

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ЭПИДЕМИОЛОГИЯ ГЕПАТИТА Е В БЕЛАРУСИ

*Давыдов В.В.¹, Бабенко А.С.¹, Жаворонок С.В.¹,
Марчук С. И.¹, Борисовец Д.С.², Гасич Е.Л.³*

¹ УО «Белорусский государственный медицинский университет,

² Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского,

³ ГУ «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии»

Минск, Беларусь

davidovvv@bsmu.by, labmdbt@gmail.com,

zhavoronok.s@mail.ru, Marchuk_s@mail.ru,

elena.gasich@gmail.com

Публикация посвящена использованию молекулярно-генетических технологий для эпидемиологического анализа случаев гепатита Е. Авторами проведен филогенетический анализ частичных нуклеотидных последовательностей РНК вируса гепатита Е. В ходе исследования проведено секвенирование участков генома вируса гепатита Е, отвечающего за синтез белка капсида вируса.

Ключевые слова: *эпидемиология вируса гепатита Е; филогенетический анализ.*

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF HEPATITIS E IN BELARUS

*Davydov V.V.¹, Babenko A.S.¹, Zhavoronok S. V.¹,
Marchuk S.I.¹, Borisovets D.S.², Gasich E.L.³*

¹Belarusian State Medical University,

²Institute of Experimental Veterinary Medicine. S.N.Vyshellesskiy,

³Republican Scientific and Practical Center for Epidemiology and Microbiology
Minsk, Belarus

The publication is devoted to the use of molecular genetic technologies for the epidemiological analysis of hepatitis E cases. The authors carried out a phylogenetic analysis of the partial nucleotide sequences of the RNA of the hepatitis E virus. In the course of the study, the sequencing of the genome regions of the hepatitis E virus responsible for the synthesis of the virus capsid protein was carried out.

Key words: *epidemiology of hepatitis E virus; phylogenetic analysis.*

Введение. Вирус гепатита Е (ВГЕ) является этиологическим агентом инфекции гепатита Е (ГЕ) – одной из ведущих причин острого и хронического воспаления печени. Буква «Е» означает связь с эпидемиями и энтеральным путем передачи. Это одноцепочечный РНК-вирус с позитивной полярностью, относящийся к виду *Orthohepevirus A* рода *Orthohepevirus*, семейства *Hepeviridae*. По оценкам, ежегодно во всем мире происходит 35 миллионов случаев инфицирования ВГЕ, что приводит к более чем 70 000 смертей [1]. Средний уровень смертности составляет 0,2–4%, в то время как он может достигать 10–25% у беременных женщин, которые подвергаются более высокому риску заражения ВГЕ [2]. До недавнего прошлого в промышленно развитых странах ГЕ считался мало значимой нозологией, а в Беларуси эта точка зрения превалирует до настоящего времени. Система санитарно-

противоэпидемических мероприятий, направленных на предупреждение возникновения и распространения ГЕ в Беларуси, не учитывает его зоонозный характер и не в полной мере соответствует реально существующему эпидемиологическому процессу возбудителя. В последнее время представления о ГЕ существенно изменились. В настоящее время известно, что ГЕ эндемичен для многих стран с высоким уровнем развития здравоохранения, и представляет собой зоонозную инфекцию, основным резервуаром которой являются свиньи [3]. Аутохтонные случаи заражения ВГЕ зарегистрированы почти во всех странах Европы [4].

ВГЕ – это небольшой икосаэдрический вирус без оболочки диаметром 27–34 нм [5]. Он содержит одноцепочечный геном с положительной смысловой РНК размером 7,2 kb. Геном ВГЕ содержит 3 открытые рамки считывания (ОРС). ОРС1 кодирует неструктурные белки, в том числе вирусную полимеразу, ОРС2 – белки капсида, а ОРС3 – небольшой ассоциированный с цитоскелетом белок, участвующий в секреции вириона за счет своей потенциальной активности в работе ионного канала [6]. ОРС2 и ОРС3 частично перекрываются на 5'-конце.

Известно, что 8 генотипов ВГЕ (ВГЕ-1 – ВГЕ-8) инфицируют млекопитающих и классифицируются на основе различий в последовательности ОРС2 [7]. Все известные генотипы ВГЕ относятся к одному серотипу [8]. ВГЕ-1 и ВГЕ-2 являются патогеном только человека и причиной эпидемических вспышек в эндемичных районах Африки, Америки и Азии [9]. ВГЕ-3 и ВГЕ-4 инфицируют животных, но также могут передаваться человеку, вызывая зоонозные инфекции. Географически ВГЕ-3 вызывает спорадические случаи во всем мире, включая Республику Беларусь [10]. ВГЕ-4 преобладает в Юго-Восточной Азии. ВГЕ-5 и ВГЕ-6 заражают в основном диких кабанов. ВГЕ-7 и ВГЕ-8 – это недавно открытые генотипы, которые были выделены из организма одногорбых и двугорбых верблюдов соответственно.

