

ISSN 1817-7204(Print)

ISSN 1817-7239(Online)

УДК [619:616.98-074:578.826.2]:636.4(476)

Поступила в редакцию 05.05.2020

<https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-3-339-351>

Received 05.05.2020

**П. А. Красочко<sup>1</sup>, С. В. Жаворонок<sup>2</sup>, Д. С. Борисовец<sup>3</sup>, П. П. Красочко<sup>1</sup>, Г. И. Алаторцева<sup>4</sup>,  
Т. М. Прокопенкова<sup>3</sup>, В. В. Давыдов<sup>2</sup>, Л. А. Анисько<sup>2</sup>, Л. Н. Лухверчик<sup>4</sup>, Е. С. Журавлева<sup>3</sup>,  
Д. В. Бучукури<sup>3</sup>, В. В. Зверев<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>*Витебская государственная академия ветеринарной медицины, Витебск, Беларусь*<sup>2</sup>*Институт экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышеселского,**Национальная академия наук Беларуси, Минск, Беларусь*<sup>3</sup>*Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь*<sup>4</sup>*ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова», Москва, Россия*

### РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ПОЛУКОЛИЧЕСТВЕННОГО ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИТЕЛ У СВИНЕЙ К ВИРУСУ ГЕПАТИТА Е В РЕСПУБЛИКЕ БЕЛАРУСЬ

**Аннотация:** Инфекция вирусного гепатита Е поражает до 80–100 % домашних свиней во всем мире и характеризуется высокой серопревалентностью среди поголовья домашних свиней в странах с умеренным климатом. В Республике Беларусь эпизоотический мониторинг ВГЕ-инфекции является недостаточным ввиду отсутствия необходимого количества доступных и недорогих диагностических ИФА тест-систем с хорошей чувствительностью и специфичностью. В этой связи проведение исследований по разработке отечественной тест-системы для полуколичественного выявления антител к вирусу гепатита Е у свиней с последующей оценкой серопревалентности к ВГЕ в популяции свиней в Республике Беларусь является актуальным. В статье представлены результаты исследований по разработке иммуноферментной тест-системы для полуколичественного определения иммуноглобулинов класса G к ВГЕ в сыворотке крови свиней с использованием рекомбинантных белков, включающих иммунодоминантные аминокислотные последовательности, соответствующие белкам ORF2 и ORF3 ВГЕ 3-го генотипа. Определена оптимальная концентрация для сорбции белков ORF2 и ORF3 – 2 и 1 мкг/мл соответственно. Диагностическая чувствительность данной тест-системы составляет 94,8 %, а диагностическая специфичность – 100 %. Коэффициенты вариации, являющиеся критерием оценки внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости данной тест-системы, составляют 3,5 и 12,4 % соответственно, что позволяет получать воспроизводимые результаты и выявлять специфические антитела к ВГЕ во всех положительных образцах сывороток крови свиней. При исследовании 1235 проб сывороток свиней из разных свиноводческих хозяйств Брестской, Витебской, Гомельской, Гродненской, Минской и Могилевской областей антитела к антигенам вируса гепатита Е (ВГЕ) были обнаружены у 168, или у 13,6 % животных. Описанный метод диагностики может найти широкое применение для науки и практики с целью дальнейшего изучения серопревалентности анти-ВГЕ. **Благодарности.** Работа выполнена в рамках Межгосударственной программы инновационного сотрудничества государств – участников СНГ на период до 2020 года при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, идентификатор проекта RFMEFI61316X0061, и Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь.

**Ключевые слова:** свиньи, вирус гепатита Е, иммуноферментный анализ, диагностическая тест-система, рекомбинантные антигены, конъюгат, диагностическая чувствительность, специфичность, серопревалентность, сыворотка крови, специфические антитела

**Для цитирования:** Разработка тест-систем для полуколичественного выявления антител у свиней к вирусу гепатита Е в Республике Беларусь / П. А. Красочко, С. В. Жаворонок, Д. С. Борисовец, П. П. Красочко, Г. И. Алаторцева, Т. М. Прокопенкова, Е. С. Журавлева // Вест. Нац. акад. навук Беларусі. Сер. аграр. навук. – 2020. – Т. 58, №3. – С. 339–351. <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-3-339-351>

**Petr A. Krasochko<sup>1</sup>, Sergey V. Zhavoronok<sup>2</sup>, Dzmitry S. Barysavets<sup>3</sup>, Pavel P. Krasochko<sup>1</sup>, Galina I. Alatorseva<sup>4</sup>,  
Tatsiana M. Prokopenkova<sup>3</sup>, Vladimir V. Davydov<sup>2</sup>, Ludmila A. Anisko<sup>2</sup>, Ludmila N. Luhverchik<sup>4</sup>,  
Ekaterina S. Zhuravleva<sup>3</sup>, Djemal V. Buchukuri<sup>3</sup>, Vitali V. Zverev<sup>4</sup>**

<sup>1</sup>*Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, Vitebsk, Belarus*<sup>2</sup>*Institute of Experimental Veterinary Medicine named of S. N. Vysheselsky,**the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus*<sup>3</sup>*Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus*<sup>4</sup>*Institute of Vaccines and Serums named of I. I. Mechnikov, Moscow, Russia*

### DEVELOPMENT OF ELISA TEST KITS FOR SEMI-QUANTITATIVE DETECTION OF ANTI-HEV ANTIBODIES IN PIGS IN THE REPUBLIC OF BELARUS

**Abstract:** Viral hepatitis E infection affects up to 80-100 % of domestic pigs worldwide and is characterized by high seroprevalence among domestic pigs in temperate climate countries. Epizootic monitoring of HEV infection is insufficient in the Republic of Belarus due to lack of the required number of available and inexpensive diagnostic ELISA kits with good sensitivity and specificity. In this regard, research on development of domestic ELISA kit for semi-quantitative detection of

antibodies to hepatitis E virus in pigs with subsequent assessment of seroprevalence to HEV in pig population in the Republic of Belarus is relevant. The results of studies on development of enzyme-linked immunosorbent assay kit for semi-quantitative determination of class G immunoglobulins to HEV in pig blood serum using recombinant proteins, including immunodominant amino acid sequences corresponding to the ORF2 and ORF3 proteins of HEV genotype 3 are presented in the paper. The optimal concentration for sorption of ORF2 and ORF3 proteins has been determined, which is 2 µg/ml and 1 µg/ml, respectively. The diagnostic sensitivity of this test kit makes 94.8 %, and the diagnostic specificity makes 100 %. Coefficients of variation being the criterion for assessing the intra-serial and inter-serial reproducibility of this test kit, make 3.5 % and 12.4 %, respectively, which allows to obtain reproducible results and identify specific anti-HEV antibodies in all positive samples of pig blood serum. When studying 1235 pig sera samples from various pig farms of Brest, Vitebsk, Gomel, Grodno, Minsk and Mogilev regions, seroprevalence of anti-HEV antibodies has been determined in 168 or 13.6 % of animals. The described diagnostic method can be widely used in science and practice for the further study of seroprevalence of anti-HEV.

**Acknowledgments.** The research was carried out as part of the Interstate program of innovation cooperation of States - participants of the CIS up to 2020, with the financial support of the Ministry of education and science of the Russian Federation, the project ID RFMEFI61 316X0 061, and the State Committee for Science and Technology of the Republic of Belarus.

**Keywords:** pigs, hepatitis E virus, enzyme immunoassay, diagnostic test system, recombinant antigens, conjugate, diagnostic sensitivity, specificity, seroprevalence, blood serum, specific antibodies

**For citation:** Krasochko P. A., Zhavoronok S. V., Barysavets D. S., Krasochko P. P., Alatortseva G. I., Prokopenkova T. M., Davydov V. V., Anisko L. A., Luhverchik L. N., Zhuravleva E. S., Buchukuri D. V., Zverev V. V. Development of ELISA test kits for semi-quantitative detection of anti-HEV antibodies in pigs in the Republic of Belarus. *Vestsi Natsyonal'ny akademii navuk Belarusi. Seryya agrarnykh navuk = Proceedings of the National Academy of Sciences of Belarus. Agrarian series*, 2020, vol. 58, no 3, pp. 339–351 (in Russian). <https://doi.org/10.29235/1817-7204-2020-58-3-339-351>

**Введение.** Инфицирование вирусом гепатита Е является основной причиной острого гепатита во всем мире [1]. Вирус гепатита Е (ВГЕ) представляет собой небольшой РНК-содержащий безоболочечный вирус, который классифицируется как единственный представитель р. *Orthohepevirus* в сем. *Hepeviridae*.

