

animals: development and production in Belarus]. N.A. Kovaleva (Ed.). Minsk: Belaruskaya navuka [in Russian].

7. Maksimovich, V.V. et al. (2012). *Epizootologiya i infektsionnyye bolezni: uchebnik dlya studentov i magistrantov uchrezhdeniy vysshego obrazovaniya po spetsialnosti «Veterinarnaya meditsina» [Epizootology and infectious diseases: a textbook]*. Minsk: IVC Minfina [in Russian].

УДК 619:616.98:578.826.2-07:636.4

КРАСОЧКО П.А., д-р вет. наук, д-р биол. наук, проф., академик РАЕН, e-mail: krasochko@mail.ru,

КУРДЕКО А.П., д-р вет. наук, проф., e-mail: kurdeko1964@tut.by,

КРАСОЧКО П.П., канд. вет. наук, доц., e-mail: 7696695@gmail.com

УО «Витебская ордена «Знак Почета» государственная академия ветеринарной медицины»

ЖАВОРОНОК С.В., д-р мед. наук, проф., e-mail: zhavoronok.s@mail.ru,

АРАБЕЙ А.А., e-mail: lbmi@tut.by

УО «Белорусский государственный медицинский университет»

БОРИСОВЕЦ Д.С., канд. вет. наук, e-mail: boris15ka@mail.ru,

ПРОКОПЕНКОВА Т.М., e-mail: tprokopenkova@tut.by

РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышеслеского»

НЫЧИК С.А., д-р вет. наук, проф., член-кор. НААН, e-mail: snychyk@gmail.com

Институт ветеринарной медицины НААН

ИММУНОФЕРМЕНТНЫЙ АНАЛИЗ В ДИАГНОСТИКЕ ГЕПАТИТА Е У СВИНЕЙ

В статье показаны результаты применения иммуноферментного анализа при диагностике гепатита Е у свиней. Проведены исследования по разработке тест-системы для выявления антител к вирусу гепатита Е у свиней – в качестве антигена целесообразно использовать генно-инженерные полипептиды с антигенной последовательностью вируса гепатита Е 1 и 3 генотипа, конъюгированные с бета-галактозидазой. Сорбцию полипептидов на полистироловые планшеты проводили после предварительной обработки их ультрафиолетовым излучением, в оптимальной концентрации полипептидов для сорбции на полистироловые планшеты – 8 мкг/мл в 0,005 М карбонатном буфере pH-9,5, разведение конъюгата – кроличьих антииммуноглобулиновых сывороток против IgG свиньи антител – 1:10000. Проведенные исследования показали, что 98,2% сывороток свиней содержат специфические антитела к вирусу гепатита Е человека в различной концентрации, что свидетельствует о циркуляции вируса гепатита Е среди свиноголовья на территории Республики Беларусь.

Ключевые слова: гепатит Е, иммуноферментный анализ, мониторинг, свиньи.

Введение. По современным представлениям гепатит Е уже давно рассматривается как инфекционное заболевание, которое выявляется в развивающихся странах. Вирус гепатита Е (ВГЕ) генотипа 3 был выделен от людей в США в 1997 году, а в качестве резервуара 3 генотипа были выявлены свиньи. Различные штаммы ВГЕ, были выделены из человеческой популяции, а

также от других видов, в том числе дикие кабаны, мангусты, кролик, верблюд и др. Некоторые штаммы инфицируют исключительно людей или животных, в то время как другие могут заражать как людей, так и животных. Все штаммы ВГЕ относятся к семейству *Hepeviridae*, которое было впервые описано в 2012 году [1].

