

## НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-91>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022



## Иммуноферментная идентификация escape-мутантов S143L и G145R вируса гепатита В (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*)

Коноплева М.В.<sup>1</sup>, Фельдшерова А.А.<sup>1</sup>, Эльгорт Д.А.<sup>1</sup>, Туполева Т.А.<sup>2</sup>, Кохановская Н.А.<sup>1</sup>, Панкратова В.Н.<sup>1</sup>, Семенов Т.А.<sup>1</sup>, Суслов А.П.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия;

<sup>2</sup>ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России, 125167, Москва, Россия

**Введение.** Достижение цели Всемирной организации здравоохранения по ликвидации вирусного гепатита В к 2030 г. представляется проблематичным, отчасти из-за наличия мутантов ускользания (*англ.* escape) у возбудителя этого заболевания, вируса гепатита В (ВГВ) (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*), распространяющихся преимущественно в группах риска. Специфической рутинной диагностики, направленной на идентификацию escape-мутантов, не существует.

**Цель** исследования – оценка метода серологического портретирования, адаптированного для рутинного выявления escape-мутаций в 143 и 145 аминокислотных остатках (а.о.) поверхностного антигена (HBsAg) ВГВ.

**Материал и методы.** ДНК ВГВ из 56 образцов HBsAg-положительных сывороток крови, полученных от доноров, хронических носителей HBsAg, а также страдающих злокачественными заболеваниями крови лиц, секвенировали. После выявления мутаций в HBsAg образцы тестировали в иммуноферментной тест-системе «Гепастрип-мутант-3К».

**Результаты и обсуждение.** Escape-мутации выявлялись преимущественно у больных со злокачественными заболеваниями крови: замены в 143 и 145 а.о. обнаружены в 10,81 и 8,11% случаев соответственно. С помощью иммуноферментного анализа мутация G145R распознана почти во всех случаях. Тест-система специфично распознавала замену S143L в отличие от варианта S143T. Присутствие соседней мутации D144E может предполагаться благодаря ее особому серологическому портрету.

**Заключение.** Иммуноферментная детекция escape-мутаций S143L, D144E и G145R может применяться для рутинной диагностики, особенно в группах риска. Диагностические параметры тест-системы могут быть уточнены при дополнительных исследованиях. Данная иммуноферментная тест-система и методика применимы для разработки и контроля качества вакцин против escape-мутантов.

**Ключевые слова:** вирус гепатита В (ВГВ); вирусный гепатит В; ускользание; мутант; HBsAg; G145R; S143L; S-ген; иммуноферментный анализ (ИФА); моноклональное антитело (АТ); секвенирование нового поколения (NGS); онкогематология; злокачественные заболевания крови; серологический портрет

**Для цитирования:** Коноплева М.В., Фельдшерова А.А., Эльгорт Д.А., Туполева Т.А., Кохановская Н.А., Панкратова В.Н., Семенов Т.А., Суслов А.П. Иммуноферментная идентификация escape-мутантов S143L и G145R вируса гепатита В (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*). *Вопросы вирусологии*. 2022; 67(1): 48-58. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-91>

**Для корреспонденции:** Коноплева Мария Вениаминовна, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета отдела иммунологии, ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, Россия. E-mail: [maria-konopleva@rambler.ru](mailto:maria-konopleva@rambler.ru)

**Участие авторов:** Коноплева М.В. – концепция и дизайн исследования, анализ и интерпретация данных, подготовка текста, администрирование проекта; Фельдшерова А.А. – методология исследования, проведение экспериментов; Эльгорт Д.А. – проведение экспериментов, анализ данных; Туполева Т.А. – администрирование проекта, сбор образцов; Кохановская Н.А. – сбор и обработка образцов, проведение экспериментов; Панкратова В.Н. – сбор и обработка образцов, проведение экспериментов; Семенов Т.А. – рецензирование и редактирование статьи; Суслов А.П. – общее руководство, обеспечение финансирования.

**Финансирование:** Исследование выполнено за счёт государственного бюджета.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Этическое утверждение.** Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен локальным Этическим комитетом при ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр гематологии» Минздрава России (Протокол № 104 от 28.01.2015).

Поступила 18.11.2021

Принята в печать 02.02.2022

Опубликована 28.02.2022

## ORIGINAL ARTICLE

DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-91>

# Identification by enzyme immunoassay of escape mutants S143L and G145R of hepatitis B virus (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*)

Maria V. Konopleva<sup>1</sup>, Asya A. Feldsherova<sup>1</sup>, Dina A. Elgort<sup>1</sup>, Tatiana A. Tupoleva<sup>2</sup>, Nataliya A. Kokhanovskaya<sup>1</sup>, Valentina N. Pankratova<sup>1</sup>, Tatiana A. Semenenko<sup>1</sup>, Anatoly P. Suslov<sup>1</sup>

<sup>1</sup>FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia;

<sup>2</sup>FSBI «National Medical Research Center for Hematology» of the Ministry of Health of Russia, 125167, Moscow, Russia

**Introduction.** The achievement of the goal of the World Health Organization to eliminate viral hepatitis B by 2030 seems to be problematic partly due to the presence of escape mutants of its etiological agent, hepatitis B virus (HBV) (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*), that are spreading mainly in the risk groups. Specific routine diagnostic assays aimed at identification of HBV escape mutants do not exist.

The study aimed the evaluation of the serological fingerprinting method adapted for routine detection of escape mutations in 143 and 145 aa positions of HBV surface antigen (HBsAg).

**Material and methods.** HBV DNA from 56 samples of HBsAg-positive blood sera obtained from donors, chronic HBsAg carriers and oncohematology patients has been sequenced. After the identification of mutations in HBsAg, the samples were tested in the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit «Hepastrip-mutant-3K».

**Results and discussion.** Escape mutations were detected mainly in patients with hematologic malignancies. Substitutions in 143 and 145 aa were found in 10.81% and in 8.11% of such patients, respectively. The G145R mutation was recognized using ELISA kit in almost all cases. The kit specifically recognized the S143L substitution in contrast to the S143T variant. The presence of neighbor mutation D144E can be assumed due to its special serological fingerprint.

**Conclusion.** ELISA-based detection of escape mutations S143L, D144E and G145R can be used for routine diagnostics, especially in the risk groups. The diagnostic parameters of the kit can be refined in additional studies. This immunoassay and methodology are applicable for the development and quality control of vaccines against escape mutants.

**Key words:** hepatitis B virus (HBV); viral hepatitis B; escape; mutant; HBsAg; G145R; S143L; S gene; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); monoclonal antibody (AB); next generation sequencing (NGS); oncohematology; hematologic malignancies; serological fingerprint

**For citation:** Konopleva M.V., Feldsherova A.A., Elgort D.A., Tupoleva T.A., Kokhanovskaya N.A., Pankratova V.N., Semenenko T.A., Suslov A.P. Identification by enzyme immunoassay of escape mutants S143L and G145R of hepatitis B virus (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*). *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2022; 67(1): 48-58. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-91>

**For correspondence:** Maria V. Konopleva, Ph.D (Biol.), Senior Researcher of the Immunity Mediators and Effectors Laboratory, Immunology Department, FSBI «National Research Centre for Epidemiology and Microbiology named after honorary academician N.F. Gamaleya» of the Ministry of Health of Russia, 123098, Moscow, Russia. E-mail: [maria-konopleva@rambler.ru](mailto:maria-konopleva@rambler.ru)

### Information about the authors:

Konopleva M.V., <https://orcid.org/0000-0002-9724-695X>

Feldsherova A.A., <https://orcid.org/0000-0001-7216-4301>

Elgort D.A., <https://orcid.org/0000-0002-2197-4184>

Tupoleva T.A., <https://orcid.org/0000-0003-4668-9379>

Kokhanovskaya N.A., <https://orcid.org/0000-0001-5142-846X>

Pankratova V.N., <https://orcid.org/0000-0003-4427-1809>

Semenenko T.A., <https://orcid.org/0000-0002-6686-9011>

Suslov A.P., <https://orcid.org/0000-0001-5731-3284>

**Contribution:** Konopleva M.V. – study concept and design, data analysis and interpretation, original draft preparation, project administration; Feldsherova A.A. – study methodology, investigation; Elgort D.A. – investigation, data analysis; Tupoleva T.A. – project administration, specimens collection; Kokhanovskaya N.A. – specimens collection and processing, investigation; Pankratova V.N. – specimens collection and processing, investigation; Semenenko T.A. – review and editing of the article; Suslov A.P. – supervision, funding acquisition.

