

На правах рукописи

Шустов Александр Вячеславович

**ГЕНОТИПИЧЕСКОЕ РАЗНООБРАЗИЕ ИЗОЛЯТОВ И
МОЛЕКУЛЯРНАЯ ВАРИАБЕЛЬНОСТЬ ВИРУСА ГЕПАТИТА С
У НАСЕЛЕНИЯ НОВОСИБИРСКОЙ ОБЛАСТИ**

03.00.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Кольцово - 2003

Работа выполнена в Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» Минздрава РФ.

Научный руководитель:

доктор биологических наук, профессор Нетёсов С.В.

Официальные оппоненты:

доктор медицинских наук, профессор Покровский А.Г.

доктор биологических наук Морозова О.В.

Ведущая организация:

Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Минздрава РФ (ЦНИИЭ), Москва

Защита состоится « 26 » декабря 2003 г. в 11.00 часов на заседании диссертационного совета Д 208.020.01 при Государственном научном центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» Минздрава РФ по адресу: ГНЦ ВБ «Вектор», Кольцово Новосибирской области, 630559 (тел. 3832-36-74-28).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГНЦ ВБ «Вектор».

Автореферат разослан « 25 » ноября 2003 года.

Ученый секретарь
диссертационного совета



Малыгин Э.Г.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность работы. Гепатит С - повсеместно распространённое вирусное заболевание человека, актуальность которого высока для здравоохранения всех стран мира, включая Россию. У людей, инфицированных вирусом гепатита С (ВГС), весьма часто развиваются хронический гепатит, а со временем - цирроз печени и первичный рак печени. Всемирная Организация Здравоохранения оценивает число больных и носителей ВГС в мире в 170 миллионов (WHO, Report of WHO Consultation, 1999). В Российской Федерации живут от 3 до 5 млн. людей, хронически инфицированных ВГС. Средств иммунопрофилактики ВГС пока не разработано, поэтому самые эффективные методы контроля данной инфекции нацелены на предотвращение новых случаев посредством прерывания эпидемической цепи. Преимущественным способом передачи ВГС является гемоконтактный, возможна передача половым путём или от инфицированной матери ребёнку. Эпидемиологические исследования спорадического гепатита С показали, что в значительном числе случаев момент и источник заражения установить не удаётся.

Эпидемиологическая ситуация по ВГС в Российской Федерации развивается очень динамично, но причины изменений изучены слабо. Исследования молекулярной вариабельности ВГС в Российской Федерации проводятся с середины 1990-х гг. (Львов и Дерябин, 1997; Lvov et al., 1996; Favorov et al., 1996; Viazov et al., 1997) и охватили в основном население европейской части страны, тогда как популяции регионов России, расположенных за Уралом, до недавнего времени были исследованы в этом отношении недостаточно.

Среди возбудителей гепатитов ВГС характеризуется особенно большим генетическим разнообразием. Сравнение молекулярной вариабельности изолятов, выявляемых в разных популяционных группах, в различных регионах мира используется для нужд эпидемиологического надзора. Определение генотипа изолята ВГС используется для выбора наилучшей схемы лечения. Несмотря на международные усилия по созданию серологических тест-систем для выявления маркёров инфекции ВГС, равно чувствительных к различным генотипам и серотипам вируса, имеющиеся в настоящий момент на рынках развитых стран серологические тесты демонстрируют различную чувствительность к ВГС разных генотипов (Dhaliwal et al., 1996; Neville et al., 1997). В случае создания кандидатной вакцины, возможность её применения и оценка эффективности использования у населения, проживающего на определенной территории, будет определяться в том числе степенью изученности популяционной структуры ВГС в данной среде, в частности, знанием преобладающих генотипов вируса.

Цель и задачи исследования. Целями настоящей работы являлись исследование молекулярной вариабельности изолятов ВГС, циркулирующих в различных популяционных группах Западной Сибири, и анализ эпидемиологических факторов, влияющих на циркуляцию различных генетических вариантов вируса.

Для достижения поставленной цели были решены следующие задачи:

- сформированы несколько коллекций сывороток крови, полученных из различных популяционных групп (медицинских работников, стационарных пациентов инфекционных больниц и наркологического диспансера, клинически здоровых людей и лиц с временным ухудшением здоровья, обратившихся в поликлинику). Обследованные лица являются жителями Новосибирской обл., Алтайского Края и Республики Алтай;

- собранные сыворотки крови исследованы с помощью коммерчески доступных тест-систем российского производства для выявления иммунологических маркёров гепатитов С и В;

- серопозитивные образцы сывороток, а также серонегативы от лиц из групп высокого риска по инфекции исследованы с использованием метода обратной транскрипции - полимеразной цепной реакции. Амплифицированы фрагменты двух районов генома ВГС - области 5'-UTR и гена NS5B. Нуклеотидные последовательности продуктов амплификации определены путём прямого секвенирования;

- разработана анкета для сбора социально-демографической информации и эпидемиологически значимых данных от обследуемых лиц. Методом индивидуального анонимного интервью проведено анкетирование обследованных лиц по стандартизированной анкете. Собранные данные обработаны методами статистико-эпидемиологического анализа с целью выявления и описания факторов риска инфицирования гепатитом С, преобладающих в различных популяционных группах;

- проведен филогенетический анализ последовательностей области 5'-UTR и гена NS5B изолятов ВГС, полученных от жителей Новосибирской обл., и сравнение указанных последовательностей с молекулярными данными из международных баз генетической информации. Проведено сравнение генотипического разнообразия изолятов ВГС, циркулирующих в различных популяционных группах жителей обследованного региона.

Научная новизна и практическая значимость работы. В результате проделанной работы были оценены встречаемость маркёров инфекции ВГС среди различных групп жителей Западной Сибири (медицинских работников, пациентов больниц, клинически здоровых людей), определено генотипическое разнообразие изолятов ВГС, циркулирующих у населения региона. Всего обследовано в серологических тестах более 5000 образцов сывороток крови, методом ОТ-ПЦР исследовано более 1300 проб. Получены данные по

нуклеотидным последовательностям вирусного генома 533 изолятов ВГС. Оценена относительная роль различных факторов риска инфицирования ВГС в разных популяционных группах. Показано, что генотипическое разнообразие изолятов ВГС неодинаково в разных популяционных группах. Сделаны выводы о природе статистической связи между преимущественными факторами риска и генотипическим разнообразием изолятов ВГС у жителей обследованного региона.

Положения, выносимые на защиту:

1. На территории Новосибирской обл. циркулируют изоляты ВГС подтипов ВГС: 1b, 2a, 2c и 3a. Относительная встречаемость различных генотипов ВГС различна в разных популяционных группах, однако во всех обследованных группах превалирует подтип 1b.

2. Генотип 1 превалирует в старшей возрастной группе, а генотип 3 - у людей молодого возраста. Генотипическое разнообразие изолятов ВГС на территории региона меняется со временем в сторону роста доли генотипа 3. Повышенная частота случаев инфекции ВГС генотипа 3 связана в основном с употреблением внутривенных наркотиков.

3. Наиболее важную роль в распространении ВГС среди обследованных жителей области играет внутривенная наркомания. Риск инфицирования гепатитом С у населения Новосибирской обл. в основном связан с рискованным поведением и низким социально-экономическим статусом.

4. Нозокомиальные риски инфицирования ВГС у жителей Новосибирской обл. в настоящее время невысоки. Профессиональные риски у медработников сильно различаются в зависимости от специальности и места работы.

