

УДК: 616.36-002-036.34

Изучение рисков завоза гепатита Е в Республику Беларусь

Давыдов В. В.¹, Жаворонок С. В.¹, Анисько Л. А.¹, Гасич Е. Л.², Марчук С. И.¹,
Семижон П. А.², Карлсен А. А.^{3,4}, Кюрегян К. К.^{3,4}, Михайлов М. И.^{3,4},
Алаторцева Г. И.³

¹Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет»,
г. Минск, Республика Беларусь;

²Государственное учреждение «Республиканский научно-практический центр
эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, Республика Беларусь;

³Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-
исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова»,
г. Москва, Российская Федерация;

⁴Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение «Российская
медицинская академия непрерывного профессионального образования»,
г. Москва, Российская Федерация

Реферат. Республика Беларусь (Беларусь) не является эндемичной по гепатиту Е (ГЕ), однако зоонозный характер ГЕ и данные о наличии анamnестических антител против вируса гепатита Е (ВГЕ) у населения страны свидетельствуют о циркуляции возбудителя в популяциях людей и животных. Большинство случаев ГЕ, выявленных на территории Беларуси вызвано генотипом-3 (ВГЕ) и является автохтонными. Данное исследование посвящено изучению возможности завоза ВГЕ на территорию Беларуси в результате миграционных процессов. Образцы биологического материала, полученные от граждан Республики Беларусь и иностранных граждан, временно пребывающих на территории страны, изучены при помощи ИФА-анализа на предмет наличия антител к ВГЕ (анти-ВГЕ IgG) и для обнаружения РНК ВГЕ при помощи ПЦР-анализа. Выделенные нуклеотидные последовательности ($n = 9$) подвергли процедуре секвенирования и филогенетическому анализу. Построена модель эволюционных отношений для последовательностей, кодирующих фрагмент белка капсида вируса. Доказана возможность завоза ВГЕ в Беларусь с территории Средней Азии, Ближнего востока, Индии, Западной Европы и Российской Федерации, а также существование аутохтонных случаев заболевания ВГЕ, имеющих зоонозную природу. Выявлены группы риска, обуславливающие наиболее вероятный завоз ВГЕ на территорию Беларуси.

Ключевые слова: гепатит Е, вирус гепатита Е, завозной вирусный гепатит Е, эпидемический процесс, эпизоотический процесс.

Введение. Развитие миграционных процессов, вызванных в том числе приездом граждан иностранных государств на учебу в Республику Беларусь, а также расположение страны в центре Европы обуславливает высокую актуальность изучения эпидемиологии гепатита Е (ГЕ) на территории, не являющейся эндемичной по данному заболеванию.

Заболываемость ГЕ в Беларуси не имеет эпидемического распространения, что является характерным для стран с развитой системой здравоохранения. Система эпидемического надзора за вирусными гепатитами, существовавшая в стране до 2016 г., не предполагала регистрацию случаев заболевания ГЕ у людей. В Минской городской клинической инфекционной больнице в период с 2017 по 2020 гг. было зарегистрировано более 15 случаев острой ВГЕ-инфекции у человека.

Вирус гепатита Е является основной причиной острого гепатита во всем мире [1]. Ежегодно ВГЕ заражается 20 млн человек, у 3,3 млн развивается клинически выраженная картина, из них более 56 000 случаев болезни заканчиваются смертью [2].

Вирус гепатита Е относится к *Orthohepevirus* А рода *Orthohepevirus* семейства *Hepeviridae*. Так, ВГЕ включает 8 генотипов (ВГЕ 1 — 8) [3], которые можно различить только на основе филогенетического анализа генома вируса. Например, ВГЕ1 и ВГЕ2 специфичны только для людей, ВГЕ3 и ВГЕ4

инфицируют широкий спектр хозяев, включая домашних и диких свиней, оленей, приматов и кроликов.

Организация генома ВГЕ достаточно проста: РНК вируса состоит из 7,2 kb и содержит только 3 открытых рамки считывания (ОРС), причем ОРС2 и ОРС3 частично перекрываются друг с другом. ОРС1 обеспечивает синтез неструктурного полипротеина, необходимого для репликации вируса, ОРС2 образует субгеномную бицистронную РНК размером 2 kb и кодирует белок капсида. Так, ОРС3 является наименьшей из трех и перекрывается с ОРС2 примерно на 300 нуклеотидов в альтернативной рамке считывания [4]. Область перекрытия ОРС2 и ОРС3 является наиболее консервативной последовательностью, практически лишенной полиморфизма.

