

А. А. Арабей¹, А. М. Е. Мохаммед², С. В. Жаворонок¹, К. К. Кюрегян², Л. В. Будько¹,
В. В. Давыдов¹, М. И. Михайлов²

ОБНАРУЖЕНИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА Е СРЕДИ КРОЛИКОВ В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
ФГБУ Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М. П. Чумакова, Россия, Москва²

Проведено исследование биологического материала, полученного от популяции кроликов, на наличие РНК ВГЕ в фекалиях, а также анти-ВГЕ IgG в сыворотке крови. При этом вирусная РНК выявлена у 18,3% кроликов, а антитела – у 12,5% исследуемой популяции. Проведён филогенетический анализ полученных изолятов РНК вируса, в результате которого установлено, что выделенный кластер является самостоятельным, близким, но не относящимся к 3-му генотипу ВГЕ.

Ключевые слова: вирус гепатита Е, генотип, зоонозная инфекция.

A. A. Arabey, A. M. E. Mohammed, S. V. Zhavoronok, K. K. Kuregyan, L. V. Budko, V. V. Davydu, M. I. Mikhailov

DETECTION OF HEPATITIS E VIRUS AMONG RABBITS OF BELARUS

In this study we investigate biological material obtained from the rabbit population for the presence of HEV RNA in feces, as well as anti-HEV IgG in the serum. In this case, HEV RNA was detected in 18.3% and antibodies – in 12.5% cases of the population. Phylogenetic analysis of the RNA isolates established that the selected cluster is an independent, close, but not related to the HEV3.

Key words: hepatitis E virus, genotype, zoonotic infection.

В 1980 году в Индии учёные выявили новую форму вирусного гепатита с энтеральным механизмом передачи, который впоследствии был назван гепатитом Е (ГЕ) [1]. Вирус, вызывающий эту инфекцию, был впервые описан М. С. Балаяном с соавт. в 1983 году в опыте самозаражения материалом от больных гепатитом Е советских солдат, воевавших на территории Афганистана [2].

Вирус гепатита Е (ВГЕ) является патогеном, вызывающим заболевание у людей. На сегодняшний день ВГЕ является основной причиной возникновения острого гепатита во всём мире и по предварительным данным одна треть населения земли перенесла это заболевание. Ранее считали, что эта инфекция характерна только для стран с жарким климатом. Однако, сегодня установлено, что

спорадические случаи возникновения острого ГЕ имеют место в различных развитых странах, включая США, Францию, Германию и др. [3]. Кроме того, описаны случаи возникновения хронического течения заболевания, сопровождающиеся циррозом печени [4].

ВГЕ имеет преимущественно фекально-оральный путь передачи и проявляется у лиц молодого возраста в виде острой самоограничивающейся инфекции [5].

Установлено четыре основных генотипа ВГЕ, из которых 1-й и 2-й характерны для человеческой популяции, а 3й и 4й генотипы являются зоонозами, охватывающими широкий спектр переносчиков [6]. Некоторое время назад в популяциях крыс (Германия, США) и диких кабанов (Япония) было идентифицировано два новых гено-

типа ВГЕ. Предполагается, что птичий ВГЕ, выявленный у кур, представляет собой новый род семейства *Hepeviridae*, а штамм, полученный из форели относится скорее всего к новому подтипу вируса [7].