Апробация работы. Результаты работы были представлены автором в форме докладов на конференции с международным участием “Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера” (Новосибирск – 2002 г.) и на международной конференции "Integrated Surveillance for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, and STDs Control and Prevention in Central Asia Region. CDC/USAID CAR International Conference" (Ташкент, Узбекистан, 7 – 9 октября 2003 г.).

Публикации. По результатам работы опубликованы 9 статей в рецензируемых изданиях, из них в 3-х статьях А.В. Шустов является первым автором. Одна статья принята к публикации. Результаты работы опубликованы в 36-ти сообщениях в трудах конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертационная работа состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов, разделов “Результаты” и “Обсуждение результатов”, выводов и указателя литературы (15 источников на русском языке и 412 – на английском). Диссертация изложена на 209 страницах машинописного текста, включает 21 таблицу и 29 рисунков.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Обследованные популяции. В период с 1997 по 2002 гг. мы проводили молекулярно-эпидемиологические исследования среди жителей Новосибирской обл., Алтайского Края, Республики Алтай, представляющих различные популяционные группы. Исследование проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности в соответствии с “Основами законодательства РФ об охране здоровья граждан”. Все обследованные лица приглашались к участию на добровольной основе и каждый подписывал договор с ГНЦ ВБ “Вектор” об условиях своего участия (т.н. “Информированное согласие”).

В 1997-2002 гг. собирали сыворотки крови от пациентов, находившихся во время проведения обследования на стационарном лечении. Обследовано n=1292 стационарных пациентов из ниже перечисленных больниц: 1-ой Муниципальной инфекционной клинической больницы (1-МИКБ, г. Новосибирск); 3-ей Детской инфекционной клинической больницы (3-ДИКБ, г. Новосибирск); Новосибирского государственного областного центра по профилактике и борьбе со СПИД и другими инфекционными заболеваниями (Центр СПИД, пос. Кольцово Новосибирской обл.); Муниципального городского наркодиспансера (МГНД, г. Новосибирск); Городской больницы №2 г. Барнаул (Алтайский Край).

В течение 1997-2000 гг. была собрана коллекция сывороток от сотрудников больниц (n=2116): Больницы скорой помощи №2 (БСП2, г. Новосибирск); 1-МИКБ; 3-ДИКБ; Новосибирской районной больницы №1 (НРБ-1); Государственной областной клинической больницы (ГОКБ, г. Новосибирск); Центральной районной больницы (ЦРБ, г. Искитим, Новосибирская обл.). В 2001-2002 гг. было проведено второе молекулярно-эпидемиологическое исследование (собрано n=500 сывороток) среди персонала больниц, в которое были включены сотрудники Центра СПИД, БСП2, МГНД, НРБ-1.

Для обследования клинически здоровых людей за период 1997-1998 гг. были собраны и исследованы сыворотки (n=629) от первично обратившихся доноров краевой станции переливания крови (СПК) г. Барнаул, сотрудников ГНЦ “Вектор” (пос. Кольцово) и жителей пос. Мендур-Соккон (Республика Алтай).

В 2001-2002 гг. была обследована (совместно с И.В. Гавриловой) выборка поликлинических пациентов НРБ-1 (n=500). Данная выборка была сформирована следующим образом: всем лицам, посетившим врачей-терапевтов поликлиники НРБ-1 в период проведения исследования по поводу любого заболевания (чаще всего, не связанного с патологией печени), предлагали принять участие в обследовании. Такой способ

формирования выборки был использован для того, чтобы изучить группу людей, репрезентативную в отношении общей популяции пункта, где проводилось исследование.

Эпидемиологическая часть работы выполнена по схеме “поперечного” (cross-sectional) исследования. С 1999 г. от обследуемых лиц получали не только образец сыворотки крови, но также собирали эпиданамнез (с использованием индивидуального анонимного интервью по стандартной анкете). Анкеты включали вопросы по 9-ти темам: демографическая информация; индивидуальный анамнез (состояние здоровья на момент обследования); факторы риска, связанные с перенесёнными медицинскими процедурами; факторы профессионального риска; факторы риска, связанные с особенностями поведения и привычками; контакты с больными гепатитом; социально-экономические характеристики индивида; другие факторы (возможные вмешивающиеся факторы); результаты лабораторных исследований.

Диагностические тест-системы. Для выявления антител IgG к антигенам ВГС использовали скрининговую тест-систему "РекомбиБест анти-ВГС IgG" и подтверждающий тест "РекомбиБест анти-ВГС Подтверждающий тест" (ЗАО "Вектор-Бест"). Процедуры выполняли в соответствии с инструкциями фирм-производителей (эта часть работы любезно выполнена Л.А. Акинфеевой и О.В. Басовой в сертифицированной клинико-биохимической лаборатории НРБ1, пос. Кольцово). Сыворотка считалась положительной, если она давала позитивный ответ в скрининговой системе и в подтверждающем тесте.

Молекулярно-биологические процедуры. Для выделения суммарных РНК использовали реагент Trizol (Life Technologies Inc., Cat# 15596). Комплементарные ДНК синтезировали с использованием синтетического праймера dN₆. Синтез проводили в 50 мкл раствора состава: 50 mM Tris-HCl pH8.3, 40 mM KCl, 1 mM MnCl₂, 1 mM DTT, 200 мкМ каждого дезоксинуклеозидтрифосфата, 15 нг/мкл гексамера dN₆ (либо 1 pMol специфического праймера), 70 е.а. обратной транскриптазы Mo-MuLV (Amersham, USA) при 37⁰C в течение 1 часа. Структуры праймеров, использованных для ПЦР-амплификации фрагментов 5'-UTR и NS5B ВГС, приведены в Таблице 1. Амплификацию осуществляли в 50 мкл смеси, содержащей 10 mM Трис-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 2 mM MgCl₂, 0.2 mM каждого dNTP, 0.08 о.е./ml праймеров, 2 ед. ДНК-полимеразы Taq (ЗАО “Сибэнзим”, г. Новосибирск).

Нуклеотидные последовательности продуктов амплификации определяли с использованием автоматического секвенатора Beckman CEQ2000 XL. Секвенирование проводили по обеим цепям. Для генотипирования изолятов ВГС проводили филогенетический анализ выявленных нами и прототипных последовательностей.

Таблица 1. Праймеры для амплификации фрагментов генома ВГС

Код	Последовательность ¹ (5'-3')	Область генома	Ориентация/Позиция ² , нт
S50	CCCTGTGAGGAACTWCTGTCTTCACGC	5'-UTR	S 43-69
AS52	GGTGCACGGTCTACGAGACCT	-----	AS 321-341
S51	TCTAGCCATGGCGTTAGTRYGAGTGT	-----	S 78-103
AS53	CACTCGCAAGCACCCSTATCAGGCAGT	-----	AS 288-313
R52	TGGGSTTCYCRTATGATACCCGCTGCTTTGA	NS5B	S 8245-8275
R54	GGCAGAGTACCTRGTCATAGCCTCCGTGAA	-----	AS 8616-8645
R53	GCTGYTTTGACTCMACRGTCACTG	-----	S 8266-8289
R55	CTRGTCATAGCCTCCGTGAAGYCTC	-----	AS 8611-8635
Eno2	TTCTCITATGAYACCCGCTGYTTTGA	-----	S 8250-8275
Eno4	AGTACCTRGTCATAGCCTCCGTGAA	-----	AS 8616-8640

¹ Для вырожденных положений использована однобуквенная номенклатура IUPAC/IUB.

² Ориентация: S - сенси, AS - антисенси. Указаны положения 5'-и 3'-концов праймеров на геноме прототипного изолята HCV-1.