Эпидемический процесс ВГЕ на разных территориях представлен двумя разными вариантами. На гиперэндемичных территориях с жарким климатом характерен эпидемический характер заболеваемости, вызванной ВГЕ1 и ВГЕ2. Источником инфекции в гиперэндемичных регионах является человек, а передача вируса от человека к человеку происходит через зараженную воду.

На эндемичных и не эндемичных по ВГЕ территориях, имеющих умеренный климат, эпидпроцесс проявляется в виде спорадической заболеваемости, вызванной ВГЕ3, которые передается человеку от животных при употреблении в пищу зараженных продуктов питания, а также при контакте с инфицированными животными [5].

Цель работы — установление возможности завоза гепатита Е на территорию Республики Беларусь в результате развития миграционных процессов.

Материалы и методы. Для оценки вероятности завоза ВГЕ и его циркуляции на территории Беларуси обследовано 1457 иностранных граждан, временно пребывающих на территории страны, и 415 практически здоровых жителей Беларуси на наличие антител ВГЕ IgG и IgM.

Анти-ВГЕ классов IgM и IgG определяли методом иммуноферментного анализа (ИФА) в образцах сыворотки крови. Для качественного определения анти-ВГЕ использовали коммерческие ИФА-диагностикумы производства «Диагностические системы» и «Вектор Бест» РФ.

Полученные образцы использовали для обнаружения РНК ВГЕ при помощи ПЦР анализа. Набор для выделения нуклеиновых кислот (Jena Bioscience, Германия) использовали в соответствии с протоколом производителя для выделения тотальной РНК. Для выявления РНК ВГЕ применяли адаптированный нами метод гнездовой ПЦР с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с вырожденными праймерами, ориентированными на участок ОРС2 генома ВГЕ с 5905нт по 6635 нт). Условия проведения ОТ-ПЦР соответствовали описанным ранее [6]. Подтверждение положительных результатов проводили коммерческим набором HEV RT-PCR Kit 2.0 (RealStar®, Altona, Германия).

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 [7]. В анализ были включены 37 нуклеотидных последовательностей, являющихся фрагментами ОРС2 ВГЕ величиной 273 нуклеотида (нуклеотидные позиции 6193–6466 относительно штамма Burma, номер в GenBank M73218). Были выделены 9 последовательностей из биологического материала человека и животных в Республике Беларусь, 23 референсные последовательности для 1–7-го генотипов ВГЕ и субгенотипов ВГЕ3, предложенных D. B. Smith и соавт., 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. Построено филогенетическое дерево с наибольшим логарифмическим правдоподобием (–94549,25). Процент деревьев, в которых связанные таксоны сгруппированы вместе, показан рядом с ветвями. Дерево построено в масштабе, длина ветвей измеряется количеством замен на сайт. Этот анализ включал 36 нуклеотидных последовательностей.

Результаты и их обсуждение. При обследовании сывороток 1457 иностранных граждан в возрасте $23,3 \pm 3,9$ лет, временно пребывающих на территории Беларуси, у 76 лиц, что составляет 5,22 % (95 % ДИ 4,11–6,53) были обнаружены анти-ВГЕ IgG. У 15 из них, что составляет 1,03 % (95 % ДИ 0,58–1,7) были выявлены также анти-ВГЕ IgM и симптомы острого вирусного гепатита, протекающего в стертой безжелтушной форме (гепатомегалия, повышение уровня АлАТ в сыворотке крови). Серопозитивность когорты иностранных граждан не имеет достоверных отличий от данных, получен-

ных при обследовании 415 здоровых граждан Республики Беларусь, имеющих средний возраст $41,5 \pm 13,89$ года (рисунок 1).

При изучении возрастной иммунологической структуры серопозитивного анти-ВГЕ населения Беларуси было установлено преобладание количества серопозитивных лиц в группе старше 25 лет. При обследовании людей, не достигших 25 лет, анти-ВГЕ IgG были выявлены только у 5 из 134. В возрастной группе старше 25 лет анти-ВГЕ IgG были выявлены у 23 человек из 281 обследованных.

