

На правах рукописи

Потемкин Илья Александрович

ЦИРКУЛЯЦИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА Е НА ТЕРРИТОРИЯХ С РАЗНОЙ СТЕПЕНЬЮ  
ЭНДЕМИЧНОСТИ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

03.02.02 – Вирусология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва - 2020 г.

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова».

**Научный руководитель:**

Д.б.н., профессор РАН

**Кюрегян Карен Каренович**

**Официальные оппоненты:**

**Ведущая организация**

Защита состоится «\_\_\_» \_\_\_ 2021г. в \_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д001.043.01 в ФГБУ «Научно-исследовательский институт гриппа имени А.А. Смородинцева» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 197376, Россия, Санкт-Петербург, ул. проф. Попова 15/17.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке ФГБУ «НИИ гриппа им. А.А. Смородинцева» Минздрава России (197376, Санкт-Петербург, ул. Проф. Попова, д. 15/17) и на сайте <http://www.influenza.spb.ru>

Автореферат разослан «\_\_\_» \_\_\_ 20\_\_\_ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,

Кандидат биологических наук

Амосова И.В.

## **Общая характеристика работы**

**Актуальность темы исследования.** Гепатит Е (ГЕ) является одной из глобальных проблем здравоохранения. Всемирная организация здравоохранения сообщает о 20 млн. случаев инфицирования вирусом гепатита Е (ВГЕ) ежегодно, из них 3,3 млн. протекают с симптомами болезни, а 56 600 заканчиваются смертью. Считается, что ГЕ имеет две формы, которые определяются генотипом вируса. К настоящему времени идентифицировано восемь генотипов ВГЕ, причем генотипы 3, 4, 7 и 8 способны передаваться человеку от животных [Kenney, 2019]. ВГЕ-инфекция, вызываемая генотипами 1 и 2 ВГЕ, широко распространена в развивающихся странах Азии и Африки. Эта форма инфекции является антропонозом, передаётся фекально-орально, преимущественно через контаминированную воду, вызывает крупные вспышки и спорадические случаи заболевания и не встречается в странах умеренного климата (за исключением завозных случаев). Инфекция, вызываемая генотипами 3 и 4 ВГЕ, относительно широко распространена в странах умеренного климата, является антропозоонозом. Генотипы ВГЕ 3 и 4 встречаются у нескольких видов животных (дикие и домашние свиньи, кролики, олени), при этом считается, что домашние свиньи являются основным резервуаром инфекции в промышленно развитых странах [Hughes et al., 2010; Doceul et al., 2016]. Заражение людей связано с употреблением в пищу недостаточно термически обработанной свинины, печени оленей, а также моллюсков, концентрирующих в себе ВГЕ из воды. Эта форма инфекции, по-видимому, часто протекает бессимптомно, что ведёт к формированию постинфекционных антител (анти-ВГЕ IgG) у большого числа лиц без острого гепатита в анамнезе. Однако до сих пор не было данных, свидетельствующих о длительности сохранения анти-ВГЕ после перенесенной инфекции.

Особый интерес представляют отдельные территории в неэндемичных по гепатиту Е регионах, где регистрируется повышенная заболеваемость ГЕ и отмечается интенсивная циркуляция ВГЕ. В Российской Федерации с 2013г. заболеваемость ВГЕ внесена в официальные статистические формы учета и отчетности. Согласно данным официальной статистики в России высокие показатели заболеваемости ВГЕ отмечаются на территории Владимирской области, Курской, Кировской, Белгородской и др. Такие территории представляют особый интерес в плане изучения причин распространения, формирования очагов заболеваемости.

### **Степень разработанности темы**

ВГЕ генотипа 3 широко распространен среди поголовья свиней в РФ, и значительная доля населения страны имеют постинфекционные антитела к ВГЕ. Однако данные об особенностях циркуляции ВГЕ на территории страны и факторах, обеспечивающих ее стабильность, до сих пор не изучены. Не до конца изучены пути распространения инфекции, в т.ч. какой путь является основным, в нашей стране нет полных данных по распространенности антител к ВГЕ во многих когортах (дети, доноры крови и персонал, контактирующий с резервуаром инфекции – домашними свиньями), отсутствуют данные по наблюдению за пациентами с маркерами ВГЕ в динамике, недостаточно данных о генетическом разнообразии ВГЕ, мало изучены особенности эпидемического процесса на территориях с повышенной заболеваемостью ГЕ, в т.ч. в Белгородской области, данные по факторам риска заражения и тяжести

течения заболевания также ограничены, специфическая профилактика ГЕ на территории РФ в настоящее время не проводится.

**Цель работы** - установить основные резервуары ВГЕ-инфекции, группы и факторы риска инфицирования ВГЕ, а также дать вирусологическую характеристику анклава ВГЕ-инфекции в РФ.

#### **Задачи исследования**

- Определить распространенность маркеров гепатита Е среди первичных доноров крови и пожилых лиц в регионах с разным уровнем регистрируемой заболеваемости.
- Установить длительность сохранения постинфекционных антител к ВГЕ.
- Определить распространенность маркеров гепатита Е среди иммунокомпрометированных и иммунокомпетентных детей.
- Определить долю серопозитивных по ВГЕ лиц среди работников свиноферм.
- Изучить распространенность и генетическое разнообразие ВГЕ среди поголовья свиней в регионе, являющимся центром свиноводства в РФ.
- Проанализировать филогенетические взаимоотношения между изолятами ВГЕ, выделенными от заболевших людей, свиней и сточных вод свиноферм на территории анклава по ГЕ.

#### **Научная новизна**

- Впервые на основании данных серологического скрининга подтверждено существование анклава по ВГЕ-инфекции на территории РФ – Белгородской области, где частота выявления анти-ВГЕ IgG и IgM в общей популяции значительно превышает аналогичные показатели в других регионах страны.
- Впервые определена распространенность маркеров ГЕ среди доноров крови в РФ, установлено, что в зависимости от региона от 3% до 4,5% первичных доноров имеют анти-ВГЕ IgM - маркер текущей или недавно перенесенной ВГЕ-инфекции.
- Впервые показано, что ВГЕ-инфекция встречается среди детей на территории РФ и протекает, по-видимому, в большинстве случаев бессимптомно. Также впервые продемонстрировано, что иммуносупрессия является фактором повышенного риска инфицирования детей ВГЕ.
- Получены данные о широкой распространенности анти-ВГЕ среди лиц старшего возраста в РФ, при этом доля серопозитивных пожилых лиц в Белгородской области, являющейся анклавом по ГЕ, значительно превышает таковую в Московском регионе. Выявление анти-ВГЕ IgM среди пожилых лиц свидетельствует о сохранении циркуляции вируса в старших возрастных группах.
- Впервые продемонстрировано, что постинфекционные анти-ВГЕ IgG могут сохраняться длительное время, несколько десятков лет, после перенесённой инфекции. В то же время показано, что значительная доля лиц может терять детектируемые анти-ВГЕ IgG в течение 20-30 лет.
- Впервые показано, что нуклеотидные последовательности ВГЕ генотипа 3, выделенные на территории анклава по ГЕ от людей, свиней и сточных вод свиноферм, обладают высокой степенью сходства (более 95%), что подтверждает зоонозную природу инфекции у человека. Полученные результаты свидетельствуют о том, что заражение человека может происходить не только при реализации алиментарного пути передачи, но и в результате контаминации окружающей среды сточными водами свиноферм.

- Результаты многолетнего мониторинга циркуляции ВГЕ среди поголовья свиней в Белгородской области впервые продемонстрировали широкую распространенность инфекции и стабильную циркуляцию одного варианта ВГЕ субгено типа 3е на одной и той же ферме на протяжении 5 лет.

#### **Теоретическая и практическая значимость**

- На основании выявления маркеров ГЕ среди первичных доноров крови установлено существование риска парентеральной передачи ВГЕ. Существование в РФ таких регионов, как Белгородская область, где более 5% первичных доноров крови имеют анти-ВГЕ класса IgM, указывает на актуальность ВГЕ-инфекции для отечественного здравоохранения и, в том числе, для службы крови.

- Выявление анти-ВГЕ IgM среди пожилых лиц свидетельствует о сохранении циркуляции вируса в старших возрастных группах, что указывает на необходимость обследования на маркеры ГЕ пожилых людей с заболеваниями печени.

- Продemonстрирована важность определения РНК ВГЕ для диагностики ГЕ, особенно у пациентов с иммуносупрессией, у которых возможна задержка или отсутствие выраженного гуморального иммунного ответа на инфекцию. Для таких пациентов при проведении дифференциальной диагностики заболевания печени целесообразным представляется определение РНК ВГЕ независимо от наличия или отсутствия серологических маркеров ГЕ.

- Повышенная частота выявления антител к ВГЕ у работников свиноферм свидетельствует о том, что контакт со свиньями является значимым фактором риска инфицирования ВГЕ. Установлено, что свиноводство является основным фактором формирования анклава ГЕ на территории Белгородской области. Отрицательный результат случаев выявления РНК ВГЕ у свиней старше 5 месяцев, то есть достигших возраста забоя, свидетельствует о невысоком риске алиментарной передачи ВГЕ в РФ. Контакт человека с вирусом, по-видимому, происходит за счет контаминации окружающей среды сточными водами свиноферм.