**Funding.** The research was funded by the State budget.

**Conflict of interest.** The authors declare no conflict of interest.

**Ethics approval.** The study was conducted with the informed consent of the patients. The research protocol was approved by the Local Ethics Committee of the FSBI «National Medical Research Center for Hematology» of the Ministry of Health of Russia (Protocol No. 104 dated January 28, 2015).

Received 19 November 2021

Accepted 02 February 2022

Published 28 February 2022

## Введение

Среди множества заболеваний, вызываемых вирусами у человека, лишь немногие обладают столь глобальной общественной значимостью, как вирусный гепатит В. Вирусом гепатита В (*Hepadnaviridae: Orthohepadnavirus: Hepatitis B virus*) (ВГВ) инфицирована примерно 1/3 населения планеты, при этом хроническая форма инфекции зарегистрирована не менее чем у 360 млн человек. Из-за клинических осложнений болезни, таких как цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома, в мире происходит около 1 млн смертей в год [1]. В 2016 г. 69-я Всемирная ассамблея здравоохранения одобрила Глобальную стратегию сектора здравоохранения по вирусному гепатиту, целью которой определена ликвидация инфекционного гепатита как угрозы общественному здоровью к 2030 г. Установлены следующие рекомендуемые целевые показатели: снижение распространённости ВГВ среди детей в возрасте 1 года до  $\leq 0,1\%$ ; снижение смертности от гепатита В до  $\leq 5$  на 100 тыс. населения; ежегодное снижение числа новых случаев коинфекции ВГВ и вируса гепатита С (*Flaviviridae: Hepacivirus: Hepatitis C virus*) [2].

Тем не менее распространение ВГВ продолжается, несмотря на проводимую во многих странах широко-масштабную вакцинацию против гепатита В, а также осуществление других противоэпидемических мероприятий. Такая ситуация во многом обусловлена разнообразными механизмами, сформировавшимися в ходе эволюции вируса и способствующими его выживанию в условиях иммунологического прессинга [3]. Существенное значение в этом отношении имеет возникновение мутантов диагностического, иммунологического и вакцинального ускользания (*англ. escape*) (escape-мутантов), которые выявляются во всём мире [4]. Вакцины, созданные на основе поверхностного антигена (HBsAg) вируса дикого типа, защищают не от всех escape-мутантов [5].

Процесс распространения подобных мутантов, по-видимому, происходит неравномерно, что зависит, прежде всего, от генотипа возбудителя [4, 6]. Кроме того, escape-мутации преимущественно накапливаются у лиц определённых категорий, то есть в особых группах риска. В частности, наибольшая встречаемость мутантов продемонстрирована у онкогематологических больных [7, 8], вакцинированных детей [7], а также у получивших иммунопрофилактику детей, рождённых от матерей – носителей вируса [10].

Проникновение escape-мутантов в популяции (в т.ч. охарактеризованные выше) напрямую связано также с ошибками обнаружения этих видоизменённых вариантов вируса [11]. Аналитическая чувствительность тестирования на HBsAg зависит от генотипа или субтипа ВГВ, но в случае escape-мутаций ситуация гораздо более сложная и неоднозначная. Исследования показали, что мутации в S-гене ВГВ, расположенные вблизи а-детерминанты HBsAg или в регуляторных элементах, могут существенно образом влиять на антигенные профили HBsAg, при-

водя иногда к полному нарушению распознавания последнего моноклональными антителами (АТ) диагностических тест-систем [11, 12]. Даже наиболее чувствительная на сегодняшний день количественная хемилюминесцентная тест-система «Lumipulse HBsAg-HQ» (Fujirebio Inc., Япония), которая имеет по отношению к ВГВ дикого типа диагностическую чувствительность 0,005 МЕ/мл (с нижним порогом детекции  $\sim 0,0011$  МЕ/мл), обеспечивает существенно худшее качество выявления рекомбинантных HBsAg с escape-мутациями по сравнению с диким типом этого антигена [12]. В то же время в целях адекватной оценки чувствительности подобных тест-систем в отношении escape-мутантов желательнее использовать сывороточные панели с природными мутантами, так как серологический портрет мутантного HBsAg естественного происхождения может не совпадать с таковым его рекомбинантного варианта [13]. Помимо этого, возможно снижение чувствительности диагностической тест-системы на фоне присутствия множественных escape-мутаций в HBsAg. В итоге недостаточно тщательная оценка способности тест-системы к обнаружению escape-мутантов может иметь результатом их недовыявление.

В настоящее время не существует рутинных диагностических тестов для определения мутантов подобного рода. Наиболее эффективным и надёжным способом является секвенирование нового поколения (*next generation sequencing, NGS*) [7], однако на сегодняшний день это достаточно трудоёмкая и дорогая методика. Разрабатывались решения на основе методов полимеразной цепной реакции (*polymerase chain reaction, PCR*) и гэп-лигазной цепной реакции (*gap ligase chain reaction, g-LCR*), например для детекции escape-мутантов D144A [14] и G145R [15, 16]. Кроме того, известны попытки применения ПЦР предельного разведения (*limiting dilution cloning PCR, LDC-PCR*) в сочетании с секвенированием для выявления escape-мутаций в 120, 126, 128, 133, 141–145 а.о. [17, 18]. Были также разработаны микрочипы для ДНК-идентификации генотипов ВГВ и выявления важных мутаций в генах *S*, *Pol*, *Core* и *X* [19]. Однако все эти исследования не привели к разработке полноценных диагностических тест-систем. Ранее мы предлагали алгоритм серологического поиска мутаций в 143 и 145 а.о. HBsAg в сыворотке крови (S-HBsAg), основанный на серологическом портретировании – иммуноферментном выявлении дефектов взаимодействия данного антигена с моноклональными анти-HBsAg АТ по критерию падения чувствительности иммуноферментного анализа (ИФА) в  $\geq 10$  раз при серийных 10-кратных разведениях сывороток [20]. Однако этот вариант оказался довольно трудоёмким, поскольку предполагал использование 11 моноклональных конъюгатов.

Целью данной работы стала оценка чувствительности и специфичности метода серологического портретирования, адаптированного для рутинного выявления escape-мутаций в 143 и 145 а.о. S-HBsAg.



## Материал и методы

**Образцы.** Исследование проводили на 56 образцах сывороток крови, которые были получены от пациентов различных стационаров и донорских пунктов Российской Федерации. На основании данных анамнеза или источника получения образцов пациентов разделили на следующие группы: доноры ( $n = 11$ ), хронические носители HBsAg (группа «Носители») ( $n = 8$ ) и страдающие злокачественными заболеваниями крови (группа «Онкогематология») ( $n = 37$ ).