ВГЕ представляет собой небольшой вирус, не имеющий оболочки с геномом в виде одноцепочечной РНК позитивной полярности. Геном вируса включает 3 открытые рамки считывания (ОРС), каждая из которых кодирует синтез определенных вирусоспецифических белков. ОРС1 кодирует неструктурные пептиды, ОРС2 – вирусный капсид, а ОРС3 – цитоскелет-ассоциированные фосфопротеины, выполняющие широкий спектр различных функций [8]. Первый штамм ВГЕ, поражающий животных, был обнаружен у свиней в 1997 году, после чего он был подробно изучен и описан. Все штаммы ВГЕ, выделенные из свиней относятся к 3 либо 4 генотипам являющимся зоонозными вирусами, способными инфицировать различные виды животных [9]. На сегодняшний день до конца не определен полный спектр млекопитающих, способных выступать в качестве переносчиков ВГЕ. Тем не менее, установлено, что некоторые разновидности ВГЕ, вызывающие инфицирование крыс, хорьков, мангустов, и летучих мышей не опасны для людей. Основным источником инфекции для человека являются домашние свиньи, при этом путь передачи ВГЕ возможен главным образом через употребление в пищу сырого или недостаточно хорошо обработанного мяса инфицированных животных. Отмечены случаи возникновения ВГЕ вызванные также употреблением в пищу субпродуктов и мяса диких животных, добытых в результате охоты [10]. Наряду с домашними свиньями внимание исследователей привлекли другие виды животных, выращиваемые человеком, в частности кролики. При исследовании различных популяций домашних кроликов на территории США и Китая был идентифицирован новый штамм ВГЕ близкий к третьему генотипу данного вируса. При этом было показано, что инфицирование кроликов этим штаммом может приобретать характер эпидемии и охватывать крупные территориальные области. Поскольку домашние свиньи являются основным естественным переносчиком третьего генотипа ВГЕ, то не исключён тот факт, что штамм ВГЕ полученный от кроликов может также ока-

заться опасным как для других животных, так и для человека. По этой причине представляется важным вопрос о вероятности заражения человека штаммами ВГЕ, инфицирующими кроликов как при употреблении в пищу их мяса, так и при непосредственном контакте [7].

Для пилотного исследования по установлению факта циркуляции ВГЕ в регионе нами проведено определение РНК ВГЕ и анти-ВГЕ IgG среди кроликов в Республике Беларусь.

Целью данного исследования являлось выявление факта циркуляции ВГЕ на территории Республики Беларусь, оценка интенсивности эпидемического процесса на модели популяции кроликов путем определения частоты встречаемости вирусной РНК гепатита Е и анти-ВГЕ IgG, а также проведение филогенетического анализа изолятов ВГЕ.

Материалы и методы

Объектом данного исследования являлся биологический материал от популяции кроликов, содержащихся в условиях вивария, а именно кровь, сыворотка и фекалии, собранные за первое годие жизни животных с момента рождения. Для выявления вирусной РНК гепатита Е осуществлялось исследование фекалий кроликов методом вложенной обратной-транскриптазной ПЦР. Для этого пробы фекалий объемом 1,0 мл (0,4–1,0 г) помещали в отдельные стерильные флаконы и к каждому образцу приливали по 4,0 мл физиологического раствора с целью получения 10–20% экстракта. Взвесь интенсивно встряхивали на вортексе и центрифугировали в течение 30 минут при 3000 об./мин., после чего супернатанты переносили в стерильные пробирки и повторно центрифугировали в течение 20 минут при 10000 об./мин. Полученные надосадочные жидкости отбирали и переносили в отдельные пробирки для дальнейшего выделения нуклеиновых кислот с помощью коммерческого набора (НПО «Литех») по протоколу производителя.

ПЦР осуществляли с использованием вырожденных праймеров к участку ОРС2 ВГЕ, представленных в таблице 1. Условия проведения амплификации с обратной транскрипцией представлены в таблице 2.

Таблица 1. Последовательности олигонуклеотидов, используемых для амплификации РНК ВГЕ

Последовательность	Положение	Направление	Позиция в геноме ВГЕ
5'-aay tat gcm cag tac cgg gttg -3'	Внешний	Прямой	5687–5708
5'-ccc tta tcc tgc tga gca ttctc -3'	Внешний	Обратный	6395–6414
5'- gty atg yty tgc ata cat ggct -3'	Внутренний	Прямой	5972–5993
5'-agc cga cga aat yaa ttc tgc t -3'	Внутренний	Обратный	6298–6319

* – нумерация нуклеотидных позиций приведена по штамму ВГЕ Burma (номер в базе данных GenBank M73218)

Таблица 2. Условия проведения ОТ-ПЦР

I Раунд	42 °C – 60 мин. 94 °C – 5 мин.	35 циклов: 94 °C – 30 сек, 45 °C – 30 сек., 72 °C – 45 сек.	72 °C – 7 мин.
II Раунд	-	35 циклов: 94 °C – 30 сек, 45 °C – 30 сек., 72 °C – 45 сек.	72 °C – 7 мин.