#### **Методология и методы исследования**

В данной работе определялась распространенность ВГЕ-инфекции в различных когортах населения и генотипическое разнообразие ВГЕ, циркулирующего на территории РФ. Исследовательская работа проводилась с соблюдением всех правил биоэтики. От всех участников исследования было получено информированное согласие. Для достижения цели исследования использовались иммунологические и молекулярно-биологические методы. В ходе проведения работы строго соблюдались протоколы производителей используемых диагностических систем, наборов, а также оборудования. Полученные результаты были подвергнуты статистическому анализу по общепринятым методикам, позволяющим сделать обоснованные выводы.

#### **Основные положения, выносимые на защиту:**

- Встреча с ВГЕ на территории РФ, по-видимому, происходит чаще во взрослом возрасте. Однако выявление серологических маркеров ВГЕ-инфекции у детей также свидетельствует о возможности заражения ВГЕ в детском возрасте. Очевидно, значительная доля случаев ВГЕ инфекции протекает бессимптомно.

- Риск парентеральной передачи ВГЕ существует, хотя он относительно невелик. Тем не менее, существование в РФ таких регионов, как Белгородская область, где 4,5% первичных доноров крови имеют анти-ВГЕ класса IgM, указывает на актуальность ВГЕ-инфекции для отечественного здравоохранения и, в том числе, для службы крови.

- Анти-ВГЕ IgG могут сохраняться длительное время, несколько десятков лет, после перенесенной инфекции, и это может объяснять широкую распространенность этого маркера среди пожилых лиц. В то же время, значительная доля лиц может терять детектируемые анти-ВГЕ IgG в течение 20-30 лет. Выявление анти-ВГЕ IgM среди пожилых лиц (старше 60 лет) свидетельствует о сохранении циркуляции вируса в старших возрастных группах, что указывает на необходимость обследования на маркеры ГЕ пожилых лиц с заболеваниями печени.

- Белгородская область является эндемичным по ГЕ регионом. Высокая частота ВГЕ-инфекции среди поголовья свиней, случаи выявления РНК ВГЕ в сточных водах свиноферм и высокая степень генетического сходства последовательностей ВГЕ, выделенных от заболевших людей, от свиней и из сточных вод, свидетельствуют о зоонозном характере инфекции в регионе.

#### **Степень достоверности и апробация работы.**

Достоверность полученных результатов определяется репрезентативным объемом исследованных образцов (более 8871 сывороток крови людей, более 526 образцов фекалий свиней, 10 образцов сточных вод), применением современных чувствительных методов выявления маркеров гепатита Е, проведением филогенетического анализа 108 нуклеотидных последовательностей ВГЕ, выделенных от людей, животных и образцов сточных вод, а также статистическим анализом полученных данных.

Материалы диссертационной работы были представлены на следующих конференциях:

- На научной конференции молодых учёных ФГБНУ ИПВЭ им. М.П. Чумакова, Москва, 20 апреля 2012г.
- На научной конференции молодых учёных ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова и ФГБНУ ИПВЭ им. М.П. Чумакова, Москва, 15-16 апреля 2014г.

#### **Личный вклад автора в получение научных результатов**

Автор на базах ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова и ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России лично провел отбор сывороток крови, анализ эпиданамнеза пациентов, проведение иммуноферментного анализа, отбор фекалий свиней, приготовление осветленного фекального экстракта, отбор сточных вод, концентрирование вируса в образцах сточных вод, выделение нуклеиновых кислот и амплификацию фрагментов вирусного генома, выравнивание и анализ нуклеотидных и предсказанных аминокислотных последовательностей, обработку и анализ полученных результатов.

#### **Вклад соавторов**

Филогенетический анализ, представленный в главе 2.3.6, проводился совместно с Карлсен А.А. (ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России, г. Москва, РФ).

## Основное содержание работы

### Материалы и методы исследования

Исследование проводилось в несколько этапов на базах ФГБНУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» и ФГБОУ ДПО РМАНПО Минздрава России.

Для исследования было получено 8871 образцов сыворотки крови от людей из различных когорт для детекции маркеров ГЕ (анти-ВГЕ классов IgG и IgM, РНК ВГЕ). Все образцы были собраны методом случайной выборки.

- Дети с неврологическими патологиями (НП) - 609 образцов, возраст от 0 до 19 лет (образцы получены из ФГБУ «НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко»);
- Дети с первичным иммунодефицитами (ПИД) и дети с перенесенным вакциноассоциированным полиомиелитом (ВААП) – 87 образцов, возраст 0-19 лет;
- 3122 образцов сыворотки крови от условно здоровых детей и подростков в возрасте от 0 до 19 лет из шести регионов РФ – Московской области (607 образцов), Ростовской области (504 образцов), Свердловской области (521 образцов), Республики Тыва (488 образцов), Республики Якутия (506 образцов), Хабаровского края;
- Лица старше 60 лет (от 60 лет до 101 года), проживающих в Белгородской и Московской областях (896 образцов);
- Ветераны ОКСВ, проходившие срочную службу в Афганистане в 1979–1989 гг. и постоянно проживающие в Свердловской области (n=422) и жители Свердловской области, проходившие срочную военную службу в эти же годы (1979–1989 гг.) на территории России (n=208);
- Работники свиноферм Белгородской области – 179 образцов;
- Первичные доноры крови из Белгородской (n=291) и Московской областей (n=1030);
- Условно здоровое население Белгородской области – 2027 образцов. В исследование были включены 8 возрастных когорт: 1-14 лет, 15-19 лет, 20-29 лет, 30-39 лет, 40-49 лет, 50-59 лет, 60-69 лет, 70 лет и старше. Соотношение полов во всех возрастных когортах было примерно равным. Количество обследованных лиц в каждой когорте составляло от 174 до 266 человек.

От всех пациентов было получено письменное информированное согласие на участие в исследованиях. Протокол исследования был одобрен Этическим комитетом ФГБНУ ИПВЭ им. М.П. Чумакова (заключение Этического комитета № 11 от 23 мая 2016 г.).

Для исследования на наличие РНК ВГЕ были взяты 526 образцов фекалий свиней с 4 свиноферм Белгородской области. Возраст животных составлял от 2 до 4 месяцев.

Также исследованы 10 проб сточных вод с 5 свиноферм для обнаружения РНК ВГЕ.

**Серологические методы.** Определение серологических маркеров анти-ВГЕ IgG и IgM в сыворотках крови проводили методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием наборов реагентов НПО «Диагностические системы» («ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M») согласно инструкции производителя.

В образцах сыворотки крови, полученных от ветеранов ОКВБ в 2014 г., определяли концентрацию анти-ВГЕ IgG в МЕ/мл. Для этого лиофилизированный стандарт ВОЗ для анти-ВГЕ (NIBSC code: 95/584) восстанавливали стерильной водой до концентрации 100 ед. в 1 мл (МЕ/мл) в соответствии с инструкцией производителя. Из восстановленного стандарта готовили в стерильной воде серию разведений в диапазоне концентраций от 10 до 0,01 МЕ/мл. Полученные разведения тестировали на анти-ВГЕ IgG в наборе «ДС-ИФА-АНТИ- HEV-G» на одной плашке с исследуемыми клиническими образцами согласно инструкции производителя. На основании полученных для разведений стандарта значений оптической плотности строили калибровочную кривую, с помощью которой определяли концентрацию анти-ВГЕ (в МЕ/мл) в каждом клиническом образце.

**Подготовка образцов воды и фекалий.** Образцы сточных вод концентрировали из исходного объема 5 л до 1 мл с помощью коммерческого набора «Вирсорб-М» ЗАО БТК «Биосервис», Российская Федерация). Метод концентрирования основан на связывании отрицательно заряженных вирусных частиц на поверхности магнитных частиц, покрытых полимером диоксида кремния. Концентрирование образца проводилось по протоколу производителя. Далее следовало выделение нуклеиновых кислот.

Для детекции РНК ВГЕ из образцов фекалий, готовили 10% осветленный фекальный экстракт при помощи центрифугирования.

**Выделение нуклеиновых кислот** из осветленного фекального экстракта проводилось на приборе “MagNA Pure Compact” (производство Roche Diagnostics Ltd., Rotkreuz, Switzerland), с использованием наборов для выделения “MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I” из 400 мкл образца.

Выделение нуклеиновых кислот из сыворотки крови проводилось на приборе “MagNA Pure Compact”, с использованием наборов для выделения “MagNA Pure Compact Nucleic Acid Isolation Kit I – Large Volume” из объема образца, равного 1 мл. Выделение проводилось как в индивидуальных образцах, так и в пулах по 10 для образцов, полученных от доноров с нормальными уровнями АЛТ. Один пул объемом 1 мл содержал десять индивидуальных образцов по 100 мкл каждого. Каждое выделение сопровождалось положительным контролем, полученным при внесении 50 мкл фекального экстракта, содержащего РНК ВГЕ, в 950 мкл сыворотки крови, отрицательной по анти-ВГЕ и РНК ВГЕ.

**Выявление РНК ВГЕ** проводили методом обратной транскрипции – полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) с вырожденными праймерами к участку открытой рамки считывания 2 (ОРС 2) ВГЕ. Использовали следующие олигонуклеотиды: внешняя пара праймеров - 5'-aaytatgcmcagtagccgggttg-3' (прямой) и 5'-cccttatcctgctgagcattctc-3' (обратный), внутренняя пара праймеров - 5'-gtyatgytytgcatcatggct-3' (прямой) и 5'-agccgacgaaatyaattctgtc-3' (обратный).

