

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



НАУЧНАЯ СТАТЬЯ

Маркёры вирусного гепатита E (*Hepviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*) у импортированных низших обезьян Старого Света

© Догадов Д.И.¹, Корзая Л.И.¹, Кюрегян К.К.^{2,3}, Карлсен А.А.^{2,3}, Михайлов М.И.^{2,3}

¹ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» Министерства науки и высшего образования (Минобрнауки) России, 354376, Сочи, Россия;

²ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

³ФГБОУ ДПО «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Минздрава России, 125993, Москва, Россия

Введение. Вирусный гепатит E – зооантропонозное заболевание, встречающиеся у людей и различных животных, в том числе у обезьян. Оно вызывается вирусом гепатита E (ВГЕ) (*Hepviridae*, *Orthohepevirus*: *Orthohepevirus A*), для которого на сегодняшний день описано 8 генотипов. Среди них штаммы генотипов 1 и 2 выделены от человека, 3 и 4 – от человека и животных, а 5–8 – только от животных. Основная опасность болезни заключается в том, что для вирусов 3, 4, 7 и 8 генотипических вариантов к настоящему времени доказана зоонозная передача человеку через заражённое мясо, кровь и молоко. Таким образом, возможно вовлечение обезьян в цепь передачи встречающегося у них ВГЕ.

Целью настоящей работы явилось изучение серологических и молекулярно-генетических маркёров вирусного гепатита E у низших обезьян (мартышковые, *Cercopithecoidea*), импортированных в Адлерский приматологический центр из различных регионов мира (Танзания, Вьетнам, Маврикий).

Материал и методы. Образцы фекалий ($n = 224$) и сывороток крови ($n = 395$) от макак яванских (*Macaca fascicularis*) и зеленых мартышек вервет (*Chlorocebus pygerythrus*) изучены с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) и полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ПЦР-ОТ).

Результаты и обсуждение. Полученные данные свидетельствуют о высокой частоте (51,8%) обнаружения антител (АТ) класса G к ВГЕ среди 5 групп макак яванских, импортированных из Вьетнама, с преобладанием высокорезактивных сывороток (84%). Обращает на себя внимание выявление АТ класса M у этих животных (10,4%) в одной из групп с большим количеством подобных сывороток (36,8%). Особую значимость представляет факт выделения в 2 группах макак яванских вирусной РНК (11,9 и 5,7%). Все выделенные от обезьян последовательности принадлежали к 4 генотипу ВГЕ.

Заключение. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что обезьяны (в частности, макаки яванские) могут служить естественным резервуаром ВГЕ генотипа 4 для человека. Это требует проведения в ряде ситуаций соответствующего комплекса противоэпидемических мероприятий.

Ключевые слова: вирус гепатита E; обезьяны; анти-ВГЕ (IgG, IgM); РНК ВГЕ

Для цитирования: Догадов Д.И., Корзая Л.И., Кюрегян К.К., Карлсен А.А., Михайлов М.И. Маркёры вирусного гепатита E (*Hepviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*) у импортированных низших обезьян Старого Света. *Вопросы вирусологии*. 2021; 66(3): 182-188. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-34>

Для корреспонденции: Догадов Дмитрий Игоревич, канд. биол. наук, старший научный сотрудник лаборатории инфекционных вирусов ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии» Министерства науки и высшего образования (Минобрнауки) России, 354376, Сочи, Россия. E-mail: dima_loko86@mail.ru

Участие авторов: Догадов Д.И. – написание текста, создание иллюстраций, обзор публикаций на тему статьи, статистическая обработка результатов; Корзая Л.И. – разработка дизайна исследования, написание и редактирование текста, обзор публикаций на тему статьи; Кюрегян К.К. – разработка дизайна исследования, обзор публикаций на тему статьи, редактирование текста; Карлсен А.А. – выполнение филогенетического и филодинамического анализа; Михайлов М.И. – разработка дизайна исследования, обзор публикаций на тему статьи.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации.

Поступила 03.12.2020
Принята к печати 27.04.2021

ORIGINAL ARTICLE

Markers of viral hepatitis E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*) in the imported Old World monkeys

Dmitriy I. Dogadov¹, Lidia I. Korzaya¹, Karen K. Kyuregyan^{2,3}, Anastasiya A. Karlsen^{2,3}, Mikhail I. Mikhailov^{2,3}

¹FSBRI «Research Institute of Medical Primatology» of the Ministry of Education and Science of Russia, 354376, Sochi, Russia;

²FSBRI «I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera», 105064, Moscow, Russia;

³FSBEI FPE «Russian Medical Academy of Continuous Professional Education» of the Ministry of Health of Russia, 125993, Moscow, Russia

Introduction. Viral hepatitis E is a zoonoanthropotic disease that occurs in humans and various animals, including monkeys. It is caused by hepatitis E virus (HEV) (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*: *Orthohepevirus A*), for which 8 genotypes have been described to date. Among them, strains of genotypes 1 and 2 have been isolated from humans, strains of genotypes 3 and 4 from humans and animals, and strains of genotypes 5–8 from animals only. The main threat of the disease is associated with the documented zoonotic transmission of HEV genotypes 3, 4, 7, and 8, to humans through infected meat, blood and milk. Thus, monkeys could be involved in the transmission of HEV.

The **aim** of this work was to study serological and molecular genetic markers of HEV infection in strepsirrhines (Old World monkeys, *Cercopithecoidea*), imported to the Adler Primate Center from various regions of the world (Tanzania, Vietnam, Mauritius).

Material and methods. Fecal ($n = 224$) and blood serum samples ($n = 395$) from cynomolgus (*Macaca fascicularis*) and vervet monkeys (*Chlorocebus pygerythrus*) were examined by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results and discussion. The data obtained show the high detection rate (51.8%) of IgG antibodies to HEV among 5 groups of cynomolgus monkeys imported from Vietnam, with a predominance of highly reactive sera (84%). High detection rate of IgM antibodies in these animals (10.4%) was observed, with the large number of IgM-reactive sera in one particular group of animals (36.8%). The fact of detection of HEV RNA in two groups of cynomolgus monkeys (11.9% and 5.7%) is of particular importance. All HEV sequences of isolated from monkeys belonged to genotype 4.

Conclusion. Our data indicate that monkeys (in particular, cynomolgus monkeys) can serve as a natural reservoir of HEV genotype 4 for humans. This requires an appropriate set of anti-epidemic measures in a number of situations.

Key words: hepatitis E virus (HEV); monkey; anti-HEV (IgG, IgM); HEV RNA

For citation: Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Mikhailov M.I. Markers of viral hepatitis E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*) in the imported Old World monkeys. *Problems of Virology (Voprosy Virusologii)*. 2021; 66(3): 182-188 (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-34>

For correspondence: Dmitriy I. Dogadov, Ph.D. (Biol.), Researcher of the Laboratory of Infection Virology, FSBRI «Research Institute of Medical Primatology» of the Ministry of Education and Science of Russia, 354376, Sochi, Russia. E-mail: dima_loko86@mail.ru

Information about the authors:

Dogadov D.I., <https://orcid.org/0000-0003-1596-0509>

Korzaya L.I., <https://orcid.org/0000-0003-2259-5773>

Kyuregyan K.K., <https://orcid.org/0000-0002-3599-117X>

Karlsen A.A., <https://orcid.org/0000-0002-6013-7768>

Mikhailov M.I., <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Contribution: Dogadov D.I. – writing of the text, making the figures, reviewing of publications, statistical analysis of the results; Korzaya L.I. – developing the research design, writing and editing of the text, reviewing of publications; Kyuregyan K.K. – developing the research design, reviewing publications, editing of the text; Karlsen A.A. – phylogenetic and phylodynamic analysis; Mikhailov M.I. – developing the research design, reviewing publications.

Acknowledgement. The study had no sponsorship.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

The authors confirm compliance with the institutional and national standards for the use of laboratory animals in accordance with «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). The study protocol was approved by the Ethics Committee of the organization.

Received 3 December 2020
Accepted 27 April 2021

Введение

Вирусный гепатит (ВГ) Е – острое высококонтагиозное заболевание, широко распространённое во многих тропических и субтропических странах, где регистрируется как в виде эпидемий, так и спорадически. Особенность его заключается в том, что среди всех наиболее известных ВГ (А, В, С, D, Е, F и G) только

гепатит Е является зоонозным и вызывает высокую смертность среди беременных женщин [1–4].

Возбудитель инфекции – ВГЕ относится к семейству *Hepeviridae*, роду *Orthohepevirus*, который, в свою очередь, включает 4 вида: инфицирующих птиц (*Aves*) (*Orthohepevirus B*); грызунов (*Rodentia*), землеройкообразных (*Soricomorpha*) и плотояд-

ных (*Carnivore*) (*Orthohepevirus C*); летучих мышей (*Microchiroptera*) (*Orthohepevirus D*), а также вид *Orthohepevirus A*. Для последнего описано 8 генотипов, представители которых инфицируют человека (ВГЕ-1, -2, -3, -4 и 7) [5, 6]; обезьян (*Haplorhini*) [7], кроликов (*Orientalis*), мангустов (*Herpestes*) и оленей (*Cervidae*) (ВГЕ-3); свиней (*Suidae*) (ВГЕ-3 и 4); кабанов (*Sus*) (ВГЕ-3, -4, -5 и 6); яков (*Bos*) (ВГЕ-4) и верблюдов (*Camelus*) (ВГЕ-7 и 8) [5, 6, 8]. Вирион возбудителя – сферическая необолочечная частица размером ~27–34 нм. Вирусный геном представлен одноцепочечной (+)РНК длиной ~7,2 т.п.н. РНК состоит из коротких 5'- и 3'-нетранслируемых участков (untranslated regions, UTRs), образующих «шпилечные» структуры из ~58–68 п.н. соответственно, а также 3 частично перекрывающихся открытых рамок считывания (ОРС) [6, 9, 10].

Многие виды обезьян рода макак (макак резусы (*Macaca rhesus*; *Macaca mulatta*)); яванские (*Macaca fascicularis*), индийские (*Macaca radiata*), тайванские (*Macaca cyclopis*) и японские (*Macaca fuscata*) макаки; макаки лапундеры (*Macaca nemestrina*) чувствительны к ВГЕ [11–16]. Однако несмотря на то, что у этих животных обнаружены антитела к возбудителю, к настоящему времени имеются только 2 работы, посвящённые генотипированию этого вируса у обезьян. Первая из них – публикация Н. Yamamoto с соавт., в которой представлены данные о длительной персистенции ВГЕ-инфекции у японских макак с выделением патогена. Последовательность изолированного штамма была зарегистрирована в GenBank (№ JQ026407), а её филогенетический анализ показал принадлежность к 3 генотипу ВГЕ [7]. В другой работе F. Yang с соавт. описано выделение вируса 4 генотипа от 11 макак резусов (GenBank № LC428039–49) [17]. На сегодняшний день для штаммов с генотипическими вариантами 3, 4, 7 и 8 доказана зоонозная передача человеку через заражённое мясо, кровь и молоко. Поэтому обезьяны, поступающие из-за рубежа (особенно из мест естественного обитания), несмотря на удовлетворительный соматический статус, могут представлять опасность как для окружающих животных, так и для контактирующих с ними людей.

Кроме того, импортированные обезьяны могут быть подвержены вирусным заболеваниям, распространённым среди рождённых в питомнике животных. В связи с этим определение специфических маркёров вирусных инфекций у таких особей является важным и необходимым этапом в период их содержания на карантине [14, 16].

Целью настоящей работы явилось изучение серологических и молекулярно-генетических маркёров ВГЕ у низших обезьян Старого Света (мартышковые, *Cercopithecoidea*), импортированных из различных регионов мира в Адлерский приматологический центр.

Материал и методы

Исследование проводилось на базе лаборатории инфекционных вирусов ФГБНУ «НИИ медицинской приматологии» Минобрнауки России (НИИ МП),

а также лаборатории вирусных гепатитов ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова». В работе использованы сыворотки крови и фекальные образцы, собранные в период 2014–2018 гг. Всего исследовано 224 фекальных образца и 305 сывороток крови макак яванских, доставленных в питомник НИИ МП из вьетнамского питомника в 2015–2018 гг. Также подвергнуто исследованию 40 сывороток крови зеленых мартышек вервет (*Chlorocebus pygerythrus*), поступивших из мест естественного обитания (Таңзания) в 2014 г., и 50 аналогичных сывороток макак яванских статуса SPF (specified pathogen free – свободные от специфицированной патогенной флоры) из Маврикия (2016 г.). Фекальные образцы собирали на 10, а сыворотки крови – на 23 сут после прибытия животных.

Антитела (АТ) к ВГЕ (анти-ВГЕ) определяли посредством иммуноферментного анализа (ИФА) с помощью коммерческих тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M» (НПО «Диагностические системы», Россия). Они неоднократно испытывались в сравнительном аспекте при изучении иммуноглобулинов обезьян и признаны наиболее подходящими для выявления у них анти-ВГЕ АТ. Кроме того, результаты определения показателя оптической плотности (ОП) при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀) биоматериала макак яванских SPF свидетельствуют о том, что различие значения критической ОП (ОП_{крит.}) для человека и представителей этого вида незначительно и количество положительных образцов достоверно. Данные ИФА учитывали на спектрофотометре ImmunoChem-2100 («Интермедика Сервис», США); полученные величины выражали в единицах ОП₄₅₀.

Выявление РНК ВГЕ проводили методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР) с вырожденными праймерами к участку открытой рамки считывания 2 (ОРС2) вируса. Использовали следующие олигонуклеотиды: внешняя пара праймеров – 5'-AAU TAT GCM CAG TAC CGG GTT-G-3' (прямой) и 5'-CCC TTA TCC TGC TGA GCA TTC TC-3' (обратный); внутренняя пара – 5'-GTU ATG YTY TGC ATA CAT GGC T-3' (прямой) и 5'-AGC CGA CGA AAT YAA TTC TGT C-3' (обратный).

Первый раунд ПЦР выполняли совмещённо с ОТ, условия реакции были следующими: 42 °С – 1 ч, далее 5 мин – 94 °С (денатурация и инактивация фермента обратной транскриптазы), затем 35 циклов: 94 °С – 30 с, 45 °С – 30 с, 72 °С – 45 с, финальная элонгация 72 °С – 7 мин. Условия для второго раунда ПЦР – 35 циклов: 94 °С – 30 с, 45 °С – 30 с, 72 °С – 45 с, финальная элонгация 72 °С – 7 мин. Полученные ПЦР-продукты, соответствующие ВГЕ, определяли в 1,5% агарозном геле в Трис-боратном электродном буфере (ТВЕ). Величина продукта амплификации для ВГЕ составляла 350 п.н.

Для подтверждения специфичности детекции РНК возбудителя и последующего филогенетического анализа выявленных его вариантов осуществляли прямое секвенирование амплифицированных фрагментов

вирусного генома. Продукт ПЦР размером 350 п.н. вырезали из геля и выделяли из агарозы при помощи набора QIA Quick Gel Extraction kit («Qiagen», Германия). Определение нуклеотидной последовательности фрагмента проводили на автоматическом секвенаторе 3500 Genetic Analyzer («Applied Biosystems», США) с использованием набора «Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit» («ThermoFisher Scientific», США). Выравнивание всех нуклеотидных последовательностей ВГЕ выполняли с помощью программного обеспечения MEGA v7.0.18.

Полученные в результате экспериментов данные подвергали статистической обработке по общепринятым методикам в программе Microsoft Excel 2010. Обработка включала: определение средних показателей величин; вычисление среднего квадратического отклонения; расчёт 95% доверительного интервала (ДИ); выявление достоверности различий средних значений показателей в сравниваемых группах с при-

менением точного теста χ^2 (различия оценивали как достоверные при вероятности 95% – $p \leq 0,05$).

Авторы подтверждают соблюдение институциональных и национальных стандартов по использованию лабораторных животных в соответствии с «Consensus Author Guidelines for Animal Use» (IAVES, 23 July 2010). Протокол исследования одобрен Этическим комитетом организации (Протокол № 135 от 25.05.2014).

Результаты

В таблице в сравнительном аспекте представлены суммарные данные, полученные при обследовании содержащихся в карантине обезьян из различных регионов (Танзания, Маврикий, Вьетнам) на наличие маркёров ВГЕ-инфекции. Всего проверено 395 сывороток крови и 224 фекальных образца.

Видно, что анти-ВГЕ класса G обнаружены у 40% животных, тогда как маркёры «свежей» (анти-

Частота обнаружения маркёров вируса гепатита E у обезьян, импортёванных в питомник ФГБНУ «Научно-исследовательский институт медицинской приматологии»

Detection of hepatitis E virus markers in monkeys imported into the apery of the FSBRI «Research Institute of Medical Primatology»

Вид и происхождение обезьян Monkeys' species and origin	Поступление обезьян Data of monkeys' arrival	Возраст (диапазон, $M \pm m$) Age (range, $M \pm m$)	Маркёры ВГЕ HEV markers				
			Антитела IgG IgG antibodies		Антитела IgM IgM antibodies		PHK ВГЕ* HEV RNA*
			IgG*	ОП ₄₅₀ ** OD ₄₅₀ **	IgM*	ОП ₄₅₀ ** OD ₄₅₀ **	
Макаки яванские Супомолгус обезьяны (<i>Macaca fascicularis</i>) (Вьетнам) (Vietnam)	08.11.2015	4,1–8,8 (6,0 ± 0,1)	23/40 (57,5 ± 7,8)	1,008 ± 0,086	3/40 (7,5 ± 4,1)	0,521 ± 0,101	0/9 (0)
	05.08.2016	3,6–6,6 (4,9 ± 0,1)	0/45 (0)	н.и. n.i.	0/45 (0)	н.и. n.i.	0/10 (0)
	22.04.2017	3,6–8,3 (6,1 ± 0,2)	29/44 (65,9 ± 7,1)	1,384 ± 0,073	5/44 (11,3 ± 4,8)	0,275 ± 0,056	0/10 (0)
	11.05.2017	4,0–8,3 (5,6 ± 0,2)	25/44 (56,8 ± 7,5)	1,517 ± 0,072	19/44 (43,2 ± 7,5)	0,906 ± 0,154	2/35 (5,7 ± 3,9)
	04.08.2017	0,7–2,6 (1,7 ± 0,1)	н.и. n.i.	н.и. n.i.	н.и. n.i.	н.и. n.i.	5/42 (11,9 ± 4,9)
	14.02.2018	1,7–2,5 (1,9 ± 0,1)	63/92 (68,5 ± 4,8)	1,393 ± 0,033	9/92 (9,8 ± 3,1)	0,462 ± 0,091	0/97 (0)
	09.06.2018	3,2–4,9 (3,9 ± 0,1)	18/40 (45,0 ± 7,9)	1,515 ± 0,093	4/40 (10,0 ± 4,7)	0,529 ± 0,156	0/10 (0)
Макаки яванские SPF Супомолгус обезьяны SPF (<i>Macaca fascicularis</i>) (Маврикий) (Mauritius)	17.09.2016	4,8–9,6 (8,1 ± 0,2)	0/50 (0)	0	0/50 (0)	0	н.и. n.i.
Зеленые маргышки вервет Vervet monkeys (<i>Chlorocebus pygerythrus</i>) (Танзания) (Tanzania)	01.06.2014	3–5 –	0/40 (0)	0	0/40 (0)	0	н.и. n.i.
Всего Total			158/395 (40,0 ± 2,5)	1,377 ± 0,030	40/395 (10,1 ± 1,5)	0,690 ± 0,089	7/224 (3,1 ± 1,2)

Примечание. * – число позитивных/число обследованных особей (% ± m); ** – среднее значение оптической плотности при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀) ± среднее арифметическое среднеквадратического отклонения; ВГЕ – вирус гепатита E; SPF – свободные от специфицированной патогенной флоры; н.и. – не исследованные.

Note. * number of positive/number of examined individuals (% ± m); ** mean value of optical density at 450 nm (OD₄₅₀) ± arithmetic mean of standard deviation; HEV, hepatitis E virus; SPF, specified pathogen free; n.i. not investigated.

ВГЕ IgM) и острой (РНК вируса) инфекции определялись достоверно ($p \leq 0,05$) реже (10,1 и 3,1% соответственно). Следует отметить, что индикаторы ВГЕ выявлены только среди импортированных из Вьетнама макак яванских, которые поступали в питомник отдельными партиями с 2015 по 2018 г. Всего обследовано 7 партий особой данного вида; серологические признаки ВГЕ-инфекции выявлены в 5 из 7 обследуемых групп. Анти-ВГЕ IgG обнаруживались с частотой от 45 до 68,5%, а средняя арифметическая величины реактивности положительных образцов была равной 1,377 ОП₄₅₀. Доля высокореактивных сывороток ($>1,000$ ОП₄₅₀) варьировала от 61 до 90% и в целом составила 84%.

Частота выявления анти-ВГЕ IgM была в 4 раза (10,1%) меньше ($p \leq 0,05$) и также варьировала в группах от 7,5 до 43,2%. Высокреактивные сыворотки (в количестве 36,8%) обнаружены только у 1 партии животных, поступивших 11.05.2017. В остальных группах подобные сыворотки отсутствовали.

Особого внимания заслуживает факт выделения вирусной РНК, которая детектировалась в фекальных образцах 7 (3,1%) из 224 обследованных макак яванских (рисунок). Позитивные особи присутствовали в 2 группах обезьян, привезённых 11.05.2017 и 04.08.2017. В группе макак яванских, доставленных 11.05.2017, средний возраст составил 5,6 года (4,0–8,3). Анти-ВГЕ IgG имелись у 25 (56,8%), а анти-ВГЕ IgM – у 19 (43,2%) из 44 животных. РНК ВГЕ в этой группе детектирована у 2 (5,7%) из 35 особей. Средний возраст обезьян, импортированных 04.08.2017, был равен 1,7 года (0,7–2,6), а РНК вируса выявлена у 5 (11,9%) из 42 обследованных. Отсутствие проб сывороток крови в этой группе не позволило провести исследование на наличие серологических маркёров ВГЕ-инфекции.

ВГЕ-позитивные животные не имели каких-либо клинических симптомов заболевания и имели удовлетворительный общесоматический статус. Показатели общего анализа крови также были в пределах нормы.

На рисунке в качестве примера представлена электрофореграмма с результатами выявления РНК возбудителя у 3 макак яванских с номерами 44196 (образец № 2), 44217 (образец № 8) и 44226 (образец № 10).

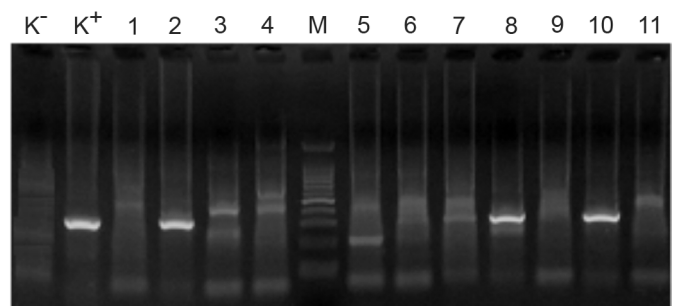
Специфичность детекции РНК ВГЕ всех 7 положительных образцов подтверждена прямым секвенированием амплифицированных фрагментов ORC1 и ORC2 величиной 711 и 273 п.н. соответственно. Поиск гомологов заданной последовательности нуклеотидов BLAST (basic local alignment search tool) в базе данных NSBI (National Center for Biotechnology Information) подтвердил принадлежность данных образцов к участкам генома ВГЕ ORC1 и ORC2. Филогенетический анализ нуклеотидных фрагментов показал, что 7 последовательностей обнаруженных у обезьян ВГЕ принадлежат к 4 генотипу. Все последовательности вируса, выделенные от макак яванских, были депонированы в GenBank (№ MK604188–94 для ORC1 и № MG387126–28, MG590378–81 для ORC2).

Обсуждение

В настоящей работе нами охарактеризовано наличие серологических и молекулярно-генетических маркёров ВГЕ у обезьян, импортированных из Вьетнама. Полученные результаты свидетельствуют о высокой частоте (51,8%) обнаружения АТ класса G к ВГЕ-инфекции среди 5 обследованных групп животных. Вместе с тем IgM-антитела выявлялись достоверно ($p \leq 0,05$) реже – у 10,1% особей. Это подтверждает литературные данные, согласно которым анти-ВГЕ обнаруживались только у представителей рода макак [7, 17], а также результаты серологического мониторинга возбудителя среди обезьян Адлерского питомника, регулярно проводимого с 1999 г.; до настоящего времени автохтонных ВГЕ-изолятов не выявлено [14, 18].

При изучении молекулярно-генетических маркёров ВГЕ-инфекции у 7 поступивших из Вьетнама макак яванских (3,1%) нами обнаружена РНК вируса, а все последовательности принадлежали к 4 генотипу. Согласно имеющейся информации это первый зарегистрированный случай инфекции, вызванной ВГЕ-4, у особой рассматриваемого вида. Кроме того, все автохтонные последовательности вируса из России принадлежат к генотипу 3; единственный обнаруженный в РФ штамм ВГЕ-4 был импортирован с территории острова Корсика (Франция) в 2012 г. [19].

Ранее нами также проведён дополнительный филодинамический анализ, в соответствии с которым средний возраст вирусных последовательностей, выделенных от макак яванских, составил 5,2 года (ДИ 3,47–10,15). Это заставляет предположить, что



Электрофореграмма с результатами выявления РНК вируса гепатита E у обезьян, импортированных из Вьетнама.

K⁻ – контрольный отрицательный образец;

K⁺ – контрольный положительный образец;

M – маркёры молекулярных масс (сверху вниз: 1500, 1000, 900, 800, 700, 500, 400, 300, 200, 100 пар нуклеотидов);

1–11 – исследуемые образцы.

Примечание. Положительные образцы от яванских макак: № 2 (44196), № 8 (44217) и № 10 (44226).

Electrophoregram with the results of hepatitis E virus RNA detection in monkeys imported from Vietnam.

K⁻, negative control sample;

K⁺, positive control sample;

M, molecular weight markers (from top to bottom: 1500, 1000, 900, 800, 700, 500, 400, 300, 200, 100 base pairs); 1–11, tested samples.

Note. Positive samples from cynomolgus monkeys: # 2 (44196), # 8 (44217), and # 10 (44226).

ВГЕ-инфекция не явилась результатом распространения от одного источника инфекции, а, вероятнее всего, стабильно циркулирует среди представителей данного вида [20, 21].

Заключение

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что обезьяны (в частности, макаки яванские) могут служить естественным резервуаром ВГЕ генотипа 4. Указанный факт требует присутствия эпидемиологической настороженности и проведения в ряде ситуаций (в том числе при содержании этих животных, импортированных из естественных мест обитания, в условиях питомника) соответствующего комплекса противоэпидемических мероприятий.