Обработка эпидемиологических данных. Собранные данные эпиданамнеза, а также результаты лабораторных исследований были обработаны с использованием программ EpiInfo 2002 (Dean, 1999) и SPSS 11 (Бююль и Цёфель, 2002). Статистическую достоверность связи между категориальными переменными оценивали с использованием критерия Хи-квадрат (с поправкой Йетса) и двустороннего точного критерия Фишера. Достоверность различий количественных признаков в группах исследовали с использованием U-критерия Манна-Уитни. Критическое значение достигнутого уровня значимости (p) для ситуации двустороннего оценивания было 5%. Для каждого фактора риска бинарной природы величину эффекта выражали с помощью отношения шансов (OR) с 95% доверительным интервалом. Для оценки влияния возможных вмешивающихся факторов использовали стратификацию по уровням вмешивающегося фактора и вычисляли взвешенное OR по Ментел-Хензелю. Построение и анализ логистических регрессионных моделей использованы для выявления независимо влияющих факторов риска и ранжирования их по величине эффекта.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Встречаемость маркёров ВГС в различных популяционных группах. Результаты тестирования сывороток крови, собранных в 1997-2002 гг. от стационарных пациентов, медработников, клинически здорового населения и поликлинических пациентов, представлены в Таблице 2. В коллекции образцов сывороток, собранных от пациентов инфекционных больниц в 1997-1998 гг., частота выявления анти-ВГС IgG в зависимости от источника варьировала от 75,8% до 88,2%, причём РНК ВГС была выявлена в от 57,1% до 76,0% серопозитивных проб. В 2001-2002 гг. нами было проведено второе исследование, в ходе которого были обследованы пациенты новосибирского Центра СПИД и пациенты

муниципального наркодиспансера г. Новосибирска (МГНД) (эта часть работы выполнена совместно с И.В. Гавриловой). В сыворотках от пациентов Центра СПИД было выявлено 179/500 (35,8%) образцов, содержащих анти-ВГС IgG, и в 151 (84,4%) серопозитивной пробе была обнаружена РНК ВГС. В коллекции от пациентов МГНД анти-ВГС IgG были найдены в 240/500 (48,0%) образцах, РНК ВГС найдена в 195 (81,3%) серопозитивных пробах. Различие в частоте выявления иммунологических маркёров инфекции ВГС в сыворотках, собранных в 2001-2002 гг. (35,8% и 48,0%), по сравнению с образцами, полученными в 1997-1998 гг. (от 75,8% до 88,2%), объясняется отбором пациентов по предварительному диагнозу “вирусный гепатит С”, имевшим место при формировании коллекции 1997-1998 гг. При формировании выборок в 2001-2002 гг. в исследование включали всех взрослых пациентов, изъявивших желание обследоваться, без какого-либо предварительного отбора.

Встречаемость маркёров инфекции ВГС в различных субпопуляциях клинически здорового населения исследовали в 1997-1998 гг., а в 2001-2002 гг. была обследована выборка из лиц с временным ухудшением здоровья - посетителей поликлиники НРБ-1 пос. Кольцово (Таблица 2). Частота встречаемости анти-ВГС IgG у сотрудников ГНЦ “Вектор” составила 0,64%, что намного ниже частоты выявления маркёров ВГС у доноров крови г. Барнаул - 2,6%. Сыворотки из СПК г. Барнаул были получены в виде двух партий: первая партия (19 образцов) была отобрана в результате рутинного скрининга 737 донорских сывороток, а вторая партия (43 образца) получена в результате аналогичного исследования более 1300 донорских сывороток (точное количество неизвестно; данные восстановить не удалось). Все эти сыворотки были получены от лиц, пришедших на станцию сдавать кровь в первый раз и отрицавших в случаи желтухи и гепатита в анамнезе. Частота выявления анти-ВГС IgG у первично обратившихся доноров СПК г. Барнаул (2,6% по результатам исследования первой группы сывороток) оказалась весьма близкой к средней встречаемости антител к ВГС по России (Lvov et al., 1996; Львов и Дерябин, 1997).

В 2001-2002 гг. была обследована выборка, сформированная из посетителей поликлиники НРБ-1. Частота встречаемости серологических маркёров ВГС у поликлинических пациентов оказалась немалой (5,6%) с учётом способа формирования данной выборки. Выявляемость РНК ВГС в серопозитивах составила 79,3%. Для сравнения, частота обнаружения анти-ВГС IgG в сыворотках крови первично обратившихся доноров в Европейской России составляет в среднем 2-4% (Favorov et al., 1996; Viasov et al., 1997; Lvov et al., 1996; Львов и Дерябин, 1997). Отличия между полученными нами и цитированными результатами могут происходить из-за того, что обследованные нами лица являются жителями другого региона (Западной Сибири) и, кроме того, мы обследовали не

доноров, а общую популяцию. Ещё одним объяснением обнаруженной нами высокой встречаемости маркёров ВГС в выборке, состоящей из лиц с временным ухудшением здоровья, но, в большинстве случаев, – без явных признаков болезни печени, может быть истинный рост случаев инфекции гепатитом С, который происходил в России в период социально-экономической нестабильности.

Была определена встречаемость маркеров ВГС у сотрудников медицинских учреждений г. Новосибирска, пос. Кольцово, а также у сотрудников объединения сельских (районных) больниц с управлением в г. Искитим (Таблица 2). Встречаемость анти-ВГС IgG в сыворотках медработников варьировала от 0% до 9,5%.

Генотипическое разнообразие изолятов ВГС в обследованных выборках. В Таблице 3 представлено генотипическое разнообразие изолятов ВГС, выявленных у стационарных пациентов, медицинских работников и поликлинических пациентов.

Из числа изолятов ВГС, полученных от пациентов стационаров, генотип ВГС был определён для 456 изолятов (Таблица 3). В данной группе образцов были обнаружены изоляты ВГС только трёх подтипов: 1b, 2a и 3a. Сравнение распределений по генотипам с использованием критерия Хи-квадрат не выявило достоверных отличий между двумя выборками от 1997-1998 гг. ($p=0,704$); в объединённой выборке частоты встречаемости подтипов ВГС составили: 1b - 84 (75,7%), 2a - 8 (7,2%), 3a - 19 (17,1%). Аналогично, различия в распределениях изолятов ВГС по генотипам между выборками от 2001-2002 гг. не были достоверны ($p=0,198$) и, в объединённой группе, составили: 1b – 172 (49,9%), 2a – 14 (4,1%), 3a – 159 (46,1%). В коллекции проб от 2001-2002 гг. доля подтипа 1b меньше, а доля подтипа 3a – больше, чем коллекции от 1997-1998 гг. ($p<0,001$). Данное наблюдение может отражать истинный рост доли случаев инфекции ВГС подтипа 3a среди пациентов стационаров, произошедший за время проведения нашего исследования.

Не было обнаружено статистически значимых различий в распределениях изолятов ВГС по генотипам между образцами от медработников из различных больниц ($p=0,830$); в объединённой группе медработников генотипическое разнообразие изолятов ВГС было следующим: подтип 1b – 61,1%; 2a – 22,2%; 2c – 1,9%; 3a – 14,8%.

В образцах из поликлиники пос. Кольцово было выявлено следующее генотипическое разнообразие изолятов ВГС: подтип 1b – 47,8%; 2a – 4,3%; 3a – 47,8%.