Первый раунд ПЦР проводили совмещено с обратной транскрипцией (ОТ), условия реакции были следующими: 42 °С – 1 час, затем 5 мин. – 94 °С (денатурация и инактивация фермента обратной транскриптазы), затем 35 циклов: 94 °С – 30 сек, 45 °С – 30 сек., 72 °С – 45 сек., финальная элонгация – 72 °С – 7 мин. Условия для второго раунда ПЦР – 35 циклов: 94 °С – 30 сек, 45 °С – 30 сек., 72 °С – 45 сек., финальная элонгация – 72 °С – 7 мин.

Полученные продукты ПЦР, соответствующие ВГЕ, определяли в 1,5% агарозном геле в ТВЕ. Величина продукта амплификации для ВГЕ составляла 350 пар оснований.



**Определение нуклеиновой последовательности.** Для подтверждения специфичности детекции РНК ВГЕ и последующего филогенетического анализа выявленных вариантов вируса проводили прямое секвенирование амплифицированных фрагментов генома ВГЕ.

Продукт ПЦР величиной 350 нт вырезали из геля и выделяли из агарозы с помощью набора QIA Quick Gel Extraction kit (QIAGEN). Определение нуклеотидной последовательности фрагмента проводили на автоматическом секвенаторе «3500 Genetic Analyzer» (ABI, США) с использованием набора «Big Dye Terminator v 3.1 Cycle Sequencing Kit». Выравнивание всех нуклеотидных последовательностей ВГЕ выполняли с помощью программного обеспечения MEGA 7.0.18.

**Статистическая обработка.** Статистический анализ полученных данных проводился с использованием пакета прикладных программ Graph Pad Prism 4 и электронных таблиц Excel 2010. Для показателей частоты выявления маркеров ВГЕ-инфекции в обследованных когортах рассчитывали 95% доверительный интервал (95% ДИ). Для статистической оценки достоверности полученных данных использовали точный тест Фишера (Fisher's exact test). Различия оценивались как достоверные при вероятности 95% ( $p < 0,05$ ).

**Анализ нуклеотидных последовательностей.** Филогенетический анализ выполняли для фрагмента длиной 300 нт, соответствующего ORC2 ВГЕ (нуклеотидные позиции 5996–6295, нумерация по штамму M73218) с референсными последовательностями для известных субгенотипов ВГЕ, предложенными D.B. Smith и соавт. [Smith D.B., 2016].

## **Результаты исследования и их обсуждение**

**Распространенность маркеров ВГЕ-инфекции среди доноров крови на территориях Московской и Белгородской областей.** Задачей данного раздела исследования являлось определение распространенности маркеров гепатита Е среди первичных доноров крови в регионах с разным уровнем регистрируемой заболеваемости. Это необходимо для общего понимания ситуации с ГЕ по стране и оценки степени важности диагностики данной инфекции для отечественной службы крови.

Частота выявления антител анти-ВГЕ класса IgG у доноров из Москвы составила 4,6%, при этом среди доноров с повышенной активностью АЛТ этот показатель оказался несколько выше, чем у доноров с нормальными значениями АЛТ (5,6 и 4,5% соответственно;  $p > 0,05$ ) (Таблица 1). Среди белгородских доноров частота выявления анти-ВГЕ IgG оказалась более чем в 2 раза выше, чем среди московских (9,96% против 4,6%;  $p < 0,05$ ). Среди московских доноров антитела анти-ВГЕ класса IgM, свидетельствующие о текущей или недавно перенесенной инфекции, были обнаружены у 30 (3,1%) доноров из группы с нормальным содержанием АЛТ и в 2 (2,8%) случаях у доноров с повышенными значениями. В среднем частота выявления антител анти-ВГЕ IgM среди московских первичных доноров крови составила 3,1%, этот показатель оказался несколько ниже, чем среди белгородских доноров, однако различия не были статистически значимыми (5,1%;  $p > 0,05$ ). Все образцы сыворотки крови от доноров тестировали на РНК ВГЕ в пулах по 10 образцов, независимо от статуса по анти-ВГЕ. Ни в одном случае РНК ВГЕ выявлена не была.

**Таблица 1.** Результаты распространения маркеров ВГЕ среди доноров крови.

| Регион   | АЛТ            | Общее<br>число<br>доноров | Анти-ВГЕ - положительные |                    |      |                   | РНК<br>ВГЕ |
|----------|----------------|---------------------------|--------------------------|--------------------|------|-------------------|------------|
|          |                |                           | IgG                      |                    | IgM  |                   |            |
|          |                |                           | абс.                     | %<br>(95% ДИ)      | абс. | %<br>(95% ДИ)     |            |
| Москва   | Выше 100 ЕД/мл | 72                        | 4                        | 5,6<br>(1,8-13,8)  | 2    | 2,8<br>(0,2-10,1) | 0          |
|          | Норма          | 958                       | 43                       | 4,5<br>(3,3-6,0)   | 30   | 3,1<br>(2,2-4,5)  | 0          |
| Белгород | Норма          | 291                       | 29                       | 9,96<br>(7,0-14,0) | 13   | 4,46<br>(2,6-7,6) | 0          |

Результаты определения серологических маркеров ГЕ среди первичных доноров показали, что анти-ВГЕ IgG выявлялись значительно чаще среди белгородских доноров по сравнению с московскими. Данное различие, по-видимому, отражает разную интенсивность циркуляции ВГЕ в обследованных регионах и соответственно различия в популяционном иммунитете к этой инфекции.

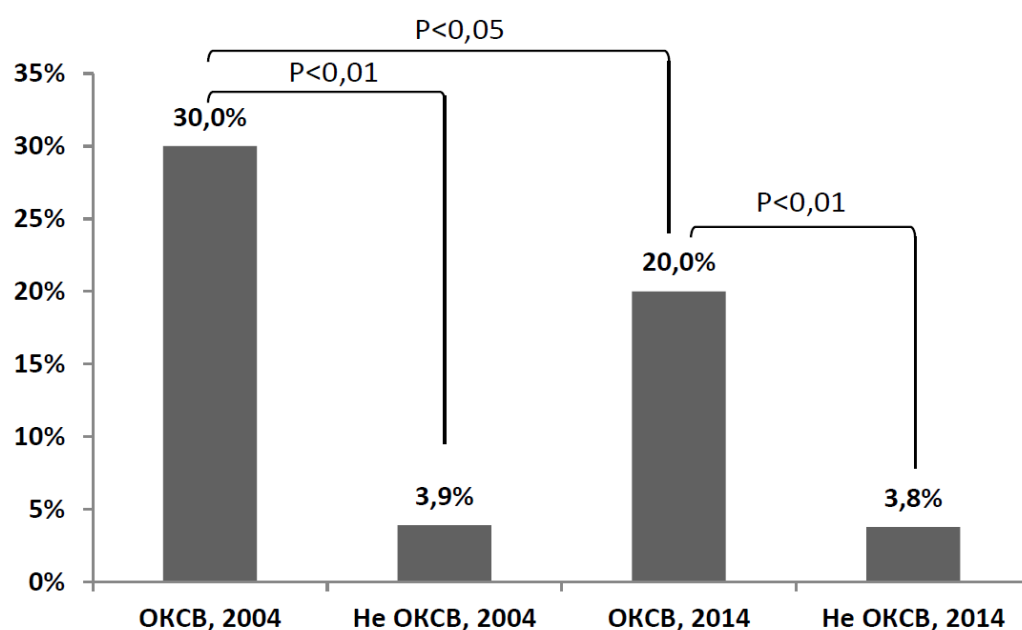
Данные настоящего исследования о распространенности антител анти-ВГЕ IgG и IgM среди доноров крови сопоставимы с результатами, полученными в Германии [Juhl D. et al., 2014], Швейцарии [Kaufmann A. et al., 2011], на севере Франции [Mansuy J.M. et al., 2015] и Японии [Fukuda S. et al., 2004 и Sakata H. et al., 2008], где эти показатели составляют от 2,1% до 6,8% для анти-ВГЕ IgG и от 0,1 до 1,0% для анти-ВГЕ IgM. Однако в США, Великобритании, на юго-западе Франции и Дании частота выявления антител анти-ВГЕ среди доноров крови значительно выше — от 15,8 до 20,6% для анти-ВГЕ IgG [Meng X.J. et al., 2002; Dalton H.R. et al., 2008; Mansuy J.M. et al., 2015; Christensen P.B. et al., 2008]. Причиной различий выявляемых показателей распространенности анти-ВГЕ могут являться тест-системы, используемые для выявления антител анти-ВГЕ. В США и Дании применяли in house тест-системы [Meng X.J. et al., 2002; Christensen P.B. et al., 2008], в других странах — коммерческие диагностикумы различных производителей. В нашем исследовании для выявления анти-ВГЕ IgM использовали ИФА-тест, высокая специфичность и чувствительность которого были подтверждены при проведении сравнительных испытаний нескольких тест-систем с помощью панелей образцов, содержащих антитела к ВГЕ всех 4 генотипов, а также образцов, полученных от здоровых лиц и больных ГЕ и ГА [Drobeniuc J. et al., 2010]. Таким образом, выбранная нами для сероэпидемиологических исследований отечественная тест-система обладает одним из наиболее высоких показателей аналитической чувствительности при определении анти-ВГЕ IgG, что свидетельствует о достоверности полученных результатов.

РНК ВГЕ не была выявлена ни в одном из образцов сыворотки крови от доноров как с нормальными, так и с повышенными уровнями АЛТ. Аналогично нашим результатам, в исследовании, проведенном в Англии и Северном Уэльсе, среди доноров крови не была обнаружена виремия ВГЕ, несмотря на присутствие серологических маркеров инфекции [Beale M.A. et al., 2011]. Однако в других неэндемичных по ГЕ странах случаи обнаружения РНК ВГЕ в сыворотках доноров крови описаны. Так, в Японии частота выявления РНК ВГЕ среди доноров крови составила 1,1%, в Германии — 0,8%, при этом случаи

выявления вирусной РНК не всегда коррелировали с присутствием в образце антител анти-ВГЕ [Juhl D. et al., 2014; Sakata H. et al., 2008].

Данные о распространенности серологических маркеров ГЕ среди доноров крови, полученные нами, свидетельствуют об интенсивности циркуляции ВГЕ в РФ, сопоставимой с наблюдаемой в других странах умеренного климата, ранее считавшихся неэндемичными по ГЕ. Это наблюдение позволяет экстраполировать данные о частоте обнаружения виремии ВГЕ у доноров крови, полученные в этих странах на больших выборках, на российские когорты доноров и сделать вывод о том, что риск парентеральной передачи ВГЕ существует, хотя он относительно невелик. Тем не менее, существование в РФ таких регионов, как Белгородская область, где более чем у 5% первичных доноров крови имеются анти-ВГЕ класса IgM, указывает на актуальность ВГЕ-инфекции для отечественного здравоохранения и в том числе для службы крови.

**Длительность сохранения антител к ВГЕ.** До начала наших исследований не было четкого понимания того, как долго сохраняются постинфекционные антитела к ВГЕ. Поэтому одной из задач данного исследования являлось определение длительности сохранения антител к ВГЕ после перенесённой инфекции. Ветераны ОКСВ, проходившие срочную службу в Афганистане, являются удобной когортой для проведения подобного исследования, поскольку после относительно кратковременного пребывания в гиперэндемичном регионе, где риск встречи с возбудителем высок, они вернулись в ранее неэндемичный регион (Свердловскую область), где риск повторной встречи с ВГЕ относительно невысокий.



**Рисунок 1.** Частота выявления анти-ВГЕ IgG среди ветеранов войны в Афганистане (ОКСВ) и в группе сравнения (не ОКСВ) при обследовании в 2004 и 2014 гг.

Частота выявления анти-ВГЕ IgG среди ветеранов ОКСВ при обследовании в 2004 г., в среднем через 20 лет после окончания службы в Афганистане, составила 30% (95/317), что многократно превысило аналогичный показатель среди лиц, проходивших в те же годы срочную военную службу на территории России (3,9%, 8/208) (рис. 1). При обследовании в 2014 г. ветеранов ОКСВ, в среднем через

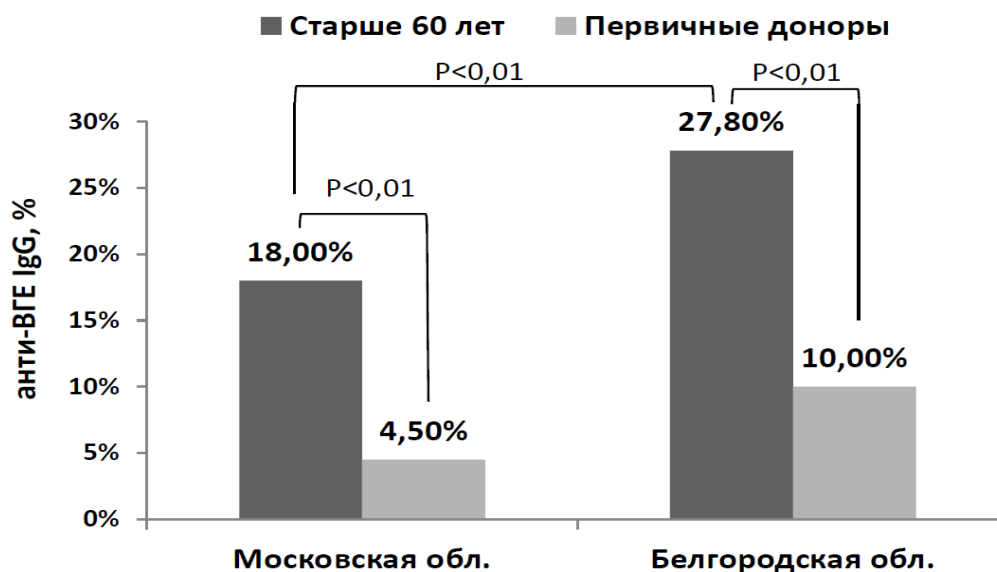
29,5 лет после пребывания в Афганистане, этот показатель достоверно снизился до 20% (21/105), однако по-прежнему достоверно превышал распространённость анти-ВГЕ IgG в общей популяции (3,8%,  $p < 0,05$ ).

Результаты свидетельствуют о длительности сохранения анамнестических анти-ВГЕ – даже через 30 лет после пребывания в гиперэндемичном регионе доля серопозитивных лиц составляет 20% против 3,8%, характерных для общей популяции в регионе постоянного проживания ветеранов ОКСВ. Прослежено исчезновение антител со временем у значительной доли лиц. Об этом свидетельствует уменьшение на 10% доли серопозитивных лиц через 30 лет после пребывания в гиперэндемичном регионе по сравнению с обследованными через 20 лет после службы в Афганистане. Влияние потенциальной встречи с ВГЕ на территории постоянного проживания обследованных на показатели выявления анти-ВГЕ у ветеранов ОКСВ представляется незначительным, поскольку доля серопозитивных лиц в группах сравнения оставалась одинаковой в течение десятилетнего интервала, с 2004 по 2014 г. Встреча с ВГЕ уже на территории РФ не исключается, что подтверждается случаями выявления анти-ВГЕ IgM у обследованных лиц. Достоверное снижение доли серопозитивных лиц в когортах ветеранов ОКСВ, обследованных с десятилетним интервалом, является косвенным свидетельством того, что анти-ВГЕ IgG после перенесённой инфекции не сохраняются пожизненно, а исчезают со временем. Результаты свидетельствуют о том, что скорость исчезновения анти-ВГЕ составляет примерно 10% за 10 лет.

По нашим сведениям, это первые данные о многолетней динамике анти-ВГЕ, полученные на ранее неэндемичной территории, где вероятность повторной встречи с возбудителем и соответственно бустирования гуморального ответа относительно невысока. Результаты наблюдений за постинфекционными анти-ВГЕ в эндемичном регионе (Китай) показали, что до 50% серопозитивных лиц теряют антитела в течение 14,5 лет [Su Y.-Y. et al., 2017]. Эти фактические данные противоречат результатам математического моделирования сохранения постинфекционных анти-ВГЕ, согласно которым, на основании пятилетней динамики концентраций анти-ВГЕ, антитела должны сохраняться не менее 50 лет после перенесённой инфекции [Chadha M. S. et al., 1999]. Случаи повторного заболевания ГЕ не описаны, что указывает на пожизненное сохранение иммунитета несмотря на исчезновение детектируемых антител. Понимание длительности сохранения постинфекционных анти-ВГЕ важно с точки зрения двух аспектов изучения ГЕ: во-первых, для разработки стратегии вакцинопрофилактики этой инфекции, во-вторых, для надзора за ВГЕ. В мире опубликовано большое число работ по выявлению анти-ВГЕ в разных группах населения, в том числе у пожилых лиц. Нами в данной работе также подтверждено, что среди пожилых лиц анти-ВГЕ выявляются достоверно чаще. Остаётся открытым вопрос, отражают ли эти данные циркуляцию ВГЕ в отдалённом прошлом или указывают на относительно недавнюю встречу с вирусом? Для ответа на этот вопрос нами исследованы образцы сыворотки крови пожилых людей (старше 60 лет) на анти-ВГЕ не только класса IgG, но и IgM, свидетельствующих о текущей или недавней инфекции.

Частота выявления анти-ВГЕ IgG в двух регионах РФ, Московской и Белгородской областях, составила 18,0 и 27,8% соответственно, при этом различия между регионами достоверны ( $p < 0,01$ )

(Рисунок 2). В качестве показателей сравнения для каждого региона выбраны значения частоты выявления анти-ВГЕ IgG среди первичных доноров крови с нормальным уровнем трансаминаз, полученные нами на первом этапе исследования.



**Рисунок 2.** Частота выявления анти-ВГЕ IgG у пожилых лиц и у первичных доноров крови.

В Московской и Белгородской областях показатели серопозитивности среди пожилых людей в несколько раз превышали аналогичные показатели среди первичных доноров крови. Анализ распространённости анти-ВГЕ IgG среди пожилых показал, что динамика их накопления у населения двух регионов различается. В Белгородской области отмечено достоверное увеличение доли лиц, позитивных по анти-ВГЕ IgG среди лиц старше 70 лет по сравнению с подгруппой в возрасте 60–70 лет (32,6% против 21,6%,  $p < 0,05$ ). В Московской области такой тенденции не было, но отмечено достоверно более частое выявление анти-ВГЕ IgM в подгруппе лиц в возрасте 60–70 лет по сравнению с лицами старше 70 лет. Частота выявления анти-ВГЕ IgM, свидетельствующих о текущей или недавно перенесённой инфекции, достоверно выше среди пожилых людей, проживающих в Белгородской области (6,9%), по сравнению с жителями Московской области из аналогичной возрастной группы (2,7%,  $p < 0,01$ ).

Полученные в настоящем исследовании результаты подтвердили данные о подъёме распространённости анти-ВГЕ среди лиц старшего возраста, полученные в других неэндемичных регионах мира. В Германии частота выявления анти-ВГЕ IgG повышается с возрастом и достигает пика (26%) среди лиц старше 60 лет [Faber M.S. et al., 2012]. Старший возраст сам по себе является фактором риска наличия анамнестических анти-ВГЕ, маскируя другие возможные факторы риска. Тесная связь между старшим возрастом и наличием анти-ВГЕ IgG, по-видимому, отражает совокупную возможность контакта с вирусом на протяжении жизни. С другой стороны, это может отражать и эффект возрастной когорты, имевшей более высокий риск встречи с вирусом несколько десятилетий назад. Такое предположение подтверждают наши данные о возможности длительного, до 30 лет, сохранения анамнестических анти-ВГЕ. В пользу снижения риска встречи с ВГЕ в течение последних десятилетий свидетельствуют данные P.Christensen и соавт., исследовавших образы сывороток от доноров крови,

собранные в 1983 и 2003 гг. Отмечено снижение распространённости анти-ВГЕ более чем на 10% при одинаковом возрасте доноров в обеих группах [Christensen P.B. et al., 2008].

Полученные результаты свидетельствуют о том, что анти-ВГЕ IgG могут сохраняться длительное время, несколько десятков лет, после перенесённой инфекции, и это может объяснять широкую распространённость этого маркера среди пожилых людей. В отличие от гуморального иммунитета к вирусу гепатита А, сохраняющегося пожизненно после перенесённой инфекции, значительная доля лиц может терять детектируемые анти-ВГЕ IgG в течение 20–30 лет. Выявление анти-ВГЕ IgM среди лиц старше 60 лет свидетельствует о сохранении циркуляции вируса в старших возрастных группах, что указывает на необходимость обследования на маркеры ГЕ пожилых людей с заболеваниями печени.

**Распространенности маркеров инфекции среди детей.** Как правило, среди детей случаи заболевания ГЕ не регистрируются [Verghese V.P. et al., 2014], однако среди них возможна бессимптомная циркуляция вируса, аналогичная наблюдаемой для ВГА [Михайлов М.И. с соавт., 2007]. Кроме того, особый интерес вызывает циркуляция ВГЕ среди детей с иммунодефицитными состояниями, так как при имунносупрессии возможно хроническое течение ВГЕ-инфекции [Krain L.J. et al., 2014]. В связи с этим одной из задач данной работы являлась ликвидация пустоты в знаниях об эпидемиологии ГЕ среди детей в России. Для этого нами была определена частота выявления маркеров перенесенной и текущей ВГЕ инфекции среди детей и подростков из шести удаленных друг от друга регионов Российской Федерации, отличающихся по своим климатическим, экономическим и социально-демографическим характеристикам. Помимо условно здоровых детей, в исследование были включены дети с иммуносупрессией - с первичными иммунодефицитами (ПИД), а также дети с неврологическими патологиями (НП), получавшие иммуносупрессивные препараты.

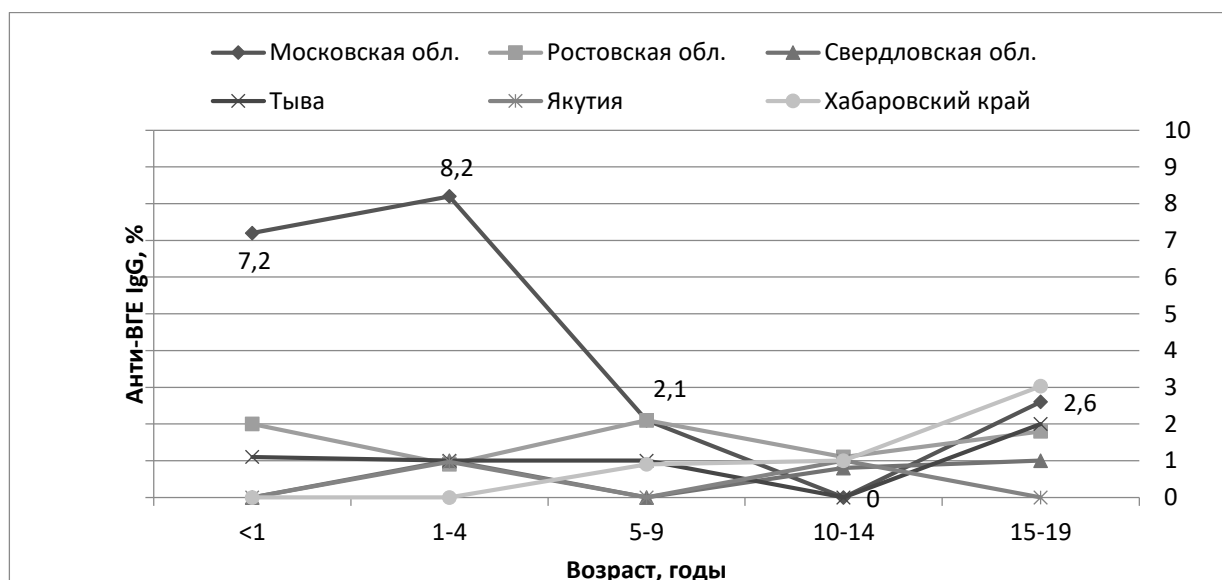
Анти-ВГЕ классов IgG, свидетельствующие о ранее перенесенной инфекции, были выявлены во всех обследованных группах детей (Таблица 2).

**Таблица 2.** Частота выявления анти-ВГЕ классов IgM и IgG среди детей.

| Группа                                 | Анти-ВГЕ IgG<br>n/N (%)<br>[95% ДИ] | Анти-ВГЕ IgM<br>n/N (%)<br>[95% ДИ] | Анти-ВГЕ IgM/IgG<br>n/N (%)<br>[95% ДИ] |
|----------------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------------|
| Дети с НП                              | 4/609 (0,6%)<br>[0,2-1,7]           | 10/609 (1,6%)<br>[0,9-3,0]          | 2/609 (0,3%)<br>[0,01-1,3]              |
| Дети с ПИД и ВААП                      | 5/87 (5,7%)<br>[2,2-13,1]           | 1/87 (1,1%)<br>[0,01-6,8]           | 0                                       |
| Условно здоровые дети<br>6-ти регионов | 44/3122 (1,4%)<br>[1,1-1,9]         | 8/3122 (0,3%)<br>[0,1-0,5]          | 0                                       |
| Московская область                     | 22/607 (3,6%)<br>[2,4-5,5]          | 2/607 (0,3%)<br>[0,01-1,3]          | 0                                       |
| Свердловская область                   | 3/521 (0,6%)<br>[0,1-1,8]           | 1/521 (0,2%)<br>[0,01-1,2]          | 0                                       |
| Хабаровский край                       | 4/496 (0,8%)<br>[0,2-2,1]           | 0                                   | 0                                       |
| Республика Якутия                      | 2/506 (0,4%)<br>[0,01-1,5]          | 0                                   | 0                                       |
| Республика Тыва                        | 5/488 (1%)<br>[0,4-2,5]             | 2/488 (0,4%)<br>[0,01-2,3]          | 0                                       |
| Ростовская область                     | 8/504 (1,6%)<br>[0,8-3,2]           | 3/504 (0,6%)<br>[0,1-2,5]           | 0                                       |

Достоверно чаще анти-ВГЕ IgG выявляли среди детей с ПИД и ВААП (5,7%,  $p < 0,05$ ) по сравнению с условно здоровыми детьми (1,4%) и детьми с НП (0,6%). Анти-ВГЕ класса IgM, свидетельствующие о текущей или недавно перенесенной инфекции, также были выявлены во всех обследованных когортах, при этом среди детей с ПИД и ВААП, а также детей с НП данный маркер выявляли в четыре раза чаще по сравнению с условно здоровыми детьми (1,6% и 1,1% против 0,25%,  $p < 0,05$ ). В группе условно здоровых детей частота выявления анти-ВГЕ IgG варьировала в зависимости от региона, от 0,4% в Республике Якутия до 3,6% в Московской области.

Среди условно здоровых детей и подростков отсутствовали выраженные различия по частоте выявления анти-ВГЕ IgG в зависимости от возраста, положительные случаи были распределены довольно равномерно во всех возрастных группах. Исключение составляли дети от 0 до 4 лет в Московской области – в этой группе частота выявления анти-ВГЕ IgG достигала 7,2% - 8,2% (против 0% - 2,0% в других регионах,  $p < 0,05$ ) (Рисунок 3).



**Рисунок 3.** Частота выявления анти-ВГЕ IgG среди условно здоровых детей в зависимости от возраста.

Достоверно более высокая частота выявления анти-ВГЕ классов IgG и IgM среди детей с ПИД, ВААП и НП по сравнению со здоровыми детьми является свидетельством в пользу связи иммуносупрессии с повышенным риском инфицирования ВГЕ. С другой стороны, дети с ПИД получают большое количество препаратов иммуноглобулинов, полученных из препаратов донорской крови, которые могут содержать в том числе и анти-ВГЕ IgG. Это может объяснять высокую частоту выявления у детей с ПИД антител к ВГЕ данного класса. Полученные данные позволяют рассматривать иммуносупрессию как фактор риска инфицирования ВГЕ. Более детальный анализ распространенности анти-ВГЕ IgG среди условно здоровых детей и подростков, выполненный в пятилетних возрастных группах, показал отсутствие увеличения частоты выявления антител с возрастом. Эти данные свидетельствует об отсутствии роста частоты встречи с ВГЕ в детском и подростковом возрасте на обследованных территориях. Это наблюдение подтверждается данными, полученными в других

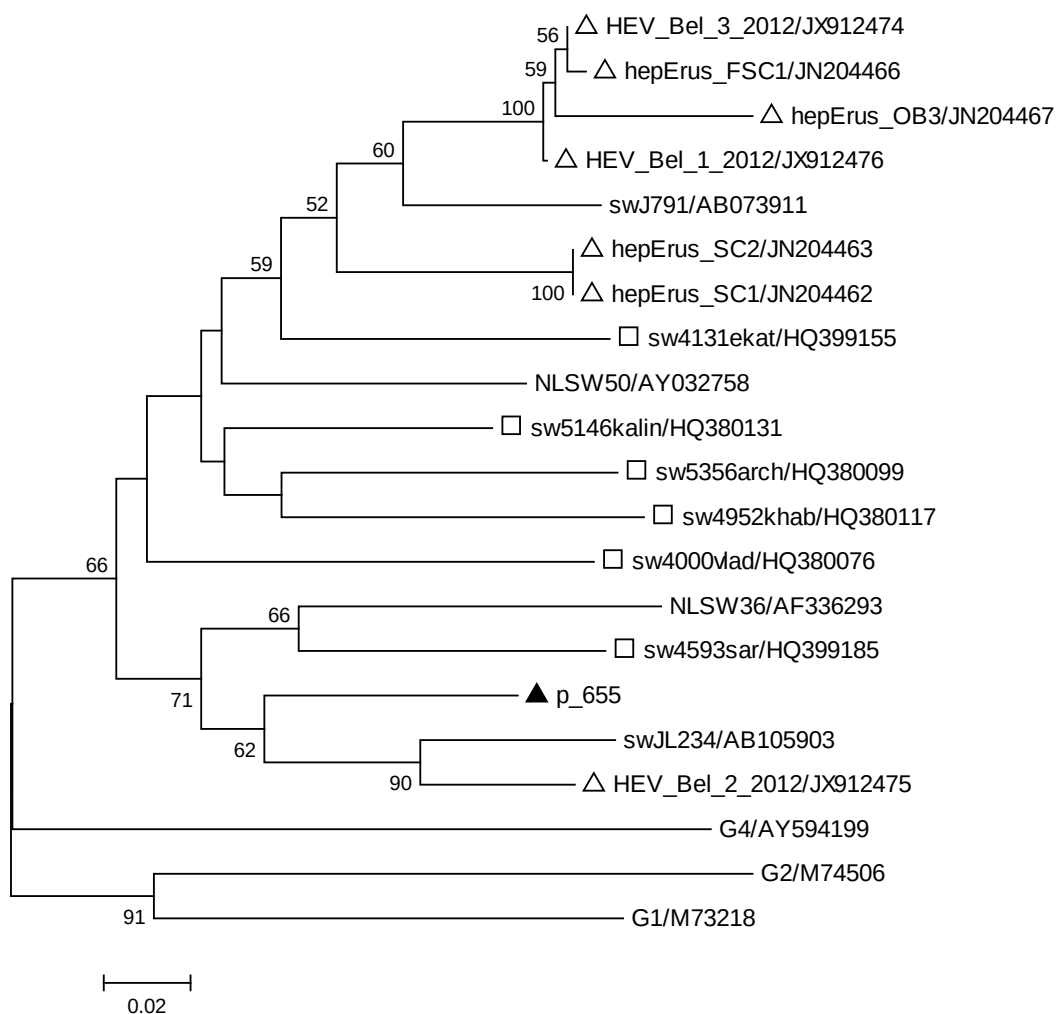
неэндемичных по ГЕ странах – в США и Великобритании среди здоровых лиц в возрасте от 1 года до 19 лет [Ijaz S. et al., 2009, Kuniholm M.H. et al., 2009]. Такая картина принципиально отличается от наблюдаемой в эндемичных странах, где частота выявления анти-ВГЕ IgG возрастает от менее 10% среди детей моложе 10 лет до 76% среди подростков [Arankalle V.A. et al., 1995, Fix A.D. et al., 2000].

Неожиданно высокой оказалась частота выявления анти-ВГЕ IgG в Московской области среди детей в возрасте от 0 до 4 лет – на уровне показателей, регистрируемых в эндемичных регионах [Arankalle V.A. et al., 1995]. При этом в более старших возрастных группах распространенность анти-ВГЕ соответствует показателям, регистрируемым у детей в других обследованных регионах – 0%-2%. Подобный резкий пик встречаемости анамнестических антител невозможно объяснить только наличием материнских антител, аналогично анти-ВГА, выявляемым часто у детей в возрасте до 1 года. По-видимому, высокая частота выявления анти-ВГЕ среди детей в возрасте до 4 лет отражает подъем циркуляции ВГЕ в регионе, предположительно произошедший за несколько лет до проведения данного исследования. На то указывает и довольно высокая частота выявления анти-ВГЕ среди взрослого населения, регистрируемая в Московской области - 5,7% среди лиц моложе 60 лет и 28,2% среди лиц старше 60 лет – выше, чем в большинстве регионов России [Кюрегян К.К., Михайлов М.И., 2013].

РНК ВГЕ не была выявлена ни в одном из образцов сыворотки крови от условно здоровых детей и подростков, а также от детей с ПИД и ВААП. Однако в одном образце от ребенка с НП, отрицательном по анти-ВГЕ IgM и IgG, была выявлена РНК ВГЕ. Анализ нуклеотидной последовательности амплифицированного фрагмента подтвердил его принадлежность ВГЕ. Было установлено, что данный изолят ВГЕ относится к 3 генотипу вируса, как и большинство вариантов ВГЕ, выделяемых в Европе и в России от людей и от животных. Филогенетический анализ не показал близкородственных отношений выделенного в данном исследовании изолята ВГЕ (обозначен черным треугольником на рисунке 4) с вариантами вируса, ранее выделенными на территории России от пациентов с автохтонным ГЕ и от свиней (обозначены на рисунке 4 незакрашенными треугольниками и квадратами, соответственно). Кроме того, последовательность выявленного варианта ВГЕ не была идентична последовательностям, ранее выделенным в лаборатории, что свидетельствует об отсутствии ложноположительного результата теста вследствие контаминации лабораторными штаммами ВГЕ.

Описанный нами случай служит подтверждением возможности бессимптомной ВГЕ-инфекции, сопровождаемой виремией, и позволяет предположить роль таких бессимптомных носителей ВГЕ как возможного резервуара инфекции. Кроме того, полученные результаты указывают на важность определения РНК ВГЕ для диагностики ГЕ, особенно у пациентов с иммуносупрессией, у которых возможна задержка или отсутствие выраженного гуморального иммунного ответа на инфекцию. Для таких пациентов при проведении дифференциальной диагностики заболевания печени целесообразным представляется определение РНК ВГЕ независимо от наличия или отсутствия серологических маркеров ГЕ.





**Рисунок 4.** Филогенетическое дерево, основанное на последовательностях фрагмента OPC2 ВГЕ величиной 300 нуклеотидов (нуклеотиды 5996-6295, нумерация по геному прототипного изолята Burme – M73128). Выделенный в данном исследовании изолят ВГЕ обозначен черным треугольником; выделенные на территории России изоляты ВГЕ от пациентов с автохтонным ГЕ обозначены незакрашенным треугольником, выделенные от свиней - квадратом.

**Распространенность маркеров инфицирования ВГЕ среди условно здорового населения Белгородской области.** Для понимания структуры популяционного иммунитета к ВГЕ нами были обследованы все возрастные группы условно здорового населения Белгородской области – региона РФ с наибольшим количеством зарегистрированных случаев ГЕ. Анти-ВГЕ IgG были выявлены в среднем среди 16,4% (95% ДИ 14,8–18,1; 332/2027) условно здорового населения Белгородской области. Доля лиц, имевших одновременно анти-ВГЕ IgM и IgG, составила в среднем 2,8% (95% ДИ 2,2–3,6; 57/2027). Распределение серопозитивных случаев по возрастным группам обследованного населения приведено в табл. 3. Частота выявления анти-ВГЕ IgG имела чёткую тенденцию к росту с увеличением возраста обследованного населения. Отмечено несколько возрастных групп, в которых происходит статистически значимый подъём частоты выявления анти-ВГЕ IgG по сравнению с младшими возрастными группами: 15–19, 40–49, 70 лет и старше. Статистически значимое увеличение доли лиц, позитивных одновременно по анти-ВГЕ IgM и IgG, также было отмечено в возрастных группах 15–19 и 40–49 лет по сравнению с

младшими возрастными группами. Различия по частоте выявления анти-ВГЕ IgM и IgG между группами 60–69 лет и 70 лет и старше не были статистически значимыми.

