

М. А. Крымский^{1, 2}, Р. М. Крымский¹, М. В. Буданов¹, В. Н. Борисова¹

СООТВЕТСТВИЕ ВАКЦИН ПРОТИВ ГЕПАТИТА В ТИПУ ВИРУСА, ПРЕВАЛИРУЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Поступила в редакцию 07.06.10. Принята к печати 24.08.10.

На данный момент во всем мире выявлено больше десятка подтипов вируса гепатита В, отличающихся сочетанием антигенных детерминант в поверхностном антигене HBsAg (Hepatitis B surface Antigen) — белке, образующем наружную оболочку вируса. Все эти подтипы вируса можно разбить на две основных группы: серотип «ау» и серотип «ад», отличающиеся второй взаимоисключающей антигенной детерминантой (*y* или *d*). В разных зонах земного шара обычно превалирует один из серотипов. В России доминирующим является серотип «ау» (от 75 до 95 % в разных регионах). Вполне логично, что вакцинацию следует проводить против эндемичного вируса, т.е. вируса того серотипа, который распространен на данной территории. В частности, в России необходимо прививать население против вируса гепатита В серотипа «ау». В противном случае из-за неполного иммунитета снижается порог инфицирования и увеличивается количество случаев заболевания гепатитом В среди уже вакцинированного населения. Для вакцинации против гепатита В последние 20 лет во всем мире используются рекомбинантные вакцины, состоящие из HBsAg того или иного серотипа. Мы исследовали серотипы HBsAg в вакцинах, присутствующих на российском рынке, и выявили, что на данный момент только компания ЗАО НПК «Комбиотех» поставляет на российский рынок вакцину против гепатита В серотипа «ау», превалирующего на территории России.

Ключевые слова: HBsAg, вакцина, гепатит В, серотип, подтип, антитела.

Гепатит В является одной из наиболее распространенных причин заболеваемости и смертности во всем мире. По причине повсеместного распространения вируса гепатита В (ВГВ) и многообразия клинических форм заболевания, включая острый и хронический гепатит, цирроз печени и гепатоцеллюлярную карциному, гепатит В представляет собой глобальную проблему здравоохранения. За последнее время приблизительно 2 млрд. человек по всему миру были инфицированы ВГВ и более чем 350 млн. являются носителями вируса в настоящее время [1]. По разным оценкам в Российской Федерации проживает от 3 до 5 млн. человек, инфицированных ВГВ [2].

На данный момент во всем мире выявлено больше десятка подтипов ВГВ, отличающихся сочетанием антигенных детерминант в поверхностном антигене HBsAg — гликопротеине, образующем наружную оболочку вируса [3, 4]. HBsAg содержит иммунодоминантную детерминанту «а», которая присутствует во всех се-

ротипах и генотипах ВГВ и расположена в пределах протяженного антигенного участка (аминокислоты 124 – 147), называемого главной гидрофильной областью. Третичная структура этой области крайне важна для ее распознавания иммунной системой. Также в этой области расположены две пары взаимоисключающих антигенных детерминант *y/d* и *w/r*. Помимо перечисленных существуют и дополнительные (минорные) детерминанты, что приводит к еще большему числу подтипов [5]. Однако исторически сложилось что, основываясь на существовании специфических антисывороток, все многообразие подтипов ВГВ принято разбивать на две основных группы: серотип «ау» и серотип «ад». В разных зонах земного шара обычно превалирует один из серотипов [3, 4, 6]. В России доминирующим является серотип «ау» (от 75 до 95 % в разных регионах) [7, 8].

На протяжении уже многих лет в вакцинах для профилактики ВГВ во всем мире используется рекомбинантный HBsAg того или иного серотипа. До недавнего времени преобладало мнение, что наличие общей детерминанты «а» во всех вакцинах вызывает универсальный иммунный ответ против всех известных подтипов

¹ ЗАО НПК «Комбиотех», Россия, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая 16/10, ИБХ РАН.

² mk@combiotech.com

ВГВ, а поэтому необходимость использования в вакцине именно того подтипа поверхностного антигена, который превалирует на данной территории, необязательна [9]. Однако в последнее время в литературе появились работы, опровергающие это мнение. Так, было установлено, что позиции 141 и 146 аминокислотной последовательности HBsAg являются критическими при взаимодействии антиген-антитело, и замена только лизина на глутаминовую кислоту в 141 положении позволяет нарушить связывание HBsAg с антителами, несмотря на их высокий уровень после вакцинации [10]. Также показано, что при введении препаратов разных подтипов HBsAg вырабатываются антитела, соответствующие введенному подтипу [11, 12], и Т- и В-лимфоцитарный ответ специфичен подтипу и генотипу вируса [13]. Различия, связанные с подтипами, несут ответственность за появление в одной и той же пробе крови вакцинированных положительной реакции на HBsAg и на анти-HBsAg, что свидетельствует о неполном иммунитете к ВГВ в некоторых случаях [14, 15].