В настоящее время известно 8 генотипов ВГЕ. Генотипы 1 и 2 заражают только людей и в основном ответственны за крупные вспышки заболеваний, передаваемых через воду, в развивающихся странах [2, 3]. Штаммы ВГЕ 3-го и 4-го генотипов были выделены у домашних свиней и диких кабанов, заражающих свиней и людей, штамм ВГЕ 5-го генотипа – от диких кабанов, он может инфицировать приматов [4]. До настоящего времени штаммы ВГЕ 6-го генотипа были выделены только от диких кабанов [5], и его зоонозный потенциал неизвестен. Генотипы вируса 7 и 8 выделены от верблюдов и могут инфицировать приматов [1, 4].

По меньшей мере четыре генотипа ответственны за заболевания у людей [6, 7]. Генотипы 3 и 4 являются автохтонными в промышленно развитых странах [7], при этом основной путь их передачи все еще остается неясным. Имеются сообщения о переливаниях и инфекциях, связанных с трансплантацией [8–10], но накапливающиеся данные свидетельствуют о том, что гепатит Е является зоонозом.

Генотипы 3 и 4 ВГЕ были выявлены у нескольких видов животных. В 1997 г. X.J. Meng et al. [11] впервые сообщили об обнаружении вируса у свиней в США. С тех пор ВГЕ был выделен у различных видов животных, таких как: олень, кабан, обезьяна, мангуст, кролик, хорек, форель, летучая мышь, крыса, курица, пустельга, сокол, верблюд и форель [4, 12]. Однако только свиньи, кабаны и олени считаются истинными резервуарами вируса для человека [13].

Потребление мяса и мясных продуктов от инфицированных ВГЕ животных, подвергнутых недостаточной термической обработке, может привести к попаданию вируса в организм человека, что представляет проблему для общественного здравоохранения [14]. Первые доказательства зоонозной передачи генотипа 3 ВГЕ были обнаружены в Японии в 2003 г., когда несколько случаев заражения гепатитом Е были связаны с потреблением мяса или внутренних органов свиней и оленей [15, 16]. Дополнительные сообщения о случаях заболевания людей, употреблявших в пищу мясо дикого кабана на гриле в Японии, мясо свинины в Испании, колбасу фигателли на Корсике, предоставили дополнительные доказательства того, что ВГЕ является зоонозом, который может передаваться при употреблении инфицированной пищи [17–19]. Исследование нуклеотидной последовательности, выделенной из биологического материала, полученного из организма пациента в Республике Беларусь в 2017 г., употреблявшего свиную печень, не прошедшую термическую обработку, позволило установить высокую степень гомологии с последовательностью ВГЕ, выделенной из фекалий домашней свиньи из Минской области, а также последовательностью, выделенной из организма дикого кабана в Смолевичском районе Минской области.

Все три последовательности кластеризуются в одной филогенетической ветви филогенетического дерева в 87 % репликаций. Величина эволюционных дистанций между этими последовательностями составляет  $0,13 \pm 0,025$  и  $0,14 \pm 0,025$  соответственно, что, вероятно, свидетельствует об аутохтонном характере данного случая ВГЕ-инфекции [20].

Свиньи, обычно с субклинической инфекцией, считаются наиболее важным резервуаром ВГЕ [21]. С. Seminati et al. [22] изучали динамику инфекции на серопозитивных свинофермах. Они проанализировали наличие антител и вирусной РНК в разных возрастных группах и пришли к выводу, что циркуляция ВГЕ обычно происходит в конце подсосного периода или в начале периода откорма. Установлено, что взрослые свиноматки могут играть роль резервуара ВГЕ и передавать вирус поросётам-сосунам [22–26]. Свиньи младше 2-месячного возраста защищены от инфекции ВГЕ благодаря наличию материнских антител [11, 27, 28].

Инфекция ВГЕ поражает до 80–100 % домашних свиней во всем мире, которые обычно переболевают в возрасте 2–4 месяцев [5]. В Европе высокая серопревалентность ВГЕ была обнаружена у свиней в Испании [22, 29], Италии [27, 30, 31], Норвегии [32], Дании [24], Великобритании [33, 34], Эстонии [35], Германии [36, 37], Швейцарии [2]. В процессе проведенных серологических исследований установлено, что от 76 до 98 % испанских свиноводческих хозяйств были серопозитивными. Это, в свою очередь, свидетельствует о циркуляции ВГЕ [22, 34, 38]. Некоторые фермы не содержали вирус, в то время как в других до 100 % животных имели определяемые уровни IgG [22, 29]. С. Vaechlein et al. [39] показали, что в Германии в 78,2 % исследованных хозяйств было выявлено как минимум одно серопозитивное животное.

Для серологической диагностики гепатита Е у свиней в настоящее время на рынке представлены зарубежные ИФА тест-системы: Векторген-Е IgG (ЗАО «Вектор-Бест», Россия), ID Screen Hepatitis E Indirect Multispecie (ID.Vet, Франция), PrioCheck HEV Antibody ELISA Kit (ThermoFishe, США), HEV-IgG ELISA Kit (MyBiosource, США) и др.

Однако, стоит отметить, что в Республике Беларусь эпизоотический мониторинг ВГЕ-инфекции является недостаточным ввиду отсутствия необходимого количества доступных и недорогих диагностических ИФА тест-систем с хорошей чувствительностью и специфичностью, а также недостаточной информированностью ветеринарных специалистов о ВГЕ, что является необходимым условием для выявления гепатита Е, будь то спорадические случаи или возникающие вспышки, и проведения соответствующих лечебно-профилактических и ветеринарно-санитарных мероприятий.

Цель настоящих исследований – разработать тест-систему для полуколичественного выявления антител к вирусу гепатита Е у свиней и оценить серопревалентность к ВГЕ в популяции свиней в Республике Беларусь с использованием сконструированной диагностической тест-системы.

**Материалы и методы исследования.** Исследования проводились на базе Института экспериментальной ветеринарии им. С. Н. Вышелесского Национальной академии наук, Белорусского государственного медицинского университета, Витебской ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины и свиноводческих хозяйств Республики Беларусь в 2018–2020 гг. Для разработки тест-системы для полуколичественного выявления IgG-антител у свиней к ВГЕ методом ИФА были использованы следующие материалы: рекомбинантные антигены вируса гепатита Е ORF2 и ORF3, синтезированные и представленные нам сотрудниками ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова»; полистироловые планшеты; конъюгаты хрена против иммуноглобулинов свиней G класса; перекись водорода; тетраметилбензидин; серная кислота; буферные растворы.

Для определения противовирусных антител у инфицированных вирусом гепатита Е (иммуноглобулины класса G) использовали тест-системы Векторген-Е IgG (аналог), ЗАО «Вектор-Бест» (Новосибирск, Россия)

В качестве антигена использованы рекомбинантные антигены ORF2 и ORF3, синтезированные и представленные нам сотрудниками ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (Г. И. Алаторцева) [40–43], которые сорбированы на полистироловые планшеты после предварительной обработки их ультрафиолетовым излучением для повышения адгезивности. Оптимальная концентрация для сорбции на полистироловые планшеты для антигенов ORF2 и ORF3 составила 8 мкг/мл в 0,05 М карбонатном буфере, pH 9,5. Для получения детектирующего реагента использовали оптимальное разведение

Т а б л и ц а 1. Место и количество отобранных проб

T a b l e 1. Location and number of samples taken

Область	Поросята-сосуны	Поросята-отъемыши	Группа откорма	Свиноматки
Брестская	–	20/2	80/8	50/5
Витебская	30/3	15/2	160/16	140/14
Гомельская	20/2	20/2	60/6	90/9
Гродненская	30/3	20/2	80/8	110/11
Минской	25/3	25/3	60/6	70/7
Могилевская	20/2	40/4	80/8	50/5
<i>Итого</i>	<i>125/13</i>	<i>140/14</i>	<i>460/46</i>	<i>510/51</i>

П р и м е ч а н и е. Количество проб по группам животных / количество пулов сывороток крови.