Таблица 2. Встречаемость маркёров гепатита С в сыворотках крови от представителей различных популяционных групп

Годы сбора образцов	Источник сыворотки	Исследовано сывороток	Положительно в ИФА, (%)	Положительно в ИФА и в ОТ-ПЦР, (% ¹)
<i>Стационарные пациенты</i>				
1997-1998	1-я МИКБ, г. Новосибирск	153	135 (88,2%)	97 (71,9%)
1997-1998	3-я ДИКБ, г. Новосибирск	57	45 (78,9%)	29 (64,4%)
1997-1998	Центр СПИД, пос. Кольцово	33	25 (75,8%)	19 (76,0%)
1997-1998	Городская больница №2, г. Барнаул	49	42 (85,7%)	24 (57,1%)
2001-2002	Муниципальный городской наркодиспансер (МГНД), г. Новосибирск	500	240 (48,0%)	195 (81,3%)
2001-2002	Центр СПИД, пос. Кольцово, Новосибирская обл.	500	179 (35,8%)	151 (84,4%)
	Всего: пациенты клиник	1292	666 (51,5%)	515 (77,3%)
<i>Клинически здоровое население и поликлинические пациенты</i>				
1997-1998	Сотрудники ГНЦ ВБ “Вектор”	467	3 (0,64%)	1 (33,3%)
1997-1998	Краевая станция переливания крови, г. Барнаул (две партии сывороток)	737 >1300 ²	19 (2,6%) 43	36 (58,1%) – данные по всем пробам из СПК г. Барнаул
2001-2002	Поликлиника Новосибирской районной больницы №1 (НРБ1), пос. Кольцово, Новосибирской обл.	500	28 (5,6%)	23 (79,3%)
	Всего: клинически здоровые люди и пациенты поликлиники	1704 ³	50 (2,9%) ³	60 (64,5%)
<i>Медицинские работники</i>				
1997-1998	БСП2, г. Новосибирск ⁴	139	10 (7,2%)	9 (90%)
1997-1998	1-я МИКБ, г. Новосибирск	121	3 (2,5%)	2 (66,7%)
1997-1998	3-я ДИКБ, г. Новосибирск	114	5 (4,4%)	0 (0%)
1997-1998	МСЧ163, пос. Кольцово, Новосибирская обл.	93	3 (3,2%)	2 (66,7%)
1999-2000	ГОКБ, г. Новосибирск	629	32 (5,1%)	22 (68,8%)
1999-2000	ЦРБ, г. Искитим	1020	21 (2,1%)	13 (65,0%)
2001-2002	Центр СПИД, пос. Кольцово, Новосибирская обл.	42	4 (9,5%)	4 (100%)
2001-2002	БСП2, г. Новосибирск ⁴	217	16 (7,4%)	11 (68,8%)
2001-2002	МГНД, г. Новосибирск	96	0 (0,0%)	
2001-2002	НРБ1, пос. Кольцово, Новосибирской обл.	145	6 (4,1%)	2 (33,3%)
	Всего: персонал медицинских учреждений	2477 ⁴	90 (3,6%) ⁴	56 (62,2%)

¹ – проценты вычислены от числа сывороток, положительных в ИФА; ² – приближённые данные (см. текст); ³ – без учёта второй партии сывороток от доноров СПК г. Барнаул; ⁴ – сотрудники БСП2 были обследованы дважды: в 1997-1998 гг. и в 2001-2002 гг. При вычислении средних частот встречаемости маркёров учитывали только данные последнего по времени сбора образцов сывороток.

Таблица 3. Генотипическое разнообразие изолятов ВГС в обследованных группах жителей Новосибирской обл.

Год	Источник образцов	Генотипировано изолятов	1b	2a	2c	3a
<i>Пациенты стационаров</i>						
1997- 1998	1-МИКБ, г. Новосибирск	93	69	7	0	17
1997- 1998	3-ДИКБ, г. Новосибирск	18	15	1	0	2
2001- 2002	Муниципальный городской наркодиспансер (МГНД), г. Новосибирск	194	105	7	0	82
2001- 2002	Центр СПИД, пос. Кольцово, Новосибирская обл.	151	67	7	0	77
Всего: Пациенты стационаров		456	256 (56,1%)	22 (4,8%)	0 (0%)	178 (39,0%)
<i>Медицинские работники</i>						
1999- 2000	ГОКБ, г. Новосибирск	22	13	6	0	3
1999- 2000	ЦРБ, г. Искитим	13	8	4	0	1
2001- 2002	Центр СПИД, пос. Кольцово, Новосибирская обл.	4	3	0	1	0
2001- 2002	БСП2, г. Новосибирск	11	6	2	0	3
2001- 2002	НРБ1, пос. Кольцово, Новосибирской обл.	4	3	0	0	1
Всего: медработники		54	33 (61,1%)	12 (22,2%)	1 (1,9%)	8 (14,8%)
<i>Пациенты поликлиники</i>						
2001- 2002	Поликлиника НРБ-1, пос. Кольцово, Новосибирская обл.	23	11 (47,8%)	1 (4,3%)	0	11 (47,8%)

Генотипическое разнообразие изолятов ВГС оказалось неодинаковым в разных возрастных группах. На Рис. 1 представлены доли (%) изолятов ВГС различных генотипов в зависимости от возрастной группы, из которой получен образец. Данные для Рис. 1 включали 227 наблюдений (из выборок от 2001-2002 гг.), по которым имелись одновременно данные по генотипу изолята ВГС и возрасту обследованного. Рис. 1 иллюстрирует равномерное снижение доли генотипа 3 с ростом среднего возраста в подгруппе (с 90% в подгруппе 11-20 лет до 0% среди лиц старше 60 лет), столь же равномерный рост доли генотипа 1 с возрастом (с 1,7% в подгруппе 11-20 лет до 100% среди лиц старше 60 лет) и сохранение доли генотипа 2 на примерно одном уровне (8,3% в самой младшей возрастной подгруппе, 16,7% в самой старшей).