Эти данные указывают на то, что при вакцинации против подтипа вируса, не являющегося эндемичным для данной территории, из-за неполного иммунитета снижается порог инфицирования и увеличивается количество случаев заболевания гепатитом В среди уже вакцинированного населения. В качестве аналогии можно привести вакцинацию против вируса гриппа. Каждый год Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) выдает рекомендации о том, какие штаммы (серотипы) вируса гриппа будут превалировать в текущем году в каждом регионе мира. На основании этих данных страны проводят вакцинацию именно против этих штаммов. Иногда прогнозы ВОЗ не сбываются, и тогда эффективность вакцинации против вируса гриппа сильно снижается. Другим подходом к проблеме соответствия типов вакцин и микроорганизмов, против которых эти вакцины направлены, является создание поливалентных вакцин, состоящих из смеси антигенов разных серотипов данного микроорганизма. Например, поливалентные вакцины против вируса гриппа, вируса герпеса, пневмококковой и менингококковой инфекции и др.

Из вышесказанного следует, что вакцинацию следует проводить против эндемичного вируса, т. е. вируса того серотипа, который распространен на данной территории. В частности, в России необходимо прививать население против вируса гепатита В серотипа «ау». Цель данной работы — определение серотипа HBsAg в вакцинах для профилактики ВГВ, присутствующих на российском рынке. Выполнение

данной работы основывалось на существовании моноклональных антител, специфически связывающихся только с одним серотипом HBsAg.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все использованные биохимические реактивы общего назначения приобретены в фирмах Sigma (США), Fluka (Швейцария), Диа-М (Россия), Хеликон (Россия). Реактивы и материалы для электрофореза, иммуноблоттинга и иммуноферментного анализа (ИФА) приобретены у Amersham (UK) и Bio-Rad (США).

В работе использовали следующие первичные антитела:

- 3Е7-АУ: моноклональные антитела MGV Hbs, специфичные к серотипу «ау» HBsAg («Имтек», Москва, Россия);
- 2F9-АУ: моноклональные антитела 2F9, специфичные к серотипу «ау» (ООО «Биалекса», Россия);
- 3С3-AD: моноклональные антитела 3С3, специфичные к серотипу «ад» (ООО «Биалекса», Россия);
- SIM-AD: моноклональные антитела SIM 2ZHВ12, специфичные к серотипу «ад» HBsAg («Cosmo Bio Co., Ltd.», Токио, Japan);
- poly-anti-HBsAg: поликлональные антитела ab32916, связывающиеся с серотипом «ау», и с «ад» («Abcam», Cambridge, UK).

Вторичные антитела к иммуноглобулинам кролей и мышей, конъюгированные с пероксидазой хрена, были производства Amersham (UK) и Bio-Rad (США) соответственно.

В работе использовали вакцины, предоставленные ФГУН ГИСК им. Л. А. Тарасевича.

Десорбция HBsAg с гидроокиси алюминия и приготовление образцов для иммуноблоттинга, иммуноферментного анализа (ИФА) и масс-спектрометрии

Для иммуноблоттинга содержимое ампулы с вакциной переносили в центрифужную пробирку и осаждали гидроокись алюминия центрифугированием при 6700g в течение 10 мин. К осадку, содержащему адсорбированный на гидроокиси алюминия HBsAg, добавляли 0,4 М фосфатный буфер (рН 8,0) в объеме 1/40 от исходного объема вакцины и столько же двукратного восстанавливающего инкубационного буфера (2x Laemmli Sample Buffer: 4 % SDS, 20 % glycerol, 10 % β-меркаптоэтанол, 0,004 % бромфеноловый голубой, 0,125 М трис-НCl, рН 6,8 [16]) и инкубировали при 100 °С в течение 10 мин. Центрифугировали при 6700g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость, содержащую десорбированный поверхностный антиген, ана-

лизировали при помощи электрофореза в присутствии SDS и последующим иммуноблотингом (SDS-PAGE — иммуноблотинг).

Для ИФА и масс-спектрометрии содержимое ампулы с вакциной переносили в центрифужную пробирку и осаждали гидроокись алюминия центрифугированием при 6700g в течение 10 мин. К осадку добавляли 0,4 М фосфатный буфер (pH 9,6) в объеме 1/10 от исходного объема вакцины и инкубировали при 57 °С в течение 60 мин. После центрифугирования при 9000g в течение 10 мин осадок еще раз экстрагировали в тех же условиях фосфатным буфером, и объединенные надосадочные жидкости анализировали с помощью ИФА и масс-спектрометрии.

Электрофорез и иммуноблотинг

Образцы HBsAg, десорбированные с гидроокиси алюминия, подвергали электрофорезу в пластинах 13,5 % полиакриламидного геля в присутствии додецилсульфата натрия (SDS-PAGE) и β-меркаптоэтанола по методу Лэммли [16]. Гели окрашивали Coomassie Blue R-250.

