

А. А. Арабей¹, С. И. Марчук¹, С. В. Жаворонок¹, В. В. Давыдов¹,
К. К. Кюрегян², М. И. Михайлов²

АДАПТИРОВАННЫЙ МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА Е У ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ

УО «Белорусский государственный медицинский университет»¹,
ФГБНУ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток,
им. И. И. Мечникова, Москва²

Описан адаптированный метод гнездовой ОТ-ПЦР для выявления вируса гепатита Е. Проведена сравнительная характеристика предложенного метода с существующими импортными аналогами. Показана высокая специфичность метода, позволяющего определять РНК ВГЕ в образцах сыворотки крови, тканей и экстрактах фекалий различных млекопитающих, в том числе и человека. Установлена высокая чувствительность предложенного метода, имеющего низкий пороговый уровень выявляемой концентрации ВГЕ, составляющий 10 МЕ/мл.

Ключевые слова: Вирус гепатита Е, гнездовая полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией.

A. A. Arabey, S. I. Marchuk, S. V. Zhavoronok, V. V. Davydov, K. K. Kyureghyan, M. I. Mikhailov

ADAPTED METHOD OF POLYMERASE CHAIN REACTION FOR DETECTING HEPATITS E VIRUS FOR PEOPLE AND ANIMAL

An adapted method of nested RT-PCR for the detection of the hepatitis E virus has been described. A comparative characteristic of the proposed method with existing import analogues has been made. The high specificity of the method allowing to determine the HEV RNA in samples of blood serum, tissues and extracts of feces of various mammals, including humans, is shown. The high sensitivity of the proposed method, which has a low threshold level of detectable concentration of HEV of 10 IU/ml, is established.

Key words: Hepatitis E virus, nested reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

Гепатит Е (ГЕ) – зооантропонозное заболевание вирусной этиологии с фекально-оральным механизмом передачи возбудителя, склонное к эпидемическому распространению в развивающихся странах. В странах с развитой системой контроля за качеством питьевой воды, к которым относится Республика Беларусь (РБ), заболеваемость ГЕ носит

спорадический характер. До 2016 года в РБ случаи заболевания ГЕ у людей не регистрировались. Начиная с 2017 года в г. Минске было выявлено несколько случаев данной инфекции у человека.

Впервые вирус гепатита Е (ВГЕ) на территории бывшего СССР был обнаружен и описан академиком РАМН М. С. Балаяном и соавт. в 1981 г. в опыте

самозаражения вирусом, полученным из экстракта фекалий 9 военнослужащих, проходящих срочную службу в составе ограниченного контингента в Демократической Республике Афганистан, болевших гепатитом неизвестной этиологии [1]. На сегодняшний день ВГЕ является основной причиной возникновения острого гепатита во всем мире [2]. Ежегодно в мире ВГЕ инфицируются 20 млн. человек, в том числе у 3,3 млн. развивается клинически выраженная картина, из них более 56 тыс. случаев болезни заканчиваются летально [3]. Чаще всего ГЕ проявляется в виде острой самоограничивающейся инфекции, однако у пациентов с хроническим заболеванием печени, у пожилых людей и у беременных женщин может развиваться фульминантная печеночная недостаточность, завершающаяся смертельным исходом в 10–20% случаев [4].

ВГЕ относится к семейству *Heperviridae*, роду *Orthohepevirus*, виду *Orthohepevirus A* и представляет собой безоболочечный РНК-вирус [5]. Только 4 генотипа ВГЕ из 7, принадлежащие к виду *Orthohepevirus A*, способны заражать людей (ВГЕ-1 – ВГЕ-4). Генотипы 1 и 2 (ВГЕ-1 и ВГЕ-2) инфицируют только людей и обуславливают большие эпидемии, связанные с водой. Генотипы 3 и 4 (ВГЕ-3 и ВГЕ-4) обнаруживаются не только у людей, но и у других животных и являются основной причиной аутохтонных случаев гепатита Е в промышленно развитых странах [6]. Свиньи являются основным резервуаром зоонозных ВГЕ-3 и ВГЕ-4 во всем мире, которые широко распространены в свиноводческих стадах. ВГЕ-3 и ВГЕ-4 также способны заражать диких кабанов, которые наряду с домашними свиньями представляют собой крупный резервуар зоонозного ГЕ [7]. Штаммы ВГЕ-3 также были обнаружены у разных видов оленей и японского мангуста [8], диких и домашних кроликов [9, 10].