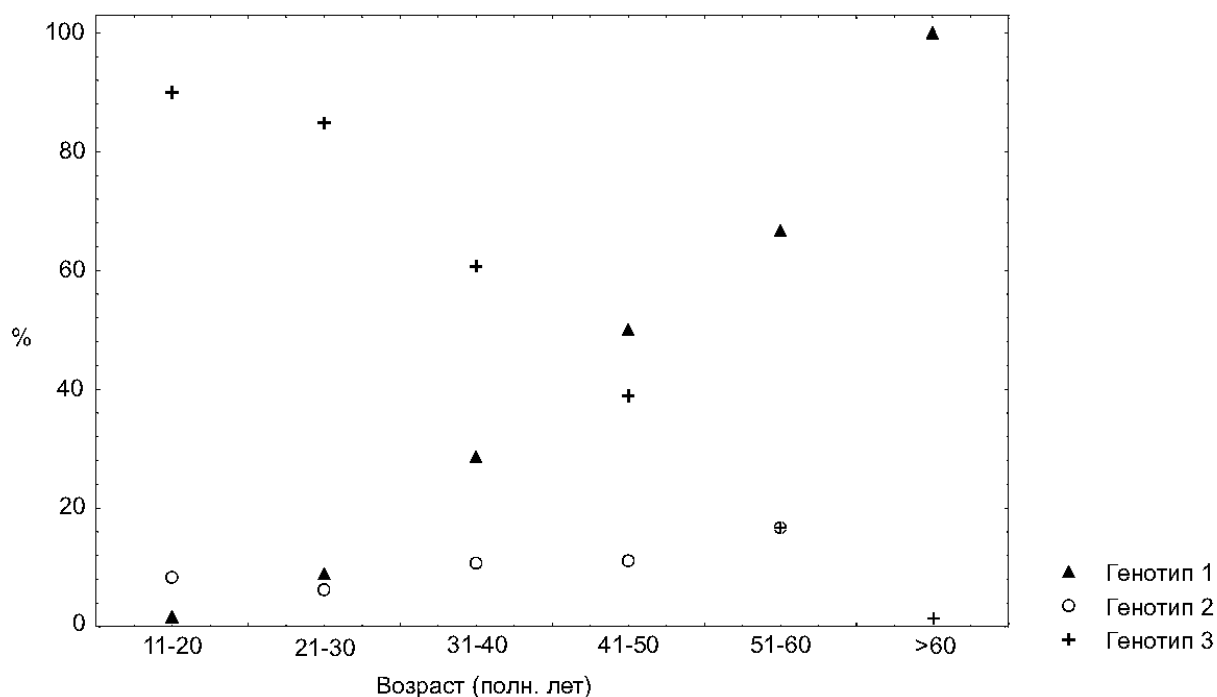


Рис. 1. Доля (%) изолятов ВГС генотипов 1, 2 и 3 в возрастных группах с 10-ти летними интервалами. Представлены результаты генотипирования 227 изолятов ВГС от жителей Новосибирской обл., обследованных в 2001-2002 гг.

Таким образом, по нашим данным, генотипическое разнообразие изолятов ВГС, циркулирующих в обследованных нами популяционных группах ограничено четырьмя подтипами (1b, 2a, 2c, 3a). Каждый из указанных подтипов вполне обычен в Евразии. Относительная представленность различных подтипов ВГС в обследованном нами регионе демонстрирует промежуточный характер между генотипическим разнообразием изолятов ВГС в Европейской части России (1a – 11,2%; 1b – 70,2%; 2a – 5%; 2b – 0,6%; 3a – 8,7%; “non-1a-3a” – 4,3%) (Lvov et al., 1996) и Северном Китае (циркуляция ограничена подтипами 1b и 2a, причём на долю 2a приходится 46-70% случаев) (Zhang et al., 1995; Wu et al., 1995; Suzuki et al., 1997; Wang et al., 1993b). Также важно, что изоляты ВГС различных генотипов распределены в обследованной нами популяции жителей Сибири неравномерно, относительная встречаемость различных генотипов ВГС зависит от среднего возраста обследованных и, по всей видимости, от преобладающих путей передачи вируса в данной популяционной группе.

Факторы риска инфекции ВГС в различных популяционных группах жителей Новосибирской обл. В данном разделе представлено исследование факторов риска в отношении инфекции ВГС в четырёх популяционных группах жителей Новосибирской обл., обследованных в 2001-2002 гг. Эпидемиологические и социологические данные были собраны от медицинских работников, пациентов МГНД, пациентов Центра СПИД и

посетителей поликлиники НРБ-1 ($n=500$ в каждой выборке). Приведённые ниже значения отношения шансов (OR) получены для объединённой группы обследованных из всех источников ($n=2000$) и происходят из таблиц сопряжённости (crude OR). Количественные значения OR приведены только для связей, имеющих статистическую поддержку на 5% уровне значимости (использован критерий Хи-квадрат с поправкой Йетса).

Употребление наркотиков оказалось наиболее прогностически ценным фактором риска (OR=77,50). Употребление алкоголя в количествах больше >100 мл (в расчете на этанол) в неделю было фактором риска (OR=3,92).

Работа на условиях полной занятости была фактором защиты (OR=0,19), тогда как статус безработного на момент проведения обследования занял следующее место по порядку величины OR после наркомании (OR=16,30). Образовательный уровень также оказался статистически связан со статусом по инфекции ВГС: наличие высшего образования было фактором защиты (OR=0,20), среднего образования - фактором риска (OR=2,88).

Была исследована роль профессиональных факторов риска, под которыми понимали различные инциденты, могущие привести к заражению ВГС в ходе выполнения профессиональных обязанностей. Обследованным были заданы вопросы о том, были ли в их практике случаи уколов и порезов загрязнённым инструментом (для медработников: $n=500$, OR=0,70, $p=0,614$) и случаи попадания крови либо других биологических жидкостей на открытые раны или слизистые оболочки (для медработников: OR=0,75, $p=0,843$). Мы ожидали, что профессиональные риски проявят своё действие в выборке медработников, однако достоверных связей для этих вопросов не было обнаружено.

Среди признаков, связанных с половым поведением, факторами риска серопозитивности по маркерам ВГС были наличие у респондента более 4 половых партнёров (в течение жизни) (OR=4,25), половые контакты с лицами своего пола (OR=6,61), и заболевания, передающиеся половым путём, в анамнезе (OR=1,74). Факторами риска также были пребывание в местах лишения свободы (OR=4,92) и наличие татуировок, выполненных в местах заключения (OR=12,76). Посещение парикмахерских и маникюрных кабинетов не было статистически достоверным фактором риска ни в одном из проведённых нами сравнений. В объединённой группе не было выявлено статистически значимых рисков от перенесённых инвазивных медицинских вмешательств. Исследованные нозокомиальные факторы риска проявили своё действие только в подгруппах с низким совокупным риском. Например, статистически значимый риск от кровопереливаний, выполненных до начала тестирования донорской крови на маркеры ВГС (1994 г.) был выявлен у лиц, никогда не употреблявших наркотики (OR=4,57). Не было выявлено статистически значимых рисков

для общей анестезии, хирургических операций или стоматологических вмешательств в анамнезе.

Таким образом, блок вопросов, описывающих образовательный уровень, доход, жилищные условия, занятость и др. социально-экономические характеристики индивида, оказался сильнее связан с ВГС, чем нозокомиальные или профессиональные риски.

Для оценки скорректированных отношений шансов (adjusted OR), отражающих добавочные риски от независимо влияющих факторов, были построены логистические регрессионные модели наилучшего приближения, из которых исключали мультиколлинеарные предикторы. Прогнозные модели строили отдельно для качественно однородных выборок (медработников, пациентов МГНД и Центра СПИД, поликлинических пациентов). Результаты выявления в перечисленных выборках наиболее прогностически ценных и независимо влияющих переменных представлены в Таблице 4. Для пациентов МГНД и Центра СПИД знания всего трёх предикторов (факта употребления наркотиков, статуса безработного и количества половых партнёров) было достаточно, чтобы предсказывать наличие/отсутствие у обследуемого маркёров ВГС с уверенностью >90 и >80%, соответственно. Поперечный формат исследования не позволяет вычислить долю случаев в общей заболеваемости, связанную действием определённой причины заражения (реализацией механизма передачи), он позволяет только описать относительное значение факторов риска. Для того чтобы вычислить долю, на которую уменьшилось бы число заболевших, если исключить воздействие на популяцию определённого фактора риска (т.е., вычислить атрибутивную долю популяционного риска) необходимо проводить когортное исследование. Однако мы можем ранжировать статистически достоверные независимо действующие риски по порядку “приоритетности” в данной популяционной группе. У обследованных медработников данный порядок следующий: статус студента; потребление большего количества алкоголя (больше 100 мл в неделю); кровопереливания в анамнезе, выполненные до начала тестирования донорской крови на маркёры ВГС (в России такое тестирование началось в 1994 г.); контакт с больным гепатитом в семье. У пациентов МГНД проведённый анализ позволил связать практически всю заболеваемость с фактором употребления наркотиков. У пациентов Центра СПИД: употребление наркотиков, статус безработного, число половых партнёров больше 4-х. Среди пациентов поликлиники НРБ-1 наиболее ценными предикторами статуса по маркёрам ВГС были (по порядку убывания величины связи): употребление наркотиков, статус безработного и наличие в анамнезе кровопереливаний.