Иммуноблоттинг проводили по методу Тобина [17]: использовали электроперенос на поливинилиден дифлюорид (PVDF) мембрану в стандартном Трис-глицин/этанол буфере, содержащем 0,02 % SDS. После переноса мембрану блокировали в течение 1 ч 5 % раствором обезжиренного молока в PBS. Инкубации с антителами проводили в PBS, содержащем 0,1 % Твин-20 и 1 % обезжиренного молока в течение 16 ч на +4 °С. В качестве вторых антител использовали конъюгаты антител с пероксидазой хрена в разведениях, рекомендованных производителем. Инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре. Для выявления белковых полос использовали хемилюминесцентную детекцию (ECL) с помощью набора реактивов фирмы Amersham (UK).

Иммуноферментный анализ

Образцы HBsAg в двукратных разведениях концентраций от 250 до 4 нг/мл сорбировали на 96-луночную плоскодонную плашку в течение 16 ч при +4°C, блокировали в течение 1 ч 5 % раствором обезжиренного молока в PBS при 37 °С. Инкубировали с растворами первичных и вторичных антител по 1 ч при 37 °С. Колориметрическую реакцию с конъюгированными с пероксидазой хрена вторичными антителами определяли с использованием в качестве субстрата тетраметилбензидина по методике производителя Imtek (Россия) при длине волны 450 нм.

Масс-спектрометрический анализ

Ограниченный ферментативный гидролиз проводили по следующей методике. К 70 мкл раствора, содержащего 14 мкг белка в фосфатном буфере, было добавлено 0,4 мкг бычьего трипсина, после чего раствор оставили в термостате на 18 ч при 37 °С. По истечении этого времени к реакционной смеси было добавлено 0,4 мкг химотрипсина и раствор инкубировали в термостате еще 18 ч при 37 °С. Реакцию останавливали добавлением 10 мкл муравьиной кислоты.

Обессоливание образца проводили с использованием обращенно-фазовой микроколонки из мембраны Empore Disk C18 (3М, каталожный номер 2215). Микроколонку промывали последовательно 20 мкл метанола, 20 мкл 0,1 % ТФУ и наносили на нее 15 мкл реакционной смеси. После пропускания через колонку раствора образца ее промывали 20 мкл 0,1 % ТФУ, и сорбированные пептиды элюировали 20 мкл 50 % ацетонитрила в 0,1 % ТФУ. Элюат концентрировали на центрифужном концентраторе до 5 мкл.

Масс-спектрометрический анализ проводили на времяпролетном MALDI масс-спектрометре Ultraflex TOF/TOF (Bruker Daltonics) в отражательном режиме регистрации положительно заряженных ионов. В качестве матрицы использовали 2,5-дигидроксибензойную кислоту, растворенную в концентрации 18 мг/мл в 50 % ацетонитриле в 0,1 % ТФУ. Растворы образца (1 мкл) и матрицы (1 мкл) смешивали непосредственно на масс-спектрометрической мишени. Анализ масс-спектрометрических данных проводили с использованием компьютерной программы FlexAnalyses 2.4 (Bruker Daltonics), соотношение масс-спектрометрических пиков с аминокислотной последовательностью белка проводили с использованием программы BioTools 3.1 (Bruker Daltonics).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования использовали доступные на отечественном рынке вакцины против гепатита В производства следующих фирм: ЗАО НПК «Комбиотех» (Россия); ЗАО «Биннофарм» (Россия); Sanofi Pasteur (Франция); Centro De Ingenleria Genetica Biotecnologia — CIGB (Куба) и Shantha Biotechnics (Индия). Где было доступно, использовали образцы вакцин разных серий. Используемые далее в тексте краткие обозначения исследуемых образцов приведены в табл. 1.

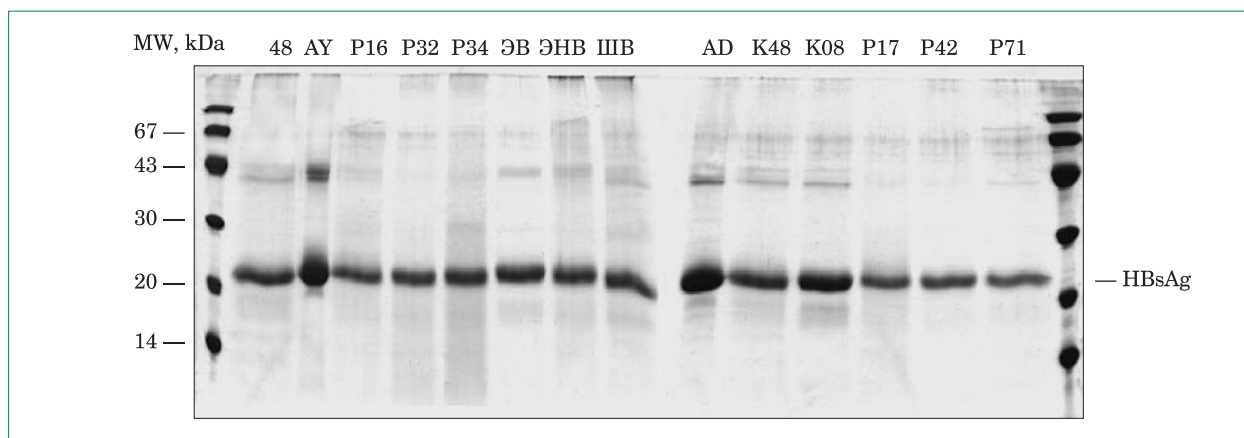


Рис. 1. SDS-PAGE поверхностного антигена гепатита В после десорбции с гидроокиси алюминия. Окраска Coomassie Blue. Обозначения дорожек соответствуют кратким обозначениям образцов вакцин, приведенным в табл. 1. Слева от геля приведены стандарты масс LMW.