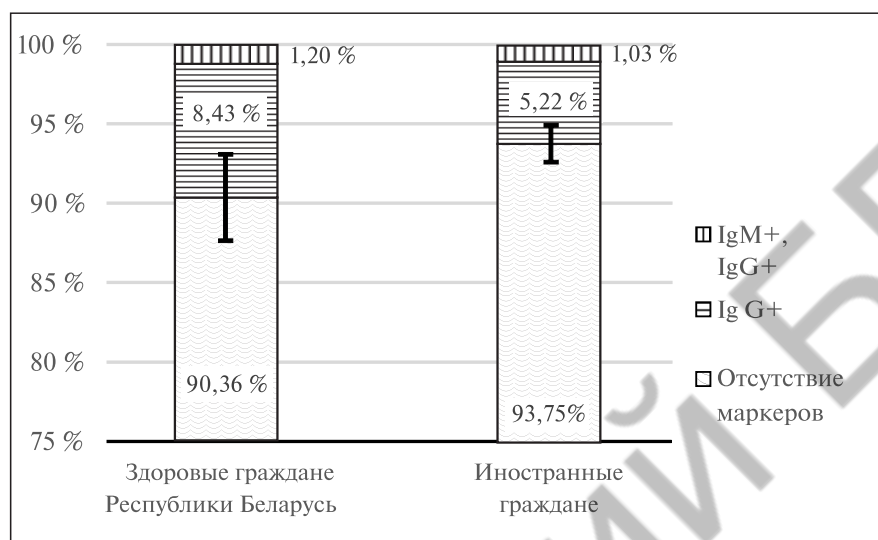


Рисунок 1 — Частота выявления анти-ВГЕ среди практически здоровых граждан Республики Беларусь и иностранных граждан, временно проживающих в стране

Для возрастной анти-ВГЕ IgG иммунологической структуры группы иностранных граждан, временно проживающих в Беларуси установлены менее выраженные различия частоты серопозитивности возрастных групп. У лиц, не достигших возраста 25 лет, анти-ВГЕ IgG были выявлены в 66 случаях их 1302 обследованных, а в группе старше 25 лет анти-ВГЕ IgG обнаружены у 10 иностранцев из 155, что, возможно, является результатом различий эпидемического процесса ГЕ в данных когортах преобладанием более молодых людей в группе иностранных граждан (рисунок 2).

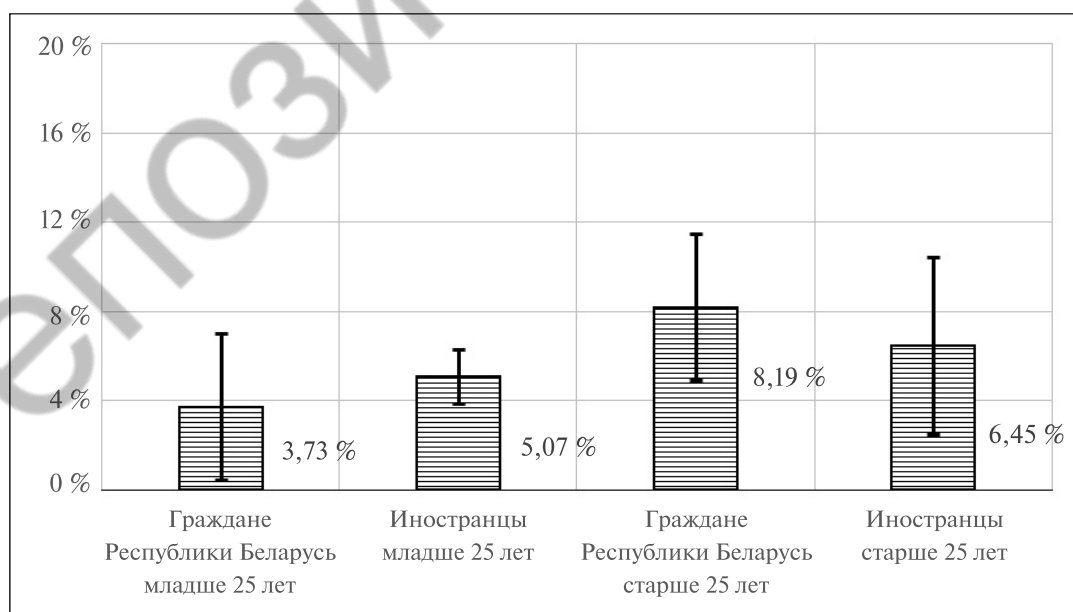


Рисунок 2 — Возрастная иммунологическая структура анти-ВГЕ IgG здорового населения Беларуси и иностранных граждан, временно проживающих в стране