ведении 1 : 10, инкубировали 30 мин при температуре 37 °С, промывали 5 раз. Затем добавляли раствор конъюгата. Для исследования сывороток крови животных вместо конъюгатов использовали раствор белка А стафилококка, конъюгированного с пероксидазой хрена. Инкубировали 30 мин при температуре 37 °С, промывали 5 раз и добавляли субстрат (тетраметилбензидин). Инкубировали при комнатной температуре в течение 25 мин. Затем добавляли серную кислоту (стоп-реагент). Спектрофотометрически определяли уровень оптической плотности при постановке ИФА.

Для исследований по изучению распространения гепатита Е у свиней был отобран биологический материал из свиноводческих хозяйств Брестской, Витебской, Гомельской, Гродненской, Минской и Могилевской областей (табл. 1). Всего было отобрано 1235 проб сывороток из разных свиноводческих хозяйств Брестской, Витебской, Гомельской, Гродненской, Минской и Могилевской с учетом разных возрастных групп свиней.

**Результаты и их обсуждение.** Для разработки тест-систем для полуколичественного выявления IgG- и IgM-антител у свиней к ВГЕ методом ИФА были получены генно-инженерные полипептиды с антигенной последовательностью вируса гепатита Е 1 генотипа, конъюгированные с бета-галактозидазой из ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И. И. Мечникова» (Москва, Россия).

При разработке диагностических тест-систем осуществляли подбор концентраций и буфера для сорбции полипептидов ORF2 и ORF3 на полистироловые планшеты после предварительной обработки его ультрафиолетовым излучением для повышения адгезивности для сорбции рекомбинантного антигена. При проведении отработки условий нанесения антигенов на планшет, а также подбора его оптимальной концентрации установлено, что оптимальная концентрация полипептидов для сорбции полипептидов ORF2 и ORF3, составляющая 2 и 1 мкг/мл соответственно в 0,005 М карбонатном буфере, рН 9,5.

Для конструирования тест-системы с целью выявления антител к вирусу гепатита Е у свиней на первом этапе провели определение антител к вирусу гепатита Е в сыворотках свиней. Для постановки использовали заранее положительные сыворотки от животных (ГВ), отрицательные (ГН) и предположительно больных гепатитом свиней, от которых получаемое потомство имеет высокие показатели смертности (ЦБ). Распределение сывороток в планшете показано в табл. 2.

При постановке ИФА были получены результаты оптической плотности, отраженные в табл. 3, в соответствии со схемой расположения сывороток крови.

Интерпретация результатов основывается на расчете коэффициента связывания антител по следующей формуле:

$$K_{св} = \frac{A_{450}ОП_{ср} - A_{450}K_{ср}^-}{A_{450}K_{ср}^+ + A_{450}K_{ср}^-} \times 100 \%,$$

где  $K_{св}$  – коэффициент связывания антител;  $A_{450}ОП_{ср}$  – оптическая плотность пробы сыворотки крови;  $A_{450}K_{ср}^+$  – средняя оптическая плотность положительного контроля;  $A_{450}K_{ср}^-$  – средняя оптическая плотность отрицательного контроля.

универсального конъюгата – белка А стафилококка с пероксидазой хрена для проявления тестируемых сывороток людей и животных (свиней, кроликов). Для выявления антител животных использован также соответствующий антивидовой конъюгат. Поэтому в работе мы использовали вторичные кроличьи антитела против иммуноглобулинов класса G свиньи, меченные пероксидазой хрена (Thermo Scientific, США) – конъюгат TS и соответствующий им субстрат – 3,3',5,5'Тетраметилбензидин (Thermo Scientific, США) в концентрации 0,1 мкг/мл.

Для постановки ИФА в лунки планшета вносили положительный и отрицательный контроли и исследуемые образцы сывороток в раз-

При расчете коэффициента связывания антител были получены результаты, отраженные в табл. 4. Результат считается положительным при значении коэффициента более 20 %.

Таким образом, после постановки ИФА в нашей панели мы имеем широкий спектр значений, охватывающий диапазон от отрицательных проб до проб с высокой концентрацией антител, при этом имеются и образцы, показывающие слабо положительные результаты.

Для нас представляют интерес все образцы, особенно имеющие пограничные значения около критерия положительности пробы (20 %). Они позволят подобрать оптимальную концентрацию конъюгата против IgG свиньи, сохранив диагностическую точность набора. Ввиду того, что при гепатите E мы будем выявлять иммуноглобулины класса G, полученная концентрация может быть применима в другой тест-системе.

В соответствии с полученными результатами отправной точкой в оптимизации конъюгата является разведение стокового раствора в диапазоне (1 : 500)–(1 : 1000). Поэтому мы испытали следующие концентрации: 0,01; 0,1 и 0,3 мкг/мл.

В результате постановки реакции с набором сывороток для выявления антител против вируса гепатита E и использовании конъюгата против IgG свиньи в различных разведениях были получены результаты, отраженные в табл. 5, 6. Расположение сывороток аналогично предыдущему.

Как видно из табл. 5, 6, наиболее эффективной концентрацией конъюгата против IgG свиньи является 0,1 мкг/мл, при использовании которой наблюдалось практически полное совпадение результатов с изначально полученными с коммерческим набором. Кроме того, такая

**Таблица 2. Схема расположения сывороток крови свиней в иммунологическом планшете**

**Table 2. Layout of pig blood serum in immunological array**

	1	2	3	4	5	6
A	K+	ГВ 5	ГВ 13	ГН 6	ГН 14	ЦБ7
B	K+	ГВ 6	ГВ 14	ГН 7	ГН 15	ЦБ8
C	K-	ГВ 7	ГВ 15	ГН 8	ЦБ1	ЦБ9
D	K-	ГВ 8	ГН 1	ГН 9	ЦБ2	ЦБ10
E	ГВ 1	ГВ 9	ГН 2	ГН 10	ЦБ3	ЦБ11
F	ГВ 2	ГВ 10	ГН 3	ГН 11	ЦБ4	ЦБ12
G	ГВ 3	ГВ 11	ГН 4	ГН 12	ЦБ5	ЦБ13
H	ГВ 4	ГВ 12	ГН 5	ГН 13	ЦБ6	ЦБ14

**Примечание.** «K+» – положительный контроль; «K-» – отрицательный контроль.

**Таблица 3. Значения оптической плотности при постановке ИФА на выявление антител к вирусу гепатита E**

**Table 3. Optical density values when performing ELISA for detecting antibodies to hepatitis E virus**

	1	2	3	4	5	6
A	1,756	1,845	0,816	0,302	0,197	1,097
B	1,81	0,514	1,911	0,316	0,154	1,128
C	0,052	0,614	1,676	0,255	0,414	0,51
D	0,049	1,968	0,416	0,248	0,269	0,334
E	2,145	2,082	0,325	0,601	0,365	0,152
F	1,476	1,08	0,214	0,409	0,618	0,097
G	1,402	1,516	0,255	0,286	0,344	0,085
H	1,541	0,992	0,401	0,114	0,167	0,911

**Таблица 4. Результат расчета коэффициента связывания антител при выявлении антител при постановке ИФА на выявление антител к вирусу гепатита E**

**Table 4. Result of calculating ratio of antibodies binding when detecting antibodies when performing ELISA for detecting antibodies to hepatitis E virus**

	1		2		3		4		5		6	
	%	Результат	%	Результат	%	Результат	%	Результат	%	Результат	%	Результат
A	–	–	103,6	+	44,2	+	14,5	–	8,5	–	60,4	+
B	–	–	26,8	+	107,4	+	15,3	–	6,0	–	62,2	+
C	–	–	32,5	+	93,8	+	11,8	–	21,0	+	26,5	+
D	–	–	110,7	+	21,1	+	11,4	–	12,6	–	16,4	–
E	120,9	+	117,3	+	15,8	–	31,8	+	18,2	–	5,9	–
F	82,3	+	59,4	+	9,4	–	20,7	+	32,8	+	2,7	–
G	78,0	+	84,6	+	11,8	–	13,6	–	16,9	–	2,0	–
H	86,0	+	54,3	+	20,2	+	3,7	–	6,7	–	49,7	+

Таблица 5. Оптические плотности при постановке ИФА с конъюгатом против IgG свиньи в разных концентрациях

Table 5. Optical densities for performing ELISA with pig anti IgG conjugate at different concentrations