Десорбция HBsAg с гидроокиси алюминия

В готовой форме вакцины HBsAg антиген адсорбирован на гидроокиси алюминия, используемой в качестве адъюванта. Для анализа антигена необходимо было десорбировать с гидроокиси алюминия. Десорбция осуществлялась или при 100 °С в присутствии детергента и восстановителя для иммуноблотинга, или при 56 °С без детергента или восстановителя для ИФА, чтобы сохранить нативное состояние антигена (см. раздел Материалы и методы). Процесс десорбции контролировался при помощи

SDS-PAGE (рис. 1). Видно, что во всех исследуемых вакцинах десорбция прошла успешно — на электрофореграмме всех образцов присутствует антиген HBsAg с молекулярной массой 22 – 24 kDa. Следует отметить, что при SDS-PAGE с использованием Coomassie Blue белки окрашиваются неспецифически, т. е. независимо от серотипа антигена.

Определение наличия серотипа «ау» иммуноблотингом

Очищенные из вакцин образцы HBsAg анализировали с помощью иммуноблотинга. Моно-

Таблица 1. Краткие обозначения исследуемых образцов вакцин против гепатита В

Обозначение	Вакцина	Серия	Производитель
AY	Стандарт HBsAg, серотип «ау»		
AD	Стандарт HBsAg, серотип «ad»		
K08	«Комбиотех», серотип «ad»	008-1009	Комбиотех
K48	«Комбиотех», серотип «ау»	048-0709	Комбиотех
P03	«Регевак В»	031014	Биннофарм
P16	«Регевак В»	160609	Биннофарм
P17	«Регевак В»	170609	Биннофарм
P18	«Регевак В»	180609	Биннофарм
P19	«Регевак В»	190709	Биннофарм
P20	«Регевак В»	200709	Биннофарм
P22	«Регевак В»	220809	Биннофарм
P32	«Регевак В»	320909	Биннофарм
P34	«Регевак В»	340909	Биннофарм
P42	«Регевак В»	421009	Биннофарм
P50	«Регевак В»	501009	Биннофарм
P71	«Регевак В»	711109	Биннофарм
ЭВ	«Euvax В» (Эувакс В)	ULX07005	Sanofi Pasteur
ЭНВ	«Heberbiovac HB» (Эбербиовак HB)	70442/0	CIGB
ШВ	«Шанвак-В»	HB78407	Shantha Biotechnics

