

РЕСПУБЛИКАНСКОЕ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКОЕ ДОЧЕРНЕЕ  
УНИТАРНОЕ ПРЕДПРИЯТИЕ «ИНСТИТУТ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ  
ВЕТЕРИНАРИИ ИМЕНИ С.Н.ВЫШЕЛЕССКОГО»

УДК 616.36–002–02–07–092.9:578.891

**АРАБЕЙ**

**Анастасия Анатольевна**

**ЦИРКУЛЯЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ, ПАТОГЕНЕЗ И ДИАГНОСТИКА  
ВИРУСНОГО ГЕПАТИТА Е У КРОЛИКОВ**

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

по специальности 06.02.02 – ветеринарная микробиология, вирусология,  
эпизоотология, микология с микотоксикологией и иммунология

Минск, 2019

Научная работа выполнена в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет»

**Научный руководитель:** **Жаворонок Сергей Владимирович**, доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней УО «Белорусский государственный медицинский университет»;

**Официальные оппоненты:** **Самойлова Тамара Ивановна**, доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории биобезопасности с коллекцией патогенных микроорганизмов ГУ «РНПЦ эпидемиологии и микробиологии»;

**Руденкова Татьяна Владимировна**, кандидат биологических наук, ведущий научный сотрудник Научно-исследовательской лаборатории ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»;

**Оппонирующая организация:** УО «Гродненский государственный аграрный университет».

Защита диссертации состоится «04» июня 2019 г. в «14<sup>00</sup>» часов на заседании совета по защите диссертаций Д 01.51.01 при РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского» Национальной академии наук Беларуси по адресу: 220003, г. Минск, ул. Ф. Брикета, 28, тел./факс 50-88-131; 50-88-353. E-mail: [bievm@tut.by](mailto:bievm@tut.by)

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»

Автореферат разослан «02» мая 2019 г.

Ученый секретарь совета  
по защите диссертаций,  
кандидат ветеринарных наук

Н.Ю. Щемелева

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита E (ВГЕ) является возбудителем острого гепатита – широко распространенного воспалительного заболевания печени у людей [Bhatia V. et al., 2008]. *Orthohepevirus A* относится к семейству *Hepeviridae* и включает в себя штаммы, циркулирующие среди людей, оленей, диких кабанов, кроликов, домашних свиней и других видов животных [Purdy M.A. et al., 2017]. Идентифицировано 8 генотипов ВГЕ [Sridhar S. et al., 2017]. Наиболее распространенными являются 1–4 генотипы. ВГЕ 1 и 2 генотипов вызывает заболевание только у людей с высокой частотой встречаемости в развивающихся странах. Генотипы 3 и 4 способны инфицировать как людей, так и некоторые виды животных [Smith D.B. et al., 2014].

Случаи гепатита E (ГЕ) в развитых европейских странах ранее связывали с выездом за границу, но в последние годы инфекция, вызванная 3 генотипом ВГЕ, считается эндемическим заболеванием, так как большинство зарегистрированных случаев имеет автохтонное происхождение и обусловлено употреблением в пищу сырого или недостаточно хорошо термически обработанного контаминированного мяса свиней, диких кабанов или оленей [Dalton H.R. et al., 2013; Larska M. et al., 2015; Pérez-Gracia M.T. et al., 2014]. По этой причине ВГЕ 3 генотипа отнесен к группе зооантропонозных инфекций [Wichmann O. et al., 2008; Masuda J.L. et al., 2005].

Эпидемиологическая ситуация на территории большинства европейских стран требует дальнейшего изучения циркуляции возбудителя ГЕ среди людей, домашних и диких животных, что обуславливает необходимость разработки высокочувствительных и специфичных методов диагностики.

Исследователи выявили антитела к ВГЕ и РНК вируса у домашних свиней, диких кабанов, оленей, косуль и кроликов, обитающих на территории европейских и азиатских стран [Hammerschmidt F. et al., 2017]. Установлено, что штаммы ВГЕ, инфицирующие кроликов, принадлежат или могут быть связаны с 3 генотипом ВГЕ, но при этом формируют отдельный клад ВГЕ [Vina-Rodriguez A. et al., 2015]. Французскими учеными идентифицированы последовательности ВГЕ кроликов в образцах биологического материала от инфицированных ВГЕ пациентов, что подтвердило инфектогенность штаммов ВГЕ кроликов в отношении людей [Abravanel F. et al., 2017].

Инфицированность кроликов ГЕ на территории Республики Беларусь не изучена. Кроме того, отсутствуют научные данные, раскрывающие механизм инфицирования кроликов, патогенетические особенности заболевания, характер течения инфекции при содержании животных в специализированных учреждениях, где осуществляется их размножение и выращивание. Кролики также широко используются в качестве экспериментальных животных во всем мире, что обуславливает необходимость их обследования на предмет инфицирования ВГЕ.

## **ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ**

### **Связь работы с крупными научными программами и темами**

Тема диссертации соответствует перечню приоритетных направлений научных исследований Республики Беларусь на 2016–2020 годы (Указ президента Республики Беларусь от 22 апреля 2015 г. № 166): «Медицина, фармация, медицинская техника: технологии профилактики, диагностики и лечения заболеваний; фармацевтические технологии, медицинские биотехнологии, лекарственные средства, диагностические препараты и тест-системы».

Диссертационное исследование выполнялось в рамках научно-исследовательской и опытно-конструкторской работы научно-исследовательской части учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» задания 7 «Создание тест-систем для диагностики гепатита E человека и испытание их диагностической эффективности на клиническом материале из эндемичных и неэндемичных регионов на территории Республики Беларусь» (срок выполнения 04.12.2015–31.12.2020 гг., № государственной регистрации 20160008 от 18.01.2016) Межгосударственной программы инновационного сотрудничества государств-участников СНГ на период до 2020 года «Создание тест-систем для серологической диагностики гепатита E и испытание их диагностической эффективности на клиническом материале из эндемичных и неэндемичных регионов».

### **Цель и задачи исследования**

Цель исследования – отработать методы детекции РНК вируса гепатита E и специфичных к нему иммуноглобулинов у кроликов; изучить распределение и особенности циркуляции возбудителя гепатита E среди кроликов в регионах Республики Беларусь; исследовать клинические, биохимические и морфологические проявления гепатита E у кроликов.

Задачи исследования:

1. Исследовать особенности циркуляции вируса гепатита E у кроликов в Республике Беларусь с использованием адаптированного метода полимеразной цепной реакции для идентификации РНК вируса в образцах биологического материала кроликов.

2. Охарактеризовать вирус гепатита E, циркулирующий среди кроликов, методом секвенирования фрагмента генома вируса и установить филогенетические взаимоотношения с другими генотипами ВГЕ, выделенными от людей и животных в Республике Беларусь и за ее пределами.

3. Изучить уровень серопревалентности специфичных к вирусу гепатита E иммуноглобулинов класса G у кроликов в Республике Беларусь. Разработать способ детекции специфических антител к вирусу гепатита E в сыворотке крови кроликов с использованием рекомбинантных белков ОРС2 и ОРС3 вируса гепатита E 3 генотипа.

4. Провести комплексное исследование серологических, клинических, биохимических и морфологических проявлений гепатита E и локализации вируса в органах и биологических жидкостях у инфицированных кроликов.

#### **Объект и предмет исследования**

Объект исследования: образцы периферической крови, фекалий, мочи, печени, желчи, почек, селезенки и кишечника кроликов; образцы фекалий зайцев; образцы воды из поилок кроликов.

Предмет исследования: специфические иммуноглобулины класса G к ВГЕ; РНК ВГЕ; количественные значения активности аланинаминотрансферазы; нуклеотидные последовательности геномов ВГЕ; клеточные структуры внутренних органов кроликов.

#### **Научная новизна**

Впервые установлена циркуляция ВГЕ у кроликов в Минской, Витебской, Гродненской, Могилевской областях Республики Беларусь. Наличие ВГЕ подтверждено выявлением специфических противовирусных антител (20,2%) и генетического материала вируса (21,2%) у обследованных животных. Выделен фрагмент генома ВГЕ от больных кроликов, определена его нуклеотидная последовательность и установлено филогенетическое родство полученного генома со штаммами ВГЕ кроликов, циркулирующими в других странах, а также с последовательностями генома ВГЕ, выявленными у людей, диких кабанов и свиней в Республике Беларусь. Нуклеотидные последовательности ВГЕ от кроликов в Республике Беларусь наиболее близки к последовательностям ВГЕ кроликов из Кореи (88,5–90%), Германии (88–89%) и России (85–89%) и отличаются от последовательностей ВГЕ 3 генотипа, выявленных у людей и свиней в Республике Беларусь, на 23,2–24,4%.