Образцы сывороток исследовали на наличие серологических маркеров возбудителя гепатита В (HBsAg, AT анти-HBs, антиген инфекционности HBeAg, анти-HBe IgG, анти-HBc IgM + IgG). Кроме того, в пробах определяли уровень вирусной нагрузки ВГВ. Анализ escape-мутаций в положениях 143 и 145 а.о. проводили методами NGS и ИФА посредством иммуноферментной тест-системы «Гепастрип-мутант-3К». Сыворотки проверяли также на AT к вирусам гепатитов С и D.

**Диагностические наборы.** Исследование сывороток крови на наличие HBsAg проводили с использованием иммуноферментной тест-системы «Гепастрип В» (ООО «Ниармедик Плюс», Россия). Для ряда образцов определяли количество HBsAg, используя отраслевой стандарт (ОСО) HBsAg 42-28-311-00 (ООО «НПО «Диагностические системы», Россия). Тестирование на другие маркеры инфицирования ВГВ, а также на наличие суммарных антител к вирусам гепатитов С и D выполняли методом ИФА с использованием тест-систем производства ЗАО «Вектор-Бест» (Россия): «ВектоHBe-IgG» (кат. № D-0578), «ВектоHBe антиген» (кат. № D-0576), «Векто-HBc антитела» (кат. № D-0566), «Векто-HBsAg антитела» (кат. № D-0562), «Бест анти-ВГС» (комплект 3) (кат. № D-0773) и «Вектогеп D-антитела» (кат. № D-0954). ИФА проводили в соответствии с прилагаемыми инструкциями производителя.

Выделение и количественное определение ДНК ВГВ осуществляли методом ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) с помощью набора реагентов «РеалБест ДНК ВГВ» (количественный вариант) (кат. № D-0599, ЗАО «Вектор-Бест», Россия) также согласно инструкции производителя.

**Моноклональные конъюгаты.** Моноклональные мышиные AT к HBsAg (11F3, H2), а также их конъюгаты с пероксидазой хрена, приготовленные по методу P. Tijssen и соавт. [21], получены в лаборатории медиаторов и эффекторов иммунитета ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почётного академика Н.Ф. Гамалеи» (НИЦЭМ) Минздрава России. Кроме того, использовали коммерчески доступный конъюгат NF5 (ООО «Сорбент», Россия).

**Полногеномное глубокое секвенирование изолятов вируса гепатита В.** Полногеномное исследование методом NGS проводили для всех 56 изолятов. С целью амплификации образцов ДНК использовали праймеры, расположенные в консервативных участ-

ках генома, с учётом перекрытия амплифицируемых локусов. Каждую реакцию амплификации осуществляли отдельно. В реакции использовали следующие праймеры [22, 23]:

- пара 1: 1-TCACCATATCTTGGGAACAAGA, 2-CGAACCACTGAACAAATGGC;
- пара 2: 1-GCCATTTGTTTCAGTGGTTCG, 2-TGGGCGTTCACGGTGGT;
- пара 3: 1-ACCACCGTGAACGCCA, 2-TCTTGTCCCAAGAATATGGTGA.

Длина первого ПЦР-продукта составила 1103 п.н., второго – 946 и третьего – 1226 п.н. После амплификации выполняли агарозный гель-электрофорез полученных ПЦР-продуктов. В полученных ампликонах измеряли концентрацию ДНК с помощью флуориметра Qubit 2.0 (Invitrogen, США). Далее все 3 продукта амплификации смешивали эквимолярно в одном образце с последующим определением содержания нуклеиновой кислоты в суммированных амплифицированных образцах также при помощи флуориметра Qubit 2. Концентрация ДНК в образцах нормировалась до 15 нг/мкл. Для приготовления индексированных библиотек в реакцию брали по 100 нг каждого образца; библиотеки были приготовлены в соответствии со стандартным протоколом производителя.

Секвенирование NGS проводили на платформе Ion PMG (Life Technologies, США) с использованием чипов типа 316 по стандартному протоколу. Каждый чип вмещал 16 подготовленных индексированных геномных библиотек при теоретической расчётной ёмкости от 300 М до 1 G, т.е. от 300 млн до 1 млрд нуклеотидов. За расчётную величину брали практическую ёмкость в 500 М исходя из длины генома ВГВ, равной ~3200 п.н. Расчётная глубина секвенирования при одновременном исследовании 16 индексированных геномных библиотек составляла ~9700 прочтений на образец. Результаты секвенирования показали, что средняя глубина прочтения разных образцов составила ~1000–10 000.

Выравнивание нуклеотидных последовательностей S-гена и сравнительный анализ первичной нуклеотидной последовательности выполняли при помощи программы Vector NTI 9.0 (ThermoFisher Scientific Inc. (Invitrogen), США). В качестве референсных данных использовали последовательности геномов ВГВ (генотипы А–Н), полученные из базы GenBank. Определение генотипов, субтипов и мутаций ВГВ проводили с учётом данных опубликованных ранее работ [11, 25, 26]. Для выравнивания последовательностей применяли также следующие референсы из GenBank: JX096956 (Latvia, субгенотип D2) и X98077, субтип adw [27]. В данной статье приведён анализ относительно части гена S, соответствующей S-HBsAg ВГВ.

**Оценка escape-мутантов HBsAg с помощью адаптированной методики серологического портретирования с ИФА набором «Гепастрип-мутант-3К».** Методика, реализованная в виде иммуноферментного набора «Гепастрип-мутант-3К», основана на данных работы А.И. Баженова и соавт. [20]. Это «сэндвич»-вариант ИФА, разработанный для поиска мутантов HBsAg в позитив-

ных по данному маркеру образцах, отобранных при скрининговом исследовании человеческих сывороток посредством любой универсальной тест-системы. В ходе анализа поликлональные анти-НВs АТ, сорбированные на поверхности лунок планшетов, связывают НВsAg в сыворотке или плазме крови человека, а образовавшийся комплекс антиген–антитело обнаруживается с помощью пероксидазных конъюгатов мышинных моноклональных АТ по цветной реакции с хромогеном. При этом используются 3 конъюгата, обладающих различной специфичностью в отношении к НВsAg дикого и мутантного типов. Конъюгат 11F3 практически не выявляет варианты НВsAg, несущие мутации S143L и G145R, в то время как конъюгат H2 выявляет как НВsAg дикого типа, так и названные варианты. Третий конъюгат (NF5) реагирует с мутантом в области 143 (но не 145) а.о.

Для каждой исследуемой НВsAg-содержащей сыворотки готовили серию 10-кратных разведений (от 1/10 до 1/1 000 000) в буфере, включающем 125 мМ HEPES ((4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновую кислоту)), 438 мМ сахарозу, 192 мМ хлорид натрия, 1,25% (v/v) казеин, 3,3 мМ *p*-гидроксифенил-уксусную кислоту, 5% (w/v) BSA (bovine serum albumin; бычий сывороточный альбумин, БСА), 1% (w/v) человеческий  $\gamma$ -глобулин, 12,2 мкМ метиловый оранжевый, 1,95 мкМ бромфеноловый красный, 0,1% (v/v) ProClin-300, 10% (w/v) мертиолят, 21,6 мкМ амфотерицин В, 0,01% (v/v) гентамицин и 1% (v/v) Твин-20. Каждое разведение сыворотки тестировали с конъюгатами в 4 дублях. Способность конъюгатов выявлять НВsAg в образцах сывороток оценивали относительно НВsAg дикого типа («ИмБио»; АО «НПО «Микроген», Россия), взятого в концентрации 2 мкг/мл.

