тест-система</b>
HBsAg	«HBsAg-ИФА-БЕСТ», 0,01МЕ/мл
	«HBsAg-подтверждающий-ИФА-БЕСТ»
	«HBsAg-количественный -ИФА-БЕСТ», аналитический диапазон измерения от 0,05 до 100 000 МЕ/мл.
Субтип/Генотип HBsAg	«Субтип/генотип ВГВ-ИФА-БЕСТ»
Анти-HBcore суммарные	ВектоHBcAg-антитела
Анти-HDV суммарные	Вектогеп D-антитела

### **2.3.2. Выделение нуклеиновых кислот из образцов сыворотки крови**

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.

### 2.3.3. Молекулярные маркеры вирусов гепатитов В и дельта

#### 2.3.4. Выявление ДНК HBV

Определение ДНК HBV проводили методом in-house ПЦР-анализа с вложенными праймерами, адаптированными из А. Basuni и W. Carman [55] 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 по результатам тестирования серии предельных разведений образцов с известной концентрацией ДНК HBV. Амплификацию в ПЦР с высокоточной ДНК-полимеразой проводили с помощью набора Fast Start High Fidelity PCR System (Roche Applied Science, Германия) по протоколу производителя. Последовательность праймеров, использованных для амплификации участков генома вируса гепатита В представлена в таблице 6.

Таблица 6. Праймеры для проведения амплификации ДНК вируса гепатита В.

Последовательность нуклеотидов	Положение	Направление	Положение в геноме*
5'-cctgctgggtggctccagttc-3'	внешний	прямой	56-75
5'-ccacaattckttgacatactttcca-3' (k=g/t)	внешний	обратный	979-1003
5'-ccgaggactggggaccctg-3'	внутренний	прямой	129-146
5'-ggtaggggttaaatgtatacc-3'	внутренний	обратный	823-842

\* - нумерация нуклеотидных позиций приведена по прототипному штамму DM059405 [245].

Условия для обоих раундов ПЦР были следующими: 94 °С – 2 мин., затем 35 циклов: денатурация при 94 °С – 45 сек., отжиг при 55 °С – 45 сек. и удлинение цепи при 72 °С – 1 мин. 30 сек. Полученный в ПЦР продукт величиной 713 п.о. вырезали из геля и выделяли из агарозы с помощью набора QIA quick Gel Extraction kit (QIAGEN, Hilden, Германия) в соответствии с протоколом производителя. Первичную нуклеотидную последовательность определяли на автоматическом

секвенаторе 3500 Genetic Analyzer (ABI, Foster City, США) с использованием набора Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit.

### **2.3.5. Филогенетический анализ полученных последовательностей ДНК вируса гепатита В**

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. Для определения генотипов использовалась классификация согласно последним рекомендациям ICTV ([https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/reverse-transcribing-dna-and-rna-viruses-2011/w/rt\\_viruses/155/hepadnaviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/reverse-transcribing-dna-and-rna-viruses-2011/w/rt_viruses/155/hepadnaviridae)), а для дополнительного разделение на субгенотипы – классификация, предложенная Kramvis [137].

Филогенетические деревья были построены методом ML (максимального правдоподобия), реализованного в пакете PhyML 3.0 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>). Оптимальная модель была выбрана с помощью jModelTest2 (<http://jmodeltest.org/>): модель нуклеотидной эволюции - GTR, эвристика для поиска в пространстве деревьев - NNI (обмен ближайшими соседями), оценка качества дерева - aLRT SH-like (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/alrt/>) анализ. Визуализация полученных филогенетических деревьев была осуществлена с помощью программы FigTree v1.4.3.

### **2.3.6. Выявление РНК HDV**

Образцы сывороток крови пациентов с гепатитом D были протестированы на наличие РНК HDV с использованием полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с вложенными праймерами для области R0 генома

вируса [81]. Координаты праймеров (856 – 1275 нт) соответствуют эталонной последовательности JA-M27 (GenBank), а их последовательности и характеристика представлены в таблице 7. Величина амплифицируемого фрагмента составляет 380 нуклеотидов.

Таблица 7. Праймеры для проведения амплификации РНК вируса гепатита дельта.

Праймер	Последовательность нуклеотидов	Положение	Направление
HDV850	5'-CGGATGCCCAGGTCGGACC-3'	внешний	прямой
HDV1380	5'-GGAGCWCCCCGGCGAAGA-3'	внешний	обратный
HDV856	5'-AGGTGGAGATGCCATGCCGAC-3'	внутренний	прямой
HDV1275	5'-GGAYCACCGAAGAAGGAAGGCC-3'	внутренний	обратный

Обратную транскрипцию проводили с использованием коммерческого набора M-MLV (Sileks, Россия) согласно протоколу производителя и, используя видоспецифичный праймер HDV1380 (таб.7), условия реакции составили 42 °С – 60 мин.

ПЦР проводили с помощью коммерческого набора Taq-полимера (Sileks, Россия) согласно протоколу производителя. Условия для обоих раундов были следующие: 95 °С – 5 мин., 35 циклов из 95 °С – 30 сек, 55 °С – 30 сек, 72 °С – 45 сек и контрольный этап удлинения цепи 72 °С – 7 мин.

Полученные в результате ПЦР ампликоны визуализировались в сравнении с маркером молекулярных масс в 2% агарозном геле с помощью гель-электрофореза.



### 2.3.7. Филогенетический анализ полученных последовательностей участка R0 РНК вируса гепатита дельта

Для генотипирования полученных последовательностей проводили очистку из геля положительных ампликонов с помощью коммерческого набора QIAquick® Gel Extraction Kit (Qiagen, Германия) согласно протоколу производителя. Первичную нуклеотидную последовательность фрагмента R0 генома вируса гепатита D 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.

На основании полученных первичных нуклеотидных последовательностей участка R0 было построено филогенетическое дерево. Генотип HDV определяли на основе филогенетического анализа с эталонными последовательностями HDV, рекомендованными в классификации ICTV 2018 [219], с использованием метода максимального правдоподобия (ML) в программе MEGA 7.0.18 [187].

### 2.3.8. Стратегия амплификации полного генома вируса гепатита дельта

В нашем исследовании полные нуклеотидные последовательности геномов HDV были получены с помощью RT-PCR с использованием двух пар праймеров, которые охватывают весь геном HDV. Продукты ПЦР секвенировали напрямую. На рисунке 7 схематично представлена стратегия амплификации полного вирусного генома. Ожидаемый размер амплифицированного генома составил 1680 нуклеотидов. Мы использовали две пары праймеров для амплификации перекрывающихся областей генома вируса гепатита D:

- 1) **HDV-A1** (1160 (прямой)) и **HDV-A2** (430 (обратный)) – 950 и
- 2) **HDV-B1** (300 (прямой)) и **HDV-B2** (1400 (обратный)) – 1100 последовательности нуклеотидов.

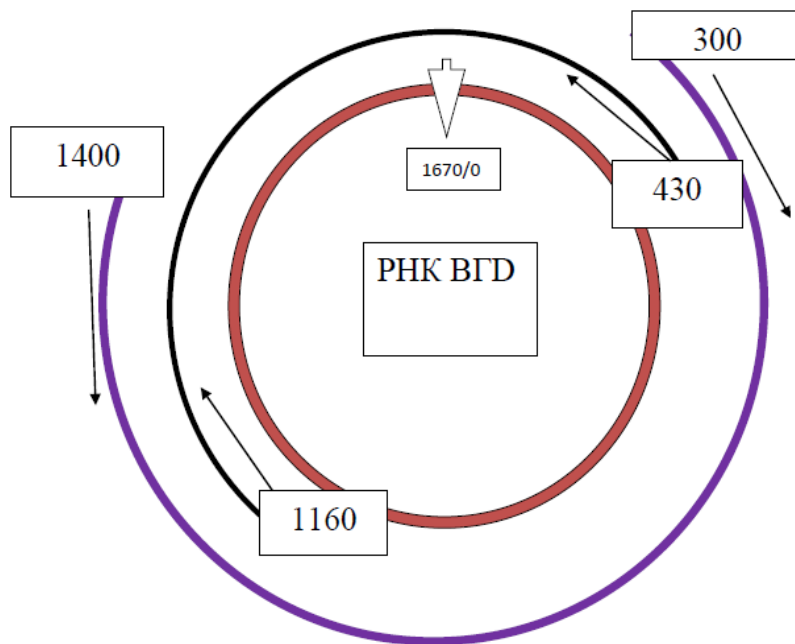
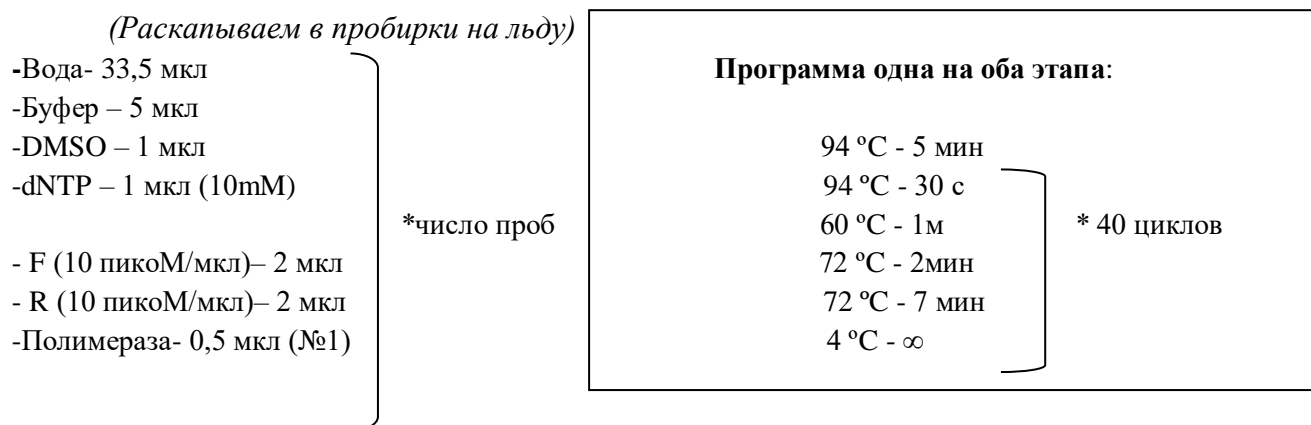


Рисунок 7. Стратегия амплификации полного генома HDV. Адаптировано из [82].

При проведении реакции обратной транскрипцией мы использовали коммерческий набор для реакции обратной транскрипции (ОТ) «Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit». Условия для данного раунда следующие: 25 °С- 10 мин., 50 °С- 60 мин., 85 °С- 5 мин., 4 °С- ∞. По окончании раунда полученная кДНК хранилась на льду.

Для проведения ПЦР мы использовали коммерческий набор «Roche Fast Start High Fidelity PCR System». На схеме представлены условия проведения реакции, которые были одинаковы для амплификации двух участков генома (рисунок 8).

- 1) 1 пара праймеров HDV-A1 (1160F) и HDV-A2 (430R)  
Длина фрагмента 950 п.о.
- 2) 2 пара праймеров HDV-B1 (300F) и HDV-B2 (1400R)  
Длина фрагмента 1100 п.о.



*Итого, общий объем 45мкл PCR смеси + 5 мкл кДНК*

Рисунок 8. Схема амплификации двух перекрывающихся участков генома HDV.

Полученные методом амплификации двух перекрывающихся участков вирусного генома ампликоны размером 950 нт и 1100 нт, перекрывающие полный геном HDV, чистили из 2% агарозного геля, как описано выше.

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 –

OK142859-OK142919, OK142930-OK142937, MH791027-MH791030, Республика Саха (Якутия) – OK142820-OK142858, OK142920-OK142929, OK142938-OK142939.

### **2.3.9. Филогенетический анализ с временной шкалой**

Для проведения сравнительных исследований по достоверности использования различных методов филогенетического анализа мы с помощью пакета программ BEAST v1.8.4 (Drummond & Rambaut, 2007), рассчитывающего филогению посредством алгоритма Монте-Карло по схеме марковских цепей (Markov chain Monte Carlo) проанализировали первичные нуклеотидные последовательности фрагмента R0 HDV, сравнив их с последовательностями из GenBank, максимально близкородственным нашим образцам, на момент выгрузки из базы данных 26.03.2019 года.

Оптимальная модель выбрана нами с помощью программы jModelTest2 (<http://jmodeltest.org/>): модель нуклеотидной эволюции – HKY85, эвристика для поиска в пространстве деревьев - NNI (обмен ближайшими соседями), оценка качества дерева - aLRT SH-like анализ. В данной работе были использованы: набор параметров согласно Yang96 [374], «ослабленная» модель молекулярных часов (lognormal relaxed clock), изначальная скорость накопления замен - 0.0028 нуклеотидных замен на сайт в год, модель распределения возраста узлов - bayesian skyline. 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.

Аннотация дерева была произведена в TreeAnnotator v1.8.3, визуализация - FigTree v1.4.3.

Полные геномные последовательности HDV из этого исследования были дополнены 327 последовательностями из GenBank с известными годом и страной выделения, которые имели расхождение не менее 1%. Выравнивание наборов данных по HDV было выполнено с использованием алгоритма ClustalW в программе MEGA 7 [187].

Оценка наиболее подходящей модели замены была выполнена с помощью Jmodeltest-2.1.10. Наиболее подходящими моделями были SYM + G для набора данных HDV, которые были выбраны среди других, потому что они имели самое низкое значение байесовского информационного критерия (BIC). Наличие положительной корреляции между генетической дивергенцией и временем отбора проб на HDV проверяли с помощью программы TempEst v.1.5. Филогенетические деревья, построенные с использованием программного обеспечения PhyML-3.1.

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 модели, 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 были аннотированы с помощью Tree Annotator v.1.10.4 с использованием каждого 1000 дерева и визуализированы с помощью FigTree v.1.4.3.

### 2.3.10. Методы статистического анализа

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 и включал: определение средних величин показателей (M); вычисление значений квадратичного отклонения (SD); выявление достоверности различий средних значений показателей в сравниваемых группах с использованием критерия Фишера и  $\chi^2$ -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 [375].

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

### Глава 3.1. Динамика показателей распространенности серологических маркеров инфицирования вирусами гепатитов В и дельта среди условно здорового населения эндемичных регионов РФ

Наиболее важной характеристикой эпидемического процесса вирусных гепатитов является распространенность маркеров инфицирования вирусами в общей популяции. Заболевание, вызванное вирусами гепатита, способно длительное время протекать бессимптомно и, следовательно, ускользать от регистрации и надзора. Поэтому объективные данные о нагрузке этих инфекций на популяцию можно получить только при проведении скрининговых исследований в репрезентативных группах населения. Оптимальной стратегией для выполнения такого рода исследований является выявление серологических маркеров (вирусных антигенов и антител к ним) в сыворотках крови условно здорового населения, поскольку данный подход позволяет определять как распространенность инфекции в настоящий момент времени, так и долю лиц на данной территории, встретившихся с этой инфекцией на протяжении жизни.

Гепатит В является инфекцией, потенциально управляемой с помощью вакцинопрофилактики. Массовая вакцинация против HBV проводится в РФ уже более 20 лет, что привело к снижению заболеваемости острым гепатитом В. В данном разделе представлены результаты наших сероэпидемиологических исследований, направленных на то, чтобы подтвердить это наблюдение и оценить изменение числа заражений HBV в эндемичных регионах Российской Федерации.

Данные по распространенности HDV в России остро нуждаются в актуализации, так как большинство работ по этому вопросу были опубликованы более 15 лет назад. Ситуация осложняется тем, что тестирование на маркеры гепатита D для пациентов с выявленной HBV-инфекцией в России рекомендовано только с 2021 года. Более того, гепатит D до настоящего времени не является

регистрируемой инфекцией, все случаи этого заболевания учитываются в статистике по гепатиту В, что скрывает реальную заболеваемость населения и нагрузку этой инфекции на систему здравоохранения.

Одной из задач нашего исследования стала необходимость оценить динамические изменения распространенности серологических маркеров инфицирования вирусами гепатитов В и D во всех возрастных группах условно здорового населения Республик Тыва и Саха (Якутия) за период 2008-2019 гг. Данные регионы относятся к наиболее неблагоприятным по гепатиту В в Российской Федерации, что подтверждается приведенными ниже результатами анализа многолетних показателей заболеваемости ХГВ.

### **3.1.1. Динамика показателей заболеваемости гепатитом В за период 2008 – 2019 годы в Республике Тыва и Республике Саха (Якутия)**

Заболеваемость острым ГВ (ОГВ) в исследуемых регионах Российской Федерации и в целом по стране имеет тенденцию к снижению, что обусловлено проведением массовой вакцинации против ГВ. Так, в 2008 году в среднем по РФ этот показатель составил 4,04 на 100 тыс. населения, в 2019 – 0,57. Аналогичная тенденция просматривается и в отношении эндемичных по данной инфекции регионов. В 2019 году, по материалам Государственного статистического наблюдения [49], в Республике Тыва не было выявлено ни одного случая заболевания ОГВ, в Республике Саха (Якутия) этот показатель составил - 0,41 на 100 тыс. населения. Динамика показателей заболеваемости хроническим гепатитом В на момент проведения наших исследований в этих республиках и в Российской Федерации в целом представлены на рисунке 9. 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, пик пройден в 2014 году – 81,96), с последующим изменением его по синусоиде, в 2019 году – 40,85 случаев на 100 тыс. населения. Заболеваемость



ХГВ в Республике Тыва в настоящее время превышает практически в пять раз средние показатели по РФ. Показатели заболеваемости ХГВ в Республике Саха (Якутия) ниже, чем в Республике Тыва, однако также превышают аналогичный по РФ в 2,9 раза. Необходимо отметить их стабильное снижение, начиная с 2016 года, в 2019 году частота выявления новых случаев хронического заболевания ГВ в Республике Саха (Якутия) за 12 лет наблюдения снизилась и составила 24,85 на 100 тыс. населения.

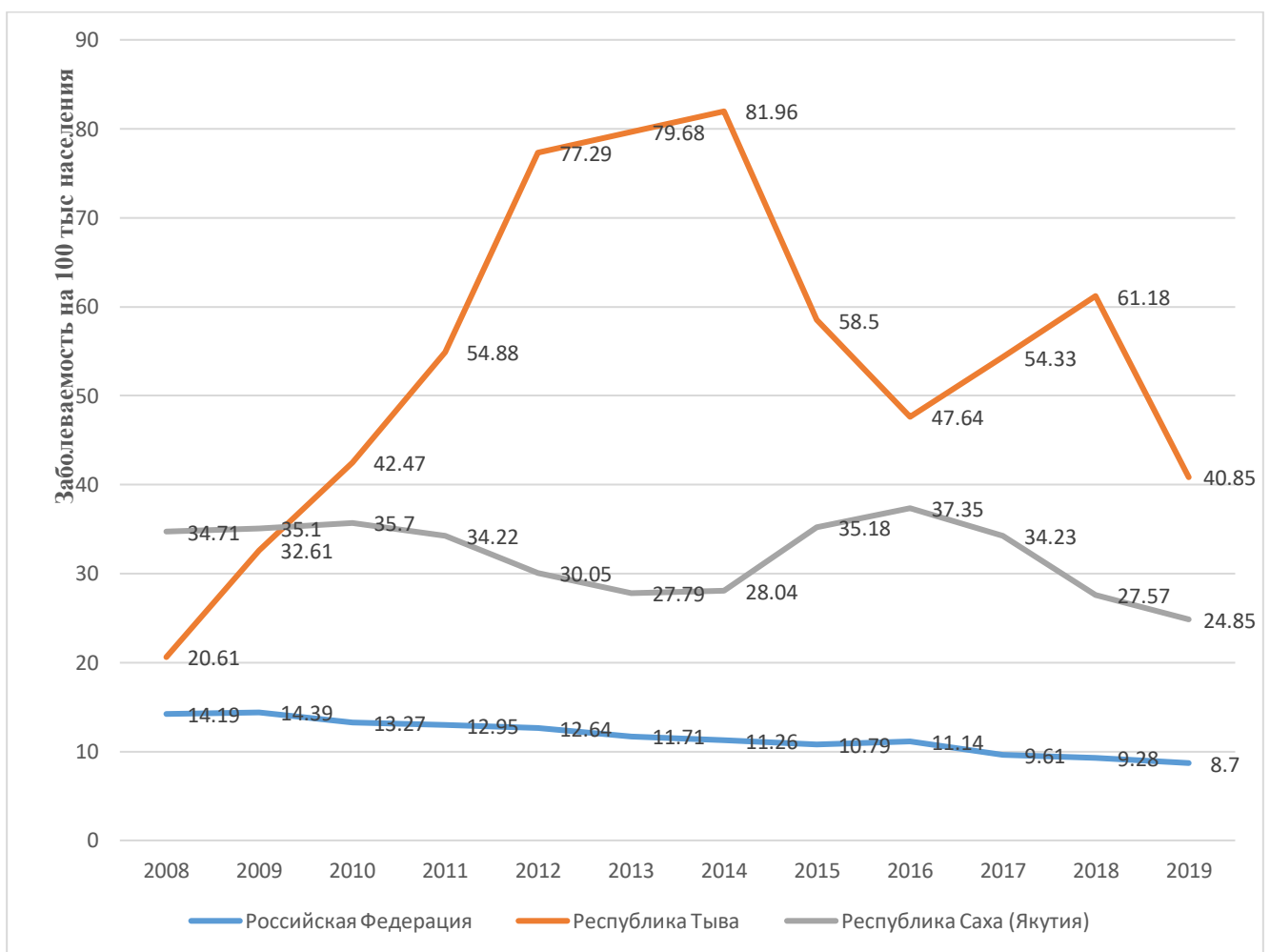


Рисунок 9. Показатели заболеваемости ХГВ на 100 тыс. населения в РФ, Республике Тыва и Республике Саха (Якутия) в период 2008-2019 годы.

### **3.1.2. Динамика выявления HBsAg среди различных возрастных групп условно здорового населения Республики Тыва за период 2008-2019 годы**

Средняя частота обнаружения HBsAg среди условно здорового населения Республики Тыва в 2019 году составила 1,2% (14/1170, 95% ДИ: 0,69–2,02%), демонстрируя значительное снижение распространенности HBsAg по сравнению с данными 2008 года – 7,8% (95/1154, 95% ДИ: 6,78–9,97%,  $p < 0,05$  (точный критерий Фишера)).

Значительное снижение показателей распространенности HBsAg в когортах условно здорового населения 2019 года наблюдалось в возрастных группах от 10-14 лет до 40-49 лет и у людей 60 лет и старше по сравнению с 2008 годом (рисунок 10). Случаев детектируемого HBsAg в 2019 году не наблюдалось в группах детей в возрасте до 1 года, 10-14 лет, 15-19 лет и молодых взрослых 20-29 лет. У детей 1-9 лет распространенность HBsAg в 2019 году была выше по сравнению с данными 2008 года (0,6% против 0,0%), не достигнув значимого уровня достоверности ( $p > 0,05$  (точный критерий Фишера)).

Единственной группой со стабильно высокими показателями выявления HBsAg были взрослые люди в возрасте 50-59 лет (7,5% в 2019 году против 7,2% в 2008 году,  $p > 0,05$  (точный критерий Фишера)).

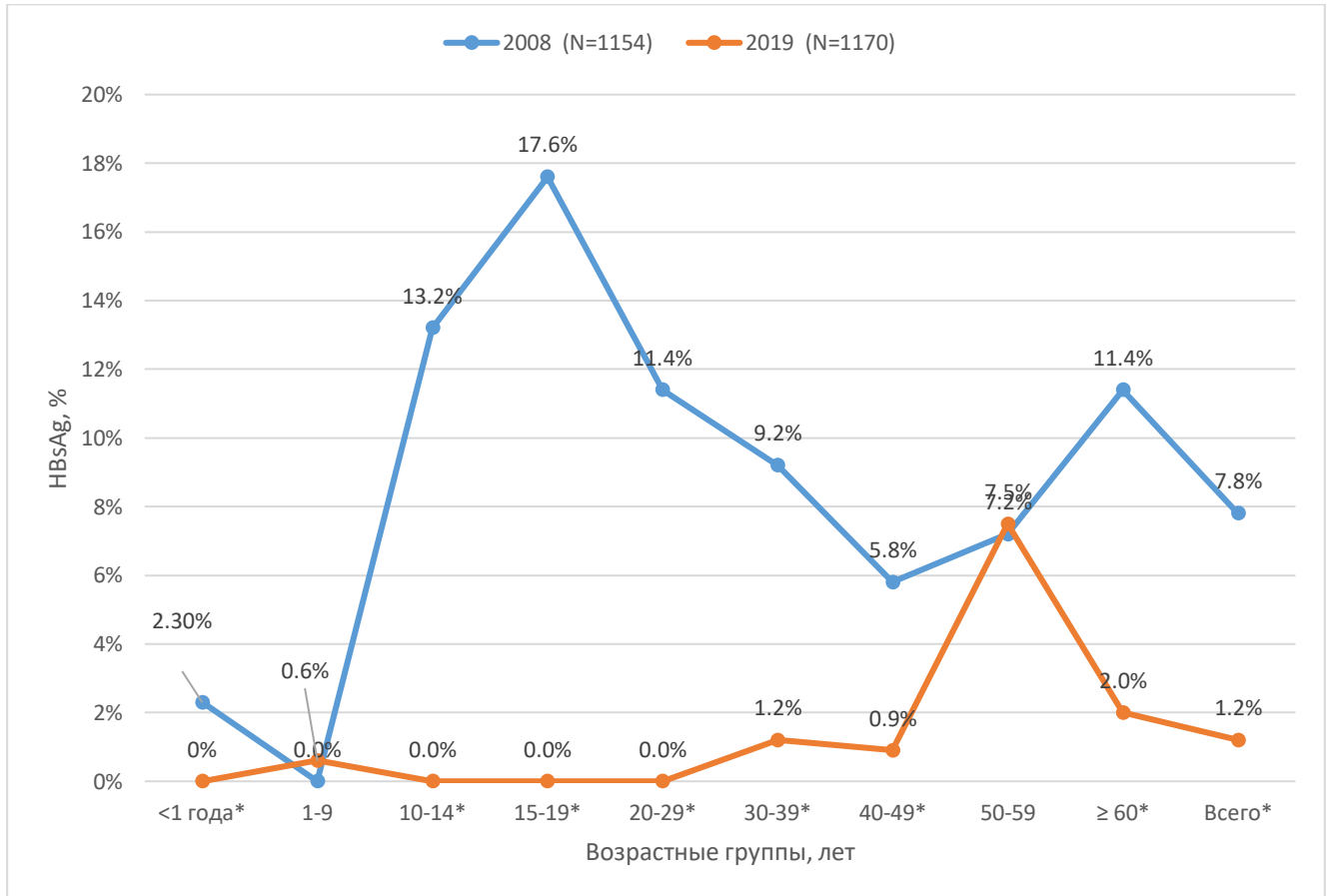


Рисунок 10. Частота выявления HBsAg в различных возрастных группах условно здорового населения Республики Тыва в 2008 и 2019 году.

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

### **3.1.3. Динамика выявления HBsAg среди различных возрастных групп условно здорового населения Республики Саха (Якутия) за период 2008-2019 годы**

При обследовании лиц из различных возрастных групп условно здорового населения Республики Саха (Якутия) в 2008 году HBsAg выявили в 2,3% (22/968) случаях. В 2019 году процент выявления этого маркера составил 3,2 (34/1072), различия статистически недостоверны ( $p > 0,05$  (точный критерий Фишера)).

Сравнительные результаты распределения показателей частоты выявления основного серологического маркера инфицирования HBV (HBsAg) среди различных групп условно здорового населения Республики Саха (Якутия) в 2008 и 2019 годах представлены на рисунке 11.

Среди возрастных групп условно здорового населения от детей до 1 года до взрослых 40-49 лет отмечается увеличение циркуляции основного маркера инфицирования HBV, однако не достигая достоверных значений изменения ( $p > 0,05$  (точный критерий Фишера)).

Следует отметить достаточно стабильное выявление HBsAg у младенцев до года, что еще раз ставит вопрос о качестве проводимой вакцинации населения против гепатита В. За период наблюдения данный показатель увеличился на 0,2%, достоверно не изменяясь, составил 2,7 и 2,9%, соответственно.

Наиболее пораженными возрастными группами оказались лица в возрасте 40-49 лет (5,94%) и 30-39 лет (5,4%). Только в группе взрослого населения 50-59 лет за истекший период произошло достоверное снижение частоты выявления HBsAg в 2019 году (1,72%) по сравнению с 2008 годом (5,4%),  $p < 0,05$  (точный критерий Фишера)). Среди лиц старше 60 лет показатель частоты распространения HBsAg несколько выше и составил 1,7% в 2019 году по сравнению с 2008 годом (2,6%), что, однако, статистически не достоверно ( $p > 0,05$  (точный критерий Фишера))

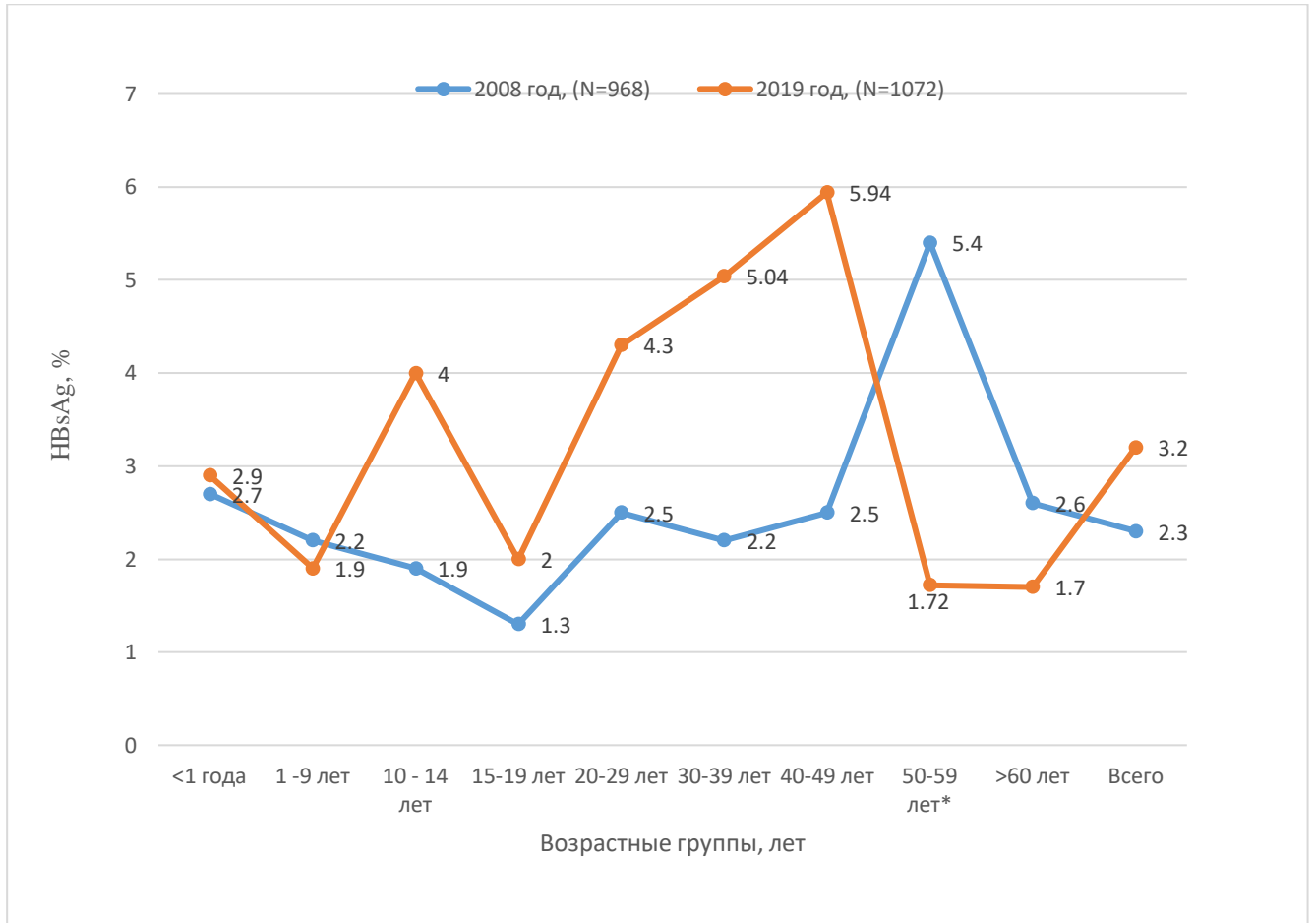


Рисунок 11. Частота выявления HBsAg в различных возрастных группах условно здорового населения Республики Саха (Якутия) в 2008 и 2019 годы.

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

### 3.1.4. Выявление HBsAg в группах населения Республики Саха (Якутия) и Республики Тыва, вакцинированных и невакцинированных против гепатита В

Вакцинация новорожденных против гепатита В внесена в Национальный календарь профилактических прививок РФ с 1998 г., в настоящее время возраст лиц, вакцинированных при рождении, составляет от 0 до 23 лет. В таблице 8 представлено сравнение показателей частоты распространения HBsAg среди

вакцинированных групп и населения, не подлежавшего обязательной вакцинации, за период 2008 - 2019 годы в республиках Тыва и Саха (Якутия).

В исследовании, проведенном среди вакцинированных и невакцинированных групп условно здорового населения в Республике Саха (Якутия) в 2008 году (2,4% и 2,9%, соответственно,  $p > 0,05$  (точный критерий Фишера)) и в 2019 году (2,6% и 3,7%, соответственно,  $p > 0,05$  (точный критерий Фишера)), получены данные, свидетельствующие об отсутствии достоверных различий в частоте выявления HBsAg ( $p > 0,05$ , точный критерий Фишера).

При сравнении показателей частоты выявления HBsAg в 2008 и в 2019 годы установлено, что среди вакцинированного поколения Республики Саха (Якутия) не выявлено достоверно значимых различий (2,4% и 2,6%, соответственно,  $p > 0,05$  (точный критерий Фишера)). Также за этот период не наблюдали достоверно значимых изменений среди невакцинированного поколения региона (2,9% и 3,7%, соответственно,  $p > 0,05$  (точный критерий Фишера)).

Таблица 8. Выявление HBsAg в группах населения Республики Тыва и Республики Саха (Якутия), вакцинированных и невакцинированных против гепатита В.

Регион	Год исследования	Вакцинированные (возраст, лет)	Невакцинированные (возраст, лет)	HBsAg среди вакцинированных n, %	HBsAg среди невакцинированных n, %	p, точный критерий Фишера
Республика Саха (Якутия)	2008	0 – 9	10 - >60	6/254, 2,4%	21/714, 2,9%	$p > 0,05$
	2019	0 -19	20 - >60	13/501, 2,6%	21/571, 3,7%	$p > 0,05$
Республика Тыва	2008	0 - 9	10 - >60	2/314 0,64%	88/840 10,5%	$p < 0,05$
	2019	0 - 19	20 - >60	2/534 0,4%	13/636 2,1%	$p < 0,05$

При аналогичном исследовании, проведенном в Республике Тыва становится очевидным, что существуют достоверные различия в выявлении HBsAg среди лиц,

вакцинированных и невакцинированных против гепатита В. Мы установили, что в 2008 году частота выявления HBsAg среди невакцинированных групп населения практически в десять раз превышала аналогичный показатель среди вакцинированных детей (10,5% и 0,64%, соответственно,  $p > 0,05$  (точный критерий Фишера)). Необходимо отметить достоверное снижение частоты выявления HBsAg среди невакцинированных лиц условно здорового населения в 2019 году по сравнению с 2008 годом (10,5% и 2,1%, соответственно,  $p > 0,05$  точный критерий Фишера).

При сравнении выявления HBsAg среди вакцинированного поколения Республики Тыва в 2019 и 2008 году показано, что достоверных изменений нет. Частота обнаружения HBsAg снизилась с 0,64 до 0,4% ( $p > 0,05$  (точный критерий Фишера)).

Таким образом, в Республике Саха (Якутия) за анализируемый период отмечено стабильное выявление HBsAg (2,4 – 3,7%) в группах как вакцинированного, так невакцинированного населения региона.

В Республике Тыва за анализируемый период отмечается значительное снижение частоты выявления HBsAg среди невакцинированного поколения и стабильно невысокие аналогичные показатели среди вакцинированных.

### **3.1.5. Динамика выявления анти-HBc среди различных возрастных групп условно здорового населения Республики Тыва за период 2008-2019 годы**

О значительных показателях распространения HBV-инфекции среди условно здорового населения свидетельствуют результаты выявления антител к HBcore – антигену (анти-HBc). Эти антитела, как правило, сохраняются пожизненно после встречи организма с вирусом, поэтому этот маркер является важным показателем интенсивности циркуляции HBV в популяции. На рисунке 12 представлены результаты динамики выявления анти-HBc в различных группах условно здорового населения Республики Тыва за период 2008 – 2019 годы. Так в 2008 году среди условно здорового населения региона частота выявления анти-HBc

достигала максимальных значений в группе лиц старше 60 лет (81,3%), минимальных (10,7%) в группе детей от 1 года до 9 лет (различия достоверны,  $p < 0,05$ , точный критерий Фишера)). Средняя распространенность анти-НВс среди всех возрастных групп населения была значительно ниже в 2019 году по сравнению с 2008 годом (29,9% (350/1170, 95% ДИ: 27,36% - 32,60%) по сравнению с 46,2% (533/1154, 95% ДИ: 43,33% - 49,07%),  $p < 0,05$ , точный критерий Фишера).

В группе младенцев до 1 года в 2019 году произошло достоверное увеличение частоты выявления анти-НВс по сравнению с данными 2008 года (37,2% и 19,3%, соответственно,  $p < 0,05$ , точный критерий Фишера). Циркуляция этого маркера остается стабильно высокой без достоверного снижения, что, по-видимому, обусловлено наличием материнских антител.

Среди детей 1–9 лет распространенность анти-НВс была ниже в 2019 году по сравнению с 2008 годом и достигла достоверных различий (10,7 против 6,3%,  $p = 0,0182$ ). Важно отметить высокий уровень выявления антител к core антигену, свидетельствующих о встрече с вирусом или о перенесенной инфекции, среди подростков 15-19 лет (31,5%) в 2008 году, не получавших в силу своего возраста вакцину при рождении. В 2019 году данный показатель имел достоверное снижение (12,2%,  $p < 0,05$ , точный критерий Фишера).

Начиная с возрастной группы 15-19 лет и до 60 лет и старше, распространенность анти-НВс значительно снизилась по сравнению с когортой 2008 года, за исключением возрастной группы 50-59 лет, где наблюдаемое снижение не было статистически значимым (рис. 12).



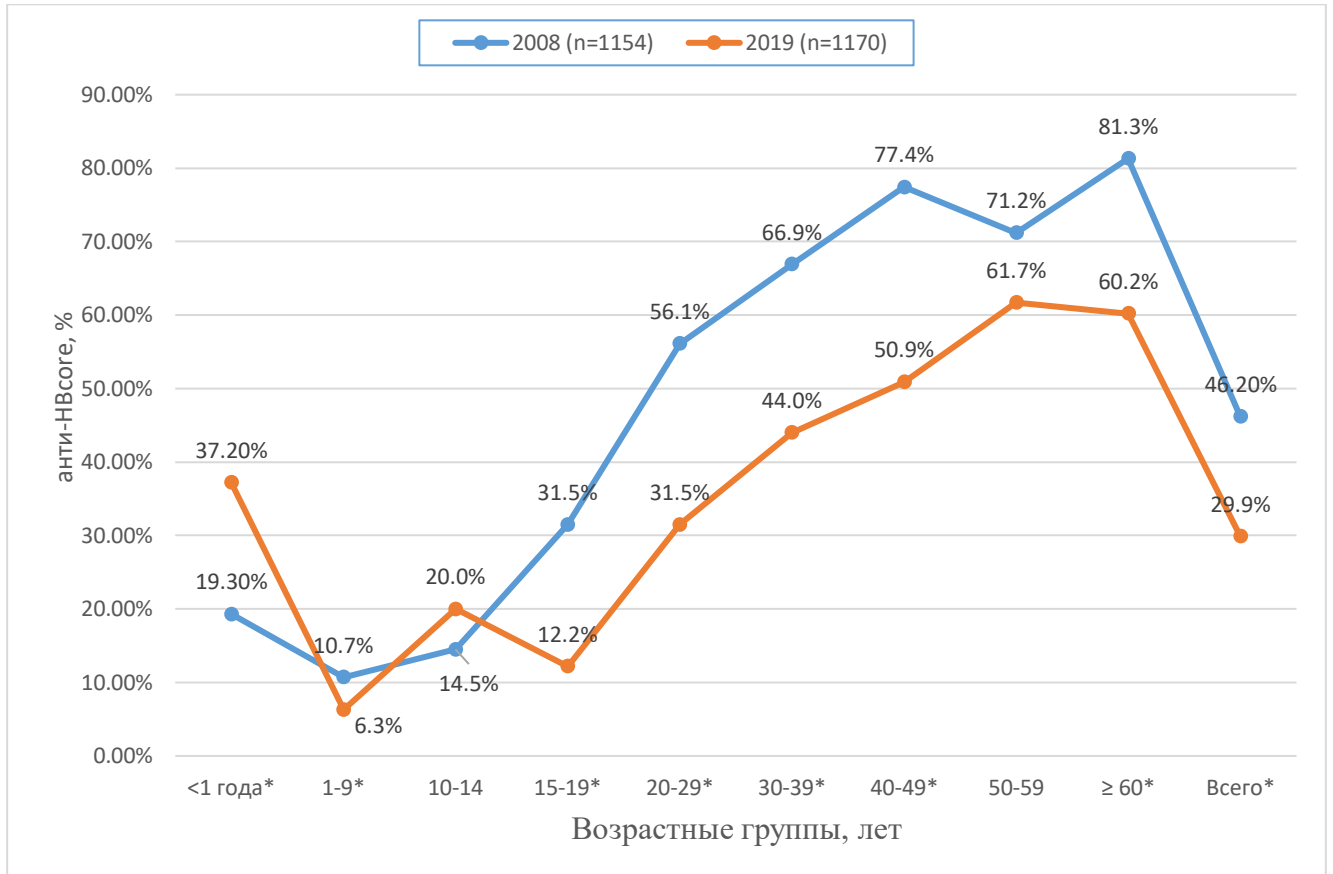


Рисунок 12. Частота выявления анти-НВс в различных возрастных группах условно здорового населения Республики Тыва в 2008 и 2019 году.

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

### 3.1.6. Динамика выявления anti-НВс среди различных возрастных групп условно здорового населения Республики Саха (Якутия) за период 2008-2019 годы

Среди различных возрастных групп условно здорового населения Республики Саха (Якутия) провели сравнительные исследования по частоте выявления антител к core антигену вируса гепатита В. Данные представлены на рисунке 13.

За истекший период произошло достоверное снижение частоты выявления анти-НВс среди условно здорового населения региона. Так в 2008 году этот

показатель составил 42,7% (413/968), в 2019 году – 24,35% (261/1072), различия статистически достоверны ( $p < 0,05$ , (точный критерий Фишера)).

Сравнительный анализ частоты выявления анти-НВс в 2008 и 2019 годы показал, что в возрастных группах 1-9 лет (27,8% и 8,7%), 10-14 лет (36,2% и 9,6%), 15-19 лет (32,9% и 18,2%), 20-29 лет (41,2% и 23,1%) и среди лиц старше 60 лет (79,2% и 46,6%) ( $p < 0,05$ , (точный критерий Фишера) произошло достоверное снижение выявления анти-НВс.

Частота выявления этого маркера увеличивалась с возрастом обследуемых и достигала максимальных значений у лиц 50-59 лет в 2008 и в 2019 годы (55,4% и 53,5%, соответственно). Во всех возрастных группах от 30 до 59 лет при очевидном снижении не наблюдали достоверных изменений этого показателя.

В группе младенцев до 1 года (18,9% и 10,2% в 2008 и 2019 годы, соответственно) циркуляция этого маркера остается стабильно высокой без достоверного снижения, что, по-видимому, обусловлено наличием материнских антител.

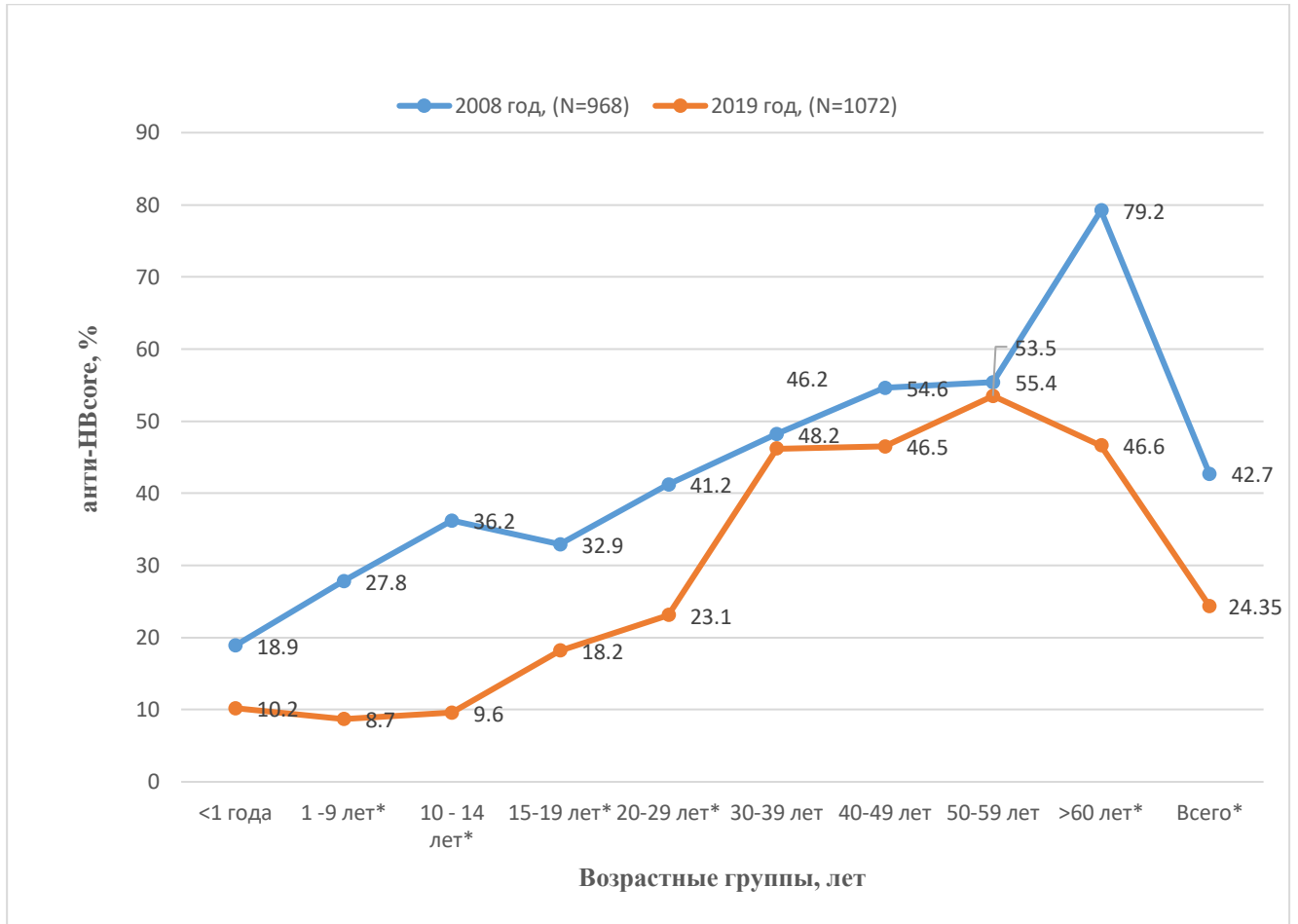


Рисунок 13. Частота выявления анти-НВс в различных возрастных группах условно здорового населения Республики Саха (Якутия) в 2008 и 2019 годы.

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

Таким образом, несмотря на проводимую более 20 лет вакцинацию против гепатита В в эндемичных регионах Российской Федерации (Республики Тыва и Саха (Якутия)) среди условно-здорового населения сохраняется циркуляция вируса гепатита В.

### **3.1.7. Анализ охвата вакцинацией против гепатита В новорожденных в Республике Саха (Якутия)**

Для изучения причин продолжающейся циркуляции HBV в вакцинированном поколении Республики (Саха) Якутия, подтвержденной нашими данными по выявлению HBsAg и анти-HBc, проведен анализ охвата вакцинацией против гепатита В новорожденных в Республике Саха (Якутия).

Уровни охвата вакцинацией новорожденных первой дозой вакцины, вводимой в первые 24 часа после рождения (НерВ-ВD), второй дозой, вводимой через 1 месяц после первой вакцинации (НерВ-2) и третьей дозой вакцины, вводимой через 6 месяцев после первой дозы (НерВ-3) в регионе представлены в таблице 1. Так, при анализе данных медицинских карт показано, что 99,2% (2165/2182) детей получили вакцину НерВ-ВD. Всего в 6 из 16 обследованных медицинских центров республики Саха (Якутия) зарегистрировано 17 медицинских карт без отметки о наличии введения первой дозы вакцины НерВ-ВD. Среди этих случаев десять (59%) были связаны с отказом родителей, а остальные семь случаев были вызваны медицинскими причинами. Наиболее частыми причинами отказа от проведения вакцинации были недоношенность, желтуха новорожденных, гемолитическая болезнь новорожденных, перинатальное поражение ЦНС и сочетание этих состояний с другими патологиями.

Охват третьей дозой вакцины НерВ3 к возрасту одного года составил 92% в регионе исследования. Этот показатель составлял от 87% до 100% во всех обследованных медицинских центрах Республики Саха (Якутия) (таблица 9). В регионе самые низкие показатели наблюдались по своевременному охвату новорожденных второй дозой вакцины НерВ-2. Этот показатель был ниже 70% в 7 из 16 обследованных клиник, что свидетельствует о том, что вторая доза, а, следовательно, и третья доза вакцины часто вводились с опозданием.

Таблица 9. Своевременное введение различных доз вакцины: НерВ-BD, НерВ-2 и НерВ-3.