Несмотря на огромный прогресс в понимании ν , многие проблемы все еще существуют и требуют дальнейшего решения. Антитела к ВГЕ (анти-ВГЕ) появляются при острой инфекции и могут сохраняться в течение нескольких лет. Таким образом, обнаружение анти-ВГЕ в крови считается, как показатель инфицирования вирусом. Распространенность этих антител может являться эпидемиологическим маркером частоты встречаемости ВГЕ в популяции. Эпидемические вспышки, чаще водные, регистрируются в странах Центральной Азии, Африки и Латинской Америки. К эндемичным странам относят Боливию, Мексику, Китай, Тайвань, Индию, а среди бывших республик СССР – Туркмению, Казахстан, Таджикистан, Узбекистан. Показатель заболеваемости гепатитом E варьирует в пределах 50,9–357,0 на 100 000 населения в Индии и от 0,8% до 25% в республиках Средней Азии. Частота обнаружения антител к вирусу GE среди жителей этих регионов составляет 23,8–28,7%, в то время как в странах с умеренным и холодным климатом – около 5%. Доля GE в структуре острых вирусных гепатитов (ОВГ) в условиях спорадической заболеваемости колеблется от 10% до 18,8%, а во время вспышек – от 64,7% до 80%. В странах Европы доля GE в структуре ОВГ составляет около 0,5%, в РФ на отдельных территориях этот показатель достигает 12,6% [2, 3].

В последние годы среди населения, проживающего не в эндемичных регионах, увеличилось количество случаев GE, которые не связаны с выездом в эндемичные регионы (автохтонный (греч. *autochthon* – местный, коренной) гепатит E). В научной литературе представлены случаи автохтонного GE в Германии, Дании, Франции, Нидерландах, Японии.

В последнее время, достигнут значительный прогресс в понимании природы и резервуаров ВГЕ у различных видов животных. Штаммы этого вируса обнаружены у домашних свиней, диких кабанов, кур, кроликов, крыс, оленей, мангустов, летучих мышей, хорьков, а также у крупного рогатого скота и овец. Все эти данные наряду с наличием известных видов животных, которые являются серопозитивными по ВГЕ, значительно расширили круг носителей этого вируса и его разновидности. Недавно новый член семейства *Hepeviridae* был идентифицирован у форели в США, при этом геном вируса оказался схож по своему размеру и организации с ВГЕ. Проводя скрининг РНК *Hepevirus* в образцах более чем 3,800 летучих мышей из 85 различных видов и с пяти континентов, Дрекслер и его коллеги [1] обнаружили ВГЕ-подобные вирусы у африканских, центрально-американских и европейских летучих мышей. На основе геномных последовательностей, эти вирусы были сгруппированы в новую филогенетическую группу в пределах семейства *Hepeviridae* [4, 5].

Полученные данные про ВГЕ-подобные вирусы в животном мире являются достаточно интересными и заслуживают дальнейшего внимания, особенно потому, что гепатит Е признан зоонозной инфекцией, с резервуарами у домашних свиней, диких кабанов и, вероятно, других видов животных. Помимо очевидных последствий, повсеместного наличия ВГЕ у животных, имеющих отношение к производству пищевых продуктов, таких как домашние свиньи, дикие кабаны и многие другие виды животных, также вызывает озабоченность со стороны здравоохранения прямой контакт человека с инфицированными животными, а также загрязнение окружающей среды, в частности, поверхностных вод фекалиями животных, а также рекреационных и профессиональных рисков в сельской местности [1].

ВГЕ свиней широко распространён как в промышленно развитых, так и в развивающихся странах, где на протяжении многих лет инфекция считалась эндемичной среди людей. С момента первого выявления ВГЕ у свиней в 1997 году в США, было выделено несколько штаммов вируса у свиней на территории Северной и Центральной Америки, Азии, Европы, Африки, Новой Зеландии и Австралии. По крайней мере два генотипа ВГЕ свиней (3 и 4), были окончательно идентифицированы и охарактеризованы исследователями, и как и в случае с человеческими штаммами, штаммы ВГЕ свиней имеют высокую степень нуклеотидных и филогенетическое расхождений в зависимости от региона.

Штаммы ВГЕ свиней, особенно те, которые определены в промышленно развитых странах, часто связаны со случаями заболевания человека, в которых не было выявлено какого-либо конкретного источника инфекции. В странах, где был выявлен ВГЕ и проводились серологические исследования среди свиней, показано, что большинство свиней в возрасте старше 3–4 месяцев являются носителями анти-ВГЕ. Свиньи моложе 2-х месяцев, чаще всего серонегативные или позитивные при низкой распространенности, тогда как свиньи более старшего возраста в 80% случаев являются серопозитивными.