Рабочие растворы конъюгатов 11F3 (0,8–1,0 мкг/мл), H2 (2 мкг/мл) и NF5 (2 мкг/мл) готовили в буфере, содержащем 0,01 М ЭДТА (этилендиаминтетраацетат), 0,5% (w/o) сухое молоко, 12,5% (v/v) FBS (fetal bovine serum, фетальная бычья сыворотка) (инактивированную 30 мин при 56 °С), 12,5% (v/v) нормальную кроличью сыворотку (инактивированную аналогичным образом), 0,05% (w/o) сапонин, 0,0125% (v/v) Triton X-405, 0,00625% (v/v) Твин-80, 15 мМ калий йодид, 0,1% (v/v) *n*-пропил-галлат, 0,15 М хлорид натрия, 0,5 М мочевины, 0,005% (w/o) бромкрезоловый пурпурный, 0,35% (w/o) тиоцианат калия, 0,1% (w/v) Цвиттергент, 10% (w/v) мертиолят (орто-этилртутьтиосалицилат натрия), 21,6 мкМ амфотерицин В, 0,01% (v/v) гентамицин в растворе Версена.

Для постановки реакции в лунки планшета из тест-системы «Гепастрип В» с иммобилизованными козьими поликлональными АТ анти-НВs вносили по 50 мкл рабочего раствора конъюгата 11F3, H2 или NF5. Каждый из них тестировали по отдельности со всеми разведениями сыворотки (либо с контрольным антигеном дикого типа). После этого в контрольные лунки планшета добавляли по 100 мкл НВsAg дикого типа или буфер, использующийся для разведения сывороток (отрицательный контроль), а в оставшиеся лунки вносили разведения тестируемых сыворо-

ток. Планшет инкубировали во влажной камере при температуре +37 °С на протяжении 2 ч, после чего отмывали 8 раз раствором PBST (Phosphate Buffered Saline Tween 20) (0,15 М хлорид натрия, 2,67 мМ натрия гидрофосфат дигидрат, 0,01% азид натрия, 0,1% (v/v) Твин-20; pH 7,2–7,5). Затем во все лунки вносили 100 мкл свежеприготовленного по стандартной методике раствора 3,3',5,5'-тетраметилбензидина гидрохлорида (ТМБ) в субстратном буфере, содержащем пероксид водорода, и выдерживали 30 мин при +37 °С. Реакцию останавливали добавлением в каждую лунку 50 мкл 2 М серной кислоты, после чего сразу производили учёт результатов на спектрофотометре Sunrise (Tecan, Швейцария) при 450 нм против референсной длины волны 620 нм.

Оценку сравнительной активности конъюгатов проводили для разведений НВsAg-содержащей сыворотки со значениями оптической плотности, позволяющими сравнивать активность 2 конъюгатов, т.е.  $\leq 3,0$  (плато).

Сыворотки, имеющие в одинаковых разведениях сходные значения оптической плотности с конъюгатами H2 и 11F3, относятся к дикому типу. Образцы же, дающие с конъюгатом H2 значения оптической плотности, превышающие таковые для 11F3 в  $>10$  раз, могут содержать мутацию в положениях 143 или 145 а.о. и требуют дальнейшего исследования. Для этого используется третий конъюгат – NF5, который реагирует с мутантом в области 143 а.о. (но не 145 а.о.). Если реактивность образца сыворотки с конъюгатом H2 не превышает таковую с NF5 в  $>10$  раз, это означает, что в данной пробе присутствует НВsAg с мутацией в положении 143 а.о. Если же реактивность сыворотки с конъюгатом H2 превышает таковую в  $>10$  раз как с 11F3, так и с NF5, можно заключить, что имеющийся НВsAg несёт мутацию в позиции 145 а.о.

Исследование проводилось при информированном согласии пациентов. Протокол исследования одобрен Локальным этическим комитетом при ФГБУ «НМИЦ гематологии» Минздрава России (Протокол № 104 от 28.01.2015 г.).

### Результаты и обсуждение

По результатам NGS только 5 (8,93%) среди 56 образцов имели мутацию в 143 а.о., причём 4 из них принадлежали группе лиц с онкогематологической патологией. Таким образом, распространённость мутации в позиции 143 а.о. составила 10,81% (4 из 37) (см. табл. 1). При этом 3 из 5 образцов содержали гомогенную мутацию S143T, а 2 оставшихся – мутацию S143L. Все образцы с вариантом S143T, относившиеся к субтипу *adw1* генотипов А и D, определены иммуноферментной тест-системой «Гепастрип-мутант-3К» как содержащие дикий тип, несмотря на достаточно высокий уровень вирусной ДНК ( $10^5$ – $10^8$  копий/мл). Низкотитражная сыворотка с гетерогенной мутацией S143L, относительное содержание которой составило 31%, также идентифицирована как имеющая дикий тип вируса. Лишь 1 из 5 сывороток с ВГВ, мутантным по 143 а.о. S-НВsAg, правильно

определена ИФА тест-системой. Это была высокотитражная сыворотка из группы «Доноры», содержащая ВГВ генотипа D субтипа ayw3 (см. табл. 1).

По сравнению с заменами в 143 а.о. мутация в 145 а.о. S-HBsAg встречалась реже и аналогичным образом доминировала в образцах из группы «Онкогематология», однако лучше детектировалась с помощью ИФА (см. табл. 2). Все 4 обнаруженные замены в 145 а.о. представляли собой мутацию G145R. Таким

образом, частота встречаемости этой мутации у онкогематологических больных составила 8,11% (3 из 37), а в целом среди всех исследованных образцов – 7,14% (4 из 56). В 2 случаях мутация оказалась гомогенной, а в 2 других – представленной в виде минорных популяций (22–25%). Оба образца со 100% мутацией G145R правильно идентифицированы иммуноферментной тест-системой. Тем не менее, чувствительность последней оказалась недостаточной для де-

**Таблица 1. Выявление мутации в позиции 143 аминокислотного остатка S-HBsAg вируса гепатита В в сыворотках с помощью иммуноферментной тест-системы «Гепастрип-мутант-3К»**

**Table 1. Detection of mutation in 143 amino acid position of S-HBsAg hepatitis B virus in sera using the enzyme-linked immunosorbent assay kit «Hepastrip-mutant-3K»**

№ сыворотки* Serum number*	Группа пациентов Patients' group	Маркеры вирусных гепатитов в сыворотке Markers of viral hepatitis in the serum								Свойства ВГВ по результатам NGS HBV properties according to NGS			Гепастрип-мутант-3К Hepastrip-mutant-3K			Оценка S-HBsAg S-HBsAg assessment
		ВГВ HBV				Другие Others							Оптимальное разведение сыворотки (1 : x) для определения конъюгатом‡ Optimal dilution of serum (1 : x) for detecting by conjugate‡			
		HBsAg§	анти-HBsAg§ anti-HBsAg§	HBeAg	анти-HBe IgG anti-HBe IgG	анти-HBc IgM + IgG anti-HBc IgM + IgG	ДНК, копий/мл DNA, copies/ml	анти-HCV anti-HCV	анти-HDV anti-HDV	Генотип Geno-type	Субтип Sub-type	Мутация в 143 а.о.† Mutation in 143 aa†	11F3	H2	NF5	
18	Онкогематология Hematologic malignancies	+	-	+	-	-	3,0 × 10 <sup>8</sup>	-	-	A	adw1	S143T 99%	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	дикий тип wild type
29		+	-	-	+	+	2,9 × 10 <sup>5</sup>	-	-	D	adw1	S143T 100%	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	дикий тип wild type
33		+	-	-	+	+	4,5 × 10 <sup>8</sup>	-	-	D	adw1	S143T 100%	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	дикий тип wild type
35		+	-	-	+	+	3,7 × 10 <sup>3</sup>	-	-	D	ayw3	S143L 31%	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	дикий тип wild type
77	Доноры Donors	95	<10	-	+	+	7,4 × 10 <sup>8</sup>	+	+	D	ayw3	S143L 100%	исходный original	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	замена в позиции 143 а.о. substitution in 143 aa position

**Примечание:** \*номера сывороток 1–40 из группы «Онкогематология» соответствуют нумерации из работы [7], содержащей детали диагноза и молекулярно-биологические характеристики; §величина обозначает установленную концентрацию аналита (МЕ/мл); †величина обозначает содержание ВГВ с указанной мутацией относительно общего пула вируса; ‡темно-серая заливка обозначает дефект распознавания в ≥100 раз, светло-серая – в ≥10 раз; «+» – положительный результат, «-» – отрицательный результат; NGS – секвенирование нового поколения.