Регион	Идентификационный номер клиники	Общее число детей	Дети, получившие НерВ-BD		Дети, получившие вторую дозу вакцины НерВ-2 через 4-6 недель		Дети, получившие третью дозу вакцины НерВ-3 в возрасте до 1 года	
			N	%	N	%	N	%
Республика Саха (Якутия)	Y1	140	140	100	62	44.3	122	87.1
	Y2	208	205	98.6	83	39.9	187	89.9
	Y3	100	99	99.0	46	46.0	89	89.0
	Y4	363	359	98.9	218	60.1	324	89.3
	Y5	100	93	93.0	46	46.0	95	95.0
	Y6	100	100	100	54	54.0	97	97.0
	Y7	100	100	100	72	72.0	96	96.0
	Y8	100	100	100	86	86.0	96	96.0
	Y9	104	104	100	79	76.0	100	96.2
	Y10	148	148	100	108	73.0	133	89.9
	Y11	100	100	100	82	82.0	100	100
	Y12	100	100	100	80	80.0	89	89.0
	Y13	106	106	100	79	74.5	100	94.3
	Y14	100	99	99.0	63	63.0	93	93.0
	Y15	213	212	99.5	159	74.6	189	88.7
	Y16	100	100	100	95	95.0	98	98.0
	Всего	2182	2165	99.2	1412	64.7	2008	92.0

Мы также наблюдали различия в показателях охвата вакцинацией новорожденных против гепатита В в зависимости от расположения медицинских центров. В Республике Саха (Якутия) показатели охвата НерВ-ВD, 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 10).

Таблица 10. Охват вакцинацией первой дозой НерВ-ВD, своевременной второй НерВ-2 и третьей НерВ-3 в зависимости от расположения медицинского центра.

Регион	Тип медицинского центра	Общее число детей	Дети, получившие НерВ-ВD		Дети, получившие вторую дозу вакцины НерВ-2 через 4–6 недель		Дети, получившие третью дозу вакцины НерВ-3 в возрасте до 1 года	
			N	%	N	%	N	%
Республика Саха (Якутия)	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 местн.)	619	617	99,7	476	76,9*	569	91,9

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

Таким образом, наиболее важным результатом нашего исследования является то, что доля защищенных лиц в вакцинированном поколении в регионе, эндемичном по HBV, ниже ожидаемой и недостаточна для остановки циркуляции HBV и HDV. Наши данные продемонстрировали наличие пробелов в охвате вакцинацией НерВ-ВD и своевременном введении НерВ-2 в реальной практике, несмотря на высокий охват введения НерВ-3 у детей к возрасту одного года.

Поскольку специфическая вакцина против гепатита D отсутствует и, вероятно, в ближайшее десятилетие не появится, то вакцинация против гепатита В

является единственным эффективным инструментом для контроля за HDV. По-видимому, вакцинация против HBV новорожденных является даже более эффективной с точки зрения предотвращения заражения HDV, чем HBV.

### **3.1.8. Частота выявления анти-HDV у лиц с наличием HBsAg в различных возрастных группах условно здорового населения Республики Тыва и Республики Саха (Якутия) в 2008 и 2019 годы**

В Республике Саха (Якутия) среди всех возрастных групп условно здорового населения в 2019 году нами не было выявлено ни одного случая инфицирования вирусом гепатита D среди HBsAg-положительных лиц (0/22 человек). Для сравнения в 2008 году в регионе частота выявления этого маркера также была очень низкой и составила всего 3 (3/22 человек).

При исследовании распространенности маркеров HDV среди условно здорового населения Республики Тыва в 2008 году нас интересовала не только текущая инфекция, но и перенесенная. Поэтому нами определялась анти-HDV не только среди HBsAg-положительных лиц, а во всей обследуемой группе условно здорового населения. В среднем частота выявления анти-HDV составила 2,3% в пересчете на все обследованное население, при этом данный маркер выявлялся во всех возрастных группах, кроме детей от 0 до 9 лет.

Стандартным подходом к оценке распространенности HDV является определение доли анти-HDV положительных среди лиц с HBsAg.

Средняя частота обнаружения HBsAg с анти-HDV составила 1,0% (12/1170, 95% ДИ: 0,57–1,81%) в когорте 2019 г., что указывает на значительное снижение по сравнению с 2,3% (26/1154, 95% ДИ: 1,53% - 3,30%) - в 2008 г. ( $p = 0,0218$ , точный критерий Фишера)).

Необходимо отметить, что доля анти-HDV-положительных образцов среди HBsAg-положительных лиц из групп условно здорового населения была значительно

выше в 2019 году по сравнению с когортой 2008 года (85,7% (12/14) против 27,4% (26/95),  $p < 0,05$ , точный критерий Фишера). Подобно общему количеству HBsAg-положительных образцов, подавляющее большинство образцов, положительных как в отношении HBsAg, так и анти-HDV, наблюдалось в возрастной группе лиц 50-59 лет (7,4%), что значительно превышало аналогичный показатель в этой возрастной группе, наблюдаемый в 2008 году (1,6%,  $p < 0,05$ , точный критерий Фишера). У людей моложе 30 лет случаев выявления HBsAg с анти-HDV не наблюдалось в когорте 2019 г., тогда как в когорте 2008 г. единственной возрастной группой, в которой не обнаруживался HBsAg/анти-HDV, были дети 0–9 лет (рисунок 14).

Таким образом, следует отметить, что высокие показатели частоты коинфекции HBV/HDV в Республике Тыва выявлены среди условно здорового населения, то есть среди лиц, не знающих о своем статусе в отношении этого быстро прогрессирующего тяжелого заболевания.

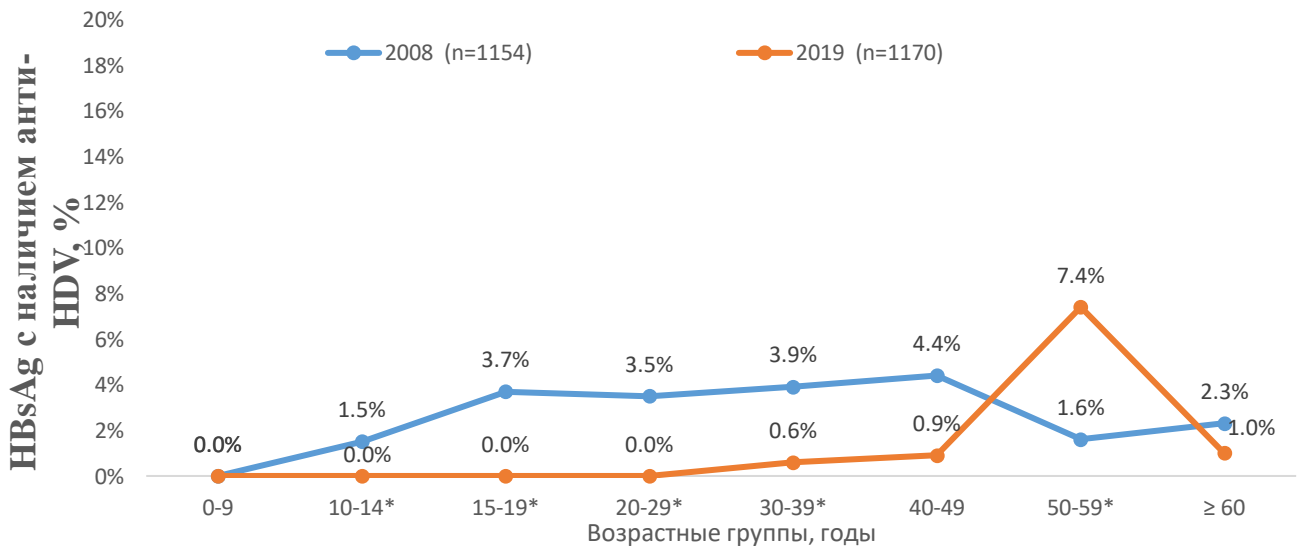


Рисунок 14. Доля лиц, имеющих анти-HDV среди HBsAg-положительных лиц из различных возрастных групп условно здорового населения Республики Тыва.

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

В 2019 году 4 из 14 HBsAg-положительных образцов содержали детектируемую ДНК HBV, а в 7 из 12 HBsAg / анти-HDV-положительных образцов



была выявлена РНК HDV. В 2008 г. был идентифицирован 21 образец с детектируемой ДНК HBV из 22 HBsAg-позитивных и из них 14 образцов содержали РНК HDV на детектируемом уровне. Все образцы сывороток крови, содержащие HBV и HDV, были включены в последующий филогенетический анализ.

### **3.2. Выявление маркеров инфицирования вирусами гепатитов В и D в биологических средах и сухой капле крови**

Одним из альтернативных вариантов для серологических исследований среди населения эндемичного региона в условиях ограниченных лабораторных ресурсов является оценка частоты выявления основных маркёров инфицирования вирусами гепатитов В и дельта в биологических средах организма (слюне и сухой капле крови (СКК)). Как и HBV, вирус гепатита D передается при контакте с кровью или другими физиологическими жидкостями инфицированного человека.

Известно, что в инфицированном вирусом гепатита D в организме больного хроническим гепатитом В одновременно циркулируют антитела к антигенам обоих возбудителей - анти- HDV, анти-HBc, а также HBsAg. Можно предположить, что анти-HDV, наряду с маркерами HB, присутствуют и в образцах слюны и СКК больных с коинфекцией, однако исследования по выявлению анти-HDV в таких образцах ранее не проводились. Очевидно, что биологический материал инфицированного человека (образцы слюны или СКК) могут служить объектом исследования как в серологических, так и в молекулярных тестах. Эти альтернативные типы клинических образцов преимущественно используются для диагностики и мониторинга терапии хронических вирусных заболеваний, таких как вирусные гепатиты В и С, ВИЧ в регионах, где дорогостоящая лабораторная медицинская инфраструктура на местах не может быть предоставлена по экономическим причинам, а также в силу удаленности от крупных лабораторий.

Интерес для нашей работы представляла также допустимая продолжительность хранения образцов до проведения исследования без снижения концентрации исследуемых маркеров до недетектируемого уровня.

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. Все материалы были собраны в 2016-2018 годы и хранились 1-3 года в соответствующих условиях – образцы СКК при комнатной температуре, образцы сывороток и слюны – при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Результаты выявления HBsAg, анти-HBc, анти-HDV в парных образцах сыворотки крови и слюны, собранных от пациентов с хроническим гепатитом HBV/HDV и хранившихся в течение 2-х лет при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , представлены в таблице 11.

В образцах сыворотки крови HBsAg выявлен у 92 (100%) больных, средняя величина коэффициента позитивности -  $35,27 \pm 8,69$ , в парных им образцах слюны – в 88/92 (95,7%), средняя величина коэффициента позитивности составила  $26,7 \pm 14,87$  и не отличалась достоверно от аналогичного показателя для образцов сыворотки крови ( $p > 0,05$ , Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса). При этом необходимо отметить отсутствие корреляционной зависимости между показателями коэффициента позитивности при выявлении данного маркера инфицирования в парных образцах сыворотки крови и слюны ( $r^2 = 0,084$ ). Частота выявления суммарных анти-HBc в образцах слюны составила 13,04% от аналогичного в парных образцах сыворотки крови (100%), различия статистически достоверны ( $p < 0,05$ , Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса). Средняя величина коэффициента позитивности для данного маркера в сыворотке крови составила  $0,043 \pm 0,008$ , в образцах слюны -  $0,48 \pm 0,035$  ( $p < 0,05$ , Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса). Корреляционная зависимость между показателями коэффициента позитивности анти-HBc в парных образцах сыворотки крови и слюны также отсутствовала ( $r^2 = 0,084$ ). Суммарные анти-HDV определяли в

парных образцах сыворотки крови и образцах слюны. Процент выявления составил 100% (92/92) в сыворотках против 0% (0/92) в образцах слюны ( $p < 0,05$ , Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса).

Таблица 11. Частота выявления HBsAg, анти-HBc, анти-HDV в парных образцах сыворотки крови и слюны, от пациентов с хроническим гепатитом дельта (срок хранения 2 года).

Маркер инфицирования	Тип образца	
	Сыворотки крови	Слюна
HBsAg (%), (Nпоз./Nобщ.)	100% (92/92)	95,7% (88/92)
$p^*$	$>0,05$	
$r^{2**}$	0,084	
КПсред	35,27±8,69	26,7±14,87
Анти-HBc %, (Nпоз./Nобщ.)	100% (92/92)	<b>13,04%</b> <b>(12/92)</b>
$P^*$	<b><math>&lt;0,05</math></b>	
$R^{2**}$	0,084	
КПсред	0,043±0,008	0,48±0,035
Анти-HDV % (N поз./N общ.)	100% (92/92)	<b>0%</b> <b>(0/92)</b>
$p^*$	<b><math>&lt;0,05</math></b>	
$r^{2**}$	Не рассчитывали	
КПсред	Не рассчитывали	Не рассчитывали

\* Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. Жирным шрифтом выделены статистически достоверные различия при сравнении между образцами сыворотки крови и слюны одного года сбора ( $p < 0,05$ )

\*\*Коэффициент корреляции сравниваемых величин.

Результаты серологических исследований по выявлению маркеров HBV и HDV в парных образцах сывороток и сухой капли крови (СКК), собранных в 2016 и 2018 году (сроки хранения при комнатной температуре 3 и 1 год, соответственно) представлены в таблице 12. В сыворотке крови частота выявления HBsAg составила 100% и не зависела от срока хранения. При аналогичных исследованиях

образцов сухой капли крови, хранившихся 3 года, частота выявления была достоверно ниже ( $p < 0,05$ , Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса) и составила 75% (60/80), в образцах, хранившихся 1 год, таких различий нет (94,9% против 100%,  $p > 0,05$ , Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса).

Таблица 12. Частота выявления HBsAg, анти-HBc, анти-HDV в парных образцах сыворотки крови и сухой капле крови (СКК) от пациентов с хроническим гепатитом HBV/HDV (3 года и 1 год хранения).

Маркер инфицирования	Тип образца		Тип образца	
	Сыворотка крови (3 года хранения)	СКК (3 года хранения)	Сыворотка крови (1 год хранения)	СКК (1 год хранения)
HBsAg (%), (Nпоз./Nобщ)	100% (80/80)	<b>75%</b> (60/80)	100% (117/117)	94,9% (111/117)
$p^*$	<b>&lt;0,05</b>		>0,05	
$r^{2**}$	0,02		0,02	
КПсред	25,33±2,69	5,95±6,87	18,93±7,03	10,44±7,62
Анти-HBcore % (Nпоз./Nобщ.)	Не исследовали	Не исследовали	100% (117/117)	<b>19,7%</b> (23/117)
$p^*$	Не рассчитывали		<b>&lt;0,05</b>	
$r^{2**}$			0,028	
КПсред			0,12±0,14	0,49±0,24
Анти-HGD % (N поз./N общ.)	Не исследовали	Не исследовали	100% (117/117)	<b>0%</b> (0/117)
$p^*$	Не рассчитывали		<b>&lt;0,05</b>	
$r^{2**}$			Не рассчитывали	
КПсред				

\* Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса. Жирным шрифтом выделены статистически достоверные различия при сравнении между образцами сыворотки крови и СКК одного года сбора ( $p < 0,05$ )

\*\*Коэффициент корреляции сравниваемых величин.

Среднее значение коэффициентов позитивности при выявлении HBsAg в образцах сыворотки и СКК (3 года хранения) достоверно отличаются ( $p < 0,05$ ,

Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса), в образцах после одного года эти показатели для образцов сыворотки и СКК схожи ( $p < 0,05$ , Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса).

Корреляционная зависимость между показателями коэффициента позитивности по HBsAg в парных образцах сывороток и СКК не выявлена ( $r^2 = 0,02$ ). Результаты выявления анти-HBc и антител к вирусу гепатита дельта в образцах СКК проведены только для образцов, хранившихся 1 год. В сыворотке крови анти-HBc выявлены в 100% случаев (117/117), а в образцах СКК только в 19,7% (23/117), различия статистически достоверны ( $p < 0,05$ , Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса). Корреляционная зависимость между показателями коэффициентов позитивности анти-HBc в парных образцах сывороток крови и СКК отсутствовала ( $r^2 = 0,028$ ). Анти-HDV были выявлены во всех 117 образцах сыворотки крови после одного года хранения при  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , в то время как во всех парных им образцах СКК был получен отрицательный результат (0/117), различия статистически достоверны ( $p < 0,05$ , Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса).

Таким образом, слюна и СКК могут служить альтернативным материалом для выявления HBsAg при скрининге и в научных сероэпидемиологических исследованиях при сроке хранения до 1 года. 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.

## Глава 3.3. Генотипы HDV и HBV у пациентов из эндемичных регионов РФ

### 3.3.1. Генотипы HDV

Доступные в настоящее время молекулярно-генетические данные для HDV остаются ограниченными. В целом, эти результаты необходимы для будущих исследований по диагностике, скринингу, эпидемиологии, эволюции вирусного гепатита дельта. 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 [262, 340].

В Российской Федерации данные о циркулирующих в популяции генотипах вируса гепатита D весьма ограничены некоторыми регионами [157, 166, 276]. На территории Республики Дагестан такие исследования никогда не проводились.

Для определения генетического разнообразия вируса гепатита D, циркулирующего в различных регионах Российской Федерации, нами исследованы геномные последовательности HDV, 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).

Распределение циркулирующих в исследуемых регионах РФ генотипов HDV также проиллюстрировано на рисунке 15.

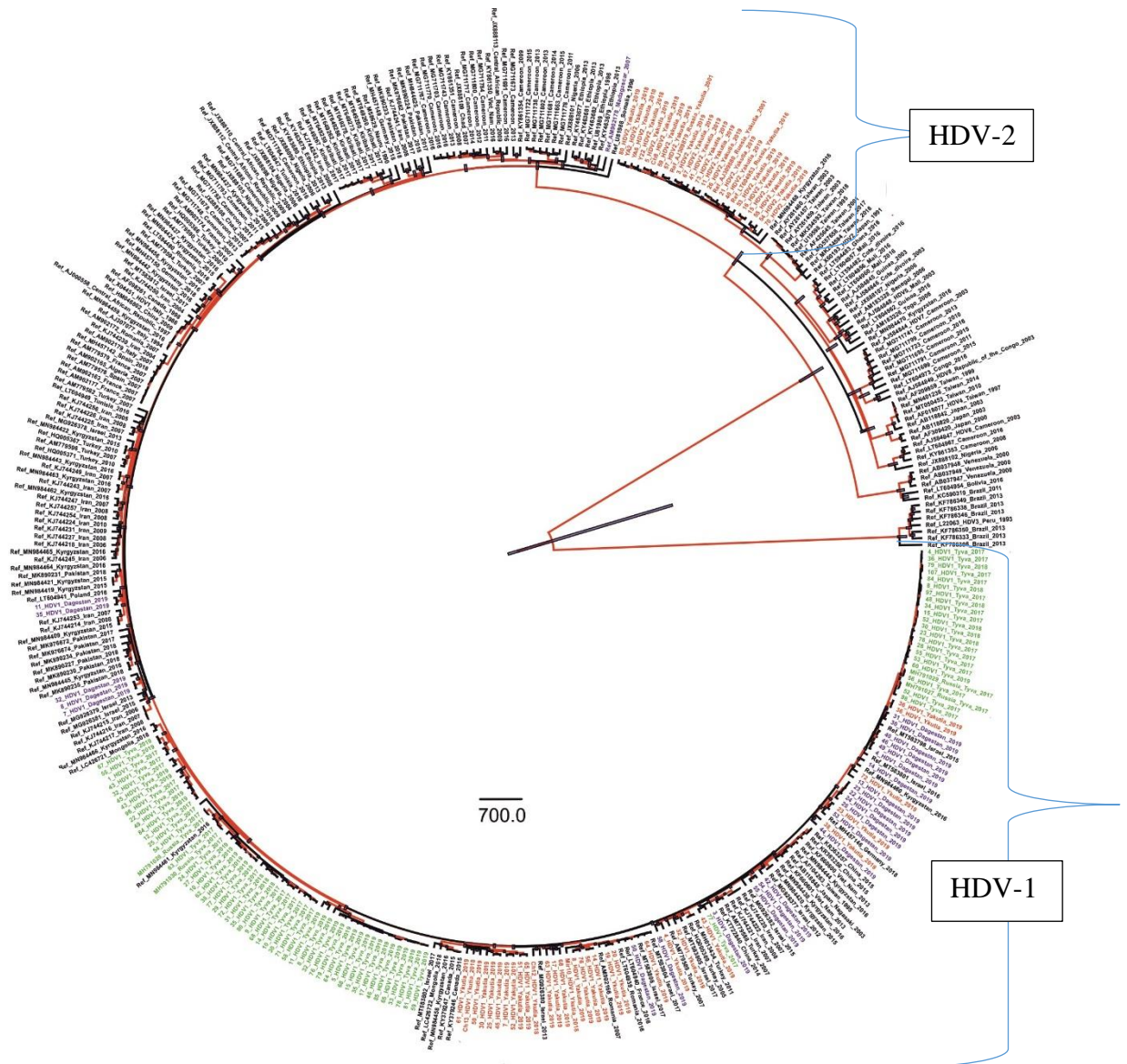


Рисунок 15. Распределение циркулирующих в исследуемых регионах РФ генотипов HDV. Филогенетический анализ с временной шкалой с использованием Байесовского анализа последовательностей HDV; 454 референсных последовательности. Последовательности HDV из республики Тыва – зеленый цвет, из республики Саха (Якутия) – красный цвет, из республики Дагестан – синий цвет.

Демографические и вирусологические характеристики пациентов с коинфекцией HBV и HDV из исследуемых регионов РФ, образцы которых использовались для генотипирования HDV, представлены в таблице 13. Из

доступных данных следует, что средний возраст пациентов из Республик Тыва и Дагестан не имел достоверных различий, составив 40,5 и 39 лет, соответственно ( $p > 0,05$  (Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса)). Соотношение мужчин и женщин в исследуемых когортах было различным и менялось от 0,5 до 2,6.

Таблица 13. Демографические и вирусологические характеристики пациентов с коинфекцией В и дельта из эндемичных регионов РФ.

Регион	Число пациентов	Возраст, годы (мин. - макс., медиана)	Мужчины: женщины соотношение	HDV РНК положит (n/N, %)	HDV генотипы (n/N, %)
Республика Тыва	514	4 -77, 40,5	194/320 (1:1,7)	370/493 (75,1%)	HDV-1, 370/370 (100%)
Республика Саха (Якутия)	59	нет данных	28/31 (1:1,1)	59 (100%)	HDV-1, 32/59 (54,2%) HDV-2, 27/59 (45,8%)
Республика Дагестан	58	13 – 68, 39	39/19 (1:0,5)	51/58 (87,9%)	HDV 1 –51 (100%)

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 Российской Федерации нами определён генотип вируса гепатита дельта, циркулирующий в Республике Дагестан (HDV-1).



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

Актуальность определения генотипа вируса гепатита В (HBV) обусловлена его взаимосвязью с тяжестью течения, прогнозом лечения и исходом заболевания.

Следует отметить, что в образцах сывороток крови пациентов с гепатитом D из Республики Тыва достоверно реже на детектируемом уровне присутствует ДНК HBV, чем в группе пациентов из Республики Саха (Якутия) и Республики Дагестан (3,9% против 37,3%, и 29,3%, соответственно,  $p < 0,05$ , (точный тест Фишера)). Число образцов с выявленной ДНК вируса гепатита В у пациентов из Республики Саха (Якутия) и Республики Дагестан достоверно не различались ( $p > 0,05$ , (точный тест Фишера)). При этом доля образцов с недетектируемым уровнем ДНК HBV во всех группах в нашем исследовании составила 85,4% от общего числа образцов пациентов с гепатитом дельта (таблица 14).

Очевидно, что при отсутствии ДНК HBV в образцах сывороток крови, определить генотип вируса гепатита В молекулярными методами, не представилось возможным.

Таблица 14. Распределение образцов сывороток крови пациентов из регионов РФ по наличию/отсутствию ДНК вируса гепатита В.

Регион	Всего образцов (N)	ДНК HBV пол (n/N, %)	ДНК HBV отр (n/N, %)
Республика Тыва	204	8/204 (3,9%)	196/204 (96,4%)
Республика Саха (Якутия)	59	22/59 (37,3%)	37/59 (62,7%)
Республика Дагестан	58	17/58 (29,3%)*	41/58 (70,1%)**
<b>Всего</b>	<b>321</b>	<b>47/321 (14,6%)</b>	<b>274/321 (85,4%)</b>

\* – по данным д-ра С.А. Магомедовой.

\*\* - из них доступно для тестирования методом ИФА - 25 образцов.

Определить генотип HBV в HBsAg-положительных образцах можно с помощью иммуноферментного анализа с панелью моноклональных антител (МАТ), применяемых в серотип-специфичных конъюгатах [39].

Первым этапом данного раздела исследования явилась валидация метода, то есть сопоставление результатов определения генотипов вируса гепатита В в HBsAg-положительных образцах сывороток крови с использованием панели МАТ с результатами молекулярно-биологических исследований для выделенных изолятов ДНК HBV.

Целью валидации являлась оценка возможности применения данного метода генотипирования для образцов сыворотки крови пациентов с коинфекцией HBV/HDV, в которых, как нами показано выше, уровень ДНК HBV часто является недетектируемым методами полимеразной цепной реакции.

Для того чтобы иметь доказательную базу для сравнительных исследований, был проведён филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей вируса гепатита В, выделенного из образцов сывороток крови пациентов из Республики Саха (Якутия) с моноинфекцией вирусом гепатита В и уровнем вирусемии, доступной для детекции.

Для валидации метода ИФА с использованием панели МАТ исследовали его с использовали образцы сывороток крови 82 пациентов с моноинфекцией HBV, вирусный генотип которых был определен прямым секвенированием участка S-гена (676 п.о.) вируса гепатита В по Сэнгеру (рисунок 16).

При проведении филогенетического анализа последовательностей, полученных прямым секвенированием участка S-гена (676 п.о.) HBV, мы получили следующее распределение генотипов, циркулирующих на территории Республики Саха (Якутия): А - 39%, С - 4%; D - 57%.

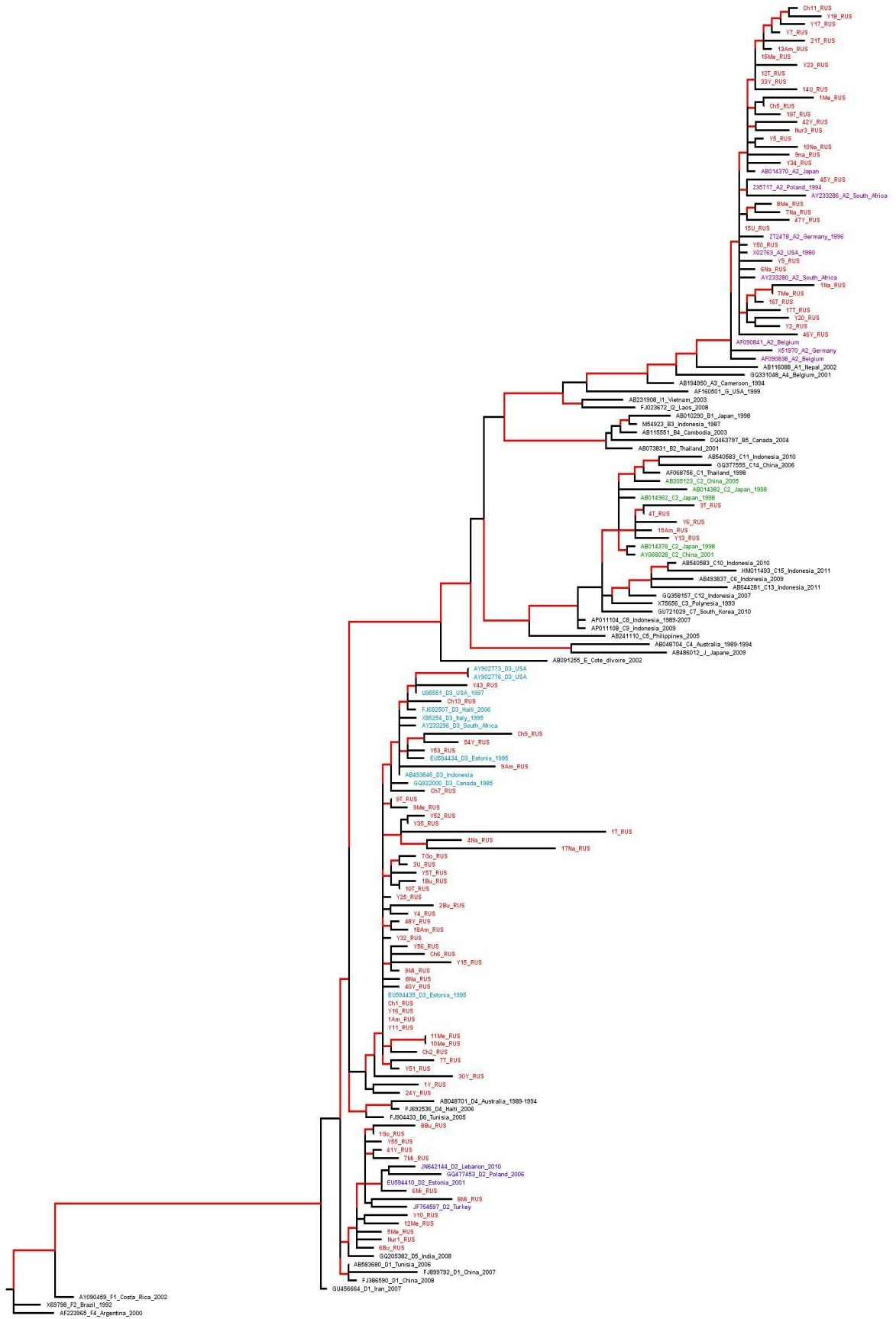


Рисунок 16. Филогенетический анализ последовательностей ДНК HBV. Филогенетические взаимоотношения изученных изолятов HBV, выделенных от пациентов с моноинфекцией HBV из Республики Саха (Якутия) (выделены красным цветом), и прототипных вариантов из GenBank на основании анализа нуклеотидной последовательности участка S-гена HBV (676 нт, 149–766; нумерация по прототипному штамму DM059405. Филогенетическое дерево построено по алгоритму Neighbour-joining без коррекции (uncorrected distance). Числа в узлах дерева — процент bootstrap-псевдорепликатов, поддерживающих данную группу (приведены только достоверные значения >70%). Длина всех исследованных последовательностей равна. Филогенетический анализ выполнен в программе Mega 7.0.

Сравнение результатов генотипирования HBV, полученных с использованием секвенирования по Сэнгеру, и набора для ИФА (МАТ) для серотипирования HBsAg представлены в таблице 15. В результате проведенного сравнительного анализа в 81 (98,8%) образце из 82 результаты генотипирования методом ИФА совпали с данными анализа нуклеотидных последовательностей.

В одном образце с генотипом HBV-C, определенным путем секвенирования, противоречивый результат был получен в ИФА; определен генотип HBV-A, серотип adw2. Для данного изолята по выведенной аминокислотной последовательности был предсказан субтип adrq+ генотипа С HBV, но с нуклеотидной заменой I126T в участке генома.

Таблица 15. Сравнение результатов генотипирования HBV, полученных с использованием секвенирования по Сэнгеру и набора для ИФА для серотипирования HBsAg

Генотипы HBV определенные секвенированием по Сэнгеру	Кол-во протестированных образцов сыворотки крови (N)	Серотип и соответствующий ему генотип HBV (ИФА)	Число правильно определенных образцов	Соответствие, %
HBV-A	46	adw2, HBV-A	46	100%
HBV-D	32	ayw2 or ayw3, HBV-D	32	100%
HBV-C	4	adrq+, HDV-C – in 3 образцах; adw2, HBV-A – in 1 образце	3	75%
Всего образцов	82		81	98.8%

Совпадения результатов определения генотипов HBV (98,8%), полученные на охарактеризованной молекулярно-биологическими методами панели образцов, предполагают высокую вероятность получения верных результатов с помощью панели МАТ при исследовании HBsAg-положительных образцов сывороток крови пациентов с недетектируемым уровнем ДНК вируса гепатита В.

Валидация набора для определения генотипов вируса гепатита в HBsAg-положительных образцах сывороток крови позволила нам провести такие исследования в группе коинфицированных пациентов с хроническим вирусным гепатитом В+D с недетектируемым уровнем ДНК HBV из эндемичных регионов Российской Федерации.

Нами продолжены исследования по определению генотипа вируса гепатита В у коинфицированных пациентов с недетектируемым уровнем вирусной ДНК, причём для пациентов из Республики Дагестан подобные исследования проведены впервые. Из 58 образцов сывороток крови в данной когорте в 17 (17/58; 29,3%)

обнаружена ДНК вируса гепатита В в детектируемом количестве ( по данным д-ра С.А. Магомедовой). Для 25 из 41 образцов с неопределяемым уровнем ДНК HBV, но с наличием HBsAg нами определён генотип HBV методом ИФА – выявлен только генотип D HBV.

Из представленных 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)). 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 16).

Таблица 16. 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 исследованных 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))

Необходимо отметить, что при сравнении с группой моноинфицированных вирусом гепатита В пациентов (82 человека) не выявлено ни одного образца

сыворотки крови, содержащей ДНК HBV с генотипом С, по-видимому, в силу его малой распространенности на территории РФ.

### 3.3.3. Определение взаимосвязи между генотипами вируса гепатита В и дельта у HBV/HDV- коинфицированных пациентов из Республики Саха (Якутия)

Как показано выше, для Республики Саха (Якутия) характерна циркуляция двух генотипов вируса гепатита В (HBV-А и HBV-D) и вируса гепатита дельта (HDV-1 и HDV-2), что существенно отличает этот регион от других территорий РФ. Мы попытались определить наличие взаимосвязи между генотипами HBV и HDV при коинфекции у пациентов, проживающих в регионе, где циркулируют разные генотипы этих вирусов. Полученные нами данные представлены в таблице 17.

Таблица 17. Распределение вирусных генотипов в образцах сыворотки крови пациентов с коинфекцией HBV/HDV в Республике Саха (Якутия).

Группы пациентов	Всего пациентов	HBV-А N (%)	HBV-D	HBV-С	HDV-1	HDV-2
HBV/HDV коинфицированные**	59	29 (49,2%)	30 (50,1%)	0 (0%)	32 (54,2 %)	27 (45,8%)
<i>p</i> value, тест Фишера		0,1138	0,3497	н. д.	0,4616	

\* - генотипы HBV были выведены из серотипа HBsAg, определенного в ИФА.

н.д. – нет данных

Из демографических данных нам известно, что пациенты с HBV-А были значительно моложе по сравнению с пациентами с HBV-D и HBV-С (медиана - 37 лет против 51 года и 57 лет), но имели аналогичное соотношение полов (1: 1 против 1: 1,3 и 1: 1,3 соответственно).

Распределение HDV-1 и HDV-2 у пациентов с коинфекцией было почти одинаковым - 54,2 и 45,8% соответственно. Никаких существенных различий в среднем возрасте или соотношении полов пациентов между двумя генотипами HDV не наблюдалось. Распределение генотипов HBV-A и HBV-D среди пациентов, инфицированных HDV-1 и HDV-2, было равномерным (таблица 18).

Таблица 18. Распределение генотипов HBV среди пациентов с коинфекцией HBV/HDV из Республики Саха (Якутия).

Генотипы вируса	HBV-A, n (%)	HBV-D, n (%)
HDV-1, n=32	16 (50%)	16 (50%)
HDV-2, n=27	13 (48.2%)	14 (51.8%)

Корреляции между генотипами HBV и HDV у пациентов с коинфекцией не наблюдалось (коэффициентом корреляции  $r = -0,016069332$ ).

Таким образом, становится очевидным, что нет каких-либо предпочтений в преимущественном сочетании генотипов вируса гепатита В и D у коинфицированных пациентов.

### **3.4. 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 вируса гепатита D в человеческой популяции. Работы, посвященные молекулярной эпидемиологии HDV, описывают генетическое разнообразие вариантов вируса, циркулирующих в различных регионах мира без учета временных рамок. Необходимо отметить, что



Российская Федерация на карте распространения генотипов вируса гепатита D до нашего исследования оставалась белым пятном.

Для того, чтобы получить максимально достоверные результаты исследований, целесообразно использование полногеномных последовательностей для построения филогенетических деревьев.

Для реконструкции истории распространения и определения основных циркулирующих генотипов вируса гепатита D мы использовали только полностью аттестованные полногеномные референсные последовательности из 40 стран мира. На основании 256 полногеномных референсных последовательностей, которые представлены в настоящее время в основной базе данных нуклеотидных последовательностей (NCBI GenBank), с известным годом и страной сбора образцов, с дивергенцией между образцами не менее 2%, а также 137 полногеномных последовательностей изолятов вируса, циркулирующих на территории РФ (Республики - Тыва, Дагестан, Саха(Якутия), впервые построено филогенетическое дерево с временной шкалой и изучены данные филогенетические отношения.

Перед проведением Байесовского филогенетического анализа с временной шкалой нами проверено, имеется ли в сформированном массиве последовательностей HDV взаимосвязь между генетической изменчивостью и функцией времени.

Для включенных в анализ последовательностей HDV как полногеномных, так и фрагмента R0, были получены кривые линейной регрессии (рисунок 18), на основании которых были рассчитаны первичные значения скорости накопления нуклеотидных замен.

Такой эффект между этими переменными демонстрирует наличие временного сигнала в наборах данных, который позволяет провести анализ молекулярных часов, чтобы восстановить историю эволюции вируса гепатита D в регионах Российской Федерации.

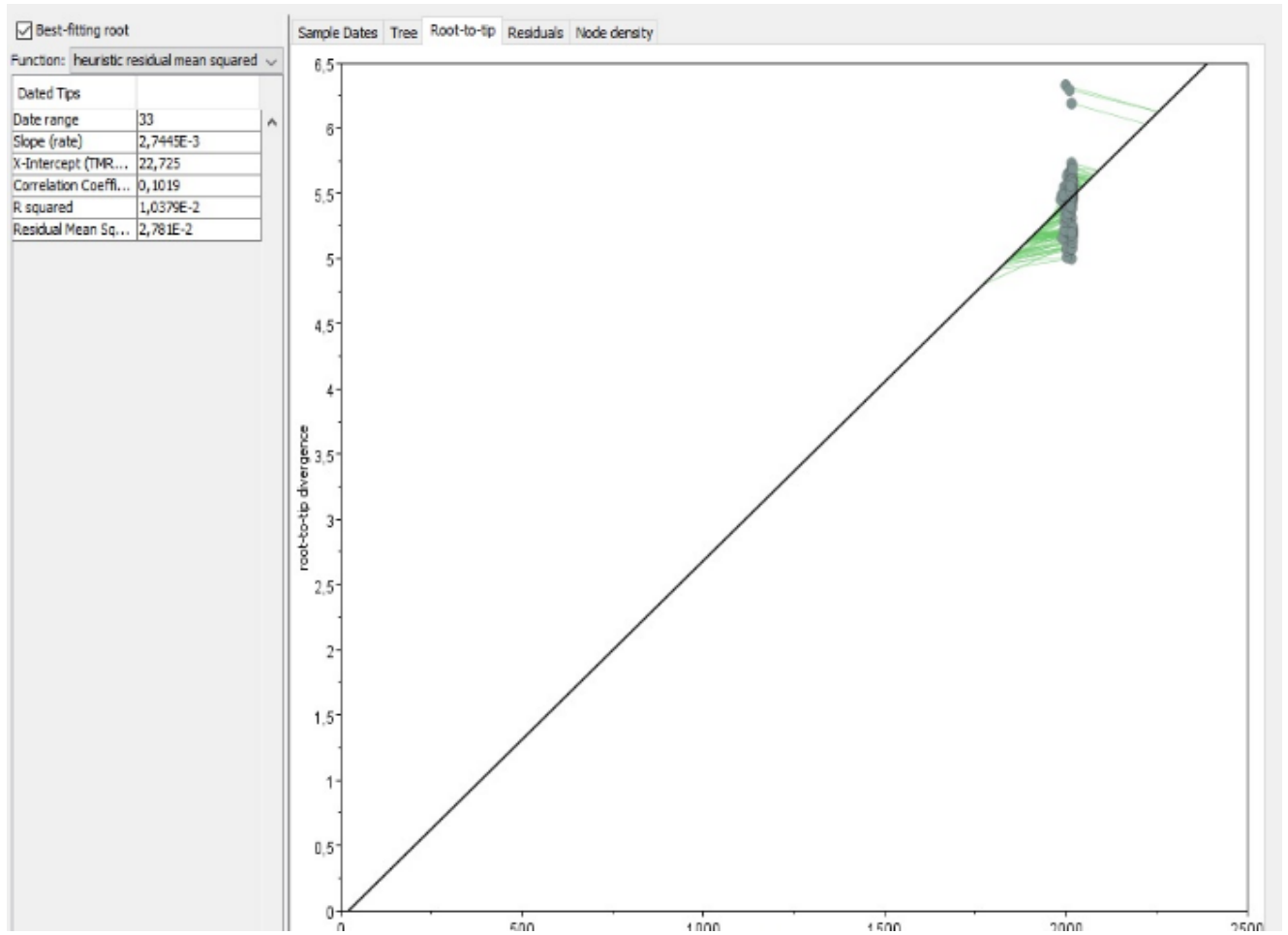


Рисунок 18. Графики линейной регрессии временного сигнала для полных последовательностей генома HDV (A).

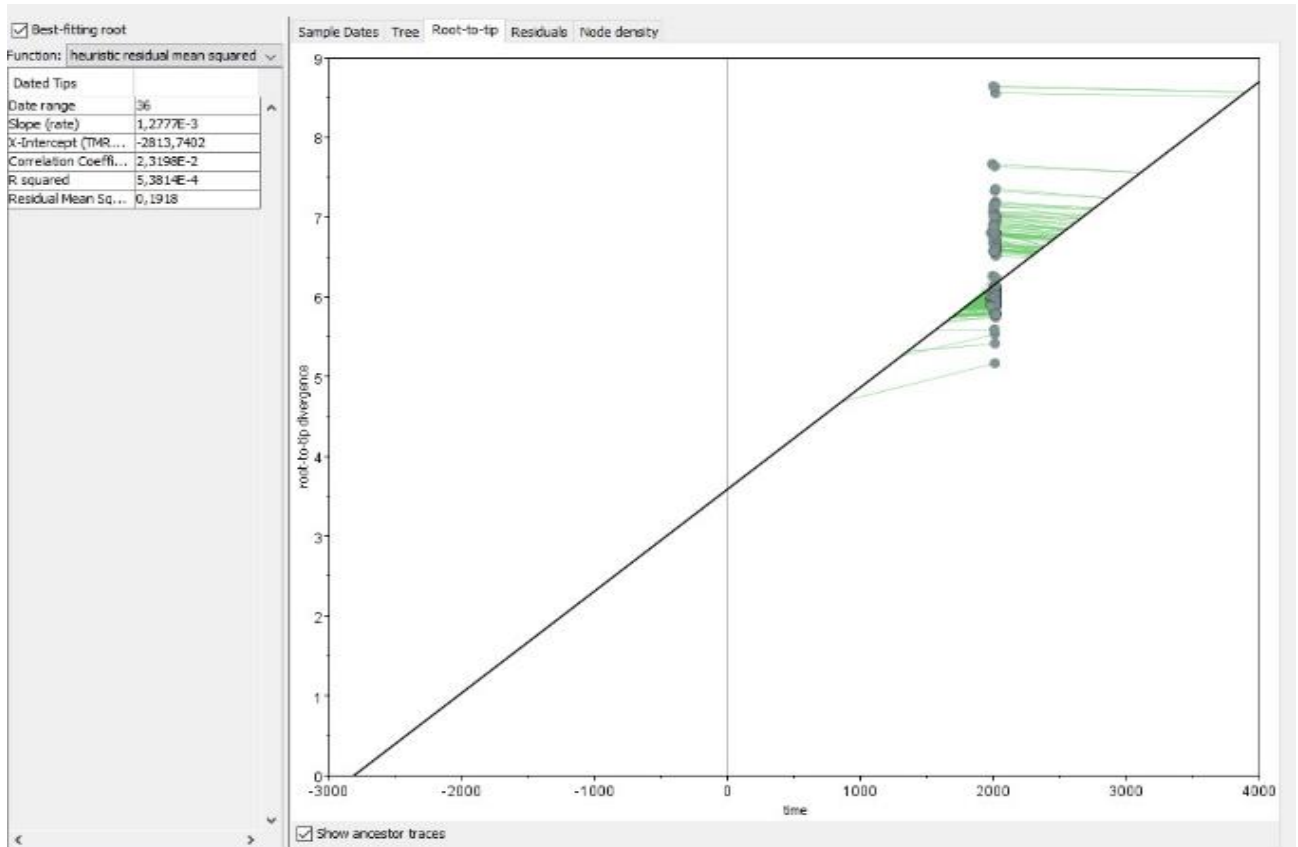


Рисунок 18. Графики линейной регрессии временного сигнала участка R0 (400 п.о.) генома вируса HDV (B).

Далее мы оценивали эволюционное расхождение ( $p$ -distance) между изместными 8 генотипами HDV. Этот показатель демонстрируют количество замен оснований на сайт между последовательностями HDV различных генотипов. В анализе участвовало 8 нуклеотидных последовательностей, соответствующих референсным для каждого генотипа. Все позиции, содержащие пробелы и недостающие данные, были удалены. При оценке  $p$ -distance между анализируемыми полногеномными последовательностями показано, что степень дивергенции ( $p$ -distance) между генотипами 1,2, 4-8 составляет 0,3 и менее, в то время как между этими генотипами и генотипом 3 - 0,65 – 0,73. При этом показатель  $p$ -distance для генотипов 1,2,4-8 варьирует в пределах от 0,23 до 0,3 (таблица 19).

Таблица 19. Расчет степени дивергенции (p-distance) между 3 и всеми остальными генотипами, выполненный на основании анализа полногеномных последовательностей HDV.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. RefX04451 HDV1 Italy 1986								
2. RefX60193 HDV2 Japan 1991	0.25							
3. RefL22063 HDV3 Peru 1993	0.73	0.69						
4. Ref AF018077 HDV4 Taiwan 1997	0.28	0.23	0.69					
5. Ref AJ584848 HDV5 Mali 2003	0.27	0.23	0.65	0.25				
6. Ref AJ584847 HDV6 Cameroon 2003	0.29	0.24	0.68	0.27	0.24			
7. Ref AJ584844 HDV7 Cameroon 2003	0.29	0.28	0.68	0.29	0.27	0.29		
8. Ref AJ584849 HDV8 Republic of the Congo 2003	0.30	0.27	0.70	0.26	0.27	0.27	0.23	

Аналогичный расчет был выполнен для участка генома R0 HDV с целью оценить его репрезентативность для проведения филогенетического Байесовского анализа. Для этого фрагмента вирусного генома степень дивергенции (p-distance) между 3 и всеми остальными генотипами составляет от 0,66 до 0,79 аналогично значениям, полученным при анализе полногеномных последовательностей. При этом показатель p-distance для генотипов 1,2,4-8 изменяется от 0,19 до 0,35 (таблица 20), что также совпадает с результатами анализа полногеномных последовательностей.

Таблица 20. Расчет степени дивергенции (p-distance) между 3 и всеми остальными генотипами при использовании фрагмента генома R0 вируса HD для филогенетического анализа.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1. Ref X04451 HDV1 Italy 1986								
2. Ref X60193 HDV2 Japan 1991	0.30							
3. Ref L22063 HDV3 Peru 1993	0.79	0.71						
4. Ref AF018077 HDV4 Taiwan 1997	0.28	0.19	0.74					
5. Ref AJ584848 HDV5 Mali 2003	0.35	0.23	0.69	0.24				
6. Ref AJ584847 HDV6 Cameroon 2003	0.30	0.21	0.67	0.18	0.21			
7. Ref AJ584844 HDV7 Cameroon 2003	0.31	0.28	0.66	0.31	0.23	0.26		
8. Ref AJ584849 HDV8 Republic of the Congo 2003	0.30	0.24	0.78	0.23	0.23	0.25	0.19	

В настоящее время в основной базе данных нуклеотидных последовательностей (NCBI GenBank) с известным годом и страной сбора образцов представлены 454 полногеномных референсных последовательностей и 1306 референсных последовательностей HDV, аттестованных по участку R0, полученные из различных регионов мира.

На основании полученных нами в настоящем исследовании результатов для проведения филогенетического Байесовского анализа могут использоваться не только полногеномные последовательности HDV, но и частичные последовательности (участок R0 HDV) как наиболее широко представленные в доступных базах данных и позволяющие, согласно нашим расчетам, корректно оценивать эволюционные различия между вариантами вируса.

### **3.4.1. Реконструкция истории распространения и длительности циркуляции вируса гепатита дельта в мире**

Анализ вариантов HDV, циркулирующих в различных регионах мира, показал неравномерность глобального распределения генотипов вируса.

Филодинамический и филогеографический анализ отношений изолятов показал существование двух клад HDV, образованных последовательностями генотипа 3 HDV, выделенными в Южной Америке (в Бразилии, Перу и Венесуэле) и последовательностями 1,2, 4-8 генотипов вируса, которые выявлены в других регионах земного шара (рисунок 19). Представленные на рисунке выделенные фрагменты (1 – 5) иллюстрируют распределение генотипов HDV, полученное в нашем исследовании, и будут подробно описаны ниже.

