

ЭПИЗОТИЧЕСКОЕ И ЭПИДЕМИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ГЕПАТИТА Е В ПАТОЛОГИИ ЖИВОТНЫХ И ЧЕЛОВЕКА

Красочко П.А., д.в.н., д.б.н., профессор УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Жаворонок С.В., д.м.н., профессор УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Алаторцева Г.И., к.м.н., с.н.с. ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова», г. Москва, Российская Федерация

Борисовец Д.С., к.в.н., доцент РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вашелесского, г. Минск, Республика Беларусь

Красочко П.П., д.б.н., доцент УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Прокопенкова Т.М., ветврач РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н.Вашелесского, г. Минск, Республика Беларусь

Давыдов В.В., к.б.н., доцент УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Арабей А.А., н.с. УО «Белорусский государственный медицинский университет», г. Минск, Республика Беларусь

Кашко Л.С., к.в.н., доцент ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА, г. Смоленск, Россия

Аннотация. Цель настоящего исследования - проведение исследований по установлению эпидемической и эпизоотической значимости вируса гепатита Е среди людей и животных в Республике Беларусь. Установлено, серопревалентность анти-ВГЕ существенно зависит от географического района, изучаемой группы людей, а также от метода, используемого для выявления антител. Значительная распространенность ВГЕ в РБ объясняется зоонозным характером эпидемического процесса, вызванного 3-м генотипом ВГЕ, циркулирующим на территории республики. Многочисленные популяции диких и домашних свиней, обитающих в Беларуси, являющихся главным резервуаром ВГЕ.

Ключевые слова: вирус гепатита Е, человек, маркеры, свиньи, кролики, антитела.

Введение. В последние годы ученые-инфекционисты начали и звучать роль гепатита Е в патологии человека и животных.

Вирус гепатита Е (ВГЕ) является одной из причиной возникновения острого гепатита – воспалительного заболевания печени у людей. Возбудитель относится к сем. *Неревирidae* роду *Неревирус*, имеет широкое распространение, но гиперэндемичные территории расположены в странах Южной, Центральной, Юго-Восточной Азии, Африки, Латинской Америки с высокой плотностью населения, жарким климатом, дефицитом пресной воды и плохим водоснабжением [1, 2].

В настоящее время идентифицировано 8 генотипов ВГЕ. К данному семейству вирусов относятся 1 и 2 генотипы ВГЕ, которые встречаются у людей, а также 3 и 4 генотипы, способные инфицировать как людей, так и некоторых видов животных [3]. В европейском регионе, среди людей и животных преобладает 3 генотип вируса. Согласно классификации [4] 3 генотип ВГЕ включает в себя 10 различных подтипов вируса (3а – 3j), выявленных методом филогенетического анализа. Так, HEV-1 распространён в Юго-Восточной, Центральной и Южной Азии, Африке; HEV-2 - в Мексике, Африке; HEV-3 - в Европе, Австралии, Новой Зеландии, Северной Америке, Аргентине; HEV-4 - на юге Китая и в ряде стран [1].

Источниками ВГЕ у людей служат больные желтушной и безжелтушной формами заболевания. Наибольшую опасность больные гепатитом Е представляют в первые дни болезни, до появления желтухи. После проявления этого визуального симптома (даже в самые первые дни желтушного периода) ВГЕ в фекалиях больных методом иммунной ЭМ удаётся обнаружить лишь в 2–10 % случаев. Заражение происходит фекально-оральным путём при высоких заражающих дозах, преимущественно через контаминированную фекалиями воду [2, 4]. Контактная передача ВГЕ осуществляется редко, с чем связана низкая очаговость в семьях больных. Взрывообразно возникающие эпидемии могут охватывать десятки тысяч людей. В Среднеазиатском регионе бывшего СССР эпидемический сезон совпадает со временем сбора хлопка, когда сборщики особенно остро испытывают дефицит пресной воды. Описаны вспышки гепатита Е на круизных судах [1]. Вспышки гепатита Е в среднеазиатских республиках бывшего СССР имели ряд общих отличительных эпидемиологических черт [1]. Важнейшими из них являлись:

- 1) взрывообразный характер заболеваемости;
- 2) своеобразная возрастная структура заболевших с преимущественным поражением лиц 15 - 29 лет, подавляющее большинство (95–98 %) из которых имели в крови «анамнестические» Ig G против ВГЕ;
- 3) незначительная очаговость в семьях;
- 4) подъём заболеваемости начиная с летних месяцев (т.е. с периода наибольшего водопотребления);
- 5) резко выраженная неравномерность территориального уровня заболеваемости, отчетливая зависимость между состоянием коммунального благоустройства (прежде всего санитарным состоянием источников питьевого водоснабжения) и показателями заболеваемости;
- 6) высокие (до 13 - 19% и даже 22%) показатели летальности среди заболевших беременных женщин [1, 5].

Все вспышки гепатита Е у людей явились результатом реализации водного пути передачи вируса и возникли как следствие употребления населением контаминированной вирусом питьевой воды.

Но исследования последних лет показали, что естественный резервуар ВГЕ все же находится и в природе [1, 3, 4].

У млекопитающих известно 4 генотипа ВГЕ. Штаммы вируса,

идентифицированные у свиней, относятся к генотипам 3 и 4. ВГЕ широко циркулирует в свиноводческих хозяйствах во всех странах. В США 80 - 100 % свиней инфицировано этим вирусом, однако клинические признаки болезни отсутствуют. Инфицирование поросят происходит фекально-оральным путём в 2 - 4-месячном возрасте, и вирус выделяется во внешнюю среду с фекалиями в течение 3–7 недель. Вирус размножается в клетках кишечника, лимфатических узлов и печени.

ВГЕ циркулирует в популяциях свиней, которые служат, по-видимому, постоянным источником заражения людей. Свиньи являются резервуаром генотипов 3 и 4 возбудителя. В экспериментальных условиях штаммы ВГЕ человека (генотипы 3 и 4) инфицируют свиней и, наоборот, штаммы от свиней (генотипы 3 и 4) инфицируют обезьян. В США у людей, проживающих в регионах с развитым свиноводством, антитела к вирусу встречаются в 6 раз чаще, чем у людей в иных регионах. Аналогичная закономерность отмечена в других странах. В печени свиней РНК ВГЕ обнаруживают в 1% случаев в Индии и в 11% в США. Описаны случаи заражения людей ВГЕ генотипа 4 при поедании сырого или недостаточно прожаренного мяса свиней [5 - 12].

Антитела против антигенов ВГЕ также обнаружены у многих позвоночных: сельскохозяйственных животных, птиц, грызунов, оленей [1]. От птиц выделен ВГЕ (АНЕВ – avian hepatitis E virus). В Венгрии описан новый генотип вируса, вызывающий у кур синдром увеличения печени и селезёнки (BLSD – big liver and spleen disease) [11]. Показана возможность экспериментального заражения приматов вариантами ВГЕ человеческого и свиного происхождения. Выделенные во Франции от домашних и диких кроликов штаммы ВГЕ генотипов [1, 3] были практически идентичны человеческим вариантам этого вируса. В Германии, США (Алеутские о-ва, Калифорния, Флорида, Теннесси, Техас) от диких крыс *Rattusrattus* и *R. norvegicus* многократно изолированы штаммы возбудителя этого заболевания (RatHEV – rat hepatitis E virus).

Существует предположение, что передача ВГЕ от свиней к людям возможна во время забоя, а при прямом контакте со свиньями возрастает риск инфицирования работников [1, 4]. После того, как была установлена зоонозная возможность передачи заболевания, стало очевидно, что чем выше уровень распространенности ВГЕ у животных, тем больше риск передачи инфекции человеку. С этой точки зрения, данные по распространенности, описанные выше, представляют собой серьезные причины для беспокойства по поводу здоровья населения.

Проведенные к настоящему времени научные исследования показали наличие антител к ВГЕ и вирусной РНК у таких животных, как домашние свиньи, дикие кабаны, олени, косули и кролики, обитающих на территории европейских и азиатских стран [4]. Республика Беларусь не является исключением, что подтвердили исследования по выявлению серологических и молекулярно-биологических маркеров ВГЕ у домашних свиней, диких кабанов и кроликов. Распространенность ВГЕ среди кроликов практически такая же, как

и среди домашних свиней. На этой почве возникает предположение, что кролики могут представлять собой такую же опасность для человека, как и свиньи [4]. На сегодняшний день до конца не установлен уровень распространенности ВГЕ у кроликов в Беларуси, что представляет интерес в данной области исследований. Кроме того, патогенез гепатита Е у кроликов изучен недостаточно хорошо.

Целью настоящей работы явилось проведение исследований по установлению эпидемической и эпизоотической значимости вируса гепатита Е среди людей и животных в Республике Беларусь.

Материалы и методы исследований.

Исследования проводились в условиях УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», УО «Белорусский государственный медицинский университет», ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И.Мечникова», РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского».

Исследования проводились в рамках Федеральной субсидии, выданной решением Минобрнауки Российской Федерации ФГБНУ «НИИВС им. И.И.Мечникова (соглашение о субсидии № 14.613.21.0057 от 28.07.2016 г) и субсидии ° № 075-15-2019-1481 от 15.08.2019, номер контракта 05.613.21.0091, идентификатор соглашения RFMEFI61319X0091).

Для оценки циркуляции вируса в популяции людей и животных использовали тест определения противовирусных антител в сыворотках крови с помощью ИФА. В качестве объекта исследования были использованы сыворотки крови 278 здоровых жителей РБ, 82 доноров крови, 1207 иностранных граждан, временно пребывающих на территории Республики Беларусь (РБ), 15 охотников, 306 пациентов с иммунодефицитом (ВИЧ инфекцией), 258 пациентов с хронической вирусной патологией печени, 1047 домашних свиней, 100 диких кабанов, 28 оленей и 88 кроликов из различных регионов Беларуси. В сыворотке

1.3 Определение анти-ВГЕ иммуноглобулинов класса G в образцах сывороток крови кроликов проводили с помощью адаптированной методики на основе использования компонентов коммерческого набора «ДС-ИФА-Анти-HEV-G» (НПО Диагностические системы, РФ) в сочетании с пероксидазным конъюгатом белка А (Имтек, РФ). Также для оценки циркуляции ВГЕ среди домашних и диких животных использована разработанная тест-система для выявления Ig G антител к ВГЕ в образцах сывороток крови свиней и кроликов использован непрямой вариант постановки иммуноферментного анализа. В качестве антигена использованы рекомбинантные антигены ORF2 и ORF3, синтезированные и представленные нам сотрудниками НИИ вакцин и сывороток им. Мечникова (Г.И. Алаторцева), которые сорбированы на полистироловые планшеты после предварительной обработки их ультрафиолетовым излучением для повышения адгезивности. Оптимальная концентрация для сорбции на полистироловые планшеты составила для антигенов ORF2 и ORF3 – 8 мкг/мл в 0,05 М карбонатном буфере, pH 9,5. Для

получения детектирующего реагента использовано оптимальное разведение универсального конъюгата – белка А стафилококка с пероксидазой хрена для проявления тестируемых сывороток людей и животных (свиней, кроликов). Подтверждена специфичность используемых рекомбинантных белков в ИФА путем определения с их помощью антител к ВГЕ у кроликов, инфицированных ВГЕ 3-го генотипа. Для выявления антител животных использован также соответствующий антивидовой конъюгат. Поэтому в работе мы использовали вторичные кроличьи антитела против иммуноглобулинов класса G свиньи, меченные пероксидазой хрена (Thermo Scientific, США) – конъюгатTS – и соответствующий им субстрат 3,3',5,5'-Тетраметилбензидин (Thermo Scientific, США) в концентрации 0,1 мкг/мл.

Для оценки наличия маркеров (генома вируса) использовали полимеразную цепную реакцию. Для выделения нуклеиновых кислот из образцов фекалий готовили 10-20% осветленный фекальный экстракт. Для этого образцы проб фекалий объемом до 1,0 мл (по 0,4–1,0 г) отбирали стерильным шпателем и помещали в стерильный флакон. К образцу фекалий добавляли 4,0 мл физиологического раствора до образования 10–20% суспензии. Взвесь фекалий интенсивно встряхивали на вортексе до образования суспензии. Полученную суспензию осветляли путем центрифугирования в течение 30 минут при 3 тыс. об/мин., а затем супернатанты переносили в стерильные пробирки и центрифугировали в течение 20 минут при 10 тыс. об/мин., чтобы очистить их от мусора и бактерий клеток. Надосадочную жидкость отбирали в одноразовую пробирку.

Нуклеиновые кислоты выделяли из 50 мкл надосадочной жидкости (осветленных фекальных экстрактов) с помощью набора для выделения нуклеиновых кислот (НПО «Литех») по протоколу производителя. Выявление РНК ВГЕ проводили во вложенной полимеразной реакцией с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦ) с вырожденными праймерами к участку открытой рамки считывания 2 (ОРС 2) ВГЕ. Полученные продукты ПЦР, соответствующие ВГЕ, определяли в 1,5% агарозном геле в трисборатном буфере (ТВЕ). Статистическая обработка данных проводилась с помощью программного пакета STATISTICA 10.

Таблица 1 – Результаты исследования поголовья свиней трёх областей Беларуси на наличие антител к вирусу гепатита E

Область	Количество обследованных свиней, гол.	Количество положительных, гол./%	Количество хозяйств	Благополучные хозяйства, гол./%
Минская	245	60 (24,5 %)	23	9 (39,1 %)
Могилёвская	264	69 (26,14 %)	21	8 (38 %)
Витебская	478	135 (28,4 %)	43	18 (41,9 %)
Всего	987	264 (26,7 %)	87	34 (39 %)

Результаты исследований.

В таблице 1 приведены результаты исследования поголовья свиней трёх областей Беларуси на наличие анти-ВГЕ

При анализе 987 образцов сывороток крови, полученных от домашних свиней и 11 от диких кабанов из различных областей Беларуси, положительные результаты выявлены у 264 свиней, что составило 26,7%. Из общего числа обследованных свиноводческих хозяйств анти-ВГЕ обнаружены в 61% (53 из 87). Частота встречаемости анти-ВГЕ у свиней варьировала от 0 до 100% в зависимости от хозяйства. При этом 100% выявления анти-ВГЕ у свиней встречалась на 6 фермах (11,3%), а 0% - на 34 (39%). При исследовании образцов крови диких кабанов из охотничьих угодий Беларуси (n=11) специфические антитела к ВГЕ не были выявлены.

Полученные данные свидетельствуют о том, что в поголовье свиней, находящихся на территории Республики Беларусь, имеет место интенсивный эпизоотический процесс ВГЕ.

Таблица 2 – Маркеры ВГЕ у животных в РБ

Животные	Количество ИФА-иссл.	Выявлено анти-ВГЕ	Количество ПЦР-исслед.	Выявлено РНК ВГЕ
Свины	1101	357 (32,4%)	7 7	20 (26%)
Кабаны	102	37 (36,3%)	38	2 (5,3%)
Олени	28	100%	40	3 (7,5%)
Кролики	124	25 (20%)	359	76 (21%)
Зайцы	-	-	21	1 (5%)

Для оценки циркуляции вируса гепатита у человека установлено следующее. При исследовании группы иностранных граждан в возрасте от 18 до 26 лет, проживающих на территории РБ из 673 обследованных граждан у 41 выявлены анти-IgG и М к ВГЕ, что составило 6,1% от общего количества, причём большинство оказались жителями Туркменистана Среди носителей иммуноглобулинов к ВГЕ выявлены в том числе жители Ливана, Швеции, Сирии, Намибии, Китая, Грузии, Ирана, Бразилии), Палестины, Индии, Шри-Ланки и Пакистана. Это подтвердило факт циркуляции ВГЕ среди иностранных граждан, проживающих в Беларуси, что не исключает возможность завоза гепатита Е из эндемичных регионов в стран. При исследовании сывороток крови пациентов с диагнозом ВИЧ-инфекция (n=29) у 5 были выявлены анти-ВГЕ, что составило 17,24%. При этом, у 1 пациента были обнаружены лишь IgM, у 2 – IgG и у 2 присутствовали оба класса иммуноглобулинов. При анализе результатов наблюдения группы пациентов, находившихся на стационарном лечении по поводу туберкулеза, выявлено, что среди 9 из 40 пациентов с наличием anti-HEV-IgG . У 2 из них так же выявлены и anti-HEV-IgM. Среди пациентов с наличием антител к ВГЕ преобладали мужчины – 66,7%, женщины - 33,3%. Средний возраст пациентов составил 45,2 года. Острый вирусный гепатит Е выявлен у 5,2% беременных пациенток с внутриспеченочным

холестазаом. Установлено, что риск антенатальной гибели плода выше при вирусном гепатите E (RR=32,25, 95% CI: 12,29-84,62, F=0,04, p=0,001).

Проведенное исследование указывает на важность и целесообразность обследования беременных с клиническими симптомами и лабораторными признаками патологии печени на маркеры вирусного гепатита E.

Заключение. Таким образом, серопревалентность анти-ВГЕ существенно зависит от географического района, изучаемой группы людей, а также от метода, используемого для выявления антител. Беларусь не является эндемичной по ГЕ. Уровень серопревалентности анти-ВГЕ в изученной группе практически здорового населения РБ коррелирует с аналогичным показателем большинства регионов Европы.

Значительная распространенность ВГЕ в РБ объясняется зоонозным характером эпидемического процесса, вызванного 3-м генотипом ВГЕ, циркулирующим на территории республики. Многочисленные популяции диких и домашних свиней, обитающих в Беларуси, являющихся главным резервуаром ВГЕ, кулинарные традиции населения, включающие употребление не прошедшего термической обработки мяса и печени этих животных, обуславливают преобладание пищевого пути в реализации фекально-орального механизма передачи ГЕ в РБ. Развитие миграционных процессов в РБ, обуславливают вероятность завоза с территории гиперэндемичных по ГЕ регионов на территорию республики 1-го генотипа ВГЕ, имеющего высокий потенциал эпидемического характера распространения ВГЕ-инфекции.

Список литературы:

1. Руководство по вирусологии: Вирусные инфекции человека и животных / [Под ред. акад. РАН Д.К. Львова]. – М.: МИА, 2013. – 1200 с.
2. Автохтонный гепатит E (эпидемиология в группах риска, диагностика, клиника), распространение у животных в Республике Беларусь / С.В. Жаворонок [и др.] // Инфекция и иммунитет. – 2017. – № 5. – С. 22-27.
3. Geng, J. Phylogenetic analysis of the full genome of rabbit hepatitis E virus (rbHEV) and molecular biologic study on the possibility of cross species transmission of rbHEV / J. Geng, H. Fu, L. Wang, Q. Bu, P. Liu // Infect Genet Evol. – 2011. – № 11. – P. 2020-2025.
4. Являются ли домашние животные резервуаром вирусного гепатита E у человека? Результаты молекулярно-генетических исследований с использованием адаптированного метода ПЦР-анализа / А.А. Арабей [и др.] // Лабораторная диагностика. Восточная Европа. – 2017. – №3 (6). – С.343-351.
5. Tyagi S., The 41-amino-acid C-terminal region of the hepatitis E virus ORF3 protein interacts with bikunin, a kunitz-type serine protease inhibitor / S. Tyagi, M. Surjit, S.K. Lal // J. Virol. – 2005. – № 79(18). – P. 12081-12087.
6. Meng X.J. Hepatitis E virus infections. / X. J. Meng, H. L. Shivaprasad, C. Payne // Diseases of poultry (12th ed.) / X.J. Meng [et al.] – Ames: Blackwell Publishing Press, 2008. – P. 443–452.

7. Pavio N. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks / N. Pavio, X.J. Meng, C. Renou // Vet. Res. – 2010. – № 41(6). – P. 46.
8. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus / X.J. Meng [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 1997. – № 94. – P. 9860-9865.
9. Prevalence of hepatitis E virus (HEV) Infection in wild boars and deer and genetic identification of a genotype 3 HEV from a boar in Japan / H. Sonoda [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 2004. – № 42. – P. 5371-5374.
10. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States / G. Haqshenas [et al.] // J. Gen. Virol. – 2001. – № 82. – P. 2449-2462.
11. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China / C. Zhao [et al.] // J. Med. Virol. – 2009. – № 81. – P. 1371–1379.
12. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR / R. Johne [et al.] // J. Gen. Virol. – 2010. – № 91. – P. 750–758.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ ВЫДЕЛЕНИЯ ДНК ЦИРКОВИРУСА СВИНЕЙ 2 ТИПА РАЗЛИЧНЫМИ МЕТОДАМИ

Красочко П.П., д.б.н., доцент УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Би Кайсюань, м.в.н. УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины», г. Витебск, Республика Беларусь

Кугелев И.М., к.в.н., доцент ФГБОУ ВО Смоленская ГСХА, г. Смоленск, Россия

***Аннотация.** В ходе эксперимента была определена эффективность выделения ДНК цирковируса свиней 2 типа методами преципитации нуклеиновых кислот, сорбции на неорганическом сорбенте или микроцентрифужных колонках. Результаты показали наибольшую эффективность выделения ДНК цирковируса свиней 2 типа методом преципитации нуклеиновых кислот.*

***Ключевые слова:** Выделение ДНК, цирковирус свиней 2 типа, сорбентный метод, метод преципитации, колоночный метод.*

Введение. При диагностике инфекционных болезней животных методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) выделение нуклеиновых кислот является определяющим фактором успеха выявления генома возбудителя при условии использования оптимизированных компонентов самой ПЦР. Абсолютное большинство диагностических ПЦР тест-систем поставляется без набора для выделения нуклеиновых кислот, и перед специалистом возникает вопрос: какой из имеющихся методов наиболее эффективен?