Полученные продукты ПЦР, соответствующие ВГЕ, определяли в 1,5% агарозном геле. Величина продукта амплификации для ВГЕ составляла 350 п.о. Для определения нуклеотидной последовательности анализируемых фрагментов вирусных геномов проводили прямое секвенирование ампликонов. Продукты ПЦР, размер которых соответствовал величине фрагмента-мишени, выделяли из агарозного геля с помощью набора QIAquick Gel Extraction kit (QIAGEN).

Выявление анти-ВГЕ IgG осуществляли методом иммуноферментного анализа с помощью коммерческих диагностических наборов «ИФА-АНТИ-ВГЕ-IgG» (НПО «Диагностические системы», РФ) с использованием видоспецифического антикроличьего конъюгата.

Филогенетический анализ изолятов ВГЕ осуществляли с помощью специального программного обеспечения, используемого при работе с сиквенсами в Институте полиомиелита и вирусных энцефалитов имени М. П. Чумакова (Москва).

Результаты и обсуждения

При исследовании 93 образцов фекальных экстрактов изучаемой популяции кроликов РНК ВГЕ была выявлена в 17 случаях, что составило 18,3% от общего количества. При этом иммунофермент-

ный анализ сывороток крови кроликов показал наличие анти-ВГЕ IgG у 5 кроликов из 40, что составило 12,5% случаев. Полученные данные свидетельствуют о том, что для в популяции кроликов на территории Республики Беларусь имеет место эпидемический процесс ВГЕ.

С целью проведения филогенетического анализа выявленных фрагментов генома ВГЕ из базы данных GenBank были отобраны референсные последовательности изолятов вируса ГЕ кроликов, полученные в Китае и Франции [6, 9], а также некоторое количество последовательностей ВГЕ, выделенных от человека и свиней, относящихся к различным генотипам и субтипам, циркулирующих в различных регионах мира.

Результаты филогенетического анализа показали, что изоляты вирусной РНК ГЕ исследуемой белорусской популяции кроликов (обозначены на рисунке 1 как Rabbit_BI_2013 4, 5, 6, 7, 9, 23, 29, 51), образуют единый кластер с изолятами, полученными от кроликов из Китая, а также с изолятами, выделенными от кроликов из Москвы (Rabbit_MR_2013 13, 78, 79, 84) и Московской области, г. Электрогорск (1 Rabbit_MR_2014 13, 15, 30, 39, 40). Степень сходства нуклеотидной последовательности данных изолятов составила 86%. Выделенный кластер является самостоятельным, близким, но

не относящимся к 3-му генотипу ВГЕ. Степень сходства между изолятами составила 97%. При этом данный кластер не группируется с изолятами, полученными от людей и свиней из различных регионов РФ (Белгородской, Владимирской, Архангельской, Калининградской, Саратовской, Свердловской областей, Хабаровского края), а также с референсными последовательностями различных субтипов ВГЕ, представленными в GenBank. Это свидетельствует о том, что ВГЕ кроликов наиболее близок третьему генотипу ВГЕ, но, по-видимому, является самостоятельным подтипом вируса.

В настоящее время до конца не выяснено, могут ли штаммы ВГЕ, поражающие кроликов, инфицировать человека. Исследования диких популяций кроликов и кроликов, выращиваемых на фермерских хозяйствах в Китае, США, и Европе, позволили обнаружить штаммы ВГЕ, вызывающие заболевание у этих животных. Оказалось, что штамм ВГЕ циркулирующий среди кроликов является родственным по отношению к человеческому, подтверждающая возможность зоонозного пути передачи [10]. Аналогичное исследование продемонстрировало принадлежность штаммов ВГЕ человека и кроликов к одному и тому же серотипу [11]. При этом остается нерешенным вопрос о возможности передачи ВГЕ человеку при прямом контакте с инфицированными животными. Исследования установили, что среди ветеринаров и заводчиков свиней носители анти-ВГЕ IgG антител встречаются с достаточно высокой частотой [10].