В результате проведенных исследований выявлен случай заболевания иностранного гражданина острым ГЕ в безжелтушной форме, который проживал в общежитии для иностранных студентов и не выезжал за пределы страны в течение последних двух лет. Анализ данного случая позволяет предположить возможность завоза ВГЕ из стран с высоким уровнем распространения ГЕ и 1-го и 2-го генотипов ВГЕ не характерных для региона Беларуси.

В результате анализа контингента серопозитивных лиц из числа иностранных граждан установлено, что наибольшая частота выявления анти-ВГЕ IgG была отмечена у жителей Индии и Туркменистана (рисунок 3). Иностранные граждане из этих стран, наиболее вероятно представляют группу риска, обуславливающую завоз ВГЕ из эндемичных по ГЕ территорий.

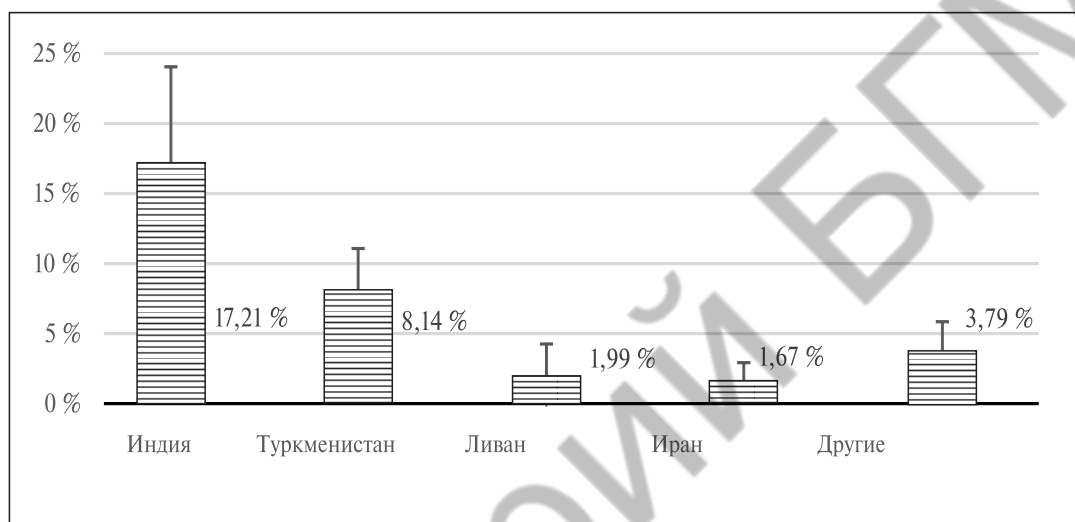


Рисунок 3 — Характеристика контингента сероположительных анти-ВГЕ IgG иностранных граждан, временно проживающих в Беларуси

На основе филогенетического анализа последовательностей, кодирующих фрагмент белка капсида вируса, построено филогенетическое дерево, которое позволило 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 (см. рисунок 4).

Последовательность генома вируса, имеющая на дендрограмме код «Patient_Su_BY_2017|g3f», выделенная из организма пациента в 2017 г., который за месяц до начала заболевания выезжал во Францию, а также постоянно употребляет в пищу сырокопченую колбасу домашнего производства, с вероятностью 97 % образует единую филогенетическую ветвь с последовательностью, выделенную из традиционной корсиканской сыровяленой свиной колбасы «Фигателли» («KJ558497_S.s_Figatellu_FR_2011|g3f»).

Заключение. Таким образом, результаты проведенных исследований свидетельствуют о существовании значительных рисков завоза ВГЕ на территорию Республики Беларусь. Установлена возможность завоза ВГЕ 1-го и 2-го генотипов в страну из гиперэндемичных по ГЕ территорий Средней Азии, Ближнего востока, Индии. Достоверно доказаны случаи завоза ВГЕ 3-го генотипа из стран Западной Европы и Российской Федерации.