	1	2	3	4	5	6
<i>Концентрация 0,3 мкг/мл</i>						
A	2,635	2,815	1,289	0,511	0,284	1,714
B	2,711	0,669	2,716	0,421	0,216	1,635
C	0,212	0,934	2,468	0,392	0,735	0,688
D	0,221	2,847	0,697	0,413	0,501	0,583
E	3,116	3,016	0,455	0,842	0,62	0,194
F	2,286	1,716	0,316	0,623	1,116	0,169
G	2,114	2,179	0,452	0,499	0,599	0,134
H	2,41	1,355	0,695	0,185	0,279	1,42
<i>Концентрация 0,1 мкг/мл</i>						
A	1,994	2,122	0,938	0,347	0,227	1,262
B	1,914	0,591	2,198	0,363	0,177	1,297
C	0,045	0,706	1,927	0,293	0,476	0,587
D	0,039	2,263	0,478	0,285	0,309	0,384
E	2,467	2,394	0,374	0,691	0,450	0,175
F	1,697	1,242	0,246	0,470	0,711	0,112
G	1,612	1,743	0,293	0,329	0,396	0,098
H	1,772	1,141	0,461	0,131	0,192	1,048
<i>Концентрация 0,01 мкг/мл</i>						
A	0,878	0,846	0,367	0,137	0,087	0,512
B	0,905	0,164	0,899	0,144	0,064	0,467
C	0,042	0,211	0,767	0,116	0,157	0,168
D	0,056	0,984	0,155	0,118	0,134	0,134
E	0,984	0,891	0,134	0,261	0,184	0,076
F	0,647	0,485	0,111	0,152	0,283	0,058
G	0,612	0,642	0,127	0,125	0,163	0,046
H	0,674	0,457	0,194	0,062	0,088	0,392

скрининга большого количества образцов, при этом по своей чувствительности практически не уступает индивидуальному исследованию сывороток крови.

В табл. 7 приведены результаты обследования 1235 проб сывороток свиней из разных свиноводческих хозяйств Брестской, Витебской, Гомельской, Гродненской, Минской и Могилевской областей разных возрастных групп свиней. Антитела к антигенам ВГЕ были обнаружены у 168, или у 13,6 % животных: у поросят-сосунов – 12 %, поросят-отъемышей – 17 %, животных группы откорма – 12,6 %, свиноматок – 13,9 %. Полученные результаты были подтверждены выборочным исследованием негативных и позитивных проб на иммунологических панелях «HEV IgG» производства НПО «Диагностические системы».

В целом результаты исследований показали широкое территориальное распространение инфицированности свиней вирусом гепатита Е. Вместе с тем, скорее всего, это была скрытая инфекция без выраженных клинических признаков, причем она не приобретала тенденции к значительному охвату поголовья (13,6 % инфицированных).

Общая серопревалентность всех изученных животных ( $n = 1101$ ) составила 32,4 % (95 %, доверительный интервал (ДИ) = 29,15–35,97). Маркеры инфицирования ВГЕ у свиней Могилевской области ( $n = 264$ ) были обнаружены в 26,1 % (95 %, ДИ = 20,34–33,08), Витебской области ( $n = 477$ ) – 28,3 % (95 %, ДИ = 23,73–33,50), Минской области ( $n = 293$ ) – 36,9 % (95 %, ДИ = 30,24–44,50), Гродненской области ( $n = 67$ ) – 67,2 % (95 %, ДИ = 48,99–89,87). Анти-ВГЕ

концентрация позволяла несколько повысить чувствительность метода – проба ЦБЗ, показывавшая отрицательный результат в исходном наборе, имела слабо положительный результат в модифицированном методе. Более высокая концентрация конъюгата (0,3 мкг/мл) приводила к значительному повышению оптической плотности отрицательного контроля, что сказывалось на конечном результате в виде снижения диагностической чувствительности набора – слабо положительные пробы (ГВ 6, ГН 5, ГН 11, ЦБ9) демонстрировали отрицательный результат. В то же время уменьшение концентрации конъюгата до 0,01 мкг/мл снижало чувствительность набора. Изначально положительные пробы с низким содержанием антител в данном варианте показывали отрицательный результат, что в итоге приводило к 7 ложноотрицательным значениям.

Установленную оптимальную концентрацию конъюгата (0,1 мкг/мл) использовали в дальнейшем для выявления антител свиней против вируса гепатита Е.

Многие ИФА тест-системы, предназначенные для мониторинга серологического статуса поголовья, имеют высокую чувствительность, что позволяет исследовать сыворотки пулом, т.е. объединять несколько проб в одну. В первую очередь на эту возможность влияет аффинность антител конъюгата: чем более аффинны антитела в конъюгате, тем меньшая концентрация их требуется для получения должного уровня оптической плотности, превышающего фоновый уровень. Такой подход позволяет сократить время и материальные ресурсы для

Т а б л и ц а 6. Результат пересчета оптических плотностей в коэффициенты связывания антител при постановке ИФА с конъюгатом против IgG свиньи в разных концентрациях

Table 6. Result of recalculation of optical densities in ratios of antibodies binding when performing ELISA with pig anti IgG conjugate at different concentrations

	1		2		3		4		5		6	
	%	Результат	%	Результат	%	Результат	%	Результат	%	Результат	%	Результат
<i>Концентрация 0,3 мкг/мл</i>												
A	–	–	105,8	+	43,7	+	12,0	–	2,7	–	61,0	+
B	–	–	18,4	–	101,8	+	8,3	–	0,0	–	57,7	+
C	–	–	29,2	+	91,7	+	7,1	–	21,1	+	19,2	–
D	–	–	107,1	+	19,6	–	8,0	–	11,6	–	14,9	–
E	118,0	+	114,0	+	9,7	–	25,5	+	16,4	–	-0,9	–
F	84,2	+	61,0	+	4,1	–	16,5	–	36,6	+	-1,9	–
G	77,2	+	79,9	+	9,6	–	11,5	–	15,6	–	-3,4	–
H	89,3	+	46,3	+	19,5	–	-1,3	–	2,5	–	49,0	+
<i>Концентрация 0,1 мкг/мл</i>												
A	–	–	108,8	+	46,9	+	16,0	–	9,7	–	63,8	+
B	–	–	28,7	+	112,7	+	16,8	–	7,1	–	65,6	+
C	–	–	34,7	+	98,6	+	13,1	–	22,7	+	28,5	+
D	–	–	116,2	+	22,8	+	12,7	–	14,0	–	17,9	–
E	126,8	+	123,0	+	17,4	–	34,0	+	21,3	+	6,9	–
F	86,6	+	62,8	+	10,7	–	22,4	+	35,0	+	3,6	–
G	82,1	+	89,0	+	13,1	–	15,0	–	18,5	–	2,9	–
H	90,5	+	57,5	+	21,9	+	4,7	–	7,8	–	52,6	+
<i>Концентрация 0,01 мкг/мл</i>												
A	–	–	94,6	+	37,7	+	10,4	–	4,5	–	55,0	+
B	–	–	13,6	–	100,9	+	11,3	–	1,8	–	49,6	+
C	–	–	19,2	–	85,2	+	8,0	–	12,8	–	14,1	–
D	–	–	111,0	+	12,6	–	8,2	–	10,1	–	10,1	–
E	111,0	+	99,9	+	10,1	–	25,2	+	16,0	–	3,2	–
F	71,0	+	51,8	+	7,4	–	12,2	–	27,8	+	1,1	–
G	66,8	+	70,4	+	9,3	–	9,0	–	13,5	–	-0,4	–
H	74,2	+	48,4	+	17,2	–	1,5	–	4,6	–	40,7	+

Т а б л и ц а 7. Результаты изучения наличия антител к вирусу гепатита Е у свиней из различных свиноводческих хозяйств Республики Беларусь

Table 7. Results of studying availability of antibodies to hepatitis E virus in pigs from various regions of Republic of Belarus

Область	Поросята-сосуны	Поросята-отъемыши	Группа откорма	Свиноматки
Брестская	–	20/5/25	80/8/10	50/7/14
Витебская	30/3/10	15/3/20	160/17/10,6	140/18/13
Гомельская	20/3/15	20/4/20	60/7/11,7	90/12/13,3
Гродненская	30/4/13	20/3/15	80/10/12,5	110/16/14,6
Минская	25/3/12	25/2/25	60/5/8,3	70/11/15,7
Могилевская	20/2/10	40/7/17,5	80/11/13,8	50/7/14
Итого	125/15/12	140/24/17	460/58/12,6	510/71/13,9

П р и м е ч а н и е. Количество проб по группам животных / количество положительных проб / % положительных проб.

