

СЛУЧАЙ ЗАВОЗА ВИРУСА ГЕПАТИТА Е 4 ГЕНОТИПА В РОССИЮ

¹Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова, Московская обл.;

²Российская медицинская академия последипломого образования, Москва

Цель. Описание первого документированного случая завозного гепатита Е, ассоциированного с 4 генотипом ВГЕ и импортированного с юга Франции. *Материалы и методы.* Проведен клинический, эпидемиологический и лабораторный анализ завозного случая заболевания гепатитом Е. Выполнен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей изолята ВГЕ, выделенного от пациента. *Результаты.* Эпидемиологический анализ позволил предположить завозной характер выявленного случая ВГЕ-инфекции. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей участков открытой рамки считывания 2 (300 нт) и открытой рамки считывания 1 (721 нт) генома ВГЕ, выделенного от пациента, показал идентичность данного изолята вариантам ВГЕ генотипа 4, выделенным во Франции в 2009 — 2011 гг. от пациентов с автохтонным гепатитом Е. *Заключение.* Полученные результаты подтверждают случай завоза в Россию ВГЕ 4 генотипа с юго-востока Франции (Корсика), где на протяжении последних лет наблюдается распространение данного генотипа вируса.

Журн. микробиол., 2016, № 3, С. 64—69

Ключевые слова: гепатит Е, завозной случай, вирус гепатита Е, генотип

М.И. Mikhailov¹, Е. Yu. Malinnikova^{1,2}, К.К. Kyuregyan¹, О. V. Isaeva¹

A CASE OF IMPORT OF GENOTYPE 4 HEPATITIS E VIRUS INTO RUSSIA

¹Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalites, Moscow Region; ²Russian Medical Academy of Post-Graduate Education, Moscow, Russia

Aim. Description of the first documented case of imported hepatitis E, associated with genotype 4 of HEV and introduced from southern France. *Materials and methods.* Clinical, epidemiologic and laboratory analysis of the imported case of disease of hepatitis E was carried out. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of HEV isolate, taken from the patient, was carried out. *Results.* Epidemiologic analysis allowed to assume imported character of the detected case of HEV-infection. Comparative analysis of nucleotide sequences of regions of the open reading frame 2 (300 nt) and open reading frame 1 (721 nt) of HEV genome, isolated from the patient, showed identity of this isolate with variants of genotype 4 HEV, isolated in France in 2009 — 2011 from patients with autochthonous hepatitis E. *Conclusion.* The results obtained confirm the case of import into Russia of genotype 4 HEV from south-eastern France (Corsica), where spread of this virus genotype is observed in recent years.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2016, No. 3, P. 64—69

Key words: hepatitis E, imported case, hepatitis E virus, genotype

ВВЕДЕНИЕ

Гепатит Е (ГЕ) является острым вирусным заболеванием печени, вызываемым РНК-содержащим безоболочечным вирусом, передающимся преимущественно фекально-оральным путем [6]. Выделяют четыре основных генотипа вируса гепатита Е (ВГЕ), при этом генотипы 1 и 2 способны инфицировать только человека, именно с этими генотипами связана заболеваемость ГЕ в развивающихся странах тропического пояса, где данная инфекция является эндемичной. Случаи устой-

чивой циркуляции ВГЕ 1 или 2 генотипа на неэндемичных территориях не описаны. Генотипы 3 и 4 способны инфицировать, помимо человека, также некоторые виды животных (диких и домашних свиней, оленей). ВГЕ 3 и 4 генотипов выделяют у животных как на эндемичных, так и на неэндемичных по ГЕ территориях, однако именно на неэндемичных территориях, к которым относятся регионы с умеренным климатом, эти генотипы вируса вызывают заболевание человека [11]. Большинство случаев ГЕ, вызванных генотипом 4, регистрируется в Китае, при этом сообщается о более выраженной патогенности 4 генотипа по сравнению с генотипом 3 [7]. В странах умеренного климата, в том числе в России, случаи ГЕ регистрируются относительно редко, и могут быть условно разделены на две группы — завозные случаи, ассоциированные с генотипом 1 ВГЕ, и автохтонные случаи, вызванные, как правило, генотипом 3 [1]. Завозные случаи в России, как правило, связаны с поездками в Индию или страны Юго-Восточной Азии [2]. В данной работе представлено первое описание завозного случая ГЕ, ассоциированного с 4 генотипом ВГЕ и импортированного с юга Франции. Генотип вируса, как и регион (неэндемичный), откуда он был импортирован, являются нехарактерными для эпидемиологии ГЕ, и, по-видимому, описанный нами случай может являться отражением изменений в эпидемиологии ГЕ на территориях, которые традиционно считались неэндемичными по данной инфекции.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Больной F., 23 лет, москвич. Заболел 25.08.2012 г., обратился к врачу 03.09.2012 г. Был заподозрен вирусный гепатит. От госпитализации отказался, поэтому клинико-эпидемиологическое расследование, мониторинг клинических и биохимических анализов крови, общего анализа мочи, определение факторов свертывания крови, УЗИ органов брюшной полости проводились амбулаторно.