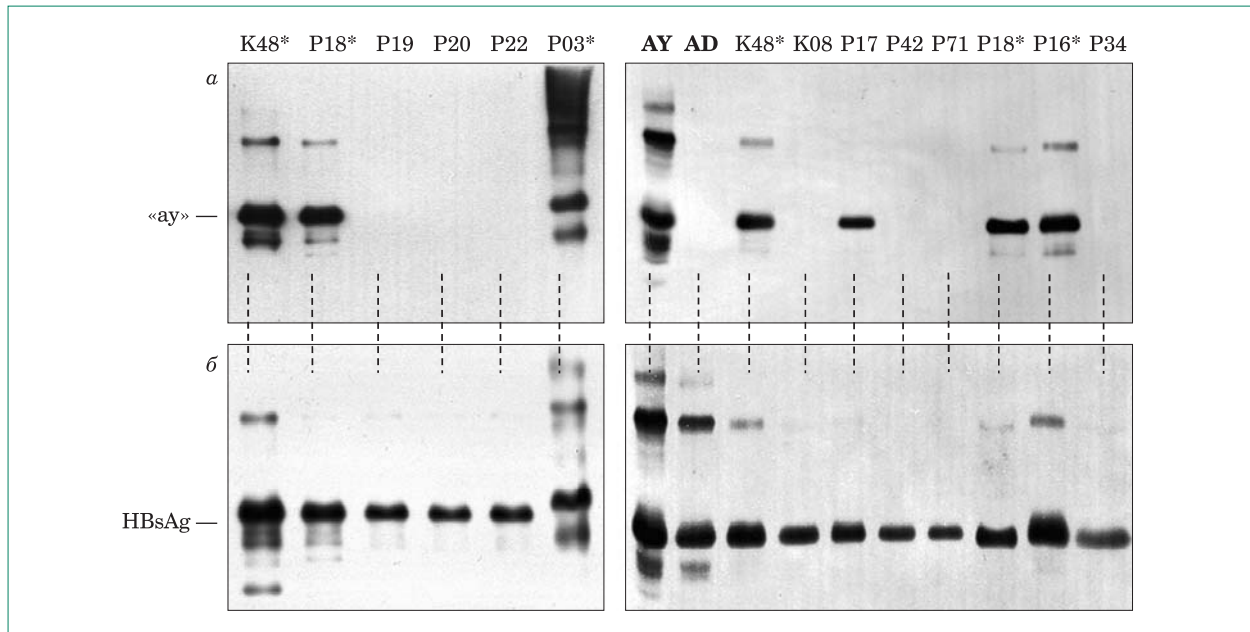


Рис. 2. Определение серотипа вакцин («ay» или «ad») с помощью иммуноблоттинга: а — 3E7-AU моноклональные антитела специфичные к серотипу «ay»; б — poly-anti-HBs — универсальные поликлональные антитела к HBsAg; * — вакцины, содержащие HBsAg серотипа «ay».

клональные антитела 3E7-AU выявили наличие HBsAg серотипа «ay» в вакцине «Комбиотех» серии 48 и вакцине «Регевак В», но только в сериях до 18 включительно (рис. 2, а, помечены звездочкой). Начиная с серии 19 в вакцине «Регевак В» антиген HBsAg серотипа «ay» не обнаруживается. Для подтверждения наличия HBsAg серотипа, отличного от «ay», в этих сериях вакцины «Регевак В» все образцы были проанализированы иммуноблоттингом с универсальными поликлональными антителами poly-anti-HBsAg, связывающимися с антигеном любого серотипа. Результаты показали, что все образцы содержат HBsAg того или иного серотипа («ay» или «ad») в сопоставимых количествах (рис. 2, б).

Аналогичный анализ на наличие HBsAg серотипа «ay» при помощи антител 3E7-AU был проведен для вакцин против гепатита В производства зарубежных фирм, присутствующих на российском рынке. Анализ определенно показал отсутствие антигена серотипа «ay» в зарубежных вакцинах (рис. 3, образцы ЭВ, ЭНВ, ШВ).

Иммуноферментный анализ

Логично предположить, что если в образце вакцины присутствует HBsAg антиген, но нет серотипа «ay», то это должен быть антиген серотипа «ad». К сожалению, все доступные антитела к серотипу «ad» связываются только с нативной формой HBsAg в виде вирусоподобных частиц и не работают в условиях SDS-ПААГЭ — имму-

ноблоттинга, так как в этих условиях происходит полное разворачивание молекулы белка и соответственно распад вирусоподобной частицы на мономеры. Поэтому для подтверждения наличия в вакцине HBsAg серотипа «ad» образцы трех серий (17, 42, 71) вакцины «Регевак В» проанализировали методом ИФА, позволяющим сохранить нативную конфигурацию исследуемого белка. Использовали моноклональные антитела 3С3-AD, специфичные к серотипу «ad» [18], и 2F9-AU, специфичные к серотипу «ay» [18] (рис. 4). Результаты ИФА подтверждают, что, как и предполагалось на основании данных иммуноблоттинга, вакцина «Регевак В» серии 17 состоит из антигена «ay» (рис. 4, а), а серии 42 и 71 — из антигена серотипа «ad» (рис. 4, б). По аналогии можно сделать вывод, что вся вакцина «Регевак В», начиная с серии 19, содержит HBsAg серотипа «ad».

Для подтверждения результатов ИФА с антителами 3С3-AD мы использовали моноклональные антитела, специфичные к серотипу «ad», другого производителя: SIM-AD. В итоге были получены аналогичные результаты — вакцина «Регевак В» серии 50 также содержит антиген серотипа «ad» (рис. 5).

Масс-спектрометрический анализ методом отпечатка пептидных масс

Как отмечалось во введении, наличие большого числа подтипов поверхностного антигена связано с некоторыми определенными аминокислотными заменами в главной гидрофильной облас-

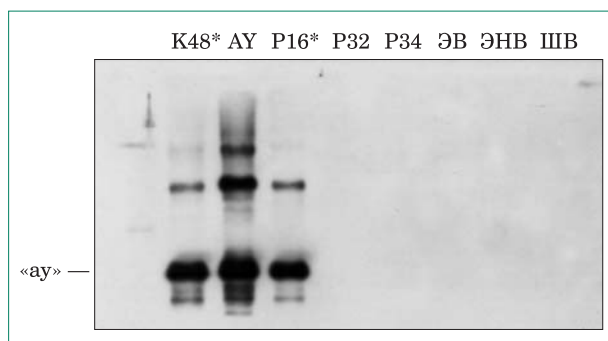


Рис. 3. Определение серотипа зарубежных вакцин против гепатита В с использованием моноклональных антител 3Е7-АУ, специфичных к серотипу «ay» HBsAg.