Стандартизирован высокоспецифичный метод гнездовой ПЦР с обратной транскрипцией, позволяющий выявлять РНК ВГЕ в концентрации 10 МЕ/мл и более в различных типах образцов биологического материала, как у людей, так и у различных видов животных.

Разработана твердофазная иммуноферментная тест-система для качественного определения иммуноглобулинов класса G к ВГЕ в сыворотке крови кроликов с использованием рекомбинантных белков ОРС2 и ОРС3 ВГЕ 3 генотипа, содержащих иммунодоминантные эпитопы, с диагностической чувствительностью 94,8% и диагностической специфичностью – 100%.

У экспериментально инфицированных кроликов установлены клинические симптомы гепатита E и волнообразный характер персистенции вируса в организме. Показана вероятность гибели кроликов после инфицирования ВГЕ.

Впервые установлено, что РНК ВГЕ выявляется достоверно чаще в фекалиях и моче животных, чем в крови. Данный факт подтверждает высокую

диагностическую значимость комплексного исследования образцов мочи и фекалий при инфицировании ВГЕ.

Впервые установлен высокий уровень аланинаминотрансферазы (АЛТ) в крови инфицированных кроликов на протяжении всего периода наблюдения (12 недель), что свидетельствует о продолжительном цитолитическом синдроме в тканях печени. Появление специфических анти-ВГЕ-IgG в организме опытных животных отмечалось с 4 по 8 недели после инфицирования. Экскреция РНК ВГЕ с калом у инфицированных животных наблюдалась наряду с циркуляцией специфичных антител к ВГЕ в крови и длилась в течение 12 недель, что указывает на склонность к хронизации инфекции. РНК ВГЕ обнаружена в печени, желчи, селезенке, кишечнике и почках больных животных. При гистологическом исследовании печени, почек и селезенки экспериментально инфицированных кроликов установлены признаки воспалительного процесса и разрушение клеток исследуемых органов.

При наблюдении за кроликами, содержащимися в условиях вивария, начиная с двухмесячного возраста, на протяжении 10 месяцев, впервые обнаружено присутствие вируса в фекалиях в продолжение всего периода наблюдения, что указывает на склонность к хроническому течению гепатита Е. Сероконверсия анти-ВГЕ-IgG у заболевших животных возникала через 1–5 месяцев после первого выявления РНК ВГЕ в фекалиях.

Впервые в образцах проб воды из поилок кроликов выявлена РНК ВГЕ, что указывает на алиментарный путь передачи ВГЕ кроликов.

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

1. Уровень инфицированности кроликов вирусом гепатита Е в исследуемых регионах Республики Беларусь составляет 21,2%. Обнаружение РНК вируса гепатита Е у кроликов, содержащихся в вивариях, достоверно выше, чем у кроликов из частных подворий ( $p < 0,001$ ). Выделение РНК вируса с фекалиями у кроликов может продолжаться в течение периода наблюдения до 10 месяцев. Выявление вирусной РНК достоверно выше в фекалиях и моче инфицированных животных по сравнению с кровью ( $p < 0,001$ ).

2. Доля кроликов с подтвержденными антителами к вирусу гепатита Е в сыворотке крови составляет 20,2% в исследуемых регионах Республики Беларусь. Метод твердофазного иммуноферментного анализа, основанный на сенсibilизации полистироловых планшетов рекомбинантными белками ОРС2 и ОРС3 вируса гепатита Е 3 генотипа в концентрации 2 мкг/мл и 1 мкг/мл соответственно, позволяет выявлять иммуноглобулины класса G к вирусу гепатита Е в сыворотке крови кроликов и имеет диагностическую чувствительность – 94,8% и диагностическую специфичность – 100%.

3. Нуклеотидные последовательности фрагмента ОРС2 генома вируса гепатита Е, циркулирующего среди кроликов в Республике Беларусь, образуют на

филогенетическом дереве однородную группу, формируют единый кластер со всеми зарегистрированными последовательностями генома вируса гепатита Е кроликов, имеют наибольшую степень гомологии с последовательностями вируса гепатита Е кроликов из Кореи, Германии и России, но отличаются от последовательностей 3 генотипа вируса, выявленных у людей и свиней в Республике Беларусь, на 23,2–24,4%.

4. Инфицирование кроликов вирусом гепатита Е сопровождается цитолизом гепатоцитов на протяжении 12 недель наблюдения, что подтверждается высокими значениями активности аланинаминотрансферазы в сыворотке крови животных. Вирус гепатита Е индуцирует разрушение и вакуолизацию гепатоцитов с возникновением лейкоцитарно-макрофагальных очагов инфильтрации в печени, разрушение и фрагментацию почечных клубочков, активную лимфоцитарную реакцию в селезенке у инфицированных кроликов.

#### **Личный вклад соискателя ученой степени**

Соискателем совместно с научным руководителем, доктором медицинских наук, профессором Жаворонком С.В. выбрана тема диссертации, поставлены цель и задачи исследования, определен объем исследований, проведен анализ полученных результатов, подготовлены печатные работы к публикации.

Автором самостоятельно выполнен анализ научной литературы, сформирована база данных, модифицирован метод ИФА для исследования сывороток крови кроликов на наличие анти-ВГЕ-IgG, проведено планирование и реализация экспериментов по моделированию инфицирования кроликов ВГЕ и длительному наблюдению за кроликами, осуществлено исследование АЛТ и анти-ВГЕ-IgG в образцах сывороток крови животных, определена РНК ВГЕ в образцах фекалий, крови, мочи, желчи, внутренних органов и проб воды, проведен филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей участка генома РНК ВГЕ. Соискателем осуществлена компьютерная графическая и статистическая обработка результатов, написаны и оформлены все разделы диссертации. Анализ окончательных данных, формулировка положений, выносимых на защиту, выводов и практических рекомендаций проведены совместно с научным руководителем, личный вклад – не менее 90%.

На базе лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (зав. Алаторцева Г.И.) разработан метод твердофазного иммуноферментного анализа для выявления иммуноглобулинов класса G к ВГЕ в сыворотке крови кроликов, личный вклад – не менее 85%.

Совместно с лабораторией вирусных гепатитов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (зав. член-корр. Михайлов М.И.), лабораторией диагностики ВИЧ и сопутствующих инфекций РНПЦ ЭИМ (зав. доцент Гасич Е.Л.), лабораторией биохимических методов исследования НИЧ БГМУ (зав. Ибрагимов Ж.А.) адаптирован и стандартизирован метод ПЦР с обратной транскрипцией для

детекции РНК ВГЕ, проведено секвенирование амплифицированных фрагментов генома ВГЕ, личный вклад – не менее 80%.

На базе кафедры анатомии животных УО ГГАУ (зав. Харитоник Д.Н.) проведено гистологическое исследование образцов печени, почек и селезенки от кроликов, личный вклад – не менее 70%.

По материалам диссертации опубликованы статьи и тезисы докладов, в которых изложены результаты распределения маркеров ГЕ у кроликов и других млекопитающих [1, 2, 4, 9–13, 15, 17–19, 23, 25–27] – вклад соискателя 85%, разработки и оптимизации методов диагностики ВГЕ [3, 5, 8, 14, 16, 20, 21, 24, 28] – вклад соискателя 90%, экспериментальных исследований патогенеза ГЕ у кроликов [6, 7, 22] – вклад соискателя 90%.

#### **Апробация диссертации и информация об использовании ее результатов**

Результаты и основные положения диссертационной работы доложены и обсуждены на научной сессии учреждения образования «Белорусский государственный медицинский университет» (г. Минск, 2015 г.); IXX Международной научно-практической конференции студентов и молодых ученых (г. Минск, 2016 г.); 12-й и 13-й Евразийских научных конференциях «Биологический фактор и микробиологическая диагностика при формировании здорового образа жизни» (г. Санкт-Петербург, 2016, 2017 гг.); 28-м Европейском конгрессе по клинической микробиологии и инфекционным заболеваниям (г. Мадрид, 2018 г.); 3-м межрегиональном форуме специалистов «Актуальные вопросы инфекционной патологии» (г. Санкт-Петербург, 2018 г.).

