

УДК 616.36-002-022.6-092.4

DOI: 10.14427/jipai.2018.2.48

## Создание экспериментальной модели вирусного гепатита E у кроликов

А.А. Арабей<sup>1</sup>, С.В. Жаворонок<sup>1</sup>, Ж.А. Макаревич<sup>1</sup>, С.И. Марчук<sup>1</sup>, В.В. Малашко<sup>2</sup><sup>1</sup> Белорусский государственный медицинский университет (Минск, РБ)<sup>2</sup> Гродненский государственный аграрный университет (Гродно, РБ)

### Experimental model of viral hepatitis E in rabbits

А.А. Arabey<sup>1</sup>, S.V. Zhavoronok<sup>1</sup>, Z. A. Makarevich<sup>1</sup>, S. I. Marchuk<sup>1</sup>, V.V. Malashko<sup>2</sup><sup>1</sup> Belarusian state medical university (Minsk, Belarus)<sup>2</sup> Grodno state agrarian university (Grodno, Belarus)

#### Аннотация

Настоящее исследование направлено на изучение патогенеза ВГЕ у кроликов, инфицированных изолятом ВГЕ кроликов. У всех зараженных ВГЕ животных наблюдались клинические проявления заболевания, наличие прерывистой вiremии, повышение уровня активности печёночной аланинаминотрансферазы (АЛТ) и экскреция вирусной РНК с фекалиями и мочой на протяжении 12 недель эксперимента. Гистопатологическое исследование образцов печени опытных животных продемонстрировало признаки хронического воспаления и разрушение гепатоцитов. РНК ВГЕ выявлена в образцах желчи, печени, двенадцатиперстной кишки, селезёнки и почек инфицированных кроликов. Установлены признаки воспалительного процесса в тканях селезёнки и почек животных. Полученные результаты свидетельствуют о том, что штаммы ВГЕ кроликов способны индуцировать тяжёлую форму гепатита с тенденцией к хроническому течению болезни. Исследование продемонстрировало, что кролики являются подходящей моделью для изучения патогенеза ВГЕ.

#### Ключевые слова

Вирус гепатита E, кролики, патогенез

Гепатит E (ГЕ) – острое самоограничивающееся инфекционное заболевание, которое вызывает вирус гепатита E (ВГЕ) [1]. ВГЕ впервые описал Балаян М.С. с помощью опыта самозаражения материалом, полученным от больных гепатитом E людей [2]. Данная инфекция широко распространена в развивающихся странах, включая Азию

#### Summary

This study focused on investigation the pathogenesis seen in rabbits following infection with a rabbit HEV isolate. All animals inoculated with the homologous rabbit HEV became infected, exhibiting clinical symptoms, an intermittent viremia, increase of liver function biomarkers alanine aminotransferase (ALT) and persistent fecal and urine virus shedding throughout the 12 weeks of study. In addition, liver histopathology showed both chronic inflammation and destruction of hepatocytes. HEV RNA was detected in bile, liver, duodenum, spleen and kidney from the necropsied rabbits. Inflammation of spleen and kidney was also observed. These results suggest that rabbit HEV infection may cause more severe hepatitis and prolong the course of the disease, with a possible chronic trend of hepatitis in rabbits. These data indicate that rabbits are an appropriate model for HEV infection which may help to study HEV pathogenesis.

#### Keywords

Hepatitis E virus, rabbits, pathogenesis

и Африку, а также встречается в промышленно развитых регионах, являясь причиной возникновения автохтонных спорадических случаев инфицирования [3]. Геном ВГЕ представлен одноцепочечной молекулой РНК позитивной полярности, насчитывающей около 7500 нуклеотидных оснований. Вирусный геном включает в себя

5'-нетранслируемую область (НТО), открытую рамку считывания 1 (ОРС1), кодирующую неструктурные белки, ОРС3, которая кодирует небольшой многофункциональный белок, участвующий в регуляции ответа организма хозяина и исходе заболевания, ОРС2, кодирующую капсидный белок, и 3'-НТО, за которой следует хвост полиаденозина, состоящий из 150-200 пар оснований. Идентифицирована также ОРС4, расположенная в пределах области ОРС1 генома ВГЕ, которая отвечает за синтез белка длиной 20 кДа [4]. В настоящее время известно 8 генотипов ВГЕ, выявленных как у животных, так и у людей. Установлена зооантропонозная природа данного заболевания [5, 6, 7, 8, 9].

ВГЕ кроликов впервые обнаружен в Китае в 2009 году, при этом распределение анти-ВГЕ иммуноглобулинов у кроликов 10 регионов Китая составило 15,4%. Нуклеотидная последовательность генома ВГЕ кроликов сходна с 1-4 генотипами примерно на 77-79% [10, 11]. Позднее на территории США, Франции и России также была выявлена циркуляция ВГЕ у кроликов, установленная с помощью ПЦР-анализа различных образцов биологического материала животных [12, 13, 14]. Республика Беларусь не является исключением, так как циркуляция маркеров ВГЕ была установлена у свиней, диких кабанов и кроликов [15, 16]. Ввиду распространенности ВГЕ у кроликов, а также риска зоонозной передачи инфекции людям и другим видам животных необходимы дополнительные исследования ВГЕ кроликов.

Несмотря на то, что ВГЕ кроликов отличается от генотипов ВГЕ других млекопитающих, экспериментальные исследования продемонстрировали возможность инфицирования кроликов 1-4 генотипами ВГЕ наряду с кроличьим генотипом [17], что позволяет использовать кроликов в качестве подходящей и легкодоступной модели для исследования гепатита Е. На сегодняшний день циркуляция и локализация вируса ВГЕ, а также период возникновения специфичных антител к антигенным детерминантам ВГЕ в организме хозяина изучены недостаточно хорошо. Экспериментальное инфицирование кроликов ВГЕ может расширить диапазон знаний о патогенезе, характере течения заболевания и особенности локализации вируса в органах и тканях организма-хозяина.

В развитых странах отмечается рост случаев хронического гепатита Е, обусловленных 3 и 4 генотипами [18, 19]. Определяющими признаками хронического гепатита Е служат высокие

уровни аминотрансфераз, виремия и характерная гистологическая картина тканей печени [19]. При исследовании инфицированных ВГЕ кроликов, установлена фекальная экскреция вирусной РНК на протяжении 9 месяцев наблюдения [20]. Результаты гистопатологического анализа печени животных выявили хроническую воспалительно-клеточную инфильтрацию и выраженный портальный фиброз, что указывало на хронический ВГЕ. Длительная виремия и фекальная экскреция вируса у инфицированных ВГЕ кроликов сопоставима с клинической картиной хронического ВГЕ, наблюдаемого у людей [21].

ВГЕ кроликов способен пересекать межвидовой барьер и инфицировать различные виды животных. Исследователями продемонстрирована высокая инфектогенность штаммов ВГЕ кроликов в отношении свиней при внутривенном введении вируса [22]. У половины зараженных животных отмечалась виремия и выделение вируса с фекалиями. Кроме этого, вирус, полученный из фекалий свиней, эффективно инфицировал здоровых кроликов. В другом исследовании показана способность ВГЕ кроликов реплицироваться в клеточных линиях PLC/PRF/5 и A549, полученных из гепато-клеточной карциномы и рака легких человека соответственно [23]. Более того, французские учёные выявили в образцах биологического материала людей последовательности ВГЕ сходные с нуклеотидными последовательностями изолятов вируса, полученных у кроликов [24].

**Целью** настоящего исследования являлось изучение патогенетических особенностей гепатита Е, локализации вируса в различных органах и биологических жидкостях, динамики циркуляции антител к вирусным антигенам, а также морфологических изменений тканей у кроликов, экспериментально инфицированных ВГЕ.

### Материалы и методы

Экспериментальные исследования проводились согласно принципам, изложенным в постановлении Межпарламентской ассамблеи государств-участников Содружества независимых государств 31.10.2007 № 29-17 о модельном законе «Об обращении с животными».

В качестве объекта для моделирования вирусного гепатита Е использовались белые кролики (6 самок и 7 самцов) весом 2,1-3,7 кг в возрасте 16 недель. Перед инфицированием животных обследовали для исключения циркуляции антител к ВГЕ в сыворотке крови методом ИФА и РНК ВГЕ в образцах фекалий методом ПЦР анализа.

Изолят ВГЕ кроликов, который использовался в настоящем эксперименте, выделяли из образцов фекалий инфицированных кроликов. Для этого готовили 10% суспензию на фосфатно-солевом буфере (ФСБ). Полученную взвесь центрифугировали при 4000 об./минуту в течение 30 минут и стерилизовали с помощью фильтра 0,2 мкм. Наличие РНК ВГЕ в полученном растворе подтверждали методом обратнo-транскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) [16].

Животных распределили случайным образом на 2 группы. Кроликов экспериментальной группы (n=8) инфицировали внутривенно суспензией, содержащей ВГЕ кроликов в концентрации  $7 \times 10^2$  МЕ/мл. Количественное исследование концентрации вируса осуществляли с помощью коммерческого набора RealStar® HEV RT-PCR Kit 2.0 (Altona, Германия). Кроликам контрольной группы (n=5) вводили стерильный раствор ФСБ. Животных содержали в индивидуальных клетках на протяжении всего эксперимента с круглосуточным доступом к воде и корму. Наблюдение за экспериментальными животными осуществлялось на протяжении 12 недель.

У кроликов экспериментальной и контрольной групп еженедельно осуществлялся забор крови, мочи и кала. В конце эксперимента животных подвергали эвтаназии с последующим взятием образцов желчи и внутренних органов (печень, двенадцатиперстная кишка, селезёнка, почка) для исследования в ОТ-ПЦР. Часть образцов внутренних органов фиксировали в 10% формалине для гистопатологического исследования.

Сыворотку крови животных получали центрифугированием цельной крови при 3000 об./минуту в течение 15 минут и тестировали на активность аланинаминотрансферазы (АЛТ) кинетическим методом («Анализ-Х», РБ) с использованием биохимического анализатора Clima MC 15 (RAL, Испания).

Определение анти-ВГЕ иммуноглобулинов класса G в образцах сывороток крови кроликов осуществляли с помощью адаптированной методики, в которой использовались компоненты коммерческого набора «ДС-ИФА-Анти-HEV-G» (НПО Диагностические системы, РФ) в сочетании с пероксидазным конъюгатом белка А (Имтек, РФ) [25].

Образцы цельной крови, мочи, фекалий и внутренних органов исследовали на наличие РНК ВГЕ методом гнездовой ОТ-ПЦР [16]. Для этого из 100 мкл фекальных экстрактов, неагулированной крови, желчи или гомогенизированных тканей выделяли суммарную РНК с

помощью набора для экстракции нуклеиновых кислот (Jena Bioscience, Германия) по протоколу производителя. Идентификацию РНК ВГЕ проводили с помощью набора вырожденных праймеров к участку ORC2 генома ВГЕ. Внешние праймеры: прямой 5'-aay tat gcm cag tac cgg gttg-3', обратный 5'-ccc tta tcc tgc tga gca ttctc -3'; внутренние праймеры: прямой 5'- gty atg yty tgc ata cat ggct -3', обратный 5'-agc cga cga aat yaa ttc tgt c -3'. Условия проведения первого раунда ПЦР, совмещённого с обратной транскрипцией: 42 °C – 1 час, затем 5 мин. – 94 °C (денатурация и инактивация обратной транскриптазы), затем 35 циклов: 94 °C – 30 сек, 45 °C – 30 сек., 72 °C – 45 сек., финальная элонгация – 72 °C – 7 мин. Второй раунд ПЦР: 35 циклов: 94 °C – 30 сек, 45 °C – 30 сек., 72 °C – 45 сек., финальная элонгация – 72 °C – 7 мин. Постановка ОТ-ПЦР осуществлялась на амплификаторе Gradient palm cycler (Corbett research, Австралия).

Для гистопатологического исследования образцы органов животных фиксировали в 10% формалине, после чего делали срезы толщиной 7 мкм и окрашивали гематоксилином и эозином. Анализ срезов проводился с использованием системы «Биоскан» (РБ).

Статистическая обработка данных проводилась с помощью программного пакета STATISTICA 10 с применением U критерия Манна-Уитни для анализа количественных показателей, а также точного теста Фишера и критерия  $\chi^2$  для качественных данных.

## Результаты и обсуждения

Все образцы биологического материала кроликов контрольной и опытной групп перед инфицированием штаммом ВГЕ продемонстрировали отрицательные результаты в ИФА и ПЦР. Кроме того, у животных контрольной группы на протяжении 12 недель эксперимента отсутствовали какие-либо клинические, биохимические и молекулярно-биологические проявления ВГЕ.

В экспериментальной группе кроликов клинические и лабораторные признаки инфицирования начали появляться на первой неделе исследования (рис. 1).

У 6 из 8 кроликов наблюдалась вялость, диарея и отказ от пищи. У одного кролика (№41) кроме диспепсического синдрома отмечались слизистые выделения из кишечника. На 9-й день после инфицирования этот кролик выбыл из эксперимента вследствие гибели.

Исследование фекалий кроликов на наличие РНК ВГЕ на 7-е и 14-е сутки после заражения

установило положительные результаты у всех животных. При этом, у трёх кроликов (№ 45, 47, 50) экскреция вирусной РНК в стуле детектировалась каждую неделю до момента завершения эксперимента. У пяти животных наблюдалась волнообразная экскреция РНК ВГЕ с фекалиями, что может быть связано с поступлением недостаточной порции желчи в просвет кишечника. Следует отметить, что на 11 и 12 неделях исследования вирусная РНК наблюдалась в фекалиях у пяти кроликов из восьми, что может свидетельствовать о хроническом течении заболевания. Установлены значимые различия в выявлении РНК ВГЕ в фекалиях животных экспериментальной и контрольной групп на протяжении всего исследования (табл. 1).

Как отражено в таблице 1, вирусная РНК носила волнообразный характер и отмечалась у 4-х инфицированных кроликов (№ 44, 45, 47, 50) в период с 4 по 12 недели исследования. При этом выявление РНК ВГЕ в крови инфицированных и контрольных кроликов значимо не различалось.

Для того, чтобы оценить какой тип биологического материала инфицированных кроликов является наиболее диагностически информативным, осуществлено суммирование всех положительных и отрицательных результатов, полученных в ходе ПЦР-анализа образцов крови, мочи и фекалий за 12 недель наблюдения. Продемонстрирована наибольшая выявляемость вирусной РНК в фекалиях и моче животных, наименьшая – в образцах крови (рис. 2).

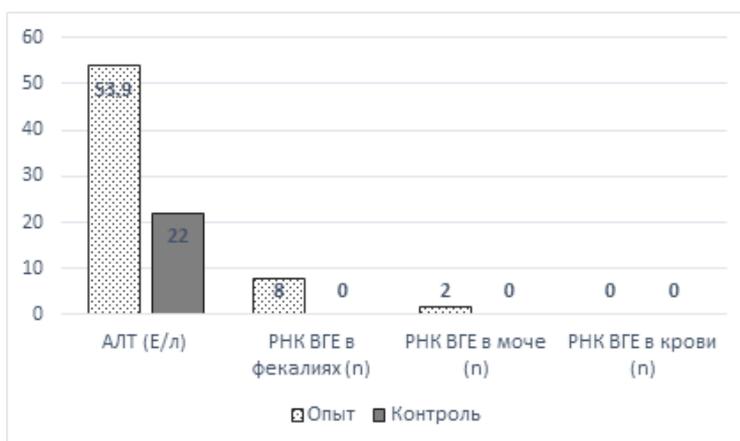


Рис. 1. Лабораторные признаки ВГЕ в опытной группе кроликов на 1-й неделе эксперимента

Таблица 1. Детекция РНК ВГЕ в образцах фекалий и крови кроликов.

Недели	Экспериментальная группа 1		Контрольная группа 2		Статистическая значимость различий выявления РНК в фекалиях кроликов 1 и 2 групп
	РНК в крови	РНК в фекалиях	РНК в крови	РНК в фекалиях	
1	0/8	8/8	0/5	0/5	F=1, p=0,0008
2	0/7	7/7	0/5	0/5	F=1, p=0,0013
3	1/7	6/7	0/5	0/5	F=0,714, p=0,0076
4	2/7	7/7	0/5	0/5	F=1, p=0,0013
5	0/7	7/7	0/5	0/5	F=1, p=0,0013
6	0/7	6/7	0/5	0/5	F=0,714, p=0,0076
7	0/7	6/7	0/5	0/5	F=0,714, p=0,0076
8	3/7	7/7	0/5	0/5	F=1, p=0,0013
9	3/7	5/7	0/5	0/5	F=0,51, p=0,0265
10	1/7	5/7	0/5	0/5	F=0,51, p=0,0265
11	2/6	4/6	0/5	0/5	F=0,476, p=0,0455
12	1/6	4/6	0/5	0/5	F=0,476, p=0,0455

Установлены статистически значимые различия между определением РНК ВГЕ в фекалиях и крови ( $\chi^2=86,76$ ,  $p<0,0001$ ), фекалиях и моче ( $\chi^2=32,92$ ,  $p<0,0001$ ). Более того, детекция РНК ВГЕ в образцах мочи инфицированных кроликов достоверно отличалась от определения вируса в крови ( $\chi^2=15,38$ ,  $p=0,0001$ ), что указывает на значимость исследования мочи наряду с анализом образцов фекалий и крови для диагностики заболевания. Следует также отметить, что появление вирусной РНК в моче возникало у кроликов ранее виремии и совпадало с началом фекальной экскреции вируса. Положительные пробы мочи детектированы на 7 и 14 день после инфицирования у 2-х и 4-х кроликов соответственно (рис. 3). Исследование образцов мочи инфицированных кроликов методом ОТ-ПЦР установило наличие вирусной РНК у 5 из 8 животных за весь период наблюдения.

Проведено исследование образцов воды из мисок-поилок инфицированных кроликов на наличие вирусной РНК. ПЦР-анализ продемонстрировал положительный результат анализируемых проб, что указывает на способность ВГЕ кроликов существовать в водной среде, образуя резервуар инфекции, способствующий дальнейшему распространению заболевания.

Анализ биохимических изменений в крови не установил статистически значимых различий средних показателей активности АЛТ в группах кроликов до начала эксперимента (0 неделя). Рост активности АЛТ в сыворотке инфицированных кроликов наблюдался на 7 день после заражения, превысив среднее значение контрольной группы в 2,5 раза (рис. 4). В контрольной группе кроликов не отмечалось роста уровня активности АЛТ на протяжении всего исследования. Средний уровень активности АЛТ в контроле

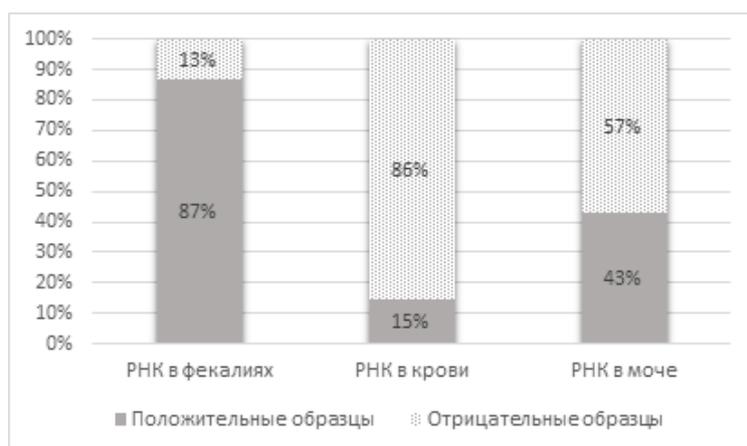


Рис. 2. Детекция РНК ВГЕ в образцах крови, мочи и фекалий инфицированных кроликов за 12 недель исследования

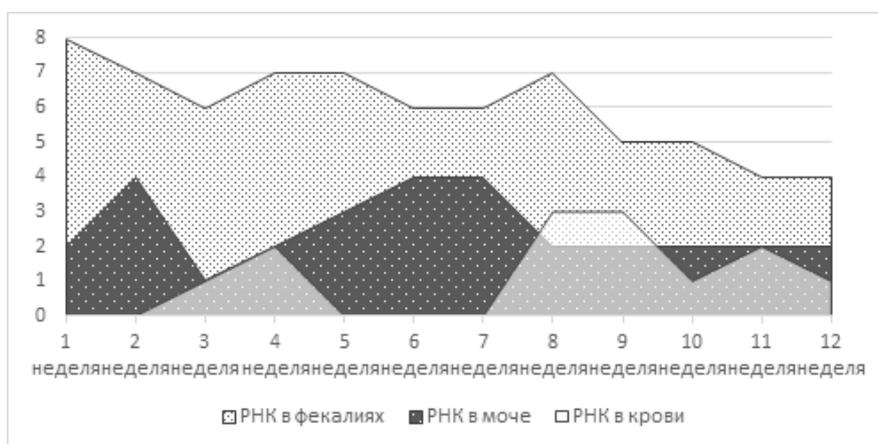


Рис. 3. Динамика циркуляции РНК ВГЕ в крови и экскреции с мочой и фекалиями в группе опытных кроликов

за 12 недель наблюдения составил 32,4 Е/л с наименьшим показанием на 2-й неделе (17,8 Е/л) и максимальным на 4-й неделе (43,7 Е/л).

Статистический анализ данных активности АЛТ установил достоверные различия между контрольной и опытной группами кроликов с 1 по 12 недели исследования ( $p < 0,05$ ), за исключением 4-й недели наблюдения. При этом среднее значение активности АЛТ в опытной группе животных на 12 неделе продолжало оставаться высоким (95,2 Е/л), превышая соответствующий показатель контрольной группы в 3 раза. Это может свидетельствовать о продолжающемся цитолитическом синдроме, вызванном токсическим поражением клеток печени вирусом.

Возникновение специфических анти-ВГЕ иммуноглобулинов класса G в сыворотке крови опытных животных наблюдалось, начиная с 4-й недели после инфицирования (рис. 5).

Как видно из представленного рисунка, анти-ВГЕ-IgG циркулировали в крови одного кролика на 4-й неделе, у 2-х на 5-й неделе, у 3-х кроликов на 8-й неделе эксперимента. При этом у кроликов с установленной циркуляцией специфических антител наблюдалась одновременная экскреция РНК ВГЕ с калом и мочой, а также вирусемия (табл. 2).

Следует отметить, что к 10-12 неделе исследования циркуляция специфических антител определялась только у 4 кроликов из 8, при этом у 3-х из

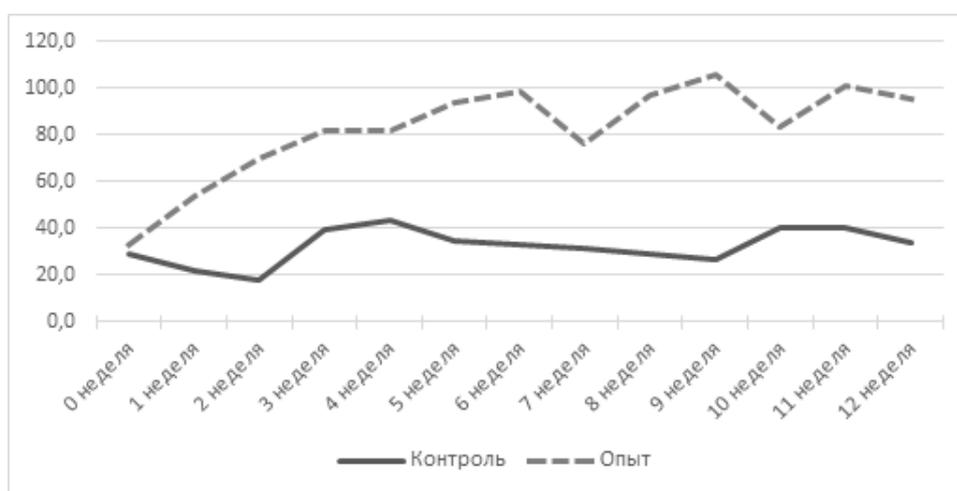


Рис. 4. Динамика активности АЛТ в контрольной и опытной группах кроликов

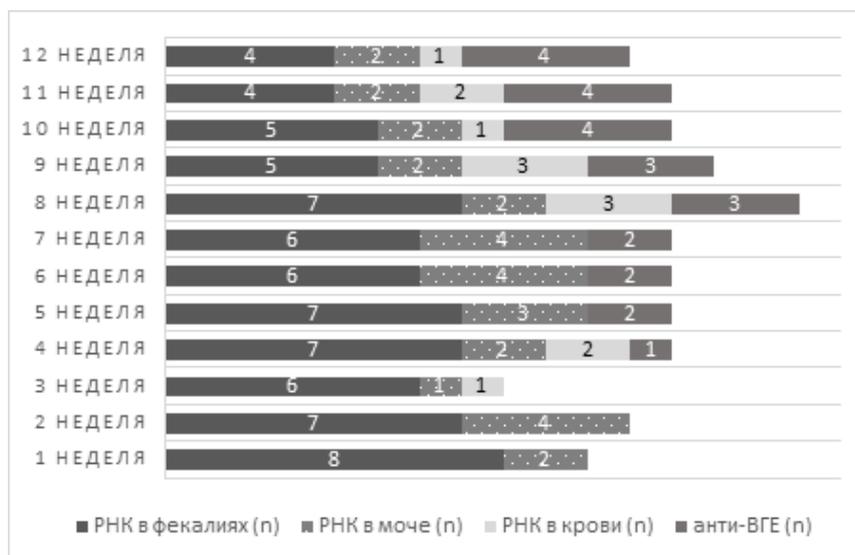


Рис. 5. Динамика циркуляции маркеров ВГЕ у инфицированных кроликов

них наблюдалась экскреция вируса с фекалиями, у 2-х - выделение вируса с мочой, и у одного кролика детектировалась виремия.

Для того, чтобы определить локализацию ВГЕ, проведено исследование образцов желчи, печени, двенадцатиперстной кишки, селезёнки и почек у контрольных и инфицированных животных методом ОТ-ПЦР. Образцы желчи и органов всех кроликов контрольной группы продемонстрировали негативные результаты исследований. Молекулярно-биологический анализ внутренних органов экспериментальной группы животных установил наличие РНК ВГЕ в образцах печени и желчи кроликов, а также внепечёночную локализацию вируса, выявленную в кишечнике, селезёнке и почках животных (табл. 3).

У кролика №46 РНК ВГЕ выявлена в желчи, кишечнике, а также в фекалиях на последней неделе, но при этом вирус не был определён в образцах печени, селезёнки, почки, мочи и крови. На 12 неделе после инфицирования у этого

кролика установлена циркуляция антител к ВГЕ. Отсутствие вируса в печени можно объяснить постепенным процессом выздоровления.

У кроликов под номерами 44, 45, 49 и 50 вирус детектирован в тканях почки, а также в моче (кроме №49) на последней неделе эксперимента, однако виремия наблюдалась только у №45 и 50. Это указывает на возможность репликации вируса в тканях почки независимо от наличия виремии. Присутствие РНК ВГЕ установлено в селезёнках семи животных, но при этом виремия наблюдалась только у двух.

Гистологическое исследование срезов печени кроликов контрольной группы не установило признаков патологических изменений (рис. 6Г). Напротив, в образцах печени инфицированных кроликов наблюдалось выраженное нарушение балочного строения печёночных долек, разрушение и вакуолизация гепатоцитов, являющаяся признаком жировой дистрофии (рис. 6А). На месте разрушенных гепатоцитов, синусоидов и

**Таблица 2. Возникновение и продолжительность циркуляции маркеров ВГЕ у кроликов**

№ кролика	Начало и длительность экскреции РНК ВГЕ с калом (нед.)	Начало и длительность виремии (нед.)	Начало и длительность экскреции РНК ВГЕ с мочой (нед.)	Начало сероконверсии анти-ВГЕ (нед.)
41	1	-	-	-
44	1 - 12	4 - 11	2 - 12	-
45	1 - 10	8 - 10	2 - 10	8
46	1 - 12	-	5	12
47	1 - 12	9 - 11	2 - 9	4
48	1 - 11	-	1 - 7	5
49	1 - 8	-	-	-
50	1 - 12	3 - 12	1 - 12	-

**Таблица 3. Детекция РНК ВГЕ в тканях внутренних органов и желчи кроликов после выведения из эксперимента**

№ кролика	РНК ВГЕ в желчи	РНК ВГЕ в печени	РНК ВГЕ в кишечнике	РНК ВГЕ в селезёнке	РНК ВГЕ в почке
41	+	+	+	+	-
44	+	+	+	+	+
45	+	+	+	+	+
46	+	-	+	-	-
47	+	+	+	+	-
48	+	+	+	+	-
49	+	+	+	+	+
50	+	+	+	+	+
42к	-	-	-	-	-
43к	-	-	-	-	-
51к	-	-	-	-	-
52к	-	-	-	-	-
53к	-	-	-	-	-

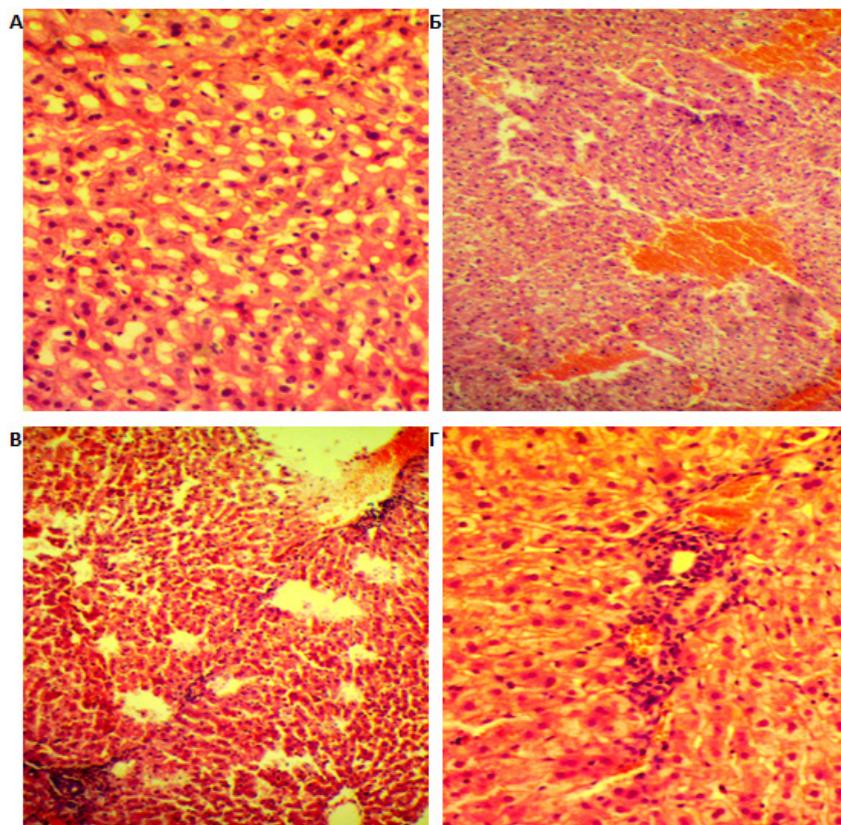
междольковых прослоек соединительной ткани выявлены многочисленные бесклеточные пространства различных размеров (рис. 6В). Установлены лейкоцитарно-макрофагальные очаги инфильтрации, наблюдаемые при хроническом воспалительном процессе в тканях. Зафиксировано поражение сосудов печени, сопровождающееся многочисленными кровоизлияниями в различных участках печёночных долек (рис. 6Б). Кроме того, выявлены нарушения целостности структуры желчных протоков с формированием обширных вакуолей и очагами лимфопролиферации в зоне портального тракта.

При гистопатологическом исследовании тканей почек инфицированных животных выявлено расширение просвета канальцев нефронов и скопление в них белкового содержимого, а также разрушение почечных клубочков и их фрагментация (рис. 7А), образование вакуолей на месте разрушенных извитых канальцев (рис. 7Б), многочисленные кровоизлияния, вакуолярная дистрофия клеток, разрушение капсулы нефронов. Установлена также лимфоцитарная инфи-

трация коркового и мозгового вещества почки, указывающая на протекающий воспалительный процесс в тканях (рис. 7В). Исследование срезов почечной ткани кроликов контрольной группы продемонстрировало нормальную гистологическую картину (рис. 7Г).

Патоморфологический анализ тканей селезёнки инфицированных кроликов продемонстрировал разрыхление стенок сосудов, тромбоз и многочисленные кровоизлияния (рис. 8В), активную пролиферацию лимфоцитов, дезинтеграцию и опустошение лимфоидных узелков с формированием отдельных островков, а также уменьшение просвета кровеносных сосудов (рис. 8Б). Красная пульпа селезёнки кроликов характеризовалась разрыхлённой структурой, кроме этого в белой и красной пульпе наблюдалась активная лимфоцитарная реакция. Установлена выраженная гипертрофия трабекул и повышенная концентрация лимфоцитов и плазмочитов вокруг них (рис. 8А).

Гистологическое исследование тканей селезёнки кроликов контрольной группы установило от-



**Рис. 6.** Гистологическое исследование образцов печени (гематоксилин-эозин): А) дисконкомплексация печеночных балок, гидропическая и жировая дистрофия гепатоцитов (x100); Б) многочисленные кровоизлияния в разных участках доли печени (x40); В) многочисленные бесклеточные вакуоли на месте разрушенных гепатоцитов, синусоидов и междольковых прослоек соединительной ткани (x40); Г) контроль (x100).

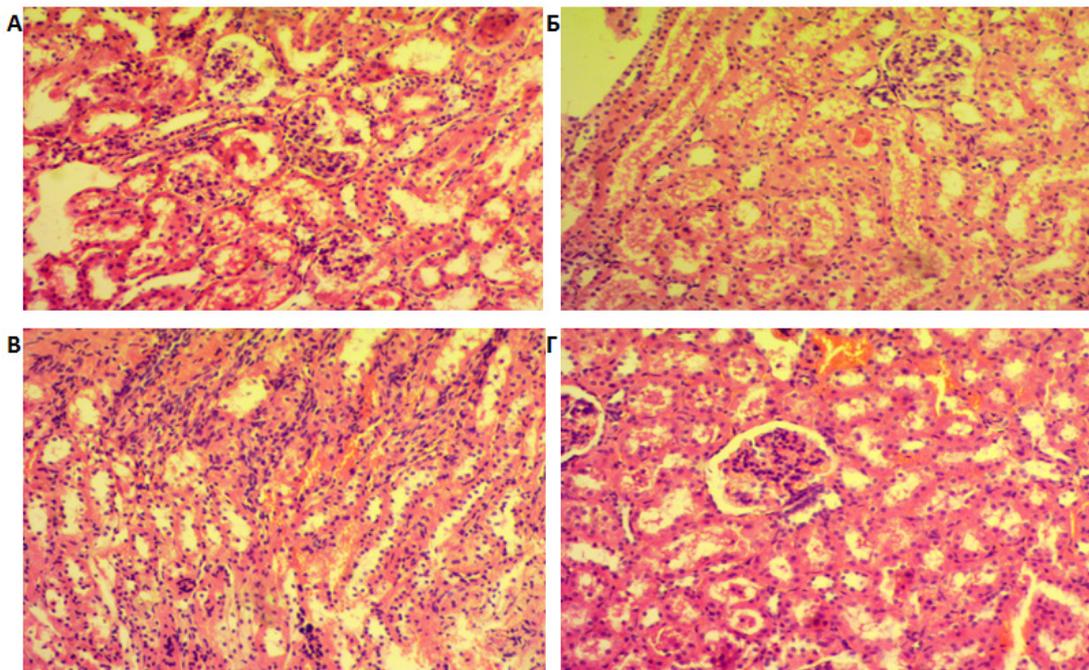


Рис. 7. Гистологическое исследование образцов почек (гематоксилин-эозин, x100): А) разрушение почечных клубочков; Б) скопление детритных масс в просвете канальцев; В) инфильтрация лимфоцитами коркового и мозгового вещества почки; Г) контроль.

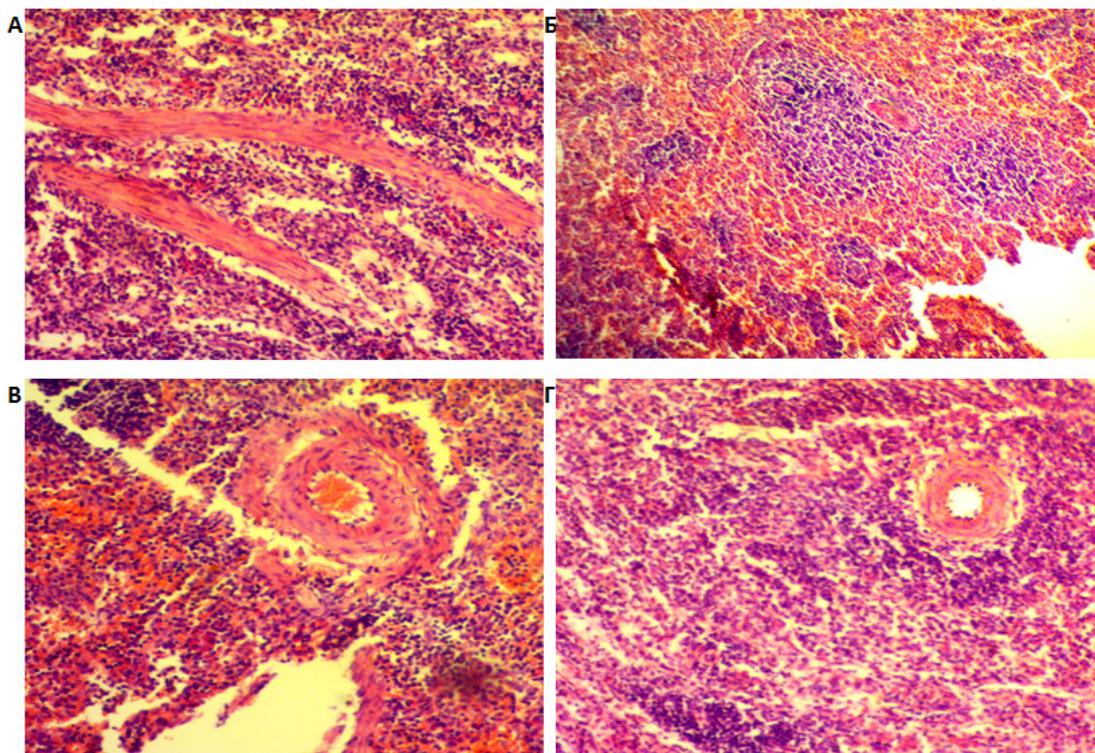


Рис. 8. Гистологическое исследование образцов селезёнки кроликов (гематоксилин-эозин, x100): А) гипертрофия трабекул, вокруг которых концентрируются лимфоциты и плазмоциты; Б) дезинтеграция и опустошение лимфоидных узелков, формирование отдельных островков, уменьшение просвета кровеносных сосудов; В) разрывление стенок сосуда, тромбоз, микрокровоизлияния; Г) контроль.

сутствие каких-либо патологических изменений (рис. 8Г).

Таким образом, в настоящем исследовании получена экспериментальная модель ВГЕ на лабораторных кроликах путём внутривенного введения изолята ВГЕ белорусских кроликов в концентрации  $7 \times 10^2$  МЕ/мл, которая позволила изучить отдельные клинические, биохимические и молекулярно-биологические проявления ГЕ у кроликов.

Установлены клинические симптомы инфицирования кроликов ВГЕ, представленные вялостью, диареей, слизистыми выделениями из кишечника, отказом от пищи, а также возможность летального исхода инфицированных животных. Выявлена продолжительная экскреция РНК ВГЕ с фекалиями, наблюдаемая в течение 12 недель, что указывает на хроническое течение инфекции у заражённых кроликов.

Диагностирована волнообразная персистенция вируса в крови, моче и фекалиях инфицированных животных. Установлены статистически значимые различия между выявлением РНК ВГЕ в фекалиях и крови ( $\chi^2=86,76$ ,  $p<0,0001$ ), фекалиях и моче ( $\chi^2=32,92$ ,  $p<0,0001$ ). Продемонстрирована наибольшая детектируемость вирусной РНК в фекалиях и моче животных по сравнению с исследованием крови. Выделение вируса с мочой достоверно отличалось от циркуляции вируса в

крови кроликов ( $\chi^2=15,38$ ,  $p=0,0001$ ), что указывает на высокую диагностическую значимость исследования мочи.

Исследование образцов воды из поилок инфицированных кроликов продемонстрировало положительный результат, что указывает на способность ВГЕ кроликов существовать в водной среде, образуя резервуар инфекции.

Рост показателей активности АЛТ в сыворотке крови инфицированных кроликов установлен с 1 по 12 недели эксперимента, что свидетельствует о продолжительном цитолитическом синдроме в тканях печени. Установлены достоверные различия активности АЛТ между контрольной и опытной группами кроликов ( $p<0,05$ ).

Выявлена репликация РНК вируса в желчи и печени инфицированных животных. Установлена внепечёночная локализация ВГЕ в селезёнке, кишечнике и почках кроликов. Репликация ВГЕ в печени, почках и селезёнке происходила независимо от наличия вiremии у некоторых животных.

При гистологическом анализе образцов печени, почек и селезёнки больных кроликов наблюдались патологические изменения, характеризующиеся нарушением морфологической структуры, кровоизлияниями в ткани и лимфоцитарной пролиферацией, свойственные для хронического воспалительного процесса.

## Литература

- Purdy M.A., Khudyakov Y.E. The molecular epidemiology of hepatitis E virus infection. *Virus Research*. 2011; 161: 31-39.
- Balayan M.S., Andjaparidze A.G., Savinskaya S.S. et al. Evidence for a virus in non-A non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology* 1983; Vol.20: 23-31.
- Purcell R.H. Hepatitis E virus. In: Knipe D, Howley P, Griffin D, Lamb R, Martin M, et al., eds. *Fields Virology*, 2001; 4th edn: 3051-3061.
- Nair V.P., Anang S.A., Subramani C. et al. Endoplasmic reticulum stress induced synthesis of a novel viral factor mediates efficient replication of genotype 1 hepatitis E virus. *PLoS Pathog.* 2016; 12: e1005521.
- Haqshenas G., Shivaprasad H., Woolcock P. et al. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis-splenomegaly syndrome in the United States. *Journal of General Virology*, 2001; 82: 2449-2462.
- Meng X.J., Purcell R.H., Halbur P.G. et al. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1997; 94: 9860-9865.
- Johne R., Heckel G., PlengeBonig A. et al. Novel hepatitis E virus genotype in Norway rats, Germany. *Emerging infectious diseases* 2010; 16: 1452.
- Takahashi M., Nishizawa T., Sato H. et al. Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *Journal of General Virology* 2011; 92: 902-908.
- Sridhar S, Teng JLL, Chiu T-H et al. Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants. Haybaeck J, ed. *International Journal of Molecular Sciences* 2017; 18(4): 869.
- Zhao C., Ma Z., Harrison T.J., et al. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent among farmed rabbits in China. *Journal of medical virology* 2009; 81: 1371-1379.
- Geng Y., Zhao C., Song A., et al. The serological prevalence and genetic diversity of hepatitis E virus in farmed rabbits in China. *Infection, Genetics and Evolution* 2011; 11: 476-482.
- Мохаммед А.М.Е., 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; № 2-1.
- Cossaboom C.M., Cordoba L., Dryman B.A., Meng X.J. Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA. *Emerging infectious diseases*, 2011; 17: 2047.
- Izopet J., Dubois M., Bertagnoli S. et al. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerging infectious diseases* 2012; 18: 1274.
- Арабей А.А., Мохаммед А.М.Е., Жаворонок С.В. и др. Обнаружение вируса гепатита Е среди кроликов в Республике Беларусь. *Военная медицина* 2015; №2: 51-53.

16. Арабей А.А., Марчук С.И., Макаревич Ж.А. и др. Являются ли домашние животные резервуаром вирусного гепатита Е у человека? Результаты молекулярно-генетических исследований с использованием адаптированного метода ПЦР-анализа. *Лабораторная диагностика. Восточная Европа* 2017; №3 (6): 343-351.
17. Ma H., Zheng L., Liu Y. et al. Experimental infection of rabbits with rabbit and genotypes 1 and 4 hepatitis E viruses. *PLoSone*, 2010; 5: e9160.
18. Shrestha A., Gupta B., Lama T. Current Treatment of Acute and Chronic Hepatitis E Virus Infection: Role of Antivirals. *Euroasian Journal of Hepato-Gastroenterology* 2017; 7(1): 73-77.
19. Kamar N., Selves J., Mansuy J.M. et al. Hepatitis E virus and chronic hepatitis in organ-transplant recipients. *N Engl J Med* 2008; 358(8): 811-817.
20. Han J., Lei Y., Liu L. et al. SPF rabbits infected with rabbit hepatitis E virus isolate experimentally showing the chronicity of hepatitis. *Plos One*, 2014; 9(6): e99861.
21. Kamar N., Izopet J., Dalton H.R. Chronic Hepatitis E Virus Infection and Treatment. *Journal of Clinical and Experimental Hepatology*. 2013; 3(2): 134-140.
22. Cossaboom C.M., Cordoba L., Sanford B.J., et al. Cross-species infection of pigs with a novel rabbit, but not rat, strain of hepatitis E virus isolated in the United States. *J Gen Virol*, 2012; 93 (Pt 8): 1687-1695.
23. Jirintai S., Jinshan, Tanggis, Manglai D. et al. Molecular analysis of hepatitis E virus from farm rabbits in Inner Mongolia, China and its successful propagation in A549 and PLC/PRF/5 cells. *Virus Res* 2012; 170 (1-2): 126-137.
24. Kaiser M., Delaune D., Chazouillères O. et al. A World Health Organization Human Hepatitis E Virus Reference Strain Related to Similar Strains Isolated from Rabbits. *Genome Announcements* 2018; 6(16): e00292-18.
25. Арабей А.А., Жаворонок С.В., Бутько Л.В. Использование белка А для диагностики ВГЕ у животных. *Экология и животный мир: международный научно-практический журнал* 2016; №1: 49-52.

#### Сведения об авторах:

Арабей Анастасия Анатольевна – Белорусский государственный медицинский университет, старший научный сотрудник. [belsoloby@gmail.com](mailto:belsoloby@gmail.com). Дзержинского, 83/5. +375172079894.

Жаворонок Сергей Владимирович – Белорусский государственный медицинский университет, Профессор кафедры инфекционных болезней. [Zhavoronok.S@mail.ru](mailto:Zhavoronok.S@mail.ru). Кропоткина, 76. +375172392890.

Марчук Светлана Ивановна – Белорусский государственный медицинский университет, старший научный сотрудник. Дзержинского, 83/5. +375172079894.

Макаревич Жанна Анатольевна – Белорусский государственный медицинский университет, заведующий вивариумом. Дзержинского, 83/5.

Малашко Виктор Викторович – Гродненский государственный аграрный университет, декан факультета ветеринарной медицины. г. Гродно, ул. Академическая, 10.

Поступила 12.04.2018 г.