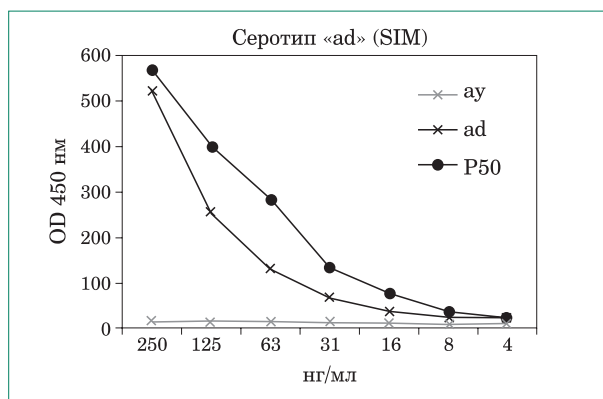


Рис. 5. Определение серотипа методом ИФА с использованием моноклональных антител SIM-AD, специфичных к серотипу «ad» HBsAg.

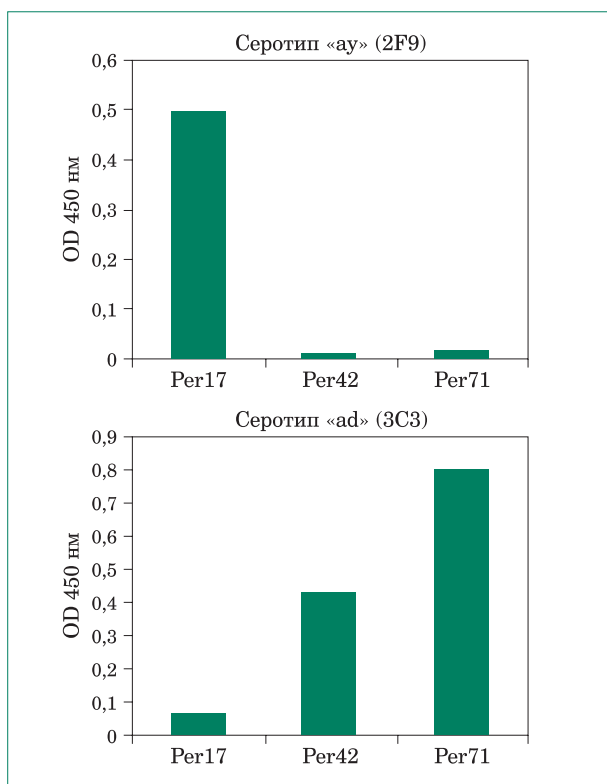


Рис. 4. Определение серотипа вакцины с помощью иммуноферментного анализа: а — 2F9-АУ моноклональные антитела, специфичные к серотипу «ay»; б — 3С3-AD моноклональные антитела, специфичные к серотипу «ad».

ти белка. Теоретически можно предположить, что антитела, специфичные (по документации производителя) к одному из серотипов «ay» или «ad», могут неодинаково реагировать с разными подтипами HBsAg в рамках одного серотипа (например *adw* и *adr*). Однако все подтипы HBsAg серотипа «ay» отличаются от всех подтипов HBsAg серотипа «ad» заменой остатка аргинина на остаток лизина в положении 122 аминокислотной последовательности белка, т. е. определяя, какой аминокислотный остаток (Lys

или Arg) находится в положении 122, мы можем однозначно определить, к какому серотипу («ay» или «ad») относится исследуемый поверхностный антиген.

Для определения аминокислотного остатка в положении 122 мы использовали метод отщепления пептидных масс. На рис. 6 приведены наложенные на аминокислотную последовательность HBsAg пептидные карты масс, полученные в результате ограниченного ферментативного гидролиза поверхностного антигена трипсином и химотрипсином. Для образца вакцины «Регевак В» (серия 50) степень перекрытия аминокислотной последовательности белка составила 51,8 %. Среди прочих фрагментов белка в масс-спектре ферментативного гидролизата был выявлен пик со значением *m/z* 1562,77, который с точностью 13,7 ppm соответствовал значению *m/z* пептида CPLIPGSTTTSTGPK, являющегося фрагментом 107-122 белка HBsAg с остатком Lys в позиции 122 (рис. 6, а). Следовательно, эта вакцина состоит из HBsAg серотипа «ad».

При анализе вакцины «Комбиотех» (серия 48) степень перекрытия аминокислотной последовательности HBsAg составила 63,4 % и был выявлен пик со значением *m/z* 2202,03, который с точностью 18,01 ppm соответствовал значению *m/z* пептида QGMLPVCPLIPGSSTTSTGPKR, являющегося фрагментом 101-122 белка HBsAg с остатком Arg в позиции 122 (рис. 6, б). Следовательно, эта вакцина состоит из HBsAg серотипа «ay».

Результаты приведенного в данной работе исследования серотипов вакцин для профилактики гепатита В, присутствующих на российском рынке, суммированы в табл. 2.