Изучение возможности межвидовой передачи ВГЕ обнаружено, что при инфицировании двух яванских макак вирусным штаммом, полученным от кроликов [12] у обоих животных развился типичный острый гепатит, сопровождающийся увеличением уровня печеночных ферментов, вирусемией, выделением вируса с экскрементами, появлением специфических антител в сыворотке крови. При этом геном ВГЕ макак на 99,8% соответствовал геному ВГЕ кроликов. При изучении локализации вируса в организме кроликов вирусная РНК была идентифицирована не только в печени, но также и в других органах и тканях животных.

Кролики являются вполне доступной и удобной экспериментальной моделью для подробного изучения клиники и патогенеза ВГЕ. Установлено, что при внутрибрюшинном инфицировании этих животных может возникнуть острая либо хроническая форма ВГЕ. Появление вируса в фекалиях носит волнообразный характер и коррелирует с наличием антигена в сыворотке крови. Вирусемия проявляется только через 72 часа после инфицирования. Благодаря иммуногистохимическому анализу вирусный антиген был идентифицирован в различных органах и тканях животных [10].

Данные о значении ВГЕ кроликов для инфекционной патологии человека пока ограничены, поскольку исследования в этом направлении только начинаются. Однако вероятность инфицирования человека ВГЕ от кроликов, аналогично описанной и доказанной передаче вируса от свиньи человеку, до сих пор не исключена.

Литература

1. Wong, D. C., Purcell R. H., Sreenivasan M. A., Prasad S. R., Pavri K. M. Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus etiology // *Lancet*. 1980. P. 876–879.
2. Balayan, M. S., Andjaparidze A. G., Savinskaya S. S., Ketiladze E. S., Braginsky D. M., Savinov A. P., Poleschuk V. F. Evidence for a virus in non-A non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route // *Intervirology*. 1983. № 20. P. 23–31.
3. Emerson, S. U. & Purcell, R. H. *Hepatitis E virus*, 5th edn. Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins. 2007.
4. Hoofnagle, J. H., Nelson, K. E., Purcell, R. H. *Hepatitis E* // *N. Engl. J. Med.* 2012. Vol. 367. P. 1237–1244.
5. Meng, X. J. Recent advances in hepatitis E virus // *J Viral Hepat.* 2010. № 17. P.153–161.
6. Bouquet, J., Tesse, S., Lunazzi, A., Eloit, M., Rose, N., Nicand, E. & Pavio, N. Close similarity between sequences of hepatitis E virus recovered from humans and swine, France, 2008–2009 // *Emerg Infect Dis.* 2011. № 17. P. 2018–2025.
7. Cossaboom, C., Cordoba, L., Sanford, B., Pineyro, P., Kenney, S., Dryman, B., Wang, Y. and Meng, X. Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States // *Journal of General Virology*. 2012. № 93. P. 1687–1695.
8. Meng, X. J. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk // *Vet Microbiol.* 2010. №1 40. P. 256–265.
9. Meng, X. J. From barnyard to food table: the omnipresence of hepatitis E virus and risk for zoonotic infection and food safety // *Virus Res.* 2011. № 161. P. 23–30.
10. Kamar, N., Dalton, H. R., Abravanel, F. and Izopet, J. Hepatitis E Virus Infection // *Clin. Microbiol. Rev.* 2014. Vol. 27. № 1. P. 116.