**Note.** \*the numbers of sera from 1 to 40 from the group «Hematologic malignancies» correspond to the numbering according [7], which contains the details of the diagnosis and molecular biological features; §the value indicates the measured concentration of the analyte (IU/ml); †the value indicates the content of the HBV with such mutation relative to the total viral pool; ‡the recognition defect that is not less than 100 times is highlighted in dark gray, and the recognition defect that is not less than 10 times is highlighted in light gray; «+», positive result; «-», negative result; NGS, next generation sequencing.

текции минорных популяций G145R: в одном случае проба определена как дикий тип, а во втором – как замена в 143 а.о. В последнем случае образец ВГВ (№ 66) имел генотип, который можно отнести к рекомбинантной форме D/E. При этом он нёс в S-HBsAg минорную мутацию L216Opal (содержание 21%) наряду с относящимися к мутациям диагностического ускользания заменами V118A и V128A, что, вероятно, могло повлиять на выявление мутации G145R.

Среди оставшихся 47 образцов 8 представляли собой сыворотки со слабовыраженными дефек-

тами по моноклональным конъюгатам ( $\leq 10$  раз) (табл. 3). Объединяющих их мутаций, позволяющих отчётливо идентифицировать характерный серологический портрет, не обнаружено (табл. 3 и 4). Интересным представляется факт, что escape-мутация D144E, встречающаяся в гомогенном виде в образцах №№ 65 и 10, показала серологическую реакцию, отличающуюся от картины мутационных изменений в позициях 143 и 145 а.о., несмотря близкую к ним расположенность. В частности, оба образца с заменой D144E имели слабый дефект по конъюгату NF5. Эта

Таблица 2. Выявление мутации в позиции 145 аминокислотного остатка S-HBsAg вируса гепатита В в сыворотках с помощью иммуноферментной тест-системы «Гепастрип-мутант-3К»

Table 2. Detection of mutation in 145 amino acid position of S-HBsAg hepatitis B virus in sera using the enzyme-linked immunosorbent assay kit «Hepastrip-mutant-3K»

№ сыворотки* Serum Number*	Группа пациентов Patients' group	Маркеры вирусных гепатитов в сыворотке Markers of viral hepatitis in the serum								Свойства ВГВ по результатам NGS HBV properties according to NGS	Гепастрип-мутант-3К Hepastrip-mutant-3K			Оценка S-HBsAg S-HBsAg assessment		
		ВГВ HBV				Другие Others					Оптимальное разведение сыворотки (1 : x) для определения конъюгатом <sup>‡</sup> Optimal dilution of serum (1 : x) for detecting by conjugate <sup>‡</sup>					
		HBsAg <sup>§</sup>	анти-HBsAg <sup>§</sup> anti-HBsAg <sup>§</sup>	HBeAg	анти-HBe IgG anti-HBe IgG	анти-HBc IgM + IgG anti-HBc IgM + IgG	ДНК, копий/мл DNA, copies/ml	анти-HCV anti-HCV	анти-HDV anti-HDV		Генотип Genotype	Субтип Sub-type	Мутация в 145 а.о. <sup>†</sup> Mutation in 145 aa <sup>†</sup>		11F3	H2
1	Онкогематология Hematologic malignancies	60	30	–	+	+	$1,0 \times 10^8$	–	–	D/E?	ayw2/ay?	G145R 100%	10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	замена в позиции 145 а.о. substitution in 145 aa position
2		95	–	+	±	+	$9,4 \times 10^7$	–	–	D	adw3	G145R 100%	10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>3</sup>	замена в позиции 145 а.о. substitution in 145 aa position
15		+	–	–	+	+	$1,4 \times 10^8$	n/t <sup>#</sup> n/t <sup>#</sup>	–	D	ayw?	G145R 25%	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	дикий тип wild type
66	HBsAg-носители HBsAg carriers	>1	<10	+	+	+	$3,7 \times 10^8$	–	–	D/E?	ayw3	G145R 22%	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	замена в позиции 143 а.о. substitution in 143 aa position

**Примечание:** \*номера сывороток 1–40 из группы «Онкогематология» соответствуют нумерации из работы [7], содержащей детали диагноза и молекулярно-биологические характеристики; <sup>§</sup>величина обозначает установленную концентрацию аналита (МЕ/мл); <sup>†</sup>величина обозначает содержание ВГВ с указанной мутацией относительно общего пула вируса; <sup>‡</sup>тёмно-серая заливка обозначает дефект распознавания в  $\geq 100$  раз, светло-серая – в  $\geq 10$  раз; <sup>#</sup>n/t – не тестировано; «+» – положительный результат, «–» – отрицательный результат.

**Note.** \*the numbers of sera from 1 to 40 from the group «Hematologic malignancies» correspond to the numbering according [7], which contains the details of the diagnosis and molecular biological features; <sup>§</sup>the value indicates the measured concentration of the analyte (IU/ml); <sup>†</sup>the value indicates the content of the HBV with such mutation relative to the total viral pool; <sup>‡</sup>the recognition defect that is not less than 100 times is highlighted in dark gray, and the recognition defect that is not less than 10 times is highlighted in light gray; «+», positive result; «–», negative result; <sup>#</sup>n/t, not tested.



Таблица 3. Характеристика сывороток со слабовыраженными дефектами распознавания вируса гепатита В моноклональными конъюгатами из иммуноферментной тест-системы «Гепастрип-мутант-3К»

Table 3. Features of sera with mild defects of hepatitis B virus recognition by monoclonal conjugates with the enzyme-linked immunosorbent assay kit «Hepastrip-mutant-3K»