Республика Беларусь не является эндемичной территорией по ВГЕ и характеризуется низким регистрируемым уровнем заболеваемости [11], эпидпроцесс проявляется в виде спорадических случаев, вызванных 3-м генотипом вируса, который передается человеку от животных при употреблении в пищу зараженных продуктов питания, а также при контакте с инфицированными животными [12]. Проведение ретроспективного эпидемиологического анализа ВГЕ на территории Республики Беларусь значительно затруднено ввиду отсутствия до недавнего времени системы регистрации заболеваемости ГЕ-инфекцией. Приблизительное представление о тенденциях развития эпидемического процесса ВГЕ в многолетней динамике может дать изучение заболеваемости острыми вирусными гепатитами в целом, и выделения из этой группы подгруппы острых вирусных гепатитов неустановленной этиологии. Заболеваемость вирусным гепатитом Е в Республике Беларусь регистрируется на низком уровне, который составлял в 2018-2019 гг. 0,04 и 0,02 случая на 100 тысяч населения соответственно. В тоже время, результаты изучения серопревалентности различных групп населения республики, свидетельствует о существенно более высокой инцидентность данного заболевания, что является проявлением так называемого парадокса

Балаяна, заключающегося в широком распространении анamnестических антител к ВГЕ при отсутствии регистрируемой заболеваемости. Разработка новых методов эпидемиологической диагностики на основе использования молекулярно-генетических технологий верификации РНК вируса, выделенной из организма человека и животных, а также из пищевых продуктов и объектов окружающей среды, является актуальным для системы эпидемиологического надзора за ГЕ в Беларуси и является **целью** настоящего исследования.

Материалы и методы исследования. В течение периода с 2017 по 2021 год были собраны образцы биологического материала от 97 пациентов, 79 свиней, 28 диких кабанов, 40 оленей, 359 кроликов. Полученные образцы использовали для обнаружения РНК ВГЕ при помощи ПЦР анализа. Для выявления РНК применяли адаптированный нами метод гнездовой ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) [13]. Набор QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Hilden, Германия) использовали для экстрагирования из агарозы продуктов амплификации, содержащихся в геле. Нуклеотидную последовательность фрагмента генома ВГЕ определяли в ходе прямого секвенирования ампликонов на автоматическом секвенаторе 3500 GeneticAnalyzer (ABI, Foster City, США) с использованием набора BigDye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit. Анализ нуклеотидных последовательностей ВГЕ их генотипирование выполняли с помощью программного обеспечения MEGA X [14]. В исследование были включены 36 нуклеотидных последовательностей – 9 последовательностей РНК ВГЕ были выделены из биологического материала человека и животных в Республике Беларусь, 23 референсные последовательности для 1–8 генотипов ВГЕ и субгенотипов ВГЕ-3 предложенных Smith D.B. и соавторами [18], 3 наиболее близкие последовательности к выделенным в Беларуси, установленные в результате BLAST-анализа. Последовательность птичьего ВГЕ была включена как внешняя группа для отрицательного контроля. Филогенетический анализ был проведен методом максимального правдоподобия и модели Хасегава-Кишино-Яно [15]. Филогенетическое дерево построено в масштабе, длина ветвей измеряется количеством замен на сайт.

Результаты и обсуждение. На основе филогенетического анализа построена модель эволюционных отношений для последовательностей, кодирующих фрагмент белка капсида вируса. Она позволила оценить степень генетического родства последовательностей ВГЕ, выделенных от человека и животных в Беларуси, с референсными последовательностями ВГЕ, установленными для генотипов и субгенотипов, и гомологичными последовательностями из базы данных GenBank. Все последовательности ВГЕ, выделенные в Беларуси, кластеризуются в пределах 3-го генотипа вируса. В большинстве случаев последовательности были генотипированы, для них были назначены субгенотипы. Изученные последовательности распределились по двум основным кладам. В пределах клады «Zabchij» кластеризуется 5 из 9 изученных последовательностей, а в кладе «Zefg» – 2 изученных изолята. Результаты филогенетического анализа были использованы для эпидемиологического расследования нескольких клинических случаев.

Анализ клинического случая пациента S., 66 лет, у которого развился острый ГЕ позволяет подтвердить возможность завоза вируса из-за границы гражданами страны, выезжающих за ее пределы в эндемичные ВГЕ регионы. Анализ частичной последовательности генома ВГЕ, выделенной из организма этого пациента, достоверно свидетельствует о заражении вирусом за границей. Последовательность, выделенная из его организма, относится к 3f генотипу и с вероятностью 99% группируется в одну ветвь с последовательностью, выделенной из колбасок фигателли во Франции в 2011г., что свидетельствует о общности их происхождения.

Нуклеотидная последовательность, выделенная из организма пациента P., с вероятностью 93% объединяется в одну филогенетическую группу с последовательностью, выделенную из организма домашней свиньи в РФ в 2010 г, что также свидетельствует о завозном характере данного случая.