У больного исследовали сыворотку крови на маркеры инфицирования вирусами гепатитов А, В, С, Е, цитомегаловирусом и вирусом Эпштейна-Барр. Определение серологических маркеров инфицирования вирусами гепатитов А (анти-ВГА IgM и IgG), Е (анти-ВГЕ IgM и IgG), В (HBsAg, HBc IgM и IgG), С (анти-ВГС IgM + IgG) проводили с помощью коммерческих диагностических тест-систем производства НПО «Диагностические системы» (Нижний Новгород).

Выделение нуклеиновых кислот из сыворотки крови проводили на приборе «MagNA Pure Compact» (Roche Diagnostics Ltd.) с использованием наборов для выделения «MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit 1 — Large Volume» из объема образца, равного 1 мл. Выявление РНК ВГЕ проводили методом обратной транскрипции — полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с вырожденными праймерами к участку открытой рамки считывания 2 (ОРС2) ВГЕ. Использовали следующие олигонуклеотиды: внешняя пара праймеров — 5'-aaytatgcmcagtagccgggttg-3' (прямой) и 5'-cccttatcctgctgagcattctc-3' (обратный), внутренняя пара праймеров — 5'-gtyatgytytgacatagggct-3' (прямой) и 5'-agccgacgaaatyaattctgtc-3' (обратный).

Первый раунд ПЦР проводили совместно с ОТ, условия реакции были следующими: 42°C — 1 час, затем 5 мин. — 94°C (денатурация и инактивация фермента обратной транскриптазы), затем 35 циклов: 94°C — 30 сек, 45°C — 30 сек, 72°C — 45 сек, финальная элонгация — 72°C — 7 мин. Условия для второго раунда ПЦР — 35 циклов: 94°C — 30 сек, 45°C — 30 сек, 72°C — 45 сек, финальная элонгация — 72°C — 7 мин. Полученные продукты ПЦР, соответствующие ВГЕ, определяли в 1,5% агарозном геле в ТВЕ. Величина продукта амплификации для ВГЕ составляла 350 пар оснований.

Дополнительно амплифицировали участок открытой рамки считывания 1 генома ВГЕ. Использовали следующие олигонуклеотиды: внешняя пара прайме-

ров — 5'-actactgcyattgagcaggctgctct-3' (прямой) и 5'-amarggatggkgagccgcccagggcc-3' (обратный), внутренняя пара праймеров — 5-aaytcygccttkgcgaatgctgtggt-3' (прямой) и 5'-gaacgagggtarggracraaggcat-3' (обратный). Условия реакции были теми же, что и для амплификации фрагмента OPC2 ВГЕ, кроме температуры отжига — для обеих пар праймеров она составляла 50°C. Амплифицированные фрагменты выделяли из агарозного геля с помощью набора QIAquick Gel Extraction Kit (производство QIAGEN) и секвенировали на автоматическом секвенаторе CEQ8800 (Beckman Coulter) с использованием набора «GenomeLabTMMethods Development Kit Dye Terminator Cycle Sequencing» (Beckman Coulter). Анализ нуклеотидных последовательностей выполняли с помощью программы MEGA (версии 5.2). Филогенетические деревья строили по алгоритму объединения ближайших соседей (neighbour-joining, NJ) при помощи программы Clustal W. Для получения показателей достоверности филогенетического группирования проанализировали по 1000 случайных выборок (bootstrap pseudoreplicates). Согласно общепринятым нормам, показатели достоверности филогенетического группирования более 70% считались достоверными.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Пациент F. заболел 25.08.2012 г., когда почувствовал тошноту, плохой аппетит, зуд кожи. Рвоту, озноб, боли в животе — отрицает. Слабость почувствовал однократно, после физической нагрузки. Отмечал два эпизода жидкого стула без примесей. Температуру тела не измерял, т.к. не было ощущения подъема температуры. 28.08.2012 г. заметил насыщенный цвет мочи и осветленный стул. 03.09.2012 г. обратился к врачу. После осмотра врач заметил иктеричность склер, кожу цвета загара с желтоватым оттенком. Был заподозрен вирусный гепатит. Больной был обследован амбулаторно (см. «Материалы и методы»).