№ сыворотки* Serum number*	Группа пациентов Patients' group	Маркеры вирусных гепатитов в сыворотке Markers of viral hepatitis in serum										Гепастрип-мутант-3К Hepastrip-mutant-3K			Оценка S-HBsAg S-HBsAg assessment	
		ВГВ HBV						Другие Others		Свойства ВГВ по результатам NGS HBV properties according to NGS			Оптимальное разведение сыворотки (1 : x) для определения конъюгатом <sup>‡</sup> Optimal dilution of serum (1 : x) for detecting by conjugate <sup>‡</sup>			
		HBsAg <sup>§</sup>	анти-HBsAg <sup>§</sup> anti-HBsAg <sup>§</sup>	HBeAg	анти-HBe IgG anti-HBe IgG	анти-HBc IgM + IgG anti-HBc IgM + IgG	ДНК, копий/мл DNA, copies/ml	анти-HCV anti-HCV	анти-HDV anti-HDV	Гено-тип Geno-type	Суб-тип Sub-type	Общие мутации Mutual mutations	11F3	H2		NF5
14	Онкогематология Hematologic malignancies	+	-	-	+	+	6,0 × 10 <sup>7</sup>	н/д <sup>†</sup> n/t <sup>†</sup>	-	D	ayw2	нет none	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	замена в позиции 143 а.о. substitution in 143 a.o. position?
38	Онкогематология Hematologic malignancies	+	-	+	+	+	5,0 × 10 <sup>8</sup>	н/д n/t	-	D2	ayw3	нет none	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	замена в позиции 143 а.о. substitution in 143 a.o. position?
40	Онкогематология Hematologic malignancies	+	-	-	+	+	1,1 × 10 <sup>5</sup>	-	-	D2	ayw3	нет none	10 <sup>3</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	замена в позиции 143 а.о. substitution in 143 a.o. position?
63	HBsAg-носители HBsAg carriers	>1	-	+	+	+	4,4 × 10 <sup>5</sup>	-	-	D	ayw2	нет none	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	?
64	HBsAg-носители HBsAg carriers	>1	-	+	+	+	1,4 × 10 <sup>8</sup>	-	-	D	ayw2	нет none	10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	?
65	HBsAg-носители HBsAg carriers	>1	-	+	+	+	2,5 × 10 <sup>7</sup>	-	-	D/E?	adw2	нет none	10 <sup>6</sup>	10 <sup>6</sup>	10 <sup>5</sup>	?
9	Онкогематология Hematologic malignancies	+	н/т n/t	-	н/т n/t	+	н/т n/t	н/т n/t	н/т n/t	D	ayw3	нет none	10	10	исходный original	?
10	Онкогематология Hematologic malignancies	+	н/т n/t	н/т n/t	н/т n/t	н/т n/t	4,7 × 10 <sup>6</sup>	н/т n/t	н/т n/t	D	adw3	нет none	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>4</sup>	?

**Примечание:** \*номера сывороток 1–40 из группы «Онкогематология» соответствуют нумерации из работы [7], содержащей детали диагноза и молекулярно-биологические характеристики; <sup>§</sup>величина обозначает установленную концентрацию анализата (МЕ/мл); <sup>†</sup>н/т – не тестировано; <sup>‡</sup>серая заливка обозначает дефект распознавания в ≥10 раз; «+» – положительный результат, «-» – отрицательный результат; «?» – характер изменений неясен.

**Note.** \*the numbers of sera from 1 to 40 from the group «Hematologic malignancies» correspond to the numbering according [7], which contains the details of the diagnosis and molecular biological features; <sup>§</sup>the value indicates the measured concentration of the analyte (IU/ml); <sup>†</sup>n/t, not tested; <sup>‡</sup>the recognition defect that is not less than 10 times is highlighted in gray; «+», positive result; «-», negative result; «?», the details of the changes are unclear.



же мутация обнаружена ещё в одном образце группы «Онкогематология», однако её содержание не превышало 72%; вероятно, по этой причине в тест-системе «Гепастрип-мутант-3К» не зарегистрирован даже слабый дефект распознавания. Серологический портрет остальных 38 образцов также ничем не отличался от портрета дикого типа вируса.

HBsAg является основным серологическим маркером для выявления острой и мониторинга хронической ВГВ-инфекции. Уровень ДНК возбудителя у вирусоносителей, которые проходят лечение аналогами нуклеозидов/нуклеотидов, может опускаться ниже предела обнаружения. Поэтому для мониторинга течения хронической ВГВ-инфекции используется количественное определение HBsAg, в т.ч. в фазах иммунотолерантности, иммунного клиренса и иммунного контроля (неактивной фазы), а также при реактивации HBeAg-негативной формы заболевания [12]. Однако при использовании даже самых чувствительных методов определения HBsAg могут иметь место диагностические ошибки. Такая возможность появляется в том случае, если в образце присутствуют escape-мутанты, особенно при их множественном возникновении у одного и того же пациента. Это способствует увеличению эпидемиологической опасности, особенно учитывая накопление мутационных изменений в группах риска [7].

Полученные нами результаты показывают, что рутинный поиск escape-мутантов оправдан именно в таких субпопуляциях, одной из которых являются страдающие онкогематологическими заболеваниями лица. Escape-мутации S143L/T, D144E и G145R выявлены преимущественно у этой категории больных с частотой 10,81, 5,41 и 8,11% соответственно. Чувствительность иммуноферментного выявления этих мутаций оказалась невелика. Наиболее отчётливый результат достигнут при 100% гомогенности мутации и высокой концентрации ДНК ВГВ. Несмотря на это, обнаружена специфичность иммуноферментного выявления замены S143L в отличие от S143T. Кроме того, надёжность выявления мутаций S143L и G145R напрямую связана с глубиной выявляемых серологических дефектов. В случае мутации S143L снижение глубины дефекта распознавания мутантного HBsAg моноклональным конъюгатом 11F3 до величины  $\leq 10$  раз приводила к погрешности определения, выявляя в качестве сомнительных образцы с ВГВ, не содержащих такой замены. Это обосновывает необходимость проведения дальнейших экспериментов по уточнению количественных критериев используемой тест-системы.

Другим важным аспектом подхода, описанного в данной работе, может являться применение его в целях разработки и контроля качества вакцин, на-

**Таблица 4. Мутации в S-HBsAg в образцах со слабовыраженными дефектами распознавания вируса гепатита В моноклональными конъюгатами иммуноферментной тест-системы «Гепастрип-мутант-3К»**

**Table 4. Mutations in S-HBsAg in samples with mild defects of hepatitis B virus recognition by monoclonal conjugates of enzyme-linked immunosorbent assay kit «Hepastrip-mutant-3K»**

№ сыворотки* Serum number*	Группа пациентов Patients' group	Дефект по конъюгатам в ИФА Conjugate defect in ELISA	Генотип ВГВ HBV genotype	Субтип ВГВ HBV subtype	Аминокислотные замены в S-HBsAg и степень их гомогенности Amino acid substitutions in S-HBsAg, and their homogeneity
14	Онкогематология Hematologic malignancies	11F3, H2	D	ayw2	V118T (100%); V128A (100%); E164A (40%); T189I (21%); S207N/H/R (39%); L222I (21%)
38	Онкогематология Hematologic malignancies		D2	ayw3	нет none
40	Онкогематология Hematologic malignancies		D2	ayw3	S114P (<100%)
63	HBsAg-носители HBsAg carriers	NF 5	D	ayw2	V118T (100%); V128A (100%); T189I (68%); L216Opal (21%)
64	HBsAg-носители HBsAg carriers		D	ayw2	R24K (27%); V118T (100%); V128A (100%)
65	HBsAg-носители HBsAg carriers		D/E?	adw2	P11L (99%); V118T (100%); V128A (100%); Y134H (94%); D144E (100%); V177A (98%)
9	Онкогематология Hematologic malignancies		D	ayw3	S114A (97%)
10	Онкогематология Hematologic malignancies	H2, NF5	D	adw3	V118T (100%); V128A (100%); D144E (100%); S174N (100%); L222R (66%); I226S (99%)

**Примечание:** \*номера сывороток 1–40 из группы «Онкогематология» соответствуют нумерации из работы [7], содержащей детали диагноза и молекулярно-биологические характеристики; ИФА – иммуноферментный анализ.

**Note.** \*the numbers of sera from 1 to 40 from the group «Hematologic malignancies» correspond to the numbering according [7], which contains the details of the diagnosis and molecular biological features; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay.