#### **Опубликование результатов диссертации**

По материалам диссертации опубликовано 28 научных работ, в том числе: 8 статей в рецензируемых журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендуемых ВАК для опубликования результатов диссертационных исследований, 14 статей в журналах, сборниках научных трудов и материалах конференций, 5 тезисов докладов, 1 инструкция по применению, утвержденная Министерством здравоохранения Республики Беларусь. Общий объем опубликованного материала – 9,83 авторских листа.

#### **Структура и объем диссертации**

Диссертация изложена на 119 страницах (основной текст – 82 страницы, таблицы и рисунки – 17, списки использованных источников и публикации соискателя – 20) и состоит из введения, общей характеристики работы, аналитического обзора литературы, описания методов исследования, изложения и обсуждения результатов собственных исследований (3 главы), заключения, библиографического списка, включающего 219 источников, в том числе 7 русскоязычных, списка публикаций соискателя – 28 работ, 4 приложений. Работа содержит 24 таблицы и 17 рисунков.



## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

### **Аналитический обзор литературы**

В аналитическом обзоре литературы отражены современные сведения о вирусном гепатите E, структуре и молекулярно-биологической организации возбудителя данного заболевания; освещены вопросы зоонозного потенциала и распространения вируса гепатита E среди людей, а также различных видов домашних и диких животных; показана роль своевременной диагностики заболевания; представлены сведения о последних экспериментальных исследованиях вируса гепатита E. На основании анализа научной литературы обоснована целесообразность проведения исследований вирусного гепатита E у кроликов, содержащихся в государственных учреждениях и на частных подворьях Республики Беларусь, с целью получения научных данных о характере распределения маркеров гепатита E, а также новых знаний о патогенетических особенностях возбудителя в условиях эксперимента.

### **Материалы и методы исследования**

Образцы фекалий кроликов собирали в государственных учреждениях и на частных подворьях Минской (165), Витебской (25), Гродненской (107), Могилевской (25) и Брестской (37) областей Республики Беларусь в течение 2014–2018 гг. Для анализа распределения РНК ВГЕ методом ПЦР исследовано 359 образцов фекалий кроликов (243 образца из государственных учреждений и 116 – из частных подворий) и 21 образец фекалий зайцев. На наличие специфичных анти-ВГЕ-IgG методом ИФА протестировано 124 образца сывороток крови кроликов из Минской (71), Витебской (27) и Гродненской (26) областей (117 – из государственных учреждений и 7 – из частных подворий).

Для моделирования вирусного ГЕ использовались кролики (6 самок и 7 самцов) весом 2,1–3,7 кг в возрасте 16 недель. Перед инфицированием у кроликов исключали циркуляцию антител к ВГЕ в крови и РНК ВГЕ в образцах фекалий. Животных экспериментальной группы (n=8) инфицировали внутривенным введением суспензии, содержащей ВГЕ кроликов в концентрации  $7 \times 10^2$  МЕ/мл. Животным из контрольной группы (n=5) вводили стерильный раствор фосфатно-солевого буфера. Забор крови, фекалий и мочи проводили каждые 7 дней с момента инфицирования на протяжении 12 недель. В конце эксперимента животных подвергали эвтаназии с последующим взятием образцов желчи и внутренних органов для исследования.

Изучение механизма инфицирования кроликов ВГЕ и особенностей течения ГЕ проводили методом наблюдения за животными (n=40), начиная с 2-х месячного возраста в течение 10 месяцев. Наблюдение за группами кроликов осуществляли в различные временные интервалы с 2016 г. по 2018 г. Забор крови у исследуемых животных осуществляли 1 раз в месяц, начиная с 3-х месячного возраста, образцы фекалий собирали с 2-х месячного возраста дважды в месяц с интервалом в 14 дней.

Экспериментальные исследования проводили согласно принципам, изложенным в постановлении Межпарламентской ассамблеи государств-участников Содружества независимых государств 31.10.2007 № 29–17 о модельном законе «Об обращении с животными», а также в положении о порядке использования экспериментальных животных в научно-исследовательских работах и учебном процессе в учреждении образования «Белорусский государственный медицинский университет», утвержденном приказом ректора университета от 18.07.1996 № 421-уч. Получено разрешение Комитета по биомедицинской этике (протокол № 8 от 26.04.2016 года).

Забор венозной крови у кроликов осуществляли из ушной вены в одноразовые пробирки. Для получения сыворотки кровь центрифугировали при 3000 об/мин 15 минут. Пробы мочи животных собирали в стерильные пробирки с помощью дозатора и стерильных наконечников. Фекалии собирали пинцетом в стерильные пробирки. Образцы маркировали и хранили при  $-70^{\circ}\text{C}$  до проведения анализа.

Исследование активности АЛТ в крови кроликов проводили с использованием коммерческого набора реагентов согласно инструкции производителя («Анализ-Х», Республика Беларусь).

Определение анти-ВГЕ-IgG в образцах сывороток крови осуществляли с помощью модифицированной методики на основе компонентов коммерческого набора «ДС-ИФА-Анти-HEV-G» (НПО Диагностические системы, РФ) в сочетании с пероксидазным конъюгатом белка А (Имтек, РФ).

Образцы цельной крови, мочи, фекалий и внутренних органов исследовали на наличие РНК ВГЕ методом гнездовой ОТ-ПЦР. Суммарную РНК выделяли из 100 мкл фекальных экстрактов, некоагулированной крови, мочи, желчи или гомогенизированных тканей с помощью набора для экстракции нуклеиновых кислот (Jena Bioscience, Германия) по протоколу производителя. Идентификацию РНК ВГЕ проводили с помощью набора вырожденных праймеров к участку ORC2 генома ВГЕ.

Секвенирование выполняли на автоматическом капиллярном секвенаторе 3500 (Applied Biosystems, США). Филогенетический анализ осуществляли с помощью программного пакета MEGA 7 методом максимального правдоподобия по двухпараметрической модели Кимуры.

Образцы органов животных для гистологического исследования фиксировали в 10% формалине. Затем делали срезы толщиной 7 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Срезы анализировали с использованием системы «Биоскан» (Республика Беларусь).

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакетов статистического анализа данных MedCalc («MedCalc

Software», Остенде, Бельгия) и Statistica for Windows 10.0 («StatSoft Inc.», Талса, США).

### **Молекулярно-биологическое исследование ВГЕ кроликов**

Стандартизацию метода ПЦР с обратной транскрипцией осуществляли посредством сравнения результатов исследования образцов биологического материала (n=32) здоровых и инфицированных кроликов с коммерческой тест-системой ПЦР для количественного определения РНК ВГЕ в режиме реального времени RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 (Altona, Германия). Сопоставление результатов исследования обоими методами выявило полное соответствие положительных и отрицательных проб, что продемонстрировало высокую специфичность и чувствительность предложенного метода ОТ-ПЦР.

Для определения аналитической чувствительности предложенного метода ПЦР, образец РНК ВГЕ исследовали с помощью диагностического набора RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0. Затем из охарактеризованного образца, содержащего РНК ВГЕ в концентрации  $3,3 \times 10^4$  МЕ/мл, готовили шесть разведений вирусной РНК:  $3,3 \times 10^2$ , 100, 50, 25, 10, 5 МЕ/мл, которые анализировали методом ОТ-ПЦР. Последняя концентрация РНК ВГЕ, определяемая предложенным методом, составила 10 МЕ/мл, что подтвердило высокую чувствительность адаптированного метода ОТ-ПЦР и позволило использовать его для дальнейших исследований распределения РНК ВГЕ в образцах биологического материала кроликов и зайцев.

### **Исследование распределения РНК ВГЕ у кроликов и зайцев в регионах Республики Беларусь**

В результате исследования фекалий кроликов обнаружено 21,2% (76/359) положительных образцов. Показаны достоверные различия в распределении позитивных и негативных результатов в Минской, Витебской, Брестской, Могилевской и Гродненской областях ( $\chi^2=23,01$ ,  $p<0,001$ ). 32,1% (53/165) положительных случаев выявлены в Минской области, 20,6% (22/107) – в Гродненской области, 4,0% (1/25) – в Могилевской области. В образцах фекалий кроликов из Витебской и Брестской областей РНК ВГЕ не выявлено. В Гомельской области не удалось найти частное подворье или государственное учреждение для осуществления забора биологического материала у кроликов.