Возможность завоза ВГЕ из стран Европы подтверждает молекулярно-эпидемиологическое исследование случая острого ГЕ пациента F., имеющего в анамнезе в рамках инкубационного периода случай выезда за пределы Республики Беларусь в страны западной Европы. Нуклеотидная последовательность, выделенная из его организма, относится к 3с генотипу ВГЕ и имеет сходство на 95% с последовательностью, выделенную из ливерной колбасы в Нидерландах в 2016г.

Проведенный молекулярно-эпидемиологический анализ трех случаев заболевания ГЕ (пациенты S., P. и F.) подтверждает возможность завоза ВГЕ из стран, являющихся эндемичными по ГЕ.

Главным фактором, характеризующим эпидемический процесс ГЕ на неэндемичных территориях, к которым относится Республика Беларусь, является зоонозная природа заболевания ГЕ. Резервуаром возбудителя инфекции являются свиньи. Сточные воды свиноферм, контаминированные ВГЕ могут попадать в поверхностные источники питьевого водоснабжения и способствовать распространению инфекции. Использование молекулярно-генетических технологий в расследовании случаев заболевания ГЕ имеет широкие перспективы для применения в практике.

Список литературы

1. Aggarwal RGS. The global prevalence of hepatitis E virus infection and susceptibility: a systematic review Geneva, Switz, World Health Organization 2010
2. Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology* 2012; 55:988-97; PMID:22121109; <http://dx.doi.org/10.1002/hep.25505>
3. Kamar, N., Dalton, H.R., Abravanel, F., and Izopet, J. Hepatitis E virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014;27: 116–138.
4. Lapa, D. Epidemiology of Hepatitis E Virus in European Countries / D. Lapa, M.R. Capobianchi, A.R. Garbuglia // *Int. J. Mol. Sci.* – 2015. – Т. 16, № 10. – С. 25711-25743.
5. 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, 23–31.

6. Ding, Q.; Heller, B.; Capuccino, J.M.; Song, B.; Nimgaonkar, I.; Hrebikova, G.; Contreras, J.E.; Ploss, A. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2017, 114, 1147–1152.
7. Purdy, M.A., Harrison, T.J., Jameel, S., Meng, X.J., Okamoto, H., Van der Poel, W.H.M. et al. ICTV virus taxonomy profile: hepeviridae. *J Gen Virol*. 2017; 98: 2645–2646.
8. Emerson SU, Clemente-Casares P, Moiduddin N, Arankalle VA, Torian U et al. Putative neutralization epitopes and broad cross-genotype neutralization of Hepatitis E virus confirmed by a quantitative cell-culture assay. *J Gen Virol* 2006; 87:697–704
9. Labrique AB, Thomas DL, Stoszek SK, Nelson KE. Hepatitis E: an emerging infectious disease. *Epidemiol Rev* 1999; 21:162–179
10. Давыдов В.В. Генетический полиморфизм вируса гепатита Е в Республике Беларусь / В.В. Давыдов, С.В. Жаворонок, Л.А. Анисько, Е.Л. Гасич, С.И. Марчук, П.А. Семижон, И.В. Потемкин, А.А. Карлсен, К.К. Кюрегян, М.И. Михайлов, Г.И. Алаторцева, П.А. Красочко, Д.С. Борисовец, Т.М. Прокопенкова // Клиническая инфектология и паразитология. 2020. Т. 9. № 3. С. 297-305. <https://doi.org/10.34883/PI.2020.9.3.029>
11. Особенности распространения вирусного гепатита Е в не эндемичном регионе / С. В. Жаворонок, В. В. Давыдов, А. А. Арабей, Е. Н. Яговдик-Тележная, Т. В. Зновец, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов, Г. И. Алаторцева, Л. А. Анисько, Т. А. Рогачева, О. О. Руммо, М. Л. Доценко, С. И. Марчук, Е. Л. Гасич, Ю. В. Кашкур, Ю. И. Шумский, П. А. Красочко, Д. С. Борисовец // Здравоохранение Кыргызстана. – 2018. – №2. – С.110-115.
12. D. Lara, M. R. Capobianchi, A. R. Garbuglia. Epidemiology of Hepatitis E Virus in European Countries. *Int J Mol Sci*. 2015 Oct; 16(10): 25711–25743.
13. А. А. Арабей, С. И. Марчук, С. В. Жаворонок, В.В. Давыдов, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов Адаптированный метод полимеразной цепной реакции для выявления вируса гепатита Е у человека и животных / // Военная медицина. – 2018. – №3. – С.86-92.
14. Kumar S., Stecher G., Li M., Knyaz C., and Tamura K. (2018). MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms. *Molecular Biology and Evolution* 35:1547-1549.
15. Hasegawa M., Kishino H., and Yano T. (1985). Dating the human-ape split by a molecular clock of mitochondrial DNA. *Journal of Molecular Evolution* 22:160-174.