В целях разработки системы эпидемического надзора и контроля за ГЕ целесообразно внедрение тестов на маркеры ВГЕ при проведении медицинских осмотров, обследовании иностранных граждан, прибывших в Беларусь из государств, являющихся гиперэндемичными по ГЕ, а также широкое внедрение в клиническую практику диагностических систем на основе ИФА и ПЦР для диагностики ГЕ у пациентов с подозрением на вирусный гепатит. Необходимо дальнейшее изучение эпидемического процесса в Беларуси, с целью выявления РНК ВГЕ и его генотипирования.

Исследования проведены в рамках «Межгосударственной программы инновационного сотрудничества государств — участников СНГ на период до 2020 года» при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ (Соглашение № 14.613.21.0057 от 28.07.2016, уникальный идентификатор проекта RFMEFI61316X0057) и ГКНТ РБ.

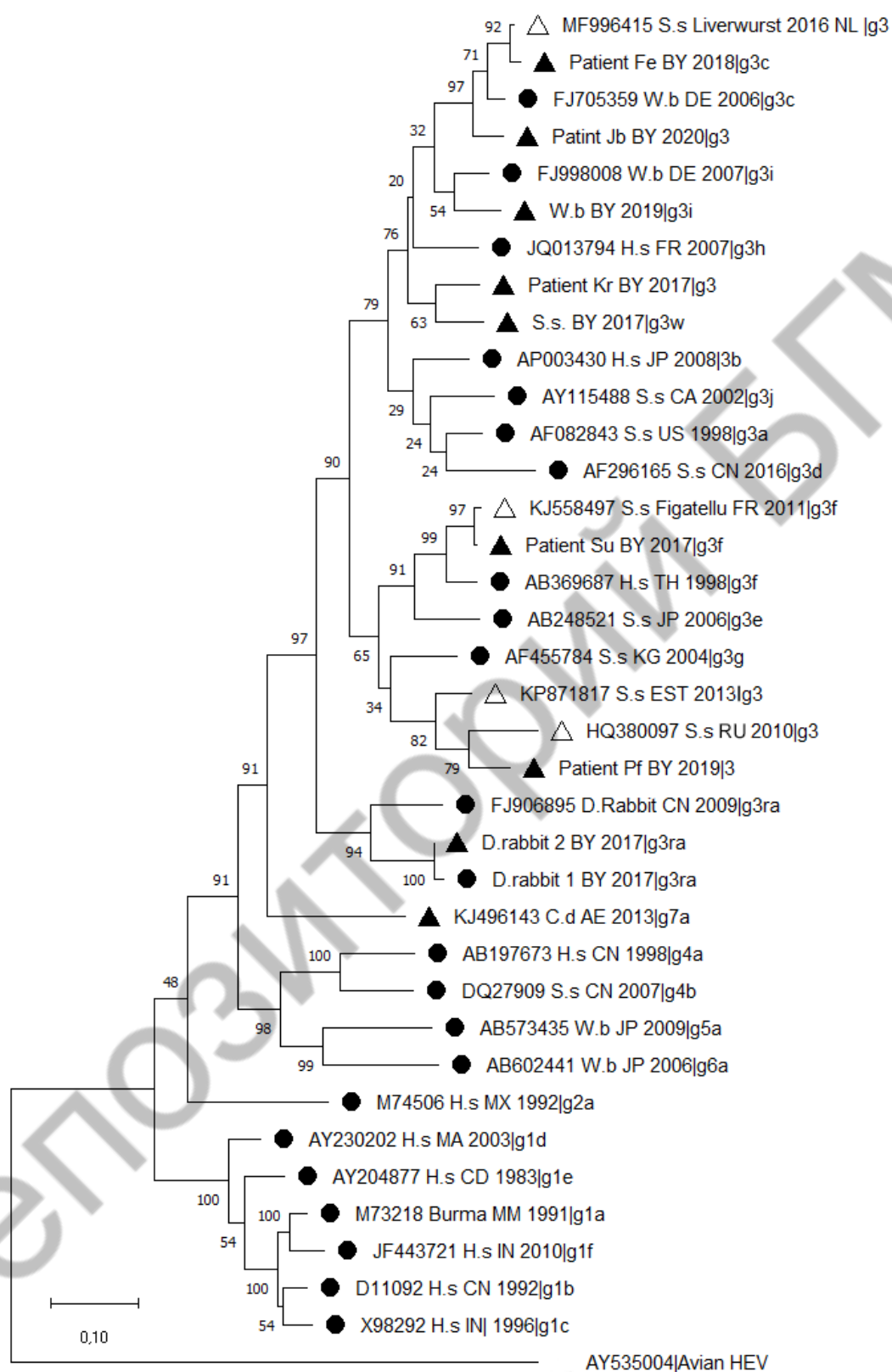


Рисунок 4 — Филогенетическое дерево для частичной последовательности OPC2

Литература

1. Zoonotic Hepatitis, E. Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes / V. Doceul [et al.] // *Viruses*. — 2016. — Oct. 3, № 8(10). — P. 270. DOI: 10.3390/v8100270.
2. Гепатит E. Информационный бюллетень. Июль, 2016 г. [Электронный ресурс]. — Режим доступа: www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/ru. — Дата доступа: 24.10.2020.
3. W.H.M. ICTV virus taxonomy profile: hepeviridae / M. A. Purdy [et al.] // *J. Gen. Virol.* — 2017. — № 98. — P. 2645–2646.
4. A bicistronic subgenomic mRNA encodes both the ORF2 and ORF3 proteins of hepatitis E virus / J. Graff [et al.] // *J. Virol.* — 2006. — № 80. — P. 5919–5926.
5. Lapa, D. Epidemiology of Hepatitis E Virus in European Countries / D. Lapa, M. R. Capobianchi, A. R. Garbuglia // *Int J. Mol. Sci.* — 2015. — Oct., № 16(10). — P. 25711–25743.
6. Адаптированный метод полимеразной цепной реакции для выявления вируса гепатита E у человека и животных / А. А. Арабей [и др.] // *Военная медицина*. — 2018. — № 3. — С. 86–92.
7. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms / S. Kumar [et al.] // *Molecular Biology and Evolution*. — 2018. — № 35. — P. 1547–1549.

Study of the risks of importing hepatitis E tu the Republic of Belarus