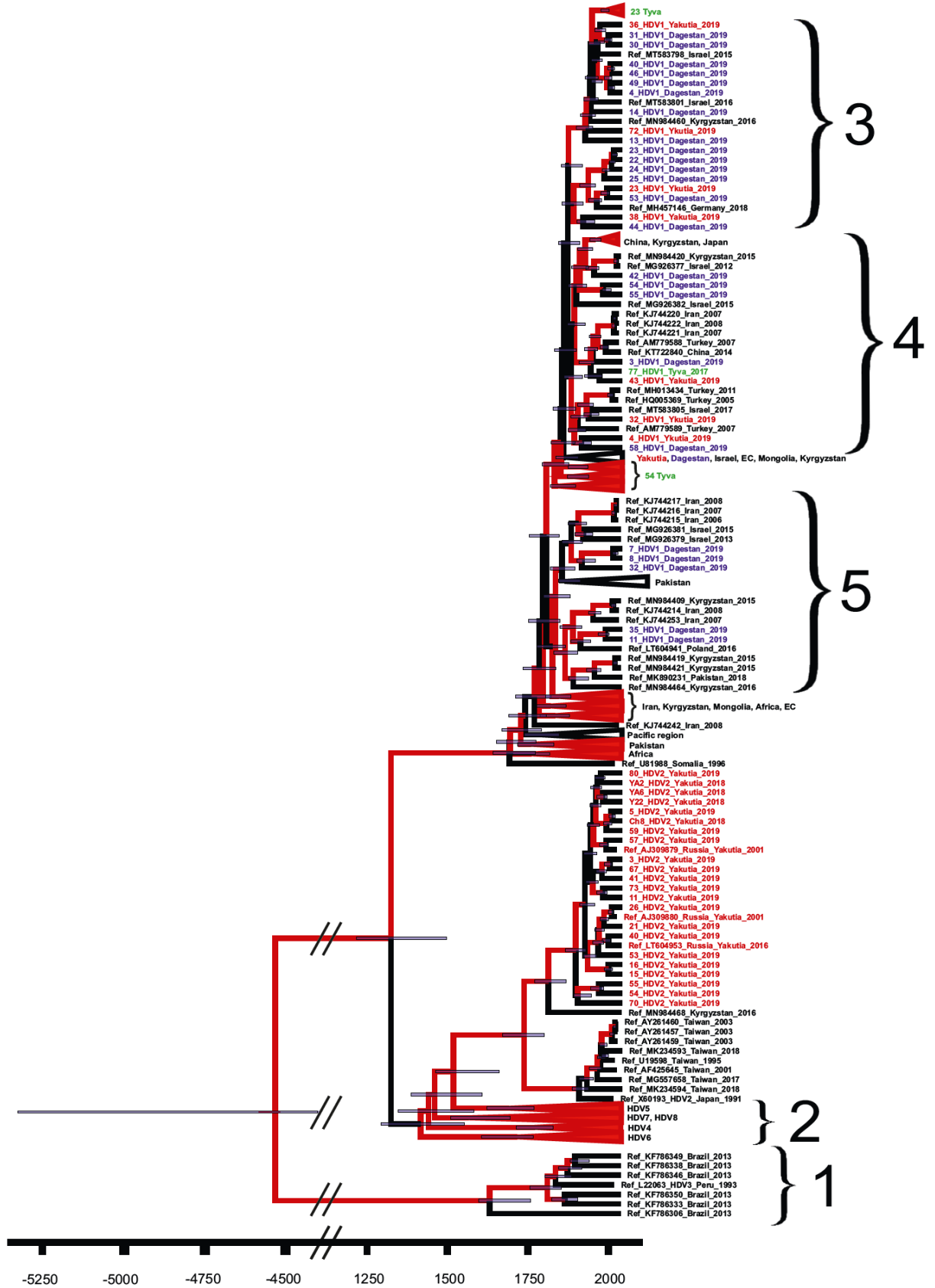


Рисунок 19. Филогенетический анализ с временной шкалой с использованием Байесовского анализа для полногеномных последовательностей HDV (1619 п.о); 454 референсных последовательности. Изоляты вируса гепатита дельта из Республики Тыва – зеленый цвет, из Республики Саха (Якутия) – красный цвет, из Республики 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.

На основании данных, полученных при изучении филогенетических отношений, становится очевидным, что общий предок (прародитель) дельта-вируса имеет возраст около 6,5 тысяч лет (95% HPD 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.

3 генотип 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 филодинамическом дереве для всех современных вариантов вируса (рисунок 20).



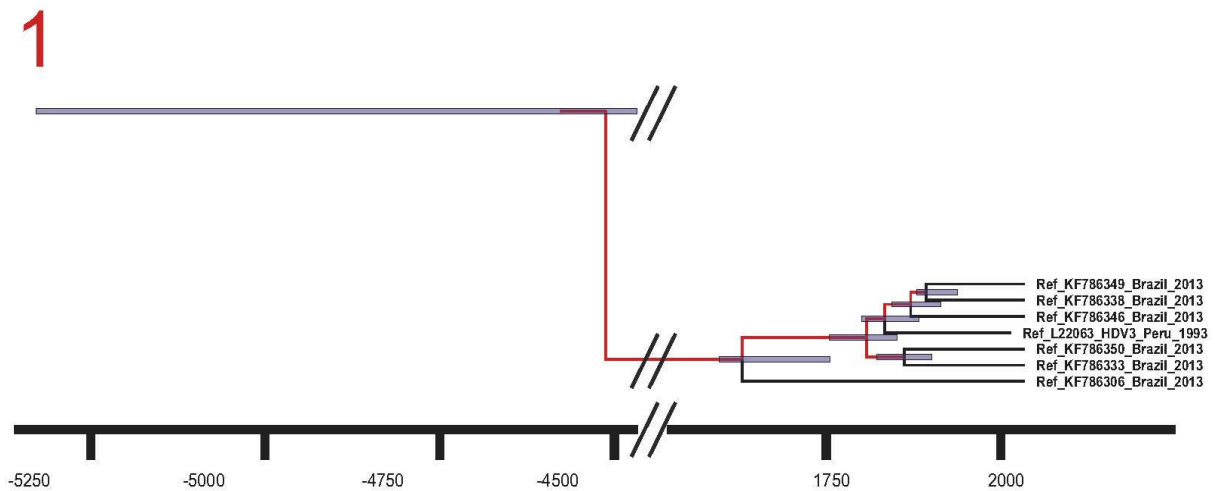


Рисунок 20. Фрагмент 1 филогенетического анализа с временной шкалой с использованием Байесовского анализа для полногеномных последовательностей HDV (1619 п.о); референсные последовательности генотипа HDV-3 вируса гепатита дельта. Для каждой последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность  $> 90\%$ . В каждом узле 95% HPD показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.

Данные нашего исследования подтверждают начало расхождения вируса гепатита D по миру через Африканский континент, который и до нашего исследования считался центром происхождения HDV [113]. Следует отметить, что в современной литературе отсутствуют данные о циркуляции 3-го генотипа HDV на Африканском континенте.

На основании данного анализа показано существование второй клады вируса гепатита D, сформированной генотипами 1,2,4-8 HDV, циркулирующих 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 1070 лет назад (95% HPD: 860 – 1340).

Генотип HDV-1 – распространён практически повсеместно. Последовательности 1 генотипа выделены в странах Европы, Азии, на Африканском континенте и в Северной Америке. Центр происхождения последовательности 1 генотипа определяется в Африке около 350 лет назад (95% HDP: 270 – 400) (рисунок 19).

Генотип HDV-2 – распространён преимущественно в странах Азии (Тайвань, Япония) и в 2016 году выявлен в республике бывшего СССР – Киргизии. Время формирования узла достоверно определяется в странах Средней Азии около 230 лет назад (95% HDP:170 – 270) (рисунок 19).

Генотип HDV-4 – распространён только в странах Тихоокеанского бассейна (Тайвань, Япония). Корень на филогенетическом дереве имеет страну происхождения – Япония, время формирования узла – 270 лет назад (95% HDP:200 – 330) (рисунок 21);

генотип HDV-5 – распространён преимущественно в странах Африканского континента (Кот-Дивуар, Того, Гана, Мали, Сенегал). Страна происхождения - Африканский континент, время формирования узла - 270 лет назад (95% HDP:200 – 310) (рисунок 21);

генотип HDV-6 – распространён только на Африканском континенте (Камерун, Нигерия). Страна происхождения - Африка, время формирования узла - 320 лет назад (95% HDP:270 – 440) (рисунок 21);

генотип HDV-7 – распространён на Африканском континенте (Камерун). Страна происхождения – Африка, время формирования узла - 230 лет назад (95% HDP:170 – 280) (рисунок 21);

генотип HDV-8 – распространён на Африканском континенте (Камерун). Страна происхождения – Африка, время формирования узла - 250 лет назад (95% HDP:190 – 310) (рисунок 21).

2

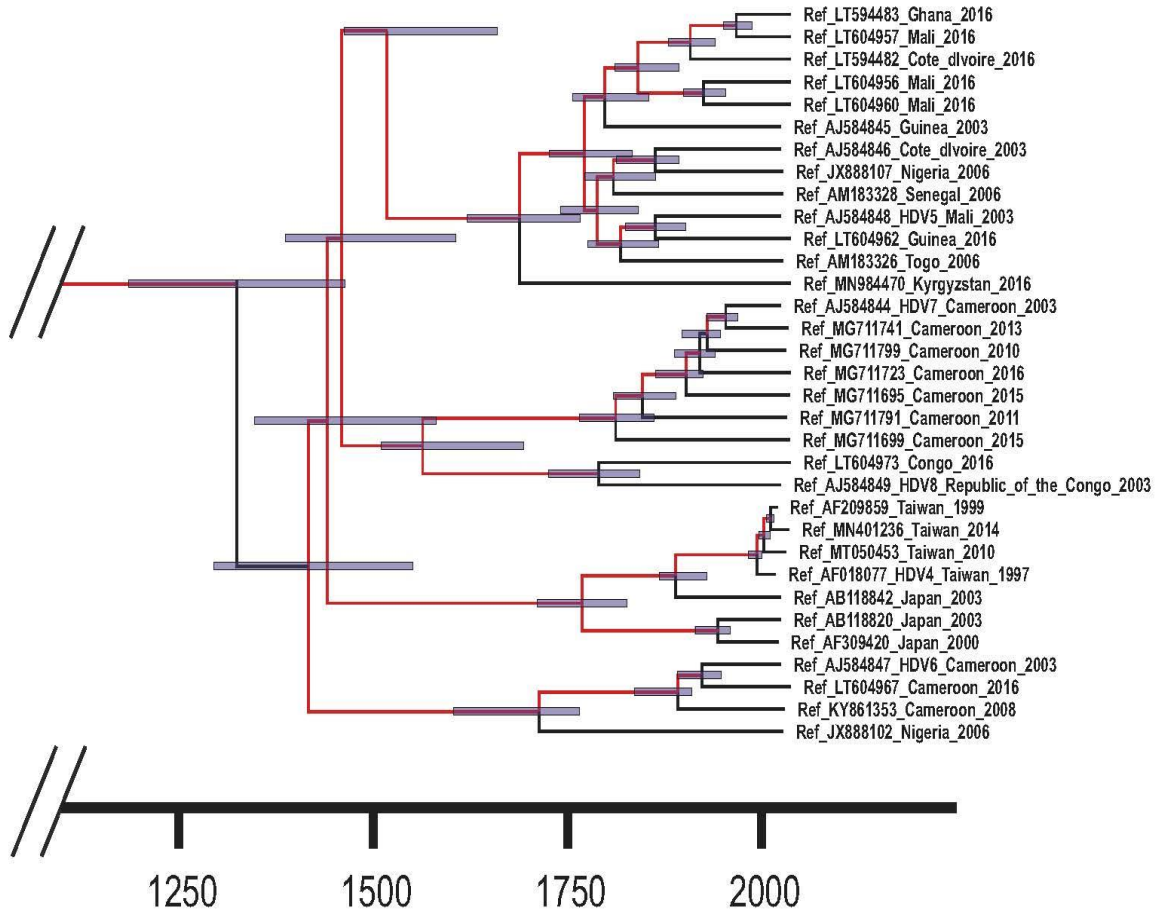


Рисунок 21. Фрагмент 2 филогенетического анализа с временной шкалой с использованием Байесовского анализа для полногеномных последовательностей HDV (1619 п.о); референсные последовательности генотипа HDV-4, 5, 6, 7 и 8 вируса гепатита дельта. Для каждой последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность > 90%. В каждом узле 95% HPD показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.

### 3.4.2. Реконструкция истории распространения и анализ генетического разнообразия вируса гепатита дельта в эндемичных регионах РФ

На основании проведенного филогенетического анализа с временной шкалой полногеномных последовательностей, выделенных от пациентов с хроническим гепатитом D в регионах РФ с различной эндемичностью (Республика Тыва - 73 образца, Республика Саха (Якутия) – 39 образцов и Республика Дагестан – 25 образцов) (рисунок 22) нами впервые реконструирована история распространения вируса гепатита D на территории Российской Федерации.



Рисунок 22. Реконструкция истории распространения вируса гепатита D в различных регионах РФ на основании анализа полногеномных последовательностей HDV.

Мы представляем историю распространения вируса гепатита D на территории Российской Федерации (подробное описание будет дано ниже), которая может быть разделена на несколько этапов:

1. около 230 лет назад произошёл занос вируса HDV-1 с территории современного Ирана на территорию Республики Тыва. Там происходит

формирование автохтонных кластеров вируса, характеризующихся циркуляцией изолятов HDV, выделенных только в данном регионе;

2. около 180 лет назад из Республики Тыва вирус HDV-1 переносится в Республику Саха (Якутия). Тогда же произошло формирование двух больших кластеров вируса на территории региона;

3. 150 лет назад с территории современного Ирана вирус HDV-1 был занесен на территорию Республики Дагестан, где циркулирует в виде отдельных вариантов и в настоящее время. Тогда же (150 лет назад) с территории Дагестана началось распространение вируса по Российской Федерации и за её пределы;

4. около 135 лет назад, произошёл занос вируса HDV-2 из Средней Азии (территория современного Кыргызстана) в Республику Саха (Якутия). С того времени вирус HDV-2 циркулирует только на данной территории;

На рисунке 19 представлена история распространения вируса гепатита D на территории Республики Дагестан. Здесь фиксируются многократные точечные заносы генотипа HDV-1 вируса гепатита D с территории современного Ирана около 150 лет назад (95% HDP: 120-190 лет), которые формируют большой кластер с доминированием эпидемических «дагестанских» изолятов вируса.

Вирус циркулировал только в регионе недолго и около 125 лет назад (95% HDP: 95-150 лет) произошло его распространение внутри страны из Республики Дагестан в Республику Саха (Якутия). Фрагмент филогенетического анализа, иллюстрирующий историю этого распространения показан на рисунке 23. 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.

3

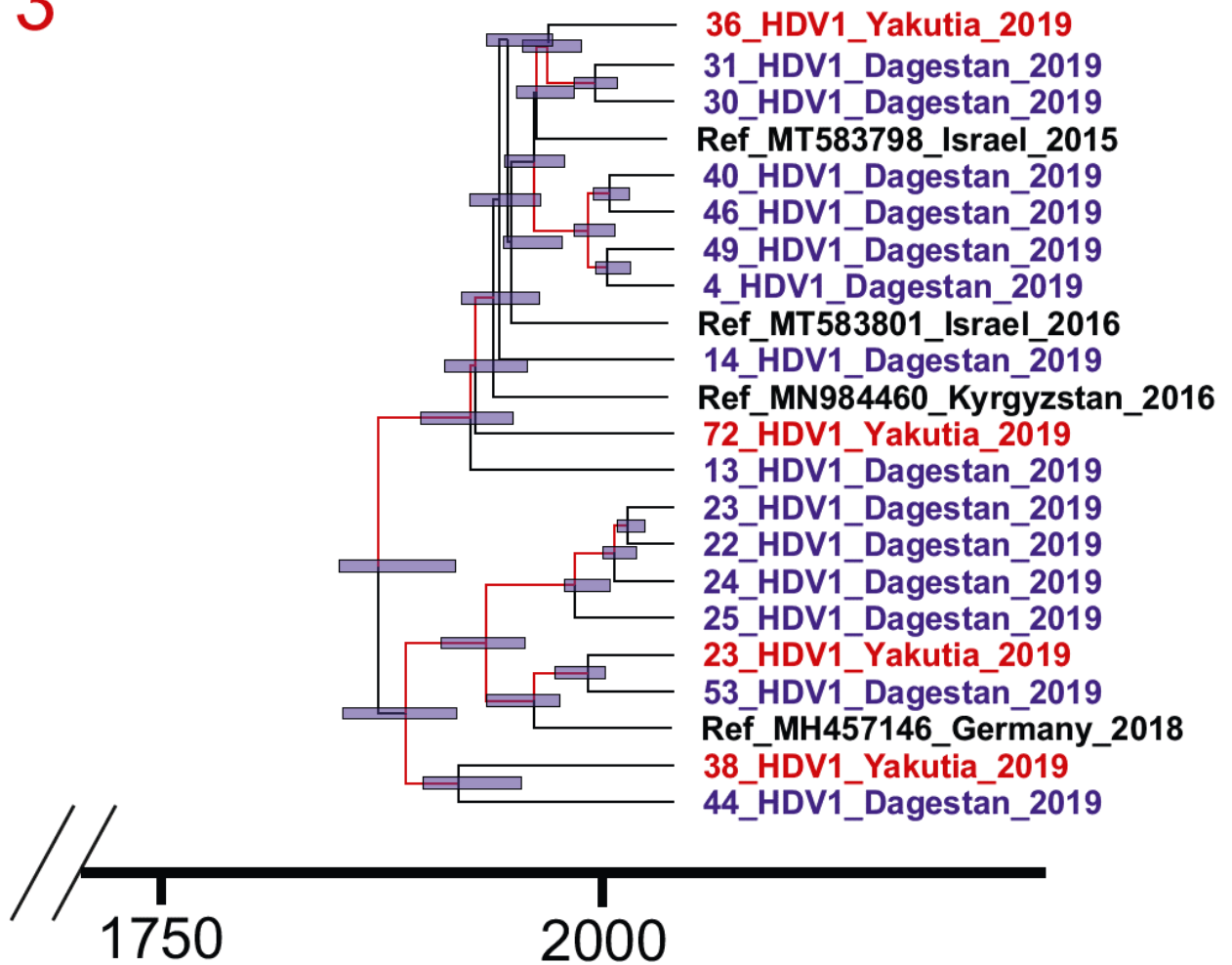


Рисунок 23. Фрагмент 3 филогенетического анализа с временной шкалой с использованием Байесовского анализа для полногеномных последовательностей HDV (1619 п.о). Изоляты вируса гепатита D из Республики Саха (Якутия) – красный цвет, из Республики Дагестан – синий цвет. Для каждой референсной последовательности указывается номер в базе данных GenBank, страна и год выделения. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность  $> 90\%$ . В каждом узле 95% HPD показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.

Следующий временной интервал переноса вируса из Республики Дагестан в регионы РФ составляет приблизительно 110 лет назад (95% HDP: 85-132 года). Вирус был занесён в Республики Тыва и Саха (Якутия). Тогда же около 90 лет назад

(95% НРД: 75-115 лет), по данным нашего исследования, произошла передача вируса в сопредельные страны южного региона – это Турция и Иран (рисунок 24).

4

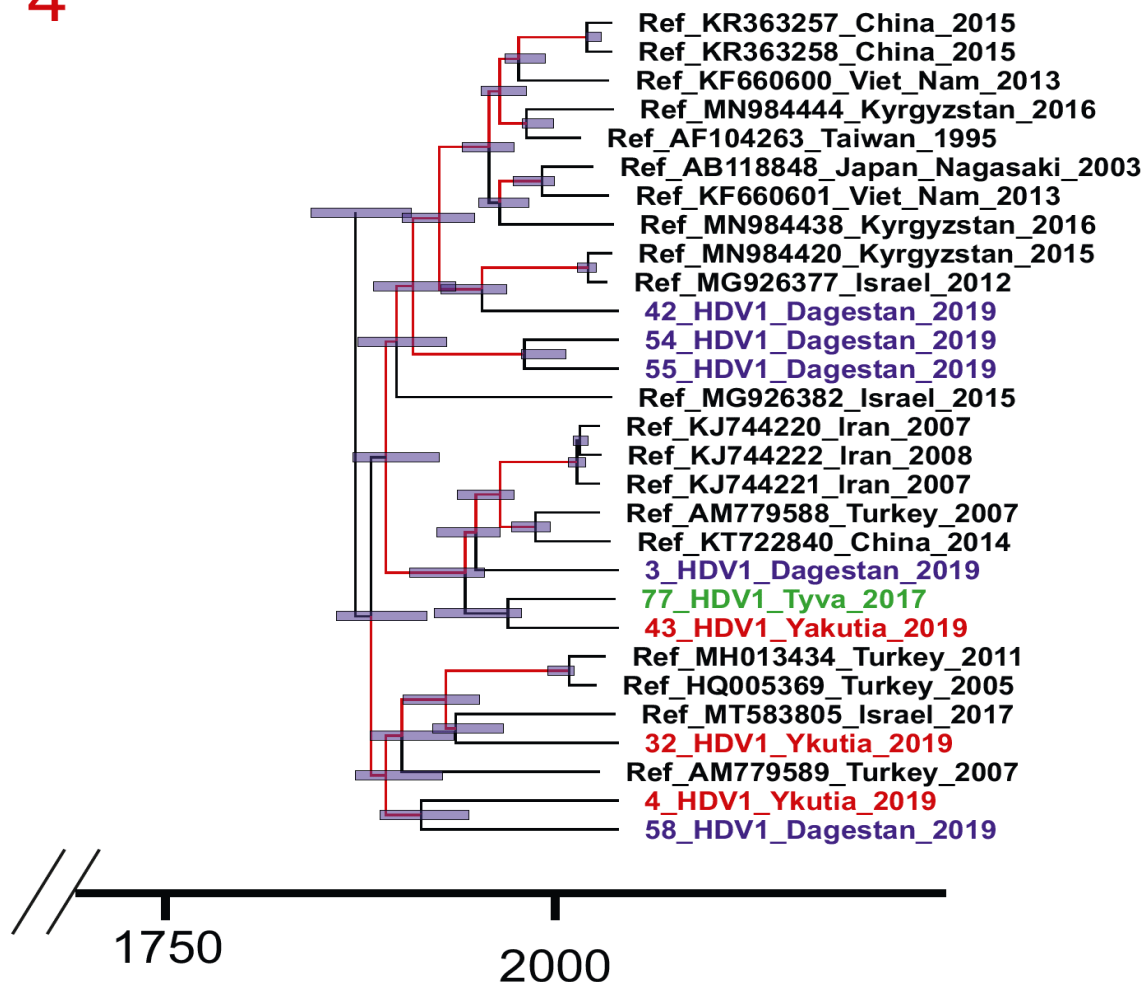


Рисунок 24. Фрагмент 4 филогенетического анализа с временной шкалой с использованием Байесовского анализа для полногеномных последовательностей HDV (1619 п.о). Изоляты вируса гепатита D из Республики Тыва – зеленый цвет, из Республики Саха (Якутия) – красный цвет, из Республики Дагестан – синий цвет. Для каждой референсной последовательности указывается номер в базе данных GenBank, страна и год выделения. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность > 90%. В каждом узле 95% НРД показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.



Тогда же, около 90 лет назад (95% НРД: 75-115 лет), предположительно произошла передача вируса в сопредельные страны южного региона – это территории современного Ирана, Кыргызстана и Израиля. В это же время продолжается распространение вируса гепатита D на территории Республики Дагестан (рисунок 25).

5

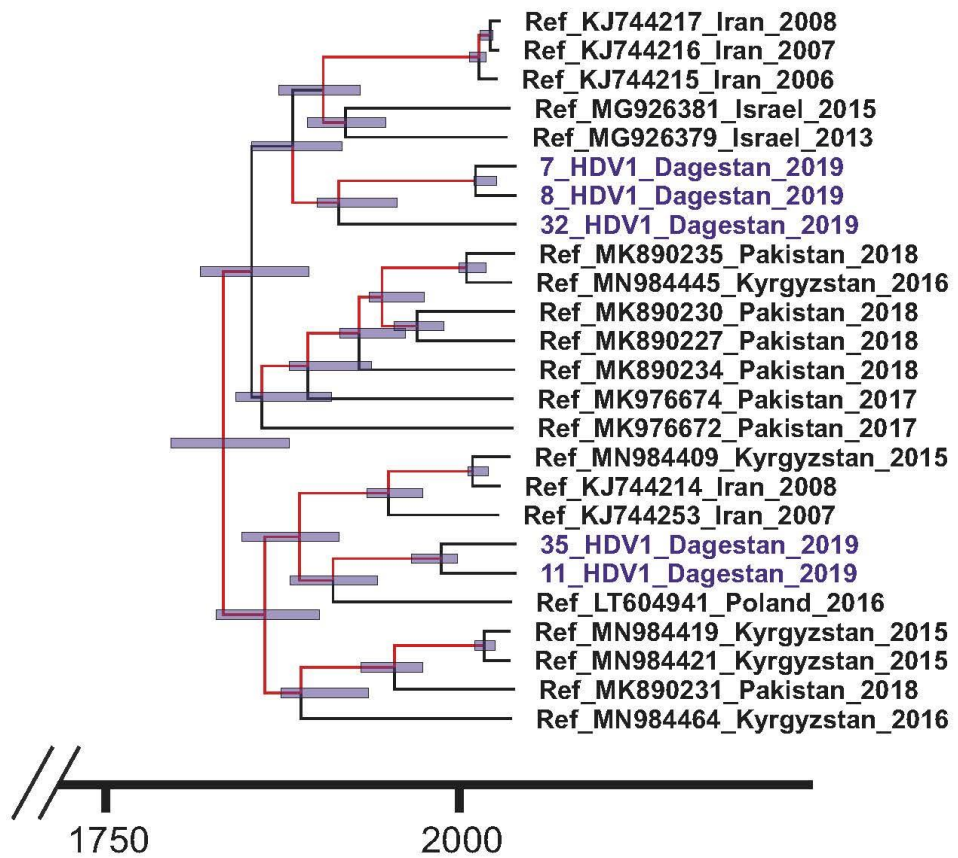


Рисунок 25. Фрагмент 5 филогенетического анализа с временной шкалой с использованием Байесовского анализа для полногеномных последовательностей HDV (1619 п.о). Изоляты вируса гепатита D из Республики Дагестан – синий цвет. Для каждой референсной последовательности указывается номер в базе данных GenBank, страна и год выделения. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность > 90%. В каждом узле 95% НРД показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.



На основании проведенного нами исследования показано, что передача вируса гепатита D внутри страны (с невозможностью получить более достоверные сведения из-за отсутствия промежуточных данных) имела место относительно недавно – около 45 лет назад (95% НРD:30-50 лет).

Республика Саха (Якутия) – единственный регион на территории Российской Федерации, где существуют два генотипа вируса гепатита D – HDV-1 и HDV-2 (Байесовское филогенетическое дерево HDV показано на рисунке 26). HDV-1 имеет обширную историю заноса в этот регион.

В результате реконструкции истории распространения и определения циркулирующих генотипов мы показали, что генотип HDV-1 начал свою историю на территории Республики (Саха) Якутия в результате заноса из Республики Тыва 180 лет назад (95% НРD: 140-208 лет), а также множественных точечных переносов вируса внутри страны (из Республики Дагестан) и с территории современной Турции. Позже (175 лет назад (95%д.и. 130-203года) отмечено их расхождение на два кластера. Все эти импортированные варианты имели восточноевропейское или ближневосточное происхождение: Турция, Румыния и Израиль. Часто варианты этого генотипа сначала циркулировали в России, на территории Республики Дагестан или Республики Тыва, а уже потом были завезены в Республику (Саха) Якутия. Первый кластер имеет близкородственных соседей из Канады, Кыргызстана, Монголии и Израиля. Второй кластер сформирован близкородственными соседями из Израиля, Румынии и Франции. Кластеры образованы древними вариантами вируса гепатита D – точки расхождения составили около 100 лет для разных изолятов.

Все последовательности HDV-2 из Якутии относятся к субгенотипу 2b и образуют монофилетическую группу, что свидетельствует о существовании «эффекта основателя», т.е. формирования данной группы в результате единой волны интродукции. Появившись 135 (95% НРD: 60–350) лет назад, генотип HDV-2 широко распространился по территории Республики Саха (Якутия), но не вышел за пределы этого региона, так как нигде в России пока не обнаружен.

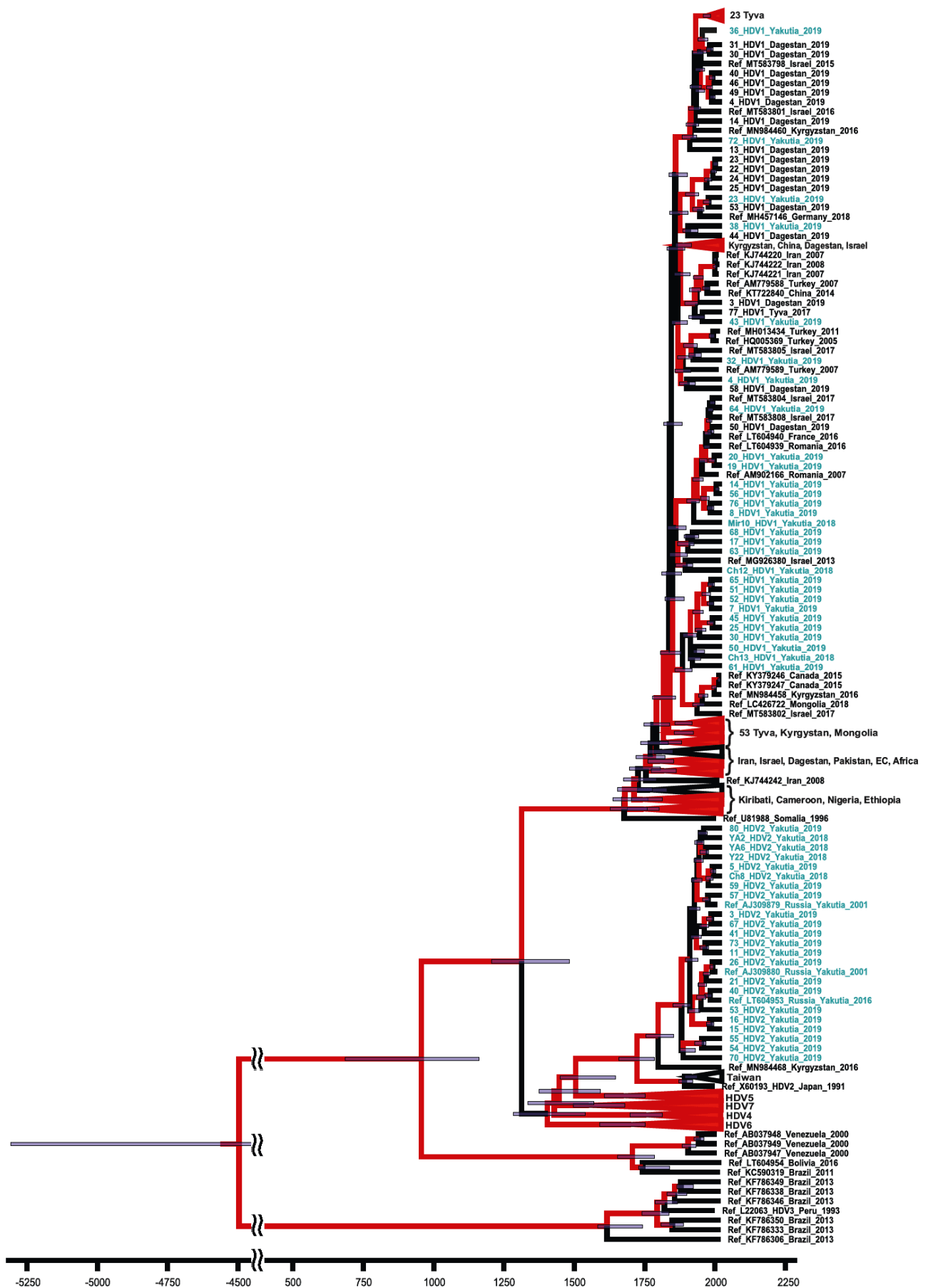


Рисунок 26. Байесовское филогенетическое дерево на основе полногеномных последовательностей HDV. Для каждой последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Последовательности этого исследования выделены бирюзовым цветом. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность  $> 90\%$ . В каждом узле 95% HPD показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.

Вопреки ранее существовавшим представлениям о том, что вариант HDV-2 попал в Республику Саха (Якутия) из Восточной Азии, наши данные продемонстрировали наличие промежуточного предка, ближайший «потомок» которого сейчас находится на территории современного Кыргызстана.

Результаты проведенного в исследовании филогенетического анализа показали, что первый занос вируса гепатита D на территорию Российской Федерации произошёл около 210 лет назад (95% HPD: 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 вируса гепатита дельта HDV-1 и положила начало формированию на территории Республики Тыва эндемичного региона с группированием трёх больших кластеров из изолятов, характерных для данной территории и дальнейшим распространением вируса по территориям РФ (рисунок 27).

Первая клада изолятов HDV, будучи наиболее древней, включает три субклады последовательностей из Республики Тыва, Монголии и Кыргызстана, а время ее наиболее позднего общего предка датируется 1811 годом (95% HPD: 1741–1834). Эти варианты вируса произошли от предков, которые были связаны с Ближним Востоком и Центральной Азией. Это событие, приведшее к первой волне заноса вируса гепатита D в Республику Тыва, показано как филогеографическая дисперсия на рисунке 28А. Дальнейшее расхождение геновариантов вируса

началось после 1810 г. (95% HPD: 1773-1854) и привело к образованию трех субклад в 1821 году (95% HPD: 1799-1876), 1866 году (95% HPD: 1850-1917) и в 1889 году (95% HPD: 1853-1913), соответственно. После этого HDV продолжал циркулировать как на территории современной Российской Федерации, так и за ее пределами. Вторая клада последовательностей HDV из Республики Тыва появилась позже. Его самый недавний общий предок датируется 1963 годом (95% HPD: 1953 - 1979) и возник в результате второй волны интродукции HDV в регион, на этот раз с других территорий России (верхний кластер на рисунке 27 и филогеографическая дисперсия на рисунке 28Б). На филогенетическом дереве корень этой клады сгруппирован вместе с изолятами HDV из Российской Федерации (Республики Дагестан и Саха (Якутия)) и Кыргызстана.

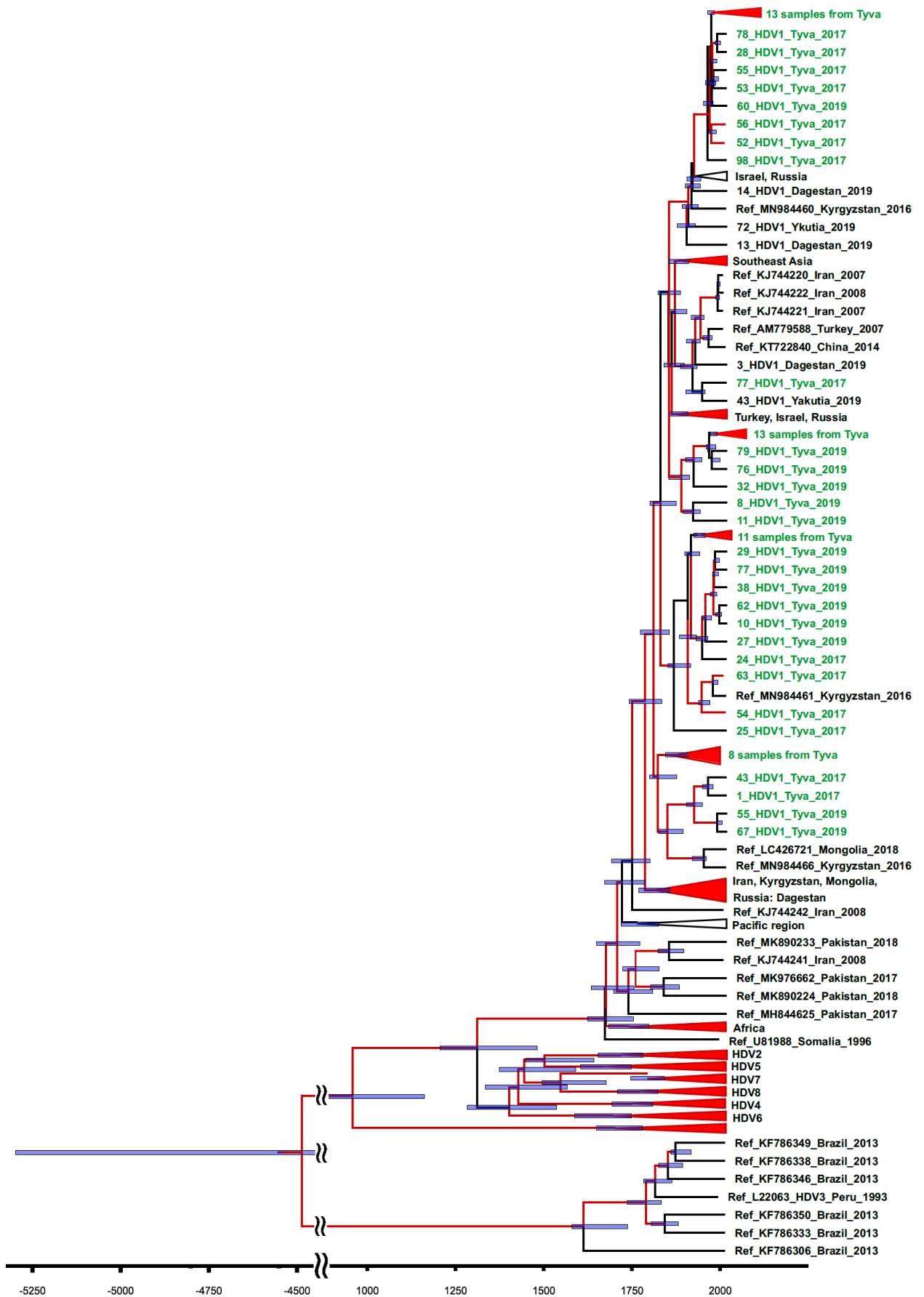


Рисунок 27. Байесовское филогенетическое дерево на основе полных последовательностей генома HDV. Для каждой последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Последовательности этого исследования показаны зеленым. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность  $> 90\%$ . В каждом узле 95% HPD показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.

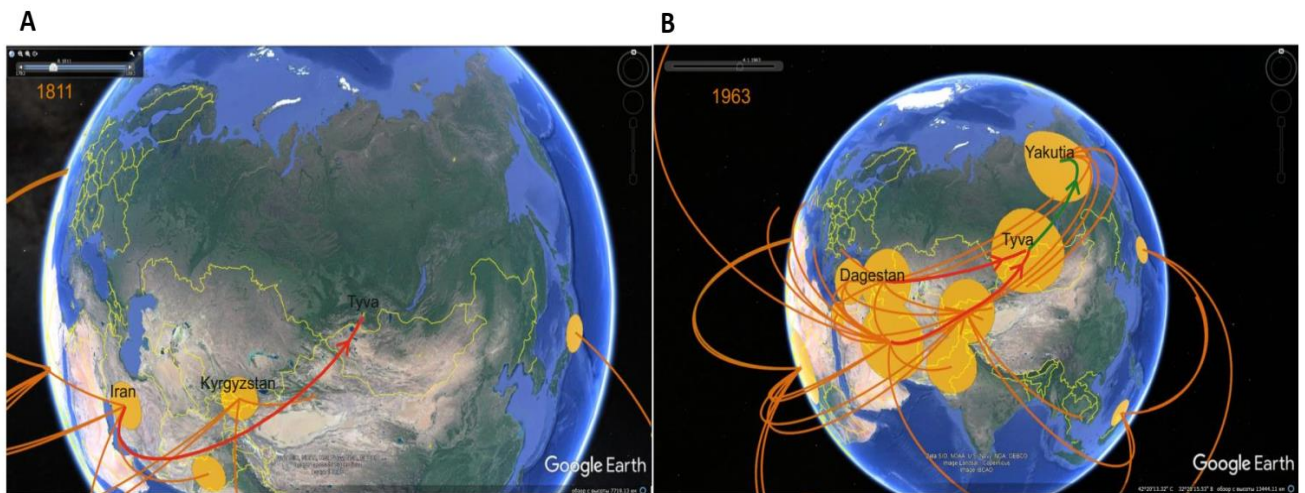


Рисунок 28. Филогеографическая дисперсия HDV в Республике Тыва для первой (А) и второй (В) волн интродукции (Байесовский филодинамический анализ). Пространственно-филогенетическая реконструкция эволюционной динамики, прослеживаемой в исследовании, показана на карте, относящейся к региону исследования. Красные линии указывают на импорт HDV в Республику Тыва, зеленые линии - на импорт из Республики Тыва.

Таким образом, длительная циркуляция HDV на одной территории привела к формированию эпидемических вариантов HDV в Республике Тыва также как и на других эндемичных территориях.

Постоянное присутствие HDV на территории Республики Тыва, безусловно, обеспечивается постоянной реализацией совместных путей передачи HBV и HDV.

Наши исследования показали, что распространение предков современных вариантов HDV произошло относительно недавно, равно как и формирование эндемичных по этой инфекции территорий.

В связи с этим, следующей задачей нашего исследования стала необходимость реконструкции истории распространения на территории Республики Тыва вируса гепатита В.

### **3.4.3. 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. Как уже было сказано ранее, репликация HDV значительно подавляет репликацию HBV в инфицированном организме, поэтому для восстановления истории распространения HBV нами были 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, проживающих на территории Республики Тыва (на рисунке 30 обозначены Tuva и выделены красным цветом).

Перед проведением Байесовского филогенетического анализа мы проверили, есть ли генетические изменения между точками отбора проб в наборах данных HBV, которых было достаточно для получения статистически значимой связи между генетической дивергенцией и временем. Кривые линейной регрессии

наблюдались для наборов данных HBV (рисунок 29), что указывает на положительную корреляцию между генетической дивергенцией и временем отбора проб. Такой эффект между этими переменными демонстрирует наличие временного сигнала в наборах данных, который позволяет провести анализ молекулярных часов, чтобы восстановить историю эволюции HBV в Республике Тыва.

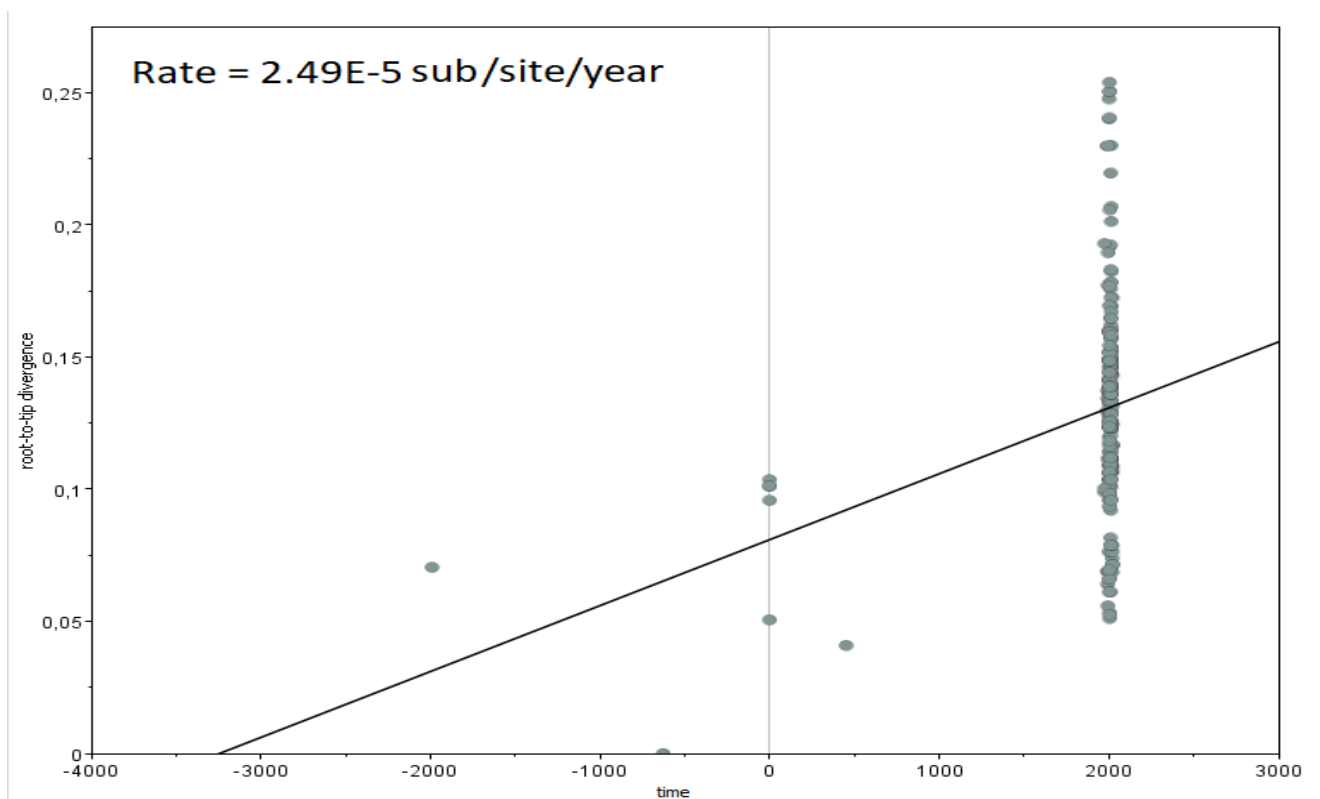


Рисунок 29. Графики линейной регрессии временного сигнала для 676-нуклеотидного фрагмента S-гена HBV.

На рисунке 30 представлено филогенетическое дерево, которое включает в себя референсные последовательности HBV различных генотипов (A – F) с известной датой сбора и страной происхождения образца. Также в качестве референсных образцов представлены изоляты вируса гепатита В (ДНК-содержащий вирус длительное время сохраняется без разрушения), 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 вируса гепатита В представляется следующим образом. Для исследуемых образцов из Республики Тыва показана циркуляция двух генотипов А (3 образца – 4,8%) и D (70 образцов – 95,2%).



Рисунок 30. 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.

В отличие от истории эволюции вируса гепатита D в Республике Тыва, охватывающей около двух веков, история эволюции вариантов вируса гепатита B в этом регионе намного длиннее и охватывает более тысячи лет (рисунок 30). Для субгенотипа A2 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. Это ещё раз демонстрирует длительную и широкую географию распространения HBV в мире. На филогенетическом дереве отмечается большая длина ветвей, которая определяет отношение этих вариантов к одному генотипу A 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. Изоляты вируса гепатита B субгенотипа D1 образуют монофилетическую группу, состоящую из 25 последовательностей из Республики Тыва, объединяясь с несколькими штаммами из Казахстана и Китая. Еще 18 последовательностей субгенотипа D1 из Республики Тыва сгруппированы с изолятами 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% НРД: 1005 – 1618 год). Последовательности D3 из Республики Тыва объединены с изолятами 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% НРД: 1172-1509 го) и 1349 (95% НРД: 1132– 1736 год), соответственно.

Таким образом, при анализе филогенетических отношений и реконструкции истории распространения и времени заноса HBV на территорию Республики Тыва показано, что изоляты 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 D произошло на фоне интенсивной циркуляции HBV, обеспечившей высокую степень возможности суперинфекции, которая, как известно, заканчивается формированием хронической HDV-инфекции.

### **3.5. Определение механизмов формирования семейных очагов HDV инфекции в эндемичном регионе**

Известно, что в регионах, эндемичных по заболеваемости вирусным гепатитом В и D, реализуются множественные пути передачи вируса. Одним из этих путей инфицирования может быть внутрисемейная передача как HBV, так и HDV. Одной из задач нашего исследования стала необходимость определения частоты формирования семейных очагов, где вирусом гепатита D инфицировано 2

и более членов одной семьи. И при наличии достаточной для получения достоверных результатов выборки с помощью методов филогенетического анализа определить механизмы формирования семейных очагов HDV- инфекции в эндемичном регионе.

Значительную роль в получении достоверных данных играют не только применяемые методы, но и параметры исследования, задаваемые в данной работе. Вероятно, что при анализе короткого участка и полного генома вируса гепатита D одним и тем же филогенетическим методом, полученные результаты могут иметь разную степень достоверности. Для этого мы оценили возможность распространения вируса гепатита D внутри отдельных семейных очагов из различных регионов Российской Федерации с помощью алгоритма максимального правдоподобия (ML) для последовательностей фрагмента 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 Дагестане (10 пациентов). В таблице 21 представлена демографическая характеристика и диагноз пациентов, чьи образцы сыворотки крови использованы в нашем исследовании. По результатам анкетных данных известно, что все пациенты являются совместно проживающими членами семей (1-3 поколения), в которых сформированы очаги инфицирования вирусами гепатита B 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 B и дельта; 10 пациентов из них имели цирроз печени класса (A – C) по шкале Child-Pugh.

Таблица 21. Демографическая характеристика и диагноз пациентов из семейных очагов В и D.

Регион, год	Семейный очаг	Число инфицированных в семье	Степень родства	Возраст	Пол	Диагноз
Республика Дагестан, 2019 год	1	2	сестра	50	жен	ХВГ В+D
			сестра	55	жен	ХВГ В+D
	2	4	мать	38	жен	ЦП класс А
			сын	18	муж	ХВГ В+D
			сын	14	муж	ХВГ В+D
			брат матери	27	муж	ЦП класс А
	3	2	брат	43	муж	ЦП класс В
			брат	46	муж	ЦП класс А
	4	2	жена	30	жен	ХВГ В+D
			муж	31	муж	ХВГ В+D
Республика Тыва, 2014 год	1	2	мать	46	жен	ХВГ В+D
			сын	24	муж	ХВГ В+D
	2	2	сестра	31	жен	ХВГ В+D
			брат	34	муж	ЦП класс В
	3	2	мать	42	жен	ХВГ В+D
			дочь	17	жен	ХВГ В+D
	4	2	мать	37	жен	ХВГ В+D
			дочь	10	жен	ХВГ В+D

Регион, год	Семейный очаг	Число инфицированных в семье	Степень родства	Возраст	Пол	Диагноз
Республика Тыва, 2017 год	5	2	сестра	41	жен	ХВГ В+D
			сестра	54	жен	ХВГ В+D
	6	2	мать	48	жен	ХВГ В+D
			дочь	22	жен	ХВГ В+D
	7	2	мать	52	жен	ЦП класс В
			сын	34	муж	ХВГ В+D,
	8	2	мать	52	жен	ХВГ В+D
			сын	30	муж	ХВГ В+D
	9	2	мать	47	жен	ХВГ В+D
			дочь	19	жен	ХВГ В+D
	10	2	мать	60	жен	ЦП класс В
			сын	38	муж	ЦП класс В
	11	2	сестра	46	жен	ЦП класс А
			сестра	56	жен	ЦП класс В
Республика Тыва, 2018 год						

Результаты филогенетического анализа с использованием алгоритма Maximum Likelihood (ML) для последовательностей участка R0 генома HDV (353 нт), полученных от членов семей из Республики Дагестан и Республики, Тыва представлены на рисунке 31. Фрагменты данного филогенетического дерева, обозначенные как 1,2 и 3 подробнее будут рассмотрены далее.