Таблица 4. Независимо влияющие и наиболее прогностически ценные факторы риска в обследованных субпопуляциях.

	Скорректированный OR ¹	OR ДИ 95% ²		p
Медицинские работники				
Характер занятости: студент	35,105	2,064	597,193	0,014
Потребление алкоголя: >100 мл в неделю	35,105	4,534	271,83	0,001
Перенёс кровопереливания, сделанные до 1994 г. вкл.	8,859	2,077	37,791	0,003
У жены/мужа в анамнезе гепатит	5,589	1,822	17,144	0,003
Работа связана с органическими растворителями	5,516	0,931	32,689	0,06
Const. ³	0,028			0
Пациенты МГНД				
Употреблял наркотики	210,453	99,652	444,45	0
Наличие в анамнезе кровопереливаний	2,446	0,862	6,944	0,093
Const.	0,051			0
Пациенты Центра СПИД				
Употреблял наркотики	20,661	12,208	34,968	0
Характер занятости: безработный	2,002	1,131	3,541	0,017
Количество половых партнёров >4	1,021	1,001	1,043	0,044
Const.	0,086			0
Пациенты поликлиники				
Употреблял наркотики	20,688	4,787	89,408	0
Характер занятости: безработный	5,118	1,384	18,931	0,014
Наличие в анамнезе кровопереливаний	3,619	1,352	9,686	0,01
Const.	0,033			0

Примечания:

¹ Отношение шансов, вычисленное для каждого из факторов риска, включённых в модель, при условии постоянства других факторов (adjusted OR).

² 95% доверительный интервал для скорректированного отношения шансов.

³ Параметр отсечения (intercept); приведено значение Const =exp(a), a – свободный член уравнения регрессии.

Ниже представлены характеристики качества подгонки моделей: критерий Хи-квадрат для модели (LR), число степеней свободы (df), достигнутый уровень значимости для модели в целом (p), процент правильных отнесений к позитивной группе (чувствительность, SN), процент правильных отнесений к негативной группе (специфичность, SP), общий процент правильных предсказаний (TP).

Для выборки медработников: LR= 26,39, df=5, p< 0.001; SN=47,8%; SP=88,8%; TP=86,7%.

Для выборки пациентов МГНД: LR= 442,44, df=2, p< 0.001; SN=93,8%; SP=92,3%; TP=93,0%.

Для выборки пациентов Центра СПИД: LR= 230,63, df=3, p< 0.001; SN=82,6%; SP=85,1%; TP=84,2%.

Для выборки пациентов поликлиники: LR= 23,37, df=3, p< 0.001; SN=54,2%; SP=84,4%; TP=82,7%.

Генетическая характеристика и филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей ВГС. Для генотипирования изолятов ВГС и изучения молекулярной вариабельности маркерных районов генома изолятов ВГС, циркулирующих в обследованных популяциях, исследовали фрагменты области 5'-UTR и гена NS5B. Множественные сравнения нуклеотидных последовательностей были построены для фрагмента 5'-UTR (104-287 нт, нумерация по последовательности прототипного изолята HCV-1), фрагмента NS5B (8276-8615 нт). Статистический анализ множественного сравнения последовательностей был выполнен с использованием программы TREE-PUZZLE (Schmidt et al., 2002). С помощью данного средства были оценены величина параметра альфа для гамма-распределения скоростей замен (для сравнения 5'-UTR: альфа=0,17, стандартная ошибка 0,02; для сравнения NS5B: альфа=0,68, стандартная ошибка 0,02) и оценка отношения количества транзиций к количеству трансверсий (для сравнения 5'-UTR: $s/v=3,61$, стандартная ошибка 0,45; для сравнения NS5B: $s/v=2,27$, стандартная ошибка 0,10). Генетические расстояния для последовательностей 5'-UTR были невелики (среднее расстояние по Джуксу-Кантору 0,064), для последовательностей NS5B генетические расстояния были, в среднем, весьма велики (среднее расстояние по Джуксу-Кантору 0,317).

Для построения филогенетических деревьев использовали методы максимального правдоподобия (ML) и минимальной эволюции (ME). Были использованы меры генетического расстояния FC96 (Felsenstein & Churchill, 1996) и TN93 (Tamura & Nei, 1993), как с гамма-коррекцией, так и без неё, причём деревья, построенные с разными метриками, не различались по топологии.

На Рис. 2 представлено ML-дерево (использованы: программа DNAML из пакета Phylip, модель (Felsenstein & Churchill, 1996), гамма-коррекция с альфа=0,68), построенное для всех последовательностей NS5B, определённых в группе образцов от пациентов МГНД, а также 48-ми прототипных последовательностей различных подтипов. В данном дереве можно наблюдать хорошо выраженное разделение клад, соответствующих всем 6-ти генотипам ВГС по классификации ICTV. При этом прототипные последовательности для каждого генотипа группируются совместно и не наблюдается случаев попадания прототипов в кладу “не своего” генотипа.

Субтипирование изолятов ВГС проводили путём исследования ME-деревьев NS5B, причём для узлов дерева вычисляли величины статистической поддержки. Был использован тест бутстреп с 1000 реплик. Было обнаружено, что в ME-деревьях последовательностей NS5B ветви 6-ти генотипов и основных субтипов ВГС имеют достаточную (>70%) поддержку в тесте бутстреп.

Благодарности

Автор приносит благодарность своим коллегам по лаборатории и сотрудникам ГНЦ ВБ “Вектор”, в тесном сотрудничестве с которыми была выполнена диссертационная работа, а именно: И.В. Гавриловой, Р.Б. Баяндину, И.Г. Раковой, М.В. Алёшиной, Г.В. Кочневой, А.А. Гражданцевой, Г.Ф. Сиволобовой, С.А. Походне.

ВЫВОДЫ

1. Выявлена циркуляция на территории Новосибирской обл. (в 2001-2002 гг.) четырёх подтипов ВГС: 1b, 2a, 2c и 3a. Распределение изолятов ВГС по генотипам было следующим, в образцах от стационарных пациентов: подтип 1b - 49.9%, 2a - 4.1%, 3a - 46.1%; у поликлинических пациентов: подтип 1b - 47.8%, 2a - 4.3%, 3a - 47.8%; у медицинских работников: подтип 1b - 63.2%; 2a - 10.5%; 2c - 5.3%; 3a - 21.1%. Для 1/388 (0.3%) изолятов ВГС генотип не мог быть присвоен из-за вероятной микст-инфекции разными генотипами. Данное распределение является промежуточным между генотипическим разнообразием изолятов ВГС в Европейской России и в Северном Китае.

2. Генотип 1 превалирует в старшей возрастной группе (65% изолятов в группе 51-60 лет), а генотип 3 - у людей молодого возраста (>90% изолятов в группе 16-20 лет). Генотипическое разнообразие изолятов ВГС на территории региона меняется со временем в сторону роста доли генотипа 3. Повышенная частота случаев инфекции ВГС генотипа 3 связана в основном с употреблением внутривенных наркотиков.

3. Определение генотипов изолятов ВГС, циркулирующих на территории региона, может быть выполнено на основании филогенетического анализа последовательностей как 5'-UTR, так и NS5B. Для определения подтипов изолятов ВГС и получения статистически значимого группирования в филогенетическом анализе предпочтительно исследовать последовательность гена NS5B (например, фрагмент 8276-8615 нт).