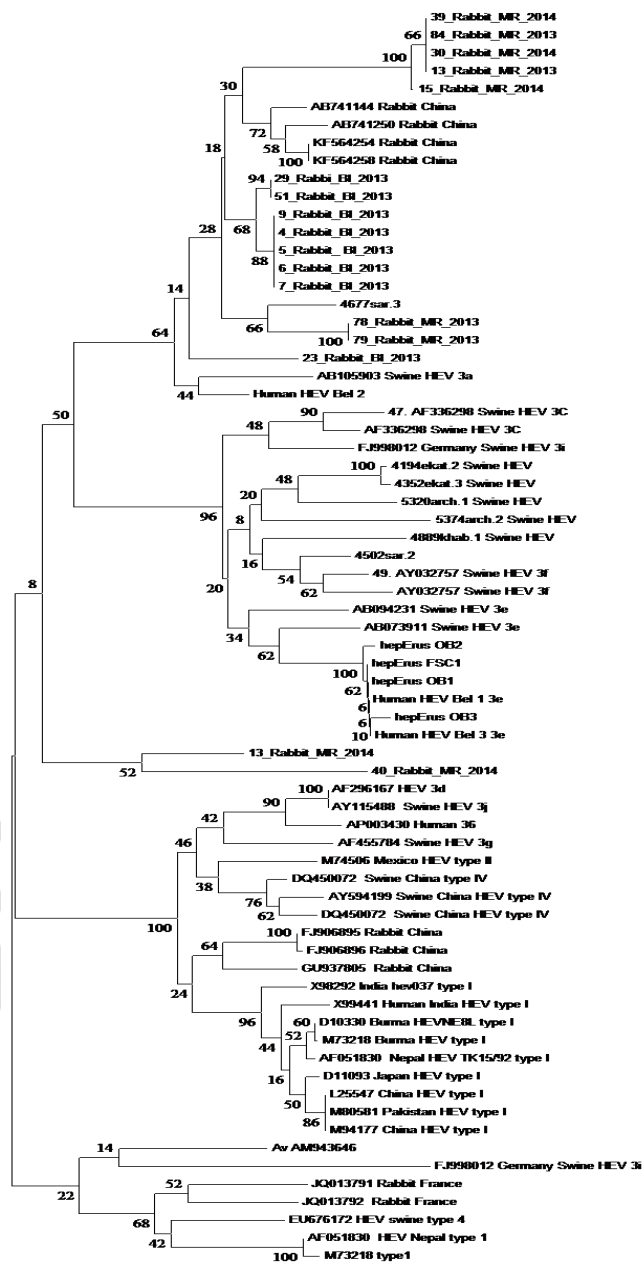


Рис. 1. Филогенетические взаимоотношения изолятов ВГЕ, выделенных от кроликов, а также людей и свиней. Для обозначения региона выделения вируса использованы следующие обозначения: Республика Беларусь – Rabbit_BI_2013 (4, 5, 6, 7, 9, 23, 29, 51), Архангельская область – arch, Владимирская область – vlad, Калининградская область – kalin, Саратовская область – sar, Свердловская область – ekat, Хабаровский край – khab, Белгородская область – Bel. Прототипные изоляты ВГЕ из GenBank приведены с указанием их номеров в базе данных. Анализ частичной нуклеотидной последовательности проводился в ORC 2 РНК ВГЕ (300 нт., 5996–6295 нумерация по прототипному изоляту Burma – M731.28). Филогенетическое дерево построено по алгоритму Neighbour-joining без коррекции (uncorrected distance) при помощи программы MEGA 5.05. Числа в узлах дерева – процент bootstrap-псевдореplikатов, поддерживаемых данной группой (приведены только достоверные значения >70%). Длина ветвей отражает степень отличия нуклеотидной последовательности вирусов в соответствии с приведенной шкалой

11. Wang, S., Cheng, X., Dai, X., Dong, C., Xu, M., Liang, J., Dong, M., Purdy, M. A., Meng, X. Rabbit and human hepatitis E virus strains belong to a single serotype // *Virus Res.* 2013. Vol. 176. № 1–2. P. 101–6.

12. Liu, P., Bu, Q., Wang, L., Han, J., Du, R., Lei, Y., Ouyang, Y., Li, J., Zhu, Y., Lu, F., and Zhuang, H. Transmission of Hepatitis E Virus from Rabbits to Cynomolgus Macaques // *Emerg Infect Dis.* 2013. Vol. 19. № 4. P. 559–65.

Поступила 26.02.2015 г.