**Таблица 3.** Частота выявления анти-ВГЕ IgG и IgM среди условно здорового населения Белгородской области

| Возрастная группа | Число обследованных | <i>P</i> | Анти-ВГЕ IgG, % (95% ДИ*) | Анти-ВГЕ IgG+IgM, % (95% ДИ) | <i>P</i> |
|-------------------|---------------------|----------|---------------------------|------------------------------|----------|
| 1-14 лет          | 250                 | <0,01    | 2,8% (1,3-5,8%)           | 0,4% (0,1-2,5%)              | <0,05    |
| 15-19 лет         | 266                 |          | 7,5% (4,9-11,4%)          | 2,3% (0,9-5,0%)              |          |
| 20-29 лет         | 258                 |          | 8,1% (5,3-12,2%)          | 1,6% (0,5-4,1%)              |          |
| 30-39 лет         | 260                 | <0,01    | 9,2% (6,2-13,4%)          | 1,5% (0,5-4,0%)              | <0,05    |
| 40-49 лет         | 261                 |          | 16,1% (12,1-21,1%)        | 4,2% (2,3-7,5%)              |          |
| 50-59 лет         | 239                 |          | 20,1% (16,2-26,5%)        | 4,2% (2,2-7,6%)              |          |
| 60-69 лет         | 174                 | <0,01    | 23,0% (17,3-29,8%)        | 5,2% (2,6-9,7%)              | > 0,05   |
| 70 лет и старше   | 319                 |          | 40,1% (34,9-45,6%)        | 3,8% (2,1-6,5%)              |          |

В целом для Белгородской области характерно постепенное увеличение с возрастом доли лиц, встречавшихся с ВГЕ, при этом показатели выявления анти-ВГЕ IgM, свидетельствующие о недавнем контакте с вирусом, указывают на увеличение риска инфицирования среди лиц старше 40 лет. Все незавозные случаи ВГЕ-инфекции на территории РФ, в том числе в Белгородской области, связаны с генотипом 3 ВГЕ. Поскольку для него основным резервуаром являются домашние свиньи [Dalton H.R. 2008], по-видимому, именно широкая циркуляция ВГЕ среди свиней определяет высокую частоту контакта с вирусом среди населения Белгородской области.

Эндемичные территории на юге Франции также связаны с циркуляцией зоонозных генотипов 3 и 4 ВГЕ [Lhomme S. et al., 2015]. По-видимому, причиной формирования эндемичных территорий, связанных с ВГЕ генотипов 3 и 4, является сосредоточение свиноферм в определенных регионах. Так, в Германии было показано, что анти-ВГЕ IgG значительно чаще встречаются у населения свиноводческих регионов, имеющих непосредственный контакт со свиньями [Krumbholz A. et al., 2014]. В пользу этого свидетельствует повышенная частота выявления анти-ВГЕ среди работников свиноводческих ферм, боен и мясоперерабатывающих цехов [Olsen B. et al., 2006; Carpentier A. et al., 2012; Mughini-Gras L. et al., 2017]. Полученные нами данные о выявлении анти-ВГЕ среди свиноводов Белгородской области также подтверждают эти наблюдения.

**Выявление маркеров ВГЕ у свиноводов.** Из 179 образцов, собранных на фермах Белгородской области, среди работников, имеющих контакт с свиньями 39 (21,7%) оказались положительными по анти-ВГЕ IgG (95% ДИ 16,3-28,4). Анти-ВГЕ IgM были положительными у 10 (5,6%) работников (95% ДИ 2,9-10,1).

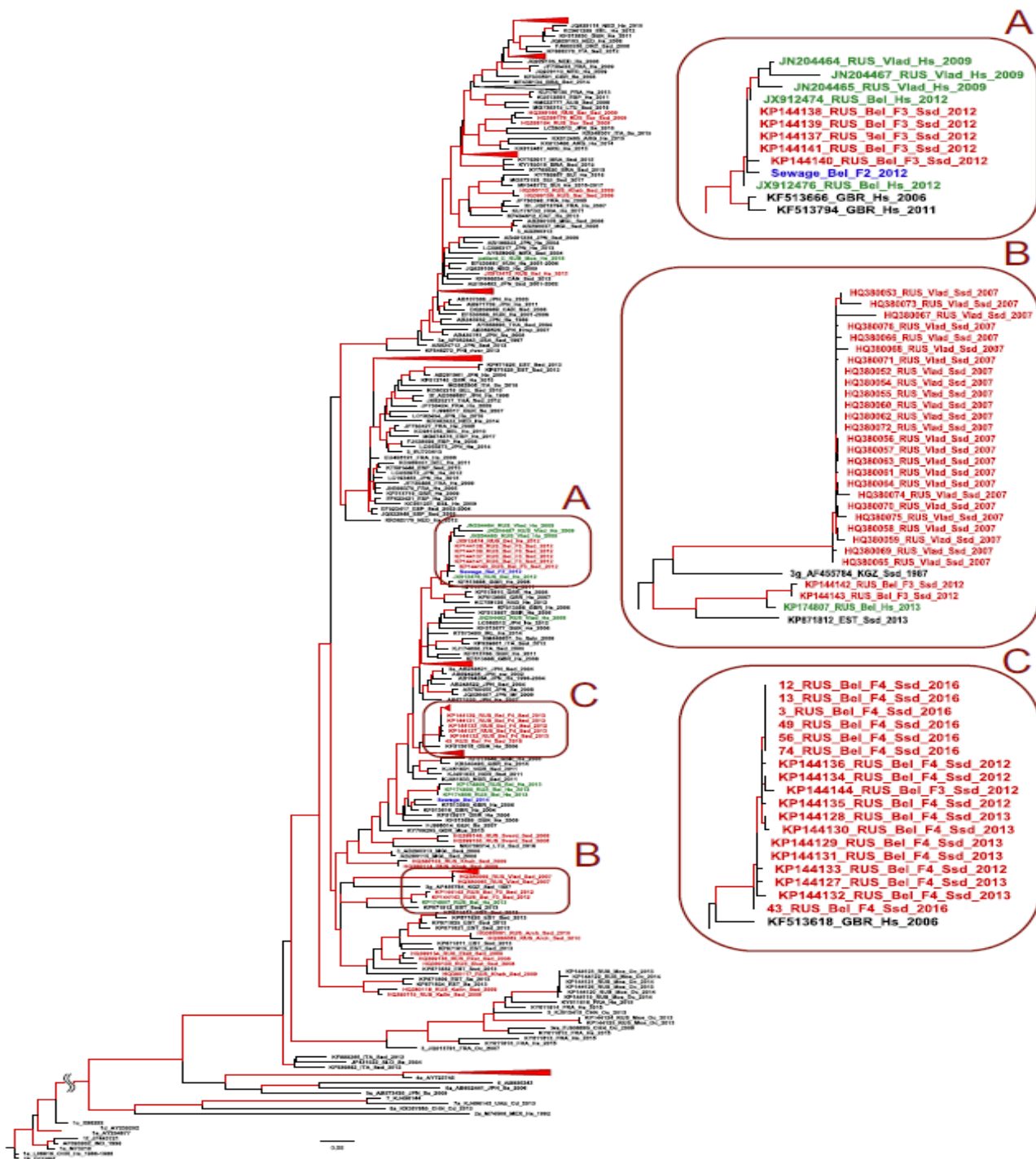
Результаты говорят о широком распространении ВГЕ на территориях свиноферм. Частота выявления анти-ВГЕ IgG среди работников свиноферм оказалась достоверно выше по сравнению с долей серопозитивных первичных доноров крови из этого же региона. Частота выявления анти-ВГЕ IgM и IgG среди работников свиноферм оказалась сходной с наблюдаемой среди пожилых лиц в Белгородской области, то есть пиковой для условно здорового населения. Эти данные подтверждают мнение о том, что работники свиноферм являются группой риска инфицирования ВГЕ. Считается, что не только непосредственно употребление в пищу продуктов свиноводства (непрожаренное мясо, печень и прочие субпродукты) и непосредственный контакт с животными, но в первую очередь контаминация вирусом объектов внешней среды приводит к высокому риску контакта человека с ВГЕ [Dalton H.R. et al., 2018]. В пользу этого служат сообщения последних лет о выявлении РНК ВГЕ в сточных водах [La Rosa G. et al., 2010; Marcantonio C. et al., 2018; Smith D. et al., 2016], а также свидетельство о длительном выявлении РНК ВГЕ в сточных водах после пищевой вспышки ВГЕ во Франции [Miura T. et al., 2016].

**Циркуляция ВГЕ среди поголовья домашних свиней в Белгородской области.** Результаты выявления РНК ВГЕ в образцах фекалий свиней в возрасте 2–4 месяцев приведены в табл. 4. Случаи ВГЕ-инфекции у свиней были выявлены на всех четырёх обследованных фермах. В среднем частота выявления РНК ВГЕ среди обследованного поголовья животных составила 20% (95% ДИ 16,8–23,6; 105/526).