IgG были выявлены у 37,8 % (184/487) животных, выращиваемых в личных подворных хозяйствах. Свины, выращиваемые в сельскохозяйственных предприятиях Беларуси, имели более низкий статистически достоверный ( $P < 0,05$ ) показатель серопревалентности, который составил 16,4 % (71/432).

В то же время, по данным наших предыдущих исследований [44], уровень серопревалентности IgG среди поголовья свиней в Республике Беларусь составлял 33,8 % (95 %, ДИ = 30,44–37,32; 380/1126). Снижение частоты обнаружения анти-ВГЕ может быть обусловлено проведением на свиноводческих комплексах плановых лечебно-профилактических обработок и ветеринарно-санитарных мероприятий.

### Выводы

1. Разработана иммуноферментная тест-система для полуколичественного определения иммуноглобулинов класса G к ВГЕ в сыворотке крови свиней с использованием рекомбинантных белков, включающих иммунодоминантные аминокислотные последовательности, соответствующие белкам ORF2 и ORF3 ВГЕ 3-го генотипа.

2. Определена оптимальная концентрация для сорбции белков ORF2 и ORF3 – 2 и 1 мкг/мл соответственно. Диагностическая чувствительность данной тест-системы составляет 94,8 %, а диагностическая специфичность – 100 %. Коэффициенты вариации, являющиеся критерием оценки внутрисерийной и межсерийной воспроизводимости данной тест-системы, составляют 3,5 и 12,4 % соответственно, что позволяет получать воспроизводимые результаты и выявлять специфические антитела к ВГЕ во всех положительных образцах сывороток крови свиней.

3. Продемонстрирована циркуляция вируса гепатита E среди свиней в Республике Беларусь. При исследовании 1235 проб сывороток свиней из разных свиноводческих хозяйств Брестской, Витебской, Гомельской, Гродненской, Минской и Могилевской областей антитела к антигенам ВГЕ были обнаружены у 168, или у 13,6 % животных.

Описанный метод диагностики может найти широкое применение на практике для дальнейшего изучения серопревалентности анти-ВГЕ.

**Благодарности.** Работа выполнена в рамках Межгосударственной программы инновационного сотрудничества государств – участников СНГ на период до 2020 года при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации, идентификатор проекта RFMEFI61316X0061, и Государственного комитета по науке и технологиям Республики Беларусь.

### Список использованных источников

1. Transmission of a novel genotype of hepatitis E virus from Bactrian camels to cynomolgus macaques / L. Wang [et al.] // *J. of Virology*. – 2019. – Vol. 93, N 7. – P. e02014–e02018. <https://doi.org/10.1128/jvi.02014-18>
2. Molecular virology of hepatitis E virus / R.P. Holla [et al.] // *Seminars in Liver Disease*. – 2013. – Vol. 33, N 1. – P. 3–14. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1338110>.
3. Hepatitis E virus infection: Epidemiology and treatment implications / G.Y. Lee [et al.] // *World J. of Virology*. – 2015. – Vol. 4, N 4. – P. 343–355. <https://doi.org/10.5501/wjv.v4.i4.343>
4. Zoonotic hepatitis E virus: classification, animal reservoirs and transmission routes / V. Doceul [et al.] // *Viruses*. – 2016. – Vol. 8, N 10. – Art. 270. <https://doi.org/10.3390/v8100270>
5. Meng, X.J. Recent advances in hepatitis e virus / X.J. Meng // *J. of Viral Hepatitis*. – 2010. – Vol. 17, N 3. – P. 153–161. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01257.x>
6. Detection of IgM and IgG against hepatitis E virus in serum and meat juice samples from pigs at slaughter in Bavaria, Germany / S. Wacheck [et al.] // *Foodborne Pathogens a. Disease*. – 2012. – Vol. 9, N 7. – P. 655–660. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1141>
7. Murali, A.R. Chronic hepatitis E: A brief review / A.R. Murali, V. Kotwal, S. Chawla // *World J. of Hepatology*. – 2015. – Vol. 7, N 19. – P. 2194–2201. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i19.2194>
8. Genome sequence of a hepatitis e virus of genotype 3e from a chronically infected kidney transplant recipient / V. Moal [et al.] // *Genome Announcements*. – 2014. – Vol. 2, N 1. – P. e01156-13. <https://doi.org/10.1128/genomea.01156-13>
9. Hepatitis e virus of subtype 3i in chronically infected kidney transplant recipients in southeastern France / V. Moal [et al.] // *J. of Clinical Microbiology*. – 2014. – Vol. 52, N 11. – P. 3967–3972. <https://doi.org/10.1128/jcm.02028-14>
10. Hepatitis E: An old infection with new implications / G. Marano [et al.] // *Blood Transfusion*. – 2015. – Vol. 13, N 1. – P. 6–20. <https://doi.org/10.2450/2014.0063-14>
11. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus / X.J. Meng [et al.] // *Proc. of the Nat. Acad. of Sciences of the USA*. – 1997. – Vol. 94, N 18. – P. 9860–9865. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9860>



12. Обнаружение вируса гепатита E среди кроликов в Республике Беларусь / А. А. Арабей [и др.] // Воен. медицина. – 2015. – №2. – С. 51–53.
13. *Van der Poel, W.H.* Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission / W.H. Van der Poel // Current Opinion in Virology. – 2014. – Vol. 4. – P. 91–96. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.01.006>
14. Molecular investigation on the presence of hepatitis E virus (HEV) in wild game in North-Western Italy / L. Serracca [et al.] // Food a. Environmental Virology. – 2015. – Vol. 7, N 3. – P. 206–212. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9201-9>
15. Sporadic acute hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food / Y. Yazaki [et al.] // J. of Gen. Virology. – 2003. – Vol. 84, N 9. – P. 2351–2357. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19242-0>
16. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings / S. Tei [et al.] // Lancet. – 2003. – Vol. 362, N 9381. – P. 371–373. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14025-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14025-1)
17. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat / T.-C. Li [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2005. – Vol. 11, N 12. – P. 1958–1960. <https://doi.org/10.3201/eid1112.051041>
18. *Renou, C.* Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage, France / C. Renou, A.-M.R. Afonso, N. Pavio // Emerging Infectious Diseases. – 2014. – Vol. 20, N 11. – P. 1945–1947. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140791>
19. *Riveiro-Barciela, M.* Hepatitis E virus: new faces of an old infection / M. Riveiro-Barciela, F. Rodríguez-Frías, M. Buti // Annals of Hepatology. – 2012. – Vol. 12, N 6. – P. 861–870. [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31290-6](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31290-6)
20. Филогенетический анализ последовательностей ВГЕ, выявленных в Республике Беларусь / А. А. Арабей [и др.] // Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2018», Минск, 27–28 сентября 2018 г. : сб. тр. / М-во здравоохранения Респ. Беларусь [и др.] ; под ред. В.И. Покровского. – Минск, 2018. – С. 288–290.
21. *Sridhar, S.* Hepatitis E: a disease of reemerging importance / S. Sridhar, S.K. P. Lau, P.C. Y. Woo // J. of the Formosan Med. Assoc. – 2015. – Vol. 114, N 8. – P. 681–690. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2015.02.003>
22. Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain / C. Seminati [et al.] // Veterinary J. – 2008. – Vol. 175, N 1. – P. 130–132. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.018>
23. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction / S. Fernández-Barredo [et al.] // J. of Veterinary Diagnostic Investigation. – 2006. – Vol. 18, N 5. – P. 462–465. <https://doi.org/10.1177/104063870601800506>
24. Hepatitis E virus is highly prevalent in the Danish pig population / S. Ø. Breum [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2010. – Vol. 146, N 1–2. – P. 144–149. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.002>
25. Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-nish swine herds / M. Casas [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2011. – Vol. 148, N 1. – P. 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.010>
26. Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs / S. Fernández-Barredo [et al.] // Canad. J. of Veterinary Research. – 2007. – Vol. 71, N 3. – P. 236–240.
27. Detection and molecular characterization of zoonotic viruses in swine fecal samples in Italian pig herds / M. Monini [et al.] // Arch. of Virology. – 2015. – Vol. 160, N 10. – P. 2547–2556. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2538-4>
28. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus / C. Kasorndorkbua [et al.] // Canad. J. of Veterinary Research. – 2003. – Vol. 67, N 4. – P. 303–306.
29. Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain / M. Casas [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2009. – Vol. 135, N 3–4. – P. 248–252. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.075>
30. Serological and molecular investigation of swine hepatitis E virus in pigs raised in southern Italy / N. Costanzo [et al.] // J. of Food Protection. – 2015. – Vol. 78, N 11. – P. 2099–2102. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-15-159>
31. Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy / I. Di Bartolo [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2011. – Vol. 149, N 3–4. – P. 330–338. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.12.007>
32. Assessment of domestic pigs, wild boars and feral hybrid pigs as reservoirs of hepatitis E virus in Corsica, France / F. Jori [et al.] // Viruses. – 2016. – Vol. 8, N 8. – Art. 236. <https://doi.org/10.3390/v8080236>
33. Prevalence of hepatitis E virus in slaughter-age pigs in Scotland / C. Crossan [et al.] // Epidemiology a. Infection. – 2015. – Vol. 143, N 10. – P. 2237–2240. <https://doi.org/10.1017/s0950268814003100>
34. Prevalence of hepatitis E virus infection in pigs at the time of slaughter, United Kingdom, 2013 / S. Grierson [et al.] // Emerging Infectious Diseases. – 2015. – Vol. 21, N 8. – P. 1396–1401. <https://doi.org/10.3201/eid2108.141995>
35. Hepatitis E virus in domestic pigs, wild boars, pig farm workers, and hunters in Estonia / A. Ivanova [et al.] // Food a. Environmental Virology. – 2015. – Vol. 7, N 4. – P. 403–412. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9210-8>
36. Hepatitis E virus seroprevalence of domestic pigs in Germany determined by a novel in-house and two reference ELISAs / P. Dremsek [et al.] // J. of Virological Methods. – 2013. – Vol. 190, N 1–2. – P. 11–16. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.03.010>
37. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in humans living in high pig density areas of Germany / A. Krumbholz [et al.] // Med. Microbiology a. Immunology. – 2014. – Vol. 203, N 4. – P. 273–282. <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0336-3>
38. Widespread distribution of hepatitis e virus in Spanish pig herds / N. Jimenez De Oya [et al.] // BMC Research Notes. – 2011. – Vol. 4, N 1. – Art. 412. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-412>
39. Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using direct assays / C. Baechlein [et al.] // Veterinary Microbiology. – 2010. – Vol. 144, N 1–2. – P. 187–191. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.011>