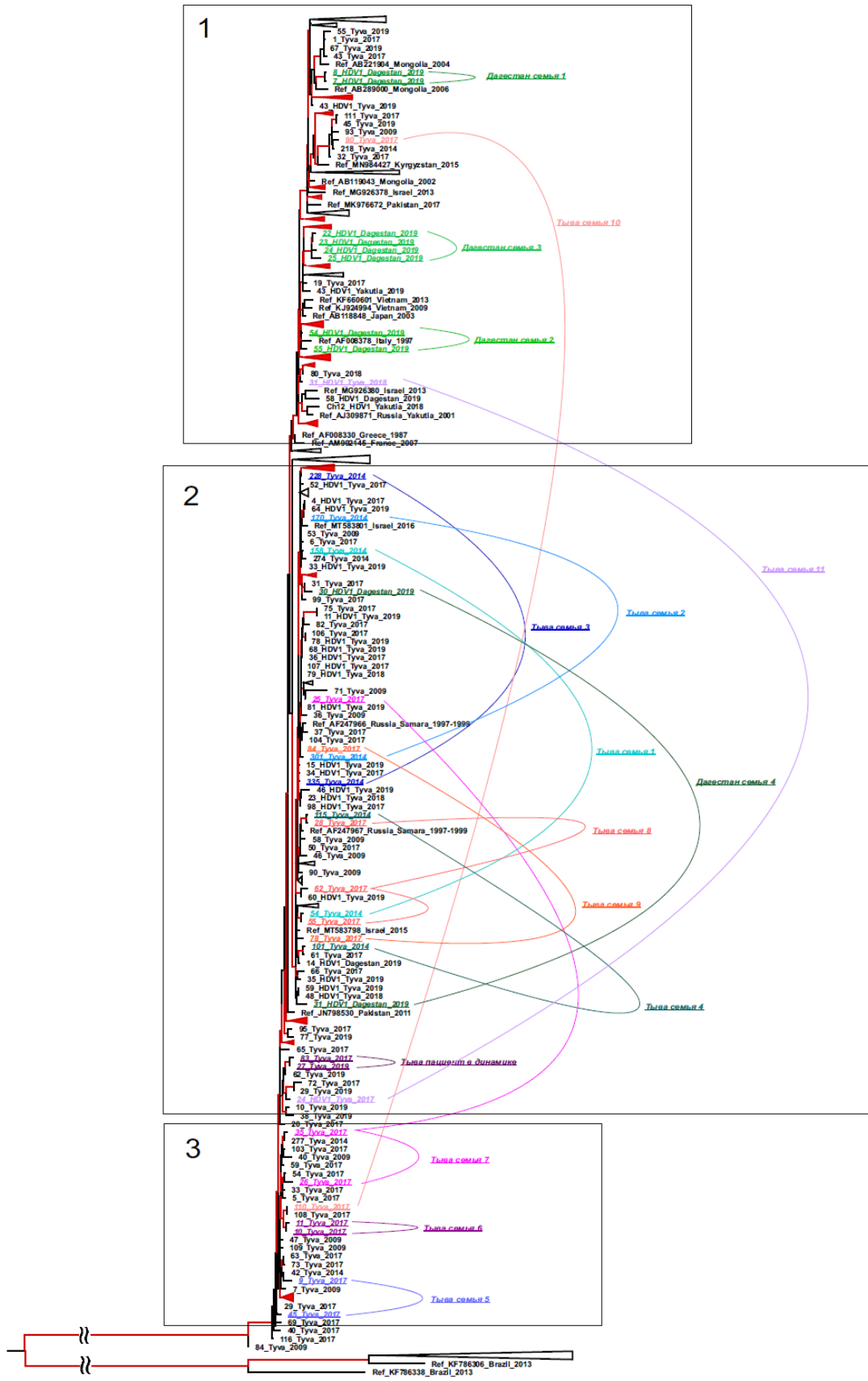




Рисунок 31. Филогенетический анализ с использованием алгоритма Maximum Likelihood для последовательностей участка R0-гена HDV (353 нт). Для каждой референсной последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Для каждой последовательности из исследуемых регионов указывается номер, генотип HDV, регион и год выделения. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность  $> 90\%$ . В каждом узле 95% HPD показано серой полосой. Изоляты из семейных очагов из Республики Тыва и Республики Дагестан выделены различными цветами и каждый из семейных очагов объединён круглой скобкой с подписью.

Для анализа короткого фрагмента генома R0 вируса гепатита D методом ML в качестве референсных последовательностей использованы изоляты HDV, представленные в GenBank из разных регионов мира, а также изоляты вируса, выделенные от больных хроническим гепатитом D из Республики Тыва и Республики Дагестан, не формирующие семейные очаги. Исследуемые изоляты относятся к HDV-1 генотипу вируса гепатита D.

Фрагмент 1 филогенетического дерева иллюстрирует вероятную передачу вируса HDV от одного источника инфицирования для последовательностей 7\_HDV1\_Dagestan\_2019 и 8\_HDV1\_Dagestan\_2019, относящихся к одному семейному очагу, обозначенному на филогенетическом дереве, как Дагестан семья 1. Полученные в результате анализа данные также демонстрируют, что последовательности 22\_HDV1\_Dagestan\_2019, 23\_HDV1\_Dagestan\_2019, 24\_HDV1\_Dagestan\_2019 и 25\_HDV1\_Dagestan\_2019, относящиеся к семейному очагу, обозначенному на филогенетическом дереве, как Дагестан семья 3, формируют монофилетическую группу, подтверждая теорию о возможном внутрисемейном инфицировании (рисунок 32).

Такое расположение последовательностей HDV, выделенных из изолятов семейных очагов Республики Дагестан, даёт возможность предположить существование одного источника инфицирования вирусом гепатита D.

Что касается изолятов вируса гепатита дельта 54\_HDV1\_Dagestan\_2019 и 55\_HDV1\_Dagestan\_2019, относящихся к семейному очагу, обозначенному на филогенетическом дереве, как Дагестан семья 2, вероятно имело место существование различных путей инфицирования членов данной семьи (рисунок 32).

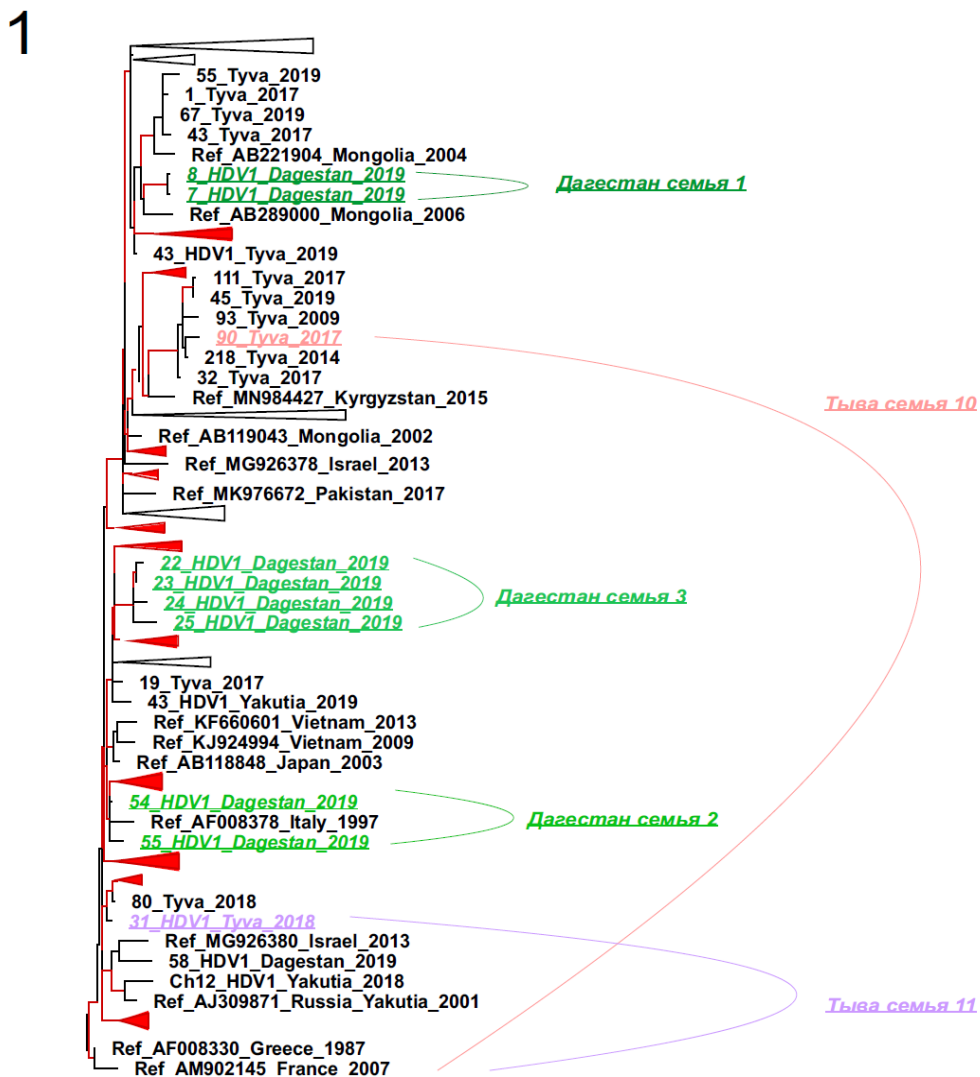


Рисунок 32. Фрагмент 1 филогенетического дерева, полученного при анализе методом Maximum Likelihood участка генома R0 HDV. Для каждой референсной последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Для каждой последовательности из исследуемых регионов

указывается номер, генотип HDV, регион и год выделения. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность  $> 90\%$ . В каждом узле  $95\%$  HPD показано серой полосой.

Фрагмент 2 филогенетического дерева иллюстрирует значительное удаленное расположение друг от друга изолятов 30\_HDV1\_Dagestan\_2019 и 31\_HDV1\_Dagestan\_2019, относящихся к одному семейному очагу, обозначенному на филогенетическом дереве, как Дагестан семья 4. Такое расположение последовательностей HDV даёт возможность предположить существование различных источников инфицирования для членов этой семьи (рисунок 33).

2

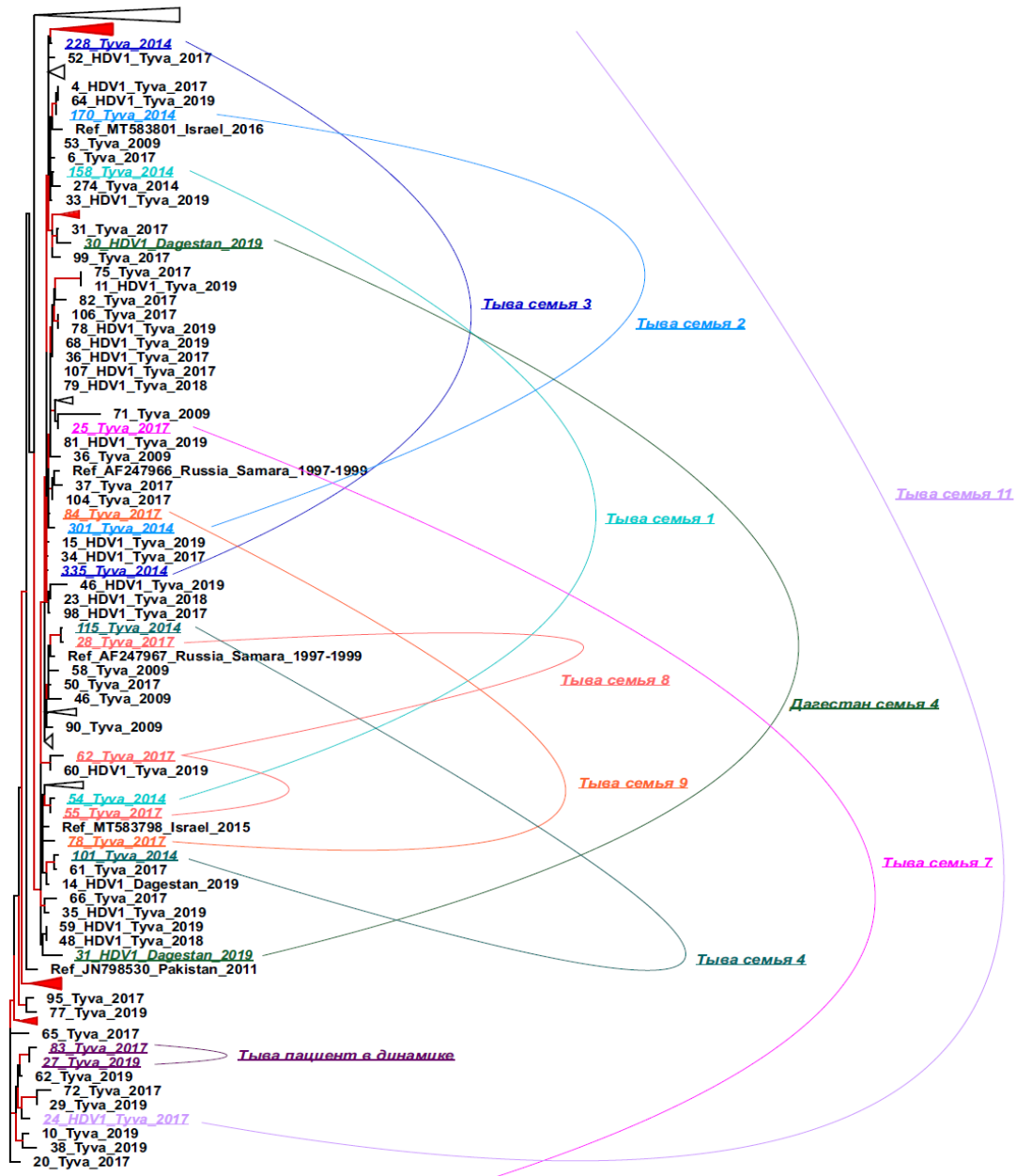


Рисунок 33. Фрагмент 2 филогенетического дерева, полученного при анализе методом Maximum Likelihood фрагмента генома R0 HDV. Для каждой референсной последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Для каждой последовательности из исследуемых регионов указывается номер, генотип HDV, регион и год выделения. Ветви деревьев,

показанные красным, имеют апостериорную вероятность  $> 90\%$ . В каждом узле 95% HPD показано серой полосой.

3

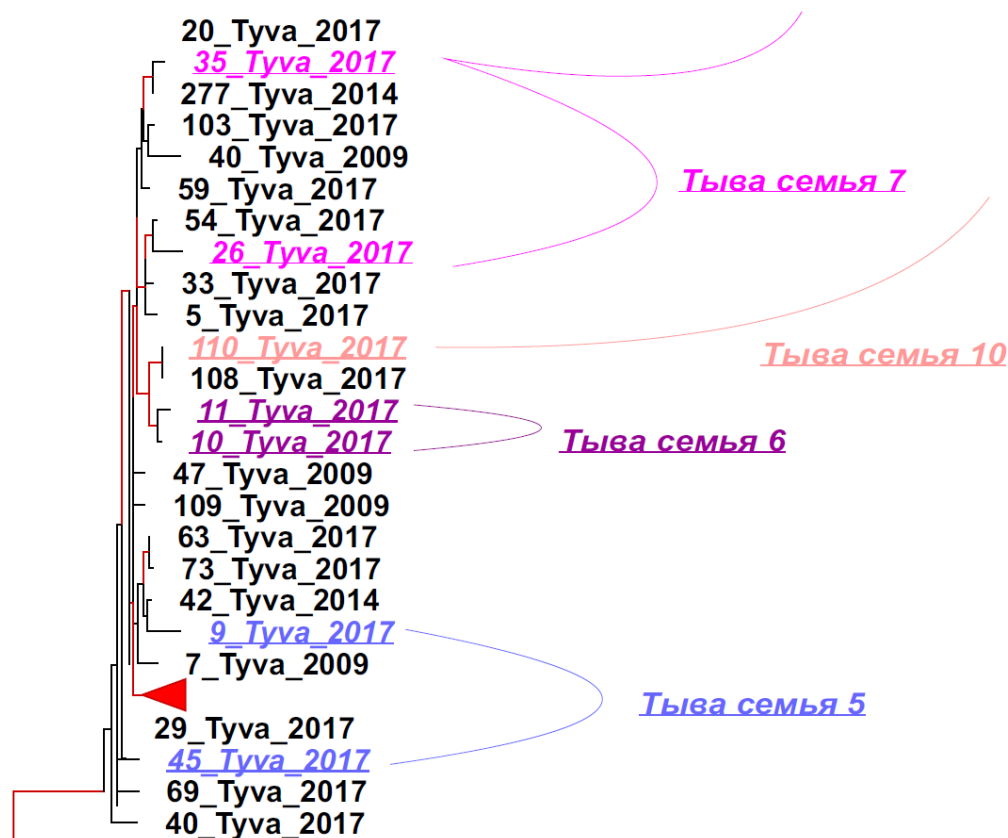


Рисунок 34. Фрагмент 3 филогенетического дерева, полученного при анализе методом Maximum Likelihood участка генома R0 HDV. Для каждой референсной последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Для каждой последовательности из исследуемых регионов указывается номер, генотип HDV, регион и год выделения. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность  $> 90\%$ . В каждом узле 95% HPD показано серой полосой.

Фрагменты 1, 2 и 3 филогенетического дерева демонстрируют для изолятов вируса гепатита D, выделенных из десяти семейных очагов Республики Тыва, высокую вероятность существования различных источников инфицирования

членов одной семьи в эндемичном регионе (рисунок 31). Исключение составили только последовательности HDV 10\_Tyva\_2017 и 10\_Tyva\_2017, относящиеся к одному семейному очагу, обозначенному на филогенетическом дереве, как Тыва семья 6, что подтверждает истинно внутрисемейную передачу вируса в эндемичном регионе.

Для опровержения или подтверждения возможности внутрисемейной передачи вируса гепатита D мы проанализировали филогенетические отношения для тех же изолятов из Республики Дагестан и Республики Тыва, используя полногеномные последовательности HDV для построения филогенетического дерева методом ML. Результаты анализа с использованием алгоритма ML для данных последовательностей представлены на рисунке 35.

В результате проведенного филогенетического анализа нами определены изменения во взаимосвязи между анализируемыми последовательностями при формировании данных семейных очагов. Так, четыре семейных очага, представленных на дереве как Дагестан семья 1-4 достоверно формируют четыре независимых кластера и подтверждают тем самым внутрисемейную передачу или существование одного источника вируса гепатита D в Республике Дагестан.

В наших исследованиях показано, что расхождение в результатах анализа филогенетических отношений изолятов, полученные при выявлении внутрисемейной передачи касается последовательностей 30\_HDV1\_Dagestan\_2019 и 31\_HDV1\_Dagestan\_2019, относящихся к одному семейному очагу, обозначенному на филогенетическом дереве, как Дагестан семья 4, а также 54\_HDV1\_Dagestan\_2019 и 55\_HDV1\_Dagestan\_2019, относящихся к семейному очагу, обозначенному на филогенетическом дереве, как Дагестан семья 2.

Таким образом, при использовании для проведения филогенетического анализа метода ML для полногеномных последовательностей вируса гепатита дельта изоляты четырёх семейных очагов, представленных на дереве как Дагестан семья 1-4 достоверно формируют четыре независимых кластера и подтверждают

тем самым только внутрисемейную передачу вируса гепатита D в Республике Дагестан.

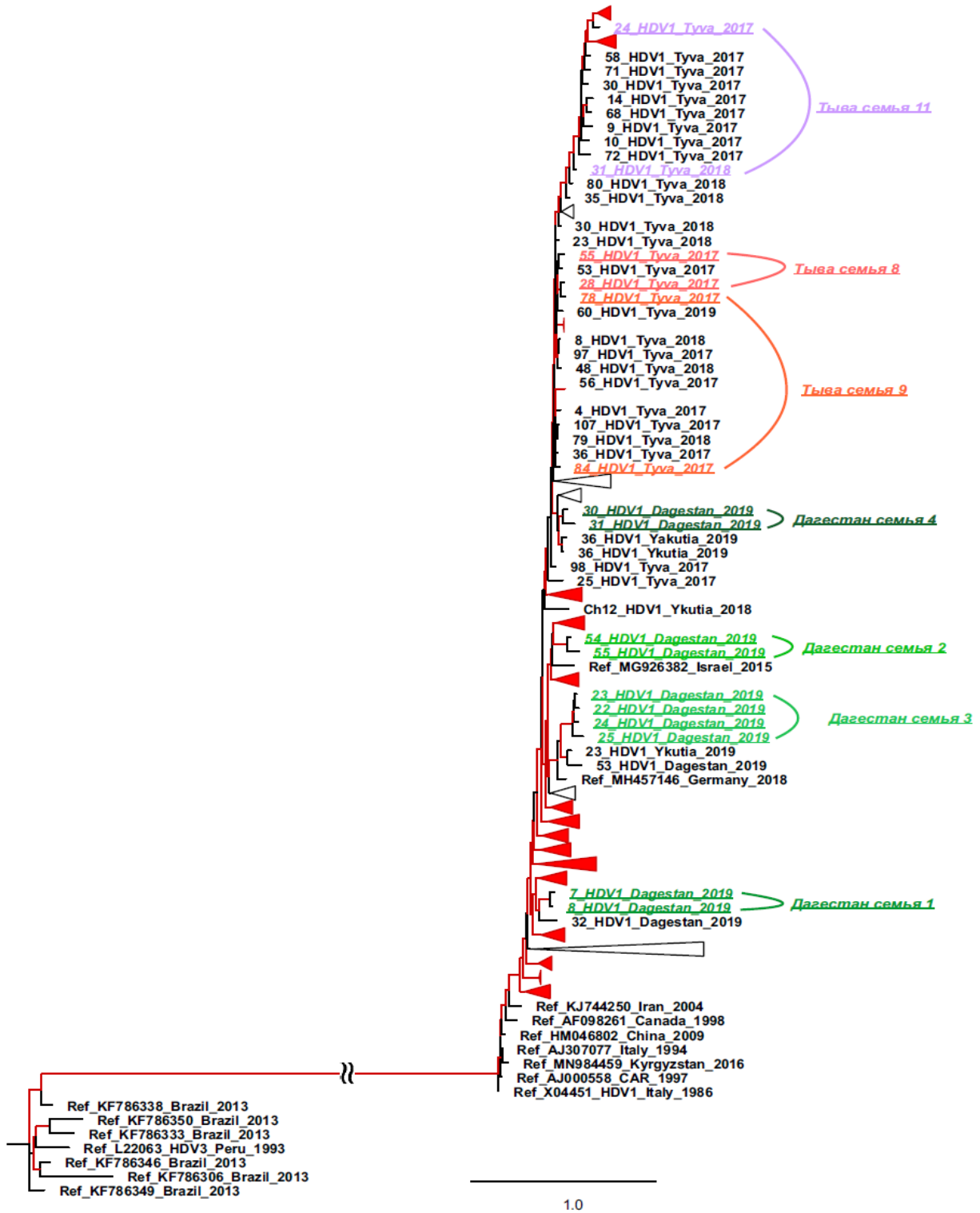


Рисунок 35. Филогенетический анализ с использованием алгоритма ML для полногеномных последовательностей HDV (1690 нт). Для каждой референсной последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Для каждой последовательности из исследуемых регионов указывается номер, генотип HDV, регион и год выделения. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность  $> 90\%$ . В каждом узле 95% HPD показано серой полосой. Изоляты из семейных очагов из Республики Тыва и Республики Дагестан выделены различными цветами и каждый из семейных очагов объединён круглой скобкой с подписью.

Далее нами оценена возможность изменения результатов анализа филогенетических взаимоотношений изолятов HDV из семейных очагов Республики Дагестан и Республики Тыва при использовании Байесовского анализа для последовательностей участка R0-гена HDV (как наиболее доступных для исследования), выполненный для определения взаимосвязи между последовательностями с учетом скорости накопления мутаций и использованием временной шкалы для определения возможной передачи вируса в семейных очагах (рисунок 36). Последовательности участка R0 генома HDV изолятов, полученных из семейных очагов из Республики Тыва показаны различными цветами и объединены скобкой. Последовательности участка R0-гена HDV изолятов из семейных очагов из Республики Дагестан, показаны зелёным цветом и объединены скобкой.

Фрагменты данного филогенетического дерева, обозначенные как 1, 2 и 3 подробнее будут рассмотрены далее.



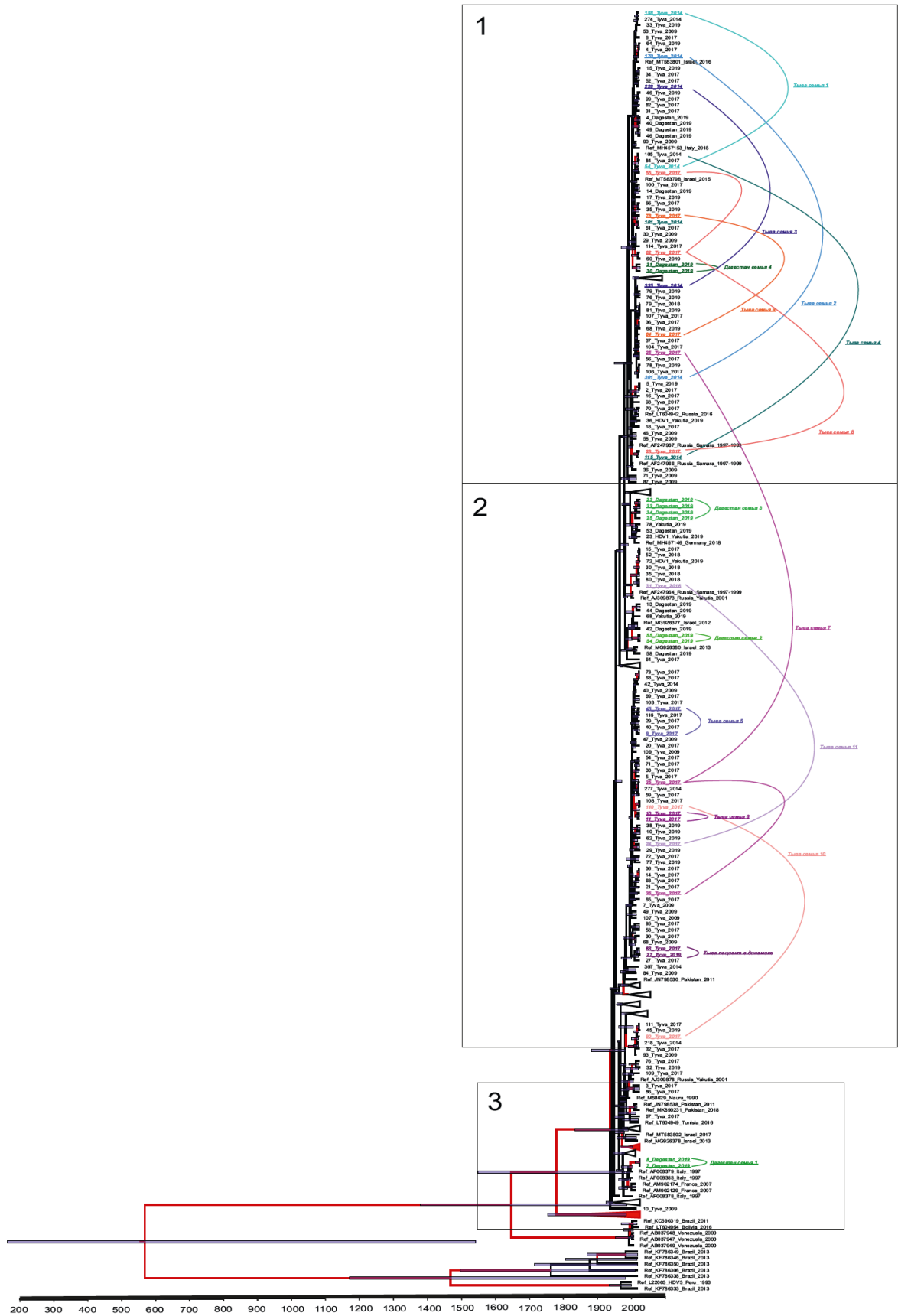


Рисунок 36. Байесовское филогенетическое дерево на основе частичных последовательностей участка R0 HDV (373 п.о.). Для каждой референсной

последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Для каждой последовательности из исследуемых регионов указывается номер, генотип HDV, регион и год выделения. Последовательности участка R0-гена HDV изолятов, полученных из семейных очагов из Республики Тыва, показаны различными цветами и объединены скобкой. Последовательности участка R0-гена HDV изолятов, полученных из семейных очагов из Республики Дагестан, показаны зелёным цветом и объединены скобкой. Ветви деревьев, показанные красным, имеют апостериорную вероятность  $> 90\%$ . В каждом узле 95% HPD показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.

Фрагмент 1 Байесовского филогенетического дерева на основе частичных последовательностей участка R0 HDV демонстрирует сохранение взаимоотношений между последовательностями 30\_HDV1\_Dagestan\_2019 и 31\_HDV1\_Dagestan\_2019 (Дагестан семья 4), показанное при использовании метода ML для полногеномных последовательностей HDV (рисунок 37).

Данные, аналогичные показанным при использовании метода ML для полногеномных последовательностей HDV, подтверждающие внутрисемейную передачу вируса на данной территории, продемонстрированы на рисунке 38 (фрагмент 2) для последовательностей 54\_HDV1\_Dagestan\_2019 и 55\_HDV1\_Dagestan\_2019 (Дагестан семья 2).

При использовании Байесовского анализа для изолятов из Республики Дагестан очевидно формирование четырёх независимых кластеров, в которые входят помимо исследуемых изолятов также, в основном, варианты вируса от пациентов из Республики Дагестан. Для многих РНК-содержащих вирусов характерна высокая скорость эволюции, превышающая для наиболее изменчивых участков генома 1% в год. Для участка R0 генома вируса гепатита дельта скорость накопления замен составляет  $3 \times 10^{-3}$  в год.

Обнаружение у больных людей из семейных очагов близкородственных вариантов вируса свидетельствует о том, что совместно проживающие члены этих

семей относительно недавно инфицированы из одного источника. Особенно это очевидно для семейных очагов, обозначенных на рисунке 37, 38: Дагестан семья 1 (последовательности 7\_HDV1\_Dagestan\_2019 и 8\_HDV1\_Dagestan\_2019) (рисунок 39, фрагмент 3); Дагестан семья 2 и семья 4 (последовательности 54\_HDV1\_Dagestan\_2019 и 55\_HDV1\_Dagestan\_2019; также 30\_HDV1\_Dagestan\_2019 и 31\_HDV1\_Dagestan\_2019, соответственно) (фрагмент 1 и 2).

Для семейного очага Дагестан семья 3 (последовательности 22,23,24, 25\_Dagestan\_2019) (рисунок 38) (фрагмент 2) сформированный кластер характеризуется вероятным последовательным внутрисемейным инфицированием.

Таким образом, проведенные различными методами исследования изолятов вируса гепатита дельта (как филогенетический анализ полногеномной последовательности методом ML, так и Байесовский анализ участка R0 HDV), полученные от членов семейных очагов из Республики Дагестан, показали, что на территории региона реализуется передача HDV от одного источника инфицирования.

1

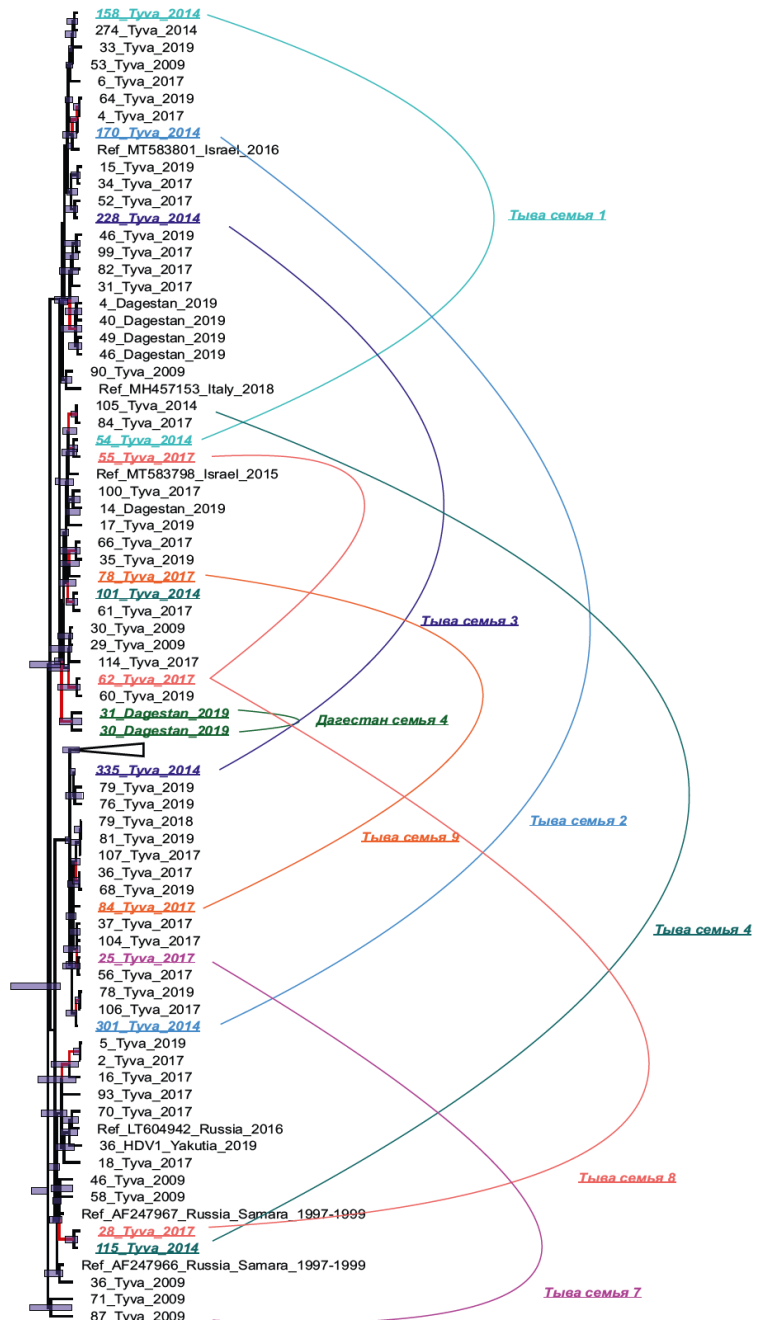


Рисунок 37. Фрагмент 1 Байесовского филогенетического дерева на основе частичных последовательностей участка R0 HDV (373 п.о.) изолятов, полученных из семейных очагов из Республики Тыва и Республики Дагестан. Для каждой референсной последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Для каждой последовательности из исследуемых регионов указывается номер, генотип HDV, регион и год выделения. Последовательности участка R0-гена HDV изолятов, полученных из семейных

очагов из Республики Тыва, показаны различными цветами и объединены скобкой. Последовательности участка R0-гена HDV изолятов, полученных из семейных очагов из Республики Дагестан показаны зелёным цветом и объединены скобкой. Ветви деревьев, отмеченные красным, имеют апостериорную вероятность  $> 90\%$ . В каждом узле 95% HPD показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.

2

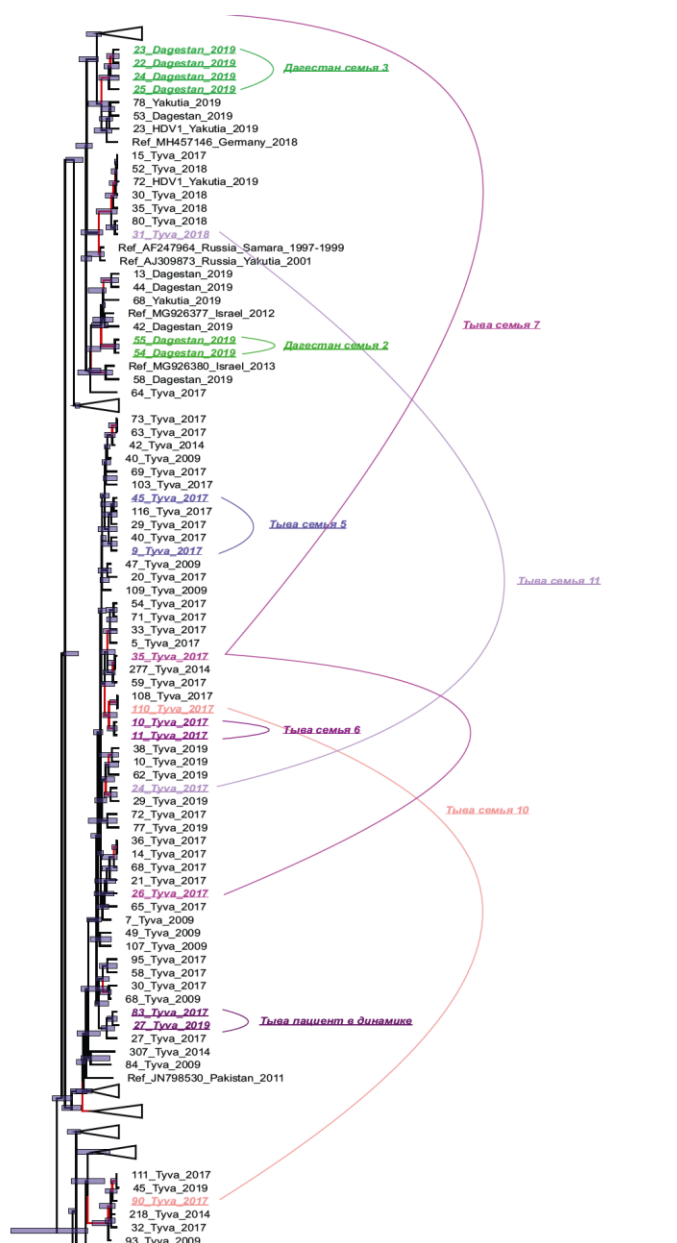


Рисунок 38. Фрагмент 2 Байесовского филогенетического дерева на основе частичных последовательностей участка R0 HDV (373 п.о.) изолятов, полученных из семейных очагов из Республики Тыва и Республики Дагестан. Для каждой

референсной последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV, страна и год выделения. Для каждой последовательности из исследуемых регионов указывается номер, генотип HDV, регион и год выделения.

Последовательности участка R0-гена HDV изолятов, полученных из семейных очагов из Республики Тыва, показаны различными цветами и объединены скобкой. Последовательности участка R0-гена HDV изолятов, полученных из семейных очагов из Республики Дагестан отмечены зелёным цветом и объединены скобкой. Ветви деревьев, выделенные красным, имеют апостериорную вероятность  $> 90\%$ . В каждом узле 95% HPD показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.

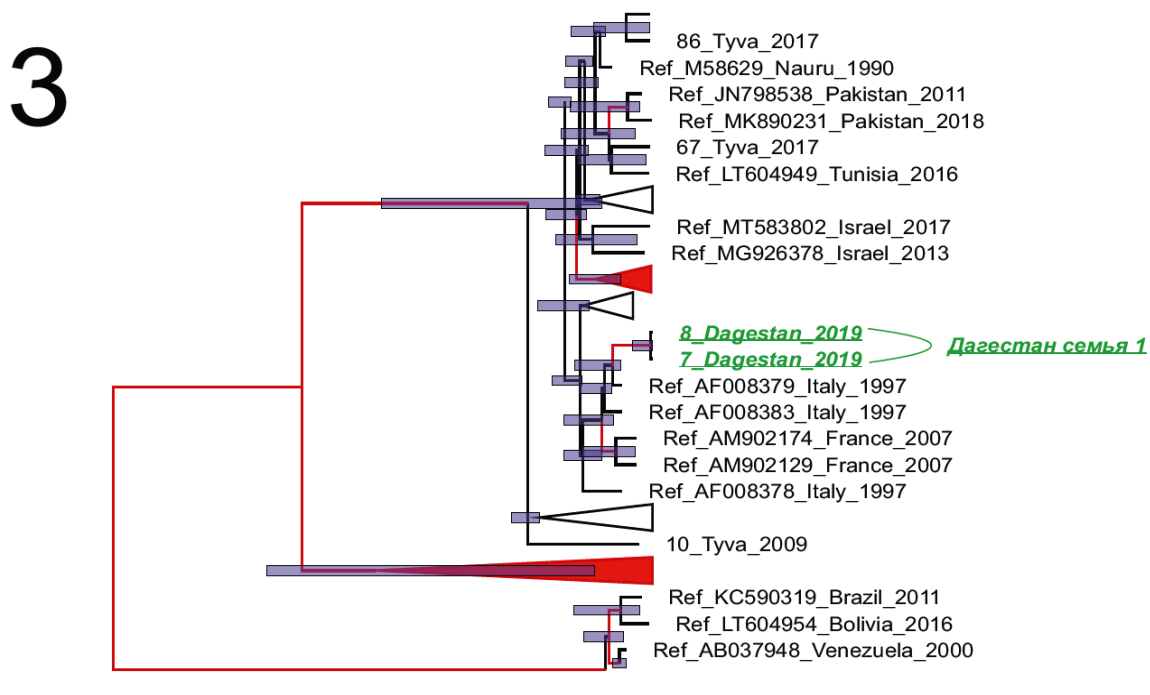


Рисунок 39. Фрагмент 3 Байесовского филогенетического дерева на основе частичных последовательностей участка R0 HDV (373 п.о.) изолятов, полученных из семейных очагов Республики Дагестан. Для каждой референсной последовательности указывается номер в базе данных GenBank, генотип HDV,

страна и год выделения. Для каждой последовательности из исследуемых регионов указывается номер, генотип HDV, регион и год выделения. Последовательности участка R0-гена HDV изолятов, полученных из семейных очагов из Республики Дагестан, показаны зелёным цветом и объединены скобкой. Ветви деревьев, выделенные красным, имеют апостериорную вероятность  $> 90\%$ . В каждом узле 95% HPD показано серой полосой. Ось X показывает время в годах.

Уровень гетерогенности последовательностей HDV в семейных очагах в Республике Тыва свидетельствует против единственно возможной внутрисемейной передачи вируса. Как видно на рисунке 37 (фрагмент 1), изоляты вируса, выделенные из семейных очагов, находятся на значительном эволюционном удалении друг от друга, особенно это касается изолятов из двух семейных очагов: 228\_Tyva\_2014, 335\_Tyva\_2014, обозначенные на дереве как Тыва семья 3 и 170\_Tyva\_2014, 301\_Tyva\_2014, обозначенные на дереве как Тыва семья 2.

Необходимо отметить, что практически каждая последовательность HDV из семейных очагов Республики Тыва входит в различные кластеры и каждый член семьи имеет независимый источник инфицирования. Исключение составили последовательности 9\_Tyva\_2017 и 45\_Tyva\_2017 (Тыва семья 5), вошедшие в один кластер. Однако, источники инфицирования в данной семье также различны.

Такой анализ частичных последовательностей участка R0 вируса гепатита D методом Байесовского анализа также сохраняет построение взаимоотношений, полученное для изолятов вируса от членов семей из Республики Тыва, подтверждая наличие многих путей инфицирования в эндемичном регионе (рисунок 37, 38).

Единственный семейный очаг из Республики Тыва при анализе предложенными нами методами подтвердил существование истинно внутрисемейной передачи в эндемичном регионе – 10\_Tyva\_2017 и 10\_Tyva\_2017, относящиеся к одному семейному очагу, обозначенному на филогенетическом дереве как Тыва семья 6.

Таким образом, основываясь на данных филогенетического анализа, проведенного различными методами, нами установлено, что семейные очаги, сформировались на территории эндемичного региона (Республика Тыва) в результате существования значительного числа источников инфекции и реализации множественных путей передачи вируса.

Основным критерием молекулярной эпидемиологии является статистически достоверная филогенетическая связь между исследуемыми генетическими последовательностями.

Таким образом, наши исследования, проведенные в эндемичных регионах Российской Федерации, показали, что филогенетический анализ наиболее часто используемого для этих целей фрагмента генома R0 вируса гепатита дельта с целью расследования случаев заражения необходимо проводить с помощью Байесовского анализа. Решение таких задач с помощью анализа полного генома возможно также с использованием алгоритма максимального правдоподобия (ML).

### **3.6. Течение хронического вирусного гепатита дельта у жителей эндемичного региона**

Двойное инфицирование вирусами гепатита В и D в большей степени по сравнению с изолированным инфицированием HBV ассоциировано с ускоренным прогрессированием хронического гепатита, трансформацией его в цирроз печени (ЦП) и неблагоприятным прогнозом. Течение и исход хронического вирусного гепатита D определяются совокупностью изменений клинико-биохимических и вирусологических показателей. Характер его клинических проявлений, тяжесть и скорость прогрессирования сильно варьируют. Однако данные о факторах, влияющих на профиль инфекционного процесса (со стороны как макро-, так и обоих микроорганизмов), в настоящее время ограничены в силу малочисленности исследований по этой тематике.



Всего на конец 2020 года в регистре инфекционной больницы №1 г. Кызыла в Туве находились 3553 пациента с вирусным гепатитом, в том числе 3246 (91,4%) пациентов с хроническим гепатитом и 307 (8,6%) - с циррозом печени. Среди 3246 пациентов с хроническим гепатитом 1597 (49,2%) имели гепатит В, 784 (24,2%) - гепатит D, 845 (26,0%) - гепатит С, 18 (0,6%) - коинфекцию HCV/HBV и 2 (0,06%) - тройное инфицирование HBV, HDV и HCV. Таким образом, доля инфицированных HDV среди зарегистрированных пациентов с HBV составила 32,7% (786/2401).

Среди 786 пациентов, инфицированных HDV из республики Тыва, полные медицинские карты были доступны для 514 пациентов, которые были включены в базу данных в период с 2008 по 2020 годы. Их демографические, клинические и вирусологические характеристики представлены в таблице 22 и стратифицированы по диагнозу, установленному при включении в регистр (хронический гепатит, степень ЦП по Child-Pugh). На момент постановки диагноза у 37,5% (193/514) пациентов (средний возраст - 44 - 45 лет) диагностирован ЦП; средний возраст больных с хроническим гепатитом D составил 38 лет (доля женщин была более чем в 1,2 раза выше по сравнению с мужчинами во всех подгруппах (хронический гепатит, ЦП класса А-С по Child-Pugh).

У 493/514 пациентов сохранились архивные образцы для проведения тестирования HBV и HDV. 75,1% из них с диагнозом хронический гепатит D имели детектируемую виремию HDV, в то время, только 19,7% из них имели ДНК HBV. Такие пропорции детектируемой РНК HDV и ДНК HBV наблюдались во всех подгруппах пациентов с хроническим гепатитом и ЦП (таблица 22).

Все положительные образцы РНК HDV от этих пациентов были подвергнуты полногеномной амплификации и секвенированию для последующего филогенетического анализа.

Таблица 22. Демографические, клинические и вирусологические данные больных хроническим вирусным гепатитом D в Республике Тыва.

	Количество пациентов, (N)	Возраст, годы (мин. - макс., медиана)	Мужчины: женщины соотношение	HDV RNA полож (n/N, %)	HDV генотипы (n/N, %)	HBV DNA полож (n/N, %)	HBV генотипы (n/N, %)
Всего пациентов	514	4 -77; 40,5	194/320 (1:1,7)	370/493 (75,1%)	HDV-1 370/370 (100%)	97/493 (19,7%)	HBV- A: 7/127 (5,5%) HBV- D: 120/12 7 (94,5%)
Первичный диагноз							
Хронический гепатит	321	4-77; 38	117/204 (1:1,7)	222/311 (71,4%)	HDV-1 222/222 (100%)	65/311 (20,9%)	HBV- A: 4/73 (5,5%) HBV- D: 69/73 (94,5%)
Цирроз печени класса А	44	22-69; 45	16/28 (1:1,8)	32/40 (80,0%)	HDV-1 32/32 (100%)	6/40 (15,0%)	HBV- A: 2/13 (15,4%) HBV- D: 11/13 (84.6%)
Цирроз печени класса В	79	17-62; 44	29/50 (1:1,7)	67/77 (87,0%)	HDV-1 67/67 (100%)	16/77 (20,8%)	HBV- A: 1/16 (6,3%) HBV- D: 15/16 (93.7%)
Цирроз печени класса С	70	23-63; 45	32/38 (1:1,2)	49/65 (75,4%)	HDV-1 49/49 (100%)	10/65 (15,4%)	HBV- A: 0/25 (0%) HBV- D: 25/25 (100%)

Примечание: класс А-С – тяжесть цирроза печени по Child-Pugh.

Актуальность определения генотипа вируса гепатита В обусловлена его взаимосвязью с тяжестью течения, прогнозом лечения и исхода заболевания. Особенно это касается пациентов с сочетанной вирусной инфекцией В и D.

Различные генотипы HBV связаны с различными клиническими фенотипами и прогнозом. Нами установлено, что среди обследованной когорты пациентов из Республики Тыва циркулирует только HDV-1 генотип вируса гепатита D и генотипы А и D вируса гепатита В.

Не ясно, существует ли взаимосвязь между генотипами HBV и тяжестью течения заболевания, у пациентов с хроническим гепатитом или ЦП.

При секвенировании у всех пациентов с виремией был установлен генотип HDV-1. Генотипы HBV-A и D были идентифицированы у пациентов с хроническим гепатитом D на основании результатов проведения ИФА (МАТ). Генотип D HBV преобладал во всей когорте пациентов (94,5%) и в субкогортах, стратифицированных по степени поражения печени (84,6–100%).

Следует отметить, что среди 25 пациентов с циррозом печени класса С по Child-Pugh не выявлено ни одного случая инфицирования HBV-A.