**Таблица 4.** Частота выявления РНК ВГЕ в образцах фекалий домашних свиней

| № фермы | Число обследованных образцов фекалий | Число образцов, позитивных по РНК ВГЕ (% [95% ДИ]) |
|---------|--------------------------------------|----------------------------------------------------|
| 1       | 69                                   | 5 (7,25% [2,8-16,2%])                              |
| 2       | 107                                  | 4 (3,74% [1,2-9,5%])                               |
| 3       | 101                                  | 50 (49,50% [40,0-59,1%])                           |
| 4       | 249                                  | 46 (18,5% [14,1-23,8%])                            |

В 2 из 10 образцов сточных вод свиноферм также была выявлена РНК ВГЕ. На рисунке 5 представлены результаты филогенетического анализа последовательностей ВГЕ, выделенных от заболевших ГЕ жителей Белгородской области, от домашних свиней из этого региона и из сточных вод свиноферм, а также последовательностей ВГЕ от свиней из других регионов РФ. Все выделенные на территории РФ последовательности ВГЕ относились к генотипу 3 ВГЕ и, как правило, образовывали специфичные для каждого региона кластеры. Последовательности ВГЕ, выделенные на территории Белгородской области от заболевших людей, от свиней и из образцов сточных вод, группировались вместе, что указывает на наличие эпидемиологической связи между ними. В одном случае последовательности, выделенные из сточных вод, были идентичны последовательностям, полученным от заболевшего человека и от свиней на одной из обследованных свиноферм. В других случаях степень сходства между последовательностями, выделенными от животных, из сточных вод свиноферм и от заболевших людей, составляла 95–98%.



**Рисунок 5.** Филогенетическое дерево для частичной последовательности открытой рамки считывания 2 генома вируса гепатита Е (300 нуклеотидов, позиции 5996–6295, нумерация по прототипному изоляту Burma – M73218). Красным цветом выделены ветви с достоверностью >90%. Для каждого изолята на филогенетическом дереве указаны номер в базе данных GenBank, страна и год выделения, а также организм, из которого он выделен (**Ssd** – свинья домашняя (*Sus scrofa domestica*), **Hs** – человек (*Homo sapiens*), **Sewage** – образцы сточных вод). Российские последовательности выделены жирным шрифтом, последовательности из Белгородской области выделены жирным шрифтом и подчёркиванием. F3, F4 – номера обследованных ферм.

Также для оценки стабильности циркуляции ВГЕ на свинофермах был выполнен филогенетический анализ геномных последовательностей вируса, собранных на одной свиноферме (ферма 4) в

Белгородской области в 2016 году и в архивных образцах с этой же фермы 2012-2013 гг. Результаты анализа продемонстрировали стабильную циркуляцию одного варианта ВГЕ субгенотипа 3е на одной и той же ферме (F4 на рисунке 5С) на протяжении 5 лет, с 2012 по 2016 год (Рисунок 14).

## **Заключение**

### **Выводы**

1. Установлена неравномерность циркуляции ВГЕ на территории РФ. Показатели выявления анти-ВГЕ IgG среди условно здорового населения Белгородской области (16,4%) и среди первичных доноров крови в этом регионе (10,0%) в несколько раз превышают аналогичные показатели в других регионах РФ, что свидетельствует об интенсивной циркуляции ВГЕ в регионе, и позволяет отнести его к территориям со средней эндемичностью в отношении гепатита Е.
2. Анти-ВГЕ IgG достоверно чаще выявляются у лиц старше 60 лет по сравнению с более молодым населением (18,0% - 27,8% против 4,5%-10,0%), при этом частота выявления анти-ВГЕ IgM в старших возрастных группах остается на том же уровне, что и в остальных возрастных группах, что указывает на сохранение циркуляции ВГЕ среди пожилых лиц.
3. Впервые продемонстрировано, что анти-ВГЕ IgG могут сохраняться длительное время (до 30 лет), после перенесенной инфекции, однако значительная доля лиц может терять детектируемые анти-ВГЕ IgG в течение 20-30 лет.
4. Частота выявления анти-ВГЕ класса IgM среди первичных доноров крови составляет, в зависимости от региона, от 2,8% до 4,5%, что указывает на актуальность ВГЕ-инфекции для отечественной службы крови.
5. Впервые установлено длительное, до 5 лет, сохранение одного штамма ВГЕ на свиноферме, что свидетельствует о стабильности эпизоотического процесса.
6. Высокая степень генетического сходства последовательностей ВГЕ (95–98%), выделенных от заболевших людей, от свиней и из сточных вод, свидетельствуют о том, что причиной формирования эндемичного региона на территории Белгородской области послужило широкое распространение ВГЕ среди поголовья свиней (от 7,3% до 49,5% в зависимости от свинофермы) и контаминация вирусом сточных вод свиноферм.

### **Перспективы дальнейшей разработки темы и рекомендации**

В связи с широкой циркуляцией ВГЕ среди всех возрастных групп населения и повышенным риском инфицирования среди лиц старше 40 лет, обследование на маркеры ВГЕ-инфекции должно быть включено в систему дифференциальной диагностики заболеваний печени, при этом особое внимание следует уделять диагностике у пожилых лиц. Тестирование на маркеры гепатита Е должно быть включено в алгоритм обследования пожилых людей, поступающих в стационары с патологией желудочно-кишечного тракта. У лиц с иммуносупрессией возможна нестандартная картина лабораторных маркеров ВГЕ-инфекции. При проведении дифференциальной диагностики заболеваний печени у лиц с иммуносупрессией целесообразно проводить тестирование на РНК ВГЕ независимо от результатов серологических тестов. Кроме того, представляется целесообразным включить выявление

маркеров ВГЕ-инфекции (анти-ВГЕ IgM, РНК ВГЕ) в систему обследования доноров крови. Для контроля за ВГЕ-инфекцией необходимы мероприятия, направленные на снижение циркуляции ВГЕ среди поголовья свиней и обеззараживание сточных вод свиноферм. Необходимо разработать и внедрить систему дезинфекции сточных вод свиноферм для предотвращения контаминации ВГЕ окружающей среды.

#### **Список опубликованных работ по теме диссертации в изданиях, рекомендованных ВАК:**

1. Малинникова Е.Ю., Коптюг В.Г., Потемкин И.А. и др. Неврологические проявления гепатита Е // Инфекционные болезни. 2013. – Т.11. – № 1. – С. 16-20.
2. Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Потемкин И.А. и др. Эпидемиология вирусных гепатитов // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2013. – № 1. – С.78-85.
3. Потемкин И.А., Кюрегян К.К., Исаева О.В. и др. Распространенность маркеров гепатита Е среди доноров крови в регионах Российской Федерации // Гематология и трансфузиология. – 2013. – Т. 58. – № 4. – С. 26-28.
4. Малинникова Е.Ю., Потемкин И.А. Факторы риска обнаружения антител к вирусу гепатита Е среди жителей регионов с низким уровнем распространения этой инфекции // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. – С. 312.
5. Потемкин И.А., Малинникова Е.Ю., Дьяррассуба А.А. и др. Обнаружение антител к вирусу гепатита Е среди жителей белгородской области // Современные проблемы науки и образования. – 2014. – № 2. – С. 311.
6. Потемкин И.А., Лопатухина М.А., Гаджиева О.А. и др. Распространенность маркеров гепатита Е у детей // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2015. – № 2. – С. 38-46.
7. Дьяррассуба А., Потемкин И.А., Лопатухина М.А. и др. Стандартизация диагностики гепатита Е // Клиническая лабораторная диагностика. – 2016. – Т. 61. – № 5. – С. 299-303.
8. Кюрегян К.К., Потёмкин И.А., Лопатухина М.А. и др. Длительность сохранения анамнестических антител к вирусу гепатита Е // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63. – № 5. – С. 310-314.
9. Кюрегян К.К., Поляков А.Д., Потемкин И.А. и др. Белгородская область - эндемичный по гепатиту Е регион // Вопросы вирусологии. – 2019. – Т. 64. – № 6. – С. 274-280.

#### **Благодарности**

Хочу поблагодарить всех причастных к данной работе. Большое спасибо за помощь и сотрудничество коллегам, помогавшим на разных этапах выполнения работы словом и делом. В первую очередь коллегам из Белгорода, с которыми мы начинали исследование: **Щибрик Елене Валерьевне** и её сотрудникам, **Полякову Андрею Дмитриевичу**. Спасибо коллегам из Москвы, **Гаджиевой Ольге**

**Александровне** (НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н.Бурденко) и **Беляковой Вере Владимировне** (Станция переливания крови Департамента Здравоохранения г. Москвы). Огромная благодарность моим наставникам: д.м.н., профессору, член-корр. РАН **Михайлову Михаилу Ивановичу**, д.м.н. **Малиниковой Елене Юрьевне** за помощь в работе и личный пример. Искренняя благодарность моему научному руководителю **Карену Кареновичу Кюрегяну**, его отношение к делу и целеустремленность, надеюсь, передались и мне. Отдельное спасибо всем сотрудникам лаборатории вирусных гепатитов НИИВС им. И.И. Мечникова **Людмиле Юрьевне Ильченко**, **Ольге Владиславовне Исаевой**, **Анастасии Андреевне Карлсен**, **Вере Сергеевне Кичатовой** за вклад и помощь в исследовании, а также создание дружеской, рабочей атмосферы, а также **Алаторцевой Галине Ивановне**. Большое спасибо ученому секретарю ФГБУ «Научно-исследовательского института гриппа имени А.А. Смородинцева», к.б.н. **Ирине Викторовне Амосовой** за помощь при подготовке к защите данной работы.