Таким образом, в результате проделанной работы разработаны методы определения серотипа HBsAg, а также масс-спектрометрического

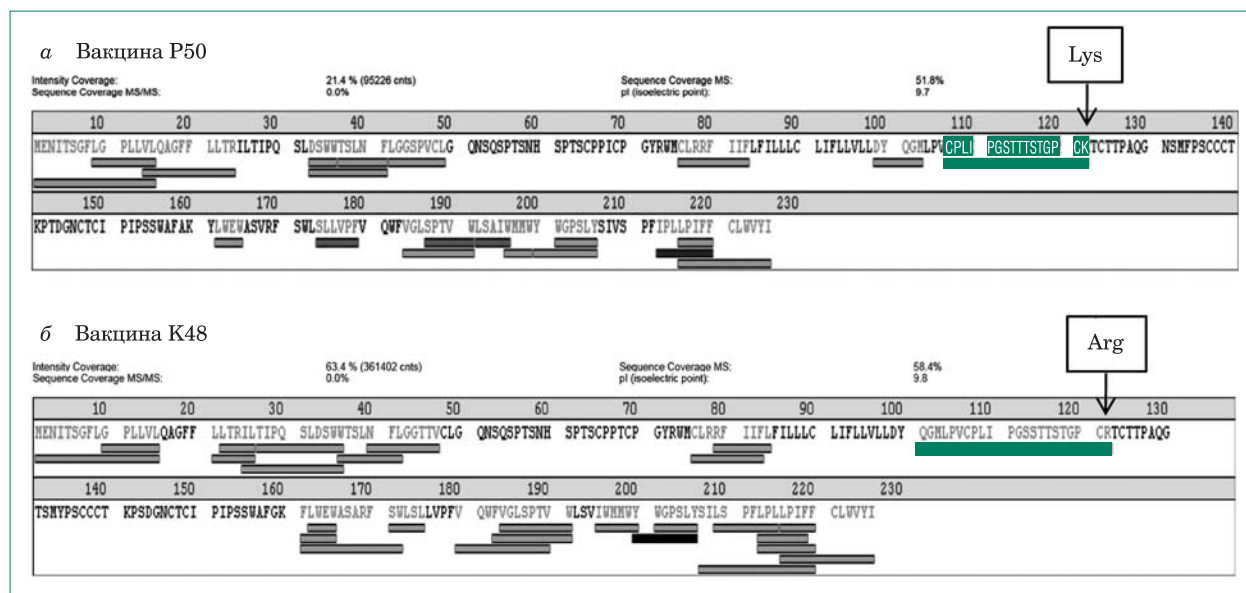


Рис. 6. Определение серотипа вакцины методом отпечатка пептидных масс. Пептиды, содержащие аминокислотный остаток, соответствующий положению 122 в HBsAg, выделены зеленым цветом.

Таблица 2. Серотип поверхностного антигена HBsAg в исследуемых вакцинах

Вакцина	«Комбиотех»		«Регевак В»						«Euvax В»					«Heberbio- vac HB«	«Шан- вак-В»		
	ad	ay	ad	ay	ay	ay	ad	ad	ad	ad	ad	ad	ad	ad	ad		
Серия	08	48	03	16	17	18	19	20	22	32	34	42	50	71	т. 1	т. 1	т. 1
Серотип	ad	ay	ay	ay	ay	ay	ad	ad	ad	ad	ad	ad	ad	ad	ad	ad	ad

анализа пептидных масс в сорбированных вакцинах против гепатита В.

ВЫВОДЫ

Результаты исследования показали, что на данный момент только компания ЗАО НПК «Комбиотех» поставляет на российский рынок вакцину против гепатита В серотипа «ay». Эта вакцина была разработана с учетом того, что в России наибольшее распространение имеет штамм вируса гепатита В серотипа «ay». Помимо высокого иммунного ответа на введение вакцины «Комбиотех» и длительного поствакцинального иммунитета [19] вакцина обладает также терапевтическим эффектом [20]. Дополнительные исследования позволяют утверждать, что проведение вакцинации вакциной «Комбиотех» серотипа «ay» на фоне базисного лечения больных вирусным гепатитом В повышает итоговую эффективность иммунотерапии [21]. Одно из возможных объяснений этому состоит в соответствии серотипа вакцины серотипу вируса, преобладающему в России.

Из всего вышесказанного следует, что в России целесообразно использование рекомбинантных вакцин, созданных на основе штамма

вируса гепатита В серотипа «ay», наиболее распространенного на территории Российской Федерации. Причем более универсальной следует считать поливалентную вакцину, содержащую HBsAg разных серотипов («ay» и «ad»), которая также выпускается ЗАО НПК «Комбиотех».

БЛАГОДАРНОСТИ

Авторы благодарны доктору Р. Х. Зиганину за помощь в проведении масс-спектрометрического исследования методом отпечатка пептидных масс и анализа полученных результатов, а также фирме ООО «Биалекса» за предоставленные антитела ЗСЗ-AD и 2F9-AY.