На основании изучения уникального клинического материала, полученного нами в ходе проводившегося в Республике Тыва с 2009 г. наблюдения за когортой пациентов с хронической HBV/HDV-инфекцией, было определено, что болезнь имеет различные течение и исходы. В одних случаях это быстрый прогресс с развитием декомпенсированного ЦП и его осложнений (печёночная/портосистемная энцефалопатия (ПЭ), кома, кровотечение) с высокой частотой летальных исходов. У других лиц отмечена длительная (на протяжении 10 лет наблюдения) хроническая форма инфекции без формирования цирроза печени. Возможно также многолетнее течение непрогрессирующего (компенсированного) ЦП класса А по шкале Child-Pugh.

В результате этих наблюдений была сформулирована ещё одна задача нашего исследования – определить демографические, клинико-биохимические и

вирусологические факторы, влияющие на течение и прогрессирование хронического вирусного гепатита D у пациентов за десятилетний период наблюдения.

В ходе выполнения исследований проанализирована динамика клинико-лабораторных данных 121 больного ХВГ D с хронической HDV-инфекцией при различном течении и исходе заболевания. Все пациенты состояли на учёте в консультативном кабинете ГБУЗ РТ «Инфекционная больница» с 2009 по 2019 годы и принадлежали к одной этнической группе (тувинцы). Количество ежегодных обследований за период наблюдения варьировало от 2 до 7.

По факту впервые установленного диагноза на момент включения в исследование и исходу болезни сформированы 3 группы инфицированных HDV: 1-я группа – 61 человек с прогрессированием хронического гепатита до ЦП (класс В-С по Child-Pugh), 2-я – 49 больных с непрогрессирующим ХВГ D и 3-я – 11 пациентов, имеющих медленно прогрессирующий ЦП (класс А по Child-Pugh).

За указанный период в 1-й группе от декомпенсированного ЦП и ГЦК скончались 17 человек; в других группах летальные случаи отсутствовали. В ходе работы мы проанализировали демографические данные (пол, возраст на момент начала исследования); наличие детектируемых уровней РНК HDV и ДНК HBV; показатели функционального состояния печени: активность АЛТ и АСТ, ЩФ, ГГТП и содержание общего билирубина (ОБ). Степень выраженности ПЭ оценивали по длительности выполнения теста связи чисел (ТСЧ).

Все включённые в исследование пациенты были инфицированы генотипом HDV-1 и доминирующим генотипом HBV-D, предсказанным на основании серотипа, определенного методом ИФА с серотип-специфичными конъюгатами.

В таблице 23 представлены результаты демографических и клинико-биохимических исследований, а также мониторинга ДНК HBV в 3 группах пациентов.

Таблица 23. Сравнительная характеристика пациентов с различным течением хронической инфекции, вызванной вирусом гепатита D в Республике Тыва.

Параметры	Группа 1 (n = 61)	Группа 2 (n = 49)	Группа 3 (n = 11)
Соотношение м : ж	1 : 1,8	1 : 3,5	1 : 2,7
Средний возраст, лет	41,1 ± 7,9	37,9 ± 9,3	39,8 ± 6,1
Средняя продолжительность наблюдения ± SD, лет	6,13 ± 2,6	6,55 ± 2,6	4,18 ± 2,6
АЛТ ± SD (МЕ/л)	149,1 ± 4,4	122,0 ± 7,4	158,1 ± 52,1
АСТ ± SD (МЕ/л)	138,5 ± 35,7	88,9 ± 19,8	115,9 ± 26,9
Билирубин общий ± SD (мкмоль/л)	43,4 ± 14,03	25,6 ± 4,7	37,6 ± 12,54
ЩФ ± SD (МЕ/л)	619,0 ± 97,4	444,01 ± 57,6	461,0 ± 69,7
ГГТП ± SD (МЕ/л)	58,9 ± 39,3	25,7 ± 10,7	71,2 ± 34,1
Тест связи чисел (ТСЧ), сек	86,4 ± 28,96	66,9 ± 15,7	83,1 ± 26,5
Наличие ДНК HBV, 1-кратное выявление в динамическом наблюдении, n/N (%)	19/61 (31,2)	19/49 (38,8)	2/11 (18,2)
Наличие ДНК HBV, выявление ≥2 раз в динамическом наблюдении, n/N (%)	12/61 (19,7)	10/49 (20,4)	0/11 (0)

Средний возраст пациентов на момент включения в исследование составил во всех группах  $41,1 \pm 7,9$  лет. Разница в соотношении мужчин и женщин была наиболее значительна во 2-й группе (1:3,5). Средняя продолжительность динамического наблюдения составила около 6 лет. В 1-й группе среднее количество лет от включения в исследование до формирования ЦП составило  $3,65 \pm 2,3$  года, до летального исхода –  $4,5 \pm 3$  года и не различалось у мужчин и женщин (4,57 и 4,43 года, соответственно). За период наблюдения у 4 пациентов с ЦП (класс

С по Child-Pugh) сформировалась ГЦК, приведшая к летальному исходу. Ещё 13 человек скончались от осложнений, связанных с декомпенсированным ЦП.

В таблице 24 приведены данные сравнительного анализа параметров, оказывающих возможное влияние на формирование различных исходов заболевания.

Статистически значимые межгрупповые различия по среднему возрасту на момент включения в исследование и гендерному соотношению не отмечены.

При сравнении показателей достоверно более высокие активности АСТ, ЩФ, ГГТП, уровень ОБ и повышенная скорость выполнения ТСЧ выявлены в 1-й группе по сравнению со 2-й; показатели АЛТ в них значимо не различались. При сравнении групп с прогрессированием заболевания и компенсированным ЦП (1-я и 3-я) не выявлено статистически значимых различий ни по одному из клинико-биохимических параметров. В то же время активность АЛТ и ГГТП, содержание ОБ и время выполнения ТСЧ были статистически значимо выше среди пациентов с медленно прогрессирующим ЦП (3-я группа) по сравнению со 2-й группой. Различия в показателях активности АСТ и ЩФ между этими группами не выявлены. Положительный результат детекции ДНК HBV достоверно чаще зарегистрирован у больных с прогрессирующим течением заболевания и у пациентов с ХВГ по сравнению с данными пациентов с компенсированным и медленно прогрессирующим ЦП.

Таблица 24. Сравнительный анализ клинико-биохимических показателей у пациентов с разными вариантами течения хронической HDV-инфекции.

Параметры	Группа 1: группа 2	Группа 1: группа 3	Группа 2: группа 3
Соотношение м : ж	$\varphi^*_{эмп} = 1,579$	$\varphi^*_{эмп} = 0,577$	$\varphi^*_{эмп} = 0,342$
Средний возраст, лет	$t_{эмп} = 1,5$	$t_{эмп} = 0,4$	$t_{эмп} = 0,5$
АЛТ $\pm$ SD (МЕ/л)	$t_{эмп} = 1,98$	$t_{эмп} = 0,5$	$t_{эмп} = 2,7^\dagger$
АСТ $\pm$ SD (МЕ/л)	$t_{эмп} = 3,8^\dagger$	$t_{эмп} = 1,8$	$t_{эмп} = 0,7$
Билирубин общий $\pm$ SD (мкмоль/л)	$t_{эмп} = 4,8^\dagger$	$t_{эмп} = 0,8$	$t_{эмп} = 3,3^\dagger$
ЩФ $\pm$ SD (МЕ/л)	$t_{эмп} = 5,2^\dagger$	$t_{эмп} = 2,3$	$t_{эмп} = 0,9$
ГГТП $\pm$ SD (МЕ/л)	$t_{эмп} = 4,3^\dagger$	$t_{эмп} = 0,8$	$t_{эмп} = 6,1^\dagger$
Тест связи чисел (ТСЧ), сек	$t_{эмп} = 4,1^\dagger$	$t_{эмп} = 0,4$	$t_{эмп} = 2,7^\dagger$
ДНК HBV	$\varphi^*_{эмп} = 0,722$	$\varphi^*_{эмп} = 2,718^\dagger$	$\varphi^*_{эмп} = 3,06^\dagger$

Критерий  $\varphi^*$  – угловое преобразование Фишера.

Критерий  $t_{эмп}$  – величина вычисленного эмпирического критерия, который необходимо сравнивать с критическим (критерий Стьюдента).

$^\dagger$  – значение  $p \leq 0,05$ .

На рисунке 40 представлены данные многофакторного анализа биохимических параметров, оказывающих влияние на формирование различных исходов ХГД (расчет корреляционной матрицы с поправкой Бенджамини-Хохберга). При проведении многофакторного анализа были использованы данные только двух групп пациентов (группа 1 и группа 2), как имеющие наиболее представительную выборку.

Проведенный анализ показал, что большинство стандартных маркеров функционального состояния печени не являются предикторами неблагоприятного исхода. Исключение составляет только уровень активности АСТ (рисунок 40).

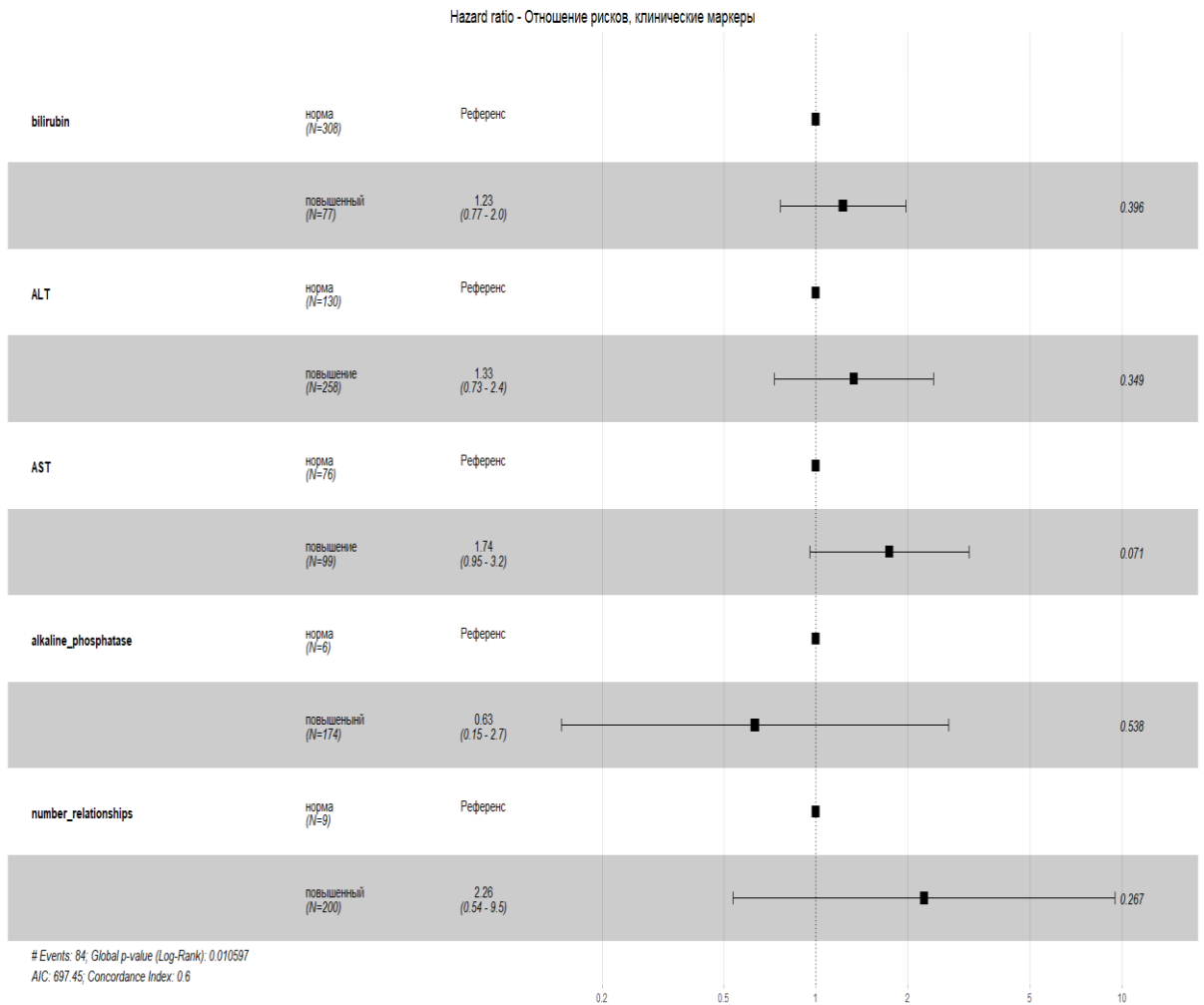


Рисунок 40. Сравнительный анализ биохимических параметров у пациентов с различными исходами ХГД (расчет корреляционной матрицы с поправкой Бенджамини-Хохберга).

Как мы определили ранее, течение и исходы хронического вирусного гепатита D характеризуются динамикой вирусологических параметров. Одним из них является концентрация HBsAg в сыворотке крови, данные об изменениях которой и влиянии на прогрессирование и исходы ХГД ограничены.

Для оценки влияния концентраций HBsAg мы сравнили данные, полученные при определении количественного уровня HBsAg в сыворотках крови пациентов 1 группы - 61 человек с прогрессированием заболевания от хронического гепатита до цирроза печени (ЦП) и 2 группы - 49 человек с непрогрессирующим ХГД, для чего



использовали набор реагентов «HBsAg – ИФА – БЕСТ-количественный» (ЗАО «Вектор-Бест»). Различия средних значений показателей оценивались как достоверные при вероятности 95% -  $p < 0,05$  (Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса). В динамике уровни HBsAg в сыворотках крови были нестабильны и повышались от 0,7 до 5 lg ME/мл (таблица 25).

Таблица 25. Анализ влияния уровня HBsAg на прогрессирование течения ХГД.

Параметры	Группа 1 – прогрессирующее заболевание от ХГД до ЦП, (N=61)	Группа 2 – непрогрессирующий ХГД, (N=49)
Уровни HBsAg в сыворотке крови в динамике (lg ME/мл)	0,7 - 5	
Средние значения количества HBsAg (lg ME/мл)	4,6±0,6*	4,2±0,9
Максимальные и минимальные значения количества HBsAg в динамике (lg ME/мл)	4,5±0,5*	4,1±0,9
Различия между значениями HBsAg в первый и последний год наблюдения (lg ME/мл)	4,3±0,5*	3,9±0,9

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

В группе 1 по сравнению с группой 2 достоверно более высокие показатели ( $p < 0,01$ , Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса) выявлены при сравнении следующих параметров: средняя концентрация HBsAg - 4,6±0,6 lg ME/мл и 4,2±0,9 lg ME/мл; средняя величина различий между максимальной и минимальной концентрацией HBsAg у пациентов в динамике - 4,5±0,5 lg ME/мл и 4,1±0,9 lg

МЕ/мл; средняя величина различий между концентрациями HBsAg в первый и в последний год наблюдения -  $4,3 \pm 0,5$  lg МЕ/мл и  $3,9 \pm 0,9$  lg МЕ/мл, соответственно.

В образцах сывороток крови РНК вируса гепатита D определялась в 333 случаях (82,6%), а ДНК вируса гепатита В была однократно выявлена не более, чем в 38,8%. При проведении сравнительного анализа вирусологических параметров, оказывающих влияние на формирование различных исходов ХГД (расчет корреляционной матрицы с поправкой Бенджамини-Хохберга) (рисунок 41) было установлено наличие постоянно детектируемой РНК вируса гепатита дельта и, в меньшей степени, высокая концентрация HBsAg (более 3,5 lg МЕ/мл), принятая в нашем исследовании за пороговые значения, что достоверно определяет неблагоприятный исход заболевания с формированием цирроза печени. При этом наличие ДНК вируса гепатита В в крови не оказывает достоверного влияния на формирование ЦП.

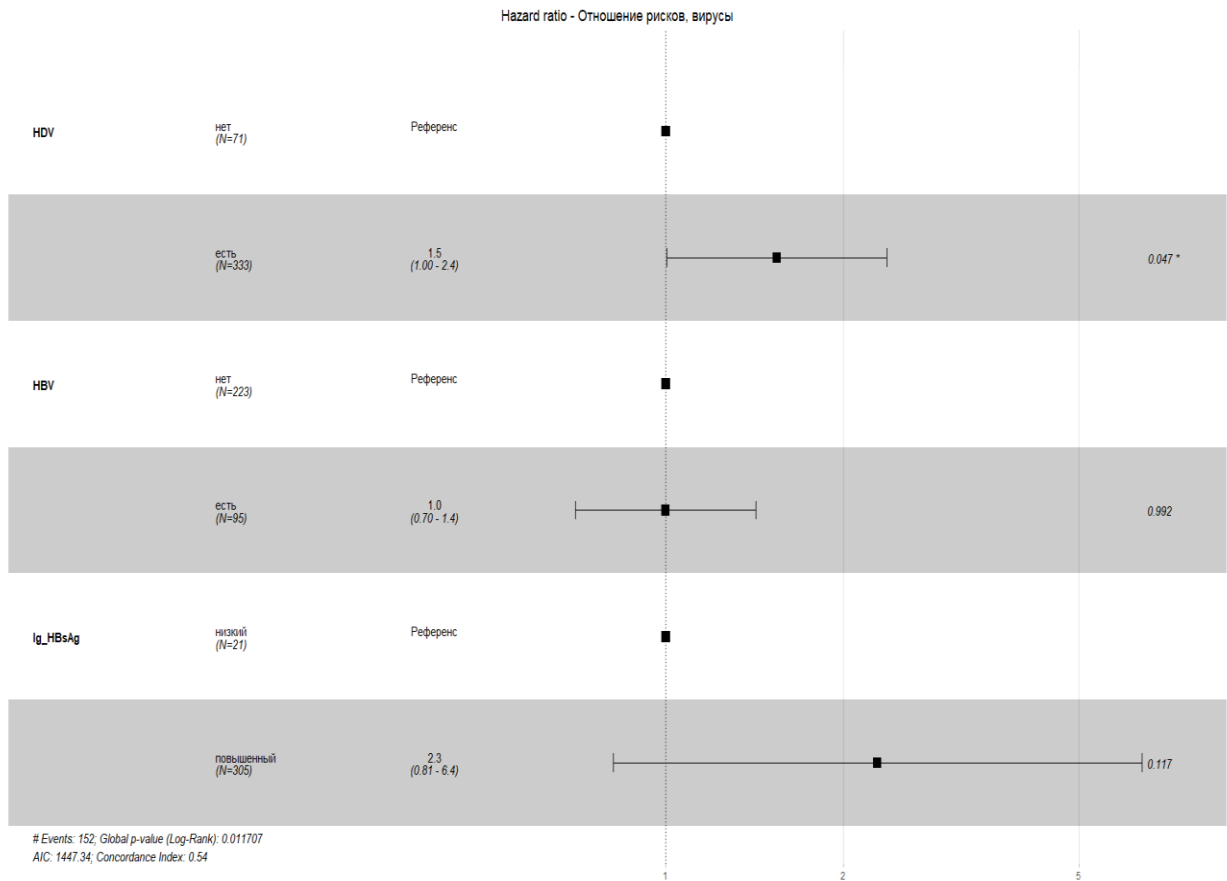


Рисунок 41. Сравнительный анализ вирусологических параметров, оказывающих влияние на формирование различных исходов ХГД (расчет корреляционной матрицы с поправкой Бенджамини-Хохберга).

### 3.7. Летальные исходы хронического гепатита дельта

Несмотря на то, что вирусный гепатит D известен уже более 40 лет, доступность адекватных методов лечения остается серьезной проблемой при хронической HDV-инфекции. В связи с этим быстрый прогресс заболевания с формированием декомпенсированного ЦП и его осложнений (комы, пищеводно-желудочного кровотечения из варикозно расширенных вен) приводит с высокой частотой к летальному исходу и является одним из вариантов развития инфекционного процесса. Вместе с тем данные об особенностях и динамике

клинико-биохимических и вирусологических показателей у пациентов с летальным исходом гепатита D крайне ограничены.

В ходе исследования 14-ти случаев летального исхода мы анализировали демографические (пол, возраст на момент включения в исследование) характеристики, количество лет, прошедшее от постановки первичного диагноза до формирования ЦП и ГЦК, а также до летального исхода. У больных оценивались в динамике показатели активности: АЛТ и АСТ, ЩФ, ГГТП, содержание общего билирубина. Выявление РНК HDV и ДНК HBV в образцах сывороток крови, а также определение генотипа HDV проводили молекулярно-биологическими методами, описанными ранее [5].

В таблице 26 представлена демографическая характеристика и диагнозы 14 пациентов, наблюдавшихся в период с 2009 г. по 2019 годы и скончавшихся от осложнений хронической дельта-инфекции. Соотношение мужчин и женщин в наблюдавшейся когорте составило 1:1, средний возраст пациентов на момент включения в исследование –  $40,9 \pm 10,1$ , средняя продолжительность наблюдения –  $5,5 \pm 3,3$  лет, средний возраст на момент смерти –  $44,7 \pm 9,1$  лет. Прогрессирование заболевания на протяжении периода наблюдения было отмечено у всех пациентов с летальным исходом хронического гепатита D. У 2 больных ЦП класса С привел к развитию ГЦК и гибели. Еще 12 человек скончались от осложнений, связанных с декомпенсированным ЦП. Из 14 человек только у трех при первом визите был выявлен хронический гепатит В+D с последующим развитием ЦП от класса В до класса С по Child-Pugh, но остальные пациенты уже при первом визите имели ЦП классов В ( $n=7$ ) или С ( $n=4$ ). Нужно отметить, что ни у одного из них нами не было зафиксировано ЦП класса А по Child-Pugh. Вероятно, это обусловлено отсутствием возможности регулярного наблюдения и быстрым прогрессированием заболевания.

Таблица 26. Прогрессирование заболевания в группе пациентов с летальным исходом ХГД.

Идент. номер пациента	Пол	Возраст на момент включения в исследование, годы	Диагноз на момент включения в исследование	Возраст на момент смерти, лет	Диагноз на момент смерти
П1	М	30	ХГ В+D	37	ЦП В+D класс В
П2	Ж	47	ЦП В+D класс В	54	ЦП В+D класс С
П3	Ж	53	ЦП В+D класс С	55	ЦП В+D класс С
П4	М	28	ХГ В+D	34	ЦП В+D класс С
П5	М	55	ЦП В+D класс С	56	ЦП В+D класс С
П6	Ж	42	ХГ В+D	50	ЦП В+D класс С
П7	Ж	41	ЦП В+D класс В	47	ЦП В+D класс С
П8	М	31	ЦП В+D класс В	40	ГЦК
П9	М	30	ЦП В+D класс С	31	ЦП В+D класс С
П10	М	32	ЦП В+D класс В	39	ЦП В+D класс С
П11	Ж	56	ЦП В+D класс В	57	ЦП В+D класс В
П12	М	34	ЦП В+D класс С	35	ЦП В+D класс С
П13	Ж	47	ЦП В+D класс В	47	ГЦК
П14	Ж	47	ЦП В+D класс В	54	ЦП В+D класс С

Примечания: ХГ – хронический гепатит; ЦП – цирроз печени; ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома. Класс А-С – тяжесть цирроза печени по Child-Pugh.

Среди наблюдавшихся пациентов среднее количество лет от включения в исследование до формирования ЦП составило  $3,65 \pm 2,3$  года, до летального исхода –  $4,5 \pm 3,25$  года. При этом данный показатель не имел статистически значимых различий у мужчин и женщин (4,57 и 4,43 года, соответственно, ( $p > 0,05$ , Критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса)).

В таблице 27 приведены клинико-биохимические данные пациентов с летальным исходом хронической HDV-инфекции, которые свидетельствовали о незначительном превышении основных показателей активности печеночного

процесса. Так, показатели верхней границы нормы (ВГН) АЛТ и АСТ были превышены у этих больных в 1,8 и 1,6 раза, соответственно. Значения других маркеров функционального состояния печени – ГГТП, ЩФ и общего билирубина – не превышали 3 ВГН.

Таблица 27. Средние показатели биохимических маркеров в группе пациентов с летальным исходом ХГД.

Параметры	Среднее значение	Превышение ВГН
АЛТ (МЕ/Л) $\pm$ SD	63,9 $\pm$ 47,5	1,8
АСТ (МЕ/Л) $\pm$ SD	63,8 $\pm$ 41,7	1,6
Билирубин общий (мкм/Л) $\pm$ SD	42,3 $\pm$ 41,0	2,1
ЩФ (МЕ/Л) $\pm$ SD	348 $\pm$ 94,1	3,1
ГГТП (МЕ/Л) $\pm$ SD	2,6 $\pm$ 44,8	2,4

В таблице 28 представлены результаты динамического наблюдения изменения уровня HBsAg в сыворотке крови пациентов с летальным исходом. У 5 пациентов количественное определение HBsAg было выполнено однократно, поскольку они скончались в тот же или на следующий год после первого визита. Это еще раз указывает на очень позднее обращение в лечебное учреждение больных с этой инфекцией, а также быстрое прогрессирование заболевания, приводящее к летальному исходу. У этих пациентов (П5, П9, П11, П12 и П13 в таблице 28) были отмечены наиболее высокие концентрации HBsAg (4,86–5 lg МЕ/мл). Наибольшее число наблюдений имели три пациента (П1, П2 и П6 – 4, 4 и 6 точек наблюдения, соответственно), 11 человек наблюдались три раза и менее. Наблюдаемые в динамике уровни HBsAg у всех пациентов были нестабильны и изменялись от минимального значения (3,3 lg) до максимального (5 lg). У пациентов П1, П3, П4, П8, П10 и П14, наблюдавшихся несколько лет, уровень HBsAg увеличивался до максимальных значений – свыше 4 lg в последний год исследования и превышал

предыдущие показатели. У пациентов П2 и П10 в последний год также отмечалось повышение концентрации антигена до значений 4,65 lg и 4,28 lg, однако более высокие уровни выявленного HBsAg были обнаружены при первом определении и составили 4,86 lg и 4,85 lg соответственно. Пациент П1 наблюдался на протяжении четырех лет, при этом концентрации HBsAg у него оставались невысокими, незначительно изменяясь от 3,5 lg до 4,2 lg – в последний год наблюдения (2018 год). Данный пациент в 2016 г. получал противовирусную терапию (энтекавир). Прием препарата определил относительно невысокие уровни концентрации HBsAg, однако не остановил прогрессирование заболевания после его отмены. Вероятно, это и определило летальный исход от осложнений, связанных с декомпенсированным ЦП класса В по Child-Pugh (пациент скончался в 2018 году). Остальные вирусологические характеристики пациентов также отражены в таблице 28.

Таблица 28. Вирусологическая характеристика пациентов с летальным исходом ХГД.

Идент. номер пациента	Год исследования	HBsAg, Ig ME/мл	РНК HDV	ДНК ВГВ	Генотип HDV	Генотип HBV
П1 (энтекавир в 2016 г.)	2011	3,5	+	+	1	D
	2016	4,0	+	-		
	2017	3,7	+	+		
	2018	4,2	+	-		
П2	2012	4,9	+	-	1	D
	2016	4,2	+	+		
	2017	4,1	+	+		
	2018	4,7	+	-		
П3	2016	4,5	+	-	1	D
	2017	5,0	+	-		
П4	2012	3,5	+	-	1	D
	2017	5,0	+	-		
П5	2017	4,8	+	-	1	D
П6	2010	4,0	+	-	1	D
	2012	4,3	+	-		
	2013	4,3	+	-		
	2016	4,6	+	-		
	2017	4,9	+	-		
	2018	4,7	+	-		
П7	2012	4,1	+	+	1	D
	2013	5,0	+	-		
	2017	3,3	+	-		
П8	2009	3,7	+	+	1	D
	2017	5,0	+	-		
П9	2017	5,0	+	-	1	D
П10	2012	4,9	+	-	1	D
	2017	4,1	+	-		
	2018	4,3	+	-		
П11	2018	4,9	+	-	1	н/о
П12	2018	4,8	+	-	1	н/о
П13	2018	5,0	+	-	1	н/о
П14	2012	4,7	+	-	1	D
	2016	5,0	+	+		
	2018	4,7	+	-		

Примечание: н/о – не определен.



Все больные, включенные в исследование, были инфицированы 1 генотипом HDV и положительными по РНК HDV в течение всего периода наблюдения. У 11 пациентов был обнаружен генотип D HBV, у трех пациентов (П11, П12 и П13) генотип HBV не был определен. Положительный результат выявления ДНК HBV наблюдали у 5 пациентов, из них: у 2 ДНК HBV выявляли два и более раза, а у 3 – однократно. У остальных 9 пациентов отмечались недетектируемые уровни виремии HBV на протяжении всего периода наблюдения.

Доля таких пациентов (64,3%) была выше по сравнению с долей пациентов с виремией HBV. У больного (П1), имевшего эпизод лечения энтекавиром, ДНК HBV определялась на детектируемом уровне как до, так и после курса терапии. Установлено, что у пациентов с детектируемой виремией HBV к последнему году жизни (последняя дата взятия материала) ДНК HBV в сыворотке крови исчезала.

Таким образом, хроническая HDV-инфекция имеет 3 различные формы течения – быстрое прогрессирование в ЦП с частыми летальными исходами; непрогрессирующий в ЦП ХГ и медленно прогрессирующий ЦП класса А по Child-Pugh. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что подавляющее большинство пациентов при первом обращении в лечебное учреждение уже имели далеко продвинутые стадии заболевания, в том числе и ЦП класса С по Child-Pugh. Очевидно, что позднее обращение за медицинской помощью относится к факторам неблагоприятного исхода гепатита D.

Темпы прогрессирования хронической моноинфекции HBV до стадии выраженного фиброза, ЦП и ГЦК зависят от множества факторов: спектра маркеров вирусов, состояния иммунной системы пациента, возраста, пола, генетической предрасположенности больного и т.д. Вероятно, способствуют быстрому течению хронического гепатита дельта и формированию ЦП невысокий социальный уровень пациентов и злоупотребление алкоголем. Полученные нами данные свидетельствуют о существенном влиянии и стабильной детектируемой

виремии HDV и высоких концентраций HBsAg в сыворотках крови больных гепатитом дельта на прогрессирование заболевания с формированием ЦП.

Очевидно, что в этих регионах, которые, без сомнения, имеют удаленные и труднодоступные районы, получить своевременную медицинскую помощь не всегда возможно. Необходимо обратить более пристальное внимание на проблему изучения распространенности HDV в таких регионах мира ввиду высокой вероятности существования значительно большего числа инфицированных и отсюда неверной трактовки уровня заболеваемости.

Серьезным препятствием для сдерживания распространения данного заболевания, поражающего в Республике Тыва людей трудоспособного возраста, является отсутствие регистрации инфекции. Все случаи гепатита D в РФ учитываются в статистике по гепатиту В, что скрывает реальную заболеваемость населения и нагрузку этой инфекции на систему здравоохранения.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

В Российской Федерации о ситуации в отношении HDV-инфекции можно судить только по результатам отдельных научных исследований, поскольку в стране отсутствует ее официальная регистрация, а рекомендации по обязательному определению анти-HDV у больных хроническим гепатитом В введены только с 2021 года [11].

Данные о широте распространения гепатита D в Российской Федерации, основанные на частоте выявления анти-HDV среди лиц, положительных по HBsAg, в настоящее время ограничены. Представленные результаты исследований касаются определения частоты выявления анти-HDV в общей популяции и у больных хроническим гепатитом В лишь в некоторых регионах РФ. Показано, что HDV относительно редко встречается на территории Европейской части РФ и широко распространен на отдельных территориях Азиатской части страны – в Республике Тыва, в Республике (Саха) Якутия, на Чукотке, достигая 35% среди больных хроническим гепатитом В [166, 276].

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

После длительного периода недооценки значимости этой инфекции в настоящее время пришло понимание ее актуальности. Это связано с ростом миграции населения из эндемичных регионов, сохранением в мире широкой распространенности вируса гепатита В и отсутствием специфической защиты от суперинфицирования HDV, а также ограниченными возможностями терапии этого тяжелого заболевания печени. 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 дельта, как и в HBV, входит

HBsAg, гуморальный иммунный ответ на вакцину против гепатита В в полной мере защищает и от инфицирования HDV [34].

Массовая вакцинация против гепатита В приводит к уменьшению числа лиц, инфицированных HBV, и, как следствие, восприимчивых к HDV. В странах, где давно внедрена массовая иммунизация новорожденных против HBV, случаи заражения вирусом гепатита D среди детей и подростков практически не регистрируются, а большинство случаев инфекции приурочены к старшим возрастным группам [298].

В то же время, данные об эпидемиологической эффективности вакцины против гепатита В в отношении гепатита D в эндемичных странах, где число потенциальных источников этого вируса велико, отсутствуют. Наличие в мире и, в частности, в Российской Федерации регионов с широкой распространенностью инфекции, вызванной HDV, указывает на необходимость разработки специальных программ по диагностике, профилактике и терапии этой опасной инфекции.

В мае 2016 года Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) разработала первую Глобальную стратегию сектора здравоохранения по вирусным гепатитам с объявленной целью ликвидации этих инфекций. Десять основных показателей были предложены для контроля распространения вирусных гепатитов, в том числе такие ключевые показатели, как распространенность хронической HBV-инфекции, число людей, живущих с HBV-инфекцией, охват первой дозой при рождении и полным курсом вакцинации против гепатита В среди младенцев. Эта стратегия имеет две цели, которые должны быть достигнуты к 2030 году: снижение заболеваемости хронической HBV-инфекцией на 90% и снижение смертности от HBV-инфекции на 65% [357].

В 2007 году в Российской Федерации вакцинация взрослого населения была осуществлена в рамках национального проекта «Здоровье» [12]. С тех пор более 70 миллионов человек, примерно 50% от общей численности населения, были

вакцинированы, и заболеваемость острым гепатитом В среди населения России снизилась с 43 случаев на 100 000 в предвакцинальный период до самых низких показателей 0,9 - на 100 000 в 2016–2018 годы и 0,6 - на 100 000 в 2019 году [13].

Согласно результатам рейтингового анализа экономического ущерба, в 2008 – 2018 годы наибольшие успехи, помимо ряда других инфекций, достигнуты в отношении вирусного гепатита В [13]. Нами проанализированы изменения показателей заболеваемости хроническим гепатитом В в различных регионах РФ, поскольку этот показатель имеет непосредственное отношение к проблеме гепатита дельта, отражая долю лиц, восприимчивых к заражению HDV или уже заразившихся этим вирусом. Для исследования мы выбрали регионы со стабильно высокими уровнями заболеваемости ХГВ, одними из самых высоких в РФ – Республики Тыва и Саха (Якутия).

В результате проведенного анализа показано, что, несмотря на существенное снижение заболеваемости острым гепатитом В в 2019 году, заболеваемость хронической формой этой инфекции в Республике Тыва практически в пять раз превышает средние показатели по РФ. Показатели заболеваемости ХГВ в Республике Саха (Якутия) ниже, чем в Республике Тыва, однако также превышают среднероссийский в 2,9 раза.

В 2008 году в Республике Тыва среди всех возрастных групп условно здорового населения HBsAg выявлялся в 7,7% случаях [181]. Такие данные позволили отнести регион к гиперэндемичному. В 2019 году произошло снижение этого показателя, ключевого для оценки распространенности HBV и HDV, до 3,07%, 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 заставляет 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. [244].

Нужно отметить, что подобные сероэпидемиологические исследования были проведены в Архангельской области в 2010-2011 годы и авторы показали, что только 1,2% выборки дали положительный результат на наличие HBsAg [321]. Также в исследовании В.В. Клушкиной и соавт. показана частота выявления HBsAg среди условно здорового населения в Московской области - 1,6%, в Ростовской области - 1,6%, в Свердловской области - 1,2%, в Хабаровском крае - 2,0% [182]. Эти результаты убедительно свидетельствуют о неоднородности территорий РФ по распространенности HBV.

Показатели выявления HBsAg среди детского населения по-прежнему крайне далеки от целевого показателя ВОЗ, равного 0,1% и соответствующего планам элиминации HBV к 2030 г. [356]. Обращает на себя внимание довольно высокая частота выявления HBsAg среди детей в возрасте до 1 года: 0,4% - в Республике Тыва и 2,9% - в Республике Саха (Якутия), связанная, очевидно, с повышенной реализацией вертикальной передачи HBV. По-видимому, охват первой дозой вакцины при рождении в реальной практике в регионах не достаточен для полного предотвращения вертикальной передачи вируса. Кроме того, дополнительные меры профилактики вертикальной передачи HBV, основанные на применении противовирусной терапии у беременных [381], необходимы для максимального снижения риска передачи вируса новорожденным.

О значительных показателях распространения HBV-инфекции среди условно здорового населения свидетельствуют результаты выявления антител к HBc – антигену. Эти антитела, как правило, сохраняются пожизненно после встречи организма с вирусом, поэтому этот маркер является важным показателем интенсивности циркуляции HBV в популяции. В Республике Саха (Якутия) за период с 2001 по 2016 годы охват детского населения вакцинацией против

гепатита В, представленный в официальных документах, вырос с 12,5% до 95,8%, соответственно [3]. Результатом этого стало снижение распространенности в популяции и антител к core белку HBV. Мы показали, что частота выявления анти-HBc в период с 2008 до 2018 годы осталась на стабильно высоком уровне только среди лиц старших возрастных групп (55%).

В Республике Тыва программа вакцинации новорожденных против гепатита В начата в 1997 году; в 2000 году показатель охвата вакцинацией детей в возрасте до 12 мес. составил 10,2 %, в 2003 году – 93,6%, в 2004 году – 96,1%, в 2007 году – 98,0% (данные ФГУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора»). Важно отметить, что в группе лиц условно здорового населения Республики Тыва средняя распространенность anti-HBc была достоверно ниже в 2019 году по сравнению с 2008 годом (29,9% и 46,2%, соответственно). Однако среди детей 0–9 лет распространенность анти-HBc в 2019 году была выше по сравнению с 2008 годом, достигнув достоверных различий (18,1 против 11,0%,  $p = 0,0182$ ). Важно отметить высокий уровень выявления антител к core антигену, свидетельствующих о встрече с вирусом или о перенесенной инфекции, среди подростков 15-19 лет (31,5%) в 2008 году, не получавших вакцину при рождении. В 2019 году данный показатель продемонстрировал достоверное снижение в 2,6 раза, составив 12,2 %.

При оценке распространенности анти-HBc другими исследователями также показано, что в странах с наибольшим охватом вакцинацией этот показатель заметно снижается. Так, в Польше, где охват вакцинацией в стране составил 55%, только у 10,3% взрослых выявлен этот маркер [132]. В Китае [205] частота выявления анти-HBc составила 47% у взрослых при охвате вакцинацией 23,7% и была самой высокой (57,4%) также у взрослого населения в Нигерии [247], где охват вакцинацией составил всего 7,9%.

Данных о распространенности серологических маркеров инфицирования HBV на территории России и в странах бывшего СССР недостаточно [166, 182, 267]. В настоящее время исследования, проведенные среди населения в Архангельской области и в Республике Таджикистан, дали представление о

распространенности анти-НВс в этих регионах. Данные из Республики Таджикистан показали, что у 30% молодых людей в возрасте 15–24 лет получен положительный результат при определении анти-НВс, в Архангельской области этот показатель составил 10,7% [183, 321].

Полученные нами результаты сравнения свидетельствуют о том, что на территориях, эндемичных в 2008 году [6] по гепатиту В (Республика Тыва и Республика Саха (Якутия)) произошло значительное снижение случаев встречи с вирусом во всех возрастных группах условно здорового населения, за исключением лиц в возрасте 50-59 лет, которые за 11 лет наблюдения остались группой наиболее высокого риска HBV-инфекции.

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-ВD) [133]. К сожалению, данные по этому ключевому индикатору в рамках глобальной стратегии здравоохранения ВОЗ по вирусному гепатиту [357] 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 [90]. 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 [49, 182]. 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.

Одной из задач нашего исследования явилось определение фактических показателей охвата первой дозой вакцины против гепатита В (НерВ-ВD) 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 [28]. В 2017–2019 годы заболеваемость острым гепатитом В в регионе снизилась до 0,2–0,4 случаев на 100 000, однако ежегодные показатели хронического гепатита В все еще высоки (24,9 - на 100 000 в 2019 году) [112], что свидетельствует о значительном уровне заболеваемости данной формой инфекции и о наличии потенциальных источников инфицирования HBV среди населения.

Необходимо отметить, что Республика Саха (Якутия) относится к регионам с суровыми климатическими условиями и экстремально низкими температурами в зимний период. Известно, что циклы замораживания/оттаивания вакцины приводят к потере ее иммуногенности [133]. В связи с этим, одной из причин несостоятельности применения вакцины может быть снижение её качества из-за нарушения холодной цепи при транспортировке и хранении. Проблемы подобного типа ранее были описаны в Монголии [91].

Другим весьма 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.

Действительно, наши исследования демонстрируют, что в некоторых перинатальных центрах реальные данные проведенной вакцинации могут быть значительно ниже, чем средние показатели, даже для региона, где итоговые показатели введения трех доз вакцины против гепатита В являются

удовлетворительными. 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 сильно различаться между клиниками и 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 [322]. В одной конкретной клинике охват второй дозой вакцины составлял всего 39,9%, и это была единственное медицинское учреждение с таким низким показателем, выявленная в нашем исследовании.

Продолжающаяся циркуляция вируса создает благоприятные условия для дальнейшего его распространения, а также потенциально может привести к распространению HDV в когорте детей, рожденных в 1998–2019 годы, особенно в Республике Саха (Якутия), где имеется значительное число потенциальных источников инфицирования [157].

Опубликованные данные и наши результаты подчеркивают необходимость строгого соблюдения схемы и сроков вакцинации против HBV, чтобы предотвратить подобное развитие событий.

Таким образом, наиболее важным результатом нашего исследования является то, что доля защищенных лиц в вакцинированном поколении в регионе, эндемичном по HBV, ниже ожидаемой и недостаточна для остановки циркуляции HBV и HDV. Наши данные продемонстрировали наличие пробелов в охвате вакцинацией НерВ-ВD и своевременном введении НерВ-2 в реальной практике, несмотря на высокий охват введения НерВ-3 у детей к возрасту одного года. Такие проблемы могут быть связаны с ошибками в соблюдении холодовой цепи доставки и хранения вакцины и/или неадекватной работой медицинского персонала, ответственного за вакцинацию. Эта неблагоприятная ситуация указывает на

необходимость введения системы аудита вакцины, направленной на мониторинг охвата вакцинацией против гепатита В и вакцинального иммунитета, а также на значительное улучшение медицинского образования в области вакцин и вакцинации.

Поскольку специфическая вакцина против гепатита D отсутствует и, вероятно, в ближайшее десятилетие не появится, то вакцинация против гепатита В является единственным эффективным инструментом для контроля за HDV. По-видимому, вакцинация против HBV новорожденных является даже более эффективной с точки зрения предотвращения заражения HDV, чем HBV. Показано, что перинатальная передача HDV, в отличие от HBV, случается крайне редко, и заражение HDV, как правило, происходит в раннем детстве в виде суперинфекции на фоне полученной перинатально HBV-инфекции [113, 299]. Таким образом, наличие поствакцинальных анти-HBs у новорожденного защищает его от возможного заражения HDV уже в первые месяцы.

Очевидно, что вакцинация новорожденных против гепатита В приведет к значительному снижению распространенности и даже элиминации гепатита D в отдаленном будущем. Математическое моделирование, выполненное A.Goyal и J.M. Murgau для оценки влияния массовой вакцинации против HBV на распространенность HBV и HDV, показало, что в условиях Китая, где около 7% общей популяции инфицировано HBV, для быстрого снижения распространенности HDV недостаточно только вакцинации новорожденных. Внедрение вакцинации против HBV среди взрослых с темпом охвата 10% в год позволит предотвратить в течение 15 лет 39 тысяч новых случаев HDV-инфекции, что значительно больше по сравнению с вакцинацией исключительно новорожденных [135].

Известно, что частота случаев ко- и суперинфекции HBV и HDV колеблется в различных странах от спорадической регистрации до 25-30% [144], при этом двойная инфекция HBV и HDV приводит к наиболее тяжелому поражению печени, с частым исходом в цирроз и гепатоцеллюлярную карциному. Уровень

эндемичности инфекции, вызванной HDV, связан с распространенностью гепатита В на данной территории, однако, эта связь не является абсолютной; ареалы распространения HDV не полностью соответствуют распространенности HBV. Тем не менее, недавние исследования показали, что распространенность HDV, по крайней мере, в два-три раза выше, чем предыдущие оценки [63].

Еще раз следует подчеркнуть, что гепатит D не является в Российской Федерации регистрируемой инфекцией, все случаи инфицирования учитываются в статистике по гепатиту В, что способствует маскировке нагрузки этой инфекции на популяцию и здравоохранение [4]. Имеются данные, указывающие на то, что помимо известных эндемичных по гепатиту D регионов (Республика Тыва, Республика Саха (Якутия), в настоящее время формируются новые, где в последние годы участились случаи этого заболевания (Республика Дагестан, Астраханская область) [10, 8].

О влиянии вакцинации против гепатита В на процесс распространения HDV в эндемичном регионе мы упоминали ранее [160] и показали полное отсутствие циркуляции анти-HDV среди HBsAg-положительных лиц в группе детей от 0 до 9 лет. При сравнении результатов исследования в группах населения, вакцинированных в соответствии с календарем прививок, и не подлежащих вакцинации становится очевидным, что вакцинация против гепатита В является защитой от инфицирования HDV. В 2019 году в возрастной группе от 0 до 29 лет (именно эта категория населения в настоящий момент в Республике Тыва максимально вакцинирована) не выявлены случаи анти-HDV среди HBsAg-положительных лиц. Аналогичные результаты нами получены и при исследованиях, проведенных в Республике Саха (Якутия), где среди вакцинированного поколения также не обнаружены случаи инфицирования HDV.

В 2008 году было установлено полное отсутствие случаев выявления анти-HDV среди HBsAg-положительных лиц в группе детей от 0 до 9 лет [160]. В 2019 году в возрастной группе от 0 до 29 лет (именно эта категория населения в настоящий момент в Республике Тыва максимально вакцинирована) также не выявлены

антитела к HDV среди HBsAg-положительных лиц условно здорового населения региона. В то же время, наличие случаев HBsAg у детей в возрасте до года свидетельствует о неполной защите от инфицирования при вакцинации новорожденных. Можно предположить, что эти дети были рождены от матерей, инфицированных HBV в дородовом периоде, при этом инфицирование произошло в дородовой период, поскольку введение первой дозы вакцины в первые сутки после рождения в большинстве случаев защищает от постнатального инфицирования. Очевидно, значительный охват вакцинацией против гепатита В (составивший более 96%, начиная с 2004 года) позволил предотвратить возможность инфицирования HDV, несмотря на большое количество потенциальных источников инфекции в популяции. Для сравнения, если в 2000 году охват новорожденных вакцинацией против HBV составил 10,2%, то и процент выявления анти-HDV среди детей в возрасте 10-14 лет составил 1,5% от общего числа обследованных в данной группе, или 11,1% среди лиц, положительных по HBsAg.

В литературе мы встретили ограниченное число работ, представляющих данные по изучению распространения антител к HDV в различных возрастных группах условно здорового населения эндемичных регионов. В исследовании, проведенном в Камеруне [101], авторы показали, что среди детей в возрасте от 2-х до 17-ти лет частота выявления анти-HDV составила 50,5%. Однако, необходимо отметить, что в исследование вошли не только лица, имеющие HBsAg, но и пациенты без маркеров инфицирования HBV.

В работе по изучению распространенности маркеров инфицирования вирусами гепатита, проведенном также среди условно здорового населения юга Ирана (регион является эндемичным по гепатиту В и D), авторы показали, что частота выявления HBsAg составила 2,5%, а анти-HDV среди HBsAg-положительных – 5% [50]. Для оценки распространенности HDV у доноров крови в северной Германии определяли анти-HDV, которые были обнаружены у двух из 167 доноров (1,2%), еще у четырех доноров (2,4%) был сомнительный

результат. Однако авторы предполагают более высокую распространенность этой инфекции [165].

Для проведения серологических популяционных и диагностических исследований традиционно используются сыворотки крови пациентов. Однако, очевидно, что в Российской Федерации есть значительно удаленные регионы, где доставка клинического материала и своевременная лабораторная диагностика практически невозможны. Известно, что в организме больного хроническим гепатитом D одновременно циркулируют антитела к антигенам обоих возбудителей - анти-HDV, анти-HBc и HBsAg. Можно предположить, что анти-HDV, наряду с маркерами HBV, присутствуют и в образцах слюны и сухой капли крови СКК больных хроническим вирусным гепатитом D. Однако исследования по выявлению анти-HDV в таких образцах ранее не проводились. Очевидно, что биологический материал инфицированного человека (например, образцы слюны или СКК) могут служить объектом исследования как в серологических, так и в молекулярных тестах. Нами проведено исследования по выявлению маркеров инфицирования вирусами гепатитов HBV и HDV у пациентов Республики Тыва в биологических средах и СКК в сравнении с обнаружением этих же показателей в сыворотках крови, целью которого явилось определение возможности их применения для диагностики в труднодоступном регионе.

В последнее время образцы СКК используются для изучения распространенности HBV в эндемичных районах и в группах повышенного риска инфицирования [114, 206, 331]. Одна из задач нашего исследования заключалась в определении зависимости частоты выявления основных маркеров инфицирования вирусом гепатита В (HBsAg и анти-HBc) в парных архивных образцах слюны, СКК и сывороток крови в зависимости от длительности их хранения. Результаты выполненного исследования показали, что в образцах сывороток крови, хранившихся при температуре  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ , HBsAg выявляется в 100% случаев, независимо от сроков хранения (3 года).

Ранее J.C. Forbi и соавт. сообщали о низкой чувствительности обнаружения HBsAg в СКК по сравнению с образцами сывороток (78,6%) [114]. Нами не отмечена статистически значимая разница в частоте выявления HBsAg между парными образцами сывороток крови и СКК, хранившимися 1 год при комнатной температуре (100% против 94,9%). Данное наблюдение подтверждается исследованиями L.M. Villar с соавт., которые описывают применение ИФА для определения HBsAg в образцах СКК с чувствительностью 97,62% [331]. В нескольких исследованиях было показано, что образцы СКК остаются стабильными, без каких-либо изменений результатов выявления HBsAg до 63 дней после отбора проб при любых температурах хранения [224, 332]. Однако, как показали наши исследования, при длительном (до 3 лет) хранении образцов СКК происходит деградация HBsAg, на что указывает снижение частоты выявления этого маркера до 75%.

G. McAllister с соавт. проводили исследования по оценке выявления HBsAg и анти-HBc в образцах СКК в зависимости от температуры (-70 °С, -20 °С, 4 °С, 22-28 °С и 37 °С) и длительности хранения (200 дней). Было отмечено значительное снижение частоты обнаружения как HBsAg, так и анти-HBc уже через 14 дней хранения при положительных температурах во всех условиях хранения, за исключением образцов, хранящихся при положительных температурах. В то же время образцы, хранившиеся при -20 °С или -70 °С получили минимальные изменения в выявлении HBsAg и анти-HBc вплоть до конечной точки времени (200 дней) хранения [225]. Также Chee Eng Lee и соавт. показали хорошую корреляцию при определении HBsAg в сыворотке крови и свежих образцах СКК ( $r^2 = 0,432$ ;  $p < 0.001$ ) [75].

В нашем исследовании, несмотря на высокие показатели совпадения выявления HBsAg в парных образцах СКК и сыворотках крови, было показано отсутствие корреляционной зависимости между показателями коэффициента позитивности в парах образцов что, по всей вероятности, можно объяснить длительностью хранения этих образцов (1-3 года).

Чувствительность выявления анти-НВс в образцах СКК также зависит от длительности их хранения. Так, по данным L.M.Villar с соавт., уже к 63 дню наблюдения образцов, хранившихся при температуре 22-25 °С, происходит значительный рост оптической плотности до значений, соответствующих отрицательным результатам [331]. Нами впервые исследованы архивные образцы СКК, хранившиеся в течение года при комнатной температуре, на наличие анти-НВс. Полученные результаты продемонстрировали низкую стабильность данного маркера при длительном хранении образцов СКК, так как только в 19,7% образцов был получен положительный результат при частоте выявления 100% в парных образцах сывороток крови.

Ранее было показано, что метод элюции образцов СКК не оказывает влияния на результаты выявления маркеров гепатита В [332]. Таким образом, именно длительность хранения при комнатной температуре является причиной снижения клинической чувствительности выявления маркеров НВV в образцах СКК.

Для диагностики вирусного гепатита В обычно используют образцы сывороток крови, что требует венопункции, специального персонала и строгого соблюдения условий биологической безопасности. Как альтернатива могут использоваться образцы слюны, к сбору которых нет таких строгих требований [1, 76, 241, 268]. Постановка образцов слюны для выявления НВsAg в тест-системах ИФА обычно проводится без изменений относительно стандартного протокола для образцов сыворотки крови, эксперименты по увеличению периода инкубации не показали каких-либо преимуществ [136, 241]. В данной работе при исследовании образцов слюны методом ИФА на маркеры НВV и HDV нами также применялись стандартные протоколы, рекомендованные производителем тест-систем для тестирования образцов сыворотки крови.

По данным литературы, клиническая чувствительность выявления НВsAg методом ИФА в слюне серопозитивных пациентов варьирует от 93,6% до 100%, а специфичность - от 92,6% до 100% [77]. Нами также показано выявление НВsAg в 95,7% образцов слюны по сравнению с образцами сывороток крови этих пациентов



при температуре хранения  $-70^{\circ}\text{C}$  в течение года, что свидетельствует о возможности использования образцов слюны в качестве альтернативы образцам сывороток крови при тестировании на данный маркер. В этих же образцах частота выявления анти-НВс составила всего 13,04%, что значительно отличается от литературных данных - частота выявления этого маркера у серопозитивных лиц обычно составляет 96-100% [328]. Интересно, что у больных, коинфицированных НВВ/ВИЧ, наблюдается низкая частота выявления анти-НВс в образцах альтернативных типов [136].

Возможно, что отмеченная в нашем исследовании низкая частота выявления анти-НВс в образцах слюны у больных хроническим гепатитом В и D также связана именно с наличием двух вирусов в организме.

В отличие от маркеров НВВ, определение анти-НДВ в образцах СКК и слюны ранее не проводилось. Нами впервые описано отсутствие анти-НДВ в этих образцах, полученных от больных хроническим гепатитом В и D. В то же время, анти-НДВ в сыворотке крови присутствовали в 100% образцов, хранившихся 2-3 года при  $-70^{\circ}\text{C}$ . Отсутствие положительных случаев выявления анти-НДВ при успешном выявлении анти-НВс у части серопозитивных пациентов (13% в образцах слюны и 19,7% - в образцах СКК), возможно, обусловлено тем, что белок core вируса гепатита В является более сильным иммуногеном, приводящим к выработке анти-НВс в высокой концентрации. Известно, что после перенесенной инфекции эти антитела остаются пожизненно [300]. Вероятно, концентрация анти-НДВ значительно ниже, что объясняет отсутствие этих антител в слюне и СКК у больных НВВ и НДВ.

Таким образом, слюна и СКК могут служить альтернативным материалом для выявления НВsAg при скрининге и в научных сероэпидемиологических исследованиях. Определение анти-НВс в образцах этих типов у пациентов с хронической инфекцией В и D, на наш взгляд, является нецелесообразным ввиду высокой вероятности получения ложноотрицательных результатов. По той же причине серологическая диагностика гепатита D 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 HBV на эндемичных территориях, в случае выявления HBsAg в альтернативных материалах (слюна, СКК) маркеры инфицирования HDV следует определять в сыворотке крови.

Становится очевидным, что постоянная циркуляция HBV и проблемы в выполнении программ вакцинации создали серьёзные предпосылки для успешной реализации существования в популяции эндемичных регионов другого вируса – HDV. Недостаточный охват диагностикой и, как следствие, отсутствие данных о бремени HDV существенно затрудняют попытки борьбы с гепатитом D во многих странах мира, в том числе в России. Мы стремились восполнить этот пробел в регионе, который ранее был признан наиболее пострадавшим от HBV в Российской Федерации [7].

Одним из самых серьёзных результатов нашего исследования динамики распространённости серологических маркеров вирусных гепатитов В и D в группах условно здорового населения стали данные значительного увеличения выявления анти-HDV-положительных образцов среди HBsAg-положительных лиц в 2019 году по сравнению с когортой 2008 года (85,7% (12/14) против 27,4% (26/95). При этом, аналогично показателям выявления HBsAg (7,4%) наиболее высокий процент положительных результатов обнаружения анти-HDV отмечается в возрастной группе 50-59 лет. Такие данные о распространённости вирусов мы описали в популяции условно здорового населения, то есть людей, не знающих о своем инфекционном статусе.

Следующим этапом исследования стал анализ и описание состояния проблемы вирусного гепатита D среди пациентов с ко-инфекцией HBV и HDV, проживающих в эндемичных регионах Российской Федерации.

Анализ включал следующие данные: пол, возраст и стадию HDV-ассоциированного заболевания печени при постановке диагноза и наличие инфекции HDV среди членов семьи. Исследовали три когорты пациентов:

1. - 58, впервые обследованных больных хроническим вирусным гепатитом D, состоявших на учете в кабинете инфекциониста (г. Махачкала, Республика Дагестан) [10];
2. - пациенты из Республики Тыва, наблюдавшиеся в консультационном кабинете Инфекционной больницы города Кызыла. Их данные получены из медицинских карт базы данных 3246 пациентов (2020 год). Доля инфицированных HDV среди пациентов с HBV достигает 32,7%. Всего в анализ включены 514 пациентов с гепатитом D. Для 493 из них были доступны для тестирования архивные образцы сыворотки, собранные в 2008-2020 годах;
3. - кроме того, нам также были предоставлены для исследования 59 аттестованных образцов сывороток крови больных ХГД из Республики Саха (Якутия).

Далее было проанализировано генетическое разнообразие изолятов HDV из этих трех регионов, на основании которого нами установлено, что в Республике Тыва циркулирует только генотип HDV-1. Этот генотип распространен во всем мире и связан со случаями гепатита D в Европе, на Ближнем Востоке и в Центральной Азии [301].

Впервые в нашем исследовании также установлено, что в Республике Дагестан циркулирует генотип HDV-1, который распространен в большинстве регионов России, за исключением Якутии, где циркулируют два генотипа, HDV-1 и HDV-2. Нами отмечено, что соотношение циркулирующих изолятов HDV-1 и HDV-2 в этом регионе практически равно, что подтверждает стабильное их распространение, представленное в исследовании V. Ivaniushina и соавт. более 20 лет назад [157]. Очевидно, что увеличение в дальнейшем доступных для анализа изолятов вируса может внести корректировки в полученные результаты.

Патология печени, вызванная HBV / HDV, трудно излечима и, вследствие этого, любые попытки более детально исследовать проблему необходимы. Течение

хронической HBV-инфекции включает различные клинические фазы, каждая из которых потенциально длится годами. Четко определенные и верифицированные серологические и молекулярно-генетические маркеры, биохимия крови, биопсия печени позволяют оценить тяжесть заболевания и необходимость лечения [365].

Обнаружено, 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 [127, 128, 366].

Результаты, полученные в настоящем исследовании, позволили определить генотип HBV с помощью иммуноферментного анализа с панелью моноклональных антител (МАТ) у пациентов, инфицированных вирусами гепатита В и D. Для того, чтобы оценить возможность применения разработанного метода МАТ генотипирования HBV у больных, инфицированных вирусами гепатита В и D, валидировали данные теста МАТ при моноинфекции HBV с результатами, полученными при использовании молекулярных методов.

С помощью разработанного набора МАТ для группы образцов сывороток крови больных ХГВ с выделенной ДНК HBV получено 95% валидных результатов. При генотипировании образцов сывороток крови пациентов показана циркуляция генотипов А, D и С в Республике Саха (Якутия) и А, D - в Республике Тыва. Эти данные еще раз подтверждают географическое распределение генотипов на территории Российской Федерации, выявленное ранее. Так, С.С. Слепцова установила, что в популяции больных с хронической HBV-инфекцией в Республике Саха (Якутия) генотип D был обнаружен в 38% случаев, генотип А — в 24,1%, генотип С — в 24,1%, у 13,8% пациентов (4 человека) одновременно присутствовали два генотипа гепатита В [14].

Филогенетический анализ последовательностей HBV, выделенных от позитивных по ДНК HBV лиц, показал преобладание циркуляции генотипа D, 2 субтипов (ayw2, ayw3) на территории Республики Тыва – 96,9%. Генотип А ВГВ был определен в 3,1% случаев [7].

В настоящем исследовании показано 99% совпадение результатов определения генотипов HBV, полученное на охарактеризованной молекулярно-биологическими методами панели образцов, что гарантирует высокую вероятность получения верных результатов с помощью панели МАТ при исследовании HBsAg-положительных образцов сывороток крови пациентов с наличием/недетектируемым уровнем ДНК HBV.

Генотип HBV нередко трудно определить молекулярными методами у пациентов с гепатитом D, поскольку у значительной части таких пациентов вирусная нагрузка HBV очень низкая или даже не определяется из-за подавления репликации HBV [137], что также было подтверждено в экспериментах *in vitro* [25]. 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 А, D или С 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 данного теста нами установлено, что подавляющее большинство пациентов с гепатитом D на обследованных территориях (Республика Тыва и Республика Дагестан) Российской Федерации в популяции пациентов с сочетанным вирусным поражением печени (В и D) циркулируют два основных генотипа: А и D с абсолютным преобладанием генотипа D в каждом регионе (14,3% против 85,7%, соответственно). Такое распределение генотипов HBV совпадает с ранее сообщенной распространенностью генотипов у пациентов с моноинфекцией HBV в Республике Тыва и большинстве других регионов России [304,360]. Исключение на территории РФ составляет Республика Саха (Якутия), где определена циркуляция генотипов HBV-А и HBV-D в практически равных пропорциях (49,2 и 50,1%, соответственно).

Данные о взаимовлиянии генотипов HDV и HBV и роли генотипа HBV в патогенезе гепатита D пока ограничены. Генотип HBV-C, как сообщалось, был связан с неблагоприятными исходами гепатита D по сравнению с генотипом HBV-B [302], в то время как генотип HBV-A - с более низкой вирусной нагрузкой HDV по сравнению с генотипами HBV-D и HBV-F у пациентов с гепатитом D в Бразилии [184].

Нами установлено преобладание генотипов HBV-A и HBV-D в Республике Саха (Якутия), причем HBV-C выявляется только у моноинфицированных вирусом гепатита В пациентов, что в целом согласуется с полученными ранее данными [157]. Однако нами получены некоторые изменения в соотношении циркулирующих генотипов вируса HBV-A и HBV-D по сравнению с результатами 2008 года: в нашем исследовании доля HBV-A снизилась с 63% до 36%, а доля HBV-D обратно пропорционально увеличилась с 37% до 58%, соответственно.

Более того, генотипы HBV-A и HBV-D одинаково распространены у пациентов с инфекцией-HDV в регионе, без какого-либо конкретного предпочтения. 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.

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. На основании полученных нами данных, стало очевидным, что общий предок (прародитель) дельта-вируса имеет возраст около 6,5 тысяч лет. В это время произошло разделение на две ветви – это генотип 3, который циркулирует только в странах Латинской Америки и в настоящее время,

и генотипы 1,2, 4-8. На основании данного анализа нами доказано существование второй кланды HDV, сформированной генотипами 1,2,4-8, циркулирующими в различных регионах мира и определено историческое время распространения современных вариантов вируса.

Для исследуемых регионов Российской Федерации нами также проведена реконструкция истории распространения HDV. Филогенетический анализ показал, что циркуляция HDV-1 началась в Республике Тыва не ранее XIX века и имела две волны интродукции. Первая волна была связана с завозом вируса из Средней Азии в начале 19 века, а вторая обусловлена завозом в середине 20 века вируса из нескольких регионов Советского Союза. В свою очередь, варианты HDV-1 из Республики Тыва получили дальнейшее распространение по стране во второй половине XX века. Широкое распространение HDV в Тыве, по-видимому, связано с большим количеством инфицированных HBV людей, проживающих в этом эндемичном регионе. Результаты Байесовского анализа реконструкции совместного распространения HBV и HDV показали, что история циркуляции HBV в Республике Тыва насчитывает не менее тысячи лет, что подтверждается формированием на этой территории эндемичных геновариантов, преимущественно генотипа D. В результате длительного и широкого распространения HBV в регионе, приведшее к формированию региональных эпидемических вариантов HBV, послужило предпосылкой для широкого распространения HDV после его заноса на данную территорию.

В целом, оценки эволюции и эпидемиологической динамики HDV и HBV в Республике Тыва указывают 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-позитивных 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.

Регионом с совершенно уникальной картиной совместного распространения циркулирующих изолятов вируса гепатита D HDV-1 и HDV-2 является Республика Саха (Якутия). Нами установлено, что HDV начал распространяться здесь сравнительно недавно, не более 200 лет назад. HDV-1 неоднократно завозился в регион из стран Европы и Центральной Азии, а также из других регионов России, например, из Республики Тыва. Эти данные позволяют предположить, что Республика Саха (Якутия) была частью глобального эпидемического процесса HDV-1. При этом HDV-2 попал в Якутию только один раз, по-видимому, из Средней Азии, что привело к так называемому «эффекту основателя», то есть, все якутские последовательности HDV-2 образуют монофилетическую группу. Остается неясным, почему HDV-2 не распространился на соседние регионы РФ. Не исключено, что существенную роль в формировании автохтонного варианта вируса стала низкая плотность и относительно невысокая степень мобильности населения северо-восточных регионов РФ.

К сожалению, в доступных ресурсных системах не существует сохранившихся древних или хотя бы старых последовательностей HDV, потому что это РНК-содержащий вирус. Это важное ограничение всех реконструкций эволюционной истории HDV. Тем не менее, доступные последовательности HDV позволяют



реконструировать историю эволюции HDV за последние десятилетия с довольно небольшим 95% доверительным интервалом, что очень важно для понимания циркуляции вируса на фоне вакцинации против HBV. Таким образом, используя Байесовский анализ, F.S. Nogueira-Lima и соавт. продемонстрировали снижение величины популяции HDV-3 в Южной Америке после введения вакцинации против HBV и скрининга доноров [242].

Полученные нами данные филодинамического анализа ещё раз подтверждают, что текущие меры профилактики HBV, такие как вакцинация новорожденных против HBV и скрининг доноров, будучи достаточно эффективными для предотвращения новых случаев инфицирования HBV, недостаточны для борьбы с эпидемией HDV в эндемичных регионах. Взятые вместе, эти данные указывают на необходимость строгого контроля качества проводимой вакцинации против гепатита В, своевременного охвата всеми дозами вакцины, а также реализации программы широкомасштабного скрининга на наличие HBV и HDV среди населения неблагополучных по гепатиту В регионов.

В ходе выполнения наших исследований с помощью филодинамического анализа изолятов, выделенных от больных, впервые реконструирована история заноса HDV на территорию Республики Дагестан, которая, наряду с Республиками Тыва и Саха (Якутия), явилась резервуаром для сохранения и дальнейшего распространения вируса по территории Российской Федерации и сопредельных территорий около 110 лет назад.

Ключевым вопросом применения того или иного филогенетического метода является истинность эволюционных отношений между анализируемыми нуклеотидными последовательностями. Основным критерием молекулярной эпидемиологии является статистически достоверная филогенетическая связь между исследуемыми генетическими последовательностями. 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 [9]. 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, механизма формирования семейных очагов HDV в эндемичном регионе не вызывает сомнения. Однако, нужно отметить, что не существует какого-то определенного метода филогенетического анализа, превосходящего все другие методы [9].

Значительную роль в получении достоверных данных играют не только применяемые методы, но и параметры исследования, задаваемые при данной работе (определенные фрагменты вирусного генома или полногеномные последовательности). 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-инфекции 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 [299]. В основном, горизонтальная

передача HDV зарегистрирована у детей в эндемичных странах [113]. 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 случаев групповой внутрисемейной заболеваемости в эндемичных регионах Российской Федерации различаются и определяются значительным спектром возможных путей передачи HDV и источников инфицирования.

Проблема распространения HDV среди больных хроническим вирусным гепатитом В осложняется отсутствием эффективной терапии хронического гепатита D. Единственная доступная в настоящее время терапия гепатита D основана на использовании высоких доз пегилированного интерферона-альфа, что связано с низкой частотой ответа и редким вирусным клиренсом [323]. Новый ингибитор проникновения булевиртид одобрен в России с конца 2019 г. [269], но его доступность пока ограничена.

Следовательно, крайне необходимы эффективные и доступные стратегии противовирусного лечения. В отсутствие эффективной терапии и специфической вакцины против HDV единственным вариантом профилактики в настоящее время является программа скрининга в сочетании с кампанией по распространению знаний, направленной на повышение осведомленности о HDV среди людей, живущих с HBV.

Результаты многоцентрового кросс-секционного исследования клинических и вирусологических особенностей HDV, проведённого Международной сетью по борьбе с этим заболеванием (Hepatitis Delta International Network, HDIN) на самой большой на сегодняшний день выборке пациентов (более 1500 человек из 19 центров в 15 странах, расположенных на 4 континентах), подтвердили особую

значимость болезни и подчеркнули выраженную гетерогенность особенностей течения HDV-инфекции в различных регионах мира [347]. В исследовательский протокол не вошли пациенты из Российской Федерации.

К настоящему времени описано 8 генотипов HDV [154], которые, возможно, связаны с различным клиническим течением данной инфекции. Самый распространённый из них – генотип 1, ответственный за большинство случаев хронического вирусного гепатита D в Европе, Северной Америке и Азии, ассоциирован с наиболее тяжёлым поражением печени [302, 115, 226].

A.Wranke и соавт. на основании анализа различий клинических проявлений ХВГ D у пациентов из Европы и Азии, инфицированных в основном генотипом HDV-1, предположили, что генетические или экологические факторы возможно способствуют различным исходам заболевания [347].

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 дальнейшей оценки влияния вируса и факторов хозяина на прогрессирование и исходы хронического HDV.

Для проведения данного анализа в течении длительного (более 10 лет наблюдения) были определены три группы пациентов из регистра Инфекционной больницы города Кызыла (Республика Тыва), как было описано выше. Особую озабоченность вызывает поздняя постановка диагноза у пациентов после инфицирования HDV. Так, 37,5% пациентов с гепатитом D уже имели ЦП при первичном обращении за медицинской помощью, а у 77% - ЦП в продвинутой стадии (B и C по степени Child-Pugh).

Позднее обращение за медицинской помощью относится к предикторам неблагоприятного исхода HDV. Так, W.S.M. Braga с соавт. показали, что больные с HDV-инфекцией в Южной Америке часто имели далеко зашедшие стадии заболевания печени уже при первом обращении за медицинской помощью [51].

Кроме того, следует подчеркнуть относительно молодой возраст пациентов из Республики Тыва (45 лет), у которых развился HDV-ассоциированный ЦП. Этот

факт ещё раз свидетельствует о том, что инфицированию HDV в рассматриваемом эндемичном регионе в основном подвержены лица, не прошедшие курс вакцинации от гепатита В, начатой здесь ещё в 1997 году [160].

К сожалению, в подавляющем большинстве случаев отсчет от даты инфицирования HBV и HDV у наших пациентов был неизвестен, следовательно, невозможно адекватно оценить скорость прогрессирования хронической инфекции HDV до ЦП. В тоже время нельзя исключить влияние злоупотребления алкоголем в гепатотоксических дозах на прогрессирование заболевания хронического гепатита D в цирроз печени [207]. Социальные исследования, проведенные ранее в Республике Тыва, показали, что до 60% взрослого населения в этом регионе страдают от злоупотребления алкоголем [185].

Известно, что HBV и вирус гепатита С (HCV) выступают основными факторами ГЦК. HDV также рассматривается как причина возникновения рака печени, при этом механизм его развития реализуется через индукцию воспаления и прогрессию до ЦП [186]. В нашем исследовании развитие тяжелого фиброза / ЦП у наблюдаемых пациентов происходило в среднем за  $3,65 \pm 2,3$  года, а летальный исход наступал через  $4,5 \pm 3,0$  года после включения в исследование. Такая быстрая прогрессия до летального исхода, по-видимому, является причиной низкой частоты ГЦК (6,6%; 4 случая среди 61 участника), но быстрой декомпенсацией ЦП в данной когорте. Частота развития ЦП и декомпенсации функции печени среди исследуемых составила 50,4% (61/121 – 1-я группа), что соответствует наблюдениям, проведённым в других регионах мира, где циркулирует генотип 1 HDV [33, 78, 93, 94, 126, 213,].

В то же время, результаты ретроспективного наблюдения 188 итальянских пациентов с ХГД, выполненного G.A. Niro с соавт., продемонстрировали невысокую частоту декомпенсации цирроза (33% за 10 лет наблюдения) и более высокую частоту возникновения ГЦК (13%) [233].

Известно, что у больных с моноинфекцией HBV развитие ГЦК в 70–90% случаев происходит на стадии ЦП. В масштабном проспективном когортном

исследовании с участием 3653 HBV-инфицированных пациентов, проживающих в Тайване, показано, что высокая концентрация ДНК HBV ( $\geq 5$  lg копий/мл) в сыворотке является независимым фактором риска ГЦК [72].

При коинфекции HDV и HBV часто происходит подавление репликации последнего, поэтому в крови у имеющих вирус гепатита D могут быть очень низкие (вплоть до недетектируемых) уровни ДНК HBV [30]. В нашем исследовании проведён качественный анализ ДНК HBV в сравниваемых группах и не выявлено достоверных различий в частоте положительных результатов среди лиц с прогрессирующей формой заболевания и пациентов с непровиссирующим HDV. Однако необходимо отметить, что у больных медленно прогрессирующим ЦП достоверно чаще отсутствовали детектируемые уровни ДНК HBV.

По данным наблюдений HDIN повышение активности АЛТ (свыше 3 норм), указывающее на высокую биохимическую активность заболевания, зарегистрировано лишь у незначительного числа участников. При этом пациенты из стран Восточной Европы имеют более высокий уровень цитолиза (значения активности АСТ и АЛТ, указывающие на повышенный воспалительный статус) [347]. В настоящее время причины этого феномена не ясны, однако предположительно могут иметь значение факторы окружающей среды и одновременное злоупотребление наркотическими препаратами или алкоголем; не исключается также роль генетических механизмов.

В нашей работе высокие значения активности АЛТ (свыше 3 норм) зарегистрированы в группах пациентов с прогрессированием заболевания и при медленно прогрессирующем ЦП. В отличие от АЛТ, уровни АСТ в группе с прогрессирующей формой заболевания были выше, чем у пациентов с непровиссирующим заболеванием.

S. Wu с соавт. отмечали, что уровни АСТ значимо выше у HDV-позитивных лиц по сравнению с инфицированными только HBV ( $p < 0,05$ ) [358]. В тоже время у жителей Китая с наличием HDV-инфекции активность АЛТ составляла  $1485,65 \pm$

935,53 МЕ/л, АСТ -  $977,56 \pm 939,71$ , что значительно превышало полученные показатели среди пациентов Республики Тыва.

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 [30]. 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.

По данным литературы, виремия HDV выступает основным независимым предиктором прогрессирования хронического гепатита D, печеночной декомпенсации и смерти [176, 262].

При проведении многофакторного анализа вирусологических параметров, оказывающих влияние на формирование различных исходов хронического гепатита D, мы показали, что стабильно детектируемая виремия HDV, как единственный параметр с абсолютно статистически достоверным вкладом, а также наличие высоких уровней HBsAg (более 3,5 lg МЕ/мл), достоверно определяет неблагоприятный исход заболевания с формированием цирроза печени у пациентов. Вклад HBsAg в развитие и прогрессирование заболевания гепатитом D был представлен ранее Н.И. Yang с соавторами [371]. В данном исследовании авторы показали, что относительный риск развития гепатоцеллюлярной карциномы среди пациентов с положительным результатом на HBsAg по сравнению с пациентами с отрицательным результатом был значительно выше.

Печеночная энцефалопатия (ПЭ) относится к распространённым осложнениям ЦП; от 10 до 14% пациентов имеют явную энцефалопатию на момент первичной диагностики заболевания печени, а при декомпенсированном ЦП

распространённость явной ПЭ составляет 20–30% [95, 378]. К сожалению, до настоящего времени не существует «золотого стандарта» диагностики этого состояния. Вместе с тем имеется ряд отдельных методик для оценки различных аспектов функционирования ЦНС, которые могут использоваться как по отдельности, так и в комбинации [53, 227, 228]. Доступные рекомендации в определённой степени носят ограниченный характер и отличают тестирование в клинических и исследовательских целях [333].

Полученные результаты убедительно демонстрируют целесообразность использования ТСЧ для оценки клинического статуса. Статистически значимые различия в скорости его выполнения конкретным пациентом при динамическом наблюдении свидетельствует о прогрессии заболевания, нарастании выраженности ПЭ, что может быть использовано в качестве показателя неблагоприятного течения процесса.

Таким образом, полученные нами в относительно однородной когорте пациентов результаты показали, что возраст и пол не являются факторами, влияющими на прогрессирование ХВГ D в ЦП, а выявленные различия клинико-биохимических показателей отражают степень функционального поражения печени при HDV-ассоциированных ХВГ и ЦП.

Дальнейшие исследования, направленные на изучение роли вирусной нагрузки HDV, а также влияющих на прогрессирование HDV-инфекции генетических характеристик вируса и макроорганизма, позволят с большей точностью расшифровать механизмы патогенеза этого заболевания.

В наблюдавшейся нами когорте наиболее частой причиной смерти являлся цирроз печени, но не ГЦК. Считается, что HDV-инфекция увеличивает риск развития ГЦК по сравнению с моноинфекцией HBV, в первую очередь, за счет окислительного стресса в результате тяжелого воспаления [30]. Однако эпидемиологические данные свидетельствуют о том, что наиболее частым клиническим исходом HDV-инфекции является печеночная декомпенсация, а не развитие ГЦК [24]. Наблюдения в германской когорте пациентов с гепатитом D



продемонстрировали высокую частоту формирования ГЦК (16%, средний период наблюдения 3 года). Однако ГЦК у пациентов в этой когорте было вторичными по отношению к ЦП [43]. Эти данные согласуются с результатами, полученными нами в тывинской когорте, где только у 2 пациентов из 14 (14,3%) развилась ГЦК. В то же время некоторые исследования подтверждают, что коинфекция HBV/HDV приводит к увеличению в 2 раза смертности и в 3 раза риска развития ГЦК по сравнению с моноинфицированными HBV пациентами [109, 116, 162]. Таким образом, роль HDV в индукции и развитии ГЦК остается спорной и должна быть дополнительно изучена.

Коинфекция HDV может вызывать подавление репликации HBV до неопределяемых значений [151]. Наши результаты подтверждают это наблюдение – уровни ДНК HBV при чувствительности детекции 50 копий/мл не определялись у большинства пациентов с летальным исходом, что предполагает ингибирующий эффект HDV на репликацию HBV, сохраняющийся и на терминальной стадии инфекции. Патогенез многих инфекций, в том числе HBV и HDV, могут определяться генотипом вируса [79]. Выявленный в нашем исследовании у всех пациентов генотип HDV-1 считается, наряду с генотипом HDV-3, наиболее патогенным и связанным с быстрым прогрессированием заболевания [229]. Однако, в тывинской когорте пациентов, в том числе и с летальным исходом HDV-инфекции, был обнаружен только генотип D, что не позволяет определить влияние разных генотипов HBV на исходы HDV-инфекции.

Интересным фактом представляется отсутствие у наблюдавшихся в нашем исследовании пациентов с летальным исходом гепатита D значительного повышения показателей функционального состояния печени. Так, уровни АЛТ и АСТ превышали в ВГН менее чем в 2 раза, а уровни ГГТП, ЩФ и общего билирубина – не более чем в 3 раза. Результаты наблюдения китайских учёных показывают, что коинфекция HBV/HDV связана с выявлением более высоких уровней АЛТ и АСТ по сравнению моноинфицированными HBV пациентами [358]. Вероятно, невысокую активность воспалительного процесса в печени у

наблюдавшихся нами пациентов можно объяснить сформировавшимся на момент включения в исследование ЦП и, соответственно, сравнительно небольшим числом функционирующих гепатоцитов.

Очевидно, что позднее обращение в лечебное учреждение больных гепатитом дельта – негативный фактор, влияющий на летальность при данной инфекции. В настоящем исследовании из 14 пациентов с летальным исходом 5 (36%) скончались в тот же или на следующий год после первого визита. Это свидетельствует, с одной стороны, о недостаточном уровне охвата больных ранней диагностикой и, с другой, о быстром прогрессировании заболевания, приводящем к летальному исходу.

Терапия хронического гепатита D по-прежнему затруднена из-за отсутствия эффективных лекарств. Интерферон-альфа в настоящее время служит единственной доступной лицензированной терапией [155]. Наиболее часто используемым препаратом является пегилированный интерферон, но только около 25% пациентов сохраняют устойчивый вирусологический ответ после 1 года лечения [368]. При этом уровни трансаминаз нормализуются у 40–70% пролеченных пациентов, а рецидивы возникают у 60–97% [156]. Более того, опыт интерферонотерапии гепатита D в когорте пациентов, проживающих на территории Республики Тыва (этнические тувинцы), показал неэффективность схем лечения с применением интерферонов [159]. Таким образом, высокая степень летальности гепатита дельта, наряду с объективными патогенетическими факторами, объясняется поздней диагностикой и отсутствием доступной терапии.

## **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. Однако, применение методологических и аналитических возможностей вирусологии и эпидемиологии способствует развитию понимания закономерностей циркуляции HDV.

Проведенные нами сероэпидемиологические исследования и полученные результаты продемонстрировали значительное снижение и даже прекращение циркуляции HDV среди поколений, охваченных вакцинацией против гепатита В 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. Результаты проведенного нами динамического когортного наблюдения демонстрируют, что хроническая инфекция, вызванная HDV имеет три различные формы течения – быстрое прогрессирование в цирроз печени с частым летальным исходом; непрогрессирующий в цирроз печени хронический гепатит и непрогрессирующий цирроз класса А по Child-Pugh.

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 В 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, по-видимому, 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.

Полученные в ходе исследования данные позволяют сформулировать меры по разработке системы контроля за гепатитом дельта в Российской Федерации:

1. внедрение системы контроля качества проведения вакцинации против гепатита В населения Российской Федерации;

2. обязательная разработка и внедрение скрининговых программ для выявления маркёров инфицирования HBV и HDV и постоянного мониторинга их динамики для населения эндемичных регионов Российской Федерации;
3. обязательная разработка и внедрение скрининговых программ выявления маркёров инфицирования HBV и HDV и вакцинации против гепатита В среди семейного окружения пациентов с гепатитом D для предотвращения внутрисемейной передачи вируса;
4. внедрение обязательного определения анти-HDV для всех HBsAg-положительных пациентов во всех регионах Российской Федерации;
5. проведение ежегодного мониторинга виремии HDV и концентрации HBsAg у пациентов, инфицированных вирусом гепатита D;
6. введение обязательной регистрации вирусного гепатита D как отдельной нозоформы и ее учет в статистике Роспотребнадзора (включения острого и хронического гепатита D в Перечень инфекционных и паразитарных болезней и других состояний, подлежащих регистрации и учету);
7. создание и поддержание базы данных вариантов HDV, циркулирующих на территории Российской Федерации.

## 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-А 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-НВs в группах вакцинированных, сформированных методом случайной выборки.

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

Рекомендовать тестирование альтернативных образцов (слюна и сухая капля крови) для выявления НВsAg при скрининге и в научных сероэпидемиологических исследованиях в случаях, когда тестирование этого маркера в сыворотке крови недоступно. Не рекомендуется в клинической практике определение анти-НВс и анти-НDV 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 НВV в иммуноферментном анализе (ИФА) с серотип-специфичными моноклональными антителами для определения генотипа НВV у пациентов с гепатитом дельта.

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

Рекомендовать мониторинг виремии НDV, уровней НВsAg и АСТ для оценки рисков исхода хронического гепатита дельта и выбора тактики ведения и лечения пациентов, инфицированных НDV.

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 дельта, возможно будет получить приоритетные данные о микроэволюции HDV на протяжении многолетней хронической инфекции, определить скорость накопления замен в разных участках вирусного генома и выявить изменения, связанные с ускользанием вируса от иммунного ответа.

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АЛТ – аланинаминотрансфераза

АСТ – аспаргатаминотрансфераза

Анти-НВsAg – антитела к поверхностному антигену вируса гепатита В

Анти-НDV – антитела к вирусу гепатита дельта

ВГН – верхняя граница нормы

ВИЧ - вирус иммунодефицита человека

ВОЗ - Всемирная организация здравоохранения

ГГТП – гаммаглутамилтранспептидаза

ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА - иммуноферментный анализ

кзкДНК – ковалентно-замкнутая кольцевая ДНК

МЕ/л - Международные единицы измерения на литр

ОРС – открытая рамка считывания

ОТ – обратной транскрипция

ОТ-ПЦР - обратная транскрипция - полимеразная цепная реакция

п.о. – пара оснований ДНК

ПВТ – противовирусная терапия

ПН – печеночная недостаточность

ПЦР - полимеразная цепная реакция

РНК – рибонуклеиновая кислота

УВО – устойчивый вирусологический ответ

ХГ - хронический гепатит

ХГD – хронический гепатит дельта

ХГВ - хронический гепатит В

ЦП - цирроз печени

ЩФ – щелочная фосфатаза

Bootstrap value – оценка бутстреп-анализа

CDC – Centers for Disease Control and Prevention (Центр по контролю и профилактике заболеваний в США)

FDA – Food and Drug Administration (Управление по контролю за продуктами и лекарствами США)

HBV – вирус гепатита В

HDV – вирус гепатита дельта

HBcAg – капсидный антиген вируса гепатита В

HBеAg - антиген е вируса гепатита В

HBsAg - поверхностный антиген вируса гепатита В

ML – Maximum Likelihood, метод максимального правдоподобия

NCBI – National Center for Biotechnology Information

NJ – Neighbour joining, метод присоединения соседей

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Асратян А.А. Маркёры вирусных гепатитов в образцах слюны больных острыми гепатитами А, В and С / А.А. Асратян, И.П. Павлова, А.Р. Рейзис и др. // Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии. – 1997. – Т. 6. – С. 43–47.
2. Богомолов П.О. Эффективность и безопасность булевиртида в лечении хронического гепатита D: результаты рандомизированных контролируемых исследований / П.О. Богомолов, В.Т. Ивашкин, А.О. Буеверов с соавт. // Инфекционные болезни. – 2020. – Т. 18. – С. 153–62.
3. Дмитриева Т.Г. Изучение напряженности поствакцинального иммунитета против гепатита В у детей и подростков республики Саха (Якутия) / Т.Г. Дмитриева, А.О. Острелина // Детская медицина Северо-Запада. – 2018. – Т. 7. – №1. – 106 с.
4. 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.
5. Исаева О.В. 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. Сырыглар, М.И. Михайлов // Ж. Терапия. 2021. - Т.7 - №4(46). - С.48-56
6. Кожанова Т.В. 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.
7. Кожанова Т.В. Первичная лекарственная резистентность вируса гепатита В к аналогам нуклеоз(т)идов у ВГВ-инфицированных пациентов / Т.В. Кожанова, О.В.

- Исаева, В.В. Клущкина и др // Дальневосточный журнал инфекционной патологии. – 2011. – №18(18). – С. 41–47.
- 8.** Левитан Б. Н. Дельта-гепатит / Б.Н. Левитан, А.В. Дедов // Астрахан. гос. мед. акад. – Астрахань: Астрахан. гос. мед. акад. – 2001. – 99 с.
  - 9.** Лукашов В.В. Молекулярная эволюция максимального правдоподобия и филогенетический анализ / В.В. Лукашов – М.: БИНОМ. – 2009.
  - 10.** Магомедова С.А. Проблема вирусных гепатитов В и D в республике Дагестан / С.А. Магомедова // Материалы конференции: «Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания» 30 октября - 02 ноября 2018 г. Сочи.
  - 11.** Методические рекомендации МЗ РФ : «Хронический вирусный гепатит D (ХВГD) у взрослых», Москва, 2021.
  - 12.** Онищенко Г.Г. «О дополнительной иммунизации населения Российской Федерации» / Г.Г. Онищенко // Федеральная служба по надзору в России (Роспотребнадзор); М.: Россия, 2005. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации № 25.
  - 13.** О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2018 году: Государственный доклад. – М.: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – 2019. – 254 с. – ISBN 978–5–7508–1681–1.
  - 14.** Слепцова С.С. Роль генотипов вирусов гепатитов В, С и D в развитии первичного рака печени / С.С. Слепцова // ВИЧ-инфекция и иммуносупрессии. – 2012. – Т.4. – № 4. – С. 67-73.
  - 15.** Яшина Т. Л. Распространение маркеров гепатита В и дельта среди населения регионов, контрастных по уровню заболеваемости / Т.Л. Яшина, М.О. Фаворов, И.В. Шахгильдян и др. // Вопросы вирусологии. – 1992. – № 4. – С. 194–196.
  - 16.** Abe K. Molecular epidemiology of hepatitis B, C, D and E viruses among children in Moscow, Russia / K. Abe , E. Hayakawa , A. V. Sminov , A.L. Rossina , X. Ding, T.T. Huy , T. Sata , V.F. Uchaikin // J. Clin Virol. – 2004, May. – Vol. 30(1). – P. 57–61.

- 17.** Alfaiate D. Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options / D. Alfaiate, P. Dény, D. Durantel // *Antiviral Res.* – 2015, Oct. – Vol. 122. – P. 112-29. – doi: 10.1016/j.antiviral.2015.08.009. Epub 2015 Aug 11. PMID: 26275800.
- 18.** Abou-Jaoude G. Myristoylation signal transfer from the large to the middle or the small HBV envelope protein leads to a loss of HDV particles infectivity / G. Abou-Jaoude, S. Molina, P. Maurel, C. Sureau // *Virology.* – 2007. – Vol. 365. – P. 204–09.
- 19.** Alexander J. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis / J. Alexander Stockdale, Kreuels Benno, Y.R. Marc Henrion, et al. // *Journal of Hepatology.* – 2020. – vol. 73 j. – P. 523–532.
- 20.** Amini N. Prevalence of hepatitis d in the eastern mediterranean region: systematic review and meta analysis / N. Amini, S.M. Alavian, A. Kabir, S.H. Aalaei-Andabili, S.Y. Saiedi Hosseini, M. Rizzetto // *Hepat Mon.* – 2013. – Jan.,13(1). – doi: 10.5812/hepatmon.8210.
- 21.** APASL 2019: DELTA HEPATITIS 27-28 июня, г.Баку.
- 22.** Alvarado-Mora MV. Dynamics of hepatitis D (delta) virus genotype 3 in the Amazon region of South America / M.V. Alvarado-Mora, C.M. Romano, M.S. Gomes-Gouvêa, M.F. Gutierrez, F.J. Carrilho, J.R.R. Pinho // *Infect Genet Evol.* [Internet]. – 2011. – Vol. 11. – P. 1462–8.
- 23.** Asratian A.A. Viral hepatitis markers in saliva specimens from patients with acute hepatitis A, B and C / A.A. Asratian, I.P. Pavlova, A.R. Reñizis, et al // *Zhurnal Mikrobiologii, Epidemiologii, I Immunobiologi.* – 1997. – Vol. 6. – P. 43–47. (in Russian)
- 24.** Abbas Z. Hepatitis D and hepatocellular carcinoma / Z. Abbas, M. Abbas, S. Abbas et al // *World J Hepatol.* – 2015. – Vol. 7. – P. 777–86.



- 25.** Alfaiate, D. HDV RNA replication is associated with HBV repression and interferon-stimulated genes induction in super-infected hepatocytes / D. Alfaiate, J. Lucifora, N. Abeywickrama-Samarakoon, M. Michelet, B. Testoni, J.C. Cortay, C. Sureau, F. Zoulim, P. Deny, D. Durantel // *Antivir. Res.* – 2016. – Vol. 136. – P. 19–31.
- 26.** Abbas Z. Co- treatment with pegylated interferon alfa-2aand entecavir for hepatitis D: a randomized trial / Z. Abbas , M. Memon, M. Umer , et al // *World J Hepatol.* – 2016. – Vol.8. – P. 625-631.
- 27.** Abbas Z. Interferon lambda-3 polymorphism and response to pegylated interferon in patients with hepatitis D / Z. Abbas, J. Yakoob, M.A. Umer, M. Abbas, S. Hamid // *Antivir Ther.* – 2015. – Vol. 20(5). – P. 529-33.
- 28.** Alexeeva M.N. Viral hepatitis in Sakha Republic (Yakutia) / M.N Alexeeva, L.E. Grinenko, M.A. Rafailova // *Russian Journal of Gastroenterology Hepatology and Coloproctacology.* – 1998. – Vol. 5. – P. 156–159 [in Russian].
- 29.** Alfaiate D. HDV RNA replication is associated with HBV repression and interferon-stimulated genes induction in super-infected hepatocytes /D. Alfaiate, J. Lucifora, N. Abeywickrama-Samarakoon, M. Michelet, B. Testoni, J.C. Cortay, C. Sureau, F. Zoulim, P. Dény, D. Durantel // *Antiviral Res.* – 2016, Dec. – Vol. 136. – P. 19-31. – doi: 10.1016/j.antiviral.2016.10.006.
- 30.** Abbaz Z. Hepatocellular carcinoma in hepatitis delta: Does it differ from hepatitis B monoinfection / Z. Abbaz, M. Qureshi, S. Hamid et al // *Saudi J.Gastroenterol.* – 2012. –Vol. 18. – P. 18–22.
- 31.** Abbas Z. Hepatocellular carcinoma in hepatitis D: does it differ from hepatitis B monoinfection / Z. Abbas, M. Qureshi, S. Hamid, W. Jafri // *Saudi J Gastroenterol.* – 2012. – Vol. 18. – P. 18–22. – doi: 10.4103/1319-3767.91731.
- 32.** Abbas Z. Hepatitis D and hepatocellular carcinoma / Z. Abbas, M. Abbas, S. Abbas, L. Shazi // *World J Hepatol.* – 2015. – Vol. 7(5). – P. 777–86. – doi: 10.4254/wjh.v7.i5.777.

- 33.** Buti M. Clinical outcome of acute and chronic hepatitis delta over time: a long-term follow-up study / M. Buti, M. Homs, F. Rodriguez-Frias, G. Funalleras, R. Jardí, S. Sauleda, D. Taberner, M. Schaper, R. Esteban // *J Viral Hepat.* – 2011, Jun. – Vol. 18(6). – P. 434–42. – doi: 10.1111/j.1365-2893.2010.01324.x. PMID: 20546496.
- 34.** Botelho-Souza LF. Hepatitis delta: virological and clinical aspects / L.F. Botelho-Souza, M.P.A. Vasconcelos, A.O. Dos Santos, J.M.V. Salcedo, D.S. Vieira // *Virol J.* – 2017, Sep 13. – Vol. 14(1). – 177 p. – doi: 10.1186/s12985-017-0845-y. PMID: 28903779; PMCID: PMC5597996.
- 35.** Bonino F. Delta hepatitis agent: structural and antigenic properties of the delta-associated particle / F. Bonino, B. Hoyer, J.W. Shih et al // *Infect Immun.* – 1984. – Vol. 43. – P.1000– 5.
- 36.** Beard MR. Identification and characterization of a hepatitis delta virus RNA transcriptional promoter / M.R. Beard, T.B. Macnaughton, E.J. Gowans // *J Virol.* – 1996. – Vol. 70. – P. 4986– 95.
- 37.** Butler EK. High prevalence of hepatitis delta virus in Cameroon / E.K. Butler, M.A. Rodgers, K.E. Coller, D. Barnaby, E. Krilich, A. Olivo, M. Cassidy, D. Mbanya, L. Kaptue, N. Ndembi, G. Cloherty // *Sci Rep.* – 2018, Aug, 2. – Vol. 8(1). – 11617 p. – doi: 10.1038/s41598-018-30078-5. PMID: 30072752; PMCID: PMC6072717.
- 38.** Brian J. McMahon. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B / J. McMahon Brian // *Hepatology International.* – 2009. – Vol.3(2). – P. 334–342.
- 39.** Bezuglova L.V. Determination of the genotype of hepatitis B virus and the HBsAg subtype by enzyme immunoassay / L.V. Bezuglova, Ya.D. Mosina, V.A. Poryvaeva, I.G. Netesova // *Sbornik trudov VIII Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii "Molekulyarnaya diagnostika-2014" s mezhdunarodnym uchastiyem, Moscow.* – 2014. – Vol. 1. – P.124–125. (in Russian).
- 40.** Brazas R. A Cellular Homolog of Hepatitis Delta Antigen: Implications for Viral Replication and Evolution / R. Brazas, D. Ganem // *Science.* – 1996. – Vol. 274. – P. 90–4.

41. Bergner LM. Diversification of mammalian deltaviruses by host shifting / Bergner LM, Orton RJ, Broos A, Tello C, Becker DJ, Carrera JE, Patel AH, Biek R, Streicker DG // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2021, Jan 19. – Vol. 118(3). – doi:10.1073/pnas.2019907118.
42. Braga WS. Chronic HDV/HBV co-infection: predictors of disease stage—a case series of HDV-3 patients / W.S. Braga, C.M. de Oliveira, de AJ. et al // *J Hepatol*. – 2014. – Vol. 61. – P. 1205–11.
43. Bockmann JH. High rates of cirrhosis and severe clinical events in patients with HBV/HDV co-infection: longitudinal analysis of a German cohort / J.H. Bockmann, M. Grube, V. Hamed et al // *BMC Gastroenterol*. – 2020. – Vol. 20(1). – 24 p. Published 2020 Jan 30. – doi:10.1186/s12876-020-1168-9.
44. Blank A. Drug-drug interaction potential of the HBV and HDV entry inhibitor myrcludex B assessed in vitro / A. Blank, K. Meier, S. Urban et al // *Antivir Ther*. – 2018. – Vol. 23. – P. 267-75.
45. Bogomolov P. Treatment of chronic hepatitis D with the entry inhibitor myrcludex B: first results of a phase Ib/IIa study / P. Bogomolov, A. Alexandrov, N.Voronkova et al // *J Hepatol*. – 2016. – Vol. 65. – P. 490-498.
46. Bogomolov P.O. et al. Clinical study report, groups A-D (MYR203) / P.O. Bogomolov et al // Final version 1.0. – 11.09.2019.
47. Berndt, N. Targeting protein prenylation for cancer therapy / N. Berndt, A.D. Hamilton, S.M. Sebti // *Nat. Rev. Cancer*. – 2011. – Vol.11. – P. 775–791.
48. Botelho-Souza LF. Hepatitis delta: virological and clinical aspects / L.F. Botelho-Souza, M.P.A. Vasconcelos, A.O. Dos Santos, J.M.V. Salcedo, D.S. Vieira // *Virology*. – 2017, Sep, 13. – Vol. 14(1). – 177 p. – doi: 10.1186/s12985-017-0845-y. – PMID: 28903779; PMCID: PMC5597996.
49. Bulletin of the Russian Statistics Agency, M.:Russia. – 2019. Available online: [http://www.gks.ru/free\\_doc/new\\_site/population/demo/Popul2019.xls](http://www.gks.ru/free_doc/new_site/population/demo/Popul2019.xls) (accessed on 26 November 2020).