Анализ распределения положительных образцов, содержащих РНК ВГЕ, в зависимости от возраста кроликов не установил статистически достоверных различий – 24,0% (54/225) против 16,4% (22/134), ( $\chi^2=2,89$ ,  $p=0,089$ ), что демонстрирует высокий уровень вирусоносительства во всех возрастных группах с тенденцией к снижению в старшей возрастной группе. Показаны достоверно значимые различия в зависимости от содержания в государственных учреждениях – 28,4% (69/243) и частных подворьях – 6,0% (7/116), ( $\chi^2=23,52$ ,  $p<0,001$ ).

При исследовании фекалий зайцев (n=21) выявлен один положительный образец.

### **Филогенетический анализ последовательностей геномов ВГЕ, выявленных у кроликов в Республике Беларусь**

Методом секвенирования установлены нуклеотидные последовательности амплифицированного фрагмента генома ВГЕ длиной 273 п.н. позиции 6023–6295. Анализ фрагментов осуществляли относительно референсного штамма ВГЕ 1 генотипа M73218. Для филогенетического анализа выявленных фрагментов генома ВГЕ кроликов в базе данных GenBank были отобраны референсные последовательности ВГЕ, полученные от кроликов в США, Корее, Китае, Франции, России, Германии и Японии, последовательности ВГЕ, выделенные у людей, свиней и дикого кабана в Республике Беларусь, ряд других известных на сегодняшний день нуклеотидных последовательностей ВГЕ различных генотипов, полученных от людей и разнообразных видов животных из других стран. Всего проанализировано 64 нуклеотидные последовательности ВГЕ.

Анализ данных показал, что штаммы ВГЕ, выделенные у кроликов в Республике Беларусь, формируют на филогенетическом дереве единую однородную группу со степенью сходства 97,5–100% и наиболее близки к последовательностям ВГЕ кроликов из Кореи (88,5–89,9%), Германии (87,7–89,1%) и России (84,6–89,2%). Анализируемые последовательности ВГЕ кроликов отличаются от последовательностей ВГЕ 3 генотипа, выявленных у людей и свиней в Республике Беларусь, на 23,2–24,4%. Различия в структуре исследуемых нуклеотидных последовательностей ВГЕ кроликов и дикого кабана составили 20,6–22,0%.

### **Исследование распределения серологических маркеров ГЕ у кроликов в отдельных регионах Республики Беларусь**

При анализе образцов сывороток крови кроликов анти-ВГЕ-IgG выявлены у 20,2% (25/124) животных. Распределение антител к ВГЕ достоверно различалось в исследуемых регионах Республики Беларусь с превалированием положительных результатов, полученных из Витебской области ( $\chi^2=16,61$ ,  $p<0,001$ ). Установлены достоверные различия между показателями распределения серологических маркеров ГЕ в Минской и Витебской – 18,3% (13/71) против 44,4% (12/27), ( $\chi^2=7,03$ ,  $p=0,008$ ), Минской и Гродненской – 18,3% (13/71) против 0,0% (0/26), ( $F=0,05$ ,  $p=0,012$ ), а также Витебской и Гродненской областях – 44,4% (12/27) против 0,0% (0/26), ( $F=0,28$ ,  $p<0,001$ ). Анализ распределения положительных на анти-ВГЕ-IgG образцов сывороток крови у кроликов в возрасте до 6 (11,4%) и старше 6 (25,0%) месяцев не выявил достоверных различий ( $\chi^2=3,28$ ,  $p=0,07$ ).

### **Оценка качества разработанной тест-системы**

При оценке основных характеристик разработанного метода ИФА для качественного выявления анти-ВГЕ-IgG у кроликов диагностическая

чувствительность составила 94,8%, диагностическая специфичность – 100% ( $AUC=0,984\pm 0,012$ ,  $z=39,512$ ,  $p<0,001$ ), что подтвердило надежность разработанного лабораторного варианта тест-системы. Критическое пороговое значение оптической плотности ( $OP_{\text{крит.}}$ ) для разделения позитивных и негативных результатов в ИФА составило 0,171 ( $p<0,001$ ).

Воспроизводимость метода определяли посредством тестирования 8 образцов сывороток крови кроликов в 10 параллельных повторах для каждого образца в пределах одного планшета (внутрисерийная воспроизводимость) с повторением анализа в трех независимых экспериментах (межсерийная воспроизводимость). Коэффициенты вариации, являющиеся критерием оценки внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости данной тест-системы, составили 3,5% и 12,4% соответственно.

### Исследование патогенеза вирусного ГЕ у кроликов

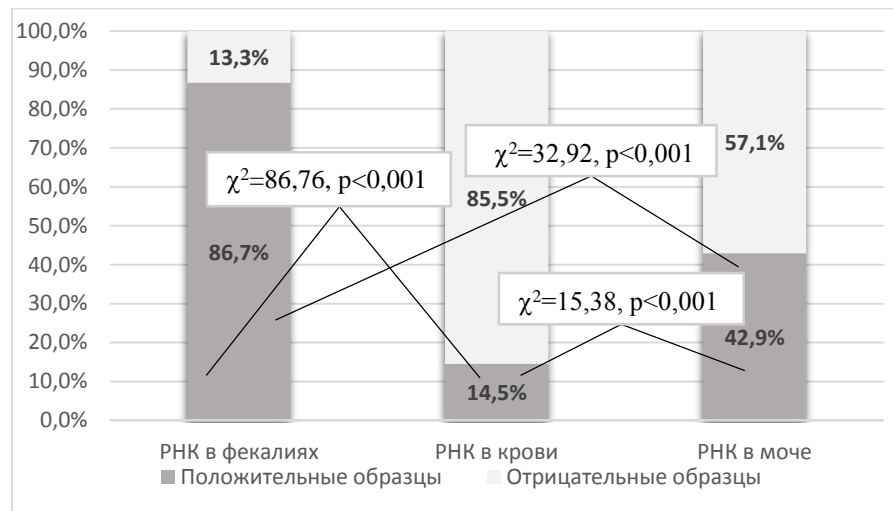
После инфицирования ВГЕ клинические проявления ГЕ наблюдались у животных опытной группы на первой неделе исследования. У 6 из 8 опытных кроликов установлены симптомы интоксикации (вялость, диарея, отказ от пищи). Кролик № 41 выбыл из эксперимента в следствие гибели на 9-й день после инфицирования. РНК ВГЕ выявлена в фекалиях всех инфицированных животных на 7 и 14 сутки после заражения (таблица). У кроликов № 45, 47, 50 экскреция вирусной РНК детектировалась в фекалиях на протяжении всего периода наблюдения. У пяти животных наблюдалась волнообразная экскреция РНК ВГЕ с фекалиями. На 11–12 неделях исследования вирусная РНК определена в фекалиях пяти кроликов из семи, что может свидетельствовать о склонности к хроническому течению заболевания. В контрольной группе РНК ВГЕ не выявлена на протяжении всего исследования.

Таблица – Детекция РНК ВГЕ в образцах крови и фекалий кроликов

Недели	Экспериментальная группа (1)		Контрольная группа (2)		Статистическая значимость различий выявления РНК в фекалиях кроликов
	РНК в крови	РНК в фекалиях	РНК в крови	РНК в фекалиях	
1	0/8	8/8	0/5	0/5	F=1,0, p<0,001
2	0/7	7/7	0/5	0/5	F=1,0, p=0,001
3	1/7	6/7	0/5	0/5	F=0,7, p=0,008
4	2/7	7/7	0/5	0/5	F=1,0, p=0,001
5	0/7	7/7	0/5	0/5	F=1,0, p=0,001
6	0/7	6/7	0/5	0/5	F=0,7, p=0,008
7	0/7	6/7	0/5	0/5	F=0,7, p=0,008
8	3/7	7/7	0/5	0/5	F=1,0, p=0,001
9	3/7	5/7	0/5	0/5	F=0,5, p=0,026
10	1/7	5/7	0/5	0/5	F=0,5, p=0,026
11	2/6	4/6	0/5	0/5	F=0,476, p=0,045
12	1/6	4/6	0/5	0/5	F=0,476, p=0,045

У экспериментально инфицированных ВГЕ животных наблюдался достоверно высокий уровень АЛТ с 1 по 12 недели наблюдения по сравнению с контрольной группой ( $p < 0,05$ ), что свидетельствует о длительном цитолитическом синдроме, вызванном токсическим поражением клеток печени ВГЕ.