40. Получение рекомбинантного аналога капсидного белка вируса гепатита E 1 генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств / Г.И. Алаторцева [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 6. – С. 72–80. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-6-72-80>

41. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита E 1 генотипа с применением метода оптимизации кодонов / Г.И. Алаторцева [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2017. – № 6. – С. 63–72. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-6-63-72>

42. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита E 3 генотипа и оценка его антигенных свойств / Г.И. Алаторцева [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2018. – № 5. – С. 46–53. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-46-53>

43. Разработка рекомбинантного белка капсида вируса гепатита E 3 генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств / Г.И. Алаторцева [и др.] // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2019. – № 1. – С. 10–17. <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-10-17>

## References

1. Wang L., Gong W., Li M., Xu Q., He Y., Zhuang H., Wang L., Teng J. L. L., Lau S. K. P., Sridhar S., Woo P. C. Y., Fu H. Transmission of a novel genotype of hepatitis E virus from Bactrian camels to cynomolgus macaques. *Journal of Virology*, 2019, vol. 93, no. 7, pp. e02014–e02018. <https://doi.org/10.1128/jvi.02014-18>
2. Holla R. P., Ahmad I., Ahmad Z., Jameel S. Molecular virology of hepatitis E virus. *Seminars in Liver Disease*, 2013, vol. 33, no. 1, pp. 3-14. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1338110>
3. Lee G. Y., Poovorawan K., Intharasongkroh D., Sa-Nguanmoo P., Vongpunsawad S., Chirathaworn C., Poovorawan Y. Hepatitis E virus infection: Epidemiology and treatment implications. *World Journal of Virology*, 2015, vol. 4, no. 4, pp. 343-355. <https://doi.org/10.5501/wjv.v4.i4.343>
4. Doceul V., Bagdassarian E., Demange A., Pavio N. Zoonotic hepatitis E virus: classification, animal reservoirs and transmission routes. *Viruses*, 2016, vol. 8, no. 10, art. 270. <https://doi.org/10.3390/v8100270>
5. Meng X. J. Recent advances in hepatitis e virus. *Journal of Viral Hepatitis*, 2010, vol. 17, no. 3, pp. 153-161. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2893.2009.01257.x>
6. Wacheck S., Werres C., Märklbauer E., Mohn U., Dorn S., Soutschek E., Fredriksson-Ahomaa M. Detection of IgM and IgG against hepatitis E virus in serum and meat juice samples from pigs at slaughter in Bavaria, Germany. *Foodborne Pathogens and Disease*, 2012, vol. 9, no. 7, pp. 655-660. <https://doi.org/10.1089/fpd.2012.1141>
7. Murali A. R., Kotwal V., Chawla S. Chronic hepatitis E: A brief review. *World Journal of Hepatology*, 2015, vol. 7, no. 19, pp. 2194-2201. <https://doi.org/10.4254/wjh.v7.i19.2194>
8. Moal V., Colson P., Ferretti A., Devichi P. Genome sequence of a hepatitis e virus of genotype 3e from a chronically infected kidney transplant recipient. *Genome Announcements*, 2014, vol. 2, no. 1, p. e01156-13 <https://doi.org/10.1128/genomea.01156-13>
9. Moal V., Gerolami R., Ferretti A., Purgus R., Devichi P., Burtsey S., Colson P. Hepatitis e virus of subtype 3i in chronically infected kidney transplant recipients in southeastern France. *Journal of Clinical Microbiology*, 2014, vol. 52, no. 11, pp. 3967-3972. <https://doi.org/10.1128/jcm.02028-14>
10. Marano G., Vaglio S., Pupella S., Facco G., Bianchi M., Calizzani G., Candura F., Catalano L., Farina B., Lanzoni M., Piccinini V., Liumbruno G. M., Grazzini G. Hepatitis E: An old infection with new implications. *Blood Transfusion*, 2015, vol. 13, no. 1, pp. 6-20. <https://doi.org/10.2450/2014.0063-14>
11. Meng X.-J., Purcell R. H., Halbur P. G., Lehman J. R., Webb D. M., Tsareva T. S., Haynes J. S., Thacker B. J., Emerson S. U. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, vol. 94, no. 18, pp. 9860-9865. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.18.9860>
12. Arabei A. A., Mokhammed A. M., Zhavoronok S. V., Kyuregyan K. K., Bud'ko L. V., Davydov V. V., Mikhailov M. I. Detection of hepatitis E virus among rabbits of Belarus. *Voennaya meditsina* [Military Medicine], 2015, no. 2, pp. 51-53 (in Russian).
13. Van der Poel W. H. Food and environmental routes of Hepatitis E virus transmission. *Current Opinion in Virology*, 2014, vol. 4, pp. 91-96. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2014.01.006>
14. Serracca L., Battistini R., Rossini I., Ercolini C., Mignone W., Peletto S., Boin C., Pistone G., Ercolini R. Molecular investigation on the presence of hepatitis E virus (HEV) in wild game in North-Western Italy. *Food and Environmental Virology*, 2015, vol. 7, no. 3, pp. 206-212. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9201-9>
15. Yazaki Y., Mizuo H., Takahashi M., Nishizawa T., Okamoto H., Sasaki N., Gotanda Y. Sporadic acute hepatitis E in Hokkaido, Japan, may be food-borne, as suggested by the presence of hepatitis E virus in pig liver as food. *Journal of General Virology*, 2003, vol. 84, no. 9, pp. 2351-2357. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19242-0>
16. Tei S., Kitajima N., Takahashi K., Mishiro S. Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet*, 2003, vol. 362, no. 9381, pp. 371-373. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(03\)14025-1](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(03)14025-1)
17. Li T.-C., Takeda N., Miyamura T., Chijiwa K., Sera N., Ishibashi T., Etoh Y., Shinohara Y., Kurata Y., Ishida M., Sakamoto S. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat *Emerging Infectious Diseases*, 2005, vol. 11, no. 12, pp. 1958-1960. <https://doi.org/10.3201/eid1112.051041>
18. Renou C., Afonso A.-M. R., Pavio N. Foodborne transmission of hepatitis E virus from raw pork liver sausage, France. *Emerging Infectious Diseases*, 2014, vol. 20, no. 11, pp. 1945-1947. <https://doi.org/10.3201/eid2011.140791>
19. Riveiro-Barciela M., Buti M., Rodríguez-Frías F. Hepatitis E virus: new faces of an old infection. *Annals of Hepatology*, 2013, vol. 12, no. 6, pp. 861-870. [https://doi.org/10.1016/s1665-2681\(19\)31290-6](https://doi.org/10.1016/s1665-2681(19)31290-6)