правленных против ескаре-мутантов. В такой ситуации рекомбинантный HBsAg с мутацией может рассматриваться как гомогенный белковый препарат, и тест-система «Гепастрип-мутант-3К» позволит отчётливо выявлять правильный фолдинг этого мутантного белка в количественном отношении.

### Заключение

Иммуноферментный вариант детекции ескаре-мутаций S143L, D144E и G145R может быть использован в рутинной лабораторной диагностике, особенно в группах риска. Тем не менее, возможно уточнение параметров диагностической чувствительности и специфичности тест-системы, а также критериев оценки наличия мутационных изменений при дополнительных исследованиях на увеличенной выборке образцов, охарактеризованных молекулярно-биологическими методами. Кроме того, данная тест-система и методика в целом применимы для разработки и контроля качества вакцин против ескаре-мутантов.

### ЛИТЕРАТУРА

- Mahamat G., Kenmoe S., Akazong E.W., Ebogo-Belobo J.T., Mbaga D.S., Bowo-Ngandji A., et al. Global prevalence of hepatitis B virus serological markers among healthcare workers: A systematic review and meta-analysis. *World J. Hepatol.* 2021; 13(9): 1190–202. <https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i9.1190>
- Polaris Observatory Collaborators. The case for simplifying and using absolute targets for viral hepatitis elimination goals. *J. Viral Hepat.* 2021; 28(1): 12–9. <https://doi.org/10.1111/jvh.13412>
- Han Q., Zhang C., Zhang J., Tian Z. The role of innate immunity in HBV infection. *Semin. Immunopathol.* 2013; 35(1): 23–38. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0331-y>
- Araujo N.M., Teles S.A., Spitz N. Comprehensive Analysis of Clinically Significant Hepatitis B Virus Mutations in Relation to Genotype, Subgenotype and Geographic Region. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 616023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.616023>
- Баженов А.И., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Будницкая П.З., Никитина Г.И., Хац Ю.С., и др. Выявление антител к мутантным формам HBsAg у лиц, иммунизированных против гепатита В вакцинами разных субтипов. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2011; 5(60): 49–53.
- Hossain M.G., Ueda K. A meta-analysis on genetic variability of RT/HBsAg overlapping region of hepatitis B virus (HBV) isolates of Bangladesh. *Infect. Agent. Cancer.* 2019; 14: 33. <https://doi.org/10.1186/s13027-019-0253-6>
- Konopleva M.V., Belenikin M.S., Shanko A.V., Bazhenov A.I., Kiryanov S.A., Tupoleva T.A., et al. Detection of S-HBsAg Mutations in Patients with Hematologic Malignancies. *Diagnostics (Basel).* 2021; 11(6): 969. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11060969>
- Семенов Т.А., Ярош Л.В., Баженов А.И., Никитина Г.Ю., Клейменов Д.А., Эльгорт Д.А., и др. Эпидемиологическая оценка распространенности «скрытых» форм и HBsAg-мутантов вируса гепатита В у гематологических больных. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика.* 2012; 6(67): 9–14.
- Hsu H.Y., Chang M.H., Ni Y.H., Chen H.L. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan. *Gut.* 2004; 53(10): 1499–503. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.034223>
- Komatsu H., Inui A., Umetsu S., Tsunoda T., Sogo T., Konishi Y., et al. Evaluation of the G145R Mutant of the Hepatitis B Virus as a Minor Strain in Mother-to-Child Transmission. *PLoS One.* 2016; 11(11): e0165674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165674>
- Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* 2005; 32(2): 102–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.008>
- Deguchi M., Kagita M., Yoshioka N., Tsukamoto H., Takao M., Tahara K., et al. Evaluation of the highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay “Lumipulse HBsAg-HQ” for hepatitis B virus screening. *J. Clin. Lab. Anal.* 2018; 32(4): e22334. <https://doi.org/10.1002/jcla.22334>
- Konopleva M.V., Борисова В.Н., Соколова М.В., Фельдшерова А.А., Крымский М.А., Семенов Т.А., и др. Сравнительная характеристика антигенных свойств рекомбинантных и нативных HBs-антигенов с мутацией G145R и оценка их иммуногенности. *Вопросы вирусологии.* 2017; 62(4): 179–86. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-179-186>
- Cuestas M.L., Mathet V.L., Oubiña J.R. Specific primer sets used to amplify by PCR the hepatitis B virus overlapping S/Pol region select different viral variants. *J. Viral Hepat.* 2012; 19(10): 754–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2012.01614.x>
- Zhang M., Gong Y., Osiowy C., Minuk G.Y. Rapid detection of hepatitis B virus mutations using real-time PCR and melting curve analysis. *Hepatology.* 2002; 36(3): 723–8. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.35346>
- Osiowy C. Sensitive Detection of HBsAg Mutants by a Gap Ligase Chain Reaction Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(7): 2566–71. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2566-2571.2002>
- Nainan O.V., Khristova M.L., Byun K., Xia G., Taylor P.E., Stevens C.E., et al. Genetic variation of hepatitis B surface antigen coding region among infants with chronic hepatitis B virus infection. *J. Med. Virol.* 2002; 68(3): 319–27. <https://doi.org/10.1002/jmv.10206>
- Osiowy C. Detection of HBsAg mutants. *J. Med. Virol.* 2006; 78(S1): S48–51. <https://doi.org/10.1002/jmv.20607>
- Gauthier M., Bonnaud B., Arsac M., Lavocat F., Maisetti J., Kay A., et al. Microarray for hepatitis B virus genotyping and detection of 994 mutations along the genome. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11): 4207–15. <https://doi.org/10.1128/JCM.00344-10>
- Баженов А.И., Коноплева М.В., Эльгорт Д.А., Фельдшерова А.А., Будницкая П.З., Никитина Н.И., и др. Алгоритм серологического поиска и оценка распространенности серологически значимых HBsAg-мутаций у хронических носителей вируса гепатита В. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2007; 6: 30–7.
- Tijssen P., Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates enzyme immunoassays. *Anal. Biochem.* 1984; 136(2): 451–7. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90243-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90243-4)
- Pumpens P., Grens E., Nassal M. Molecular Epidemiology and Immunology of Hepatitis B Virus Infection. *Intervirology.* 2002; 45: 218–32.
- Zheng X., Weinberger K.M., Gehrke R., Isogawa M., Hilken G., Kemper T., et al. Mutant hepatitis B virus surface antigens (HBsAg) are immunogenic but may have a changed specificity. *Virology.* 2004; 329: 454–64. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.033>
- Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* 2005; 32: 102–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.008>
- Norder H., Hammas B., Löfdahl S., Couroucé A.M., Magnius L.O. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J. Gen. Virol.* 1992; 73(5): 1201–8. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-5-1201>
- Norder H., Couroucé A.M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S.D., Mushahwar I.K., et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology.* 2004; 47(6): 289–309. <https://doi.org/10.1159/000080872>
- Pult I., Chouard T., Wieland S., Klemenz R., Yaniv M., Blum H.E. A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B. *Hepatology.* 1997; 25(6): 1507–15. <https://doi.org/10.1002/hep.510250633>

### REFERENCES

- Mahamat G., Kenmoe S., Akazong E.W., Ebogo-Belobo J.T., Mbaga D.S., Bowo-Ngandji A., et al. Global prevalence of hepatitis B virus serological markers among healthcare workers: A systematic review and meta-analysis. *World J. Hepatol.* 2021; 13(9): 1190–202. <https://doi.org/10.4254/wjh.v13.i9.1190>
- Polaris Observatory Collaborators. The case for simplifying and using absolute targets for viral hepatitis elimination goals. *J. Viral Hepat.* 2021; 28(1): 12–9. <https://doi.org/10.1111/jvh.13412>