Установлены статистически значимые различия при определении РНК ВГЕ в фекалиях и крови ( $\chi^2 = 86,76$ ,  $p < 0,001$ ), фекалиях и моче ( $\chi^2 = 32,92$ ,  $p < 0,001$ ), моче и крови ( $\chi^2 = 15,38$ ,  $p < 0,001$ ) инфицированных животных, что указывает на высокую значимость исследования мочи наряду с анализом образцов фекалий и крови (рисунок). У экспериментально инфицированных кроликов вирусная РНК в моче появлялась раньше, чем в крови.



**Рисунок – Детекция РНК ВГЕ в образцах крови, мочи и фекалий инфицированных кроликов за 12 недель исследования**

Синтез анти-ВГЕ-IgG в сыворотке крови опытных животных наблюдался, начиная с 4 недели после инфицирования. При этом у кроликов с подтвержденной циркуляцией специфических антител идентифицирована вирусемия, экскреция РНК ВГЕ с калом и мочой.

При исследовании внутренних органов кроликов экспериментальной группы РНК ВГЕ выявлена в образцах печени (7/8), желчи (8/8), кишечника (8/8), селезенки (6/7) и почек (4/7).

При гистологическом исследовании печени инфицированных кроликов выявлено нарушение балочного строения печеночных долек, разрушение и вакуолизация гепатоцитов, лейкоцитарно-макрофагальные очаги инфильтрации, наблюдаемые при воспалительном процессе, поражение сосудов печени, кровоизлияния в различных участках печеночных долек, нарушение целостности структуры желчных протоков с формированием обширных вакуолей и очагами пролиферации лимфоцитов в зоне портального тракта.

Исследование гистологической структуры тканей почек инфицированных животных установило расширение просвета канальцев нефронов, скопление в них белка, деструкцию почечных клубочков, образование вакуолей на месте

разрушенных извитых канальцев, кровоизлияния, вакуольную дистрофию клеток, распад капсулы нефронов, лимфоцитарную инфильтрацию коркового и мозгового вещества почки, указывающую на воспалительный процесс.

Патоморфологическое исследование образцов селезенки инфицированных кроликов выявило разрыхление стенок сосудов, тромбоз, кровоизлияния, активную пролиферацию лимфоцитов, дезинтеграцию и опустошение лимфоидных узелков с формированием отдельных островков, уменьшение просвета кровеносных сосудов. Установлена выраженная гипертрофия трабекул с повышенной концентрацией лимфоцитов и плазмоцитов. При гистологическом исследовании тканей печени, почек и селезенки кроликов контрольной группы патологических изменений не установлено.

### **Исследование особенностей проявления ГЕ у кроликов при длительном наблюдении**

При наблюдении за кроликами ( $n=40$ ), содержащимися в условиях вивария, установлена положительная динамика увеличения уровня анти-ВГЕ-IgG ( $R^2=0,9555$ ) с долей серопозитивных животных 50% (20/40) к концу периода наблюдения. У четырех кроликов специфичные анти-ВГЕ-IgG циркулировали в крови на третьем месяце жизни, причиной чего могло являться как инфицирование ВГЕ, так и пассивная иммунизация материнскими антителами. При исследовании образцов фекалий этих кроликов на РНК ВГЕ положительные результаты выявлены у 2 из 4 животных, что подтверждает присутствие материнских анти-ВГЕ-IgG у крольчат. В ИФА показатели оптической плотности образцов сывороток крови от крольчат с материнскими антителами характеризовались достоверно более низкими значениями – 0,344 (0,270–0,368) по сравнению с образцами от переболевших ГЕ крольчат – 0,659 (0,595–1,952) на протяжении всего периода наблюдения ( $z=2$ ,  $p=0,045$ ).

У 9 кроликов экскреция РНК ВГЕ с фекалиями происходила наряду с циркуляцией специфичных антител и длилась у 2 животных 1 месяц с момента первого выявления анти-ВГЕ-IgG, у двух кроликов – 2 месяца, у трех кроликов – 4 месяца, и у двух кроликов – 5 месяцев. У остальных 9 заболевших животных выделение вируса с калом прекратилось до начала циркуляции анти-ВГЕ-IgG.

Длительность экскреции вирусной РНК составила от менее 2 недель до 10 месяцев. В результате анализа установлено, что у 67% ( $n=12$ ) кроликов фекальная экскреция вируса длилась от < 2 недель до 3 месяцев, у 22% ( $n=4$ ) – от 3 до 6 месяцев, у 11% ( $n=2$ ) – более 6 месяцев, что указывает на склонность к хроническому течению ГЕ.

Исследование интервала между возникновением РНК ВГЕ в стуле и началом циркуляции специфичных анти-ВГЕ-IgG продемонстрировало нарастание титра антител в том же месяце, когда впервые была выявлена РНК ВГЕ в кале у трех кроликов. Циркуляция анти-ВГЕ-IgG наблюдалась через 1 месяц после первой

детекции РНК вируса в фекалиях у 3 животных, через 2 – у пяти, через 3 – у двух, через 4 – у двух и через 5 месяцев – у одного кролика. Задержка иммунного ответа при инфицировании ВГЕ указывает на различия иммунного статуса животных.

В результате ПЦР-анализа образцов воды из поилок кроликов установлено наличие РНК ВГЕ. В водопроводной воде РНК ВГЕ не выявлена. Используемые миски-поилки для кроликов не являлись индивидуальными и после заполнения водой попадали от одних животных к другим, обуславливая передачу вируса от больных животных здоровым.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

### **Основные научные результаты диссертации**

1. Установлена циркуляция вируса гепатита Е у кроликов в Минской, Витебской, Гродненской, Могилевской областях Республики Беларусь. Показаны достоверно значимые различия в выявлении вирусной РНК у кроликов, содержащихся в государственных учреждениях – 28,4% (69/243) и частных подворьях – 6,0% (7/116), ( $\chi^2=23,52$ ,  $p<0,001$ ). Впервые детектирована РНК вируса гепатита Е в фекалиях зайца. Адаптирован метод полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией для детекции РНК вируса в различных типах образцов биологического материала с чувствительностью 10 МЕ/мл. Предложенный метод стандартизирован с помощью коммерческого набора для количественного определения РНК вируса гепатита Е в режиме реального времени RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 (Altona, Германия) [1, 5, 9, 10, 12, 14, 17, 18, 23, 25, 28].

2. Методом секвенирования установлены нуклеотидные последовательности фрагмента генома вируса гепатита Е, циркулирующего у кроликов в Республике Беларусь. В результате филогенетического анализа показано образование единого кластера исследуемых последовательностей вируса гепатита Е кроликов со всеми зарегистрированными последовательностями вируса гепатита Е кроликов. Нуклеотидные последовательности вируса формируют на филогенетическом дереве единую однородную группу со степенью сходства 97,5–100% и наиболее близки к последовательностям ВГЕ кроликов из Кореи (88,5–89,9%), Германии (87,7–89,1%), России (84,6–89,2%). Степень сходства между последовательностями вируса гепатита Е кроликов из США и Республики Беларусь составила 86,6–87,6%, Японии и Республики Беларусь – 86,0–87,0%, Китая и Республики Беларусь – 84,1–88,1%. Исследуемые последовательности вируса гепатита Е кроликов отличаются на 23,2–24,4% от последовательностей 3 генотипа вируса, выявленных у людей и свиней в Республике Беларусь. Различия в структуре последовательностей вируса гепатита Е кроликов и дикого кабана составили 20,6–22,0% [1, 5, 15, 21, 24, 27].

3. Впервые установлено наличие иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита Е у кроликов из Витебской и Минской областей Республики Беларусь – 20,2%. Модифицирован коммерческий набор «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G»



производства НПО «Диагностические системы» для определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита E в сыворотке крови человека, что позволило проводить качественное определение аналогичных антител в сыворотке крови кроликов. Разработан и оптимизирован лабораторный вариант иммуноферментной тест-системы для качественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита E в сыворотке крови кроликов с использованием рекомбинантных белков, включающих иммунодоминантные эпитопы и соответствующих белкам ORC2 и ORC3 3 генотипа вируса. Установлены высокие показатели аналитической надежности разработанной тест-системы. Диагностическая чувствительность тест-системы составила 94,8%, диагностическая специфичность – 100%. Коэффициенты вариации, являющиеся критерием оценки внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости тест-системы, составили 3,5% и 12,4% соответственно [2, 3, 4, 8, 11, 16, 19, 20, 26, 27].