4. По результатам молекулярно-эпидемиологического исследования, выполненного в 2001-2002 гг., частота выявления иммунологических маркеров инфекции ВГС в разных группах обследованных из Новосибирской обл. составила: 35.8% - в группе пациентов Областного Центра СПИД, 48.0% - среди пациентов Муниципального наркологического диспансера, 5.6% - среди посетителей поликлиники и 4.6% - у медицинских работников больниц Новосибирской обл. Частота выявления РНК ВГС в серопозитивных образцах составила (данные за 2001-2002 гг.) в среднем 82.5% в сыворотках от стационарных пациентов, 79.3% - в пробах от поликлинических пациентов, 65.4% в сыворотках от медработников.

5. Основные факторы риска инфицирования гепатитом С населения Новосибирской области связаны с рискованным поведением и низким социально-экономическим статусом. Наиболее важную роль в распространении ВГС среди обследованных жителей области играет внутривенная наркомания (отношение шансов: OR= 77.5, $p<0.05$). Статистически значимо ($p<0.05$) повышенные риски серопозитивности выявлены у безработных (OR=16.3); у людей, потребляющих много алкоголя (OR= 3.9); у лиц, имеющих много половых партнёров (OR= 4.3) или практиковавших гомосексуальные контакты (OR=6.6); у лиц, перенесших заболевания, передающиеся половым путём (OR=1.7).

6. Среди потенциально инвазивных медицинских процедур в анамнезе статистически значимый ($p<0.05$) риск был выявлен для кровопереливаний (только в группах низкого риска по инфекции, OR=4.6). Частоты обнаружения маркёров ВГС у медицинских работников разных специальностей сильно различаются (у сотрудников терапевтических отделений – 1.8%, у медперсонала отделений гемодиализа и трансплантации почки – 9.8%, у сотрудников отделений переливания крови – 8.7%), что отражает зависимость величины профессионального риска у медработников от выполняемой ими работы.

Список работ, опубликованных по теме диссертации:

1. **Нетёсова И.Г., Киселёв Н.Н., Лосева М.И., Ярославцева О.А., Вторушина И.А., Калинин П.Н., Шустов А.В., Поспелова Т.И., Адамовская И.А., Зайцев С.А., Нетёсов С.В. (1997).** Встречаемость серологических маркёров вирусных гепатитов В и С в крови пациентов и медицинского персонала гематологического отделения 2-ой городской больницы г. Новосибирска. *Вопр вирусол* 1, 27-30.
2. **Гаврилова Н.И., Киселёв Н.Н., Мишин В.П., Шустов А.В., Спиридонова Э.А., Никифорова Н.А. (1998).** Диагностика острого вирусного гепатита у детей. *Педиатрия* 1, 11-13.
3. **Толоконская Н.П., Непомнящих Г.И., Киселёв Н.Н., Шустов А.В., Сахарова Е.Г. (1999).** Клиническая характеристика вирусного гепатита С. *Эпидемиология и инфекционные болезни* 5, 20-23.
4. **Канев А.Н., Шалунова Н.В., Нетесов С.В., Ястребова О.Н., Мусина Е.Е., Бочарова Н.Г., Мишин В.П., Киселев Н.Н., Шустов А.В., Смердова М.А., Бектимиров Т.А. (2000).** Конструирование референс-панели сывороток к вирусу гепатита С с нормированным уровнем IgG-антител. *Вопр вирусол* 4, 42-47.
5. **Шустов А.В., Мишин В.П., Максютков А.З., Киселев Н.Н., Сахарова Е.Г., Толоконская Н.П., Robertson V.J., Нетесов С.В. (2000).** Встречаемость маркёров

- вируса гепатита С и различных его генотипов у пациентов 1-й Муниципальной инфекционной клинической больницы г. Новосибирска. *Вопр вирусол* 6, 22-27.
6. **Kochneva G.V., Sivolobova G.F., Grazdantseva A.A., Shustov A.V., Gavrilova I.V., Nesterov A.E., Streltsova M.A., Paltsev A.I., Loktev A.V., Maksyutov A.Z., West E., Netesov S.V. and Ryder R.W. (2000).** The prevalence and risk factors of hepatitis C virus and hepatitis B virus infections among health care workers in Novosibirsk region hospitals. *Antiviral Therapy* 5 (Suppl. 1), 31.
 7. **Shustov A.V., Mishin V.P., Kisselev N.N., Ossipova L.P., Posukh O.L., Maksyutov A.Z., Sakharova E.G., Tolokonskaya N.P., Netesov S.V. and Robertson B.H. (2000).** Studies on Hepatitis C Virus (HCV) in Western Siberia. *Antiviral Therapy* 5 (Suppl. 1), 29.
 8. **Гаврилова И.В., Шустов А.В., Нетёсов С.В. (2001).** Быстрые методы генотипирования изолятов вируса гепатита С с использованием анализа конформационного полиморфизма одиночных цепей ДНК и гетеродуплексного анализа. *Мир вирусных гепатитов* 11, 8-18.
 9. **Шустов А.В., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Гаврилова И.В., Нестеров А.Е., Стрельцова М.А., Пальцев А.И., Локтев А.В., Максютов А.З., Акинфеева Л.А., Торшин В.П., West T.E., Нетесов С.В., Ryder R.W., Онищенко Г.Г. (2002).** Частота встречаемости маркёров гепатита С и факторы риска у персонала больниц Новосибирской области. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)* 2, 26-32.
 10. **Шустов А.В., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Гаврилова И.В., Акинфеева Л.А., Ракова И.Г., Алешина М.В., Букин В.Н., Орловский В.Г., Беспалов В.С., Zelicoff A.P., Нетесов С.В. (2003).** Частоты встречаемости маркёров, распределение генотипов и факторы риска вирусного гепатита С среди некоторых групп населения Новосибирской области. *Журнал микробиологии эпидемиологии и иммунобиологии (ЖМЭИ)* (принята к публикации).

Участие в конференциях (2000-2003 гг.)

1. Шустов А.В., Стрельцова М.А., Акинфеева Л.А., Нестеров А.Е., Максютов А.З., Дьячкова Л.Б., Пальцев А.И., Нетёсов С.В., Райдер Р. Встречаемость маркёров вируса гепатита С у персонала больниц Новосибирской области. 3-я Всероссийская научно-практическая конференция “Генодиагностика в современной медицине” (Москва, 25-27 января 2000 г.) Сборник трудов конференции, 2000 г.