20. Arabei A. A., Zhavoronok S. V., Davydov V. V., Gasich E. L., Karlson A. A., Kyuregyan K. K., Mikhailov M. I. Phylogenetic analysis of HEV sequences identified in the Republic of Belarus. *Mezhdunarodnaya nauchno-prakticheskaya konferentsiya "Molekulyarnaya diagnostika 2018"*, Minsk, 27-28 sentyabrya 2018 g.: *sbornik trudov* [International scientific and practical conference "Molecular diagnostics 2018", Minsk, September 27-28, 2018: proceedings]. Minsk, 2018, pp. 288-290 (in Russian).
21. Sridhar S., Lau S. K. P., Woo P. C. Y. Hepatitis E: a disease of reemerging importance. *Journal of the Formosan Medical Association*, 2015, vol. 114, no. 8, pp. 681-690. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2015.02.003>
22. Seminati C., Mateu E., Peralta B., De Deus N., Martin M. Distribution of hepatitis E virus infection and its prevalence in pigs on commercial farms in Spain. *Veterinary Journal*, 2008, vol. 175, no. 1, pp. 130-132. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2006.11.018>
23. Fernández-Barredo S., Galiana C., García A., Vega S., Gómez M. T., Pérez-Gracia M. T. Detection of hepatitis E virus shedding in feces of pigs at different stages of production using reverse transcription-polymerase chain reaction *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 2006, vol. 18, no. 5, pp. 462-465. <https://doi.org/10.1177/104063870601800506>
24. Breum S. Ø., Hjulsgaard C. K., Larsen L. E., De Deus N., Segalés J. Hepatitis E virus is highly prevalent in the Danish pig population. *Veterinary Microbiology*, 2010, vol. 146, no. 1-2, pp. 144-149. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.05.002>
25. Casas M., Pina S., Peralta B., Allepuz A., Cortey M., Casal J., Martín M., Cortés R. Longitudinal study of hepatitis E virus infection in Spanish farrow-to-nish swine herds. *Veterinary Microbiology*, 2011, vol. 148, no. 1, pp. 27-34. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.08.010>
26. Fernández-Barredo S., Galiana C., García A., Gómez-Muñoz M. T., Vega S., Rodríguez-Iglesias M. A., Pérez-Gracia M. T. Prevalence and genetic characterization of hepatitis E virus in paired samples of feces and serum from naturally infected pigs. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2007, vol. 71, no. 3, pp. 236-240.
27. Monini M., Di Bartolo I., Ianiro G., Angeloni G., Ruggeri F. M., Magistrali C. F., Ostanello F. Detection and molecular characterization of zoonotic viruses in swine fecal samples in Italian pig herds. *Archives of Virology*, 2015, vol. 160, no. 10, pp. 2547-2556. <https://doi.org/10.1007/s00705-015-2538-4>
28. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus / C. Kasorndorkbua [et al.] // *Canad. J. of Veterinary Research*. – 2003. – Vol. 67, №4. – P. 303-306.
- Kasorndorkbua C., Thacker B. J., Halbur P. G., Buitenwerf R. M., Royer R. L., Guenette D. K., Meng X.-J. Experimental infection of pregnant gilts with swine hepatitis E virus. *Canadian Journal of Veterinary Research*, 2003, vol. 67, no. 4, pp. 303-306.
29. Casas M., Pujols J., Rosell R., De Deus N., Peralta B., Pina S., Casal J., Martín M. Retrospective serological study on hepatitis E infection in pigs from 1985 to 1997 in Spain. *Veterinary Microbiology*, 2009, vol. 135, no. 3-4, pp. 248-252. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2008.09.075>
30. Costanzo N., Sarno E., Peretti V., Santoro A., Ciambro L., Casalnuovo F. Serological and molecular investigation of swine hepatitis E virus in pigs raised in southern Italy. *Journal of Food Protection*, 2015, vol. 78, no. 11, pp. 2099-2102. <https://doi.org/10.4315/0362-028x.jfp-15-159>
31. Di Bartolo I., Ponterio E., Ruggeri F. M., Castellini L., Ostanello F. Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Veterinary Microbiology*, 2011, vol. 149, no. 3-4, pp. 330-338. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2010.12.007>
32. Jori F., Laval M., Maestrini O., Casabianca F., Charrier F., Pavio N. Assessment of domestic pigs, wild boars and feral hybrid pigs as reservoirs of hepatitis E virus in Corsica, France. *Viruses*, 2016, vol. 8, no. 8, art. 236. <https://doi.org/10.3390/v8080236>
33. Crossan C., Scobie L., Grierson S., Banks M., Thomson J., Ward A., Nunez-Garcia J. Prevalence of hepatitis E virus in slaughter-age pigs in Scotland. *Epidemiology and Infection*, 2015, vol. 143, no. 10, pp. 2237-2240. <https://doi.org/10.1017/S0950268814003100>
34. Grierson S., Heaney J., Cheney T., Morgan D., Wyllie S., Powell L., Smith D., Ijaz S., Steinbach F., Choudhury B., Tedder R. S. Prevalence of hepatitis E virus infection in pigs at the time of slaughter, United Kingdom, 2013. *Emerging Infectious Diseases*, 2015, vol. 21, no. 8, pp. 1396-1401. <https://doi.org/10.3201/eid2108.141995>
35. Ivanova A., Tefanova V., Reshetnjak I., Kuznetsova T., Geller J., Golovljova I., Janson M., Neare K., Velström K., Jokelainen P., Lassen B., Saar T., Viltrop A., Lundkvist Å., Hütt P. Hepatitis E virus in domestic pigs, wild boars, pig farm workers, and hunters in Estonia. *Food and Environmental Virology*, 2015, vol. 7, no. 4, pp. 403-412. <https://doi.org/10.1007/s12560-015-9210-8>
36. Dremsek P., Groschup M. H., Ulrich R. G., Joel S., Krumbholz A., Baechlein C., Pavio N., Schielke A., Johne R., Ziller M., Dürrwald R., Renner C. Hepatitis E virus seroprevalence of domestic pigs in Germany determined by a novel in-house and two reference ELISAs. *Journal of Virological Methods*, 2013, vol. 190, no. 1-2, pp. 11-16. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2013.03.010>
37. Krumbholz A., Joel S., Neubert A., Lange J., Wutzler P., Sauerbrei A., Zell R., Dremsek P., Ulrich R. G., Johne R., Dürrwald R., Walther M., Müller T. H., Kühnel D. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in humans living in high pig density areas of Germany. *Medical Microbiology and Immunology*, 2014, vol. 203, no. 4, pp. 273-282. <https://doi.org/10.1007/s00430-014-0336-3>
38. Jiménez De Oya N., Blázquez A.-B., Martín-Acebes M. A., Saiz J.-C., Escribano-Romero E., De Blas I., Halaihel N., Gironés O. Widespread distribution of hepatitis e virus in Spanish pig herds. *BMC Research Notes*, 2011, vol. 4, no. 1, art. 412. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-4-412>
39. Baechlein C., Schielke A., Johne R., Ulrich R. G., Baumgaertner W., Grummer B. Prevalence of Hepatitis E virus-specific antibodies in sera of German domestic pigs estimated by using direct assays. *Veterinary Microbiology*, 2010, vol. 144, no. 1-2, pp. 187-191. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.12.011>

40. Alatorstseva G. I., Sidorov A. V., Nesterenko L. N., Likhverchik L. N., Dotsenko V. B., Amiantova I. I. (et al.). Design of hepatitis E virus genotype 1 recombinant capsid protein: cloning, expression, purification, evaluation of the antigenic properties. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, no. 6, pp. 72–80 (in Russian). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-6-72-80>