4. Получена экспериментальная модель гепатита E на кроликах путем внутривенного введения вируса гепатита E кроликов в концентрации  $7 \times 10^2$  МЕ/мл. Изучены клинические признаки и биохимические показатели гепатита E, установлена возможность летального исхода инфицированных животных. Выявлена продолжительная экскреция РНК вируса с фекалиями, наблюдаемая в течение 12 недель, что указывает на склонность к хроническому течению гепатита E у зараженных животных. Диагностирована волнообразная персистенция вируса в крови, моче и фекалиях инфицированных кроликов. Показано, что вирусная РНК чаще выявляется в фекалиях и моче больных животных, чем в крови, что указывает на высокую диагностическую значимость исследования мочи. Определены высокие показатели АЛТ в сыворотке крови инфицированных кроликов с 1 по 12 недели эксперимента, что свидетельствует о продолжительном цитолитическом синдроме в тканях печени. Обнаружена внепеченочная локализация вируса в селезенке, кишечнике и почках кроликов. При гистологическом анализе образцов печени, почек и селезенки больных животных наблюдались нарушения морфологической структуры, сопровождающиеся воспалительным процессом в тканях [7, 22].

5. При наблюдении за кроликами в течение 10 месяцев установлена выраженная положительная динамика появления специфичных антител в группе заболевших гепатитом E кроликов. Выявлена экскреция вирусной РНК с фекалиями на протяжении всего периода наблюдения. Выделение РНК вируса с калом происходило у 9 животных наряду с циркуляцией специфичных антител и продолжалось от 1 до 5 месяцев с момента их первого выявления. Сероконверсия иммуноглобулинов класса G у заболевших гепатитом E животных наблюдалась через 1–5 месяцев после первого выявления вирусной РНК в фекалиях. В образцах проб воды из мисок-поилок кроликов выявлена РНК вируса гепатита E, что может способствовать распространению инфекции среди животных [6, 13].

### **Рекомендации по практическому использованию результатов**

Разработана инструкция по применению «Метод молекулярно-генетического выявления РНК вируса гепатита Е», утвержденная Министерством здравоохранения Республики Беларусь (№ 055-0518 от 01.06.2018) [28]. Данная инструкция предназначена для специалистов учреждений, осуществляющих лабораторно-диагностические исследования, государственный санитарный надзор и оказывающих медицинскую помощь пациентам с гепатитом Е. Метод внедрен в научные учреждения, осуществляющие исследование возбудителя вирусного гепатита Е, в лечебно-профилактические учреждения здравоохранения для проведения мониторинга гепатита Е, а также в учреждения ветеринарной службы Республики Беларусь (4 акта о внедрении).

Получен положительный результат предварительной экспертизы Национального центра интеллектуальной собственности на способ определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита Е у кроликов с использованием иммуноферментного анализа (№ А 20180190 от 22.05.2018). Заявляемый способ позволяет с высокой точностью определять иммуноглобулины класса G к вирусу гепатита Е в сыворотке крови кроликов за счет использования в качестве антигенных рекомбинантных полипептидов аминокислотных последовательностей, соответствующих белкам ОРС2 и ОРС3 вируса гепатита Е 3 генотипа, наиболее близкого к вирусу гепатита Е кроликов. Последующее внедрение разработанного способа может способствовать дальнейшему изучению распределения специфичных к гепатиту Е антител у кроликов как на территории Республики Беларусь, так и за ее пределами.

Рекомендуется проводить качественную дезинфекцию поилок в учреждениях, занимающихся разведением и выращиванием кроликов, а также использующих кроликов в качестве экспериментальных животных для проведения научно-исследовательских работ.

Рекомендуется проводить обследование лабораторных кроликов на наличие РНК вируса гепатита Е и специфичных к вирусу антител перед их включением в экспериментально-исследовательскую работу. Обследование животных может способствовать более качественному проведению экспериментов благодаря исключению инфицированных кроликов.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ СОИСКАТЕЛЯ

### Статьи, соответствующие пункту 18 Положения о присуждении ученых степеней и присвоении ученых званий в Республике Беларусь

1. Жаворонок, С. В. Распространение вирусного гепатита Е среди животных и людей / С. В. Жаворонок, А. А. Арабей, П. А. Красочко // Экология и животный мир. – 2015. – № 1. – С. 22–30.

2. Гепатит Е у беременных с патологией печени в Республике Беларусь / Т. В. Зновец, С. В. Жаворонок, Е. И. Барановская, А. А. Арабей // Здоровоохранение. – 2016. – № 5. – С. 9–15.

3. Использование белка А для диагностики ВГЕ у животных / А. А. Арабей, С. В. Жаворонок, Л. В. Бутько, П. А. Красочко // Экология и животный мир. – 2016. – № 1. – С. 49–52.

4. Распространенность антител к вирусу гепатита Е среди поголовья свиней в Республике Беларусь / С. В. Жаворонок, А. А. Арабей, Д. С. Борисовец, Г. Е. Толяронок, П. А. Красочко, М. И. Михайлов, Г. И. Алаторцева // Экология и животный мир. – 2017. – № 1. – С. 20–26.

5. Являются ли домашние животные резервуаром вирусного гепатита Е у человека? Результаты молекулярно-генетических исследований с использованием адаптированного метода ПЦР-анализа / А. А. Арабей, С. И. Марчук, С. В. Жаворонок, Ж. А. Макаревич, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов, Д. С. Борисовец // Лаб. диагностика. Вост. Европа. – 2017. – Т. 6, № 3. – С. 343–350.

6. Длительность вирусоносительства и тенденция к хронизации гепатита Е у кроликов / А. А. Арабей, Ж. А. Макаревич, С. И. Марчук, С. В. Жаворонок // Ученые записки УО «Витеб. ордена «Знак почета» гос. акад. ветеринар. медицины». – 2018. – Т. 54, № 3. – С. 3–8.

7. Создание экспериментальной модели вирусного гепатита Е у кроликов / А. А. Арабей, С. В. Жаворонок, Ж. А. Макаревич, С. И. Марчук, В. В. Малашко // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2018. – № 2. – С. 48–58.

8. Технология определения специфических антител к вирусу гепатита Е у кроликов с использованием разработанной иммуноферментной тест-системы / А. А. Арабей, Л. Н. Лухверчик, Г. И. Алаторцева, В. В. Зверев, С. В. Жаворонок // Лаб. диагностика. Вост. Европа. – 2018. – Т. 7, № 2. – С. 240–249.

### Статьи в журналах, сборниках научных трудов и материалах конференций

9. Обнаружение вируса гепатита Е среди кроликов в Республике Беларусь / А. А. Арабей, А. М. Е. Мохаммед, С. В. Жаворонок, К. К. Кюрегян, Л. В. Бутько, В. В. Давыдов, М. И. Михайлов // Воен. медицина. – 2015. – № 2. – С. 51–53.

10. Автохтонный гепатит Е (эпидемиология в группах риска, диагностика, клиника), распространение у животных в Республике Беларусь / С. В. Жаворонок,

А. А. Арабей, Е. Н. Яговдик-Тележная, Т. В. Зновец, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов, Г. И. Алаторцева, Л. А. Анисько, Т. А. Рогачева, О. О. Руммо, М. Л. Доценко, О. В. Михайлова, Ю. В. Кашкур, П. А. Красочко, Д. С. Борисовец // Обеспечение эпидемического благополучия: вызовы и решения : материалы XI съезда Всерос. науч.-практ. О-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Москва, 16–17 нояб. 2017 г. / Федерал. служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Общерос. обществ. орг. «Всерос. науч.-практ. о-во эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» ; под ред. А. Ю. Поповой. – СПб., 2017. – С. 18.

11. Вирусный гепатит Е среди иностранных граждан из регионов с высоким уровнем его распространения / С. В. Жаворонок, А. А. Арабей, В. В. Давыдов, Е. В. Воропаев, В. М. Мицура, Ю. В. Кашкур, В. А. Юрганова // Донозология и здоровый образ жизни. – 2017. – № 2. – С. 84–85.