Риск передачи ВГЕ связанный с потреблением сырого мяса или из-за контакта со свиньями уже доказан в различных странах, а вирусная РНК была обнаружена в свиной печени в продуктовых магазинах в Японии, Нидерландах и США. Кроме того, РНК ВГЕ или специфические антитела были обнаружены среди мясников работников скотобоев в различных странах. Существует предположение, что передача ВГЕ от свиней к людям возможна во время забоя, а при прямом контакте со свиньями возрастает риск инфицирования работников [5]. В этой связи существует необходимость в разработке тест-систем для детекции этого вируса у животных.

Цель работы. Разработать высокоэффективную тест-систему для оценки наличия антител в сыворотке крови инфицированных животных.

Материалы и методы исследований. Исследования проводились в условиях УО «Витебская государственная академия ветеринарной медицины», РУП «Институт экспериментальной ветеринарии им. С.Н. Вышелесского», УО «Белорусский государственный медицинский университет».

Матеріалом дослідження являлись сироватки крові, отримані від тварин, що містяться на свиноводах фермах.

Всього досліджено і проаналізовано 1047 сироваток крові від свиней тваринводах ферм і приватного сектора різних регіонів Білорусі на наявність анти-ВГЕ-IgG.

Для визначення серологічних маркерів інфікування вірусом гепатиту Е (іммуноглобуліни класу G) використовували тест-системи ЗАО «Вектор-Бест» Векторгеп-Е IgG, г. Новосибірськ, а також тест-систему, сконструйовану на базі УО «Білоруський державний медичний університет», УО «Вітебська державна академія ветеринарної медицини» і РУП «Інститут експериментальної ветеринарії ім. С.Н.Вишелеского».

Постановку ІФА проводили наступним чином. Для цього в лунки планшета вносили позитивний і негативний контроль і досліджувані зразки сироваток в розведенні 1:10, інкубували 30 хвилин при 37°C, промивали 5 раз. Далі додавали розчин кон'югату. Для дослідження сироваток крові тварин замість кон'югату використовували розчин білка А стафілококка, кон'югованого з пероксидазою хрена. Інкубували 30 хвилин при 37°C, промивали 5 раз і додавали субстрат (тетраметилбензидин). Інкубували при кімнатній температурі впродовж 25 хвилин. Далі додавали серну кислоту (стоп-реагент). Спектрофотометричне вимірювання результатів реакції проводили на приладі Stat Fax 3200.

Для сенсибілізації полістиролових панелей використані генно-інженерні поліпептиди з антигенною послідовністю вірусу гепатиту Е1 генотипу, кон'юговані з бета-галактозидазою, отримані з Установи Науково-дослідницький інститут вакцин і сироваток ім. І.І. Мечнікова РАМН (г. Москва).

Результати досліджень і їх обговорення. З Установи Науково-дослідницький інститут вакцин і сироваток ім. І.І. Мечнікова РАМН (г. Москва) отримані синтетичні поліпептиди з антигенною послідовністю вірусу гепатиту Е 1 генотипу, кон'юговані з бета-галактозидазою. В процесі досліджень

На даному етапі досліджень здійснено вибір концентрацій і буфера для сорбції поліпептидів ОРС2 і ОРС3 на полістирольні планшети після попередньої обробки його ультрафіолетовим випромінюванням для підвищення адгезивних властивостей. Оптимальна концентрація поліпептидів для сорбції на полістирольні планшети складала для антигенів ОРС2 і ОРС3 8 мкг/мл в 0,05 М карбонатному буфері (pH 9,5). Для сконструювання діагностичних наборів, зокрема для виявлення анти-IgM необхідно комбінувати обидва поліпептиди.

Для оцінки тест-системи для виявлення антител класу G к ВГЕ використовували сенсибілізовані мікропанелі для ІФА рекомбінантним білком ORF1. В якості кон'югату використовували кроличьи антитела проти

IgG свиньи, меченные пероксидазой хрена, а в качестве субстрата 3,3',5,5'-Тетраметилбензидин (Thermo Scientific, США).

Используя собственные сенсibilизированные рекомбинантным белком ORF1 панели ИФА-планшеты и конъюгат TS были проанализированы сыворотки крови свиней, накопленные на предыдущем этапе работы.