- 50.** Behzadi MA. Seroprevalence of viral hepatitis A, B, C, D and E viruses in the Hormozgan province southern Iran /M.A. Behzadi, V.H. Leyva-Grado, M. Namayandeh et al // *BMC Infect Dis.* – 2019, Dec, 3. – Vol.19(1). – 1027 p.
- 51.** Braga WSM. Chronic HDV/HBV co-infection: Predictors of disease stage - a case series of HDV-3 patients /W.S.M. Braga, C.M.C. de Oliveira, J.R. de Araujo et al // *Journal of Hepatology.* – 2014. – Vol. 61(6). – P. 1205-11.
- 52.** Brechot C. Pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma: old and new paradigms/C. Brechot // *Gastroenterology.* – 2004. – 127. – S. 56-61.
- 53.** Bajaj J.S. The design of clinical trials in hepatic encephalopathy — an International Society for Hepatic Encephalopathy and Nitrogen Metabolism (ISHEN) consensus statement / J.S. Bajaj, J. Córdoba, K.D. Mullen et al // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2011. – Vol. 33 – P. 739–74.
- 54.** Bockmann J.-H. High rates of cirrhosis and severe clinical events in patients with HBV/HDVco-infection: longitudinal analysis of a German cohort / J.-H. Bockmann, M. Grube, V. Hamed et al // *BMC Gastroenterol.* – 2020. – Vol. 20(1). – 24 p. – doi: 10.1186/s12876-020-1168-9.
- 55.** Basuni AA. HBV Vaccine-Escape Variants Hepat. B D Protoc., New Jersey / A.A. Basuni, W.F. Carman // *Humana Press.* – n.d. – P. 115–24. – 10.1385/1-59259-669-X:115.
- 56.** Chen PJ. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus / P.J. Chen, G. Kalpana, J. Goldberg, W. Mason, B. Werner, J. Gerin, J. Taylor // *Proc Natl Acad Sci, USA.* – 1986, Nov. – Vol. 83(22). – P. 8774-8.
- 57.** Casey JL. Control of ADAR1 editing of hepatitis delta virus RNAs / J.L. Casey // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2012. – Vol. 353. – P. 123–143.
- 58.** Chou, H.C. Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA / H.C. Chou, T.Y. Hsieh, G.T. Sheu, M.M. Lai // *J. Virol.* – 1998. – Vol. 72. – P. 3684–3690.

- 59.** Chang, J. Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II / J. Chang, X. Nie, H.E. Chang, Z. Han, J. Taylor // *J. Virol.* – 2008. – Vol. 82. – P.1118–1127.
- 60.** Chai N. Properties of subviral particles of hepatitis B virus /N. Chai, H.E. Chang, E. Nicolas et al // *J Virol.* – 2008. – Vol. 82. – P. 7812–7.
- 61.** Crispim MAE. Molecular epidemiology of hepatitis B and hepatitis delta viruses circulating in the western Amazon region, North Brazil / M.A.E. Crispim, N.A. Fraiji, S.C. Campello, N.A. Schriefer, M.M.A. Stefani, D. Kiesslich // *BMC Infect Dis.* – 2014. – Vol. 14. – 94 p.
- 62.** Chen X. A novel quantitative microarray antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus-infected Mongolians / X. Chen, O. Oidovsambuu, P. Liu, R. Grosely, M. Elazar, V.D. Winn, B. Fram, Z. Boa, H. Dai, B. Dashtseren, D. Yagaanbuyant, Z. Genden, N. Dashdorj, A. Bungert, N. Dashdorj, J.S. Glenn // *Hepatology.* – 2017, Dec. – Vol. 66(6). – P. 1739–1749. – doi: 10.1002/hep.28957. – Epub 2017 Oct 30. PMID: 27880976; PMCID: PMC5441964.
- 63.** Chen H.-Y., et a. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis / H.-Y. Chen et al // *Gut.* – 2018.
- 64.** Coghill S. Epidemiology and clinical outcomes of hepatitis delta (D) virus infection in Queensland, Australia / S. Coghill, J. McNamara, M. Woods et al // *Int J Infect Dis.* – 2018. – Vol. 74. – P. 123–7.
- 65.** Cross TJ. The increasing prevalence of hepatitis delta virus (HDV) infection in South London / T.J. Cross, P. Rizzi, M. Horner et al // *J Med Virol.* – 2008. – Vol. 80. – P. 277–82.
- 66.** Chao M. Analyses of a whole-genome inter-clade recombination map of hepatitis delta virus suggest a host polymerase-driven and viral RNA structure-promoted template-switching mechanism for viral RNA recombination / M. Chao, T.C. Wang, C.C. Lin et al // *Oncotarget.* – 2017. – Vol. 8(37). – P. 60841-60859.

- 67.** Chao M. RNA recombination in hepatitis delta virus: implications regarding the abilities of mammalian RNA polymerases / M. Chao // *Virus Res.* – 2007. – Vol. 127(2). – P. 208-215.
- 68.** Chan H. L.-Y. Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis B e antigen-positive patients / H. L.-Y. Chan, M.L. Wong, A.Y. Hui, L.C.-T. Hung, F.K.-L. Chan, J.J.-Y. Sung // *Journal of Clinical Microbiology.* – 2003. – Vol. 41(3). – P. 1277–1279.
- 69.** Chang W.S. Novel hepatitis D-like agents in vertebrates and invertebrates / W.S. Chang, J.H. Pettersson, Le Lay C et al // *Virus Evol.* – 2019. – Vol. 5(2). – vez021. Published 2019 Jul 15. – doi:10.1093/ve/vez021.
- 70.** Chudy M. Collaborative study to establish a World Health Organization international standard for hepatitis D virus RNA for nucleic acid amplification technology (NAT)-based assays / M. Chudy, K. Hanschmann, M. Bozsayi et al // *WHO Report (WHO/BS/2013.2227).* – 2013.
- 71.** Chen CJ. Hepatitis B virus DNA levels and outcomes in chronic hepatitis B / C.J. Chen, H.I. Yang, U.H. Iloeje // *Hepatology.* – 2009. – Vol. 49. – P. 72–84.
- 72.** Chen CJ. Risk of hepatocellular carcinoma across a biological gradient of serum hepatitis B virus DNA level / C.J. Chen, H.I. Yang, J. Su et al // *JAMA.* – 2006. – Vol. 295. – P. 65–73.
- 73.** Chang, J. Replication of the human hepatitis delta virus genome is initiated in mouse hepatocytes following intravenous injection of naked DNA or RNA sequences / J. Chang, L.J. Sigal, A. Lerro, J. Taylor // *J. Virol.* – 2001. – Vol. 75. – P. 3469–3473.
- 74.** Castelnau C. Efficacy of peginterferonalpha-2b in chronic hepatitis delta: relevance of quantitative RT-PCR for follow-up / C. Castelnau, F. Le Gal, M. Ripault et al // *Hepatology.* — 2006. — Vol. 44. — P. 728–735.
- 75.** Chee Eng Lee. Evaluation of the Dried Blood Spot (DBS) Collection Method as a Tool for Detection of HIV Ag/Ab, HBsAg, anti-HBs and anti-HCV in a Malaysian Tertiary Referral Hospital / Chee Eng Lee, S. Ponnampalavanar, S. Omar, S. Mahadeva et al // *Ann Acad Med Singapore.* – 2011. – Vol. 40. – P. 448-53.

- 76.** Clemmons R. M. Development of a Prototype, Rapid Saliva Test for Hepatitis B Surface Antigen (HBSAg) Utilizing a «Dipstick» / R.M. Clemmons, C. Stewart, G. Davis et al // *Method, Annals of the New York Academy of Sciences.* – 1993. – Vol. 694 (1). – P. 272-273.
- 77.** Cruz H. M. Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect hepatitis B surface antigen / H.M. Cruz, E.F. da Silva, C.A. Villela-Nogueira et al // *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* – 2011. – Vol. 25 (2). – P. 134–141.
- 78.** Calle Serrano B. Development and evaluation of a baselineevent-anticipation score for hepatitis delta /B. Calle Serrano, A. Grosshennig, M. Homs et al // *J Viral Hepat.* – 2014.
- 79.** Chan H. L.-Y. Hepatitis B virus genotype C takes a more aggressive disease course than hepatitis B virus genotype B in hepatitis B e antigen-positive patients / H. L.-Y. Chan, M.L. Wong, A.Y. Hui et al // *J Clin Microbiol.* – 2003. – Vol. 41(3). – P. 1277–79. – doi: 10.1128/jcm.41.3.1277-1279.2003.
- 80.** Chen HY. Prevalence and burden of hepatitis D virus infection in the global population: a systematic review and meta-analysis / H.Y. Chen, D.T. Shen, D.Z. Ji et al // *Gut.* – 2019, Mar. – Vol. 68(3). – P. 512-521
- 81.** Chang SY. Molecular epidemiology of hepatitis D virus infection among injecting drug users with and without human immunodeficiency virus infection in Taiwan / S.Y. Chang, C.L. Yang, W.S. Ko, W.C. Liu, C.Y. Lin, C.H. Wu, Y.C. Su, S.F. Chang, M.Y. Chen, W.H. Sheng, C.C. Hung, S.C. Chang // *J Clin Microbiol.* – 2011,Mar. – Vol. 49(3). – P. 1083-9. – doi: 10.1128/JCM.01154-10.
- 82.** Çelik İ. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of hepatitis delta viruses isolated from nine Turkish patients / İ. Çelik et al // *Archives of virology.* – 2011.
- 83.** D'souza S. Molecular mechanisms of viral hepatitis induced hepatocellular carcinoma / S. D'souza, K.C. Lau, C.S. Coffin, T.R. Patel // *World J Gastroenterol.* – 2020. – Vol. 26(38). – P. 5759-5783. – doi:10.3748/wjg.v26.i38.5759

- 84.** Delfino CM. A comprehensive bioinformatic analysis of hepatitis D virus (HDV) full-length genomes / C.M. Delfino, C.S. Cerrudo, M. Biglione, J.R. Oubiña, P.D. Ghiringhelli, V.L. Mathet // *J Viral Hepat.* – 2018. – Vol. 25. – P. 860-869.
- 85.** De la Peña M. Hepatitis delta virus-like circular RNAs from diverse metazoans encode conserved hammerhead ribozymes / M. De la Peña, R. Ceprián, J.L. Casey, A. Cervera // *Virus Evol.* – 2021. – Feb 18. – Vol. 7(1). – doi: 10.1093/ve/veab016.
- 86.** Deny P. Polymerase chain reaction-based detection of hepatitis D virus genome in patients infected with human immunodeficiency virus /P. Deny, C. Lecot, V. Jeantils et al // *J Med Virol.* – 1993. – Vol. 39. – P. 214–8.
- 87.** Da BL. Hepatitis D infection: from initial discovery to current investigational therapies / B.L. Da, T. Heller, C. Koh // *Gastroenterol Rep (Oxf).* – 2019. – Jun 23. – Vol. 7(4). – P. 231-245. – doi: 10.1093/gastro/goz023. – PMID: 32477569; PMCID: PMC6691517.
- 88.** Dandri, M. Mouse models of hepatitis B and delta virus infection / M. Dandri, M. Lutgehetmann // *J. Immunol. Methods.* – 2014. – Vol. 410. – P. 39–49.
- 89.** David Durantel. Nucleic Acid Polymers are Effective in Targeting Hepatitis B Surface Antigen, but More Trials Are Needed / Durantel David, Asselah Tarik // *Gastroenterology.* – 2020. – Vol. 158 (8). – P. 2051-2054.
- 90.** Demography report; Federal State Statistics Service: M.: Russia, 2019. Available online: <https://rosstat.gov.ru/folder/12781> (accessed on 26 November 2020). (in Russian)
- 91.** Davaalkham, D. Administration of hepatitis B vaccine in winter as a significant predictor of the poor effectiveness of vaccination in rural Mongolia: evidence from a nationwide survey / D. Davaalkham, T. Ojima, S. Wiersma, T. Lkhagvasuren, P. Nymadawa, R. Uehara, M. Watanabe, I. Oki, Y. Nakamura // *J Epidemiol Community Health.* – 2007. – Vol. 61(7). – P. 578-84. – doi: 10.1136/jech.2006.051375.



- 92.** Deterding K. Prevalence of HBV genotypes in Central and Eastern Europe / K. Deterding, I. Constantinescu, F.D. Nedelcu, J. Gervain, V. Nemecek, O. Srtuneky, A. Vince, I. Grgurevic, K.P. Bielawski, M. Zalewska, T. Bock, A. Ambrozaitis, J. Stanczak, M. Takács, V. Chulanov, J. Slusarczyk, M. Drazd'áková, J. Wiegand, M. Cornberg, M.P. Manns, H. Wedemeyer // *J Med Virol.* – 2008. – Oct. – Vol. 80(10). – P. 1707-11. – doi: 10.1002/jmv.21294.
- 93.** Dulger AC. High prevalence of chronic hepatitis D virus infection in Eastern Turkey: urbanization of the disease / A.C. Dulger, B. Suvak, H. Gonullu et al // *Arch Med Sci.* – 2016. – Vol. 12(2). – P. 415-20.
- 94.** Degertekin H. Seropositivity for delta hepatitis in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis in Turkey: a meta-analysis / H. Degertekin, K. Yalcin, M. Yakut, C. Yurdaydin // *Liver International.* – 2008. – Vol. 28(4). – P. 494-8.
- 95.** Di Pascoli M. Hospitalizations due to cirrhosis: clinical aspects in a large cohort of Italian patients and cost analysis report / M. Di Pascoli, E. Ceranto, P. De Nardi et al // *Dig Dis.* – 2017. – Vol. 35. – P. 433–438.
- 96.** El Bouzidi K. Hepatitis delta virus testing, epidemiology and management: a multicentre cross-sectional study of patients in London / K. El Bouzidi, W. Elamin, K. Kranzer et al // *J Clin Virol.* – 2015. – Vol. 66. – P. 33–7.
- 97.** European Association for the Study of the Liver. EASL 2017 clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection // *J Hepatol.* – 2017. – Vol. 67. – P. 370–98.
- 98.** Erhardt A. Treatment of chronic hepatitis delta with pegylated interferon-alpha2b / A. Erhardt, W. Gerlich, C. Starke et al // *Liver Int.* — 2006. — Vol. 26. — P. 805–810.
- 99.** Einav S. Prenylation inhibitors: a novel class of antiviral agents / S. Einav, J. Glenn // *J. Antimicrobial. Chemother.* – 2003. – Vol. 52. – P. 883–886.
- 100.** Elazar, M. Emerging concepts for the treatment of hepatitis delta / M. Elazar, J. S. Glenn // *Curr. Opin. Virol.* – 2017. – Vol. 24. – P. 55–59.
- 101.** Emily K. Butler. High prevalence of hepatitis delta virus in Cameron / Butler Emily K., Rodgers Mary A., Collier Kelly E. et al // *Sci Rep.* – 2018. – Vol. 8. – 11617 p.

- 102.** Flores R. Viroids and hepatitis delta virus /R. Flores, S. Ruiz-Ruiz, P. Serra // *SeminLiverDis.* – 2012. – Vol. 32. – P. 201-210.
- 103.** Fonseca JC. Prevalence of infection with hepatitis delta virus (HDV) among carriers of hepatitis B surface antigen in Amazonas state, Brazil / J.C. Fonseca, S.R. Simonetti, H.G. Schatzmayr, M.J. Castejón, A.L. Cesário, J.P. Simonetti // *Trans R Soc Trop Med Hyg.* – 1988. – Vol. 82. – P. 469–71.
- 104.** Flodgren E. Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing hepatitis B and D virus strains / E. Flodgren, S. Bengtsson, M. Knutsson et al // *J Clin Microbiol.* – 2000. – Vol. 38(9). – P. 3311-3316. – doi:10.1128/JCM.38.9.3311-3316.2000.
- 105.** Freitas N. Support of the infectivity of hepatitis delta virus particles by the envelope proteins of different genotypes of hepatitis B virus /N. Freitas, K. Abe, C. Cunha, S. Menne, S. O. Gudima // *J. Virol.* – 2014. – Vol. 88. – P. 6255–6267. – 10.1128/JVI.00346-14.
- 106.** Fiedler M. Vaccination against hepatitis delta virus infection: studies in the woodchuck (*Marmota monax*) model / M. Fiedler, M. Roggendorf // *Intervirology.* – 2001. – Vol. 44(2-3). – P. 154-61. – doi: 10.1159/000050042.
- 107.** Fiedler M. Immunology of HDV infection / M. Fiedler, M. Roggendorf // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2006. – Vol. 307. – P. 187–209.
- 108.** Fattovich G. Influence of hepatitis delta virus infection on progression to cirrhosis in chronic hepatitis type B /G. Fattovich, S. Boscaro, F. Noventa et al // *J Infect Dis.* – 1987. – Vol. 155. – 931 p.
- 109.** Fattovich G. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B: The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep) / G. Fattovich, G. Giustina, E. Christensen et al // *Gut.* – 2000. – Vol. 46. – P. 420–6.
- 110.** Fu, L. Woodchuck sodium taurocholate cotransporting polypeptide supports low-level hepatitis B and D virus entry / L. Fu, H. Hu, Y. Liu, Z. Jing, W. Li // *Virology.* – 2017. – Vol. 505. – P. 1–11.

- 111.** Fiedler, M. Prime/boost immunization with DNA and adenoviral vectors protects from hepatitis D virus (HDV) infection after simultaneous infection with HDV and Woodchuck hepatitis virus / M. Fiedler, A. Kosinska, A. Schumann, O. Brovko, A. Walker, M. Lu, L. Johrden, A. Mayer, O. Wildner, M. Roggendorf // *J. Virol.* – 2013. – Vol. 87. – P. 7708–7716.
- 112.** Federal Center of Hygiene and Epidemiology. Infectious and parasitic diseases morbidity in Russian Federation. Federal statistical form 1. [in Russian]. Moscow, 2019.
- 113.** François-Souquière S. Epidemiological and molecular features of hepatitis B and hepatitis delta virus transmission in a remote rural community in central Africa / S. François-Souquière, M. Makuwa, U. Bisvigou, M. Kazanji // *Infect Genet Evol.* – 2016, Apr. – Vol. 39. – P. 12-21. – doi: 10.1016/j.meegid.2015.12.021.
- 114.** Forbi J.C. Application of dried blood spot in the sero-diagnosis of hepatitis B infection (HBV) in an HBV hyperendemic nation / J.C. Forbi, J.O. Obagu, S.D. Gyar, C. R. Pam, G.R. Pennap et al // *Ann Afr Med.* – 2010. – Vol. 9. – P. 44–45.
- 115.** Farci P. Clinical features of hepatitis D / P. Farci, G.A. Niro // *Semin Liver Dis.* – 2012. – Vol. 32(3). – P. 228-36.
- 116.** Freitas N. Hepatitis delta virus infects the cells of hepadnavirus-induced hepatocellular carcinoma in woodchucks /N. Freitas, J. Salisse, C. Cunha et al // *Hepatology.* – 2012. – Vol. 56(1). – P. 76–85. – doi: 10.1002/hep.25663.
- 117.** Fiedler M. Prime/boost immunization with DNA and adenoviral vectors protects from hepatitis D virus (HDV) infection after simultaneous infection with HDV and woodchuck hepatitis virus /M. Fiedler,A. Kosinska, A. Schumann et al // *J Virol.* – 2013, Jul. – Vol. 87(13). – P. 7708-16. – doi: 10.1128/JVI.00645-13.
- 118.** Gudima S. Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA / S. Gudima, J. Chang, G. Moraleda, A. Azvolinsky, J. Taylor // *J. Virol.* – 2002. – Vol. 76. – P. 3709–3719. – doi: 10.1128/JVI.76.8.3709-3719.2002

- 119.** Greco-Stewart, V.S. The human RNA polymerase II interacts with the terminal stem-loop regions of the hepatitis delta virus RNA genome / V.S. Greco-Stewart, P. Miron, A. Abraham, M. Pelchat // *Virology*. – 2007. – Vol. 357. – P. 68–78.
- 120.** Gudima S. Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA /S. Gudima, J. Chang, G. Moraleda et al // *J Virol*. – 2002. – Vol. 76. – P. 3709–19.
- 121.** Glenn JS. Prenylation of HDAg and antiviral drug development / J.S. Glenn // *Curr Top Microbiol Immunol*. – 2006. – Vol. 307. – P. 133–49.
- 122.** Glenn JS. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen /J.S. Glenn, J.A. Watson, C.M. Havel et al // *Science*. – 1992. – Vol. 256. – P. 1331–3.
- 123.** Giersch K. Persistent hepatitis D virus mono-infection in humanized mice is efficiently converted by hepatitis B virus to a productive co-infection /K. Giersch, M. Helbig, T. Volz, L. Allweiss, L.V. Mancke, A.W. Lohse, S. Polywka, J.M. Pollok, J. Petersen, J. Taylor et al // *J. Hepatol*. – 2014. – Vol. 60. – P. 538–544.
- 124.** Giersch K. Hepatitis Delta co-infection in humanized mice leads to pronounced induction of innate immune responses in comparison to HBV mono-infection / K. Giersch, L. Allweiss, T. Volz, M. Helbig, J. Bierwolf, A.W. Lohse, J.M. Pollok, J. Petersen, M. Dandri, M. Lutgehetmann // *J. Hepatol*. – 2015. – Vol. 63. – P. 346–353.
- 125.** Groc S. High prevalence and diversity of hepatitis B and hepatitis delta virus in Gabon / S. Groc, J.L. Abbate, F. Le Gal, A. Gerber, E. Tuaille, J.L. Albert, D. Nkoghé, E.M. Leroy, B. Roche, P. Becquart // *J Viral Hepat*. – 2019,Jan. – Vol. 26(1). – P. 170-182. – doi: 10.1111/jvh.12991. Epub 2018 Sep 19. PMID: 30141209.
- 126.** Gheorghe L. Hepatitis Delta Virus Infection in Romania: Prevalence and Risk Factors / L. Gheorghe, I.E. Csiki, S. Iacob, C. Gheorghe, A. Trifan, M. Grigorescu, A. Motoc, A. Suceveanu, M. Curescu, F. Caruntu, I. Sporea, C. Brisc, I. Rogoveanu, R. Cerban, L. Tugui, A. Alexandrescu // *J Gastrointestin Liver Dis*. – 2015, Dec. – Vol. 24(4). – P. 413-21. – doi: 10.15403/jgld.2014.1121.244.dtv. PMID: 26697566.

- 127.** Ge Z. HBV mutations in EnhII/BCP/PC region contribute to the prognosis of hepatocellular carcinoma /Z. Ge, T. Tian, L. Meng et al // *Cancer Medicine*. – 2019. – Vol. 8(6). – P. 3086–3093.
- 128.** Gao J. Characteristics and evolutionary history of hepatitis B virus quasi-subgenotype B3 in Southeast Asia /J. Gao, R. Zuo, J. Wang, T. Shen // *Virus Research*. – 2019. – Vol. 273.
- 129.** Guilhot, S. Expression of the hepatitis delta virus large and small antigens in transgenic mice / S. Guilhot, S.N. Huang, Y.P. Xia, N. La Monica, M.M. Lai, F.V. Chisari // *J. Virol*. – 1994. – Vol. 68. – P. 1052–1058.
- 130.** Gudima, S. Assembly of hepatitis delta virus: Particle characterization, including the ability to infect primary human hepatocytes / S. Gudima, Y. He, A. Meier, J. Chang, R. Chen, M. Jarnik, E. Nicolas, V. Bruss, J. Taylor // *J. Virol*. – 2007. – Vol. 81. – P. 3608–3617.
- 131.** Gripon, P. Infection of a human hepatoma cell line by hepatitis B virus / P. Gripon; S. Rumin, S. Urban, J. Le Seyec, D. Glaise, I. Cannie, C. Guyomard, J. Lucas, C. Trepo, C. Guguen-Guillouzo // *Proc. Natl. Acad. Sci. – USA*. – 2002. – Vol. 99. – P. 15655–15660.
- 132.** Ganczak M. A cross-sectional serosurvey on hepatitis B vaccination uptake among adult patients from GP practices in a region of South-West Poland / M. Ganczak, G. Dmytrzyk-Daniłow, M. Korzen, Z. Szych // *BMC Public Health*. – 2015. – Vol. 15. – 1060 p. – doi: 10.1186/s12889-015-2388-8.
- 133.** Galina, N.P. Surveying children and adult vaccination program against diphtheria, tetanus, measles and viral hepatitis B in the Russian Federation /N.P. Galina, A.Y. Mindlina, R.V. Polibin // *Russ. J. Infect. Immun.* – 2019. – Vol. 9. – P. 779–786. – doi:10.15789/2220-7619-2019-5-6-779-786. (In Russian)
- 134.** Galazka, A. Thermostability of vaccine. WHO document WHO/GPV/98. 07 / A. Galazka, J. Milstein, M. Zaffran // Geneva: World Health Organization. – 1998.

- 135.** Goyal A, Murray JM. The impact of vaccination and antiviral therapy on hepatitis B and hepatitis D epidemiology /A. Goyal, J.M. Murray // PLoS One. – 2014. – Oct, 14. – Vol. 9(10). – doi: 10.1371/journal.pone.0110143. eCollection 2014.
- 136.** Geane Lopes Flores. Evaluation of HBsAg and anti-HBc assays in saliva and dried blood spot samples according HIV status / Flores Geane Lopes, Cruz Helena Medina, Potsch Denise Vigo et al // Journal of Virological Methods. – 2018. – Vol. 90(12). – 1863 p.
- 137.** Giersch K. Hepatitis B and Delta Virus: Advances on Studies about Interactions between the Two Viruses and the Infected Hepatocyte / K. Giersch, M. Dandri // J Clin Transl Hepatol. – 2015. – Sep 28. – Vol. 3(3). – P. 220-9. – doi: 10.14218/JCTH.2015.00018.
- 138.** Gheorghe L. Hepatitis Delta Virus Infection in Romania: Prevalence and Risk Factors / L. Gheorghe, I.E. Csiki, S. Iacob et al // J Gastrointestin Liver Dis. – 2015. – Vol. 24(4). – P. 413-21.
- 139.** Hughes S.A. Hepatitis delta virus / S.A. Hughes, H. Wedemeyer, P.M. Harrison // Lancet. – 2011. – Jul 2. – Vol. 378(9785). – P. 73-85. – doi: 10.1016/S0140-6736(10)61931-9. Epub 2011 Apr 20. PMID: 21511329.
- 140.** Hwang S.B. Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen / S.B. Hwang, M.M. Lai // J Virol. – 1993. – Dec. – Vol. 67(12). – P. 7659-62. – doi: 10.1128/JVI.67.12.7659-7662.1993. PMID: 8230486; PMCID: PMC238236.
- 141.** Huang I.C. Induction of hepatitis D virus large antigen translocation to the cytoplasm by hepatitis B virus surface antigens correlates with endoplasmic reticulum stress and NF-kappaB activation / I.C. Huang, C.Y. Chien, C.R. Huang et al // J Gen Virol. – 2006. – Vol. 87. – P. 1715–23.
- 142.** Hsu S.C. Varied assembly and RNA editing efficiencies between genotypes I and II hepatitis D virus and their implications / S.C. Hsu, W.J. Syu, I.J. Sheen et al // Hepatology. – 2002. – Vol. 35. – P. 665–72.

- 143.** Hsieh T.-H. Hepatitis B virus genotype B has an earlier emergence of lamivudine resistance than genotype C / T.-H. Hsieh, T.-C. Tseng, C.-J. Liu et al // *Antiviral Therapy*. – 2009. – Vol. 14(8). – P. 1157–1163.
- 144.** Heidrich B. Virological and clinical characteristics of delta hepatitis in Central Europe / B. Heidrich, K. Deterding, H.L. Tillmann et al // *J Viral Hepat*. – 2009. – Vol. 16. – P. 883–94.
- 145.** Huang C. R. Evolution and Diversity of the Human Hepatitis D Virus Genome / C. R. Huang, S.J. Lo // *Advances in Bioinformatics*. – 2010. – V. 1.
- 146.** Hetzel U. Identification of a Novel Deltavirus in Boa Constrictors / U. Hetzel, L. Szirovicza, T. Smura et al // *mBio*. – 2019. – Apr,2. – Vol. 10(2).
- 147.** Hirtz, Christophe, and Sylvain Lehmann. "Blood sampling using "dried blood spot": a clinical biology revolution underway?" // *Annales de biologieclinique*. – 2015. – Vol. 73(1).
- 148.** Cruz H.M.. Evaluation of saliva specimens as an alternative sampling method to detect hepatitis B surface antigen / H. M. Cruz, E. F. da Silva, C. A. Ville la-Nogueira, et al // *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. – 2011. – Vol. 25 (2). – P. 134–141.
- 149.** Hutse V. Oral fluid as a medium for the detection of Hepatitis B surface antigen / V. Hutse, E. Verhaegen, L. De Cock et al // *J Med Virol*. – 2005. – Vol. 77. – P. 56–63.
- 150.** Huang I.C. Induction of hepatitis D virus large antigen translocation to the cytoplasm by hepatitis B virus surface antigens correlates with endoplasmic reticulum stress and NF-kappaB activation /I.C. Huang, C.Y. Chien, C.R. Huang et al // *J Gen Virol*. – 2006. – Vol. 87. – P. 1715–23.
- 151.** Heidrich B. HBeAg-positive hepatitis delta: virological patterns and clinical long-term outcome /B. Heidrich, B.C. Serrano, R. Idilman et al // *Liver Int*. – 2012. – Vol. 32. – P. 1415–25.
- 152.** He W. Modification of three amino acids in sodium taurocholate cotransporting polypeptide renders mice susceptible to infection with hepatitis D virus in vivo / W. He,

- Z. Cao, F. Mao, B. Ren, Y. Li, D. Li, H. Li, B. Peng, H. Yan, Y. Qi et al // *J. Virol.* – 2016. – Vol. 90. – P. 8866–8874.
- 153.** He W. Hepatitis D virus infection of mice expressing human sodium taurocholate co-transporting polypeptide / W. He, B. Ren, F. Mao, Z. Jing, Y. Li, Y. Liu, B. Peng, H. Yan, Y. Qi, Y. Sun et al // *PLoS Pathog.* – 2015. – Vol. 11.
- 154.** Hughes S.A. Hepatitis delta virus / S.A. Hughes, H. Wedemeyer, P.M. Harrison // *Lancet.* – 2011. – Vol. 9785. – P. 73-85.
- 155.** Heidrich B. Late HDV RNA relapse after peginterferon alpha-based therapy of chronic hepatitis delta /B. Heidrich, C. Yurdaydın, G. Kabaçam et al // *Hepatology.* – 2014. – Vol. 60(1). – P. 87–97. – doi: 10.1002/hep.27102.
- 156.** Heller T. Long-term therapy of chronic delta hepatitis with peginterferon alfa /T. Heller, Y. Rotman, C. Koh et al // *Aliment Pharmacol Ther.* – 2014. – Vol. 40(1). – P. 93–104. – doi: 10.1111/apt.127880.
- 157.** Ivaniushina V. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia /V. Ivaniushina, N. Radjef, M. Alexeeva, E. Gault, S. Semenov, M. Salhi, O. Kiselev, P. Dény // *J Gen Virol.* – 2001. – Nov. – Vol. 82(Pt 11). – P. 2709-2718. – doi: 10.1099/0022-1317-82-11-2709. PMID: 11602783.
- 158.** Iwamoto M. Identification of novel avian and mammalian deltaviruses provides new insights into deltavirus evolution /M. Iwamoto, Y. Shibata, J. Kawasaki et al // *Virus Evol.* – 2021. – Feb 12. – Vol. 7(1). – doi: 10.1093/ve/veab003. PMID: 33614159; PMCID: PMC7882216.
- 159.** Ilchenko L. Yu. Clinical course and outcomes of chronic Delta infection in an endemic region / L. Yu. Ilchenko, T.V. Kozhanova, A. A. Saryglar et al // *Archive of internal medicine.* – 2012. – Vol. 5 (7). – P. 51-56.
- 160.** Isaeva O. V. The effect of hepatitis B vaccination on the prevalence of hepatitis Delta in an endemic region /O.V. Isaeva, L. Yu. Ilchenko, T.V. Kozhanova et al // *Infectious diseases: news, opinions, training.* – 2019. – Vol. 8. – No. 2 (29). – P. 36-42.



- 161.** Jardi R. Determination of hepatitis delta virus RNA by polymerase chain reaction in acute and chronic delta infection / R. Jardi, M. Buti, M. Cotrina et al // *Hepatology*. – 1995. – Vol. 21. – P. 25–9.
- 162.** Ji J. A population-based study of hepatitis D virus as potential risk factor for hepatocellular carcinoma / J. Ji, K. Sundquist, J. Sundquist // *J Natl Cancer Inst*. – 2012. – Vol. 104. – P. 790–2.
- 163.** Jang T.Y. Role of hepatitis D virus infection in development of hepatocellular carcinoma among chronic hepatitis B patients treated with nucleotide/nucleoside analogues / T.Y. Jang, Y.J. Wei, T.W. Liu et al // *Sci Rep*. – 2021. – Vol. 11(1). – 8184 p. Published 2021 Apr 14. doi:10.1038/s41598-021-87679-w.
- 164.** Jaoude, G.A. Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus / G.A. Jaoude, C. Sureau // *J. Virol*. – 2005. – Vol. 79. – P. 10460–10466.
- 165.** Juhl D. Prevalence of antibodies against Hepatitis D virus (HDV) in blood donors in Northern Germany / D. Juhl, M. Chudy, S. Görg, H. Hennig // *Transfus Apher Sci*; – 2020. – Jan 9. – 102721 p.
- 166.** Kozhanova T. Prevalence of hepatitis delta markers in general population of Russian Federation / T. Kozhanova, V. Klushkina, L. Ilchenko et. al / 14th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease, Shanghai, Chine, 22–25 June 2012. — P. 126–127.
- 167.** Kos A. The hepatitis delta (delta) virus possesses a circular RNA / A. Kos, R. Dijkema, A.C. Arnberg, P.H. Van der Meide, H. Schellekens // *Nature*. – 1986. – Vol. 323. – P. 558-560.
- 168.** Kuo M.Y. Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure, and applications / M.Y. Kuo, J. Goldberg, L. Coates et al // *J Virol*. – 1988. – Vol. 62. – P. 1855– 61.
- 169.** Kushner T. Delta hepatitis within the Veterans Affairs medical system in the United States: Prevalence, risk factors, and outcomes / T. Kushner, M. Serper, D.E. Kaplan // *J*

Hepatol. – 2015. – Sep. – Vol. 63(3). – P. 586-92. – doi: 10.1016/j.jhep.2015.04.025. Epub 2015 May 8. PMID: 25962883; PMCID: PMC4574953.

**170.** Kuzin S.N. Shirota rasprostraneniya virusnyh gepatitov sredi razlichnyh grupp naseleniya na territorii Respubliki Saha (Yakutija) /S.N. Kuzin, V.V. Zverev, G. I. Alatorceva, A.V. Nikolaev, L.E. Kuzina, V.F. Lavrov, V.G. Krivoschapkin, S.I. Semenov, N.V. Sadikova, N.N. Pavlov, L.D. Indeeva, R.G. Savvin, R.I. Chemezova, L.K. Kozhevnikova // Zhurnal Mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii. – 2004. – Vol. 1. – P. 18-22. (in Russian)

**171.** Krivoschapkin V.G. Clinical and laboratory characteristics hepatitis D in republic of Sakha (Yakutia) / V.G. Krivoschapkin, S.I. Semenov, S.S. Maximova, N.N. Tihonova, A.I. Sivtseva, S.S. Sleptsova // Wiad lek. – 2018. – Vol. 71(1 pt 2). – P. 179-183.

**172.** Kao J.H. Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy / J.H. Kao, N.H. Wu, P.J. Chen, M.Y. Lai, D.S. Chen // Journal of Hepatology. – 2000. – Vol. 33(6). – P. 998-1002.

**173.** Kramvis A. Genotypes and genetic variability of hepatitis B virus / A. Kramvis // Intervirology. – 2014. – Vol. 57(3-4). – P. 141–150.

**174.** Kobayashi M. Infection with hepatitis B virus genotype A in Tokyo, Japan during 1976 through 2001 / M. Kobayashi, F. Suzuki, Y. Arase et al // Journal of Gastroenterology. – 2004. – Vol. 39(9). – P. 844–850.

**175.** Kühnert M. Recommendations of the AGG (Task Force for Obstetrics, Section Maternal Diseases) on the Management of Maternal Hepatitis B, C and D Infection in Pregnancy / M. Kühnert, S. Kehl, U. Pecks et al // Geburtshilfe Frauenheilkd. – 2021. – Vol. 81(4). – P. 390-397. – doi:10.1055/a-1330-7514.

**176.** Kamal H. Long-Term Study of Hepatitis Delta Virus Infection at Secondary Care Centers: The Impact of Viremia on Liver-Related Outcomes / H. Kamal, G. Westman, K. Falconer, A.S. Duberg, O. Weiland, S. Haverinen, R. Wejstål, T. Carlsson, C. Kampmann, S.B. Larsson, P. Björkman, A. Nystedt, K. Cardell, S. Svensson, S. Stenmark, H. Wedemeyer, S. Aleman // Hepatology. – 2020. – Oct. – Vol. 72(4). – P. 1177-1190. – doi: 10.1002/hep.31214. Epub 2020 Sep 24. PMID: 32145073

- 177.** Kuo, M.Y. Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: Role of delta antigen / M.Y. Kuo, M. Chao, J. Taylor // *J. Virol.* – 1989. – Vol. 63. – P. 1945–1950.
- 178.** Karaca C. Efficacy of pegylated interferon- $\alpha$  treatment for 24 months in chronic hepatitis delta and predictors of response / C. Karaca, O. Soyer, B. Baran // *Antivir. Ther.* — 2013. — Vol. 18. — P. 561–566.
- 179.** Kozhanova T.V. Viral hepatitis delta. Is there the delta infection problem in the Russian federation? / T.V. Kozhanova, L.Yu. Ilchenko, M.I. Mikhailov // *Eksperimental'naja i klinicheskaja gastrojenterologija* [Experimental and clinical gastroenterology]. – 2014. – Vol. 112 (12). – P. 4–12.
- 180.** Koh C. Oral prenylation inhibition with lonafarnib in chronic hepatitis D: infection a proof-of-concept randomized, double-blind, placebo-controlled phase IIa trial / C. Koh, L. Canini, H. Dahari et al // *Lancet Infect Dis.* – 2015. – Vol. 15. – P. 1167-1174.
- 181.** Kozhanova T.V. Serologicheskie markery inficirovanija virusami gepatitov sredi «uslovno» zdorovogo naselenija Respubliki Tyva / T.V. Kozhanova, L.Yu. Ilchenko, V.V. Klushkina et al // *Med. virusol.* – 2013. – Vol. XXVII (2). – P. 74–88. (in Russian).
- 182.** Klushkina V.V. Impact of universal hepatitis B vaccination on prevalence, infection-associated morbidity and mortality, and circulation of immune escape variants in Russia / V.V. Klushkina, K.K. Kyuregyan, T.V. Kozhanova, O.E. Popova, P.G. Dubrovina, O.V. Isaeva, I.V. Gordeychuk, M.I. Mikhailov // *PLoS ONE.* – 2016. – Vol. 11. – doi: 10.1371/journal.pone.0157161.
- 183.** Khetsuriani N. Substantial decline in hepatitis B virus infections following vaccine introduction in Tajikistan / N. Khetsuriani, F. Tishkova, S. Jabirov, K. Wannemuehler, S. Kamili, Z. Pirova, L. Mosina, E. Gavrilin, P. Ursu, J. Drobeniuc // *Vaccine.* – 2015. – Vol. 33. – P. 4019–4024. – doi: 10.1016/j.vaccine.2015.05.092.
- 184.** Kiesslich D. Influence of hepatitis B virus (HBV) genotype on the clinical course of disease in patients coinfecting with HBV and hepatitis delta virus /D. Kiesslich, M.A.

- Crispim, C. Santos, Fde L. Ferreira, N.A. Fraiji, S.V. Komninakis, R.S. Diaz // *J Infect Dis.* – 2009. – Jun, 1. – Vol. 199(11). – P. 1608-11. – doi: 10.1086/598955.
- 185.** Kuular L.Y. Problems and reserves of reducing the mortality rate of the population of the Tuva Republic / L.Y. Kuular, K.D. Arakchaa, M.T. Oyun // Publishing of Research Institute of Medical and Social Problems and Management of the Republic of Tyva, Kyzyl. – 2012. – Vol. 97. (in Russian).
- 186.** Kew M.C. Hepatitis viruses (other than hepatitis B and C viruses) as causes of hepatocellular carcinoma: an update / M.C. Kew // *J Viral.Hepat.* – 2012. – Vol.20. – P. 345-349.
- 187.** Kumar, S. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets /S. Kumar, G. Stecher, K. Tamura // *Molecular Biology and Evolution.* – 2016. – Vol. 33(7). – P. 1870–1874. – <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
- 188.** Lempp F.A. Hepatitis Delta Virus: Replication Strategy and Upcoming Therapeutic Options for a Neglected Human Pathogen /F.A. Lempp, S. Urban // *Viruses.* – 2017. – Vol. 9(7). – 172 p.
- 189.** Lamas Longarela O. Proteoglycans act as cellular hepatitis delta virus attachment receptors / O. Lamas Longarela, T.T. Schmidt, K. Schoneweis, R. Romeo, H. Wedemeyer, S. Urban, A. Schulze // *PLoS ONE.* – 2013. – Vol. 8.
- 190.** Leistner, C.M. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus /C.M. Leistner, S. Gruen-Bernhard, D. Glebe // *Cell. Microbiol.* – 2008. – Vol. 10. – P. 122–133.
- 191.** Lai M.M. The molecular biology of hepatitis delta virus / M.M. Lai // *Annu Rev Biochem.* – 1995. –Vol. 64. – P. 259–86.
- 192.** Li Y.J. Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication /Y.J. Li, M.R. Stallcup, M.M. Lai // *J Virol.* – 2004. – Vol. 78. – P. 13325–34.
- 193.** Lin F.M. Initiation of RNA replication of cloned Taiwan-3 isolate of hepatitis delta virus genotype II in cultured cells /F.M. Lin, C.M. Lee, T.C. Wang et al // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – Vol. 306. – P. 966–72.

- 194.** Le Gal, F. Genetic diversity and worldwide distribution of the *deltavirus* genus: A study of 2,152 clinical strains /F. Le Gal, S. Brichler, T. Drugan, C. Alloui, D. Roulot, J.-M. Pawlotsky, P. Dény and E. Gordien // *Hepatology*. – 2017. – Vol. 66. – P. 1826-1841. – <https://doi.org/10.1002/hep.29574>.
- 195.** Lin C.-L. Hepatitis B virus genotypes and variants / C.-L. Lin, J.-H. Kao // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*. – 2015. – Vol. 5(5).
- 196.** Lin C. L. Natural history of acute and chronic hepatitis B: the role of HBV genotypes and mutants /C.L. Lin, J.H. Kao // *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* – 2017. – Vol. 31. – P. 249–255. – 10.1016/j.bpg.2017.04.010.
- 197.** Lok A.S. Endpoints and new options for treatment of chronic hepatitis D / A.S. Lok, F. Negro, T. Asselah, P. Farci, M. Rizzetto // *Hepatology*. – 2021. – Jul, 31. – doi: 10.1002/hep.32082.
- 198.** Lasda E. Circular RNAs: Diversity of Form and Function /E. Lasda, R. Parker // *RNA (New York, N.Y.)*. – 2014. – Vol. 20. – P. 1829–42.
- 199.** Lai M. M. RNA Replication Without RNA-Dependent RNA Polymerase: Surprises From Hepatitis Delta Virus / M.M. Lai // *Journal of Virology*. – 2005. – Vol. 79. – P. 7951–8.
- 200.** Le Gal F. Quantification of hepatitis delta virus RNA in serum by consensus real-time PCR indicates different patterns of virological response to interferon therapy in chronically infected patients /F. Le Gal, E. Gordien, D. Affolabi et al // *J Clin Microbiol.* – 2005. – Vol. 43. – P. 2363–9.
- 201.** Le Gal F. First international external quality assessment for hepatitis delta virus RNA quantification in plasma /F. Le Gal, S. Brichler, R. Sahli et al // *Hepatology*. – 2016. – Vol. 64. – P. 1483–94.
- 202.** Lamas Longarela, O. Proteoglycans act as cellular hepatitis delta virus attachment receptors /O. Lamas Longarela, T.T. Schmidt, K. Schoneweis, R. Romeo, H. Wedemeyer, S. Urban, A. Schulze // *PLoS ONE*. – 2013. – Vol. 8.

- 203.** Lempp, F.A. Screening an FDA-approved drug library on a cell line that supports the full lifecycle of hepatitis delta virus /F.A. Lempp, L. Nußbaum, L. Rieble, Y. Ni, S. Urban // *J. Hepatol.* – 2016. – Vol. 64. – 388 p.
- 204.** Lampertico, P. EASL 2017 clinical practice guidelines on the management of hepatitis B virus infection /P. Lampertico, K. Agarwal, T. Berg, M. Buti, H.L.A. Janssen, G. Papatheodoridis, F. Zoulim, F. Tacke // *J. Hepatol.* – 2017.
- 205.** Liang X. Epidemiological serosurvey of hepatitis B in China—Declining HBV prevalence due to hepatitis B vaccination /X. Liang, S. Bi, X. Yang, L. Wang, G. Gui, F. Gui, Y. Zhang, J. Liu, X. Gong, Y. Chen et al // *Vaccine.* – 2009. – Vol. 27. – P. 6550–6557. – doi: 10.1016/j.vaccine.2009.08.048.
- 206.** Lukacs Z. Simultaneous determination of HIV antibodies, hepatitis C antibodies, and hepatitis B antigens in dried blood spots—a feasibility study using a multi-analyte immunoassay /Z. Lukacs, A. Dietrich, R. Ganschow, A. Kohlschutter, R. Kruihof // *ClinChem Lab Med.* – 2005. – Vol. 43. – P. 141–145.
- 207.** Llamosas-Falcón L. Alcohol use disorders and the risk of progression of liver disease in people with hepatitis C virus infection - a systematic review / L. Llamosas-Falcón, K.D. Shield, M. Gelovany, J. Manthey, J. Rehm // *Subst Abuse Treat Prev Policy.* – 2020. – Jun,30. – Vol. 15(1). – 45 p. – doi: 10.1186/s13011-020-00287-1.
- 208.** Lai, M.M. RNA replication without RNA-dependent RNA polymerase: Surprises from hepatitis delta virus / M.M. Lai // *J. Virol.* – 2005. – Vol. 79. – P. 7951–7958.
- 209.** Luan Felipe Botelho-Souza. Hepatitis delta: virological and clinical aspects / Botelho-Souza Luan Felipe, Vasconcelos Mariana Pinheiro Alves , dos Santos Alcione de Oliveira et al // *Virol J.* – 2017. – Vol. 14. – 177 p.
- 210.** Makino S. Molecular cloning and sequencing of a human hepatitis delta (delta) virus RNA /S. Makino, M.F. Chang, C.K. Shieh, T. Kamahora, D.M. Vannier, S. Govindarajan, M.M. Lai // *Nature.* – 1987. – Sep, 24-30. – Vol. 329(6137). – P. 343-6.
- 211.** Mason W.S. Eight Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses / W.S. Mason, C.J. Burrell, Casey J. Deltavirus. In: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J.

Maniloff, U. Desselberger, L.A. Ball eds // London: Elsevier/Academic Press. – 2005. – Vol. 735. – 8 p.

**212.** Mongolia Viral Hepatitis Prevention Control Elimination program. Poster 178. The Global Viral Hepatitis Summit: 15th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease. Berlin 26–28 June 2015.

**213.** Manesis E.K. Prevalence and clinical course of hepatitis delta infection in Greece: a 13-year prospective study /E.K. Manesis, G. Vourli, G. Dalekos et al // *J Hepatol.* – 2013. – Vol. 59. – P. 949–56.

**214.** Miao Z. Recombinant identification, molecular classification and proposed reference genomes for hepatitis delta virus /Z. Miao, S. Zhang, Z. Ma, M.S. Hakim, W. Wang, M.P. Peppelenbosch, Q. Pan // *J Viral Hepat.* – 2019. – Jan. – Vol. 26(1). – P. 183–190.

**215.** McMahon B. J. The influence of hepatitis B virus genotype and subgenotype on the natural history of chronic hepatitis B /B.J. McMahon B // *Hepatology International.* – 2009. – Vol. 3(2). – P. 334–342.

**216.** Mayerat C. Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? /C. Mayerat, A. Mantegani, P.C. Frei // *Journal of Viral Hepatitis.* – 1999. – Vol. 6(4). – P. 299–304.

**217.** Marciano S. HBV genotype F: natural history and treatment /S. Marciano, O. A. Galdame, A.C. Gadano // *Antivir. Ther.* – 2013. – Vol. 18. – P. 485–488. – 10.3851/IMP2604.

**218.** Melo Da Silva E. Non-F HBV/HDV-3 coinfection is associated with severe liver disease in Western Brazilian Amazon /E. Melo Da Silva, A. Kay, C. Lobato, R. Muwonge, F. Zoulim et al // *J. Med. Virol.* – 2019. – Vol. 91. – P. 1081–1086. – 10.1002/jmv.25411.

**219.** Magnius L. ICNV Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Deltavirus /L. Magnius, J. Taylor, W.S. Mason, C. Sureau, P. Dény, H. Norder // *J Gen Virol.* – 2018. – Dec. – Vol. 99(12). – P. 1565–1566. – doi: 10.1099/jgv.0.001150. Epub 2018 Oct 12. PMID: 30311870.