Для разных генотипов ВГЕ, инфицирующих человека, характерны различия эпидемического процесса. ВГЕ-1 и ВГЕ-2 связаны с обширными эпидемиями среди людей и характерны для развивающихся стран, тогда как ВГЕ-3 и ВГЕ-4 могут инфицировать самые разнообразные виды млекопитающих, включая людей. Генотип ВГЕ-3 широко распространен по всему миру, в то время как ВГЕ-4 генотип был зарегистрирован только в Азии и в Европе. Инфицирование людей ВГЕ-1 и ВГЕ-2 генотипами происходит в основном через загрязненную воду, а инфицирование ВГ-3 и ВГЕ-4 генотипами осуществляется за счет зоонозной передачи вируса через продукты, полученные из мяса свиней, диких кабанов, или оленей [11].

Благодаря филогенетическому анализу последовательностей генома ВГЕ в последнее время выявлено еще 3 генотипа. ВГЕ-5 и ВГЕ-6 были идентифицированы у дикого кабана в Японии [12], ВГЕ-7 был обнаружен в фекальных образцах, полученных от верблюдов [13]. Также были описаны другие животные, инфицированные ВГЕ: крысы, хорьки, нор-

ки, лисицы, летучие мыши, куры, пустельга, сокол. Однако штаммы ВГЕ, обнаруженные у этих животных, генетически более далеки от штаммов ВГЕ человека и классифицируются как разные виды рода *Orthohepevirus*: *Orthohepevirus B*, *Orthohepevirus C* и *Orthohepevirus D*.

Геном ВГЕ имеет длину 7,2 кб и содержит три открытые рамки считывания (ОРС). ОРС1 кодирует структурные белки с предполагаемыми функциональными доменами, включая метилтрансферазу, папаиноподобную цистеиновую протеазу, геликазную и РНК-зависимую РНК-полимеразу. ОРС3 перекрывается с ОРС2 и кодирует небольшой фосфопротеин, который влияет на процесс течения инфекции, исход заболевания и регуляцию реакции организма хозяина. ОРС2 расположена на 3'-конце генома, и состоит из 1980 нуклеотидов. Она кодирует вирусный капсидный белок, который содержит три домена: S, P1 и P2. Белок ОРС2 является самым высоко консервативным среди всех белков, кодируемых ОРС ВГЕ.

На территории РБ существуют условия для эпидемического и эпизоотического процесса ГЕ, что подтверждается собственными результатами изучения серопревалентности. При исследовании образцов сыворотки крови 278 жителей РБ в 27 образцах (9,7%) были обнаружены анти-ВГЕ IgG. При обследовании сывороток 995 иностранных граждан, временно проживающих на территории РБ, у 54 (5,1±1,4%) были обнаружены анти-ВГЕ IgG. В результате изучения популяций домашних кроликов фермерских хозяйств на территории РБ также были получены положительные результаты. В 12,5% случаев были обнаружены анти-ВГЕ IgG [14, 15, 16]. Получены предварительные результаты исследования сывороток крови на наличие IgG к ВГЕ у домашних свиней, диких кабанов, оленей, обитающих на территории РБ. Эти данные позволяют предположить о возможности существования на территории РБ аутохтонных и завозных случаев ГЕ и определяют высокую актуальность дальнейшего изучения эпидемиологической характеристики ГЕ на территории РБ.

Из-за ограниченности применения серологических тестов, связанной с невозможностью выявления антигенных сайтов некоторых штаммов ВГЕ, а также в силу высокой распространённости ВГЕ среди людей и возможности зоонозной передачи ВГЕ, на сегодняшний день существует высокая актуальность использования высокочувствительного метода определения вирусной РНК гепатита Е. Обнаружение РНК ВГЕ имеет преимущество в определении различных генотипов вируса независимо от типа тестируемого биологического образца. Наиболее эффективным методом выявления РНК ВГЕ в организме хозяина является полимеразная цепная реакция (ПЦР). Учитывая высокую гетерогенность штаммов ВГЕ, циркулирующих среди людей и многих видов животных, было разработано несколько традиционных методик

полимеразной цепной реакции по выявлению вирусной РНК в различных типах биологических образцов, включая сыворотки крови и фекалии [17, 18]. Большинство протоколов, используемых для ПЦР-диагностики ВГЕ у людей, подходит также и для выявления штаммов животных 1–4 генотипов. К универсальным относятся праймеры области ОРС2, метилтрансферазы или консервативного участка РНК-зависимой РНК-полимеразы. Более того, большинство традиционных методик ПЦР можно комбинировать с гнездовой ПЦР, что позволяет повысить чувствительность обнаружения следовых количеств вирусной РНК [19].

Сравнительный анализ существующих ПЦР-систем для идентификации ВГЕ выявил значительное варьирование чувствительности при параллельном исследовании одинаковых образцов на базе одной и той же лаборатории [20]. При слепом исследовании для анализа эффективности традиционной ПЦР и ПЦР в реальном времени в 20 различных лабораториях, которые регулярно осуществляли выявление РНК ВГЕ, были обнаружены различия чувствительности кратность которой варьирует от 100 до 1000 раз при анализе образцов стандартной панели штаммов ВГЕ 3 и 4 генотипов [17, 20]. В настоящее время существует лишь одна тест-система ПЦР в режиме реального времени, которая весьма широко используется для обнаружения ВГЕ у людей, благодаря заявленной высокой чувствительности (предел обнаружения составляет 4 геномных эквивалента генома ВГЕ) и способности выявлять все четыре генотипа ВГЕ млекопитающих [21, 22]. Однако, данная система не доступна для широкого использования в ряде стран, в том числе и РФ, из-за своей стоимости и логистических трудностей.

Несмотря на то, что ПЦР в режиме реального времени, предназначенная для выявления консервативных участков генома, обеспечивает точное обнаружение ВГЕ и позволяет получить результаты значительно быстрее, чем традиционный ПЦР анализ, для получения дополнительной характеристики штаммов вируса требуется секвенирование его генома [17, 14]. Имеются сведения о дуплексном ОТ-ПЦР-анализе в режиме реального времени для обнаружения и идентификации 3 и 4 генотипов ВГЕ. Данный анализ ориентирован на выявление области перекрытия ОРС2-ОРС3 и разработан таким образом, чтобы обеспечить чувствительное и быстрое вы-

явление зоонозных генотипов ВГЕ с целью проведения эпидемиологических исследований [23].

Целью данного исследования являлась оценка эффективности использования предложенной нами универсальной методики гнездовой ОТ-ПЦР для выявления ВГЕ в различных видах биологических образцов, полученных от человека и животных.

Материалы и методы

Для проведения данного исследования осуществлялся забор биологических образцов на протяжении 2014–2017 гг. Проанализированы образцы биологического материала от 77 свиней, 37 диких кабанов, 30 оленей, 165 кроликов. Для исследований проводился забор биологических жидкостей (кровь, моча), фекалий, желчи, либо образцов различных органов и тканей в стерильные пробирки. Забор крови осуществлялся в пробирки, содержащие антикоагулянт (ЭДТА). До проведения исследований образцы биологического материала хранили при -20°C .

Из образцов фекалий готовили 10–20% осветлённый экстракт. Для этого пробы фекалий объемом 1,0 мл (0,4–1,0 г) помещали в отдельные стерильные пробирки и к каждому образцу добавляли по 4,0 мл физиологического раствора. Взвесь интенсивно встряхивали на вортексе и центрифугировали в течение 30 минут при 3000 об./мин., после чего супернатанты переносили в новые пробирки и повторно центрифугировали 20 минут при 10000 об./мин. Полученные надосадочные жидкости отбирали и переносили в отдельные пробирки для дальнейшего анализа. Образцы органов и тканей предварительно измельчали специальными приспособлениями (погружной блендер, гомогенизатор и пр.). Суммарную РНК выделяли из 50 мкл надосадочной жидкости фекальных экстрактов с помощью набора для выделения нуклеиновых кислот (Jena Bioscience, Германия) по протоколу производителя. Полученные пробы РНК сразу же использовали для постановки ОТ-ПЦР.

Выявление РНК ВГЕ проводили в два раунда. Первый раунд включал стадию обратной транскрипции участков РНК в кДНК и их последовательную многократную амплификацию с типоспецифическими внешними праймерами. Второй раунд включал амплификацию продукта первого раунда с внутренними праймерами (таблица 1). Использование

Таблица 1. Нуклеотидные последовательности праймеров, используемые для первого и второго раундов ПЦР

Последовательность	Положение	Направление	Позиция в геноме*
5' - AAУTATGСMCAGTACCGGGTTG - 3'	Внешний	Прямой	5687–5708
5' - ССТТATССТGCTGAGCATTCTC - 3'	Внешний	Обратный	6395–6414
5' - GTYATGYTYTGСATACAGGCT - 3'	Внутренний	Прямой	5972–5993
5' - AGCCGACGAAATYAATTCTGTG - 3'	Внутренний	Обратный	6298–6319

* – нумерация нуклеотидных позиций приведена по штамму ВГЕ Burma (номер в базе данных GenBank M73218).

вложенной (гнездовой) ПЦР с вырожденными праймерами к участку ORC2 генома ВГЕ позволяет добиться высокой чувствительности и специфичности анализа.

Рабочие амплификационные смеси ОТ-ПЦР-1 для первого и ПЦР-2 для второго раунда готовили в соответствии с таблицами 2 и 3.

Таблица 2. Компоненты реакционной смеси для первого раунда ПЦР

Компоненты	Объем для 1 пробы (мкл)
Вода для ПЦР	7,5
Буфер для обратной транскриптазы (5X)	5
Смесь дНТФ (10 мМ)	2
Внешний праймер прямой (10 мкМ)	1,5
Внешний праймер обратный (10 мкМ)	1,5
RiboLock (20 ЕД/мкл)	1,0
Обратная транскриптаза (200 ЕД/мкл)	1,0
ДНК-полимераза (5 ЕД/мкл)	0,5
Объем смеси на 1 пробирку	20
Исследуемая РНК	5

Таблица 3. Компоненты реакционной смеси для второго раунда ПЦР

Компоненты	Объем для 1 пробы (мкл)
Вода	6,5
ПЦР-Мастер-Микс	12,5
Внутренний праймер прямой (10 мкМ)	1,0
Внутренний праймер обратный (10 мкМ)	1,0
Объем смеси на 1 пробирку	21
Реакционная смесь первого раунда, содержащая кДНК	4

Реакционную смесь перемешивали на vortexe, центрифугировали и разливали по 20 мкл по отдельным ПЦР-пробиркам. После внесения образца исследуемой РНК пробирку сразу помещали в амплификатор, запрограммированный на определенный режим в зависимости от раунда реакции.

Таблица 4. Программа амплификации первого раунда (ОТ-ПЦР-1)

Этап	Температура, °	Продолжительность	К-во циклов
Обратная транскрипция	42	1 час	1
Дезактивация фермента ОТ	94	5 мин	1
Денатурация	94	30 сек	35
Отжиг	45	30 сек	
Элонгация	72	45 сек	
Финальная элонгация	72	7 мин	1

Таблица 5. Программа амплификации второго раунда ПЦР

Этап	Температура, °	Продолжительность	К-во циклов
Денатурация	94	5 мин	35
Денатурация	94	30 сек	
Отжиг	45	30 сек	
Элонгация	72	45 сек	1
Финальная элонгация	72	7 мин	

Продукты ПЦР разделялись электрофоретически в 2% агарозе, содержащей 2,5 мкг/мл бромистого этидия, и визуализировались в ультрафиолетовом свете на трансиллюминаторе. Для контроля размера полученных фрагментов использовали коммерческие маркеры размера ДНК (Fermentas) при каждом электрофорезе наряду с образцами. Величина продукта амплификации для данного фрагмента генома ВГЕ составляла 350 п.о. В качестве положительного контроля использовался изолят свиного штамма ВГЕ. Положительный и отрицательный контроли использовали в каждом исследовании для исключения контаминации образцов.

Для сравнения предложенной методики с существующими аналогами, проводили выявление РНК ВГЕ в одних и тех же образцах биологического материала, полученных от здоровых, а также инфицированных людей и животных (свиньи и кролики) параллельно двумя методами: гнездовой ОТ-ПЦР, предложенной нами и коммерческой тест-системой ПЦР для количественного определения РНК ВГЕ в режиме реального времени RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 (Altona, Германия). В целях стандартизации предложенного метода с определением порогового уровня чувствительности осуществляли исследование серии разведений (раститровки) РНК, полученной из заведомо известного положительного образца фекального экстракта человека.

Результаты и обсуждение

При анализе фекальных экстрактов кроликов методом гнездовой ОТ-ПЦР было выявлено 33 положительных результата из 165, что составило 33,3%. Все обследованные кролики находились на территории Минской области. Результаты электрофореза образцов после проведения ОТ и гнездовой ПЦР представлены на рисунке 1.

В результате исследования фекальных экстрактов домашних свиней установлено 20 положительных образцов из 77 (26%). В 26 экстрактах, полученных из фекалий диких кабанов РНК ВГЕ выявлено не было. ПЦР анализ 8 образцов желчи, 2 образцов печени и 1 образца мяса диких кабанов также не выявил положительных результатов. При этом все анализируемые образцы фекалий были получены от свиней Минской области, а фекалии диких кабанов собирались

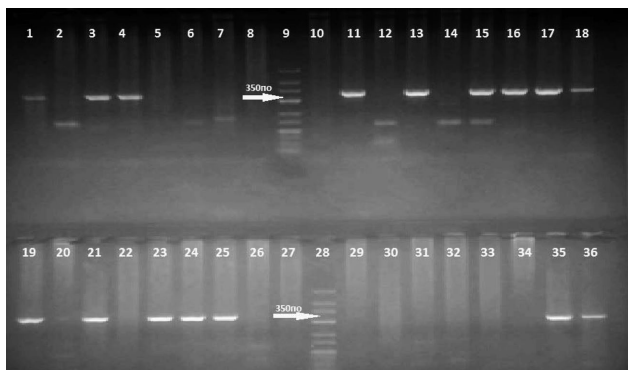


Рис. 1. Электрофореграмма результатов ОТ-ПЦР образцов кроликов
1, 3, 4, 11, 13, 15, 16, 17, 18, 19, 21, 23, 24, 25, 35, 36 дорожки – образцы фекалий, в которых обнаруживается ВГЕ (полоса 350 п.н.); 2, 5, 6, 7, 8, 10, 12, 14, 20, 22, 26, 27, 29, 30, 31, 32, 33, 34 дорожки – образцы фекалий, в которых не обнаруживается ВГЕ (отсутствие полосы 350 п.н.); 9, 28 дорожки – маркер молекулярного веса ДНК (сверху вниз: 700, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50, 25 п.н).

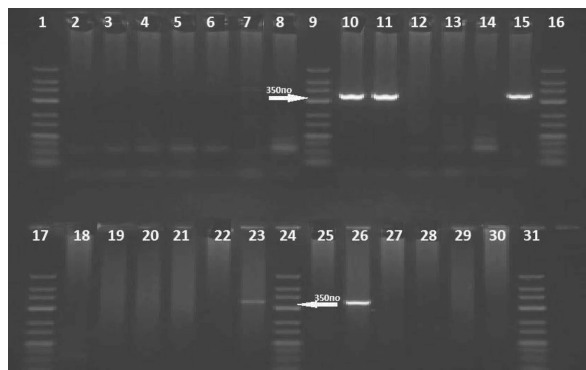


Рис. 2. Электрофореграмма результатов ОТ-ПЦР образцов свиней и диких кабанов
10, 11, 15, 23, 26 дорожки – образцы фекалий свиньи, в которых обнаруживается ВГЕ (полоса 350 п.н.); 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 18, 19, 20, 21, 22, 25, 27, 28, 29, 30 дорожки – образцы фекалий свиньи и диких кабанов, в которых не обнаруживается ВГЕ (отсутствие полосы 350 п.н.); 1, 9, 16, 17, 24, 31 дорожки – маркер молекулярного веса ДНК (сверху вниз: 700, 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75, 50, 25 п.н).

как на территории Минской, так и Гродненской областей (рисунок 2).

При исследовании двух образцов мяса оленей, наличие вирусной РНК установлено в одном образце. Анализ 26 фекальных образцов и 2 образцов крови оленей не выявил ни одного положительного результата.

При обследовании 98 пациентов с острым гепатитом, у пяти из них установлен острый вирусный гепатит Е (ОВГЕ). Уточнение анамнеза позволило связать три из этих случаев ГЕ с употреблением свиного мяса, один – свиной печени, а один – недостаточно термически обработанной олениной. У всех в начале заболевания были выявлены анти-ВГЕ IgM с последующим снижением их титра и нарастанием титра анти-ВГЕ IgG. У двоих из них выявлена РНК ВГЕ в образцах сыворотки крови и экстрактах фекалий (рисунок 3).

При секвенировании выявленной РНК установлен третий генотип ВГЕ.

Сопоставление данных исследования положительных и отрицательных образцов биологического материала здоровых и инфицированных людей и животных выявило абсолютное соответствие полученных результатов, что демонстрирует высокую специфичность и чувствительность предложенного метода.

Для определения порогового уровня чувствительности, предложенного нами метода гнездовой ОТ-ПЦР, положительный образец РНК, полученный из фекального экстракта инфицированного человека, исследовали с помощью диагностического набора RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 с целью установления концентрации вируса ($8,6 \times 10^5$ МЕ/мл). После этого охарактеризованный количественно образец РНК раститровали для получения семи различных проб

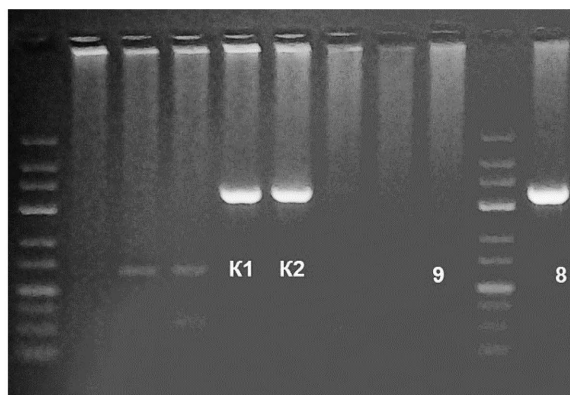
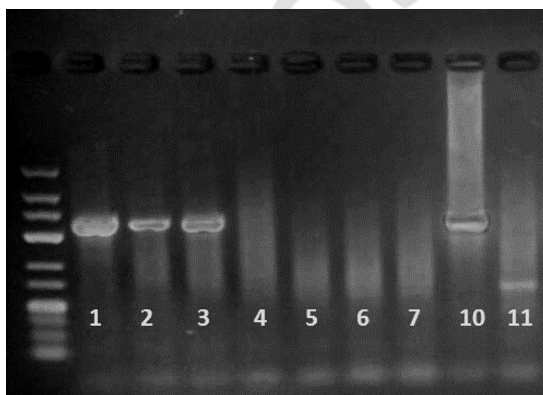


Рис. 3. Электрофореграммы результатов ОТ-ПЦР образцов биологического материала пациентов С и К, полученные в динамике острого ГЕ
1, 2, 3, K1 и K2 дорожки – образцы сыворотки крови, в которых обнаруживается ВГЕ (полоса 350 п.н.), 8, 10 дорожки – образцы экстрактов фекалий, в которых обнаруживается ВГЕ

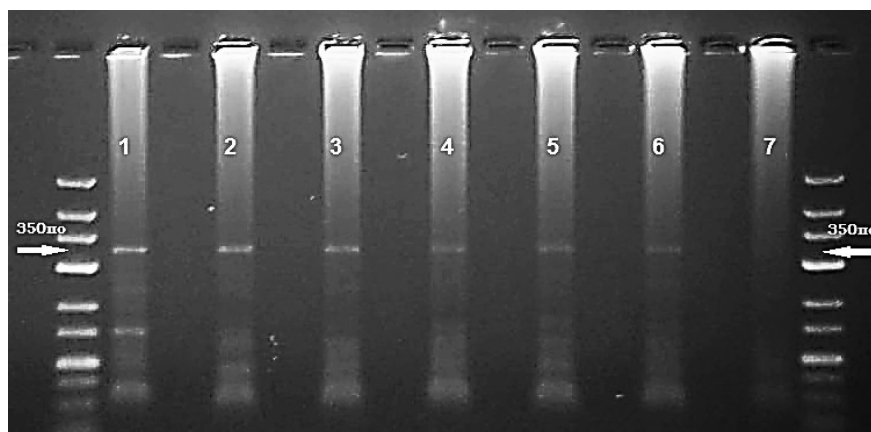


Рис. 4. Электрофореграмма результатов исследования порога чувствительности метода гнездовой ОТ-ПЦР. Дорожка 1 – $8,6 \times 10^3$ МЕ/мл, дорожка 2 – 3×10^2 МЕ/мл, дорожка 3 – 100 МЕ/мл, дорожка 4 – 50 МЕ/мл, дорожка 5 – 25 МЕ/мл, дорожка 6 – 10 МЕ/мл, дорожка 7 – 5 МЕ/мл.

с известными концентрациями ВГЕ. Результаты исследования чувствительности нашего метода ОТ-ПЦР представлены на рисунке 4.

Как видно из электрофореграммы, минимальной детектируемой концентрацией РНК ВГЕ является значение 10 МЕ/мл (дорожка 6).

ГЕ является зооантропоозным заболеванием и, как показали проведенные исследования, имеет широкое распространение среди домашних и диких животных [1]. Степень распространённости ВГЕ в РБ до сих пор остается неизученной, как среди животных, так и среди людей. Имеющиеся данные свидетельствует о скрытом эпидемическом процессе ГЕ на территории РБ. Для изучения циркуляции ВГЕ в популяциях человека, диких и домашних животных РБ нами предложен специфический и высокочувствительный метод выявления РНК ВГЕ, в различных образцах биологического материала.

Гнездовая ПЦР является высокочувствительным методом выявления малых количеств специфических нуклеотидных последовательностей. Для идентификации РНК ВГЕ нами была отработана и адаптирована методика ОТ-ПЦР, предполагающая возможность экстракции вирусной РНК из фекальных экстрактов с помощью любых доступных методов выделения тотальных нуклеиновых кислот. Положительным аспектом предложенной методики является возможность использования практически любого варианта из большого выбора наборов для проведения реакции обратной транскрипции. Используемые нами праймеры, представляют собой вырожденные последовательности ДНК, комплементарные участку ORC2 генома ВГЕ, кодирующему вирусный капсидный белок, который связывается с клетками организма-хозяина и способствует появлению антител. Применение таких праймеров позволяет идентифицировать вирусную РНК гепатита Е у разных видов млекопитающих, в том числе у человека, что и было продемонстрировано в настоящем исследовании.

Литература

1. Balayan M. S. Brief report: experimental hepatitis E infection in domestic pigs // Journal of Medical Virology. – 1990. – Vol. 32, № 1. – P. 58–9.
2. Doceul, V., Bagdassarian, E., Demange, A., Pavio, N. & Zoonotic Hepatitis, E. Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. Viruses 8, E270 (2016).
3. Гепатит Е. Информационный бюллетень. Июль 2016 г. www.who.int/mediacentre/factsheets/fs280/ru.
4. Khuroo M. S., Teli M. R., Skidmore S., et al. Incidence and severity of viral hepatitis in pregnancy. Am J Med. 1981; Vol. 70: 252-255.
5. Doceul, V., Bagdassarian, E., Demange, A., Pavio, N. & Zoonotic Hepatitis, E. Virus: Classification, Animal Reservoirs and Transmission Routes. Viruses 8, E270 (2016).
6. Meng, X. J. Recent advances in hepatitis E virus // J Viral Hepat. 2010. № 17. P. 153–161.
7. Pavio, N., Meng, X.-J., Doceul, V. Zoonotic origin of hepatitis E. Curr. Opin. Virol. 2015, 10, 34–41.
8. Nidaira, M., Takahashi, K., Ogura, G., Taira, K., Okano, S., Kudaka, J., Itokazu, K., Mishiro, S., Nakamura, M. Detection and phylogenetic analysis of hepatitis E viruses from mongooses in Okinawa, Japan. J. Vet. Med. Sci. 2012, 74, 1665–1668.
9. Caruso, C., Modesto, P., Prato, R., Scaglione, F. E., De Marco, L., Bollo, E., Acutis, P. L., Masoero, L., Peletto, S. Hepatitis E Virus: First description in a pet house rabbit. A new transmission route for human? Transbound. Emerg. Dis. 2015, 62, 229–232.
10. Lhomme, S., Dubois, M., Abravanel, F., Top, S., Bertagnoli, S., Guerin, J.-L., Izopet, J. Risk of zoonotic transmission of HEV from rabbits. J. Clin. Virol. 2013, 58, 357–362.
11. Lu L, Li C, Hagedorn CH. / Phylogenetic analysis of global hepatitis E virus sequences: genetic diversity, subtypes and zoonosis. Rev. Med. Virol. 2006. 16:5–36.
12. Smith, D. B., Simmonds, P., Jameel, S., Emerson, S. U., Harrison, T. J., Meng, X.-J., Okamoto, H., Van der Poel, W. H. M., Purdy, M. A., et al. Consensus proposals for classification of the family Hepeviridae. J. Gen. Virol. 2014, 95, 2223–2232.
13. Woo, P. C. Y., Lau, S. K. P., Teng, J. L. L., Tsang, A. K. L., Joseph, M., Wong, E. Y. M., Tang, Y., Sivakumar, S., Xie, J., Bai, R., Wernery, R., et al. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. Emerg. Infect. Dis. 2014, 20, 1044–1048.

14. Мохаммед А. М., Потемкин И. А., Карлсен А. А., Исаева О. В., Кюрегян К. К., Козлов В. Г., Жаворонок С. В., Михайлов М. И. Циркуляция вируса гепатита е кроликов на территориях с разной степенью эндемичности по гепатиту Е // Современные проблемы науки и образования. 2015. № 2. С. 64.

15. Жаворонок С. В., Арабей А. А., Зновец Т. В., Ягвдик Е. Н., Давыдов В. В., Красочно П. А. Кюрегян К. К., Михайлов М. М., Алаторцева Г. И. Вирусный гепатит Е среди различных животных и людей в Республике Беларусь. Материалы III всероссийской научно-практ. конференции с международным участием. Москва: Изд. «Ваш полиграфический партнер», Сочи, 2016. – С. 136–138.

16. Арабей А. А., Мохаммед А. М. Е., Жаворонок С. В., Кюрегян К. К., Бутько Л. В., Давыдов В. В., Михайлов М. И. / Обнаружение вируса гепатита Е среди кроликов в Республике Беларусь // Военная медицина. – 2015. – № 2. – С. 51–54.

17. Baylis SA, Hanschmann KM, Blumel J, Nubling CM. / Standardization of hepatitis E virus (HEV) nucleic acid amplification techniquebased assays: an initial study to evaluate a panel of HEV strains and investigate laboratory performance. J. Clin. Microbiol. 2011. 49:1234–1239.

18. Huang S, Zhang X, Jiang H, Yan Q, Ai X, Wang Y, Cai J, Jiang L, Wu T, Wang Z, Guan L, Shih JW, Ng MH, Zhu F, Zhang J, Xia N. Profile of acute infectious markers in sporadic hepatitis E. PLoS One, 2010. 5:e13560.

19. Ruggeri, F. M., Di Bartolo, I., Ostanello, F., Trevisani, M. Hepatitis E virus. An emerging zoonotic and foodborne pathogen. Springer, 2013, p. 56–57.

20. Gyarmati P, Mohammed N, Norder H, Blomberg J, Belak S, Widen F. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and Primer-Probe Energy Transfer. J. Virol. Methods. 2007, 146:226–235.

21. Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ, Hill VR. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. J. Virol. Methods, 2006 131:65–71.

22. Garson JA, Ferns RB, Grant PR, Ijaz S, Nastouli E, Szypulska R, Tedder RS. Minor groove binder modification of widely used TaqMan probe for hepatitis E virus reduces risk of false negative real-time PCR results. J. Virol. Methods, 2012; 186:157–160.

23. Zhang X, Li A, Shuai J, Dai Y, Zhu Z, Wu S, He Y. Validation of an internally controlled multiplex real time RT-PCR for detection and typing of HEV genotype 3 and 4. J. Virol. Methods, 2013;193:432–438.

24. Xia J, Zeng H, Liu L, Zhang Y, Liu P, Geng J, Wang L, Wang L, Zhuang H. Swine and rabbits are the main reservoirs of hepatitis E virus in China: detection of HEV RNA in feces of farmed and wild animals. Arch Virol., 2015 Nov;160(11):2791-8.