При постановке ИФА использовали следующие параметры:

- разведение испытуемых сывороток 1:10;
- первичная инкубация с исследуемыми сыворотками 60 мин.;
- вторичная инкубация с конъюгатом TS 30 мин.;
- отмывка планшета между инкубациями по 350 мкл промывочного раствора (фосфатно-солевой буфер с Твином-20) на лунку 4-хкратно;
- инкубация с субстратом 10 мин;
- остановка реакции стоп-раствором (0,05М серная кислота);
- учет реакции на спектрофотометре при длине волны 450 нм.

При постановке ИФА отрицательный контроль давал среднюю оптическую плотность менее 0,2 единиц оптической плотности. В связи с этим положительными считали сыворотки с оптической плотностью выше 0,2.

Исходя из этого критерия нами установлено, что при исследовании 1047 сывороток крови свиней из ферм и частных подворий 98,2% сывороток свиней содержат специфические антитела к ВГЕ человека в различной концентрации. Такой высокий процент положительных образцов может свидетельствовать о циркуляции этого вируса среди свинопоголовья на территории Республики Беларусь. Так, при обследовании 44 хозяйств Беларуси в 27 хозяйствах обнаружено наличие ВГЕ у свиней в высоких титрах. Не загрязненными оказались 17 хозяйств.

Выводы и перспективы дальнейших исследований. Проведенные исследования по разработке тест-системы для выявления антител к ВГЕ у свиней показали, что в качестве антигена целесообразно использовать генно-инженерные полипептиды с антигенной последовательностью ВГЕ 1 и 3 генотипа, конъюгированные с бета-галактозидазой, полученные из Учреждения Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова РАМН, для сорбции полипептидов на полистироловые планшеты после предварительной обработки их ультрафиолетовым излучением для повышения адгезивности при сорбции рекомбинантного антигена, в оптимальной концентрации полипептидов для сорбции на полистироловые планшеты – 8 мкг/мл в 0,005 М карбонатном буфере pH-9,5, а разведением конъюгата – кроличьих антител против IgG свиньи TS30 является разведение 1:10000. При исследовании 1047 сывороток крови свиней из ферм и частных подворий 98,2% сывороток свиней содержат специфические антитела к ВГЕ человека в различной концентрации, что свидетельствует о его циркуляции среди свинопоголовья на территории Республики Беларусь.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Руководство по вирусологии; под ред. академика РАН Д.К. Львова. – М.: Медицинское информационное агентство, 2013 – 1200 с.

2. Qi Y. Expression and characterization of hepatitis E virus-like particles and non-virus-like particles from insect cells / Qi Y., Fan J., Huang W., et al. // *Biotechnol Appl Biochem.* – 2015. – Vol. 63. – P. 362–370.
3. Pavio N. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks / N. Pavio, X.J. Meng, C. Renou. – *Vet. Res.* – 2010. – P. 41–46.
4. Yoo D. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus / D. Yoo, P. Willson, Y. Pei, M.A. Hayes, A. Deckert, C.E. Dewey // *Clin Diagn Lab Immunol.* – 2001. – Vol. 8. – P. 1213–1219.
5. Choi I.S. Identification of swine hepatitis E virus (HEV) and prevalence of anti-HEV antibodies in swine and human populations in Korea / I.S. Choi, H.J Kwon., N.R. Shin, H.S. Yoo // *J. Clin. Microbiol.* 2003. – Vol. 41. – P. 3602–3608.

ІМУНОФЕРМЕНТНИЙ АНАЛІЗ В ДІАГНОСТИЦІ ГЕПАТИТУ Е У СВИНЕЙ /

Красочко П.А., Курдеко А.П., Красочко П.П., Жаворонок С.В., Арабей А.А., Борисовец Д.С., Прокопенкова Т.М., Ничик С.А.

У статті показані результати застосування імуноферментного аналізу за діагностики гепатиту Е у свиней. Проведено дослідження з розробки тест-системи для виявлення антитіл до вірусу гепатиту Е у свиней – в якості антигену доцільно використовувати генно-інженерні поліпептиди з антигенної послідовністю вірусу гепатиту Е1 і 3 генотипу, кон'югований з бета-галактозидазою. Сорбцію поліпептидів на полістиролові планшети проводили після їхньої попередньої обробки ультрафіолетовим випромінюванням, в оптимальній концентрації поліпептидів для сорбції на полістиролові планшети – 8 мкг/мл в 0,005 М карбонатному буфері рН-9,5, розведення кон'югату – кролячих антитіл проти IgG свині – 1:10000. Проведені дослідження показали, що 98,2% сироваток свиней містять специфічні антитіла до вірусу гепатиту Е людини в різній концентрації, що свідчить про циркуляцію вірусу гепатиту Е серед свинопоголів'я на території Республіки Білорусь.