СПИСОК ССЫЛОК

1. Palumbo E. / Am. J. Ther. 2007. V. 14(3). P. 306 – 309.
2. Ильченко Л. Ю., Сторожиков Г. И. / Мир вирусных гепатитов. 2009. № 4. С. 4 – 0.
3. Schaefer S., Pointek M., Ahn S.-J., Papendieck A., Janowicz A., Timmermans I., Gellissen G. *Hansenula Polymorpha: Biology and Applications* / Ed. by G. Gellissen — Germany: Wiley-VCH, 2002. С. 175 – 210.
4. Swenson P. D., Van Geyt C., Alexander E. R., Hagan H., Freitag-Koontz J. M., Wilson S., Norder H.,

- Magnius L. O., Stuyver L. / J. Med. Virol. 2001. V. 64. P. 305 – 311.
5. Norder H., Couroucé A. M., Coursaget P., Echevarria J. M., Lee S. D., Mushahwar I. K., Robertson B. H., Locarnini S., Magnius L. O. / Intervirology. 2004. V. 47. P. 289 – 309.
6. Stuyver L., Van Geyt C., De Gendt S., Van Reybroeck G., Zoulim F., Leroux-Roels G., Rossau R. / J. Clin. Microbiol. 2000. V. 38(2). P. 702 – 707.
7. Netesova I. G., Swenson P. D., Osipova L. P., Gubina M. A., Posukh O. L., Netesov S. V. / J. Med. Virol. 2003. V. 71(2). P. 183 – 187.
8. Мануйлов В. А. / Мир вирусных гепатитов. 2009. № 4. С. 24 – 5.
9. Балаян М. И., Михайлов М. И. / Энциклопедический словарь. Вирусные гепатиты. — М.: Амипресс, 1994.
10. Karthigesu V. D., Allison L. M., Fortuin M., Mendy M., Whittle H. C., Howard C. R. / J. Gen. Virol. 1994. V. 75(2). P. 443 – 8.
11. Echevarria J. M., Avellón A. / J. Med. Virol. 2006. V. 78. P. S36 – 42.
12. Hepatitis B, the Virus, the Disease, the Vaccine. / Ed. by Millman I. — NY, USA: Plenum Press, 1984. P. 164.
13. Cupps T. R., Tibbles J., Hurni W. M., Miller W. J., Ellis R. W., Milich D., Wetter N. / J. Immunol. 1993. V. 151(6). P. 3353 – 60.
14. Майер К. П. / Гепатит и последствия гепатита. — М.: Гэотар, 1999. С. 38.
15. Heijtkink R. A., Bergen P., Melber K., Janowicz Z. A., Osterhaus A. D. / Vaccine. 2002. V. 20(17 – 18). P. 2191 – 6.
16. Laemmli U. K. / Nature. 1970. V. 227. P. 680 – 685.
17. Towbin H., Staehelin, T., Gordon, G. / Proc. Natl. Acad. Sci USA. 1979. V. 76. P. 4350 – 4354.
18. Swenson P. D., Riess J. T., Krueger L. E. / J. Virol. Methods. 1991. V. 33(1 – 2). P. 27 – 38.
19. Акимкин В. Г. и др. / Военно-мед. ж. 1997. № 12. С. 33 – 36.
20. Гордейчук И. Н. / ЗниСО. 1999. № 2. С. 8 – 10.
21. Притулина Ю. Г. Дифференцированная иммунотерапия персистирующей HBV-инфекции рекомбинантной анти-HBV-вакциной. / Дис. докт. наук. — Воронежский гос. тех. унив., 2007.

COMPLIANCE OF HEPATITIS B VACCINES TO THE SUBTYPE OF HEPATITIS B VIRUS PREVALENT IN RUSSIAN FEDERATION

М. А. Krymsky^{1, 2}, R. M. Krymsky¹, M. V. Budanov¹, V. N. Borisova¹

¹ ZAO NPK «Combiotech», Miklukho-Maklaya Str. 16/10, IBCh RAS, 117997 Moscow

² E-mail: mk@combiotech.com

At present more than a dozen subtypes of Hepatitis B virus (HBV) have been identified, varying by combination of antigenic determinants in the Hepatitis B surface Antigen (HBsAg) — the protein forming an outer envelope of the virus. Based on the difference in the second mutually exclusive determinant *d/y*, all HBV subtypes could be divided into two basic serologic types «ad» and «ay». Only one of these serotypes usually prevails in different parts of the world. In Russia the serotype «ay» is predominant (from 75 % to 95 % varying by regions) suggesting that the Russian population should be vaccinated by vaccines against endemic «ay» virus. Otherwise an incomplete immunity to HBV could cause decreasing of the infection threshold and increasing hepatitis B cases among vaccinated population. Since more than 20 years ago the recombinant vaccines consisting of different HBsAg serotypes have been used for HBV vaccination all over the world. We investigated HBsAg serotypes of the vaccines present on the Russian market, and have found that only NPK «Combiotech» produces a serotype «ay» vaccine against hepatitis B at present.

Keywords: HBsAg, vaccine, hepatitis B, serotype, subtype, antibodies.