2. Гаврилова Н.И., Ольховикова Е.А., Шустов А.В., Нетесов С.В. Методы генодиагностики в оценке эффективности α -интерферона у детей с хроническим вирусным гепатитом С, В+С. 3-я Всероссийская научно-практическая конференция "Генодиагностика в современной медицине" (Москва, 25-27 января 2000 г.) Сборник трудов конференции, 2000 г.
3. GV Kochneva, GF Sivolobova, AA Grazdantseva, AV Shustov, IV Gavrilova, AE Nesterov, MA Streltsova, AI Paltsev, AV Loktev, AZ Maksyutov, E West, SV Netesov and RW Ryder. The prevalence and risk factors of hepatitis C virus and hepatitis B virus infections among health care workers in Novosibirsk region hospitals. X-th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (9-13 April, 2000, Atlanta, USA). ABSTRACT C057.
4. AV Shustov, VP Mishin, NN Kisselev, LP Ossipova, OL Posukh, AZ Maksyutov, EG Sakharova, NP Tolokonskaya, SV Netesov and BH Robertson. Studies on Hepatitis C Virus (HCV) in Western Siberia. X-th International Symposium on Viral Hepatitis and Liver Disease (9-13 April, 2000, Atlanta, USA). ABSTRACT C053.
5. Шустов А.В., Мишин В.П., Киселёв Н.Н., Осипова Л.П., Посух О.Л., Максютков А.З., Сахарова Е.Г., Толоконская Н.Н., Нетёсов С.В. и Робертсон Б.Дж. Встречаемость маркёров и генотипическое разнообразие вируса гепатита С (ВГС) в Западной Сибири. VI-я Российско-Итальянская конференция «ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, ПРОФИЛАКТИКА» (14-16 декабря 2000 г., г. Санкт-Петербург). Сборник трудов конференции. С.297.
6. Шустов А.В., Гаврилова И.В., Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Гражданцева А.А., Нетёсов С.В. Распределение изолятов вируса гепатита С по генотипам может быть различно у пациентов инфекционных больниц и клинически здоровых людей. VI-я Российско-Итальянская конференция «ИНФЕКЦИОННЫЕ БОЛЕЗНИ: ДИАГНОСТИКА, ЛЕЧЕНИЕ, ПРОФИЛАКТИКА» (14-16 декабря 2000 г., г. Санкт-Петербург). Сборник трудов конференции. с.296-297.
7. А.В. Шустов, Г.В. Кочнева, Г.Ф. Сиволобова, А.А. Гражданцева, И.В. Гаврилова, М.А. Стрельцова, А.Е. Нестеров, А.И. Пальцев, Л.А. Акинфеева, В.П. Торшин, С.В. Нетёсов, Р.У. Райдер. Факторы риска и генотипическое разнообразие изолятов вируса гепатита С у персонала больниц Новосибирской области. Материалы IV Российской научно-практической конференции "Гепатит В, С и D - проблемы диагностики, лечения и профилактики" (г. Москва, Россия, 19-21 июня 2001 г.) Сборник трудов конференции. с.397-398.
8. И.В. Гаврилова, А.В. Шустов, С.В. Нетёсов. Быстрые и эффективные методы генотипирования изолятов вируса гепатита С. Материалы II Научной конференции с

- международным участием "Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера". (Новосибирск, Россия, 29-31 мая 2002 г.) Сборник трудов конференции. с.33.
9. Н.И. Гаврилова, П.Н. Филимонов, А.В. Шустов, И.В. Гаврилова, С.В. Нетёсов. Влияние репликации ВГС и ВГВ на гистологическую активность гепатита у детей с ХГ В+С. Материалы II Научной конференции с международным участием "Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера". (Новосибирск, Россия, 29-31 мая 2002 г.) Сборник трудов конференции. с.34.
 10. Влияние характеристик серологической тест-системы на результат эпидемиологического исследования. А.В. Шустов, Г.Ф. Сиволобова, А.А. Гражданцева, И.В. Гаврилова, Л.А. Акинфеева, С.В. Нетёсов. Материалы II Научной конференции с международным участием "Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера". (Новосибирск, Россия, 29-31 мая 2002 г.) Сборник трудов конференции. с.62.
 11. The prevalence and risk factors of HCV and HBV infections among health care workers in Novosibirsk region hospitals. A.V. Shustov, G.F. Sivolobova, A.A. Grazdantseva, G.V. Kochneva, I.V. Gavrilova, R.B. Bayandin, L.A. Akinfeeva, A. Zelicoff, S.V. Netesov. Материалы II Научной конференции с международным участием "Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера". (Новосибирск, Россия, 29-31 мая 2002 г.) Сборник трудов конференции. с.63.
 12. Shustov A.V., Sivolobova G.F., Grazdantseva A.A., Kochneva G.V., Gavrilova I.V., Bayandin R.B., Akinfeeva L.A., Netesov S.V. The prevalence and risk factors of HCV and HBV infections among health care workers in Novosibirsk region hospitals. XII International Congress of Virology (Paris, 27 July-1 August 2002). Abstract V-1026. Abstract book. P. 343.
 13. Вирусные гепатиты в Западной Сибири за сорок лет в сравнении с данными по России и другим странам. С.В. Нетесов, А.В. Шустов, И.В. Гаврилова, В.А. Терновой, Р.Б. Баяндин, Г.В. Кочнева, А.А. Гражданцева, Г.Ф. Сиволобова, Н.А. Маркович, В.М. Гранитов, Л.И. Губанова, Е.Г. Сахарова. Материалы V Российской научно-практической конференции "Гепатит В, С и D - проблемы диагностики, лечения и профилактики" (г. Москва, Россия, 3-5 июня 2003 г.) Сборник трудов конференции. с.206-207.
 14. Генотипы вирусов А, В и С, циркулирующих среди населения Западной Сибири. А.В. Шустов, И.В. Гаврилова, В.А. Терновой, Т.Н. Рудзевич, Е.В. Чуб, Р.Б. Баяндин, Г.В. Кочнева, А.А. Гражданцева, Г.Ф. Сиволобова, М.О. Фаворов, Б. Дж. Робертсон, С.В. Нетесов. Материалы V Российской научно-практической конференции "Гепатит В, С и D

- проблемы диагностики, лечения и профилактики" (г. Москва, Россия, 3-5 июня 2003 г.)
Сборник трудов конференции. с.352-353.
15. Особенности ВГС - серологических ответов у детей с моно и микст хроническими гепатитами. Н.И. Гаврилова, П.Н. Филимонов, О.Н. Ястребова, Э.А. Криницина, А.В. Шустов, И.В. Гаврилова, О.Н. Гришаева. Материалы V Российской научно-практической конференции "Гепатит В, С и D - проблемы диагностики, лечения и профилактики" (г. Москва, Россия, 3-5 июня 2003 г.). Сборник трудов конференции. с.49-51.
16. Изучение частоты встречаемости маркёров и генотипического разнообразия вируса гепатита В среди некоторых групп населения Новосибирской области. Баяндин Р.Б., Шустов А.В. XIV Научная конференция-конкурс молодых ученых ГНЦ ВБ "Вектор". Кольцово, 26-27 июня 2003.
17. Генотипическое разнообразие изолятов вируса гепатита С, циркулирующих в г. Барнауле. Чуб Е.В., Шустов А.В. XIV Научная конференция-конкурс молодых ученых ГНЦ ВБ "Вектор". Кольцово, 26-27 июня 2003.
18. A.V. Shustov, I.V. Gavrilova, V.A. Ternovoi, T.N. Rudzevich, E.V. Chub, R.B. Bayandin, G.V. Kochneva, A.A. Grazhdantseva, G.F. Sivolobova, M.O. Favorov, and S.V. Netesov. Genotypes of hepatitis A, B, and C viruses circulating in the population of Western Siberia. 6-ой ежегодный съезд Европейского Общества Клинической Вирусологии и 8-ая Конференция по Современной ситуации в области Хронических Вирусных Гепатитов (г. Лион, Франция, 23-30 августа 2003 г.). Постерное сообщение.
19. A.V. Shustov et al. Molecular Epidemiology of Hepatitis B and Hepatitis C in Siberia. (А.В. Шустов и др. Молекулярная эпидемиология вирусов гепатитов В и С в Сибири). Международная конференция "Integrated Surveillance for HIV/AIDS, Viral Hepatitis, and STDs Control and Prevention in Central Asia Region. CDC/USAID CAR International Conference." (Ташкент, Узбекистан, 7 – 9 октября 2003 г.). Доклад.
20. Гаврилова Н.И., Филимонов П.Н., Ястребова О.Н., Криницина Э.В., Шустов А.В., Гаврилова И.В., Гришаева О.Н. Изучение особенностей серологического ответа у детей с хроническими вирусными гепатитами. VI Российский съезд врачей-инфекционистов / Материалы съезда. - СПб., ВМедА. - 2003. - С. 80-81.