- 220.** McDade. "What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research." / McDade, W. Thomas, W. Sharon, J. Josh Snodgrass // *Demography*. – 2007. – Vol. 44.4. – P. 899-925.
- 221.** Madejon A. Detection of HDV-RNA by PCR in serum of patients with chronic HDV infection /A. Madejon, I. Castillo, J. Bartolome et al // *J Hepatol*. – 1990. – Vol .11. – P. 381–4.
- 222.** Mederacke I. Establishment of a novel quantitative hepatitis D virus (HDV) RNA assay using the Cobas TaqMan platform to study HDV RNA kinetics / I. Mederacke, B. Bremer, B. Heidrich, J. Kirschner, K. Deterding, T. Bock, K. Wursthorn, M.P. Manns, H. Wedemeyer // *J Clin Microbiol*. – 2010. – Jun. – Vol. 48(6). – P. 2022-9. – doi: 10.1128/JCM.00084-10. Epub 2010 Mar 29. PMID: 20351206; PMCID: PMC2884474.
- 223.** Mijimolle, N. Protein farnesyltransferase in embryogenesis, adult homeostasis, and tumor development /N. Mijimolle, J. Velasco, P. Dubus, C. Guerra, C.A. Weinbaum, P.J. Casey, V. Campuzano, M. Barbacid // *Cancer Cell*. – 2005. – Vol. 7. – P. 313–324.
- 224.** Mendy M. Hepatitis B surface antigenaemia and alpha-foetoprotein detection from dried blood spots: Applications to field-based studies and to clinical care in hepatitis B virus endemic areas /M. Mendy, G.D. Kirk, M. Van der Sande, A. Jeng-Barry, O.A. Lesi, P. Hainaut, O. Sam, S. McConkey, H. Whittle // *J Viral Hepat*. – 2005. – Vol. 12. – P. 642–647.
- 225.** McAllister. Long term stability of HBsAg, anti-HBc and anti-HCV in dried blood spot samples and eluates / McAllister, S. Shepherd, K. Templeton, C. Aitken, and R. Gunson // *Journal of Clinical Virology*. – 2015. – Vol. 71. – P. 10–17.
- 226.** Moatter T. Clinical presentation and genotype of hepatitis delta in Karachi / T. Moatter, Z. Abbas, S. Shabir, W. Jafri // *World journal of gastroenterology : WJG*. – 2007. – Vol. 13(18). – P. 2604-7.
- 227.** Montagnese S. Methods for diagnosing hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis: a multidimensional approach /S. Montagnese, P. Amodio, M.Y. Morgan // *Metab Brain Dis*. – 2004. – Vol. 19. – P. 281–312.



- 228.** Morgan M.Y. Hepatic encephalopathy in patients with cirrhosis. in: J.S. Dooley, A.S.F. Lok, G. Garcia-Tsao, M. Pinzani (Eds.) /M.Y. Morgan // *Sherlock's Diseases of the Liver and Biliary System*. – 13th ed. Wiley-Blackwell, Oxford. – 2018. – P. 151–179.
- 229.** Mentha, N. A review on hepatitis D: from virology to new therapies /N. Mentha, S. Clement, F. Negro, D. Alfaiate // *J Adv Res*. – 2019. – Vol. 17. – P. 3–15. – doi: 10.1016/j.jare.2019.03.009.
- 230.** Nguyen M.H. Hepatitis B Virus: Advances in Prevention, Diagnosis, and Therapy /M.N. Nguyen, G. Wong, E. Gane, J.H. Kao, G. Dusheiko // *Clin Microbiol Rev*. – 2020. – Vol. 33. – [PMID: 32102898 DOI: 10.1128/CMR.00046-19]
- 231.** Negro F. Hepatitis D virus coinfection and superinfection /F. Negro // *Cold Spring Harb Perspect Med*. – 2014. – Vol. 4. – [PMID: 25368018 DOI: 10.1101/cshperspect.a021550]
- 232.** Ni Y. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes /Y. Ni, F.A. Lempp, S. Mehrle, S. Nkongolo, C. Kaufman, M. Fälth, J. Stindt, C. Königer, M. Nassal, R. Kubitz, H. Sültmann, S. Urban // *Gastroenterology*. – 2014. – Apr. – Vol. 146(4). – P. 1070-83. – doi: 10.1053/j.gastro.2013.12.024. Epub 2013 Dec 19. PMID: 24361467.
- 233.** Niro G.A. Outcome of chronic delta hepatitis in Italy: a long-term cohort study / G.A. Niro, A. Smedile, A.M. Ippolito et al // *J Hepatol*. – 2010. – Vol. 53. – P. 834–40.
- 234.** Netter H.J. Hepatitis Delta Virus (HDV) and Delta-Like Agents: Insights Into Their Origin /H.J. Netter, M.N. Barrios, M. Littlejohn, L.K.W. Yuen // *Front Microbiol*. – 2021. – Jun, 21. – Vol. 12. – P. 652962. – doi: 10.3389/fmicb.2021.652962.
- 235.** Negro, F. Chronic hepatitis D virus (HDV) infection in hepatitis b virus carrier chimpanzees experimentally superinfected with HDV /F. Negro, K.F. Bergmann, B.M. Baroudy, W.C. Satterfield, H. Popper, R.H. Purcell, J.L. Gerin // *J. Infect. Dis*. – 1988. – Vol. 158. – P. 151–159.

- 236.** Ni, Y. Stem cell-derived hepatocytes: A promising novel tool to study hepatitis B virus infection /Y. Ni, S. Urban // *J. Hepatol.* – 2017. – Vol. 66. – P. 473–475.
- 237.** Niro G. Pegylated interferonalpha-2b as monotherapy or in combination with ribavirin in chronic hepatitis delta /G. Niro, A. Ciancio, G. Gaeta et al // *Hepatol.* — 2006 . — Vol.44. — P. 713–720.
- 238.** Nkongolo S. Bulevirtide als erster spezifischer Wirkstoff gegen Hepatitis-D-Virusinfektionen – Mechanismus und klinische Wirkung [Bulevirtide as the first specific agent against hepatitis D virus infections-mechanism and clinical effect] / S. Nkongolo, J. Hollnberger, S. Urban // *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz.* – 2022. – Jan,13. – German. – doi: 10.1007/s00103-022-03486-2. Epub ahead of print. PMID: 35028672.
- 239.** Noordeen, F. Therapeutic antiviral effect of the nucleic acid polymer rep 2055 against persistent duck hepatitis B virus infection /F. Noordeen, C.A. Scougall, A. Grosse et al // *PLoS ONE.* – 2015. – Vol. 10.
- 240.** Noordeen, F. Nucleic acid polymers prevent the establishment of duck hepatitis B virus infection in vivo /F. Noordeen, A. Vaillant, A.R. Jilbert // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2013. – Vol. 57. – P. 5299–5306.
- 241.** Noppornpanth S. Detection of HBsAg and HBV DNA in serum and saliva of HBV carriers /S. Noppornpanth, N. Sathirapongsasuti, V. Chongsrisawat and Y. Poovorawan // *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health.* – 2000. – Vol. 31 (2). – P. 419–421.
- 242.** Nogueira-Lima F.S. Phylodynamic and Phylogeographic Analysis of Hepatitis Delta Virus Genotype 3 Isolated in South America / F.S. Nogueira-Lima, L.F. Botelho-Souza, T.P. Roca, A.O.D. Santos, S.D.C. Oliveira, J.A.D.S. Queiroz, F.A.G.D. Santos-Alves, J.M.V. Salcedo, D.S. Vieira // *Viruses.* – 2019. – Oct, 29. – Vol .11(11). – 995 p. – doi: 10.3390/v11110995.
- 243.** Ozasa A. Influence of Genotypes and Precore Mutations on Fulminant or Chronic Outcome of Acute Hepatitis B Virus Infection /A. Ozasa, Ya. Tanaka, E. Orito, M. Sugiyama, J. Kang, Sh. Hige, T. Kuramitsu, K. Suzuki, E. Tanaka, Sh. Okada, H. Tokita,

- Ya. Asahina, K. Inoue, Sh. Kakumu, T. Okanoue, Y. Murawaki, K. Hino, M. Onji, H. Yatsushashi, H. Sakugawa, Y. Miyakawa, R. Ueda and M. Mizokami // *Hepatology*. – 2006. – Vol. 44(2). – P. 326-34.
- 244.** Ott J.J. Global epidemiology of hepatitis virus infection: New estimates of age-specific HBsAg seroprevalence and endemicity /J.J. Ott, G.A. Stevens, J. Groeger, S.T. Wiersma // *Vaccine*. – 2012. – Vol. 30. – P. 2212–2219. – doi: 10.1016/j.vaccine.2011.12.116.
- 245.** Okamoto H. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes /H. Okamoto, F. Tsuda, H. Sakugawa, R.I. Sastrosoewignjo, M. Imai, Y. Miyakawa, M. Mayumi // *J Gen Virol*. – 1988. – Oct. – Vol. 69 (Pt 10). – P. 2575-83.
- 246.** Ormeci N. Pegylated interferonalfa-2B for chronic delta hepatitis: 12 versus 24 month /N. Ormeci, F. Bolukbas, E. Erden et al // *Hepatogastroenterol*. — 2011. — Vol. 58. — P. 1648–1653.
- 247.** Olayinka A.T. Seroprevalence of hepatitis B infection in Nigeria: A national survey. Am /A.T. Olayinka, A. Oyemakinde, M.S. Balogun, A. Ajudua, P. Nguku, M. Aderinola, A. Egwuenu-Oladejo, S.W. Ajisegiri, S. Sha'aibu, B.O.P. Musa // *J. Trop. Med. Hyg.* – 2016. – Vol. 95. – P. 902–907. – doi: 10.4269/ajtmh.15-0874.
- 248.** Ponzetto A. Titration of the infectivity of hepatitis D virus in chimpanzees / A. Ponzetto, B.H. Hoyer, H. Popper, R. Engle, R.H. Purcell, J.L. Gerin // *J Infect Dis*. – 1987. – Vol. 155. – P. 72–78.
- 249.** Paraskevopoulou S. Mammalian deltavirus without hepadnavirus coinfection in the neotropical rodent *Proechimys semispinosus* /S. Paraskevopoulou, F. Pirzer, N. Goldmann et al // *Proc Natl Acad Sci. – U S A.* – 2020. – Jul,28. – Vol. 117(30). – P. 17977-17983. – doi: 10.1073/pnas.2006750117. Epub 2020 Jul 10.
- 250.** Perez-Vargas J. Enveloped viruses distinct from HBV induce dissemination of hepatitis D virus in vivo /J. Perez-Vargas, F. Amirache, B. Boson et al // *Nat Commun*. – 2019. – May,8. – Vol. 10(1). – 2098 p. – doi: 10.1038/s41467-019-10117-z.

- 251.** Ponzetto, A. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta agent to the eastern Woodchuck /A. Ponzetto, P.J. Cote, H. Popper, B.H. Hoyer, W.T. London, E.C. Ford, F. Bonino, R.H. Purcell, J.L. Gerin // *Proc. Natl. Acad.Sci. – USA.* – 1984. – Vol. 81. – P. 2208–2212.
- 252.** Polo J.M. Transgenic mice support replication of hepatitis delta virus RNA in multiple tissues, particularly in skeletal muscle /J.M. Polo, K.S. Jeng, B. Lim, S. Govindarajan, F. Hofman, F. Sangiorgi, M.M. Lai // *J. Virol.* – 1995. – Vol. 69. – P. 4880–4887.
- 253.** Palsuledesai C.C. Protein prenylation: Enzymes, therapeutics, and biotechnology applications /C.C. Palsuledesai, M.D. Distefano // *ACS Chem. Biol.* – 2015. – Vol. 10. – P. 51–62.
- 254.** Rizzetto M. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers /M. Rizzetto, M.G. Canese, S. Arico et al // *Gut.* – 1977. – Vol. 18. – P. 997– 1003.
- 255.** Rizzetto M. Transmission of the hepatitis B virus-associated delta antigen to chimpanzees /M. Rizzetto, M.G. Canese, J.L. Gerin et al // *J Infect Dis.* – 1980. – Vol. 141. – P. 590– 602.
- 256.** Rizzetto M. Delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees /M. Rizzetto, B. Hoyer, M.G. Canese et al // *Proc Natl Acad Sci. – USA.* – 1980. – Vol. **77.** – P. 6124– 8.
- 257.** Rizzetto M. Hepatitis D: thirty years after / M. Rizzetto // *J. Hepatol.* —2009. — Vol. 50. — P. 1043–1050.
- 258.** Radjef N. Molecular phylogenetic analyses indicate a wide and ancient radiation of African hepatitis delta virus, suggesting a deltavirus genus of at least seven major clades /N. Radjef, E. Gordien, V. Ivaniushina et al // *J Virol.* – 2004. – Vol. 78. – P. 2537– 44.
- 259.** Rizzetto M. Epidemiology of hepatitis D /M. Rizzetto, A. Ciancio // *Semin Liver Dis.* – 2012. – Vol. 32. – P. 211–9.

- 260.** Rizzetto M. HDV: Introduction and epidemiology /M. Rizzetto // Cold Spring Harb Perspect Med. – 2015. – doi: 10.1101/cshperspect.a021576.
- 261.** Rizzetto M. Alavian hepatitis delta: the rediscovery / M. Rizzetto // Clin Liver Dis. – 2013. – Vol. 17. – P. 475–87.
- 262.** Roulot D. Origin, HDV genotype and persistent viremia determine outcome and treatment response in patients with chronic hepatitis delta D. / Roulot, S. Brichler, R. Layese, Z. BenAbdesselam, F. Zoulim, V. Thibault, C. Scholtes, B. Roche, C. Castelnau, T. Poynard, O. Chazouillères, N. Ganne, H. Fontaine, J. Gournay, D. Guyader, F. Le Gal, P. Nahon, F. Roudot-Thoraval, E. Gordien , Deltavir study group // J Hepatol. – 2020. – Nov. – Vol. 73(5). – P. 1046-1062. – doi: 10.1016/j.jhep.2020.06.038. Epub 2020 Jul 4. PMID: 32634548.
- 263.** Riccitelli N. HDV family of self-cleaving ribozymes /N. Riccitelli, A. Lupták // Prog Mol Biol Transl Sci. – 2013. – Vol. 120. – P. 123-71. – doi: 10.1016/B978-0-12-381286-5.00004-4. PMID: 24156943.
- 264.** Romeo R. A 28-year study of the course of hepatitis Delta infection: a risk factor for cirrhosis and hepatocellular carcinoma /R. Romeo, E. Del Ninno, M. Rumi et al // Gastroenterology. – 2009. – Vol. 136. – P. 1629–38.
- 265.** Rizzetto M. A novel therapy for chronic hepatitis D /M. Rizzetto, G. Niro, B. Myrcludex // J Hepatol. – 2016. – Vol. 65. – P. 465-466.
- 266.** Rizzetto, M. The prenylation inhibitor, lonafarnib: A new therapeutic strategy against hepatitis delta /M. Rizzetto, A. Ciancio // Lancet Infect. Dis. – 2015. – Vol. 15. – P. 1119–1120
- 267.** Reshetnikov O.V. Hepatitis B and C seroprevalence in Novosibirsk, western Siberia. Sex /O.V. Reshetnikov, A.A. Khryanin, T.R. Teinina, N.A. Krivenchuk, I.Y.U. Zimina // Transm. Infect. – 2001. – Vol. 77. – 463 p. – doi: 10.1136/sti.77.6.463.
- 268.** Richards A. L. A noninvasive assessment of hepatitis B virus carrier status using saliva samples /A.L. Richards, J.G. Perrault, L.T. Caringal et al // Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. – 1996. – Vol. 27 (1). – P. 80–84.

- 269.** Russian State Register of Medicines. Available online: [https://grls.rosminzdrav.ru/Grls\\_View\\_v2.aspx?routingGuid=537dd5a5-b5f4-41ab-9aad-feb034dbe7c5&t=](https://grls.rosminzdrav.ru/Grls_View_v2.aspx?routingGuid=537dd5a5-b5f4-41ab-9aad-feb034dbe7c5&t=) (accessed on 19 November 2021). (In Russian).
- 270.** Roulot D. Origin, HDV genotype and persistent viremia determine outcome and treatment response in patients with chronic hepatitis Delta /D. Roulot, S. Brichtler, R. Layese et al // *J Hepatol.* – 2020. – Vol. 73(5). – P. 1046–62. – doi: 10.1016/j.jhep.2020.06.038.
- 271.** Revil P. Global strategies are required to cure and eliminate HBV infection / P. Revil, B. Testoni, S. Locarnini, F. Zoulim // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2016. – Vol. 13. – P. 239-248.
- 272.** Roggendorf M. Perspectives for a vaccine against hepatitis delta virus / M. Roggendorf // *Semin Liver Dis.* – 2012. – Aug. – Vol. 32(3). – P. 256-61. – doi: 10.1055/s-0032-1323631.
- 273.** Sureau C. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis /C. Sureau, F. Negro // *J Hepatol.* – 2016. – Apr. – Vol. 64(1 Suppl). – P. 102-116. – doi: 10.1016/j.jhep.2016.02.013. PMID: 27084031.
- 274.** Soriano V. The changing epidemiology of liver disease in HIV patients /V. Soriano, P. Barreiro, K.E. Sherman // *AIDS Rev.* – 2013. – Jan-Mar. – Vol. 15(1). – P. 25-31. PMID: 23449226.
- 275.** Sellier P.O. Hepatitis B Virus-Hepatitis D Virus mother-to-child co-transmission: A retrospective study in a developed country /P.O. Sellier, S. Maylin, S. Brichtler, B. Berçot, A. Lopes, D. Chopin, M. Pogliaghi, A.L. Munier, V. Delcey, G. Simoneau, J. Evans, E. Gordien, F. Simon, J.F. Bergmann // *Liver Int.* – 2018. – Apr. – Vol. 38(4). – P. 611-618. –doi: 10.1111/liv.13556. Epub 2017 Sep 12. PMID: 28834623.
- 276.** Slepçova S. S. Virusnye gepatity v Respublike Saha (Yakutija) i ih rol' v razvitii pervichnogo raka pecheni: Avtoref. diss. d-ra med. Nauk /S.S. Slepçova // Spb, 2013. – 43 p. (in Russian)

- 277.** Sureau C. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion /C. Sureau, B. Guerra, R.E. Lanford // *J Virol.* – 1993. – Vol. 67. – P. 366–72.
- 278.** Sureau C. The middle hepatitis B virus envelope protein is not necessary for infectivity of hepatitis delta virus /C. Sureau, B. Guerra, H. Lee // *J Virol.* – 1994. – Vol. 68. – P. 4063–6.
- 279.** Schulze, A. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans /A. Schulze, P. Gripon, S. Urban // *Hepatology.* – 2007. – Vol. 46. – P. 1759–1768.
- 280.** Sureau, C. A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus A-determinant /C. Sureau, J. Salisse // *Hepatology.* – 2013. – Vol. 57. – P. 985–994.
- 281.** Scarponi C.F.O. Hepatitis Delta Prevalence in South America: A Systematic Review and Meta-Analysis /C.F.O. Scarponi, R.D.N.D. Silva, J.A. Souza Filho, M.R.L. Guerra, M.A.F. Pedrosa, M.P.G. Mol // *Rev Soc Bras Med Trop.* – 2019. – Jan. – Vol. 24. – 52 p. – doi: 10.1590/0037-8682-0289-2018. Erratum in: *Rev Soc Bras Med Trop.* 2019 Mar 07;52:e20190098. PMID: 30698197.
- 282.** Stroffolini T. Migratory flow and hepatitis delta infection in Italy: A new challenge at the beginning of the third millennium /T. Stroffolini, A. Ciancio, C. Furlan, M. Vinci, R. Fontana, M. Russello, G. Colloredo, F. Morisco, N. Coppola, S. Babudieri, L. Ferrigno, C. Sagnelli, E. Sagnelli // *J Viral Hepat.* – 2020. – Sep. – Vol. 27(9). – P. 941-947. – doi: 10.1111/jvh.13310. Epub 2020 May 11. PMID: 32338810.
- 283.** Soriano V. Hepatitis Delta Enters a New Therapeutic Era /V. Soriano, A. Aguilera // *J Infect Dis.* – 2018. – Mar,28. – Vol. 217(8). – P. 1173-1176. – doi: 10.1093/infdis/jix658. PMID: 29425322.
- 284.** Servant-Delmas A. Increasing prevalence of HDV/HBV infection over 15 years in France /A. Servant-Delmas, F. Le Gal, P. Gallian, E. Gordien, S. Laperche // *J Clin Virol.* – 2014. – Feb. – Vol. 59(2). – P. 126-8. – doi: 10.1016/j.jcv.2013.11.016. Epub 2013 Dec 7. PMID: 24365475.

- 285.** Shadur B. Hepatitis D virus in Victoria 2000–2009 /B. Shadur, J. MacLachlan, B. Cowie // *Intern Med J.* – 2013. – Vol. 43. – P. 1081–7.
- 286.** Su C.W. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients / C.W. Su, Y.H. Huang, T.I. Huo, H.H. Shih, I.J. Sheen, S.W. Chen, P.C. Lee, S.D. Lee, J.C. Wu // *Gastroenterology.* – 2006. – Vol. 130. – P. 1625-1635.
- 287.** Salehi-Ashtiani K. A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene /K. Salehi-Ashtiani, A. Lupták, A. Litovchick, J.W. Szostak // *Science.* – 2006. – Sep.,22. – Vol. 313(5794). – P. 1788-92. – doi: 10.1126/science.1129308. PMID: 16990549.
- 288.** Shi M. Redefining the invertebrate RNA virosphere /M. Shi, X.D. Lin, J.H. Tian et al // *Nature.* – 2016. – Dec.,22. – Vol. 540(7634). – P. 539-543. – doi: 10.1038/nature20167. Epub 2016 Nov 23.
- 289.** Shi M. The evolutionary history of vertebrate RNA viruses /M. Shi, X.D. Lin, X. Chen et al // *Nature.* – 2018. – Apr. – Vol. 556(7700). – P. 197-202. – doi: 10.1038/s41586-018-0012-7. Epub 2018 Apr 4. Erratum in: *Nature.* 2018 Jun 26.
- 290.** Szirovicza L. Snake Deltavirus Utilizes Envelope Proteins of Different Viruses To Generate Infectious Particles /L. Szirovicza, U. Hetzel, A. Kipar et al // *mBio.* – 2020. – Mar.,17. – Vol. 11(2). – doi: 10.1128/mBio.03250-19.
- 291.** Sakugawa H. Hepatitis B virus concentrations in serum determined by sensitive quantitative assays in patients with established chronic hepatitis delta virus infection / H. Sakugawa, H. Nakasone, T. Nakayoshi et al // *J Med Virol.* – 2001. – Vol. 65. – P. 478–84.
- 292.** Sarin S.K. Asian-Pacific clinical practice guidelines on the management of hepatitis B: a 2015 update /S.K. Sarin, M. Kumar, G.K. Lau et al // *Hepatol Int.* – 2016. – Vol. 10. – P. 1–98.
- 293.** Stockdale A.J. Hepatitis D prevalence: problems with extrapolation to global population estimates. /A.J. Stockdale, B. Kreuels, M.R.Y. Henrion et al // *Gut.* – 2020. – Feb. – Vol. 69(2). – P. 396-397.



- 294.** Sureau, C. Cloned hepatitis delta virus cDNA is infectious in the chimpanzee / C. Sureau, J. Taylor, M. Chao, J.W. Eichberg, R.E. Lanford // *J. Virol.* – 1989. – Vol. 63. – P. 4292–4297.
- 295.** Sureau, C. Role of the antigenic loop of the hepatitis B virus envelope proteins in infectivity of hepatitis delta virus /C. Sureau // *J. Virol.* – 2005. – Vol. 79. – P. 10460–10466.
- 296.** Sakurai, F. Human induced-pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells as an in vitro model of human hepatitis B virus infection /F. Sakurai, S. Mitani, T. Yamamoto, K. Takayama, M. Tachibana, K. Watashi, T. Wakita, S. Iijima, Y. Tanaka, H. Mizuguchi // *Sci. Rep.* – 2017. – Vol. 7. – 45698 p.
- 297.** Schulze A. Preclinical studies on Myrcludex B, a novel Hepatitis B virus (HBV) – envelope protein derived entry inhibitor /A. Schulze, A. Schieck, C. Gahler et al // *Z. Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 48. – P. 40–43.
- 298.** Stroffolini T. Hepatitis delta infection in Italian patients: towards the end of the story? /T. Stroffolini, E. Sagnelli, C. Sagnelli, M. Russello, M. De Luca, F. Rosina, B. Cacopardo, G. Brancaccio, C. Furlan, G.B. Gaeta, A. Licata, P.L. Almasio; behalf of EPACRON study group // *Infection.* – 2017. – Jun. – Vol. 45(3). – P. 277-281. – doi: 10.1007/s15010-016-0956-1. Epub 2016 Nov 5. PMID: 27817147.
- 299.** Sellier P.O. Hepatitis B Virus-Hepatitis D Virus mother-to-child co-transmission: A retrospective study in a developed country /P.O. Sellier, S. Maylin, S. Brichtler, B. Berçot, A. Lopes, D. Chopin, M. Pogliaghi, A.L. Munier, V. Delcey, G. Simoneau, J. Evans, E. Gordien, F. Simon, J.F. Bergmann // *Liver Int.* – 2017. – Aug, 23. – doi: 10.1111/liv.13556.
- 300.** Shahgildyan I. V. Parenteral viral hepatitis (epidemiology, diagnosis, prevention) /I.V. Shahgildyan, M.I. Mikhailov, G.G. Onishchenko // Moscow, GOU VUNMC MZ RF, 2003.
- 301.** Stockdale A.J. The global prevalence of hepatitis D virus infection: Systematic review and meta-analysis /A.J. Stockdale, B. Kreuels, M.Y.R. Henrion et al // *J Hepatol.* – 2020. – Vol. 73(3). – P. 523-532. – doi:10.1016/j.jhep.2020.04.008

- 302.** Su C.W. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients /C.W. Su, Y.H. Huang, T.I. Huo et al // *Journal of Hepatology*. – 2006. – Vol. 44. – 178 p.
- 303.** Sureau, C. The hepatitis delta virus: Replication and pathogenesis /C. Sureau, F. Negro // *J. Hepatol*. – 2016. – Vol. 64. – P. 102–116.
- 304.** Snijdewind Ingrid J.M. "Current and future applications of dried blood spots in viral disease management." /J.M. Snijdewind Ingrid // *Antiviralresearch*. – 2012. – Vol. 93 (3). – P. 309-321.
- 305.** Terrault N.A. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance /N.A. Terrault, A.S.F. Lok, B.J. McMahon, K.M. Chang, J.P. Hwang, M.M. Jonas, R.S. Jr. Brown, N.H. Bzowej, J.B. Wong // *Hepatology*. – 2018. – Vol. 67. – P. 1560-1599 [PMID: 29405329 DOI: 10.1002/hep.29800.
- 306.** Taylor J.M. Hepatitis delta virus /J.M. Taylor // *Virology*. [Internet]. – 2006. – Vol. 344. – P. 71–76.
- 307.** Taylor J.M. Structure and replication of hepatitis delta virus RNA /J.M. Taylor // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* — 2006. — Vol. 307. — P. 1–23.
- 308.** Taylor J.M. Virology of hepatitis D virus /J.M. Taylor // *Semin Liver Dis*. – 2012. – Vol. 32. – P. 195-200.
- 309.** Tavanez, J.P. Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm / J.P. Tavanez, C. Cunha, M.C. Silva, E. David, J. Monjardino, M. Carmo-Fonseca // *RNA*. – 2002. – Vol. 8. – P. 637–646.
- 310.** Taylor J.M. Hepatitis delta virus: cis and trans functions required for replication / J.M. Taylor // *Cell*. – 1990. – Vol. 61. – P. 371–3.
- 311.** The Bulletin of the World Helth Organization bulletin@who.int 06.2016.
- 312.** The Bulletin of the World Helth Organization bulletin@who.int 04.2017.
- 313.** Tham C. Y. L. Hepatitis delta virus acts as an immunogenic adjuvant in Hepatitis B virus-infected hepatocytes / C. Y. L. Tham, J. Kah, A.T. Tan, T. Volz, A. Chia, K. Giersch // *Cell Rep. Med*. – 2020. – Vol. 1. – 100060 p. – 10.1016/j.xcrm.2020.100060.

- 314.** Taylor J. Origin of Hepatitis Delta Virus /J. Taylor, M. Pelchat // *Future Microbiology*. – 2010. – Vol. 5. – P. 393–402.
- 315.** Taylor J.M. Infection by Hepatitis Delta Virus / J.M. Taylor // *Viruses*. – 2020. – Jun., 16. – Vol. 12(6). – 648 p. – doi: 10.3390/v12060648.
- 316.** Toukan A.U. The epidemiology and clinical outcome of hepatitis D virus (delta) infection in Jordan /A.U. Toukan, O.A. Abu-el-Rub, S.A. Abu-Laban et al // *Hepatology*. – 1987. – Vol. 7. – P. 1340–5.
- 317.** Thieme T. Clinical evaluation of oral fluid samples for diagnosis of viral hepatitis /T. Thieme, P. Yoshihara, S. Piacentini, M. Beller // *J Clin Microbiol*. – 1992. – Vol. 30. – P. 1076–1079.
- 318.** Terrault NA. Update on prevention, diagnosis, and treatment of chronic hepatitis B: AASLD 2018 hepatitis B guidance /N.A. Terrault, A.S.F. Lok, B.J. McMahon et al // *Hepatology*. – 2018. – Vol. 67. – P. 1560–99.
- 319.** Tamura I. Risk of liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma in subjects with hepatitis B and delta virus infection: a study from Kure, Japan /I. Tamura, O. Kurimura, T. Koda et al // *J Gastroenterol Hepatol*. – 1993. – Vol. 8. – P. 433–6.
- 320.** Toukan A.U. The epidemiology and clinical outcome of hepatitis D virus (delta) infection in Jordan /A.U. Toukan, O.A. Abu-el-Rub, S.A. Abu-Laban et al // *Hepatology*. – 1987. – Vol. 7. – P. 1340–5.
- 321.** Tatiana Balaeva. Seroprevalence of Markers of Hepatitis B Virus Infection, Associated Factors, and Vaccination Status in Young Adults in Arkhangelsk, Northwest Russia: A Population-Based Cross-Sectional Study / Balaeva Tatiana, Grjibovski Andrej M., Samodova Olga, Sannikov Anatoly and Klouman Elise // *Int J Environ Res Public Health*. – 2018. – Sep. – Vol. 15(9). – 1905 p.
- 322.** Tharmaphornpilas, P. Increased risk of developing chronic HBV infection in infants born to chronically HBV infected mothers as a result of delayed second dose of hepatitis B vaccination /P. Tharmaphornpilas, A.O. Rasdjarmrearnsook, S. Plianpanich, P. Sa-nguanmoo, Y. Poovorawan // *Vaccine*. – 2009. – Oct,19. – Vol. 27(44). – P. 6110-5. – doi: 10.1016/j.vaccine.2009.08.034.

- 323.** Turon-Lagot V. Targeting the Host for New Therapeutic Perspectives in Hepatitis D /V. Turon-Lagot, A. Saviano, C. Schuster, T.F. Baumert, E.R. Verrier // *J Clin Med.* – 2020. – Jan,14. – Vol. 9(1). – 222 p. – doi: 10.3390/jcm9010222.
- 324.** Usuda S. Serological detection of hepatitis B virus genotypes by ELISA with monoclonal antibodies to type-specific epitopes in the preS2-region product /S. Usuda, H. Okamoto, H. Iwanari, K. Baba, F. Tsuda , Y. Miyakawa et al // *Jornal of Virological Methods.* – 1999. – Vol. 80. – P. 97-112.
- 325.** Urban S. Hepatitis D virus in 2021: virology, immunology and new treatment approaches for a difficult-to-treat disease /S. Urban, C. Neumann-Haefelin, P. Lampertico // *Gut.* – 2021. – Sep. – Vol. 70(9). – P. 1782-1794. – doi: 10.1136/gutjnl-2020-323888. 3
- 326.** Vasconcelos M. Clinic and laboratory analysis of patients with hepatitis delta in Amazon region, Brazil /M. Vasconcelos, D.B. Pereira, R. Paraná, J.M. Villalobos-Salcedo // *J Med Med Sci.* – 2012. – Vol. 3. – P. 263–9.
- 327.** Villa E. Hepatitis B virus markers on dried blood spots. A new tool for epidemiological research /E. Villa // *Journal of Clinical Pathology.* – 1981. – Vol. 34.7. – 809 p.
- 328.** Villar L. Applicability of oral fluid and dried blood spot for hepatitis B virus diagnosis /L. Villar, C. Bezerra, H. Cruz, M. Portilho, G. Flores // *Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology.* – 2019. – Vol. 1.
- 329.** Verrier, E.R. A targeted functional RNA interference screen uncovers glypican 5 as an entry factor for hepatitis b and d viruses /E.R. Verrier, C.C. Colpitts, C. Bach et al // *Hepatology.* – 2016. – Vol. 63. – P. 35–48.
- 330.** Vaillant, A. Nucleic acid polymers: Broad spectrum antiviral activity, antiviral mechanisms and optimization for the treatment of hepatitis B and hepatitis D infection /A. Vaillant // *Antivir. Res.* – 2016. – Vol. 133. – P. 32–40.
- 331.** Villar L.M. Assessment of dried blood spot samples as a simple method for detection of hepatitis B virus markers /L.M. Villar, J.C. de Oliveira, H.M. Cruz, C.F. Yoshida, E. Lampe et al // *J Med Virol.* – 2011. – Vol. 83. – P. 1522–1529.

- 332.** Villa E. Hepatitis B virus markers on dried blood spots. A new tool for epidemiological research /E. Villa, R. Cartolari, S. Bellentani, P. Rivasi, G. Casolo, F. Manenti // *J Clin Pathol.* – 1981. – Vol. 34. – P. 809–812.
- 333.** Vilstrup H. Hepatic encephalopathy in chronic liver disease: 2014 practice guideline by the American association for the study of liver diseases and the European association for the study of the liver /H. Vilstrup, P. Amodio, J. Bajaj et al // *Hepatology.* – 2014. – Vol. 60. – P. 715–735.
- 334.** Wedemeyer H. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead /H. Wedemeyer, M.P. Manns // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2010. – Jan. – Vol. 7(1). – P. 31-40. – doi: 10.1038/nrgastro.2009.205. PMID: 20051970.
- 335.** Wang K.S. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome /K.S. Wang, Q.L. Choo, A.J. Weiner, J.H. Ou, R.C. Najarian, R.M. Thayer, G.T. Mullenbach, K.J. Denniston, J.L. Gerin, M. Houghton // *Nature.* – 1986. – Oct, 9-15. – Vol. 323(6088). – P. 508-14.
- 336.** Wang T.-C. Molecular cloning and expression of the hepatitis delta virus genotype IIb genome /T.-C. Wang, M. Chao // *Biochem Biophys Res Commun.* [Internet]. – 2003. – Vol. 303. – P. 357–363. – doi: 10.1016/S0006-291X(03)00338-3.
- 337.** Wang H.W. Packaging of hepatitis delta virus RNA via the RNA-binding domain of hepatitis delta antigens: different roles for the small and large delta antigens /H.W. Wang, P.J. Chen, C.Z. Lee, H.L. Wu, D.S. Chen // *J Virol.* – 1994. – Vol. 68. – P. 6363–71.
- 338.** Weiner A.J. A single antigenomic open reading frame of the hepatitis delta virus encodes the epitope(s) of both hepatitis delta antigen polypeptides p24 delta and p27 delta /A.J. Weiner, Q.L. Choo, K.S. Wang et al // *J Virol.* – 1988. – Vol. 62. – P. 594–9.
- 339.** Wu J.C. Recombination of hepatitis D virus RNA sequences and its implications /J.C. Wu, T.Y. Chiang, W.K. Shiue et al // *Mol Biol Evol.* – 1999. – Vol. 16(11). – P. 1622-1632.

- 340.** Wu J.C. Genotyping of hepatitis D virus by restriction-fragment length polymorphism and relation to outcome of hepatitis D /J.C. Wu, K.B. Choo, C.M. Chen, T.Z. Chen, T.I. Huo, S.D. Lee // *Lancet*. – 1995. – Oct, 7. – Vol. 346(8980). – P. 939-41. – doi: 10.1016/s0140-6736(95)91558-3. PMID: 7564729.
- 341.** Williams V. Hepatitis delta virus proteins repress hepatitis B virus enhancers and activate the alpha/beta interferon-inducible MxA gene /V. Williams, S. Brichler, N. Radjef, P. Lebon, A. Goffard, D. Hober // *J. Gen. Virol.* – 2009. – Vol. 90. – P. 2759–2767. – 10.1099/vir.0.011239-0.
- 342.** Wang W. Assembly and infection efficacy of hepatitis B virus surface protein exchanges in eight hepatitis D virus genotype isolates /W. Wang, F.A. Lempp , F. Schlund, L. Walter, C. Decker, Z. Zhang et al // *J. Hepatol.* – 2021. – Vol. 75. – P. 311–323. – 10.1016/j.jhep.2021.03.025.
- 343.** Wu J.C. Production of hepatitis delta virus and suppression of helper hepatitis B virus in a human hepatoma cell line /J.C. Wu, P.J. Chen, M.Y. Kuo et al // *J Virol.* – 1991. – Vol. 65. – P. 1099–104.
- 344.** Wille M. A Divergent Hepatitis D-Like Agent in Birds /M. Wille, H.J. Netter, M. Littlejohn // *Viruses*. – 2018. – Dec, 17. – Vol. 10(12). – 720 p.
- 345.** Walker, P.J. Changes to virus taxonomy and to the International Code of Virus Classification and Nomenclature ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses /P.J. Walker, S.G. Siddell, E.J. Lefkowitz et al // *Arch Virol.* – 2021. – Vol. 166. – P. 2633–2648. – <https://doi.org/10.1007/s00705-021-05156-1>.
- 346.** Wranke A. Anti-HDV IgM as a marker of disease activity in hepatitis delta / A. Wranke, B. Heidrich, S. Ernst // *PLoS One*. – 2014. – Jul, 29. – Vol. 9(7). – doi: 10.1371/journal.pone.0101002. eCollection 2014
- 347.** Wranke A. Clinical and virological heterogeneity of hepatitis delta in different regions world-wide: The Hepatitis Delta International Network (HDIN). /A. Wranke, L.M. Pinheiro Borzacov, R. Parana et al // *Hepatitis Delta International Network. Liver Int.* – 2018. – May. – Vol. 38(5). – P. 842-850.

- 348.** Wranke A. Hepatitis Delta International Network. Clinical and virological heterogeneity of hepatitis delta in different regions world-wide: The Hepatitis Delta International Network (HDIN) /A. Wranke, L.M. Pinheiro Borzacov, R. Parana et al // *Liver Int.* – 2017. – Sep, 29.
- 349.** Wu J.C. Natural history of hepatitis D viral superinfection: significance of viremia detected by polymerase chain reaction /J.C. Wu, T.Z. Chen, Y.S. Huang et al // *Gastroenterology.* – 1995. – Vol. 108. – P. 796–802.
- 350.** Wranke A. Antiviral therapy of hepatitis delta /A. Wranke, H. Wedemeyer // *Curr Op Virol.* – 2016. – Vol. 20. – P. 112-118.
- 351.** Wedemeyer H. Pegylated interferon plus adefovir versus either drug alone for hepatitis delta /H. Wedemeyer, C. Yurdaydin, G. Dalekos et al // *NEJM.* – 2011. – Vol. 364. – P. 322–331.
- 352.** Wedemeyer H. Prolonged therapy of hepatitis delta for 96 weeks with pegylated interferon alfa plus tenofovir or placebo does not prevent HDV-RNA relapse after treatment: the HIDIT-2 study / H. Wedemeyer, C. Yurdaydin, S. Ernst et al // *J Hepatol.* – 2015. – Vol. 60 (Suppl). – P. 2-3.
- 353.** Wranke A. Antiviral treatment and liver-related complications in hepatitis delta /A. Wranke, B.C. Serrano, B. Heidrich et al // *Hepatology.* – 2017. – Vol. 65(2). – P. 414-25.
- 354.** Wedemeyer H. et al. Clinical study report (MYR202). Final version 1.0, 10.09.2019.
- 355.** Wedemeyer H. 48 weeks of high dose (10 mg) bulevirtide as monotherapy or with peginterferon alfa-2a in patients with chronic HBV/HDV co-infection / H. Wedemeyer, K. Schöneweis, P. Bogomolov et al // *J Hepatol.* – 2020. – Vol. 73. – P. 52-53.
- 356.** WHO global health sector strategy on viral hepatitis Geneva: World Health Organization; 2016 (<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246177/1/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf?ua=1>, 20 July 2016).
- 357.** WHO Global Health Sector Strategy on Viral Hepatitis; World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2016. Available online:

<http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/246177/1/WHO-HIV-2016.06-eng.pdf?ua=1>  
(accessed on 26 November 2020).

- 358.** Wu S. Molecular epidemiology and clinical characteristics of hepatitis delta virus (HDV) infected patients with elevated transaminases in Shanghai, China /S. Wu, Y. Zhang, Y. Tang et al // *BMC Infect Dis.* – 2020. – Vol. 20(1). – 565 p.
- 359.** Wooddell, C.I. Hepatocyte-targeted RNAi therapeutics for the treatment of chronic hepatitis B virus infection /C.I. Wooddell, D.B. Rozema, M. Hossbach, M. John, H.L. Hamilton, Q. Chu, J.O. Hegge, J.J. Klein, D.H. Wakefield, C.E. Oropeza et al // *Mol. Ther.* – 2013. – Vol. 21. – P. 973–985.
- 360.** Wedemeyer H. Epidemiology, pathogenesis and management of hepatitis D: update and challenges ahead /H. Wedemeyer, M.P. Manns // *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* – 2010. – Jan. – Vol. 7(1). – P. 31-40. – doi: 10.1038/nrgastro.2009.205. PMID: 20051970.
- 361.** Wranke A. Current management of HBV/HDV coinfection and future perspectives /A. Wranke, B. Heidrich, S. Hardtke, H. Wedemeyer // *Curr. Hepatol. Rep.* – 2015. – Vol. 14. – P. 284–292. – doi: 10.1007/s11901-015-0280-8.
- 362.** Xiaohua Chen Oidovsambuu O. A novel quantitative microarray antibody capture assay identifies an extremely high hepatitis delta virus prevalence among hepatitis B virus-infected mongolians. /O. Xiaohua Chen Oidovsambuu, P. Liu et al // *Hepatology.* – 2017. – Dec. – Vol. 66(6). – P. 1739-1749.
- 363.** Yan, H. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus /H. Yan, G. Zhong, G. Xu, W. He, Z. Jing, Z. Gao, Y. Huang, Y. Qi, B. Peng, H. Wang et al // *Elife.* – 2012. – Vol. 1.
- 364.** Yamashiro T. Quantitation of the level of hepatitis delta virus RNA in serum, by real-time polymerase chain reaction—and its possible correlation with the clinical stage of liver disease /T. Yamashiro, K. Nagayama, N. Enomoto et al // *J Infect Dis.* – 2004. – Vol. 189. – P. 1151–7.



- 365.** Yuen M.F. Hepatitis B virus infection /M.F. Yuen, D.S. Chen, G.M. Dusheiko, H.L.A. Janssen, D.T.Y. Lau, S.A. Locarnini, M.G. Peters, C.L. Lai // *Nat Rev Dis Primers*. – 2018. – Jun, 7. – Vol. 4. – 18035 p.
- 366.** Yang Y. Quantitative evaluation of hepatitis B virus mutations and hepatocellular carcinoma risk: a meta-analysis of prospective studies /Y. Yang, J. W. Sun, L.G. Zhao, F. Bray, Y.B. Xiang // *Chinese Journal of Cancer Research*. – 2015. – Vol. 27(5). – P. 497–508.
- 367.** Yan, H. Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide /H. Yan, B. Peng, W. He, G. Zhong, Y. Qi, B. Ren, Z. Gao, Z. Jing, M. Song, G. Xu et al // *J. Virol*. – 2013. – Vol. 87. – P. 7977–7991.
- 368.** Yurdaydin C. Treatment of Chronic Delta Hepatitis /C. Yurdaydin // *Semin. Liver Dis*. 2012. – Vol. 32. – P. 237–244.
- 369.** Yust-Katz, S. Phase 1/1b study of lonafarnib and temozolomide in patients with recurrent or temozolomide refractory glioblastoma /S. Yust-Katz, D. Liu, Y. Yuan, V. Liu, S. Kang, M. Groves, V. Puduvalli, V. Levin, C. Conrad, H. Colman et al // *Cancer*. – 2013. – Vol. 119. – P. 2747–2753.
- 370.** Yurdaydin, C. O118: Optimizing the prenylation inhibitor lonafarnib using ritonavir boosting in patients with chronic delta hepatitis /C. Yurdaydin, R. Idilman, I. Choong, C. Kalkan, O. Keskin, M.F. Karakaya, A.E. Tuzun, E. Karatayli, M. Bozdayi, D. Cory et al // *J. Hepatol*. – 2015. – Vol. 62. – 252 p.
- 371.** Yang H.I. Hepatitis B antigen and the risk of hepatocellular carcinoma / H.I. Yang, S.N. Lu, Y.F. Liaw, S.L. You, C.A. Sun, L.Y. Wang et al // *N Engl. J. Med*. – 2002. – Vol. 347(3). – P. 168–74. – <https://doi.org/10.1056/nejmoa013215>.
- 372.** Yuen, M.F. Arc-520 produces deep and durable knockdown of viral antigens and DNA in a phase II study in patients with chronic hepatitis B /M.F. Yuen, H.L. Chan, S. Liu, B. Given, T. Schluep, J. Hamilton, C.L. Lai, S. Locarnini, J.Y. Lau, C. Ferrari et al // *Hepatology*. – 2015. – Vol. 62. – 1385A p.

- 373.** Yan H. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus /H. Yan, G. Zhong, G. Xu et al // *Elife*. – 2012. – Vol. – P. 1–28.
- 374.** Yang Z. Maximum-likelihood models for combined analyses of multiple sequence data / Z. Yang // *Journal of Molecular Evolution*. – 1996. – Vol. 42. – №. 5. – P. 587-596.
- 375.** Yoav Benjamini. Controlling the False Discovery Rate: A Practical and Powerful Approach to Multiple Testing / Benjamini Yoav, Hochberg Yosef // *Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Methodological)*. — 1995-01. — Т. 57, вып. 1. — С. 289—300. — ISSN 0035-9246. — doi:10.1111/j.2517-6161.1995.tb02031.x
- 376.** Zachou K. Quantitative HBsAg and HDV RNA levels in chronic delta hepatitis /K. Zachou, C. Yurdaydin, U. Drebber et al // *Liver Int*. – 2010. – Vol. 30(3). – P. 430-437.
- 377.** Zhevachevsky N.G. Dynamic study of HBsAg and HBeAg in saliva samples from patients with hepatitis B infection: Diagnostic and epidemiological significance / N.G. Zhevachevsky, N.Y. Nomokonova, A.B. Beklemishev, G.F. Belov // *J Med Virol*. – 2000. – Vol. 61. – P. 433–438.
- 378.** Zipprich A. Prognostic indicators of survival in patients with compensated and decompensated cirrhosis /A. Zipprich, G. Garcia-Tsao, S. Rogowski, W.E. Fleig, T. Seufferlein, M.M. Dollinger // *Liver Int*. – 2012. Vol. 32. – P. 1407–141
- 379.** Zhang, Z.; Ni, Y.; Filzmayer, C.; Urban, S. MDA5 mediated activation of innate immune responses by Hepatitis D virus infection. In Proceedings of the International Meeting on the Molecular Biology of Hepatitis B Viruses, Seoul, South Korea, 21–24 September 2016. submitted.
- 380.** Zoulim F. Quantification of HBsAg in nucleos(t)ide-naïve patients treated for chronic hepatitis B with entecavir with or without tenofovir in the BE-LOW study / F. Zoulim, G. Carosi, S. Greenbloom, W. Mazur, T. Nguyen, L. Jeffers, M. Brunetto, S. Yu, C. Llamoso // *J Hepatol*. – 2015. – Jan. – Vol. 62(1). – P. 56-63. – doi: 10.1016/j.jhep.2014.08.031. Epub 2014 Aug 28. PMID: 25176615
- 381.** <https://www.who.int/ru/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>

**ПРИЛОЖЕНИЕ 1.**

ID ОБРАЗЦА \_\_\_\_\_

**АНКЕТА (ДЛЯ ЛИЦ В ВОЗРАСТЕ 15 ЛЕТ И СТАРШЕ)**

Имя \_\_\_\_\_

Возраст (полных лет) \_\_\_\_\_ Пол : М/ Ж (нужное подчеркнуть)

Место рождения \_\_\_\_\_

Образование \_\_\_\_\_

Род деятельности \_\_\_\_\_

Место проживания:

Город, село (нужное подчеркнуть)

Условия проживания:

Квартира, частный дом, общежитие (нужное подчеркнуть)

Температура тела (заполняется процедурной сестрой): \_\_\_\_\_

Есть ли у Вас симптомы острого заболевания: Да/Нет

Болели ли Вы острым гепатитом: А, В, С (нужное подчеркнуть), когда \_\_\_\_\_

Вакцинация против гепатита В: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Вакцинация против гепатита А: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Перенесенные хирургические операции: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Перенесенные переливания крови: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Лечение с использованием препаратов крови или продуктов, полученных из крови за последние 3 месяца: Да/Нет

Наличие татуировок: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Наличие пирсинга: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Употребление внутривенных наркотиков: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Согласие на участие в исследовании (подпись) \_\_\_\_\_

Дата забора крови \_\_\_\_\_

**ПРИЛОЖЕНИЕ 2.**

ID ОБРАЗЦА \_\_\_\_\_

**АНКЕТА (ДЛЯ ДЕТЕЙ В ВОЗРАСТЕ ДО 15 ЛЕТ)**

Имя \_\_\_\_\_

Возраст (полных лет) \_\_\_\_\_ Пол : М/ Ж (нужное подчеркнуть)

Место рождения \_\_\_\_\_

Образование (домашнее, детский сад, школа), нужное подчеркнуть

Место проживания:

Город, село (нужное подчеркнуть)

Условия проживания:

Квартира, частный дом, общежитие (нужное подчеркнуть)

Температура тела (заполняется процедурной сестрой): \_\_\_\_\_

Есть ли у Вашего ребенка симптомы острого заболевания: Да/Нет

Болели ли Ваш ребенок острым гепатитом: А, В, С (нужное подчеркнуть), когда \_\_\_\_\_

Вакцинация против гепатита В: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Вакцинация против гепатита А: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Перенесенные хирургические операции: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Перенесенные переливания крови: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Лечение с использованием препаратов крови или продуктов, полученных из крови за последние 3 месяца: Да/Нет

Наличие татуировок: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Наличие пирсинга: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Употребление внутривенных наркотиков: Да/Нет, если Да, когда \_\_\_\_\_

Согласие на участие в исследовании (подпись одного из родителей, опекуна, законного представителя ребенка) \_\_\_\_\_

Дата забора крови \_\_\_\_\_