Методом ИФА сыворотка крови больного F. исследована на маркеры гепатитов А, В, С и Е. Результаты представлены в табл. Выявление анти-ВГЕ IgM позволило предположить острый гепатит Е у пациента. Подтверждением этиологической роли ВГЕ в возникновении острого гепатита у пациента F. послужило обнаружение РНК ВГЕ в образце сыворотки крови, а также появление анти-ВГЕ IgG в образце сыворотки крови, взятом через два месяца после начала заболевания.

Из эпидемиологического анамнеза известно, что перед заболеванием с июня по август 2012 г. пациент периодически жил на Корсике (по 10 — 14 дней в месяц).

Результаты выявления маркеров вирусных гепатитов в образцах сыворотки крови пациента F.

Маркер	Дата		
	03.09.12	17.09.12	24.10.12
HBsAg	Отр.	н.т.	Отр.
Анти-НВсоре	Отр.	н.т.	Отр.
Анти-НВs	Пол.	н.т.	Пол.
Анти-ВГС	Отр.	н.т.	Отр.
Анти-ВГА IgG	Отр.	н.т.	Отр.
Анти-ВГА IgM	Отр.	н.т.	Отр.
Анти-ВГЕ IgM	Пол.	Пол.	Пол.
Анти-ВГЕ IgG	Отр.	Отр.	Пол.
РНК ВГЕ	Пол.	Отр.	Отр.

Примечание. Н.т. — не тестировали.

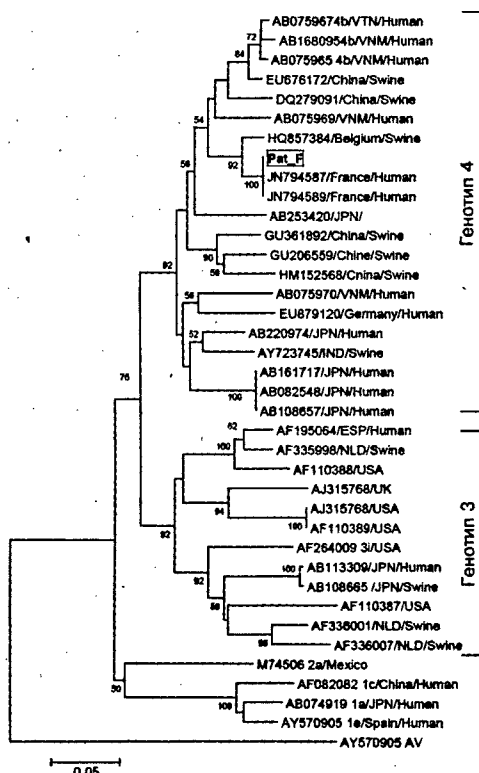
Ел разнообразную пищу, в том числе дегустировал мясные продукты (сырокопченые и кровяные колбасы) в разных деревенских частных лавках. Питался не только домашней пищей, но и в мелких ресторанах, ел плохо прожаренную говядину, морепродукты, в том числе, в виде суши и ролл. Воду пил преимущественно бутилированную. Молоко употреблял пакетированное. До июня 2012 г. из Москвы в течение года не выезжал. Операции, донорство, парентеральные манипуляции отрицает, стоматолога не посещал более 6 месяцев. Контакта с лихорадящими, желтушными больными не было. В семье все здоровы. Перенесенные заболевания — 10 лет назад госпитализирован вместе с семьей в Турции по поводу отравления. Диагноз не помнит. Мононуклеоз в 2010 году. Гепатитом, туберкулезом не болел.

Были построены филогенетические деревья для соответствующих фрагментов генома ВГЕ. Филогенетический анализ последовательностей фрагментов ORC1 (рис.) и ORC2 изолята ВГЕ показал его принадлежность к 4 генотипу. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей участка ORC2 (300 нт) и ORC1 (721 нт) с последовательностями, депонированными в базе данных NCBI, показал наибольшее сходство данного изолята с вариантами ВГЕ генотипа 4, выделенными во Франции в 2009 — 2011 гг. от пациентов с автохтонным гепатитом E.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время в Российской Федерации резко увеличилось количество людей, выезжающих на отдых в другие страны. Причем, многие из них посещают государства, эндемичные по многим инфекциям, в том числе и ГЕ. В работе представлено клиническое, эпидемиологическое и вирусологическое описание первого случая завоза ВГЕ 4 генотипа в Россию. Импортированные случаи ГЕ встречаются в течение нескольких недель после путешествия в эндемичные страны и чаще всего описаны среди иммигрантского населения. Завозные инфекции ВГЕ составляют от 10% (например, во Франции) до $\frac{2}{3}$ всех регистрируемых случаев (например, в США) и связаны с 1 или 2 генотипом вируса [10].