3. Han Q., Zhang C., Zhang J., Tian Z. The role of innate immunity in HBV infection. *Semin. Immunopathol.* 2013; 35(1): 23–38. <https://doi.org/10.1007/s00281-012-0331-y>
4. Araujo N.M., Teles S.A., Spitz N. Comprehensive Analysis of Clinically Significant Hepatitis B Virus Mutations in Relation to Genotype, Subgenotype and Geographic Region. *Front. Microbiol.* 2020; 11: 616023. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.616023>
5. Bazhenov A.I., Elgort D.A., Feldsherova A.A., Budnitskaya P.Z., Nikitina G.I., Hats Yu.S., et al. Detection of antibodies to HBsAg mutant forms in individuals immunized of different subtypes hepatitis B vaccines [Vyyavlenie antitel k mutantnym formam HBsAg u lits, immunizirovannykh protiv gepatita B vaksiniami raznykh subtipov]. *Epidemiologiya i Vaksinoprofilaktika.* 2011; 5(60): 49–53 (in Russian).
6. Hossain M.G., Ueda K. A meta-analysis on genetic variability of RT/HBsAg overlapping region of hepatitis B virus (HBV) isolates of Bangladesh. *Infect. Agent. Cancer.* 2019; 14: 33. <https://doi.org/10.1186/s13027-019-0253-6>
7. Konopleva M.V., Belenikin M.S., Shanko A.V., Bazhenov A.I., Kiryanov S.A., Tupoleva T.A., et al. Detection of S-HBsAg Mutations in Patients with Hematologic Malignancies. *Diagnostics (Basel).* 2021; 11(6): 969. <https://doi.org/10.3390/diagnostics11060969>
8. Semenenko T.A., Yarosh L.V., Bazhenov A.I., Nikitina G.Yu., Kleimenov D.A., Elgort D.A., et al. Epidemiological evaluation of the prevalence of «occulb» forms and HBsAg mutants of hepatitis B virus in hematological patients [Epidemiologicheskaya otsenka rasprostranennosti «skrytykh» form i HBsAg-mutantov virusa gepatita B u gematologicheskikh bol'nykh]. *Epidemiologiya i Vaksinoprofilaktika.* 2012; 6 (67): 9–14 (in Russian).
9. Hsu H.Y., Chang M.H., Ni Y.H., Chen H.L. Survey of hepatitis B surface variant infection in children 15 years after a nationwide vaccination programme in Taiwan. *Gut.* 2004; 53(10): 1499–503. <https://doi.org/10.1136/gut.2003.034223>
10. Komatsu H., Inui A., Umetsu S., Tsunoda T., Sogo T., Konishi Y., et al. Evaluation of the G145R Mutant of the Hepatitis B Virus as a Minor Strain in Mother-to-Child Transmission. *PLoS One.* 2016; 11(11): e0165674. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165674>
11. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* 2005; 32(2): 102–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.008>
12. Deguchi M., Kagita M., Yoshioka N., Tsukamoto H., Takao M., Tahara K., et al. Evaluation of the highly sensitive chemiluminescent enzyme immunoassay “Lumipulse HBsAg-HQ” for hepatitis B virus screening. *J. Clin. Lab. Anal.* 2018; 32(4): e22334. <https://doi.org/10.1002/jcla.22334>
13. Konopleva M.V., Borisova V.N., Sokolova M.V., Feldsherova A.A., Krymskij M.A., Semenenko T.A., et al. A comparative characteristic of antigenic properties of recombinant and native HBs-antigens with G145R mutation and evaluation of their immunogenicity [Srvnittel'naya kharakteristika antigennykh svoystv rekombinantnykh i nativnykh HBs-antigenov s mutatsiyey G145R i otsenka ikh immunogennosti]. *Voprosy virusologii.* 2017; 62(4): 179–86. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2017-62-4-179-186> (in Russian)
14. Cuestas M.L., Mathet V.L., Oubiña J.R. Specific primer sets used to amplify by PCR the hepatitis B virus overlapping S/Pol region select different viral variants. *J. Viral. Hepat.* 2012; 19(10): 754–6. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2012.01614.x>
15. Zhang M., Gong Y., Osiowy C., Minuk G.Y. Rapid detection of hepatitis B virus mutations using real-time PCR and melting curve analysis. *Hepatology.* 2002; 36(3): 723–8. <https://doi.org/10.1053/jhep.2002.35346>
16. Osiowy C. Sensitive Detection of HBsAg Mutants by a Gap Ligase Chain Reaction Assay. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40(7): 2566–71. <https://doi.org/10.1128/JCM.40.7.2566-2571.2002>
17. Nainan O.V., Khristova M.L., Byun K., Xia G., Taylor P.E., Stevens C.E., et al. Genetic variation of hepatitis B surface antigen coding region among infants with chronic hepatitis B virus infection. *J. Med. Virol.* 2002; 68(3): 319–27. <https://doi.org/10.1002/jmv.10206>
18. Osiowy C. Detection of HBsAg mutants. *J. Med. Virol.* 2006; 78(S1): S48–51. <https://doi.org/10.1128/JCM.00344-10>
19. Gauthier M., Bonnaud B., Arsac M., Lavocat F., Maisetti J., Kay A., et al. Microarray for hepatitis B virus genotyping and detection of 994 mutations along the genome. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(11): 4207–15. <https://doi.org/10.1128/JCM.00344-10>
20. Bazhenov A.I., Konopleva M.V., Elgort D.A., Feldsherova A.A., Budnitskaya P.Z., Nikitina N.I., et al. Algorithm of serologic screening and assessment of prevalence of serologically meaningful mutations of HBsAg in hepatitis B virus carriers [Algoritm serologicheskogo poiska i otsenka rasprostranennosti serologicheskikh znachimyykh HBsAg-mutatsiy u khronicheskikh nositeley virusa gepatita B]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 6: 30–7 (in Russian).
21. Tijssen P., Kurstak E. Highly efficient and simple methods for the preparation of peroxidase and active peroxidase-antibody conjugates enzyme immunoassays. *Anal. Biochem.* 1984; 136 (2): 451–7. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(84\)90243-4](https://doi.org/10.1016/0003-2697(84)90243-4)
22. Pumpens P., Grens E., Nassal M. Molecular Epidemiology and Immunology of Hepatitis B Virus Infection. *Intervirology.* 2002; 45: 218–32.
23. Zheng X., Weinberger K.M., Gehrke D., Isogawa M., Hilkene G., Kemper T. et al. Mutant hepatitis B virus surface antigens (HBsAg) are immunogenic but may have a changed specificity. *Virology.* 2004; 329: 454–64. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2004.08.033>
24. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J. Clin. Virol.* 2005; 32: 102–12. <https://doi.org/10.1016/j.jcv.2004.10.008>
25. Norder H., Hammas B., Löfdahl S., Couroucé A.M., Magnus L.O. Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *J. Gen. Virol.* 1992; 73(5): 1201–8. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-73-5-1201>
26. Norder H., Couroucé A.M., Coursaget P., Echevarria J.M., Lee S.D., Mushahwar I.K. et al. Genetic diversity of hepatitis B virus strains derived worldwide: genotypes, subgenotypes, and HBsAg subtypes. *Intervirology.* 2004; 47(6): 289–309. <https://doi.org/10.1159/000080872>
27. Pult I., Chouard T., Wieland S., Klemenz R., Yaniv M., Blum H.E. A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B. *Hepatology.* 1997; 25(6): 1507–15. <https://doi.org/10.1002/hep.510250633>