Ключові слова: гепатит Е, імуноферментний аналіз, моніторинг, свині.

ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY IN THE DIAGNOSIS OF HEPATITIS E IN PIGS / Krasochko P.A., Kurdeko A.P., Krasochko P.P., Zhavoronok S.V., Arabey A.A., Borisoveds D.S., Prokopenkove T.M., Nychyk S.A.

Introduction. *Hepatitis E has long been seen as an infectious disease that is detected in developing countries, both among humans and animals. Some strains infect only humans or animals, while others can infect both.*

Detection of anti-HEV in the blood is considered an indicator of infection with the virus. The prevalence of these antibodies may be an epidemiological marker of the incidence of HEV in the population. All these data, along with the presence of known species of animals that are seropositive for HEV significantly expanded the range of its carriers and its varieties. Strains of HEV in pigs, especially those detected in industrialized countries, are often associated with human cases, where any specific source of infection was not identified. The risk of virus transmission due to consumption of raw meat or exposure to pigs has already been proven in various countries. There is an assumption that transmission of HEV from pigs to humans is possible during slaughter and direct contact with pigs increases the risk of infection of workers.

The goal of the work was to develop high-performance test kit for antibodies detection in the pig's blood serum.

Materials and methods. *Surveyed and analyzed 1047 sera from pigs in farms and private sector of different regions of Belarus for the presence of anti-HEV-IgG using test systems CJSC "Vector-best" Vectored-E IgG, Novosibirsk, and also test kit of our own design.*

The ELISA development was carried out according to the conventional method.

Results of research and discussion. Studies on the development of a test system for the detection of antibodies to HEV in pigs have shown that it is advisable to use as an antigen the gene-engineering polypeptides with antigenic sequence of the virus 1 and 3 genotype, conjugated with beta-galactosidase, for the sorption of polypeptides to polystyrene plates after pretreatment with ultraviolet radiation to increase the adhesion in sorption of recombinant antigen, in order to optimize the concentration of polypeptides. Sorption on polystyrene plates was 8 µg/ml in 0.005 M carbonate buffer pH-9.5, and breeding conjugate – rabbit antibody against IgG pigs TS30 antibodies is 1:10000. In the study of 1047 blood sera of pigs from farms and private farms 98.2% of samples contained specific antibodies to HEV human in different concentrations, which indicates the circulation of this virus in pig population in the Republic of Belarus.

Conclusions and prospects for further research. In the study of 1,047 sera of pigs from different farms, 98.2% of pigs' sera contained specific antibodies to the human HEV in various concentrations, which indicates that it circulates among the pigs in Republic of Belarus.

Keywords: hepatitis E, ELISA analysis, monitoring, pigs.

REFERENCES

1. Lvov, D.K. (Eds.). (2013). *Rukovodstvo po virusologii [A Guide to Virology]*. M.: Meditsinskoye informatsionnoye agentstvo [in Russian].
2. Qi, Y., Fan, J., Huang, W., Zhao, C., Wang, Y., Kong, F.T., et al. (2015). Expression and characterization of hepatitis E virus-like particles and non-virus-like particles from insect cells. *Biotechnol Appl Biochem.*, 63, 362-370.
3. Pavio, N., Meng, X.J., & Renou, C. (2010). Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet. Res.*, 41-46.
4. Yoo, D., Willson, P., Pei, Y., Hayes, M.A., Deckert, A., Dewey, C.E. (2001). Prevalence of hepatitis E virus antibodies in Canadian swine herds and identification of a novel variant of swine hepatitis E virus. *Clin Diagn Lab Immunol.*, 8, 1213-1219.
5. Choi, I.S., Kwon, H.J., Shin, N.R., & Yoo, H.S. (2003). Identification of swine hepatitis E virus (HEV) and prevalence of anti-HEV antibodies in swine and human populations in Korea. *J. Clin. Microbiol.*, 41, 3602-3608.