12. Особенность эпидемиологического процесса HEV-инфекции на современном этапе в Республике Беларусь / С. В. Жаворонок, Е. Н. Яговдик-Тележная, А. А. Арабей, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов, Т. В. Зновец, Г. И. Алаторцева, Л. А. Анисько, Т. А. Рогачева, О. О. Руммо, М. Л. Доценко, Ю. И. Шумский, О. В. Михайлова, Ю. В. Кашкур, П. А. Красочко, Ю. Д. Борисовец // Донозология-2017. Проблемы гигиенической донозологической диагностики и первичной профилактики заболеваний в современных условиях : материалы 13-й Евраз. науч. конф., С.-Петерб., 14–15 дек. 2017 г. / Науч.-исслед. ин-т гигиены, профпатологии и экологии человека [и др.] ; под общ. ред. М. П. Захарченко [и др.]. – СПб., 2017. – С. 214–216.

13. Риск зоонозной передачи вируса гепатита Е от кроликов людям / А. А. Арабей, С. В. Жаворонок, Ж. А. Макаревич, К. К. Кюрегян, Н. В. Москалева, М. И. Михайлов // Обеспечение эпидемического благополучия: вызовы и решения : материалы XI съезда Всерос. науч.-практ. О-ва эпидемиологов, микробиологов и паразитологов, Москва, 16–17 нояб. 2017 г. / Федерал. служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, Общерос. обществ. орг. «Всерос. науч.-практ. о-во эпидемиологов, микробиологов и паразитологов» ; под ред. А. Ю. Поповой. – СПб., 2017. – С. 298.

14. Адаптированный метод полимеразной цепной реакции для выявления вируса гепатита Е у человека и животных / А. А. Арабей, С. И. Марчук, С. В. Жаворонок, В. В. Давыдов, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов // Воен. медицина. – 2018. – № 3. – С. 86–92.

15. Вирус гепатита Е у кроликов и зайцев в Республике Беларусь / А. А. Арабей, С. В. Жаворонок, С. И. Марчук, Ю. И. Шумский, Л. В. Бутько, Е. Л. Гасич, А. А. Карлсен, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов // Мед. новости. – 2018. – № 11. – С. 46–51.

16. Иммуноферментный анализ в диагностике гепатита E у свиней / П. А. Красочко, А. П. Курдеко, П. П. Красочко, С. В. Жаворонок, А. А. Арабей, Д. С. Борисовец, Т. М. Прокопенкова, С. А. Нычик // Ветеринарна біотехнологія. – 2018. – № 32. – С. 285–291.

17. Молекулярная эпидемиология вирусного гепатита E в Республике Беларусь / С. В. Жаворонок, В. В. Давыдов, А. А. Арабей, Е. Л. Гасич, А. А. Карлсен, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания : материалы V Всерос. междисциплинар. науч.-практ. конф. с междунар. участием, Сочи, 30 окт.–2 нояб. 2018 г. / Кубан. гос. мед. ун-т [и др.] ; редкол.: В. Н. Городин [и др.]. – Сочи, 2018. – С. 91–92.

18. Особенности распространения вирусного гепатита E в неэндемичном регионе / С. В. Жаворонок, В. В. Давыдов, А. А. Арабей, Е. Н. Яговдик-Тележная, Т. В. Зновец, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов, Г. И. Алаторцева, Л. А. Анисько, Т. А. Рогачева, О. О. Руммо, М. Л. Доценко, С. И. Марчук, Е. Л. Гасич, Ю. В. Кашкур, Ю. И. Шумский, П. А. Красочко, Ю. Д. Борисовец // Здоровоохранение Кыргызстана. – 2018. – № 2. – С. 110–115.

19. Распространение гепатита E у свиней в Могилевской и Минской областях Республики Беларусь / П. А. Красочко, А. П. Курдеко, П. П. Красочко, С. В. Жаворонок, А. А. Арабей, Д. С. Борисовец, Т. М. Прокопенкова, А. А. Тарасов // Ветеринарна біотехнологія. – 2018. – № 32. – С. 292–298.

20. Рекомбинантные антигены вируса гепатита E первого и третьего генотипов: конструирование и оценка возможности применения в диагностических тестах / Г. И. Алаторцева, А. В. Сидоров, Л. Н. Нестеренко, Л. Н. Лухверчик, В. В. Доценко, М. В. Жукина, И. И. Амиантова, А. В. Милованова, Д. С. Воробьев, Ю. И. Аммур, А. З. Нурматов, З. Ш. Нурматов, Д. А. Байызбекова, Р. О. Касымова, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов, А. А. Арабей, С. В. Жаворонок, В. В. Зверев // Здоровоохранение Кыргызстана. – 2018. – № 2. – С. 36–46.

21. Филогенетический анализ последовательностей ВГЕ, выявленных в Республике Беларусь / А. А. Арабей, С. В. Жаворонок, В. В. Давыдов, Е. Л. Гасич, А. А. Карлсен, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов // Молекулярная диагностика 2018 : сб. науч. Межд. науч.-практ. конф. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь [и др.] ; под ред. В. И. Покровского. – Минск, 2018. – С. 288–290.

22. Экспериментальное инфицирование кроликов вирусом гепатита E / А. А. Арабей, Ж. А. Макаревич, С. И. Марчук, С. В. Жаворонок // Здоровоохранение Кыргызстана. – 2018. – № 2. – С. 59–63.

#### **Тезисы докладов**

23. Вирусный гепатит E среди различных животных и людей в Республике Беларусь / С. В. Жаворонок, А. А. Арабей, Т. В. Зновец, Е. Н. Яговдик, В. В. Давыдов, П. А. Красочко, К. К. Кюрегян, М. И. Михайлов, Г. И. Алаторцева // Социально-значимые и особо опасные инфекционные заболевания : 3 Всерос.

науч.-практ. конф. с междунар. участием, Сочи, 1–4 нояб. 2016 г. : тез. докл. / М-во здравоохранения Рос. Федерации [и др.] ; редкол.: В. Н. Городин [и др.]. – Сочи, 2016. – С. 136–138.

24. Serological survey and molecular detection of hepatitis E virus in rabbits of Belarus / A. Arabey, S. I. Marchuk, Z. A. Makarevich, S. V. Zhavoronok // *Influenza and Zoonotic Diseases* : abstr. 3rd Int. Conf., Birmingham, 21–22 aug. 2017. – [Publ.] *J. of Immunol. Tech. & Infect. Dis.* – 2017. – Vol. 6, № 2. – P. 53.

25. Клинические и молекулярно-генетические варианты вирусного гепатита Е в РБ / С. В. Жаворонок, В. В. Давыдов, А. А. Арабей, М. И. Михайлов, К. К. Кюрегян, А. А. Карлсен, Ю. В. Кашкур, С. И. Марчук, Т. В. Зновец, Г. И. Алаторцева, Е. Л. Гасич, Ю. И. Шумский, Е. Н. Яговдик-Тележная, Л. А. Анисько, Т. А. Рогачева, М. Л. Доценко, Жмуровская, С. В. Крапивина, П. А. Красочко, Д. С. Борисовец // *Актуальные вопросы инфекционной патологии* : тез. III межрегион. форум специалистов совместно с заседанием профил. комис. М-ва здравоохранения Рос. Федерации по специальности «Инфекционные болезни», С.-Петербург., 25–26 апр. 2018 г. / М-во здравоохранения Рос. Федерации [и др.] ; редкол.: Е. В. Эсауленко [и др.]. – СПб., 2018. – С. 51–52.

26. Analysis of HEV seroprevalence in different countries [Electronic resource] / Y. Kashkur, S. Zhavoronok, A. Arabey, U. Davydau // *28th European Congress of clinical microbiology and infectious diseases* : abstr., Madrid, 21–24 apr. 2018. – Mode of access: [https://www.escmid.org/escmid\\_publications/escmid\\_elibrary/material/?mid=61121](https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid=61121). – Date of access: 21.04.2018. – Abstr. E0315.

27. Arabey, A. Animal reservoirs of hepatitis E virus in Belarus [Electronic resource] / A. A. Arabey, S. V. Zhavoronok, S. Marchuk // *28th European Congress of clinical microbiology and infectious diseases* : abstr., Madrid, 21–24 apr. 2018. – Mode of access: [https://www.escmid.org/escmid\\_publications/escmid\\_elibrary/material/?mid=61235](https://www.escmid.org/escmid_publications/escmid_elibrary/material/?mid=61235). – Date of access: 21.04.2018. – Abstr. E0314.