ЛИТЕРАТУРА

- Bradley D.W. Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br. Med. Bull.* 1990; 46(2): 442–61. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072409>
- Matsuda H., Okada K., Takahashi K., Mishiro S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* 2003; 188(6): 944. <https://doi.org/10.1086/378074>
- Spina A., Lenglet A., Beversluis D., de Jong M., Vernier L., Spencer C., et al. A large outbreak of Hepatitis E virus genotype 1 infection in an urban setting in Chad likely linked to household level transmission factors, 2016–2017. *PLoS One.* 2017; 12(11): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188240>
- Wang Y., Ling R., Erker J.C., Zhang H., Li H., Desai S., et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(1): 169–77. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-1-169>
- Smith D.B., Simmonds P., Izopet J., Oliveira-Filho E.F., Ulrich R.G., Johne R., et al. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(3): 537–42. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000393>
- Nan Y., Zhang Y.J. Molecular biology and infection of Hepatitis E virus. *Front. Microbiol.* 2016; (7): 1419. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01419>
- Yamamoto H., Suzuki J., Matsuda A., Ishida T., Ami Y., Suzaki Y., et al. Hepatitis E Virus Outbreak in Monkey Facility, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(12): 2032–4. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120884>
- Sridhar S., Teng J.L.L., Chiu T.H., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Hepatitis E virus genotypes and evolution: emergence of camel hepatitis E variants. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(4): 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms18040869>
- Mushahwar I.K. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J. Med. Virol.* 2008; 80(4): 646–58. <https://doi.org/10.1002/jmv.21116>
- Guu T.S.Y., Liub Z., Ye Q., Mata D.A., Li K., Yin C., et al. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106(31): 12992–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904848106>
- Hirano M., Ding X., Li T.C., Takeda N., Kawabata H., Koizumi N., et al. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol. Res.* 2003; 27(1): 1–5. <https://doi.org/10.3201/eid1808.120070>
- Purcell R.H., Emerson S.U. Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J.* 2001; 42(2): 161–77. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031815>
- Yamamoto H., Li T.C., Koshimoto C., Ito K., Kita M., Miyashita N., et al. Serological evidence for hepatitis E virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp. Anim.* 2008; 57(4): 367–76. <https://doi.org/10.1538/expanim.57.367>
- Корзая Л.И., Кебурия В.В., Догадов Д.И., Лапин Б.А., Кюрегян К.К., Михайлов М.И. Маркёры гепатита Е у населения Большого Сочи и обезьян Адлерского приматологического центра. *Вопросы вирусологии.* 2016; 61(4): 176–80. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-176-180>
- Huang F., Yu W., Hua X., Jing S., Zeng W., He Z. Seroepidemiology and molecular characterization of Hepatitis E virus in Macaca Mulatta from a village in Yunnan, China, where infection with this virus is endemic. *Hepat. Mon.* 2011; 11(9): 745–9. <https://doi.org/10.5812/kowsar.1735143X.730>
- Корзая Л.И., Лапин Б.А., Кебурия В.В., Лазарева И.Я. Частота выявления антител к вирусу гепатита Е у обслуживающего персонала и у макак Адлерского питомника обезьян. *Вопросы вирусологии.* 2007; 52(1): 36–40.
- Yang F., Duan S., Guo Y., Li Y., Yoshizaki S., Takeda N., et al. Current status of hepatitis E virus infection at a rhesus monkey farm in China. *Vet. Microbiol.* 2019; 230: 244–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.021>
- Корзая Л.И., Кебурия В.В., Гончаренко А.М., Догадов Д.И., Лапин Б.А. Маркёры вирусных инфекций у лабораторных приматов. В кн.: *Материалы второй международной научной конференции «Фундаментальные и прикладные аспекты медицины приматологии».* Сочи; 2011: 79–88.
- Михайлов М.И., Малинникова Е.Ю., Кюрегян К.К., Исаева О.В. Случай завоза вируса гепатита Е 4 генотипа в Россию. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2016; 93(3): 64–9. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-3-64-69>
- Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Kichatova V.S., Potemkin I.A., et al. Natural infection of captive cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus genotype 4. *Arch. Virol.* 2019; 164(10): 2515–8. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04337-3>
- Михайлов М.И., Кюрегян К.К., Малинникова Е.Ю., Исаева О.В., Карлсен А.А., Потёмкин И.А., и др. Вирусные гепатиты: прогнозы и проблемы. *Эпидемиология и инфекционные болезни. Актуальные вопросы.* 2019; 9(1): 71–80. <https://doi.org/10.18565/epidem.2019.9.1.71-80>

REFERENCES

- Bradley D.W. Enterically-transmitted non-A, non-B hepatitis. *Br. Med. Bull.* 1990; 46(2): 442–61. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.bmb.a072409>
- Matsuda H., Okada K., Takahashi K., Mishiro S. Severe hepatitis E virus infection after ingestion of uncooked liver from a wild boar. *J. Infect. Dis.* 2003; 188(6): 944. <https://doi.org/10.1086/378074>
- Spina A., Lenglet A., Beversluis D., de Jong M., Vernier L., Spencer C., et al. A large outbreak of Hepatitis E virus genotype 1 infection in an urban setting in Chad likely linked to household level transmission factors, 2016–2017. *PLoS One.* 2017; 12(11): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0188240>
- Wang Y., Ling R., Erker J.C., Zhang H., Li H., Desai S., et al. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *J. Gen. Virol.* 1999; 80(1): 169–77. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-80-1-169>
- Smith D.B., Simmonds P., Izopet J., Oliveira-Filho E.F., Ulrich R.G., Johne R., et al. Proposed reference sequences for hepatitis E virus subtypes. *J. Gen. Virol.* 2016; 97(3): 537–42. <https://doi.org/10.1099/jgv.0.000393>
- Nan Y., Zhang Y.J. Molecular biology and infection of Hepatitis E virus. *Front. Microbiol.* 2016; (7): 1419. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01419>
- Yamamoto H., Suzuki J., Matsuda A., Ishida T., Ami Y., Suzaki Y., et al. Hepatitis E Virus Outbreak in Monkey Facility, Japan. *Emerg. Infect. Dis.* 2012; 18(12): 2032–4. <https://doi.org/10.3201/eid1812.120884>
- Sridhar S., Teng J.L.L., Chiu T.H., Lau S.K.P., Woo P.C.Y. Hepatitis E virus genotypes and evolution: emergence of camel hepatitis E variants. *Int. J. Mol. Sci.* 2017; 18(4): 1–19. <https://doi.org/10.3390/ijms18040869>
- Mushahwar I.K. Hepatitis E virus: molecular virology, clinical features, diagnosis, transmission, epidemiology, and prevention. *J. Med. Virol.* 2008; 80(4): 646–58. <https://doi.org/10.1002/jmv.21116>
- Guu T.S.Y., Liub Z., Ye Q., Mata D.A., Li K., Yin C., et al. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009; 106(31): 12992–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904848106>
- Hirano M., Ding X., Li T.C., Takeda N., Kawabata H., Koizumi N., et al. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol. Res.* 2003; 27(1): 1–5. <https://doi.org/10.3201/eid1808.120070>
- Purcell R.H., Emerson S.U. Animal models of hepatitis A and E. *ILAR J.* 2001; 42(2): 161–77. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a031815>