41. Alatorstseva G. I., Sidorov A. V., Nesterenko L. N., Likhverchik L. N., Zhukina M. V., Amyantova I. I. (et al.) Design of hepatitis E virus genotype 1 recombinant ORF3 protein by codon optimization method. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2017, vol. 6, pp. 63–72 (in Russian). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-6-63-72>

42. Alatorstseva G. I., Sidorov A. V., Nesterenko L. N., Likhverchik L. N., Milovanova A. V., Ammur Yu. I., Mikhailov M. I., Kyuregyan K. K., Zhavoronok S. V., Zverev V. V. Obtaining the recombinant ORF3 protein of hepatitis E genotype 3 and evaluation of its antigenic properties. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2018, no. 5, pp. 46–53 (in Russian). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-46-53>

43. Alatorstseva G. I., Sidorov A. V., Nesterenko L. N., Likhverchik L. N., Dotsenko V. V., Amiantova I. I. (et al.). Development of hepatitis E 3 genotype recombinant protein capsid of: cloning, expression, purification, evaluation of the antigenic properties. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii = Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*, 2019, no. 1, pp. 10–17 (in Russian). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-10-17>

### Информация об авторах

*Красочко Петр Альбинович* – доктор ветеринарных наук, доктор биологических наук, профессор, заведующий кафедрой эпизоотологии и инфекционных болезней животных, Витебская государственная академия ветеринарной медицины (ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026 Витебск, Республика Беларусь). E-mail: [krasochko@mail.ru](mailto:krasochko@mail.ru). orcid: 0000-0002-4641-4757.

*Жаворонок Сергей Владимирович* – доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней, Белорусский государственный медицинский университет (пр. Держинского, 83, 220116 Минск, Республика Беларусь). E-mail: [zhavoronok.s@mail.ru](mailto:zhavoronok.s@mail.ru). orcid: 0000-0001-9727-1103.

*Борисовец Дмитрий Сергеевич* – кандидат ветеринарных наук, доцент, заведующий отделом вирусных инфекций, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского, Национальная академия наук Беларуси (ул. Брикета, 28, 220003 Минск, Республика Беларусь). E-mail: [borisovets\\_bievm@mail.ru](mailto:borisovets_bievm@mail.ru).

*Красочко Павел Петрович* – доктор биологических наук, доцент, заведующий отраслевой лабораторией ветеринарной биотехнологии и заразных болезней животных, Витебская государственная академия ветеринарной медицины (ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026 Витебск, Республика Беларусь). E-mail: [7696695@gmail.com](mailto:7696695@gmail.com).

*Алаторцева Галина Ивановна* – кандидат биологических наук, заведующая лабораторией клонирования вирусных геномов отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Малый Казенный переулок, 5а, 105064 Москва, Российская Федерация). E-mail: [alatorstseva@gmail.com](mailto:alatorstseva@gmail.com). orcid: 0000-0001-9887-4061.

*Прокопенкова Татьяна Михайловна* – заведующая виварием Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского, Национальная академия наук Беларуси (ул. Брикета, 28, 220003 Минск, Республика Беларусь). E-mail: [tprokopenkova@tut.by](mailto:tprokopenkova@tut.by).

*Давыдов Владимир Витольдович* – кандидат биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биологии, Белорусский государственный медицинский университет (пр. Держинского, 83, 220116 Минск, Республика Беларусь). E-mail: [davidovvv@bsmu.by](mailto:davidovvv@bsmu.by).

### Information about the author

*Petr A. Krasochko* - D. Sc. (Veterinary), D. Sc. (Biological), Professor. Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine (1 Dovatora Str. 7/11, 210026 Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: [krasochko@mail.ru](mailto:krasochko@mail.ru). orcid: 0000-0002-4641-4757.

*Sergey V. Zhavoronok* - D. Sc. (Medical). Belarusian State Medical University (83 Dzerzhinsky Ave., 220116 Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [zhavoronok.s@mail.ru](mailto:zhavoronok.s@mail.ru). orcid: 0000-0001-9727-1103.

*Dzmitry S. Barysavets* - Ph.D. (Veterinary), Associate Professor. Veterinary Medicine named of S.N. Vysheslesky, the National Academy of Sciences of Belarus (Briketa Str., 28, 220003 Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [borisovets\\_bievm@mail.ru](mailto:borisovets_bievm@mail.ru).

*Pavel P. Krasochko* - D. Sc. (Biological), Associate Professor. Vitebsk State Academy of Veterinary Medicine, the National Academy of Sciences of Belarus (7/11 Dovatora Str., 210026 Vitebsk, Republic of Belarus). E-mail: [7696695@gmail.com](mailto:7696695@gmail.com).

*Galina I. Alatorstseva* - Ph.D. (Biological). Institute of Vaccines and Serums named of I.I. Mechnikov (5a Maly Kazenny lane, 105064 Moscow, Russian Federation). E-mail: [alatorstseva@gmail.com](mailto:alatorstseva@gmail.com). orcid: 0000-0001-9887-4061.

*Tatsiana M. Prokopenkova* - the vivarium Institute of Experimental Veterinary Medicine named of S.N. Vysheslesky, the National Academy of Sciences of Belarus (28 Briketa Str., 220003 Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [tprokopenkova@tut.by](mailto:tprokopenkova@tut.by).

*Vladimir V. Davydov* - Ph.D. (Biological), Associate Professor. Belarusian State Medical University (83 Dzerzhinsky Ave., 220116 Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [davidovvv@bsmu.by](mailto:davidovvv@bsmu.by).

*Ludmila A. Anisko* - Ph.D. (Medical). Belarusian State Medical University (83, Dzerzhinsky Ave., 220116 Minsk, Republic of Belarus). E-mail: [info@gkib.by](mailto:info@gkib.by). orcid: 0000-0002-5466-2590.

*Ludmila N. Likhverchik* - Institute of Vaccines and Serums named of I.I. Mechnikov (Maly Kazenny lane, 5a, 105064 Moscow, Russian Federation). E-mail: [lexx294@yandex.by](mailto:lexx294@yandex.by). orcid: 0000-0002-2997-8892.

*Анисько Людмила Александровна* – кандидат медицинских наук, ассистент кафедры инфекционных болезней, Белорусский государственный медицинский университет (пр. Дзержинского, 83, 220116 Минск, Республика Беларусь). E-mail: info@gkib.by. orcid: 0000-0002-5466-2590.

*Лухверчик Людмила Николаевна* – кандидат медицинских наук, ведущий научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Малый Казенный переулок, 5а, 105064 Москва, Российская Федерация). E-mail: lex294@yandex.by. orcid: 0000-0002-2997-8892.

*Журавлева Екатерина Сергеевна* – кандидат ветеринарных наук, заведующая лабораторией вирусных инфекций крупного рогатого скота, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского, Национальная академия наук Беларуси (ул. Брикета, 28, 220003 Минск, Республика Беларусь). E-mail: guravl@tut.by.

*Бучукури Джемал Владимирович* – кандидат ветеринарных наук, ведущий научный сотрудник отдела вирусных инфекций, Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского (ул. Брикета, 28, 220003 Минск, Республика Беларусь). E-mail: vladitim@tut.by.

*Зверев Виталий Васильевич* – академик РАН, доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией молекулярной биотехнологии отдела вирусологии им. О.Г. Анджапаридзе, Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (Малый Казенный переулок, 5а, 105064 Москва, Российская Федерация). E-mail: vitalyzverev@outlook.com. orcid: 0000-0001-5808-2246.

*Ekaterina S. Zhuravleva* - Ph.D. (Veterinary). Institute of Experimental Veterinary Medicine named of S.N. Vysheslesky (28 Briketa Str., 220003 Minsk, Republic of Belarus). E-mail: guravl@tut.by.

*Djermal V. Buchukuri* - Ph.D. (Veterinary). Veterinary Medicine named of S. N. Vysheslesky, the National Academy of Sciences of Belarus (28 Briketa St., 220003 Minsk, Republic of Belarus). E-mail: vladitim@tut.by.

*Vitali V. Zverev* - Academician of the Russian Academy of Sciences, D. Sc. (Biological), Professor. Institute of Vaccines and Serums named of I.I. Mechnikov (Maly Kazenny lane, 5a, 105064 Moscow, Russian Federation). E-mail: vitalyzverev@outlook.com. orcid: 0000-0001-5808-2246.