Эпидемиологический анализ выявленного нами случая острого ГЕ указывает на высокую вероятность его завозного характера. Сравнительный анализ нуклеотидной последовательности участка ORC2 ВГЕ, выделенного от пациента, с последовательностями, депонированными в базе данных NCBI, показал наибольшее сходство данного изолята с вариантами ВГЕ генотипа 4, выделенными во Франции в 2009 — 2011 гг. от пациентов с автохтонным гепатитом E. Степень сходства с последовательностью ВГЕ генотипа 4, выделенной от пациента с автохтонным гепатитом E на востоке Франции в 2009 г., составила 98%, а с последовательностями ВГЕ того же генотипа, выделенными на юго-востоке Франции в 2011 г. от 5 пациентов с автохтонным гепатитом E, составила 98 — 99%. Все эти последовательности относятся к субгенотипу 4b и рассматриваются авторами, их описавшими, как один штамм ВГЕ, циркулирующий во Франции [3]. Следует отметить, что для генотипа 4 ВГЕ характерны различия на уровне субгенотипа 12,1 — 18,0%, на уровне изолята — 5,8 — 10,2% [12]. Последовательность ВГЕ, выделенная от пациента F., на филогенетическом дереве формировала единый кластер с упо-



Филогенетическое дерево на основании частичной последовательности генома ВГЕ открытой рамки считывания ORC1 (721 нуклеотид, позиции 131-851, нумерация по прототипному изоляту Burme — M73218).

Pat_F — изолят, выделенный от пациента F. Для каждого изолята указаны номер в GenBank, генотип/субгенотип, страна происхождения и организм, из которого он выделен.

минавшимися выше 6 последовательностями, выделенными во Франции. Полученные результаты свидетельствуют о том, что инфекция у пациента F была вызвана тем же штаммом, что и случаи автохтонного гепатита E, ассоциированного с 4 генотипом вируса, во Франции. Наиболее близкими к данному штамму ВГЕ вариантами вируса 4 генотипа оказались последовательности, выделенные на юго-западе Китая от макаков-резус (степень сходства составила 94,2 — 94,5%), а также последовательности, выделенные в том же регионе от людей со спорадическим гепатитом E и от свиней (степень сходства 94,2% и 94,6 — 94,9% соответственно).

Поскольку количество выделенных на территории Европы последовательностей участка ORC2 ВГЕ генотипа 4 ограничено, для расширения возможностей анализа нами была определена нуклеотидная последовательность участка ORC1 (721 нт) (рис.). Филогенетический анализ последовательностей участка ORC1 ВГЕ дал результаты, сходные с полученными при анализе ORC2. Выделенная нами от пациента F последовательность оказалась идентична (степень сходства 99 — 100%) последовательностям, выделенным P. Colson et al. от пациентов на юго-востоке Франции, употреблявших в пищу сырую колбасу из свиной печени. Для троих пациентов в указанном исследовании основным предполагаемым фактором риска инфицирования является употребление в пищу данного продукта [4]. Сходство с изолятом ВГЕ 4 генотипа, выделенным в 2006 — 2007 г. в Германии от пациента с автохтонным гепатитом [13], составило всего 85%, что аналогично 86% сходства, полученным P. Colson et al. при сравнении французских последовательностей ВГЕ 4 генотипа с этим изолятом. Степень сходства между выделенной от пациента F последовательностью ORC1 и единственными последовательностями 4 генотипа ВГЕ, выделенными на территории Европы от свиней в Бельгии в 2008 г. [8], составила 95%. Сходным образом, выделенные P. Colson et al. последовательности ORC1 ВГЕ 4 генотипа имели сходство с бельгийскими свиными изолятами (96,7%) [3].

Необходимо отметить, что описанные ранее в литературе изоляты ВГЕ, выделенные из колбасы из свиной печени и от пациентов во Франции, заболевших гепатитом E в результате употребления данного продукта, относились к 3 генотипу ВГЕ [5]. Также к 3 генотипу относятся все изоляты ВГЕ, выделенные нами от свиней и от пациентов с автохтонным гепатитом E на территории Российской Федерации.

Степень сходства последовательности участка ORC2 ВГЕ, выделенного от пациента F, с последовательностями того же участка вирусного генома 3 генотипа, выделенными от пациентов с автохтонным гепатитом E, наблюдавшимися в России, составила всего 74 — 76%. Аналогичный показатель при сравнении со свиными изолятами, выделенными на территории Российской Федерации, составил 75 — 80%. Таким образом, анализируемый случай не был связан с известными вариантами ВГЕ, циркулирующими на территории России.

Учитывая практически полную идентичность последовательности участков ORC1 и ORC2 генома ВГЕ, выделенной от пациента F, с последовательностями, выделенными от французских пациентов, заразившихся ВГЕ 4 генотипа при употреблении в пищу термически необработанных продуктов из свинины, наиболее вероятным источником инфицирования ВГЕ для пациента F представляется колбаса из свиной печени, приготовленная во Франции. Необходимо отметить, что накопленные за последние годы данные по регистрации случаев GE и частоте выявления анти-ВГЕ среди населения позволяют рассматривать юго-восток Франции как регион, где данная инфекция распространена довольно широко [9].

Таким образом, это первый документированный случай завоза GE из региона,

не являющегося эндемичным по данной инфекции, и первый импортированный случай заболевания в России, вызванного 4 генотипом ВГЕ. Увеличение мобильности населения в сочетании с ростом наших знаний о циркуляции ВГЕ в регионах умеренного климата позволяет ожидать увеличение числа таких случаев и рекомендовать обследование на маркеры гепатита Е для пациентов с острым гепатитом, имеющих в эпиданамнезе поездки не только в регионы, традиционно считающиеся эндемичными по данной инфекции.

Проект осуществлен при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, уникальный идентификатор проекта RFMEFI60414X0064.

ЛИТЕРАТУРА

1. Быстрова Т. Н., Полянина А. В., Княгина О. Н. Качественные и количественные параметры эпидемического процесса гепатит Е-инфекции на территории Среднеевропейского региона России. Мир вирусных гепатитов. 2010, 1: 9-13.
2. Михайлов М.И., Шахильдян И.В., Онищенко Г.Г. Энтеральные вирусные гепатиты (этиология, эпидемиология, диагностика, профилактика). М., ВУНМЦ Росздрава, 2007.
3. Colson P., Swiader L., Motte A. et al. Circulation of almost genetically identical hepatitis E virus of genotype 4 in France. J. Clin. Virol. 2012, 55 (2): 181-183.
4. Colson P., Romanet P., Moal V. et al. Autochthonous infections with hepatitis E virus genotype 4, France. Emerg. Infect. Dis. 2012, 18 (8): 1361-1364.
5. Colson P., Borentain P., Queyriaux B. et al. Pig liver sausage as a source of hepatitis E virus transmission to humans. J. Infect. Dis. 2010, 202 (6): 825-834.
6. Emerson S.U., Purcell R.H. Hepatitis E virus. Rev. Med. Virol. 2003, 13: 145-154.
7. Geng J.B., Wang M.R., Wang L. et al. Genetic characteristics and pathogenicity of human hepatitis E virus in Nanjing, China. World J. Gastroenterol. 2012, 18: 965-970.
8. Hakze-van der Honing R.W. et al. First isolation of hepatitis E virus genotype 4 in Europe through swine surveillance in the Netherlands and Belgium. PLoS One. 2011, 6 (8): e22673.
9. Izopet J., Labrique A.B., Basnyat B. et al. Hepatitis E virus seroprevalence in three hyperendemic areas: Nepal, Bangladesh and southwest France. J. Clin. Virol. 2015, 70: 39-42.
10. Khuroo M.S. Discovery of hepatitis E: the epidemic non-A, non-B hepatitis 30 years down the memory lane. Virus Res. 2011, 161 (1): 3-14.
11. Lewis H.C., Wichmann O., Duizer E. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. Epidemiol. Infect. 2010, 138: 145-166.
12. Lu L., Li C., Hagedorn C.H. Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. Rev. Med. Virol. 2006, 16 (1): 5-36.
13. Wichmann O., Schimanski S., Koch J. et al. Phylogenetic and case-control study on hepatitis E virus infection in Germany. J. Infect. Dis. 2008, 198 (12): 1732-1741.

Поступила 14.12.15

Контактная информация: Исаева Ольга Владиславовна, к.б.н., 142782, Москва, поселение Московский, поселок Института полиомиелита, 27 км Киевского шоссе, р.т. (495)841-90-12