13. Yamamoto H., Li T.C., Koshimoto C., Ito K., Kita M., Miyashita N., et al. Serological evidence for Hepatitis E virus infection in laboratory monkeys and pigs in animal facilities in Japan. *Exp. Anim.* 2008; 57(4): 367–76. <https://doi.org/10.1538/expanim.57.367>
14. Korzaya L.I., Keburiya V.V., Dogadov D.I., Lapin B.A., Kyuregyan K.K., Mikhailov M.I. Markers of hepatitis E among the population of the Greater Sochi and in monkeys of the Adler primate center [Markery gepatita E u naseleniya Bol'shogo Sochi i obez'yan Adlerskogo primatologicheskogo tsentra]. *Voprosy virusologii.* 2016; 61(4): 176–80. <https://doi.org/10.18821/0507-4088-2016-61-4-176-180> (in Russian)
15. Huang F., Yu W., Hua X., Jing S., Zeng W., He Z. Seroepidemiology and molecular characterization of Hepatitis E virus in Macaca Mulatta from a village in Yunnan, China, where infection with this virus is endemic. *Hepat. Mon.* 2011; 11(9): 745–9. <https://doi.org/10.5812/kowsar.1735143X.730>
16. Korzaya L.I., Lapin B.A., Keburiya V.V., Lazareva I.Ya. The detection rate of hepatitis E virus antibodies in the personnel serving the macaques of the Adler apery [Chastota vyyavleniya antitel k virusu gepatita E u obsluzhivayushchego personala i u makak Adlerskogo pitomnika obez'yan]. *Voprosy virusologii.* 2007; 52(1): 36–40. (in Russian)
17. Yang F., Duan S., Guo Y., Li Y., Yoshizaki S., Takeda N., et al. Current status of hepatitis E virus infection at a rhesus monkey farm in China. *Vet. Microbiol.* 2019; 230: 244–8. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2019.01.021>
18. Korzaya L.I., Keburiya V.V., Goncharenko A.M., Dogadov D.I., Lapin B.A. Markers of laboratory primates' viral infections. In: *Materials of the 2nd international scientific conference «Fundamental and applied aspects of Medical Primatology» [Markery virusnykh infektsiy u laboratornykh primatov. V kn.: Materialy vtoroy mezhdunarodnoy nauchnoy konferentsii «Fundamental'nye i prikladnye aspekty meditsinskoy primatologii»]*. Sochi; 2011: 79–88. (in Russian)
19. Mikhailov M.I., Malinnikova E.Yu., Kyuregyan K.K., Isaeva O.V. A case of import of genotype 4 hepatitis E virus into Russia [Sluchay zavoza virusa gepatita E 4 genotipa v Rossiyu]. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2016; 93(3): 64–9. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2016-3-64-69> (in Russian)
20. Dogadov D.I., Korzaya L.I., Kyuregyan K.K., Karlsen A.A., Kichatova V.S., Potemkin I.A., et al. Natural infection of captive cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with hepatitis E virus genotype 4. *Arch. Virol.* 2019; 164(10): 2515–8. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04337-3>
21. Mikhailov M.I., Kyuregyan K.K., Malinnikova E.Yu., Isaeva O.V., Karlsen A.A., Potemkin I.A., et al. Viral hepatitis: Prognosis and Problems [Virusnye gepatity: prognozy i problemy]. *Epidemiologiya i infektsionnye bolezni. Aktual'nye voprosy.* 2019; 9(1): 71–80. <https://doi.org/10.18565/epidem.2019.9.1.71-80> (in Russian)