*Davydov V. V.¹, Zhavoronok S. V.¹, Anisko L. A.¹, Gasich E. L.², Marchuk S. I.¹,
Semizhon P. A.², Carlsen A. A.^{3,4}, Kuregyan K. K.^{3,4}, Mikhailov M. I.^{3,4}, Alatorseva G. I.³*

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Republic of Belarus;

*²State Institution «Republican Research and Practice Center for Epidemiology and Microbiology»,
Minsk, Republic of Belarus;*

*³Federal State Budgetary Scientific Institution «Research Institute of Vaccines and Serums named
after I. I. Mechnikov», Moscow, Russian Federation;*

*⁴Federal State Budgetary Educational Institution «Russian Medical Academy of Continuing
Professional Education», Moscow, Russian Federation*

The Republic of Belarus (RB) is not endemic for hepatitis E (HE), however, the zoonotic nature of the HE and evidence on the presence of anamnestic antibodies against hepatitis E virus (HEV) in the population of the RB indicate the circulation of the pathogen in human and animal populations. Most of the cases of HE detected in the territory of the RB are caused by genotype 3 HEV and are autochthonous. This study is devoted to studying the possibility of importing HEV into the territory of the RB as a result of migration processes. Samples of biological material obtained from citizens of the RB and foreign citizens temporarily staying in the territory of the republic were studied using ELISA analysis for the presence of antibodies to HEV (anti-HEV IgG) and for detecting HEV RNA using PCR analysis. The isolated nucleotide sequences ($n=9$) were subjected to sequencing and phylogenetic analysis. A model of evolutionary relations for the sequences encoding a fragment of the virus capsid protein was constructed. The possibility of importing HEV into the RB from the territory of Central Asia, the Middle East, India, Western Europe and the Russian Federation, as well as the existence of autochthonous cases of HEV of a zoonotic nature, has been proved. Risk groups were identified that determine the most likely import of HEV into the territory of the RB.

Keywords: hepatitis E, hepatitis E virus, importation viral hepatitis E, epidemic process, epizootic process.

Поступила 26.10.2020