### **Инструкция по применению**

28. Метод молекулярно-генетического выявления РНК вируса гепатита Е (ВГЕ) : инструкция по применению № 055-0518 : утв. М-вом здравоохранения Респ. Беларусь 01.06.2018 / сост.: С. В. Жаворонок, С. И. Марчук, А. А. Арабей, В. В. Давыдов ; Белорус. гос. мед. ун-т. – Минск, 2018. – 14 с.

## РЭЗІЮМЭ

Арабей Анастасія Анатольеўна

### Цыркуляцыя ўзбуджальніка, патагенез і дыягностыка віруснага гепатыту E ў трусоў

**Ключавыя словы:** вірус гепатыту E, малекулярна-біялагічная структура, імунаглабуліны, рэкамбінантныя бялкі, аланінамінатрансфераза.

**Мэта даследавання:** распрацаваць метады дэтэкцыі РНК ВГЕ і спецыфічных да ВГЕ імунаглабулінаў у трусоў; вивучыць размеркаванне і асаблівасці цыркуляцыі ВГЕ сярод трусоў у рэгіёнах Рэспублікі Беларусь; даследаваць малекулярна-біялагічныя, клініка-біяхімічныя і марфалагічныя праявы гепатыту E ў трусоў.

**Метады даследавання:** біяхімічныя, сералагічныя, малекулярна-генетычныя, гісталагічныя, статыстычныя.

**Атрыманыя вынікі і іх навізна.** Упершыню ўсталявана доля дадатных на РНК ВГЕ фекалій трусоў у рэгіёнах Рэспублікі Беларусь 21,2% (76/359). Нуклеатыдныя паслядоўнасці штама ВГЕ, які цыркулюе сярод трусоў у Рэспубліцы Беларусь, найбольш блізкія да паслядоўнасцяў ВГЕ трусоў з Карэі (88,5–89,9%), Германіі (87,7–89,1%), Расіі (84,6–89,2%). Анты-ВГЕ-IgG выяўлены ў 20,2% (25/124) трусоў у рэгіёнах Рэспублікі Беларусь. Распрацавана імунаферментная тэст-сістэма для якаснага вызначэння анты-ВГЕ-IgG у сыворотцы крыві трусоў. Праведзена комплекснае даследаванне патагенетычных асаблівасцяў віруснага гепатыту E на мадэлі хваробы ў трусоў. Усталявана найбольшая выяўляльнасць РНК ВГЕ ў фекаліях і мачы трусоў у параўнанні з даследаваннем крыві. РНК ВГЕ вызначана ў жоўці, печані, селязенцы, кішачніку і нырках жывел. Пры гісталагічным аналізе ўзораў печані, нырак і селязенкі хворых трусоў назіраліся паталагічныя змены, характэрныя для запаленчага працэсу. Выяўлена экскрэцыя віруснай РНК з фекаліямі на працягу 10 месяцаў назірання за жывеламі.

**Рэкамендацыі па выкарыстанні:** атрыманыя вынікі могуць быць скарыстаны ў навуковых установах, што ажыццяўляюць даследаванне ўзбуджальніка віруснага гепатыту E, у лекава-прафілактычных установах аховы здароўя для маніторынгу гепатыту E, а таксама ва ўстановах ветэрынарнай службы.

**Галіна прымянення:** інфекцыйныя хваробы, вірусалогія, лабараторная дыягностыка, ветэрынарыя.

## РЕЗЮМЕ

Арабей Анастасия Анатольевна

### Циркуляция возбудителя, патогенез и диагностика вирусного гепатита E у кроликов

**Ключевые слова:** вирус гепатита E, молекулярно-биологическая структура, иммуноглобулины, рекомбинантные белки, аланинаминотрансфераза.

**Цель работы:** разработать методы детекции РНК вируса гепатита E и специфичных к нему иммуноглобулинов у кроликов; изучить распределение и особенности циркуляции вируса гепатита E среди кроликов в регионах Республики Беларусь; исследовать молекулярно-биологические, клинические, биохимические и морфологические проявления гепатита E у кроликов.

**Методы исследования:** биохимические, серологические, молекулярно-генетические, гистологические, статистические.

**Полученные результаты и их новизна.** Впервые установлена доля положительных на РНК ВГЕ образцов фекалий кроликов в регионах Республики Беларусь 21,2% (76/359). Нуклеотидные последовательности штамма ВГЕ, циркулирующего среди кроликов в Республике Беларусь, наиболее близки к последовательностям ВГЕ кроликов из Кореи (88,5–89,9%), Германии (87,7–89,1%), России (84,6–89,2%). Анти-ВГЕ-IgG выявлены у 20,2% (25/124) кроликов в регионах Республики Беларусь. Разработана иммуноферментная тест-система для качественного определения анти-ВГЕ-IgG в сыворотке крови кроликов. Проведено комплексное исследование патогенетических особенностей вирусного гепатита E на модели заболевания у кроликов. Установлена наибольшая выявляемость РНК ВГЕ в фекалиях и моче по сравнению с исследованием крови. РНК ВГЕ определена в желчи, печени, селезенке, кишечнике и почках животных. При гистологическом анализе образцов печени, почек и селезенки больных кроликов установлены патологические изменения, характерные для воспалительного процесса. Выявлена экскреция вирусной РНК с фекалиями на протяжении 10 месяцев наблюдения за животными.

**Рекомендации по использованию:** полученные результаты могут быть использованы в научных учреждениях, осуществляющих исследование возбудителя вирусного гепатита E, в лечебно-профилактических учреждениях здравоохранения для мониторинга гепатита E, а также в учреждениях ветеринарной службы.

**Область применения:** инфекционные болезни, вирусология, лабораторная диагностика, ветеринария.



## SUMMARY

**Arabey Anastasiya Anatolievna**

### **Circulation of the pathogen, pathogenesis and diagnostics of hepatitis E virus in rabbits**

**Key words:** hepatitis E virus, molecular structure, immunoglobulins, recombinant proteins, alanine aminotransferase.

**The aim of research:** to develop detection methods of HEV RNA and HEV specific immunoglobulins in rabbits; to study the distribution and features of HEV circulation among rabbits in the Republic of Belarus' regions; to research molecular biological, clinical, biochemical and morphological manifestations of hepatitis E in rabbits.

**Methods of research:** biochemical, serological, molecular, histological, statistical.

**The obtained results and their novelty.** 21,2% (76/359) excrement samples of rabbits from the Republic of Belarus' regions were established positive for HEV RNA. The HEV strain's nucleotide sequences, which are circulating among rabbits in the Republic of Belarus, are closest to rabbits' HEV sequences from Korea (88,5–89,9%), Germany (87,7–89,1%), Russia (84,6–89,2%). The circulation of anti-HEV-IgG in rabbits in the Republic of Belarus' regions was 20,2% (25/124). A system of enzyme-linked immunosorbent assay was developed for the qualitative determination of anti-HEV-IgG in serum samples of rabbits. A multipurpose study of pathogenetic features of viral hepatitis E was carried out on the infection model in rabbits. The highest detectability of RNA HEV was established in excrements and urine in contrast with blood tests. HEV RNA detected in bile, liver, spleen, intestines and kidneys of animals. Histological analysis of liver, kidney and spleen samples of sick rabbits detected pathological changes, which are peculiar to the inflammatory process. Observation of rabbits during 10 months has revealed the excretion of viral RNA in excrements throughout the study.

**Recommendations for use:** the obtained results can be used in scientific institutions, where the causative agent of viral hepatitis E is studied, in medical institutions for hepatitis E monitoring, as well as in veterinary service institutions.

**Field of application:** infectious diseases, virology, laboratory diagnostics, veterinary medicine.

**Автореферат**

диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**АРАБЕЙ Анастасии Анатольевны**

Подписано в печать 02.05.2019 г.

Формат 60x84<sup>1/16</sup> Бумага офсетная.

Гарнитура Times New Roman.

Усл. печ. л. 1,4. Тираж 60 экз. Заказ № 168

220003, г. Минск, ул. Брикета, 28

Тел./факс (+375 17) 50 88 131,

E-mail: bievnm@tut.by

Отпечатано на полиграфической базе  
РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского»