

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.168>
<https://orcid.org/0000-0003-2996-229X>

VILNIAUS UNIVERSITETAS

Martynas
SIMANAVIČIUS

Hepatito E viruso diagnostika ir paplitimo tyrimai

DAKTARO DISERTACIJA

Gamtos mokslai,
biochemija (N 004)

VILNIUS 2021

Disertacija rengta 2016 – 2020 metais Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centre.

Mokslinius tyrimus rėmė Lietuvos mokslo taryba.

Mokslinė vadovė – dr. Indrė Kučinskaitė-Kodzė (Vilniaus universitetas, gamtos mokslai, biochemija, N 004).

<https://doi.org/10.15388/vu.thesis.168>

<https://orcid.org/0000-0003-2996-229X>

VILNIUS UNIVERSITY

Martynas
SIMANAVIČIUS

The prevalence studies and diagnostics of hepatitis E virus

DOCTORAL DISSERTATION

Natural Sciences,
Biochemistry (N 004)

VILNIUS 2021

This dissertation was written between 2016 and 2020 at Vilnius University.
The research was supported by the Research Council of Lithuania.

Academic supervisor – dr. Indrė Kučinskaitė-Kodzė (Vilnius University,
Natural Sciences, Biochemistry, N 004).

TURINYS

SANTRUMPOS	7
ĮVADAS	10
1. LITERATŪROS APŽVALGA	13
1.1 HEV klasifikacija	13
1.2 HEV šeimininkai ir nešiotojai	16
1.3 HEV replikacija ir genomo struktūra	19
1.4 HEV viriono susidarymas ir išėjimas iš ląstelės	21
1.5 HEV patekimas į ląstelę	26
1.6 HEV kapsidės baltymas	27
1.7 Hepatito E klinikiniai simptomai	30
1.8 Molekuliniai HEV nustatymo metodai	35
1.9 Imunocheminiai HEV nustatymo metodai	38
1.10 HEV-3 ir žiurkių HEV paplitimas	42
1.11 Monokloniniai antikūnai	49
1.12 Literatūros apžvalgos apibendrinimas	51
2. MEDŽIAGOS IR METODAI	54
2.1 Medžiagos	54
2.1.1 Reagentai	54
2.1.2 Tirpalai ir terpės	55
2.1.3 Antriniai antikūnai	56
2.1.4 Rinkiniai	56
2.1.5 Rekombinantiniai baltymai	57
2.1.6 Eksperimentiniai gyvūnai	57
2.1.7 Ląstelių linijos	58
2.1.8 Bakterijų kamienai	59
2.1.9 Pradmenys	59
2.1.10 Vektoriai	62
2.2 Biologiniai mėginiai ir jų rinkimas	62
2.3 Metodai	64
2.3.1 Monokloninių antikūnų kūrimas	64

2.3.2	Imunocheminiai analizės metodai.....	67
2.3.3	Molekulinės biologijos ir genų inžinerijos metodai.....	70
2.3.4	Bioinformatikos metodai.....	76
2.3.5	Imunocheminiai biologinių mėginių analizės metodai	76
2.3.6	Statistiniai metodai.....	80
3.	REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS	81
3.1	Monokloninių antikūnų prieš hepatito E virusą kūrimas	81
3.1.1	HEV kapsidės baltymai.....	82
3.1.2	Hibridomų kūrimas ir stabilizavimas	86
3.1.3	Monokloninių antikūnų apibūdinimas	87
3.2	Serologinių HEV nustatymo sistemų modeliavimas.....	96
3.3	Laukinių žiurkių mėginių tyrimas	99
3.3.1	HEV RNR nustatymas ir HEV genominių fragmentų filogenetinė analizė žiurkių mėginiuose.....	100
3.3.2	Antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymas žiurkių mėginiuose serologiniais metodais	105
3.4	Antikūnų prieš HEV nustatymas kiaulių mėginiuose serologiniais metodais	107
3.5	Žmonių kraujo mėginių tyrimas.....	111
3.5.1	Antikūnų prieš HEV nustatymas žmonių kraujo mėginiuose serologiniais metodais	112
3.5.2	Antikūnų prieš HEV nustatymas žmonių kraujo mėginiuose panaudojant rekombinantinius HEV kapsidės baltymus	114
3.6	HEV kapsidės baltymų nustatymas kraujo mėginiuose	117
3.7	Rezultatų apibendrinimas.....	119
	IŠVADOS.....	122
	FINANSINĖ PARAMA.....	123
	PADĖKA.....	124
	LITERATŪROS SĄRAŠAS.....	125
	PRIEDAI	158
	PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS	168

SANTRUMPOS

A549/D3 – žmogaus plaučių karcinomos ląstelių linija
ACTB – žiurkių β -aktino iRNR
ALT – alanino transaminazė
APS – amonio peroksosulfatas
ASGPR – asialoglikobaltymo receptorius
AST – aspartato transaminazė
AT-kPGR – atvirkštinės transkripcijos kiekybinė PGR
AT-LAMP – atvirkštinės transkripcijos izoterminis pagausinimas (angl. *reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*)
AT-PGR – atvirkštinės transkripcijos PGR
BSA – jaučio serumo albuminas (angl. *bovine serum albumin*)
CCF – krūtinės ertmės skystis (angl. *chest cavity fluid*)
CDR – komplementarumą nulemianti sritis (angl. *complementary determining region*)
C_H – sunkiosios grandinės pastoviosios dalies domenas
C_L – lengvosios grandinės pastoviosios dalies domenas
DMSO – dimetilsulfoksidas
eHEV – HEV virionas su apvalkalėliu
EpCAM – epitelio ląstelinė adhezijos molekulė
ESCRT – endosominiai rūšiavimo kompleksai reikalingi transportavimo sistemai (angl. *endosomal sorting complexes required for transport*)
FBS – fetalinis veršiuko serumas (angl. *fetal bovine serum*)
HAT – hipoksantino, aminopterino, timidino mišinys hibridomų selekcijai
HBV – hepatito B virusas
HCV – hepatito C virusas
Hel – RNR helikazė
HEV – hepatito E virusas
HGPRT – hipoksantinguaninfosforiboziltransferazė
HRP – krienų peroksidazė (angl. *horseradish peroxidase*)
HSPG – heparansulfato proteoglikanai
HT – hipoksantino, timidino mišinys hibridomų selekcijai
HVR – hipervariabilus regionas
IFA – imunofermentinė analizė (angl. *enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA*)
IgG – imunoglobulinas G
IgM – imunoglobulinas M

IPTG – izopropil- β -tiogalaktopiranozidas
ITGA3 – integrinas $\alpha 3$
kDNR – kopijinė DNR
kPGR – kiekybinė PGR
LIL – lėtinės inkstų ligos
MAk – monokloniniai antikūnai
MAk–HRP – MAk žymėti HRP
MARC-145, Vero – beždžionės inkstų ląstelių linijos
Met – metiltransferazė
MVB – daugialypiai kūneliai (angl. *multivesicular bodies*)
NA – neuralginė amiotrofija
ORF – atviro skaitymo rėmelis (angl. *open reading frame*)
ORF2^C – HEV kapsidės baltymas sudarantis virioną (Yin et al., 2018)
ORF2^S – sekretuojamas HEV kapsidės baltymas (Yin et al., 2018)
ORF2c – sekretuojamas sutrumpintas HEV kapsidės baltymas (Montpellier et al., 2018)
ORF2g – sekretuojamas glikozilintas HEV kapsidės baltymas (Montpellier et al., 2018)
ORF2i – infektyvų virioną sudarantis HEV kapsidės baltymas (Montpellier et al., 2018)
OT – optinis tankis
PAk – polikloniniai antikūnai
PBS – fosfatinis buferinis tirpalas
PBST – PBS su 0,1 % Tween-20
PCP – į papainą panaši cisteino proteazė
PEG – polietilenglikolis
PI – pasikliautinis intervalas
PK-15 – kiaulės inkstų ląstelių linija
PSAP – prolinu turtingas motyvas
PVDF – polivinildifluoridas
RdRp – nuo RNR priklausoma RNR polimerazė
S/P – tiriamo mėginio OT santykis su teigiamos kontrolės OT (angl. *sample-to-positive ratio*)
SDS – natrio dodecilsulfatas
SDS–PAGE – natriododecilsulfato poliakrilamidinio gelio elektroforezė
Sp2/0 – pelių mielominė ląstelių linija
TEMED – tetrametiletandiaminas
TGOLN2 – Goldžio aparato tinklo baltymas

TIM-1 – T ląstelių imunoglobulino mucino domenas 1
TK – timidinkinazės
TMB – tetrametilbenzidinas
Tn5 ir Sf9 – vabzdžių ląstelių linijos
Tsg101 – imlumo navikui genas 101 (angl. *tumor susceptibility gene 101*)
V_H – sunkiosios grandinės kaičiosios dalies domenas
V_L – lengvosios grandinės kaičiosios dalies domenas
VPD – virusą primenančios dalelės
ŽIV – žmogaus imunodeficito virusas

ĮVADAS

Hepatitis E yra infekcinė liga, kurią sukelia hepatito E virusas (HEV). HEV turi teigiamos orientacijos viengrandės RNR genomą ir yra priskiriamas *Hepeviridae* šeimai. Šiuo metu *Orthohepevirus* gentį sudaro septyni HEV genotipai, kurie infekuoja įvairius žinduolius. HEV genotipai 1, 2, 3, 4 ir 7 gali infekuoti žmones. Pirmas HEV genotipas (HEV-1) ir HEV-2 cirkuliuoja žmonių populiacijoje, plinta per užterštą vandenį ir sukelia infekcijų protrūkius su mirtinomis pasekmėmis. HEV-3 yra zoonotinis – gali infekuoti ne tik žmones, bet ir kiaules, šernus, elnius ir kitus žinduolius. HEV-3 dažniausiai plinta per blogai termiškai apdorotą kiaulieną, šernieną, elnieną ar jų produktus. HEV-3 gali būti perduodamas medicinoje naudojamais kraujo produktais ar organų transplantatais. Lyginant su HEV-1 ir HEV-2, HEV-3 – mažiau patogeniškas virusas, pavojingiausias silpną imuninę sistemą turintiems asmenims bei pacientams, kuriems atliekamas gydymas kraujo produktais, imunosupresiniais preparatais, organų transplantatais. Taip pat yra tikimybė, kad HEV-3 gali infekuoti ne tik žmonės ir kiaules, bet ir žiurkes, kurios yra daugelio infekcijų sukėlėjų nešiotojos. HEV-3 infekcija yra potenciali grėsmė visuomenės sveikatai.

Hepeviridae šeimai priskiriami į HEV panašūs virusai identifikuoti vištose, šeškuose, lapėse, šikšnosparniuose, briedžiuose ir kt. Žiurkių HEV identifikuotas 2010 metais Vokietijoje ir nustatytas daugelyje kitų valstybių. Nuo viruso atradimo buvo diskutuojama, ar jis gali būti zoonotinis, kol 2018–2020 m. buvo nustatytos pirmosios žiurkių HEV zoonozės. Šiuo metu žiurkių HEV yra pripažįstamas kaip žmogaus patogenas.

Epidemiologiniai HEV tyrimai žmonėse atliekami molekuliniais ir serologiniais metodais. Standartizuoti diagnostiniai molekuliniai metodai – populiariausi nustatant HEV infekcijas. Serologiniai metodai epidemiologiniams tyrimams galėtų būti paprastesnė ir ekonomiškai naudingesnė priemonė. Deja, kol kas nėra standartizuoto serologinio diagnostinio metodo. Tyrėjai naudoja įvairių gamintojų ar savo pačių sukurtas serologines sistemas. Rezultatai būna skirtingi ir priklauso nuo gamintojo, todėl yra poreikis naujoms serologinės diagnostikos sistemoms. Be to, neseniai nustatytos žiurkių HEV zoonozės žmonių populiacijoje rodo, kad serologinių sistemų, kurios nustato antikūnus prieš žiurkių HEV, aktualumas auga.

HEV biologijoje taip pat yra daug neatsakytų klausimų apie viruso replikaciją ir plitimą. Tokiems tyrimams galėtų pasitarnauti įvairiomis savybėmis ir specifiškumu pasižymintys antikūnai.

Darbo tikslas

Sukurti įrankius HEV infekcijų nustatymui ir juos panaudoti HEV paplitimo tyrimams Lietuvoje.

Uždaviniai:

1. Sukurti ir apibūdinti monokloninius antikūnus prieš mielėse susintetintus HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus bei įvertinti šių baltymų imunogeniškumą ir antigeniškumą.
2. Sukurti serologinius metodus žiurkių HEV specifiškų IgG ir IgM antikūnų nustatymui ir panaudojant juos bei molekulinis metodus iširti HEV paplitimą laukinėse žiurkėse.
3. Serologiniais metodais iširti HEV infekcijų paplitimą kiaulių ir žmonių mėginiuose ir įvertinti rekombinantinių HEV kapsidės baltymų tinkamumą serologiniams kiaulių ir žmonių mėginių tyrimams.
4. Įvertinti sukurtųjų monokloninių antikūnų tinkamumą HEV kapsidės baltymo nustatymui žiurkių, kiaulių ir žmonių mėginiuose.

Darbo aktualumas ir mokslinis naujumas:

HEV sukeltas hepatitas E yra visame pasaulyje paplitusi infekcinė liga. HEV-1 ir HEV-2 infekuoja tik žmogų, o HEV-3 ir HEV-4 – žmogų ir kitus žinduolius, pavyzdžiui, kiaules, šernus, elnius, triušius. HEV-7 taip pat yra zoonotinis virusas infekuojantis kupranugarius ir žmones. Ekonomiškai silpnai išsivysčiusioms šalims būdingos HEV-1 ir HEV-2 infekcijos, kurios plinta per užterštą vandenį. Šių genotipų infekcijos nustatomos ir Europoje, tačiau jos siejamos su kelionėmis. HEV-3 yra zoonotinis virusas, jis būdingas ekonomiškai išsivysčiusioms šalims. Šio viruso infekcijų pagrindinis šaltinis yra blogai termiškai apdoroti mėsos produktai. Neseniai buvo nustatytas žiurkių HEV kaip naujas hepatito E sukėlėjas. Serologinių testų žiurkių HEV infekcijų nustatymui nėra, o jų paklausa nuolat auga.

HEV infekcijų diagnostika ir jų paplitimo tyrimai atliekami molekuliniais ir serologiniais metodais. Molekuliniai tyrimai remiasi atvirkštinės transkripcijos PGR metodais, nustatančiais skirtingus HEV genotipus.

Moksliniais tikslais serologiniai paplitimo tyrimai atliekami naudojant įvairių gamintojų diagnostines sistemas, kurių rezultatai tiriant tuos pačius mėginius dažnai skiriasi, todėl yra poreikis kurti naujus įrankius ir sistemas viruso infekcijų tyrimams. Šiame darbe apibūdinti HEV antigenai formuojantys virusą primenančias daleles buvo pirmą kartą susintetinti mielėse. Mielėms sintetinant baltymus, jų vykdomos potransliacinės modifikacijos skiriasi nuo kitų eukariotinių ar prokariotinių ląstelių, todėl rekombinantiniai virusų baltymai gali pasižymėti unikaliomis savybėmis.

Šiame darbe sukurti monokloniniai antikūnai (MAk) yra HEV tyrimams tinkami įrankiai, kurie papildo jau egzistuojančių priemonių arsenalą. Sukurti MAk pasižymi išskirtinėmis savybėmis. Visi anksčiau aprašyti antikūnai prieš HEV-3 kapsidės baltymus jungėsi prie vieno iš trijų domenu, kuriame yra išsidėstę natūralios infekcijos metu susidarančių virusų neutralizuojančių antikūnų epitopai. Šiame darbe sukurtų ir apibūdintų MAk atpažįstamos sritys HEV kapsidės baltymuose yra išsidėsčiusios visuose domenuose. Tokia antikūnų prieš HEV kolekcija aprašyta pirmą kartą. Tai suteikia galimybę modeliuoti ir išbandyti potencialiai našesnes ir plačiau pritaikomas HEV tyrimo metodikas. Vienas iš MAk yra įtrauktas į tarptautinės kompanijos „Abcam“ ir Lietuvos įmonės UAB „Baltymas“ katalogus kaip produktas.

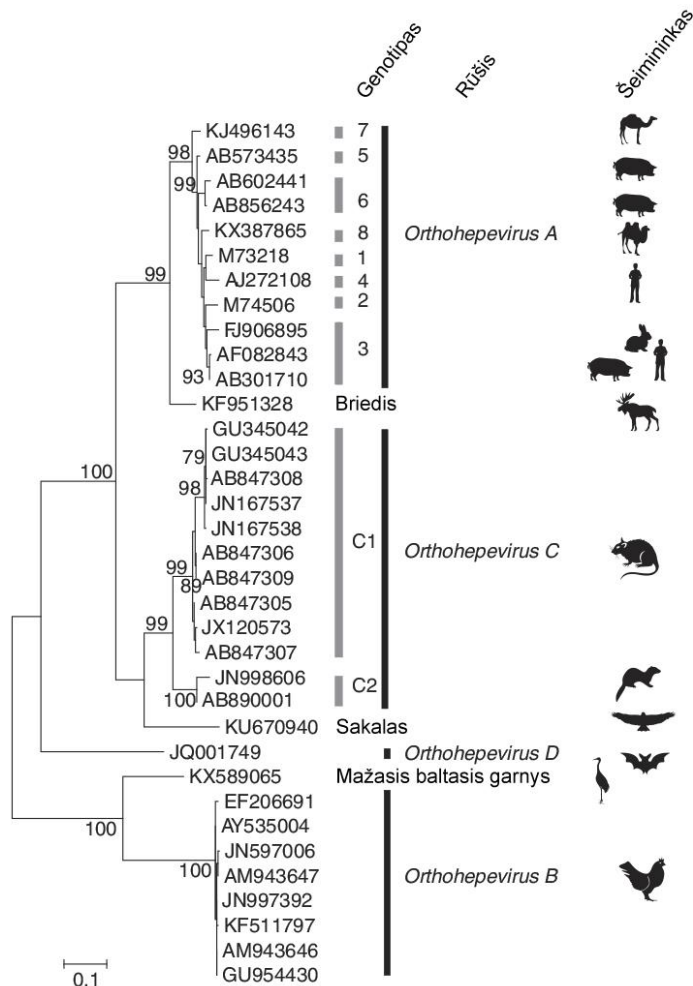
HEV paplitimo tyrimai Lietuvoje iki šiol yra riboti. Mokslininkai iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto yra atlikę HEV infekcijų paplitimo vertinimą kiaulių, šernų ir kitų laukinių kanopinių gyvūnų populiacijose (Spancerniene et al., 2018). Gauti rezultatai pademonstravo, kad HEV infekcijos yra paplitusios šiuose gyvūnuose Lietuvoje. Šiame darbe atlikti tyrimai papildo žinias apie HEV infekcijų paplitimą kiaulių populiacijoje. Taip pat pirmą kartą buvo ištirtas HEV paplitimas žmonių populiacijoje bei laukinėse žiurkėse. Laukinių žiurkių tyrimas reikšmingai papildė anksčiau gautą informaciją apie žiurkių HEV infekcijas šiaurės rytų Europoje.

1. LITERATŪROS APŽVALGA

1.1 HEV klasifikacija

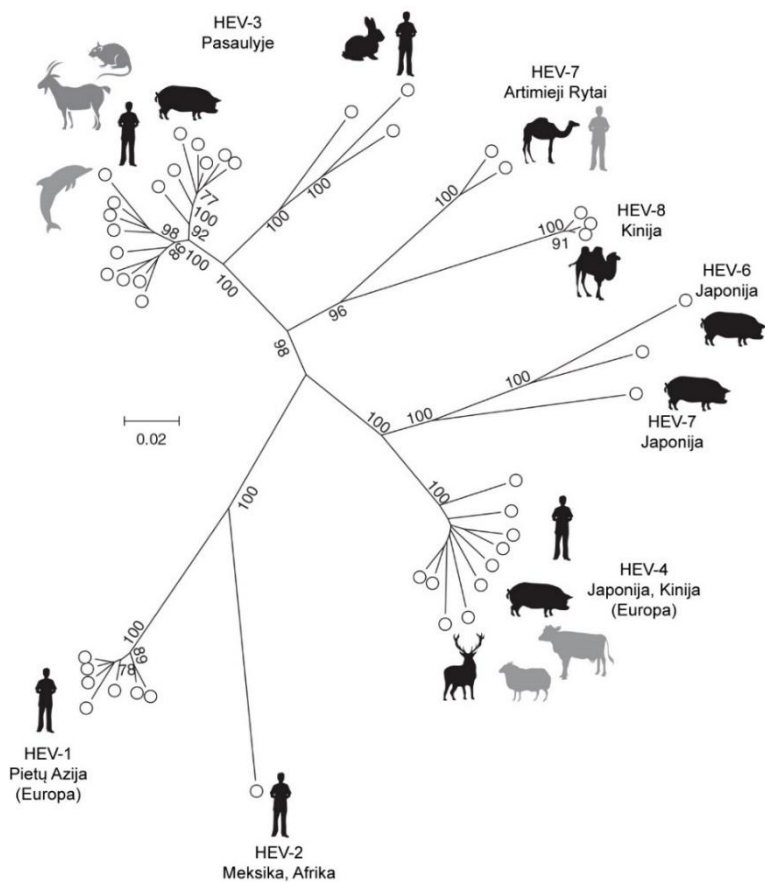
Hepatitis E virusai (HEV) yra RNR genomą turintys, *Hepeviridae* šeimos, *Orthohepevirus* genties virusai (Smith et al., 2020). Po paskutinės 2020 m. redakcijos *Orthohepevirus* taksonomija remiasi filogenetine analize ir virusų geno subgenominių regionų sekų skirtumais. HEV kapsidės baltymo konservatyvaus regiono filogenetinė analizė rodo, kad virusas gali būti skirstomas į keturias rūšis – *Orthohepevirus A*, *Orthohepevirus B*, *Orthohepevirus C* ir *Orthohepevirus D*. Taip pat yra HEV, kurie nepriskiriami šioms rūšims (1.1 pav.). *Orthohepevirus A* rūšiai priskiriami HEV genotipai 1–8 (HEV-1 – HEV-8), iš kurių HEV-1 – HEV-4 ir HEV-7 infekuoja žmones, kiaules, šernus, triušius, kupranugarius (Smith ir Simmonds, 2018). *Orthohepevirus B* rūšiai priskiriami paukščius infekuojantys HEV, kurie pirmą kartą nustatyti vištose (Payne et al., 1999, Haqshenas et al., 2002, Huang et al., 2002). 2010 m. buvo nustatyti HEV kamienai infekuojantys žiurkes (Johnė et al., 2010b, Johnė et al., 2010a), kirstukus, šeškus ir audines, kurie priskiriami *Orthohepevirus C* rūšiai. *Orthohepevirus D* rūšiai priskiriami HEV kamienai infekuojantys šikšnosparnius (Drexler et al., 2012). Yra nustatyti *Orthohepevirus* genčiai giminingi virusai briedžiuose (Lin et al., 2014), lapėse (Bodewes et al., 2013), sakaluose (Reuter et al., 2016a) ir garniuose (Reuter et al., 2016b). Šie virusai nepriskiriami aukščiau paminėtoms keturioms rūšims, bet taip pat nėra klasifikuojami į atskiras rūšis. Manoma, kad *Orthohepevirus* rūšių įvairovė išsiplės, nes HEV giminingų virusų paieškos vykdomos vis daugiau skirtingų potencialių viruso nešiotojų populiacijose (Smith ir Simmonds, 2018).

Orthohepevirus A rūšiai priklausančių HEV kamienų, išskirtų iš žmonių ir kitų viruso nešiotojų, sekų analizė leidžia suskirstyti virusus į atskirus genotipus ir subtipus (1.2 pav.). HEV genotipai 1–4 (HEV-1 – HEV-4) buvo nustatyti žmonėse, HEV-3 ir HEV-4 taip pat ir kiaulėse, šernuose ir elniuose (Lu et al., 2006), HEV-5 ir HEV-6 išskirti tik iš kiaulių (Takahashi et al., 2014). HEV-7 buvo nustatytas vienkupriuose kupranugariuose (Woo et al., 2014) bei yra identifikuotas vienas žmogaus infekcijos atvejis (Lee et al., 2016). HEV-8 yra išskirtas iš dvikuprio kupranugario (Woo et al., 2016). Yra aprašyta daug HEV subtipų, priskiriamų HEV-1 – HEV-4, tačiau sudėtinga nustatyti aiškų kriterijų, pagal kurį viruso kamienai priskiriami vienam



1.1 pav. Filogenetiniai ryšiai tarp *Orthohepevirus* rūšių (pagal Smith ir Simmonds, 2018). Medis sudarytas pagal konservatyvaus kapsidės baltymo regiono palyginimą.

subtipui būtų atskirti nuo kito subtipo (Smith et al., 2013). Sudėtingiausia konkrečiam subtipui priskirti HEV variantus izoliuotus iš triušių (Zhao et al., 2009), kurie vėliau nustatyti ir žmonėse (Izopet et al., 2012, Abravanel et al., 2017). Šie HEV variantai turi specifines insercijas geno atviro skaitymo rėmelyje 1 (ORF1). Šios viruso atmainos filogenetiškai artimos HEV-3 kamienams, tačiau labiau skiriasi nuo žmogaus HEV-3 variantų nei vienos nuo kitų (Smith et al., 2013). Visgi jos kol kas priskiriamos HEV-3. Panašūs sunkumai būdingi HEV-5 ir HEV-6, kurie gali būti klasifikuojami kaip vieno genotipo subtipai (Smith ir Simmonds, 2018).



1.2 pav. Filogenetiniai ryšiai tarp *Orthohepevirus A* HEV variantų (pagal Smith ir Simmonds, 2018). Medis sukonstruotas pagal HEV genomo atviro skaitymo rėmelių 1 (ORF1) ir 2 (ORF2) koduojančių sekų palyginimą.

Kitoms *Orthohepevirus* rūšims priskiriamų HEV kamienų įvairovė yra mažiau apibūdinta lyginant su *Orthohepevirus A*. Yra identifikuoti keturi artimai giminingi *Orthohepevirus B* genotipai, du išsiskiriantys genotipai nustatomi graužikuose ir kiauniniuose yra priskiriami *Orthohepevirus C* rūšiai. *Orthohepevirus D* rūšiai priskiriami HEV kamienai greičiausiai gali būti suklasifikuoti į daug genotipų (Smith ir Simmonds, 2018).

1.2 HEV šeimininkai ir nešiotojai

HEV yra pavojingas žmogaus patogenas. Šalyse, kuriose sanitarinės sąlygos yra prastos ir trūksta švaraus vandens, pasireiškia HEV infekcijų protrūkiai, paveikiantys dešimtis tūkstančių individų (TEO, 2012, Spina et al., 2017). Didėjant tyrimų apimtimis pastebėta, kad HEV yra zoonotinis virusas paplitęs visame pasaulyje (Nan et al., 2017, Kenney, 2019). Zoonotiniai virusai naudoja gyvūnų rūšis kaip rezervuarus, kuriuose gali išlikti aplinkoje, mutuoti ir tapti labiau virulentiškais. Siekiant išsiaiškinti galimus HEV plitimo kelius nuo gyvūnų iki žmogaus, reikia identifikuoti visus galimus viruso šeimininkus ir nešiotojus (Lentelė 1.1).

Lentelė 1.1. HEV šeimininkai ir zoonotinis potencialas (Wang ir Meng, 2021).

	Rūšis (<i>Ortho-hepe-virus</i>)	Genotipas	Šeimininkai		Zoonotinis potencialas
			Natūralūs	Ekspimentiniai	
A	HEV-1	Žmogus		Nežmoginiai primatai	Nėra
	HEV-2	Žmogus		Nežmoginiai primatai	Nėra
	HEV-3	Žmogus, kiaulė, šernas, elnias, beždžionė, mangusta, triušis, kiškis		Nežmoginiai primatai, kiaulė, triušis	Yra
	HEV-4	Žmogus, kiaulė, šernas, beždžionė		Nežmoginiai primatai, kiaulė, triušis	Yra
	HEV-5	Šernas		Nežmoginiai primatai	Tikėtinas
	HEV-6	Šernas			Nežinomas
	HEV-7	Kupranugaris			Yra
	HEV-8	Kupranugaris		Nežmoginiai primatai	Tikėtinas
	nepriskirtas	Briedis			Nežinomas
B	nepriskirtas	Višta, laukiniai paukščiai		Višta, kalakutas	Abejotinas
	nepriskirtas	Garnys			Abejotinas
C	HEV-C1	Žiurkė, kirstukas		Žiurkė	Yra
	HEV-C2	Šeškas, audinė		Šeškas	Nežinomas
	nepriskirtas	Lapė, laukiniai graužikai			Nežinomas
D	nepriskirtas	Šikšnosparnis			Abejotinas

Orthohepevirus A rūšiai priskiriami HEV genotipai yra natūraliai infekuojantys tik žmones arba zoonotiniai. Manoma, kad HEV-1 ir HEV-2 galimų šeimininkų rezervuaras yra aukštesnieji primatai. Eksperimentiškai HEV-1 ir HEV-2 gali infekuoti keletą primatų rūšių (Kenney, 2019). HEV-1 yra pagrindinis genotipas cirkuliuojantis žmonių populiacijoje besivystančiose šalyse (Krain et al., 2014). HEV-2 taip pat plinta žmonių populiacijoje ir neseniai sukėlė susirgimų protrūkį Nigerijoje (Wang et al., 2018a). Nėra aišku, kaip HEV-1 ir HEV-2 išsilaiko žmonių populiacijose neturėdami kitos negu primatai gyvūnų rūšies rezervuaro. Kol nebus identifikuoti kiti HEV-1 ir HEV-2 antriniai nešiotojai, galima manyti, kad šie HEV genotipai specifiškai prisitaikę infekuoti žmones (Kenney, 2019).

HEV-3 yra labiausiai ištyrinėtas zoonotinis HEV genotipas. HEV-3 varianto, kuris infekuoja kiaules, atradimas pakeitė nuostatą, kad HEV yra tik žmogaus patogenas paplitęs besivystančiose šalyse (Meng et al., 1997, Meng, 2000). Šiuo metu HEV yra laikomas būdingu žmogaus patogenu besivystančiose šalyse ir zoonotiniu patogenu, kuris paplitęs visame pasaulyje. Iškart po HEV-3 identifikavimo, tyrimai ieškantys HEV variantų buvo daugiausia atliekami primatų ir kiaulių populiacijose. Tik keletas ankstyvųjų serologinių tyrimų nustatė HEV giminingų virusų egzistavimo įrodymų žiurkėse (Kabrane-Lazizi et al., 1999), šunyse, galvijuose ir graužikuose (Arankalle et al., 2001). Vis didėjantis potencialių HEV giminingų virusų nešiotojų skaičius parodė, kad HEV-3 yra paplitęs daugelyje žinduolių rūšių. Pradedant nuo kiaulių (Meng et al., 1997) HEV-3 nustatytas gyvūnų rūšyse, kurios susijusios su žmogaus veikla, pavyzdžiui, ožkos (Peralta et al., 2009, Sanford et al., 2013), avys (Peralta et al., 2009, El-Tras et al., 2013), triušiai (Cossaboom et al., 2011, Izopet et al., 2012, Caruso et al., 2015, Hammerschmidt et al., 2017) ir arkliai (Zhang et al., 2008). HEV-3 variantai taip pat nustatyti laukinių gyvūnų rūšyse, pavyzdžiui, šermuose (Sonoda et al., 2004, Pavio et al., 2010), elniuose (Sonoda et al., 2004, Reuter et al., 2009, Tomiyama et al., 2009, Forgách et al., 2010, Anheyer-Behmenburg et al., 2017) ir kiškiuose (Hammerschmidt et al., 2017). HEV-3 kamienai aprašyti ir tokiuose gyvūnuose kaip mangusta (Nakamura et al., 2006, Li et al., 2006, Nidaira et al., 2012) ir delfinai (Villalba et al., 2017). Taigi, HEV-3 nešiotojų įvairovė yra labai didelė. Pagrindinis HEV-3 infekcijų šaltinis yra blogai termiškai apdorotas maistas. Taip pat virusas perduodamas kartu su kraujo produktais ar organų transplantatais iš infekuotų donorų (Li et al., 2005c, Lewis et al., 2010, Breum et al., 2010, Miyamura, 2011).

HEV-4 panašus į HEV-3 tuo, kad tai zoonotinis patogenas. Skirtingai nei HEV-3, HEV-4 yra daugiausia paplitęs Azijoje ir tik neseniai buvo nustatyti HEV-4 infekcijų atvejai Europoje (Forni et al., 2018). HEV-4, kaip ir HEV-3, visų pirma buvo nustatytas kiaulėse ir šermuose (Pavio et al., 2010). Vėliau Kinijoje HEV-4 taip pat identifikuotas galvijuose (Huang et al., 2016, Yan et al., 2016), avyse (Wu et al., 2015) ir ožkose (Li et al., 2017, Long et al., 2017). Taigi HEV-4 taip pat turi įvairių viruso nešiotojų. HEV-5, HEV-6, HEV-7 ir HEV-8 yra mažiausiai paplitę *Orthohepevirus A* atstovai. HEV-5 ir HEV-6 buvo identifikuoti šernų mėginiuose Japonijoje (Takahashi et al., 2010, Takahashi et al., 2011). Jų zoonotinis potencialas yra menkai iširtas (Li et al., 2019), o geografinis paplitimas tik Japonijoje rodo, kad šie virusai nėra išplitę. HEV-7 ir HEV-8 yra neseniai nustatyti HEV genotipai. HEV-7 rezervuaras yra vienkupriai kupranugariai, o HEV-8 – dvikupriai kupranugariai (Sridhar et al., 2017). Yra aprašytas atvejis, kai HEV-7 sukėlė lėtinę infekciją inksto recipientui (Lee et al., 2016). Tai rodo, kad virusas gali būti laikomas potencialiu zoonotiniu patogenu. Taigi, HEV-5 – HEV-8 genotipų pagrindiniai rezervuarai dabartiniais duomenimis yra gyvūnai, tačiau jų vaidmuo kaip zoonotinių žmogaus patogenų dar turėtų būti tiriama.

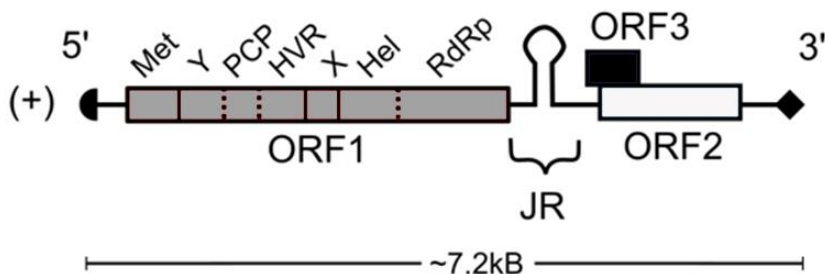
Orthohepevirus B rūšiai yra priskiriami paukščius infekuojantys HEV. Pirmieji šios rūšies kamienai buvo nustatyti viščiukuose, kuriems pasireiškė susirgimai susiję su kepenų ir blužnies pažeidimais (Haqshenas et al., 2001). Tai rodo, kad virusas aktualus paukštininkystės sričiai, nes buvo nustatyta, kad kai kurių paukščių HEV kamienų infekcijos koreliuoja su viščių patologijomis Kinijoje (Su et al., 2018). Paukščių HEV genomo panašumas į žinduolių HEV yra apie 48 % (Haqshenas et al., 2001). Šiuo metu identifikuojami keturi paukščių HEV genotipai. Genotipas 1 nustatytas viščiukuose Australijoje, 2 – JAV, 3 – Europoje ir Kinijoje, 4 – Vengrijoje ir Taivane (Haqshenas et al., 2001, Zhao et al., 2010, Marek et al., 2010, Bányai et al., 2012, Hsu ir Tsai, 2014). Tyrimai su paukščių HEV genotipu 2 parodė, kad virusas gali infekuoti kalakutus, bet ne makakas ar kiaules (Sun et al., 2004). Kitas tyrimas parodė, kad paukščių HEV genotipas 3 gali infekuoti ne tik kalakutus, bet ir antis, žąsis ir triušius, esančius viename ūkyje (Liu et al., 2018). Tai kelia klausimą, ar kai kurie paukščių HEV kamienai gali prisitaikyti infekuoti žinduolius. Vis daugiau paukščių rūšių yra identifikuojamos kaip paukščių HEV nešiotojos. Virusai nustatyti tokiose rūšyse kaip garniai, pelėdos, strazdai, balandžiai (Zhang et al., 2017) ir žvirbliai (Yang et al., 2018). Taigi, paukščių HEV nešiotojų tyrimai yra besivystanti sritis.

Orthohepevirus C rūšiai priskiriami pirmieji HEV variantai buvo nustatyti panašiu metu kaip ir kiaulių HEV. Tyrimo JAV metu pastebėta, kad daugiau negu pusė žiurkių turėjo antikūnus prieš HEV (Kabrane-Lazizi et al., 1999, Easterbrook et al., 2007), tačiau HEV RNR nustatyta nebuvo. Virusų RNR greičiausiai nebuvo nustatyta dėl pradmenų pasirinkimo remiantis *Orthohepevirus A* sekomis ir *Orthohepevirus A* ir *C* sekų skirtumo. Plataus masto PGR pradmenų panaudojimas leido atlikti pilno ilgio žiurkių HEV kamienų sekoskaitą (Johns et al., 2010b, Johns et al., 2010a). Šių kamienų genomo sekų panašumas žmogaus ir paukščių HEV yra 50 % ir mažiau. Vėliau *Orthohepevirus C* variantai buvo išskirti iš skirtingų žiurkių rūšių (Johns et al., 2010a, Johns et al., 2010b), pelių (Wang et al., 2018b, de Souza et al., 2018), bandikotų (Li et al., 2013c), kirstukų (Guan et al., 2013), šeškų (Raj et al., 2012), audinių (Krog et al., 2013, Xie et al., 2018). *Orthohepevirus C* panašius virusų RNR išskirta iš lapių (Bodewes et al., 2013) ir sakalų (Reuter et al., 2016a) išmatų. Tai kelia klausimą, ar šie HEV variantai infekuoja šiuos gyvūnus, ar infekuoja jų grobį. Iš pradžių buvo manoma, kad žiurkių HEV negali infekuoti aukštesniųjų primatų ir žmonių. Neseniai buvo nustatyta, kad žiurkių HEV sukėlė lėtinį hepatitą pacientui su kepenų transplantatu (Sridhar et al., 2018) ir ūmų hepatitą individui su sveika imunine sistema (Andonov et al., 2019). Be to, neseniai buvo patvirtinti dar septyni žiurkių HEV infekcijos žmonėse atvejai (Sridhar et al., 2020). Tai leidžia žiurkių HEV vertinti kaip zoonotinį žmogaus patogeną.

Orthohepevirus D rūšiai priskiriamų šikšnosparnių HEV panašumas žmogaus HEV-1 – HEV-4 yra 57,4–64,2 % (Drexler et al., 2012, Johns et al., 2014). Šikšnosparnių HEV nustatytas keliuose šikšnosparnių šeimose (Drexler et al., 2012, Johns et al., 2014, Kobayashi et al., 2018). Manoma, kad šikšnosparnių HEV negalėtų infekuoti žmonių dėl didelio sekų skirtumo. Be to, ištyrus kraujo donorų populiaciją nebuvo nustatyti antikūnai prieš šikšnosparnių HEV ar viruso RNR (Drexler et al., 2012). Taigi *Orthohepevirus D* yra menkiausiai ištyrinėta rūšis.

1.3 HEV replikacija ir genomo struktūra

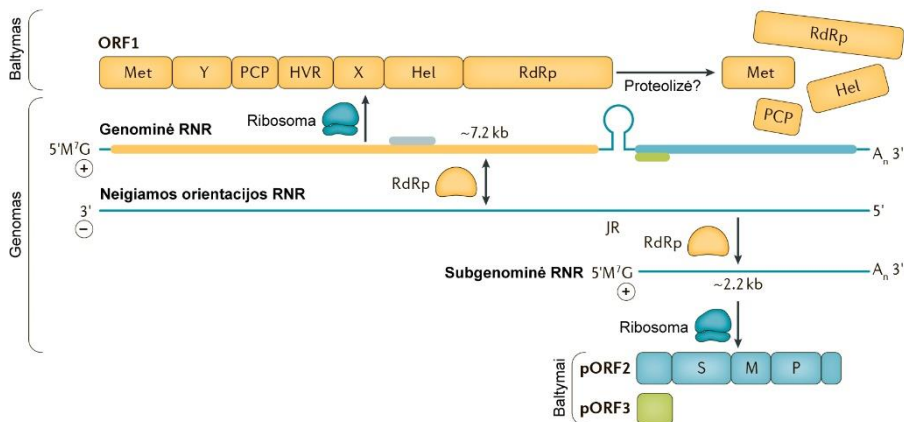
HEV genomas yra teigiamos orientacijos apie 7,2 kb ilgio viengrandinė RNR. Genomas sudarytas iš 5' gale esančio nekoduojančio regiono su 7–metilguanozino kepure, už kurio yra trys atviro skaitymo rėmeliai (ORF). 3' nekoduojančiame regione yra poli(A) uodega (1.3 pav.) (Nimgaonkar et al., 2018). Taigi, HEV genomo struktūra primena eukariotinę informacinę RNR.



1.3 pav. HEV genomo struktūra (pagal LeDesma et al., 2019). Met – metiltransferazė, Y – nežinomos funkcijos domenas, PCP – spėjama į papainą panaši cisteino proteazė, HVR – hipervariabilus domenas, X – nežinomos funkcijos domenas, Hel – RNR helikazė, RdRp – nuo RNR priklausoma RNR polimerazė, JR – jungties regionas, ORF1-ORF3 – atviro skaitymo rėmeliai.

Viruso replikacija prasideda nuo ORF1 koduojamo polipeptido transliacijos. Po ORF1 transliacijos nuo RNR priklausoma RNR polimerazė (RdRp) atlieka genominės RNR transkripciją ir susintetina genomo ilgio neigiamos orientacijos RNR. Ši RNR, kurios yra susintetinama sąlyginai maži kiekiai, yra matrica dviejų skirtingų teigiamos orientacijos RNR (genominės ir subgenominės) transkripcijai. Pilno ilgio transkriptas yra genominė RNR, kuri vėliau pakuojama į naujus virionus. Taip pat yra sintetinama subgenominė RNR, kurioje yra ORF2 ir ORF3 (1.4 pav.) (Graff et al., 2006, Varma et al., 2011). Nuo ORF2 yra transliuojamas kapsidės baltymas, o nuo ORF3 – fosforilintas multifunkcinis baltymas.

ORF1 koduojamas nestruktūrinis polipeptidas yra sudarytas iš metiltransferazės (Met), X ir Y domenų, į papainą panašios cisteino proteazės (PCP), hipervariabilaus regiono (HVR), RNR helikazės (Hel) ir RdRp (1.3 ir 1.4 pav.). Tik Met, Hel ir RdRp funkcijos yra gerai apibūdintos. Met yra atsakinga už HEV genomo 5' galo 7–metilguanozino kepurės formavimą. Met perneša metilo grupę ant guanozino trifosfato (GTP) sukurdamas m⁷-GTP. Šis junginys kovalentiškai prijungiamas prie 5' galo HEV genome (Magden et al., 2001, Kumar et al., 2020). Hel yra atsakinga už RNR dupleksų išardymą ir dalyvauja RNR transliacijoje (Karpe ir Lole, 2010b, Karpe ir Lole, 2010a). RdRp vykdo neigiamos orientacijos RNR sintezę nuo teigiamos orientacijos RNR 3' galo nekoduojančio regiono. RdRp prisijungia prie neigiamos orientacijos RNR 5' galo nekoduojančio regiono, kad susintetintų pilno ilgio teigiamos orientacijos RNR genomą. RdRp taip pat prisijungia prie



1.4 pav. HEV genomo replikacija (pagal Nimgaonkar et al., 2018). Met – metiltransferazė, Y – nežinomos funkcijos regionas, PCP – spėjama į papainą panaši cisteino proteazė, HVR – hipervariabilus regionas, X – nežinomos funkcijos regionas, Hel – RNR helikazė, RdRp – nuo RNR priklausoma RNR polimerazė, JR – jungties regionas, ORF1 – polipeptidas, pORF2 – kapsidės baltymas, pORF3 – fosforilintas baltymas.

subgenominio promotoriaus, esančio neigiamos orientacijos RNR. Nuo jo yra vykdoma subgenominės RNR, kuri koduoja ORF2 ir ORF3, transkripcija (Graff et al., 2006, Ichiyama et al., 2009, Cao et al., 2010). Kitų ORF1 domenų funkcija nėra iki galo iširta. Vis dar neaišku, ar polipeptidas veikia kaip daugiafunkcinis baltymas, ar yra suskaldomas į mažesnius funkcinis domenus (Parvez, 2013). Taip pat nėra aiškaus įrodymo, kad PCP veikia kaip proteazė (Parvez ir Khan, 2014). Nors ORF1 koduojamas polipeptidas yra būtinas HEV replikacijai, jame esančio HVR nukleotidų seka yra labai variabili net ir lyginant to pačio genotipo izoliatų HVR sekas (Smith et al., 2012). HEV genomų dydžių skirtumai daugiausia priklauso nuo HVR dydžio. Iš skirtingų pacientų izoliuotų HEV genomų sekų analizė rodo, kad HVR yra insercijos iš kitų viruso genomo regionų arba žmogaus genų (Smith et al., 2020).

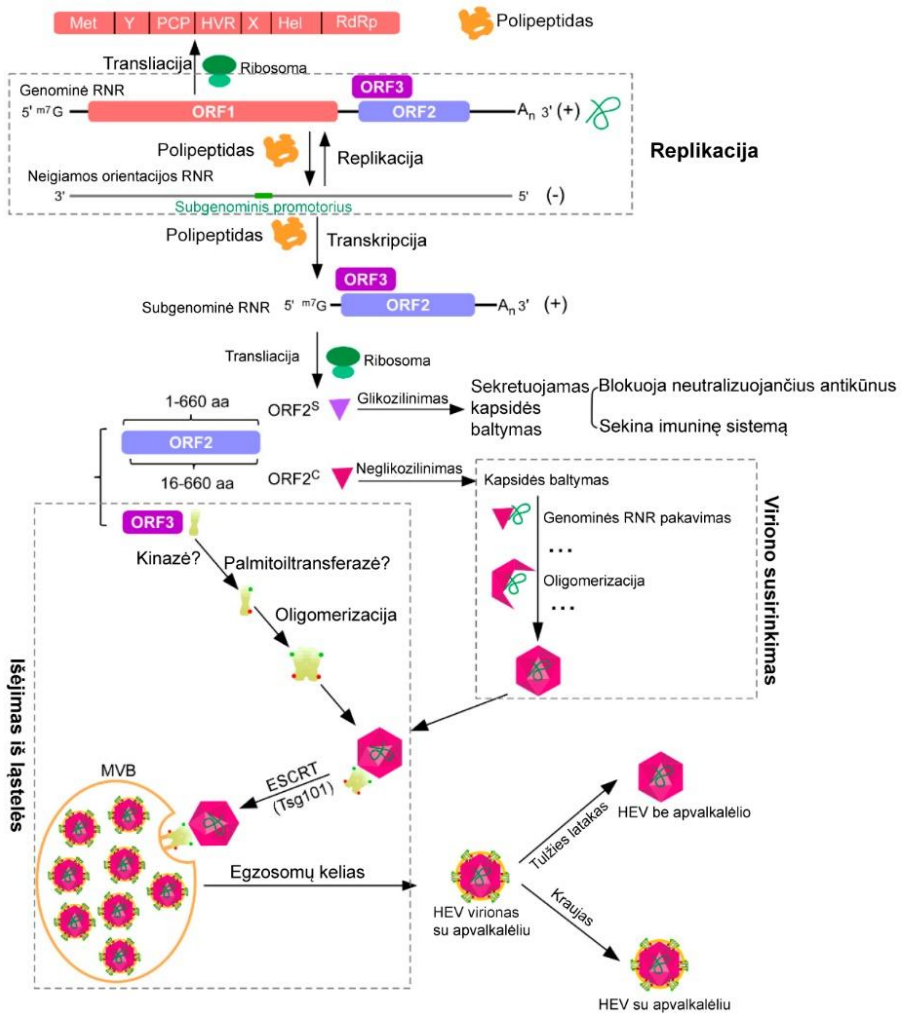
1.4 HEV viriono susidarymas ir išėjimas iš ląstelės

HEV genome ORF2 koduoja kapsidės baltymą, kuris supakuoja HEV genomą į virusines daleles. Kapsidės baltymas turi mechanizmą, kuriuo atskiria virusinę RNR nuo šeimininko RNR. Šis baltymas N gale turi signalinį peptidą, už kurio yra argininu praturtintas domenas. Šis regionas galimai

dalyvauja RNR supakavime viriono susiformavimo metu (Tam et al., 1991, Surjit et al., 2004). Maždaug 110 aminorūgščių, esančių N gale, specifiskai sąveikauja su 76 nukleotidų ilgio regionu HEV genomo 5' gale, vadinamu supakavimo signalu (Surjit et al., 2004). Vis dėlto dar nėra atlikta detali genetinė analizė, kuri identifikuotų supakavimo signalą ir šiam procesui būtinas kapsidės baltymo aminorūgštis. HEV replikacijos metu taip pat yra sintetinama subgenominė RNR, kurioje yra ORF2 ir ORF3 (Graff et al., 2006). Visgi yra manoma, kad tik HEV genomo 5' gale yra supakavimo signalas, kuris užtikrina, kad tik pilno ilgio HEV genomas yra atpažįstamas kapsidės baltymo ir supakuojamas. Spėjama, kad kapsidės baltymui prisijungus prie supakavimo signalo yra aktyvinama kapsidės baltymo oligomerizacija, tačiau šio proceso mechanizmas ir kapsidės baltymo domenai atsakingas už oligomerizaciją yra nežinomi (Ju ir Ding, 2019).

HEV virionų susidarymas yra menkai ištirtas dėl tinkamos ląstelių linijos HEV kultivavimui trūkumo. Yra keletas fundamentalių klausimų, susijusių su HEV viriono susiformavimu. Visų pirma nėra žinoma tiksli viriono susirinkimo vieta ląstelėje. Manoma, kad viriono susidarymo pradžia reikia, jog laisvas HEV genomas sudarytų sąveiką su kapsidės baltymu. Siekiant išsiaiškinti HEV viriono susidarymą, būtų galima pasitelkti konfokalinę ir elektroninę mikroskopiją ir nustatyti HEV kapsidės baltymo lokalizaciją ląstelėse. Tai leistų identifikuoti potencialią virionų susirinkimo vietą (Ju ir Ding, 2019). Tai greičiausiai neatlikta dėl to, kad nėra efektyvios HEV replikacijos *in vitro* sistemos. Kitas klausimas yra susijęs su mechanizmu, kurį HEV naudoja perjungti genomo replikacijos procesą į genomo pakavimą. Galima spėti, kad ORF1 užkoduotas polipeptidas yra atsakingas už tai. RNR modifikacijos tokios kaip N^6 -metiladenozilimas (m⁶A) gali reguliuoti RNR struktūrą, lokalizaciją, stabilumą ir funkciją. Yra nustatyta, kad m⁶A modifikacija hepatito C viruso RNR genome daro įtaką RNR sąveikai su viruso šerdiniu baltymu (Gokhale et al., 2016). Nėra aišku, ar tokia pati modifikacija HEV RNR genome gali reguliuoti šį procesą.

HEV virionai iškeliauja iš ląstelės po viriono susirinkimo (1.5 pav.). HEV ORF3 koduoja fosforilintą multifunkcinį baltymą sudarytą iš 113 ar 114 aminorūgščių. Šis baltymas nėra reikalingas viruso replikacijai, viriono susirinkimui ar viruso patekimui į Huh7 ląstelių liniją (Emerson et al., 2006). Multifunkcinis baltymas reguliuoja HEV išėjimą ar paleidimą iš infekuotos ląstelės (Yamada et al., 2009). Vis dėlto, šio proceso mechanizmas nėra gerai apibūdintas. Yra sudarytas spėjamas HEV išėjimo iš ląstelės modelis (Ju ir



1.5 pav. HEV viriono susidarymas ir išėjimas iš ląstelės (pagal Ju ir Ding, 2019). Met, Y, PCP, HVR, X, Hel, RdRp – ORF1 regionai, ORF2^S – sekretuojamas kapsidės baltymas, ORF2^C – kapsidės baltymas sudarantis virioną.

Ding, 2019). ORF3 koduojamas baltymas gali sąveikauti su neglikozilintu kapsidės baltymu (Tyagi et al., 2002). Šis baltymas nereikalingas viriono susirinkimui, tačiau manoma, kad sąveika su neglikozilintu kapsidės baltymu gali būti mechanizmas, kuriuo yra atpažįstamos susidariusios HEV virusinės dalelės ir nukreipiamos iš ląstelės. Iš ląstelės nukreiptas HEV virionas keliauja į daugialypius kūnelius (angl. *multivesicular bodies*, MVB) per endosominius rūšiavimo kompleksus reikalingus transportavimo (angl. *endosomal sorting*

complexes required for transport, ESCRT) sistamai. Multifunkcinis baltymas sąveikauja ne tik su kapsidės baltymu, bet ir su keletu šeimininko baltymų. Pavyzdžiui, citoskeleto mikrovamzdeliais (Zafrullah et al., 1997) ir imlumo navikui genu 101 (angl. *tumour susceptibility gene 101*, Tsg 101), kuris yra ESCRT sistemos dalis (Surjit et al., 2006, Kannan et al., 2009). ORF3 koduojamas baltymas sąveikauja su mikrovamzdeliais per savo N gale esančius hidrofobinius domenų. Ši sąveika padidina acetilinto α -tubulino kiekį, o tai padidina mikrovamzdelių stabilumą (Kannan et al., 2009). Multifunkcinio baltymo ir mikrovamzdelių sąveikos fiziologinių padarinių ryšys su HEV gyvenimo ciklu nėra aiškus. Manoma, kad tai leidžia HEV virionams pasinaudoti mikrovamzdeliais viduląsteliniam transportui iki tol, kol pasitelkiama ESCRT sistema (Ju ir Ding, 2019). Tai leidžia manyti, kad vėlyvojo endosominio kompartmento MVB nulemia HEV virionų paleidimą. MVB biogenezei remiasi ESCRT baltymų kompleksais (Katzmann et al., 2002, Hanson ir Cashikar, 2012). Atlikti tyrimai leidžia manyti, kad prolinu turtingas motyvas (PSAP) multifunkcinio baltymo C gale gali sąveikauti su Tsg101 tam, kad išnaudotų ESCRT sistemą ir pakrautų HEV virionus į MVB paleidimui iš ląstelės (Surjit et al., 2006). HEV virionų išrūšiavimas patekimui į MVB sistemą nėra apibūdintas.

Kitas HEV virionų išėjimo iš ląstelės etapas nulemia, ar virionas bus su šeimininko ląstelės membraninės kilmės apvalkalėliu ar be. HEV nustatomas išmatose be apvalkalėlio, tačiau kraujyje cirkuliuoja virionai su membrana (angl. *enveloped HEV*, eHEV) (Jinshan et al., 2010, Yin et al., 2016). Dauguma ląstelių linijose kultivuoto HEV dalelių yra su apvalkalėliu (Qi et al., 2015). eHEV turi lipidines membranas savo paviršiuje, kurios yra susijusios su ORF3 koduojamu baltymu, o HEV be apvalkalėlio tokių membranų neturi (Takahashi et al., 2008b, Yin et al., 2016). Iš šeimininko membranos komponentų sudarytas apvalkalėlis užmaskuoja HEV kapsidės baltymą ir taip mažina neutralizuojančių antikūnų efektyvumą (Yin et al., 2016). Ląstelės egzosomaliniu keliu transportuojami eHEV yra išgryninami kartu su ląstelės egzosomomis toje pačioje frakcijoje. Nustatyta, kad tetraspaninai CD63, CD9 ir CD81, epitelio ląstelinė adhezijos molekulė (EpCAM) ir fosfatidilserinas (PS) bei Goldžio aparato tinklo baltymas (TGOLN2) yra eHEV virionų paviršiuje. Tai rodo, kad ląstelės egzosomos ir eHEV membranos komponentai yra bendri (Nagashima et al., 2014b, Nagashima et al., 2017). Vis dėlto, eHEV biogenezei nėra visiškai išaiškinta, todėl nėra apibūdinta ir eHEV gaubiančios membranos sudėtis (Ju ir Ding, 2019). Paskutinis etapas HEV paliekant ląstelę yra virionų išėjimas pro

ląstelės membraną. MVB, kuriuose yra eHEV, susijungia su plazmine membrana ir išleidžia virionus iš ląstelės. Šis procesas yra reguliuojamas Rab27 baltymo, nes nesant šio baltymo virusinių dalelių paleidimo efektyvumas mažėja (Raposo ir Stoorvogel, 2013, Nagashima et al., 2014a). Be to, CD63 ir CD81, kurių yra daug egzosomų membranose, yra susiję su eHEV. Tai leidžia manyti, kad eHEV naudojasi sekrecinėmis egzosomomis iš MVB tam, kad paliktų ląstelę (Nagashima et al., 2014a). Apibendrinant galima teigti, kad HEV viriono susidarymas ląstelės viduje ir išėjimas iš ląstelės vis dar turi daug neatsakytų klausimų ir reikalauja nuodugnesnių tyrimų.

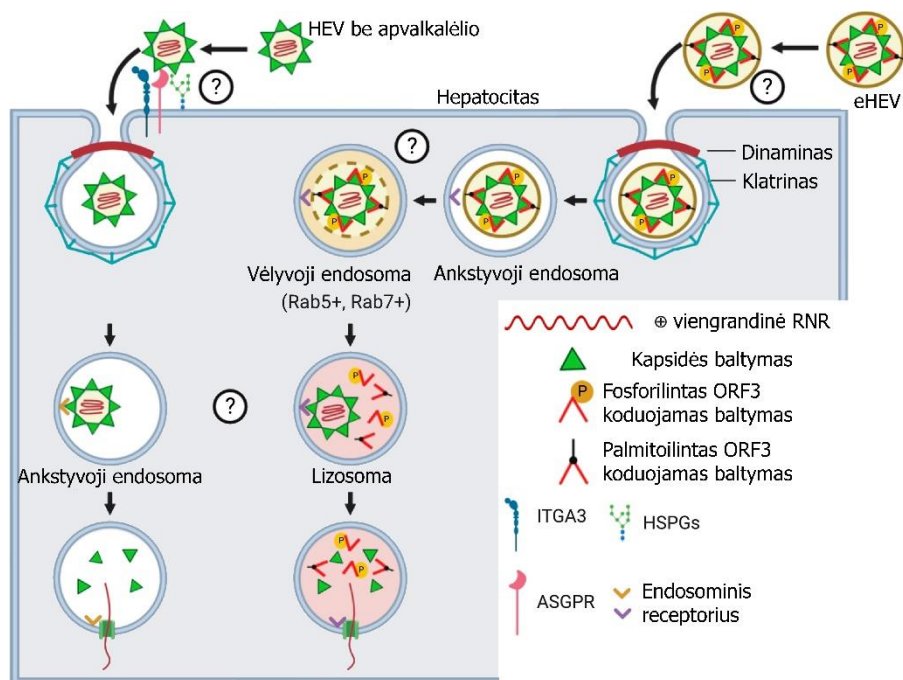
HEV multifunkcinis baltymas, koduojamas ORF3, gali oligomerizuotis ir veikti kaip jonų kanalas. Šis aktyvumas yra reikalingas virusinių dalelių išėjimui iš ląstelės (Ding et al., 2017). Jonų kanalo reikalingumas HEV išėjimui iš ląstelės nėra aiškus. Visgi tikėtina, kad jonų kanalas reguliuoja endosomos jonų koncentraciją ir pH tam, kad sudarytų sąlygas HEV viriono paleidimui. Be fosforilinimo HEV ORF3 koduojamas baltymas taip pat yra palmitoilinamas ant cisteino aminorūgščių liekanų esančių baltymo N galiniame regione. Tai atlieka kol kas nenustatyta palmitoiltransferazė. Ši modifikacija nulemia tai, kad multifunkcinis baltymas yra lokalizuotas ląstelės viduje ir prisijungęs prie membranos. Taip pat palmitoilinimas yra būtinas, kad HEV virionai paliktų ląstelę (Gouttenoire et al., 2018). Taigi HEV ORF3 užkoduoto baltymo potransliacinės modifikacijos (fosforilinimas, palmitoilinimas ir kitos nežinomos) yra dinaminis procesas, kuris nulemia šio baltymo įvairias lokalizacijas ląstelėje ir parodo, kad tai multifunkcinis baltymas.

Hepatocitai yra poliarizuotos epitelinės ląstelės. Jų išskirtinis poliškumas pasireiškia tuo, kad fiziologinėmis sąlygomis susiformuoja du domenai. Apikalinė dalis yra nukreipta į tulžies kapiliarus, o bazolateralinė dalis – į kepenų kraujagysles (sinusoidus) (Gissen ir Arias, 2015). HEV virionai gali palikti ląstelę per abiejų dalių membranas. Yra nustatyta, kad HEV ORF3 koduojamas baltymas yra lokalizuotas arčiau tulžies kapiliaro hepatocituose *in vitro* (Emerson et al., 2010, Capelli et al., 2018) ir *in vivo* (Allweiss et al., 2016). Dauguma infektyvių HEV dalelių, kurios yra su apvalkalėliu, išeina iš hepatocitų per apikalinę dalį į tulžies kapiliarą. Iš ten HEV keliauja į tulžies traktą ir patenka į išmatas. Šiuo keliu iš ląstelės išėjusių HEV virionų membraninis apvalkalėlis dėl tulžies poveikio yra degraduojamas, todėl išmatose nustatomas HEV yra be apvalkalėlio. Maža dalis HEV virionų išeina iš ląstelės pro bazolateralinę dalį į kraują ir gali išplisti po visą organizmą (Ju

ir Ding, 2019). Taigi, infektyvūs HEV virionai gali būti dviejų pavidalų dėl fiziologinių sąlygų esančių kepenyse.

1.5 HEV patekimas į ląstelę

Virusų gebėjimas prisijungti prie ląstelės ir patekti į ją yra svarbiausi žingsniai sėkmingai viruso infekcijos pradžiai. Tai nulemia viruso gebėjimą infekuoti skirtingus šeimininkus, specifinius audinius ir patogenezę. Ląstelių gaminami įvairūs plazminės membranos komponentai, kurie gali būti virusų receptoriai, lemia viruso gebėjimą infekuoti tam tikrus ląstelių tipus (Grove ir Marsh, 2011). HEV virionai su apvalkalėliu ir be jo į ląstelę patenka skirtingais mechanizmais (1.6 pav.) (Yin et al., 2016, Chapuy-Regaud et al., 2017, Nagashima et al., 2017). HEV be apvalkalėlio prisijungia prie ląstelės paviršiaus per heparansulfato proteoglikanus (HSPG) (Kalia et al., 2009), asialoglikobaltymo receptorius (ASGPR) (Zhang et al., 2016) ir spėjamus receptorius integrinus $\alpha 3$ (ITGA3) (Shiota et al., 2019). Manoma, kad eHEV prisijungia prie ląstelės per viruso fosfatidilseriną turinčią membraną prie T ląstelių imunoglobulino mucino domeną 1 (TIM-1) ant infekuojamos ląstelės,



1.6 pav. HEV patekimas į ląstelę (pagal Wißing et al., 2020).

kaip ir kiti virusai su apvalkalėliu (Jemielity et al., 2013, Das et al., 2019, Wißing et al., 2020). Visgi išlieka neaišku, ar toks dvejopas skirtingų HEV virionų tipų prisijungimo prie ląstelės būdas daro įtaką viruso išgyvenamumui ir specifiškumui įvairiems audiniams. Žinant, kad HEV infekcijos neapsiriboja tik kepenų ląstelėmis, mažiau specifiškas eHEV virionų negu virionų be apvalkalėlio prisijungimas prie ląstelių galėtų paaiškinti, kodėl HEV infekcijos nustatomos įvairiuose audiniuose.

Po HEV prisijungimo prie ląstelės receptoriaus, abiejų tipų HEV virionai yra endocituojami. Viriono išpakavimo mechanizmai yra menkai ištyrinėti, tačiau yra aišku, kad abiem HEV formoms reikia skirtingų mechanizmų. HEV virionai be apvalkalėlio yra išpakuojami ankstyvosiose endosomose. RNR genomai, manoma, keliauja į citoplazmą per porą, kuri susidaro virionui susijungiant su ląstelės receptoriumi. eHEV virionų išpakavimui reikia, kad endosoma subręstų iki lizosomos. Lizosomoje susidaranti rūgštinė aplinka reikalinga, kad viriono membrana iširtų (Kapur et al., 2012, Yin et al., 2016, Wißing et al., 2020). Iširus virionui, RNR genomai atsiduria citoplazmoje ir prasideda replikacijos procesas (1.3 skyrius).

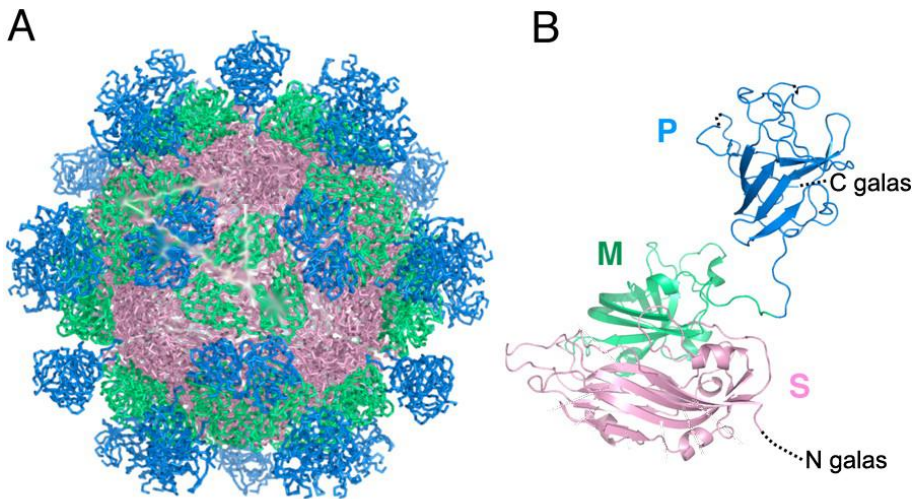
1.6 HEV kapsidės baltymas

HEV kapsidės baltymas infekcijos metu nustatomas skirtingų formų. Yra aprašyti du tyrimai, kurie pademonstravo, kad HEV infekcijos metu dalis susintetinto kapsidės baltymo susirenka į sekretuojamas pseudodaleles, o kita dalis dalyvauja viriono susiformavime. Vienas tyrimas nustatė infektyvų (ORF2i), glikozilintą (ORF2g) ir sutrumpintą (angl. *cleaved*, ORF2c) kapsidės baltymo formas. ORF2i baltymas sudaro infektyvaus HEV viriono kapsidę. ORF2g ir ORF2c yra sekretuojami viruso baltymai, kurie nesudaro infektyvių HEV dalelių (Montpellier et al., 2018). Kitas tyrimas yra parodęs, kad sekretuojamo kapsidės baltymo (ORF2^S) transliacija pradama nuo pradžios kodono esančio 15 kodonų už kito pradžios kodono, nuo kurio yra transliuojamas virioną sudarantis kapsidės baltymas (ORF2^C). ORF2^S buvo nustatytas kaip glikozilintas dimeras, kuris efektyviai keliauja iš ląstelės klasikiniu sekrecijos keliu. Šio baltymo sudėtyje yra panašios antigeninės struktūros kaip ir iš ORF2^C baltymo sudarytoje kapsidėje, bet jos nėra identiškos (Yin et al., 2018). Manoma, kad antrojo tyrimo metu nebuvo nustatytas sutrumpintas kapsidės baltymas (ORF2c) mažiau efektyvios baltymų raiškos ląstelių kultūros modelyje (Ankavay et al., 2019). Dauguma susintetinto kapsidės baltymo yra sekretuojama kaip ORF2^S, o ne ORF2^C,

kuris supakuoja HEV genomą į virionus. Sekretuojamo kapsidės baltymo vaidmuo HEV gyvenimo cikle nėra žinomas. Spėjama, kad jis gali veikti kaip priedanga, kuri apsaugo infektyvius HEV virionus nuo neutralizuojančių antikūnų. ORF2^S ir ORF2^C erdvinė struktūra šiek tiek skiriasi, todėl tai leidžia manyti, kad imuninis atsakas susidaręs prieš ORF2^S yra mažiau efektyvus prieš ORF2^C. Tai galėtų išsekinti imuninę sistemą ir atidėti efektyvios apsaugos prieš HEV infekciją susiformavimą (Ju ir Ding, 2019). Taigi apibendrinant abu tyrimus yra aišku, kad dalis HEV kapsidės baltymo yra išskiriama iš infekuotos ląstelės be viruso genomo, o kita dalis – supakuoja viruso genomą ir sudaro virioną.

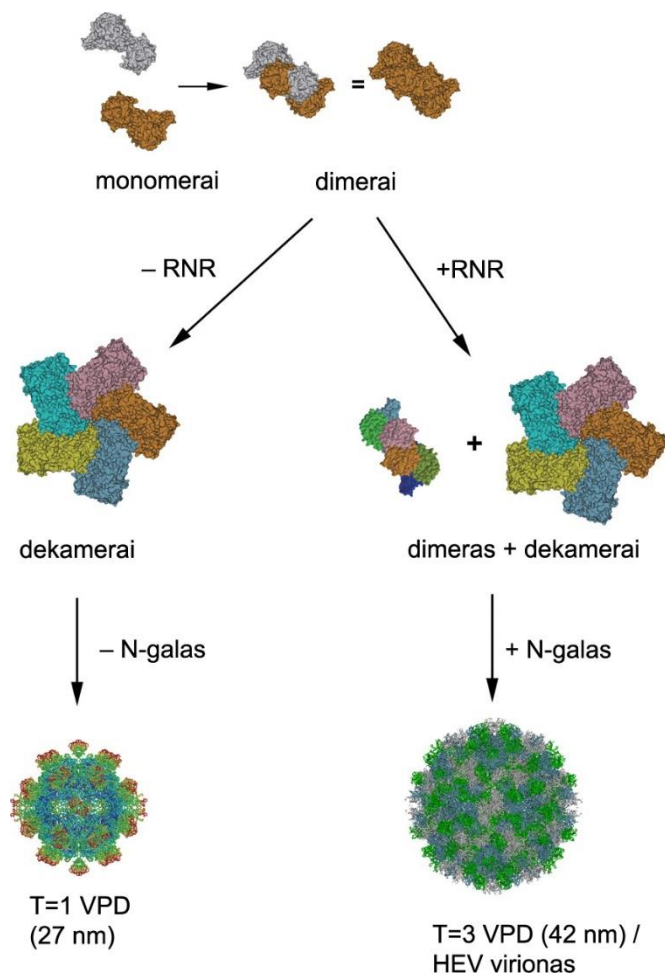
Natyvių HEV virionų struktūra nėra nustatyta. Nors jau yra išvesta ląstelių linija, kuri gali palaikyti nuolatinę HEV replikaciją (Meister et al., 2019), pakankamo natyvių HEV virionų kiekio struktūros tyrimams išgryninti nepavyksta. Rekombinantinio HEV kapsidės baltymo savybė oligomerizuotis buvo išnaudota virusų primenančių dalelių (VPD) sintezei *in vitro*. Pavyzdžiui, rekombinantiniai sutrumpinti HEV kapsidės baltymai po sintezės *Escherichia coli* formavo dimerus ir heksamerus (Li et al., 2005a, Li et al., 2009a). Sutrumpinti baltymai, kuriuos sudaro HEV kapsidės baltymo sritys 394–606 ir 459–660 suformuoja heksamerus. Rekombinantinis virusinis baltymas p239 (368–606 aminorūgščių sritis) formuoja 23 nm skersmens daleles (Li et al., 2005b). HEV-1 kapsidės baltymo įvairaus ilgio variantų sintezė taip pat atlikta bakulovirusų sistemoje (Li et al., 1997). Susintetinus N galinių aminorūgščių mutantą (112–660 aminorūgščių sritis) Tn5 ir Sf9 ląstelių linijose buvo nustatyti 58 ir 53 kDa dydžio baltymai. Tik 53 kDa baltymas susintetintas Tn5 ląstelėse buvo sekretuojamas ir formavo 23–24 nm skersmens daleles (Li et al., 2005a). Bakulovirusų sistemoje susintetintas N gale sutrumpintas žiurkių HEV kapsidės baltymas formavo subvirusines daleles, kurių skersmuo panašus į natūralių HEV virionų – 35 nm (Li et al., 2011). Taip pat yra aprašyta sutrumpinto HEV kapsidės baltymo (112–608 aminorūgštys), kuris suformavo 22 nm skersmens VPD, sintezė mielėse *Pischia pastoris* (Gupta et al., 2020). HEV kapsidės baltymas (110–610 aminorūgštys) yra susintetintas augaluose *Nicotiana benthamiana* ir formuoja 100 nm skersmens struktūras (Mardanova et al., 2020). Taigi yra įvairių rekombinantinių HEV kapsidės baltymų, kurie gali būti panaudoti HEV tyrimams.

Tiriant rekombinantinių HEV kapsidės baltymų struktūras nustatyta, kad juos sudaro trys domenai – S (angl. *shell*), M (angl. *middle*) ir P (angl. *protruding*) (1.7 pav.) (Yamashita et al., 2009). Erdvinėje kapsidės baltymo struktūroje S domenas tarnauja kaip pagrindas iškeliantis M ir P domenus. M domeno paviršius stipriai sąveikauja su S ir P domenais. P domenas prisijungia prie ląstelės receptoriaus bei yra neutralizuojančių antikūnų prisijungimo vieta (Xing et al., 2010). Rekombinantinių HEV kapsidės



1.7 pav. Sutrumpinto HEV kapsidės baltymo (112–606 aminorūgštys) suformuotos virusą primenančios dalelės (T=1) struktūros modelis (A) ir baltymo modelis (B) (pagal Yamashita et al., 2009).

baltymų struktūrų tyrimai taip pat atskleidė, kad VPD gali būti dviejų skirtingų simetrijų – T=1 ir T=3. HEV-3 ir HEV-4 kapsidės baltymai sudaryti iš 112–608 aminorūgščių srities sudaro T=1 simetrijos VPD (1.7 ir 1.8 pav.) (Guu et al., 2009, Yamashita et al., 2009). HEV-3 kapsidės baltymas be C galo 52 aminorūgščių, gali sudaryti T=3 simetrijos natūralaus HEV viriono dydžio VPD, kuri savo viduje turi RNR (1.8 pav.) (Xing et al., 2010). Kapsidės baltymo N galinių 14–111 aminorūgščių regiono sąveika su RNR lemia T=3, o ne T=1 simetrijos virionų susiformavimą (Guu et al., 2009, Yamashita et al., 2009, Xing et al., 2010). Spėjama, kad kapsidės baltymo dimerai susijungia į dekamerus, tada į ikosaedrinę T=3 simetrijos kapsidę (Xing et al., 2010, Mori



1.8 pav. Skirtingų simetrijų HEV VPD susidarymo modelis (pagal Xing et al., 2010).

ir Matsuura, 2011). Natūralios infekcijos metu HEV virionas yra sudarytas iš pilno ilgio kapsidės baltymo ir yra T=3 simetrijos.

1.7 Hepatito E klininiai simptomai

HEV infekcijos sukelta liga yra vadinama hepatitu E. Daugumai užsikrėtusiųjų HEV infekcija nesukelia jokių simptomų. Jeigu ir pasireiškia silpni simptomai, dažniausiai daugumos pacientų organizmas pats susitvarko su infekcija per kelias savaites. Hepatitas E klasikiniu atveju pasireiškia kaip ūmi infekcija su geltos simptomais (5–30 % atvejų). Šios ligos pirminiai

simptomai yra karščiavimas, pykinimas, vėmimas, apetito praradimas ir negalavimo jausmas. Vėliau atsiranda tokie simptomai kaip tamsus šlapimas ir gelta. Liga praeina savaime po kelių dienų ar savaitės, tačiau mirtingumas gali pasiekti 0,5–4 % atvejų per protrūkius (Wedemeyer et al., 2012). HEV-1 ir HEV-2 dažniausiai infekuoja jaunos vyrus (15–30 metų amžiaus) besivystančiose šalyse. Infekcija gali būti besimptomė, sukelti nesudėtingus simptomus arba gali išsivystyti staigus ir ūmus hepatitas, kuris sukelia kepenų nepakankamumą. Nėščiosios priskiriamos padidintos rizikos grupei. Užsikrėtus HEV antrame ir trečiame nėštumo trimestruose, gali išsivystyti kepenų nepakankamumas. Mirtingumas gali pasiekti 25 % per trečią nėštumo trimestrą (Navaneethan et al., 2008). Nėščiosios miršta dėl komplikacijų, pavyzdžiui, kraujavimo ir eklampsijos. Yra aprašytas ir kepenų nepakankamumas. Negyvų kūdikių gimimas taip pat yra dažnas. HEV gali būti perduotas vertikaliai iš motinos kūdikiui. Tai padidina naujagimių sergamumą ir mirštamumą (Khuroo et al., 2009). HEV-1 infekcija nėštumo metu yra siejama su dažnesniais persileidimais, priešlaikiniu gimdymu, mirštamumu gimdymo metu. Taigi besivystančiose šalyse HEV infekcija yra pavojingiausia nėščiosioms, tačiau sukelia klinikinius simptomus ir vyrams (Khuroo et al., 2009).

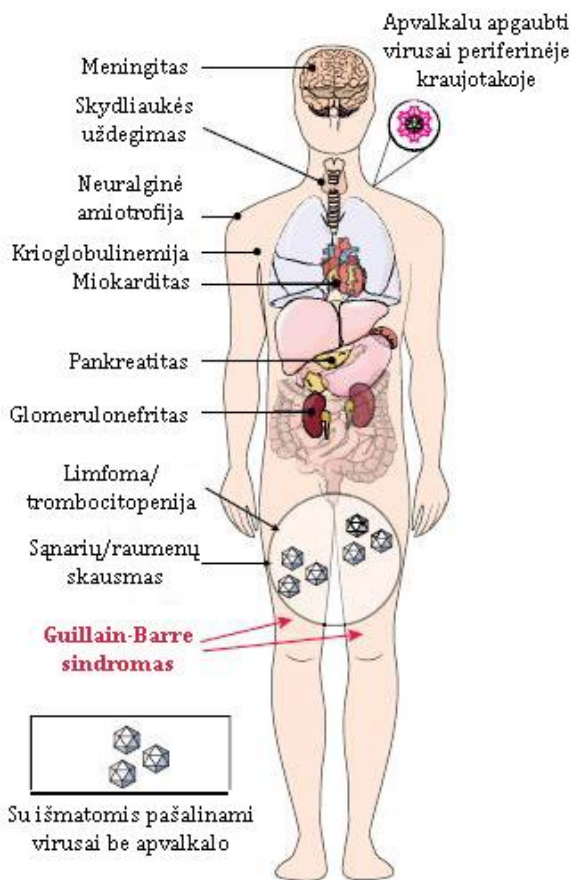
Išsivysčiusiose šalyse HEV įprastai infekuoja vidutinio amžiaus ar vyresnius vyrus (>55 metų amžiaus). Pavojingos HEV infekcijos nėščiosioms nėra aprašytos. Pacientai, kurie jau serga kepenų liga, yra rizikos grupėje išsivysčiusiose ir besivystančiose šalyse (Dalton et al., 2007a, Péron et al., 2007). Europoje 5–33 % pacientų infekuotų HEV-3 arba HEV-4 pasireiškia hepatito E simptomai, įskaitant geltą (Said et al., 2009, Guillois et al., 2016, Faber et al., 2018). Simptomų pasireiškimas gali būti siejamas su HEV virionų koncentracija organizme. Tai rodo tyrimai, kurie nustatė, kad pacientai su pasireiškusiais simptomais turi didesnę HEV RNR koncentraciją kraujyje negu sveiki kraujo donorai, kurių kraujyje nustatyta HEV RNR (Lhomme et al., 2019).

Pacientams su nusilpusia imunine sistema gali išsivystyti lėtinė HEV-3 ar HEV-4 infekcija. Tai pacientai po transplantacijos (Gérolami et al., 2008, Kamar et al., 2008b, Haagsma et al., 2008) arba infekuoti žmogaus imunodeficito virusu (ŽIV) (Colson et al., 2009, Dalton et al., 2009, Kenfak-Foguena et al., 2011). Taip pat yra aprašyti lėtinės HEV infekcijos atvejai pacientams su hematologine liga, kuriems atliekama chemoterapija (Peron et al., 2006, Tamura et al., 2007, Ollier, 2009, Geng et al., 2013), kamieninių ląstelių recipientams (Versluis et al., 2013) arba pacientams su reumatiniais

sutrikimais, kuriems atliekama imuninę sistemą slopinanti imunoterapija (Bauer et al., 2015, Pischke et al., 2019). Yra aprašyta HEV-7 infekcija pacientui, kuris vartojo kupranugario mėsą ir pieną. Manoma, kad ši infekcija buvo lėtinė (Lee et al., 2016). HEV infekcija yra laikoma lėtine, kai HEV dauginimasis tęsiasi ilgiau negu 3 mėnesius (Kamar et al., 2013). Jos metu gali išsivystyti lėtinis hepatitas, kuris greitai progresuoja į kepenų cirozę 10 % infekuotų pacientų atvejų (Gérolami et al., 2008, Haagsma et al., 2008, Kamar et al., 2008a, Kamar et al., 2011). Dalis šių pacientų gali mirti dėl nepakankamai atsistačiusios kepenų funkcijos po cirozės praėjus 2–3 metams nuo hepatito E diagnozės. Nėra aprašyta ūmaus hepatito atvejų HEV infekuotų transplantatų recipientams (Lhomme et al., 2020). Taigi HEV-3 ir HEV-4 infekcijos sudėtingiausias kliniškes būkles sukelia pacientams su nusilpusia imunine sistema.

HEV gali infekuoti ne tik kepenis, todėl yra nustatomi kliniškiniai simptomai, atsirandantys dėl kitų organų pažeidimų (1.9 pav.). Šie kliniškiniai simptomai gali būti skirstomi į neurologinius ir sukeltus sutrikusios inkstų funkcijos. Nedaug yra žinoma apie mechanizmus, kurie sukelia šiuos kliniškinis simptomus. Manoma, kad tiesioginis HEV replikacijos organuose poveikis arba netiesioginiai imuninės sistemos veiklos padariniai gali būti su jais susiję.

Neurologiniai sutrikimai yra nustatyti pacientams, kurie sirgo ūmiu arba lėtiniu hepatitu E, kurį sukėlė HEV-1 ir HEV-3 infekcijos (Dalton et al., 2016). Buvo aprašyti tokie neurologiniai sutrikimai kaip neuralgine amiotrofija (NA), *Guillain-Barré* sindromas, paralyžius veido srityje ir daugybinė radikulopatija (uždegimas nugaros smegenyse) (Dalton et al., 2017). Keletas hepatito E pacientų kohortų ir atvejų tyrimų susijusių su NA buvo atlikti HEV-3 infekuotiems europiečiams. Vienas tyrimas apimantis keturis tyrimo centrus Prancūzijoje, Jungtinėje Karalystėje ir Nyderlanduose prospektyviai išanalizavo daugiau nei 450 pacientų su ūmia netrauminia neurologine pažaida. Buvo nustatyta, kad 2,4 % tiriamųjų buvo infekuoti HEV (Dalton et al., 2017). Trys NA atvejai buvo susieti su HEV. Panašius rezultatus gavo ir kitas Jungtinės Karalystės ir Nyderlandų kohortos tyrimas, kuris nustatė, kad 10,6 % pacientų su NA turėjo HEV infekciją, kai pasireiškė neurologinis susirgimas (Van Eijk et al., 2014). Kitas plataus masto 118 pacientų su NA tyrimas Europoje parodė, kad pacientai, kurių susirgimas siejamas su HEV, išsiskiria kliniškinio fenotipu palyginus su pacientais su NA, bet be HEV infekcijos. Pacientai, kuriems nustatyta HEV infekcija ir NA, turėjo didesnę tikimybę, kad jiems išsivystys peties nervų rezginio pažeidimai.



1.9 pav. HEV infekcijos padariniai organizme už kepenų ribų (Pischke et al., 2016).

Šiems pacientams taip pat dažniau nustatyti neurologiniai pažeidimai freniniuose nervuose (Van Eijk et al., 2017). Neseniai atliktas tyrimas nustatė HEV RNR ir IgM klasės antikūnus prieš HEV stuburo kanale pacientui su NA. Tai rodo neurotropinę HEV infekciją (Fritz et al., 2018). HEV infekcijos ryšys su *Guillain-Barré* sindromu yra išanalizuotas tyrimuose Bangladeše (Geurts van Kessel et al., 2013), Japonijoje (Fukae et al., 2016) ir Nyderlanduose (Van Den Berg et al., 2014). Neseniai buvusi HEV infekcija nustatyta 5–11 % pacientų su *Guillain-Barré* sindromu. Tai buvo didesnis HEV infekcijos dažnis lyginant su sveikų žmonių kontroline grupe. Belgijoje atliktas tyrimas parodė, kad 8 % pacientų su *Guillain-Barré* sindromu turėjo HEV infekciją (Stevens et al., 2017). Kiti neurologiniai simptomai, pavyzdžiui, neuropatinis skausmas, skausmo jautimo sutrikimai, encefalitas

ar mielininio dangalo uždegimas, periferine neuropatija, taip pat buvo aprašyti HEV infekuotiems pacientams (Dalton et al., 2016, Abravanel et al., 2018). Dauguma HEV infekuotų pacientų su neurologiniais sutrikimais turėjo normalią arba lengvai sutrikusią kepenų veiklą. Tai rodo, kad neurologiniai sutrikimai yra pagrindiniai simptomai šiems pacientams.

Su HEV siejamų neurologinių sutrikimų patofiziologija nėra išaiškinta. Spėjama, kad imuninis atsakas, kurį sukelia virusas, gali daryti įtaką. Yra nustatyta, kad neurologiniai pažeidimai dažniau nustatomi pacientams su sveika imunine sistema (22,6 %) negu pacientams su nusilpusia imunine sistema (3,2 %, $p < 0,001$) (Abravanel et al., 2018). Tai leidžia manyti, kad *Guillain-Barré* sindromas ir NA yra dėl imuninio atsako, sukkelto HEV infekcijos, atsirandantys sutrikimai. Kita hipotezė yra tiesioginis viruso neurotropizmas. Išskirtinis atvejis buvo nustatytas lėtinę HEV infekciją turinčiam inksto recipientui. HEV kamienai, nustatyti cerebrospinaliniame skystyje ir serume tuo pačiu metu, skyrėsi. Tai leidžia spėti, kad evoliucionuoja neurotropiniai HEV variantai (Kamar et al., 2010) ir kad HEV galimai gali replikuotis centrinėje nervų sistemoje. Taigi neurologinius sutrikimus gali sukelti HEV infekcijos sukeltas imuninis atsakas, tiesioginis viruso poveikis arba abu.

Ūmios ir lėtinės HEV infekcijos gali sukelti inkstų pažeidimus ir sutrikdyti inkstų funkcijas (Kamar et al., 2005, Kamar et al., 2012), tačiau mažai yra žinoma apie mechanizmus, kurie nulemia šiuos klinikinius simptomus. HEV-1 arba HEV-3 infekuotų pacientų inkstų biopsijos parodė glomerulinės ligos ženklus (Kamar et al., 2012). HEV taip pat gali paskatinti jau esančios IgA nefropatijos paūmėjimą (Kamar et al., 2012, Del Bello et al., 2015). HEV RNR buvo nustatyta kraujo serume, paimtame iš paciento su sveika imunine sistema ir ūmia HEV infekcija bei inkstų uždegimu (Guinault et al., 2016). HEV infekcija taip pat buvo identifikuota kaip nepriklausomas veiksnys nulemiantis krioglobulinemiją organų recipientams (Marion et al., 2018). Inkstų funkcija pagerėja pasibaigus HEV infekcijai (Kamar et al., 2012, Del Bello et al., 2015, Guinault et al., 2016). Taigi HEV infekcija gali pasunkinti jau esančius inkstų funkcijų sutrikimus ir kitas ligas.

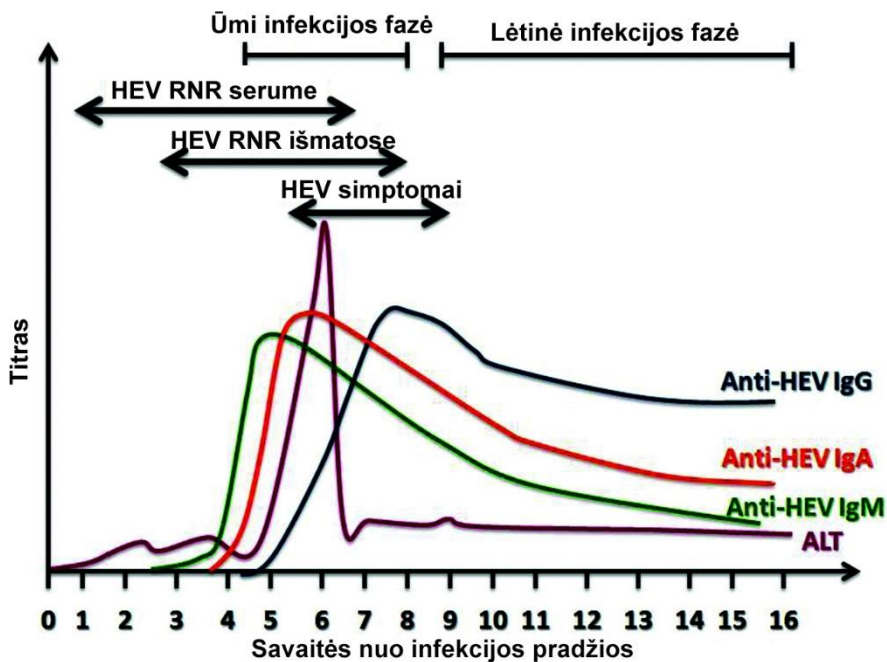
HEV infekcijos poveikio inkstams mechanizmas nėra žinomas. Pacientams su hepatito C viruso (HCV) infekcija ir inkstų uždegimu gali susidaryti HCV antigeno, IgG antikūnų prieš HCV ir reumatoidinio veiksnio imuninių kompleksų sankaupos glomerulėse (D'Amico, 1998). Manoma, kad panašus mechanizmas veikia ir HEV infekcijos atveju. HEV antigenas ir RNR buvo nustatyta pacientų su lėtine HEV-3 arba HEV-4 infekcija šlapime (Geng

et al., 2016, Marion et al., 2019). Didelės HEV antigeno koncentracijos buvo nustatytos pacientų su nusilpusia imunine sistema šlapime nepriklausomai nuo to, ar nustatyta HEV RNR. Didelės molekulinės masės HEV virionai neturėtų laisvai pereiti glomerulių filtracijos barjero (Robinson et al., 1998, Montpellier et al., 2018, Yin et al., 2018). Visgi mažesnės molekulinės masės sekretuojami kapsidės baltymo variantai (ORF2^S (Yin et al., 2018) arba ORF2c ir ORF2g (Montpellier et al., 2018)) galėtų būti sekretuojami į šlapimą ir nustatomi. Taip pat tikėtina, kad HEV antigenas į šlapimą galėtų būti sekretuojamas inkstų epitelinių ląstelių. Yra pademonstruota, kad HEV gali daugintis nežmoginių primatų ir kiaulių inkstų ląstelėse (Grigas et al., 2020). Vis dėlto nėra jokių įrodymų, kad HEV yra tiesiogiai nefrotoksiškas ar kad jis galėtų daugintis žmogaus inkstų ląstelėse (Lhomme et al., 2020). Taigi, ar HEV infekcija tiesiogiai paveikia inkstus ir kaip tai vyksta lieka neišaiškinta.

1.8 Molekuliniai HEV nustatymo metodai

HEV klinikiniai simptomai ir biocheminiai testai nesuteikia pakankamai informacijos, kad būtų patvirtinta HEV infekcijos diagnozė. Visgi tai padeda identifikuoti virusinės infekcijos pradžią ar jos stadiją. HEV infekcijai diagnozuoti optimaliausias variantas yra molekulių ir serologinių HEV infekcijos nustatymo metodų derinimas. Šių metodų derinimas leidžia patvirtinti infekciją bei vertinti gydymo efektyvumą lėtinės infekcijos atveju. Egzistuoja keletas molekulių ir imunocheminių (žr. 1.9 skyrių) HEV nustatymo metodų.

Molekuliniai HEV nustatymo metodai nustato viruso RNR. Kraujyje HEV RNR gali būti nustatoma labai ankstyvoje ūmios HEV infekcijos stadijoje ir jos kiekis tolygiai mažėja iki 5–6 savaitės, kol būna nebenustatomas (1.10 pav.). Praėjus 2–3 savaitėms nuo infekcijos pradžios HEV RNR yra nustatoma išmatose. HEV RNR yra nustatoma tik ūmios infekcijos fazės metu (Al-Sadeq et al., 2018). Keletas tyrimų yra parodę, kad HEV RNR nustatymas yra reikalingas norint patvirtinti HEV buvimą kraujo ar organų donacijų metu (Vollmer et al., 2012, Fischer et al., 2015, Nasrallah et al., 2017). HEV RNR detekcija yra laikoma standartine procedūra HEV pastovios infekcijos nustatymui individams su nusilpusia imunine sistema (Pischke et al., 2010, Mover et al., 2013). Visgi kraujo produktų tikrinimas prieš kraujo donacijas ar transfuzijas yra diskutuotinas (Coilly et al., 2013, Pawlotsky, 2014). Europoje kraujo donorų tyrimai nustatė HEV viremijas. Be to, rutiniškai HEV



1.10 pav. HEV žymenų titras infekcijos žmoguje eigoje (pagal Al-Sadeq et al., 2018).

infekcijos kraujo donoruose yra tiriamos Airijoje, Jungtinėje Karalystėje, Prancūzijoje, Nyderlanduose, Vokietijoje, Ispanijoje, Austrijoje, Liuksemburge (Boland et al., 2019).

Dažniausiai HEV RNR nustatymui yra naudojamas PGR metodas (lentelė 1.2). Diagnostikai populiariausia yra atvirkštinės transkripcijos tikro laiko kiekybinė PGR (AT–kPGR), tačiau taip pat yra naudojama AT lizdinė (angl. *nested*) PGR ir AT–PGR. AT–kPGR taikiniai yra išsidėstę ORF1 (Pas et al., 2012, Slot et al., 2013, Gupta et al., 2013, Behrendt et al., 2016), ORF2 (Abravanel et al., 2012) arba ORF3 (Sauleda et al., 2015). Yra keletas gamintojų, kurie tiekia rinkinius HEV diagnostikai AT–kPGR metodu. Taip pat Pasaulio sveikatos organizacija yra patvirtinusi visų HEV genotipų RNR standartų rinkinį diagnostinių metodų validavimui (Baylis et al., 2019). AT–PGR taikiniai yra ORF1 (Jothikumar et al., 1993, Abravanel et al., 2013). Lizdinės PGR taikiniai taip pat yra ORF1 (Meng et al., 1997, Wu et al., 1998, Zhang et al., 2006, Garg et al., 2016). AT–kPGR yra naudojama taip pat ir kiekybiniam HEV RNR kiekiui įvertinimui mėginiuose, o kitų PGR tipų produktai yra nuskaitomi DNR sekoskaita ir naudojami HEV genotipavimui.

Lentelė 1.2. HEV RNR nustatymo metodai ir jų taikiniai.

Metodas	Taikiniai HEV-3 genome	Taikiniai žiurkių HEV genome
Atvirkštinės transkripcijos tikro laiko kiekybinė PGR	ORF1; ORF2; ORF3	5' galas; ORF1; ORF2; ORF1 ir ORF2 ribojimosi vieta
Atvirkštinės transkripcijos lizdinė PGR	ORF1	ORF1
Atvirkštinės transkripcijos PGR	ORF1	Nekoduojanti RNR
Atvirkštinės transkripcijos izoterminis pagausinimas	ORF2; ORF3	–

Atvirkštinės transkripcijos izoterminis pagausinimas (angl. *reverse transcription loop-mediated isothermal amplification*, AT–LAMP) yra greitas metodas naudojamas HEV nustatymui (lentelė 1.2). Yra publikuota keletas AT–LAMP sistemų, skirtų nustatyti HEV kiaulių, vėžiagyvių ir žmonių mėginiuose (Lan et al., 2009, Zhang et al., 2012, Chen et al., 2014, Gao et al., 2016). Šios sistemos taikiniai yra konservatyvūs viruso genomo regionai. Taikinių pagausinimui yra naudojami keletas išorinių, vidinių ir „kilpos pradmenų“ (angl. *loop primers*) sistemų komplementarių kelioms skirtingoms genomo sritims. Kadangi HEV turi RNR genomą, LAMP metodas yra derinamas su atvirkštinės transkripcijos reakcija. Atvirkštinė transkripcija ir LAMP reakcija vyksta tame pačiame mėgintuvėlyje izoterminėse sąlygose (63 °C). Gaunami kokybiniai rezultatai, kurie identifikuojami DNR elektroforezės metodu arba reakcijos mišinio spalvą keičiančiomis ar fluorescencinėmis medžiagomis (Zhang et al., 2012, Chen et al., 2014). AT–LAMP jautrumas – 9 HEV RNR kopijos (Al-Sadeq et al., 2018). Taigi yra ir alternatyvių HEV nustatymo molekulinį metodų.

HEV nustatymui žiurkėse yra naudojami AT lizdinė PGR ir AT–kPGR. RNR mėginiai yra gryninami iš žiurkių kepenų ir išmatų. PGR taikiniai pasirenkamos sritys, esančios genomo 5' gale, ORF1, ORF2, ORF1 ir ORF2 ribojimosi vietoje (John et al., 2010b, Mulyanto et al., 2013, Widén et al., 2014). PGR taikinių detalesnė analizė atliekama DNR sekoskaitos metodu. Filogenetiniams ryšiams tirti nuskaitomi ne mažiau kaip 200 nukleotidų ilgio fragmentai (Purdy ir Sue, 2017, Ryll et al., 2017). Vykstant HEV genomo replikacijai yra sintetinama nekoduojanti RNR, kurios nustatymas parodo vykstančią HEV replikaciją. Nekoduojanti HEV RNR yra nustatoma AT–

PGR (Billam et al., 2008, Zhang et al., 2011). Taigi, yra keletas būdų žiurkių HEV RNR nustatymui.

1.9 Imunocheminiai HEV nustatymo metodai

Imunocheminiai HEV nustatymo metodai gali nustatyti viruso antigeną arba virusui specifiskus antikūnus kraujyje. Virusų antigenas ūmios infekcijos fazės metu yra nustatomas kraujyje ir kepenyse. Lėtinės infekcijos metu HEV antigenas taip pat yra aptinkamas. Virusų antigeno nustatymas dviepitopės imunofermentinės analizės (IFA) metodu yra vienas iš tiesioginių būdų nustatyti HEV viremiją (Aggarwal ir Goel, 2016). HEV antigenas yra viruso kapsidės baltymas (Zhang et al., 2006). ORF3 nekoduoja HEV kapsidės baltymo, tačiau taip pat yra nustatomas kraujo serume ūmios infekcijos metu (Takahashi et al., 2008b). Dviepitopės IFA metodui gali būti panaudoti monokloniniai ir/arba polikloniniai antikūnai. Jais gali būti padengiamas plokštelės šulinėlių dugnas tam, kad išgaudytų HEV antigenus. Tie patys antikūnų tipai gali būti naudojami HEV antigeno-antikūno kompleksų detekcijai (Zhang et al., 2006). HEV antigeno nustatymas dažniau sutampa su HEV RNR nustatymu negu IgM klasės antikūnų prieš HEV nustatymas su HEV RNR (Zhang et al., 2006, Vollmer et al., 2014, Trémeaux et al., 2016). IgM prieš HEV susidaro infekcijos pradžioje (1.10 pav.). Nors AT–PGR yra jautresnė už HEV antigeno nustatymo metodus (Vollmer et al., 2014, Trémeaux et al., 2016), įtaką PGR jautrumui gali daryti HEV genomo sekos variabilumas ir genotipų įvairovė. Tikėtina, kad HEV antigeno nustatymo metodai gali toleruoti šią HEV genotipų įvairovę (Zhang et al., 2006). HEV antigeno nustatymo IFA sistemos pasižymi aukštu specifiskumu, nes nėra nustatomos kryžminės reakcijos su kitų hepatito A, B ar C virusų antigenais (Trémeaux et al., 2016). Deja, HEV antigenų nustatymo IFA sistemų jautrumas varijuoja nuo 40 iki 91 % (Vollmer et al., 2014). Kraujyje HEV antigenų koncentracija yra didesnė, kai yra nustatomas mažas kiekis IgM klasės antikūnų prieš HEV ir atvirkščiai. Sumaišius kraujo serumą su IgM prieš HEV su ląstelių kultūros infekuotos HEV supernatantu, antigeno nustatymo metodo signalas sumažėjo lyginant su kontroline grupe (Vollmer et al., 2014). Be to, pacientams su nusilpusia imunine sistema HEV infekcijos metu nustatytas didesnis HEV antigeno kiekis kraujyje lyginant su pacientais turinčiais sveiką imuninę sistemą. Tai siejama su sumažėjusia antikūnų gamyba (Vollmer et al., 2014, Trémeaux et al., 2016). Virusų antigeno nustatymas HEV replikacijos metu yra labiau tikėtinas lėtinės infekcijos metu

netgi esant antikūnams prieš HEV. HEV antigeno ir antikūnų prieš HEV nustatymo metodai gali būti naudojami lėtinę HEV infekcijos patvirtinimui (Gupta et al., 2013). Taigi, HEV antigenas galėtų būti puikus tiesioginis HEV infekcijos žymuo, tačiau nėra sukurtas nustatymo metodas, kuris pasižymėtų aukštu jautrumu.

Netiesiogiai HEV infekcija yra diagnozuojama naudojant serologinius testus, kurie nustato antikūnus prieš HEV. IgM ir IgG klasių antikūnai prieš HEV yra humoralinio imuninio atsako dalis. Ūmios HEV infekcijos metu, IgM prieš HEV yra nustatomi simptomų atsiradimo metu ir išlieka kraujyje iki kelių mėnesių (1.10 pav.) (Favorov et al., 1992). IgG prieš HEV parodo buvusią HEV infekciją arba lėtinį hepatitą E, kai paciento imuninė sistema yra nusilpusi ir negali įveikti infekcijos. IgG prieš HEV gamyba prasideda iškart po IgM prieš HEV atsiradimo. IgG antikūnai kraujyje išlieka ilgiau negu IgM (1.10 pav.). Keletas tyrimų parodė, kad IgG prieš HEV galima nustatyti praėjus metams po infekcijos, tačiau tikslus laikas nėra nustatytas (Favorov et al., 1992). IgA prieš HEV taip pat yra nustatomi ir yra ūmios infekcijos žymuo. Jų nustatymas taip pat gali padėti diagnozuoti HEV infekciją kartu su IgM prieš HEV arba kai IgM antikūnai nenustatomi (Takahashi et al., 2005, Herremans et al., 2007, Zhang et al., 2009b). Svarbu paminėti, kad nors egzistuoja keli HEV genotipai, jie sukelia labai panašų imuninį atsaką, todėl laikoma, kad egzistuoja vienas HEV serotipas. Taigi netiesioginių HEV infekcijos žymenų nustatymo serologiniai metodai gali būti universalūs diagnostiniai įrankiai.

IFA yra dažniausiai naudojama antikūnų prieš HEV nustatymui moksliniams HEV infekcijų paplitimo tyrimams. Yra keletas serologinių antikūnų nustatymo metodų, kurie skiriasi HEV antigenu, mėginio skiedimu, atlikimo trukme ir ribine signalo verte, kuri atskiria teigiamus mėginius nuo neigiamų. Galima įsigyti kelių skirtingų gamintojų antikūnų prieš HEV nustatymo IFA rinkinius (lentelė 1.3). Šiuose rinkiniuose yra naudojami skirtingi antigenai – rekombinantiniai baltymai arba sintetiniai peptidai. Šios molekulės atkartoja HEV kapsidės ir/arba ORF3 koduojamo baltymų imunodominuojančius epitopus. HEV antigenai išgaudo antikūnus prieš HEV iš paciento kraujo mėginio (Aggarwal, 2013). Be to, yra IFA testas, kuriame naudojami rekombinantiniai mozaikiniai baltymai, kuriuose yra įterpti HEV baltymų antigeniški epitopai (Fields et al., 1996). Rekombinantiniai antigenai geriau atkartoja konformacinius epitopus negu trumpi peptidai, nes IFA paremta pilno ilgio antigenu pasižymi aukštesniu jautrumu (Mast et al., 1998, Aggarwal, 2013). Imunoblotingo metodai taip pat yra sukurti antikūnų prieš

HEV nustatymui, tačiau jų efektyvumas yra prastas (Herremans et al., 2007). Imunoblotingo testai skiriasi nuo IFA tuo, kad juose naudojama nitroceliuliozinė membrana padengta išgrynintų HEV rekombinantinių antigenų juostele. Šių testų atlikimas užtrunka dėl ilgų inkubacijų su pacientų kraujo mėginiais ir detekciniais antikūnais. Be to, imunoblotingo testo rezultatų interpretacija priklauso nuo vizualaus spalvotos juostelės ryškumo vertinimo. Juostelės ryškumas priklauso nuo prisijungusių antikūnų prieš HEV kiekio. „Mikrogen Diagnostik“ yra vienintelė įmonė, kuri gamina imunoblotingo testą. Taigi yra labai įvairių serologinių testų antikūnų prieš HEV nustatymui.

Lentelė 1.3. Serologinių HEV nustatymo IFA sistemų palyginimas.

Gamintojas	Reagentas, išgaudantis antikūnus prieš HEV	Antikūnų klasė	Jautrumas, %	Specifiškumas, %	Imties dydis	Šaltinis
„Wantai“	Antikūnai prieš IgM sunkiąją grandinę	IgM	97,7	99,6	43	(Abravanel et al., 2013)
			75	>99	34	(Pas et al., 2013)
			65,4	-	52	(Avellon et al., 2015)
	Rekombinantiniai HEV antigenai	IgG	62	99	216	(Norder et al., 2016)
			72,5	-	40	(Avellon et al., 2015)
			100	96,5	189	(Al-Absi et al., 2018)
„Mikrogen“	Rekombinantiniai HEV-1 ir HEV-3 kapsidės baltymai	IgM	38	99	66	(Norder et al., 2016)
			74	99	34	(Pas et al., 2013)
			75	-	52	(Avellon et al., 2015)
		IgG	62	99	216	(Norder et al., 2016)
			72,5	-	40	(Avellon et al., 2015)
„Euroimmun“	Rekombinantiniai HEV-1 ir HEV-3 antigenai	IgM	61,5	-	52	(Avellon et al., 2015)
			42	99	216	(Norder et al., 2016)
		IgG	57,5	-	40	(Avellon et al., 2015)
			61,5	98,8	108	(Al-Absi et al., 2018)
„MP Diagnostics“	Trys rekombinantiniai HEV antigenai	IgM	74	84	34	(Pas et al., 2013)
			59,6	-	52	(Avellon et al., 2015)
			80	86,1	309	(Wu et al., 2014)
		IgG	70	-	40	(Avellon et al., 2015)
			73,3	65,3	309	(Wu et al., 2014)
			100	98,5	169	(Al-Absi et al., 2018)
„DiaPro“	Keturi peptidai su konservatyviais HEV ORF2 ir ORF3 koduojamų baltymų epitopais	IgM	72	100	66	(Norder et al., 2016)
			81	98	34	(Pas et al., 2013)
			59,6	-	52	(Avellon et al., 2015)
		IgG	98	96	216	(Norder et al., 2016)
			77,5	-	40	(Avellon et al., 2015)
„Axiom“	HEV-1 kapsidės baltymo C galas	IgM	29	99	66	(Norder et al., 2016)
		IgG	95	98	216	

Serologinius antikūnų prieš HEV nustatymo metodus yra lengviau atlikti ir jie yra pigesni negu molekuliniai testai, tačiau jų jautrumas ir specifiškumas yra labai skirtingas. Tokia testų įvairovė apsunkina HEV infekcijų seroepidemiologinių tyrimų rezultatų vertinimą (Park et al., 2012, Wenzel et al., 2013, Shrestha et al., 2016). Įvairių gamintojų IFA rinkiniai demonstruoja skirtingus rezultatus, nepaisant to, kad yra tiriami identiški mėginiai (Mast et al., 1998, Lin et al., 2000, Bendall et al., 2010, Abravanel et al., 2013, Pas et al., 2013, Avellon et al., 2015, Shrestha et al., 2016, Capai et al., 2019). Šiuo metu populiariausias serologinis testas yra „Wantai anti-HEV IgG“ gaminamas „Beijing Wantai Biological“. Šio testo jautrumas ir specifiškumas, nustatant IgG antikūnus prieš HEV, yra atitinkamai 97,7 % ir 99,6 % (lentelė 1.3). Be to, tyrimai taip pat pademonstravo didesnę antikūnų nustatymo dažnį su „Wantai“ testu lyginant su kitais. Šis skirtumas greičiausiai egzistuoja ne dėl klaidingai teigiamų rezultatų (Rossi-Tamisier et al., 2013, Hartl et al., 2016). „Wantai“ testas nustato labai mažą paplitimą vaikų populiacijose. Antikūnų nustatymo dažnis yra didesnis vyresnių žmonių grupėse (Christensen et al., 2008, Mansuy et al., 2011). Be to, didžioji dalis „Wantai“ testu nustatytų teigiamų rezultatų yra patvirtinti imunoblotingo metodu (Rossi-Tamisier et al., 2013). Kiti testai nepakankamai įvertina HEV paplitimą. Danijoje atliktas tyrimas parodė 10,7 % antikūnų prieš HEV nustatymo dažnį su kito gamintojo testu ir 19,8 % – su „Wantai“ (Holm et al., 2015). Katalonų kraujo donorų tyrimas atskleidė 19,96 % („Wantai“) ir 10,72 % („Mikrogen“) teigiamų mėginių (Sauleda et al., 2015). Prancūzijoje teigiamų mėginių nustatoma nuo 3,2 % iki 22,4 % priklausomai nuo naudojamo testo (Boutrouille et al., 2007, Mansuy et al., 2016). Taigi galima manyti, kad seroepidemiologinės studijos atliktos su „Wantai“ testu parodo rezultatus, kurie yra arčiausiai realios situacijos. Labai svarbu yra paminėti, kad nėra nė vieno patvirtinto serologinio testo, kuris galėtų būti naudojamas klinicinei HEV infekcijos diagnostikai. Šiuo metu egzistuojantys testai gali būti naudojami tik epidemiologiniams tyrimams ir kaip pagalbinių priemonė diagnostikai.

Antikūnai prieš žiurkių HEV žiurkėse dažniausiai yra nustatomi mokslininkų sukurtomis IFA sistemomis. Antikūnų prieš HEV išgaudymui yra naudojami rekombinantiniai žiurkių HEV kapsidės baltymai (Li et al., 2011, Purcell et al., 2011, Johne et al., 2012). Serologiniams žiurkių kraujo mėginių tyrimams yra išbandyta „Axiom“ IFA sistema, kuri paremta HEV-1 antigenais, kurie išgaudo antikūnus nepriklausomai nuo jų kilmės. Ši sistema nebuvo efektyvi tiriant žiurkių mėginius (Johne et al., 2012). Nėra nė vieno

platinamo IFA rinkinio skirto serologiniams žiurkių kraujo mėginių ar antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymo žmonėse tyrimams.

Kiaulių serologiniams tyrimams pritaikytų testų yra įvairių gamintojų. Dažniausiai naudojamas metodas yra IFA. Kiaulių tyrimams naudojami pritaikyti netiesioginės IFA formato testai arba adaptuoti žmonių tyrimams skirti serologiniai testai, kuriuose naudojami kiaulių antikūnams specifiški detekciniai antikūnai (Grierson et al., 2015, Spancerniene et al., 2016). Taip pat serologiniams tyrimams yra populiarūs IFA testai, kurie nustato antikūnus nepriklausomai nuo jų kilmės (Thiry et al., 2017a). Taigi kiaulių tyrimams yra galimybė įsigyti pritaikytų serologinių testų.

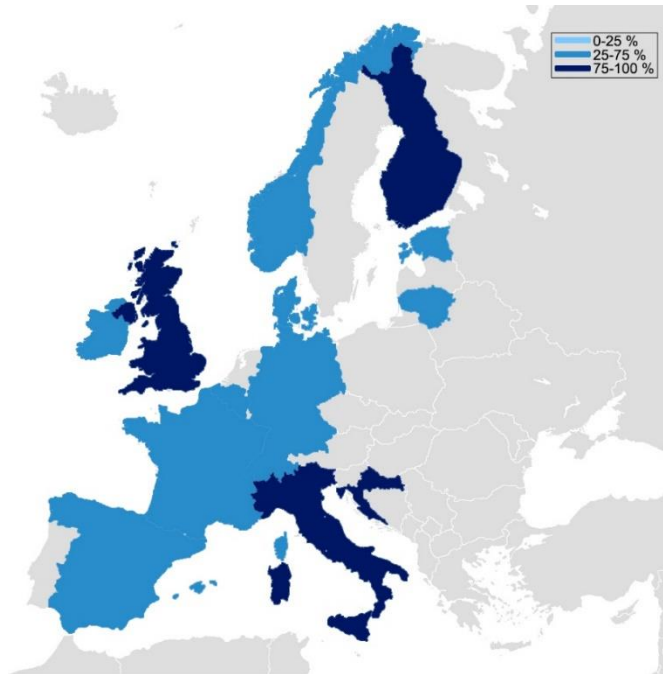
1.10 HEV-3 ir žiurkių HEV paplitimas

HEV-3 didelių protrūkių kaip HEV-1 ir HEV-2 nesukelia, tačiau išsivysčiusiose šalyse yra atliekama vis daugiau tyrimų, kurie rodo, kad virusas yra paplitęs populiacijoje. HEV specifiški IgG klasės antikūnai yra persirgtos HEV infekcijos žymuo. 2019 m. atlikta publikacijų duomenų bazėse esančių žmonių populiacijos seroepidemiologinių tyrimų analizė (Capai et al., 2019). Į analizę buvo įtraukti 26 tyrimai, kurie naudojo „Wantai“ testą, atlikti 15 šalių. Vidutinis apskaičiuotas antikūnų prieš HEV nustatymo dažnis yra 19 %, o tyrimai atlikti bendrai 63828 individams (Capai et al., 2019). Prancūzijoje bendros populiacijos kraujo donorų tyrimai parodė, kad antikūnų prieš HEV nustatymo dažnis yra 22,4 % (Mansuy et al., 2016). Tai nėra aukštas rodiklis lyginant jį su Prancūzijos atskirų regionų paplitimu. Regionuose HEV infekcijų paplitimas yra gerokai aukštesnis – antikūnai nustatyti 52,5 % (Mansuy et al., 2011), 39,1 % (Mansuy et al., 2015) ir 34 % (Izopet et al., 2015) mėginių surinktų iš kraujo donorų. Taigi galima sakyti, kad tam tikri regionai yra hiperendeminiai. Lenkijoje bendros populiacijos kraujo donoruose nustatytas 43,52 % antikūnų prieš HEV dažnis (Grabarczyk et al., 2018), o regionuose šiek tiek aukštesnis – 49,6 % (Bura et al., 2017). Nyderlanduose antikūnų prieš HEV nustatymo dažnis yra 27–31 % (Slot et al., 2013, van Gageldonk-Lafeber et al., 2017, Mooij et al., 2018). Vertinant regioninį paplitimą Italijoje, centrinėje šalies dalyje nustatyta 49 % teigiamų tirtų mėginių (Lucarelli et al., 2016). Tai yra taip pat daugiau negu bendroje Italijos populiacijoje – 8,7 % (Spada et al., 2018). Šiaurinėje Italijos dalyje antikūnų prieš HEV nustatymo dažnis panašus į bendrąją populiaciją – 9,8 % (Galli et al., 2017). Vidutinis HEV paplitimas – 12–19,96 % – nustatytas Jungtinėje Karalystėje, JAV, Austrijoje, Norvegijoje, Danijoje ir Ispanijoje

(Beale et al., 2011, Xu et al., 2013, Fischer et al., 2015, Sauleda et al., 2015, Holm et al., 2015, Lange et al., 2017, Zafrullah et al., 2018). Mažiausiais antikūnų prieš HEV nustatymo dažnis – 4,2–9,7 % – nustatytas Naujojoje Zelandijoje, Škotijoje, Airijoje, Kanadoje, Australijoje (Dalton et al., 2007b, Cleland et al., 2013, Shrestha et al., 2014, O’Riordan et al., 2016, Fearon et al., 2017, Hewitt et al., 2018, Thom et al., 2018). Taigi HEV paplitimas didžiausias yra Europoje. Tokius duomenis galima pagrįsti gastrinomiais įpročiais vartoti nepakankamai termiškai apdorotus arba išvis neapdorotus iš kepenų pagamintus mėsos produktus. Taip pat įtaką gali daryti profesijų, susijusių su padidinta HEV infekcijų rizika, populiarumas.

Žmonėms, kurie darbe susiduria su gyvūnais, yra dažniau nustatomi antikūnai prieš HEV. Tokių tikslinių populiacijų tyrimai atlikti įvairiais serologiniais testais, todėl rezultatų tiksliai palyginti neįmanoma (Capai et al., 2019). Visgi galima nuspėti, kurios populiacijos yra padidintoje HEV infekcijų rizikoje. Pavyzdžiui, kiaulių ūkių darbuotojai ar žmonės savo darbe susiduriantys su kiaulėmis (Meng et al., 2002, Krumbholz et al., 2014, Ivanova et al., 2015, Teixeira et al., 2017), miškininkai (Dremsek et al., 2012, Carpentier et al., 2012, Chaussade et al., 2013) ir ūkių darbuotojai (Lange et al., 2017). Įdomu tai, kad veterinarai ne visada yra padidintoje HEV infekcijos rizikoje (Lange et al., 2017, Kantala et al., 2017, De Sabato et al., 2017). Vis dėlto, veterinaro darbo vieta (regioninės ar miesto vietovės) gali daryti įtaką HEV infekcijos tikimybei. Norvegijoje atliktas tyrimas parodė, kad veterinarų, kurie dirba su kiaulėmis, antikūnų prieš HEV nustatymo dažnis yra didesnis už tuos, kurie toje srityje nedirba (Lange et al., 2017). Miškininkai, medžiotojai, kiaulių ar kitų ūkių darbuotojai yra padidintos rizikos profesijų pavyzdžiai.

Labai svarbu yra tirti HEV paplitimą kiaulių ūkiuose, norint įvertinti kiaulių populiacijos užsikrėtimo laipsnį ir visuomenės sveikatos riziką. Yra atlikta daug įvairių kiaulių populiacijų tyrimų. Mėginiai juose yra surinkti iš skerdyklų, atsitiktinai arba specifiskai pasirinktų ūkių. Serologiniai tyrimai atliekami retrospektyviai, nustatant antikūnus prieš HEV ir vertinant paplitimą tam tikru periodu (Salines et al., 2017). Europoje HEV infekcijų paplitimas yra dažnas (1.11 pav.). Antikūnų prieš HEV nustatymo dažnis tirtose kiaulėse Europoje variuoja nuo 20,4 iki 92,8 %. Labiausiai HEV infekcijos kiaulėse paplitusios Suomijoje, Jungtinėje Karalystėje, Italijoje ir Kroatijoje (daugiau negu 75 % paplitimas). Tokia rezultatų įvairovė, ko gero, nustatyta dėl naudotų metodų ir dėl atsitiktinumo pasirenkant ūkius ir individus tyrimams.



Valstybė	Antikūnų prieš HEV paplitimas, %	Šaltinis
Belgija	73	(Thiry et al., 2014)
Kroatija	91,7	(Lipej et al., 2013)
Danija	73,2	(Breum et al., 2010)
Estija	61,6	(Ivanova et al., 2015)
Lietuva	43,75	(Spancerniene et al., 2016)
Suomija	86,5	(Kantala et al., 2013)
Prancūzija	31	(Rose et al., 2011)
Vokietija	68,6	(Wacheck et al., 2012)
Airija	27	(O' Connor et al., 2015)
Italija	50,2–87	(Martinelli et al., 2011, Di Bartolo et al., 2011, Costanzo et al., 2015, Caruso et al., 2017)
Norvegija	73	(Lange et al., 2017)
Škotija	61,4	(Crossan et al., 2014)
Ispanija	20,4–48,4	(Seminati et al., 2008, Casas et al., 2009, Jiménez De Oya et al., 2011)
Šveicarija	58,1	(Burri et al., 2014)
Jungtinė Karalystė	85,5–92,8	(Banks et al., 2004, Grierson et al., 2015)

1.11 pav. HEV infekcijų kiaulėse paplitimas. Pagal intervalus žemėlapyje skirtingomis spalvomis pažymėtos valstybės, kuriose serologiniais metodais nustatytas HEV paplitimas patenka į nurodytus intervalus. Lentelėje pateikti antikūnų prieš HEV nustatymo dažniai įvairiose valstybėse.

Ūkio ypatybės ir ūkininkavimo praktika yra veiksniai, nulemiantys didesnę antikūnų prieš HEV nustatymo dažnį. Vidutinio dydžio ar šeimos ūkiai su

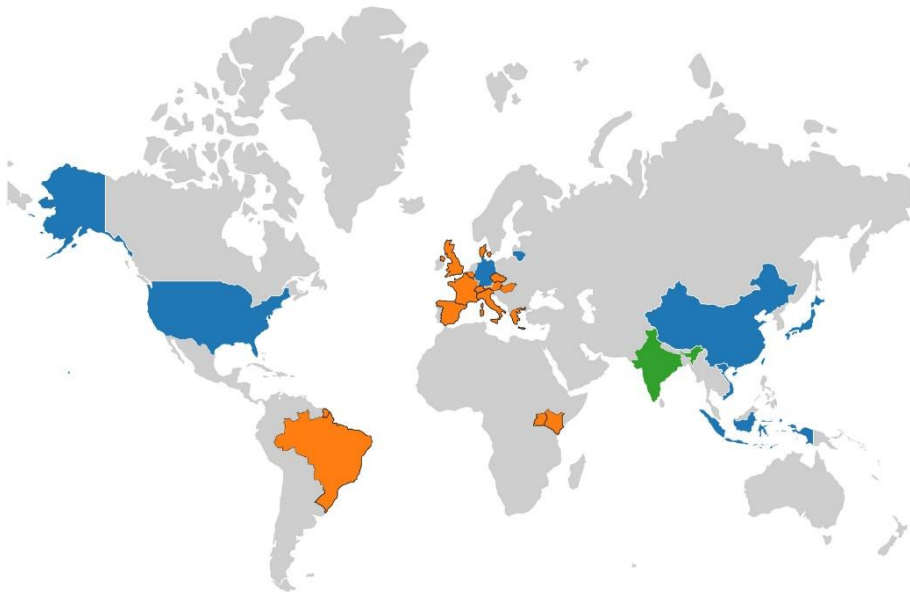
sąlyginai nedideliu skaičiumi gyvulių yra padidintoje HEV infekcijų rizikoje (Di Bartolo et al., 2008, Li et al., 2009b, Jinshan et al., 2010, Hinjoy et al., 2013). Taip pat yra parodyta, kad HEV specifiškai antikūnai dažniau nustatomi ekologiškuose ūkiuose negu įprastiniuose (Rutjes et al., 2014). Keletas padidintos rizikos ūkininkavimo praktikų taip pat yra apibūdinta. Pagrindinės praktikos yra vėlyvas atjunkymas, gyvulių maišymasis nuo gimimo augimo metu ir prasta higiena (Walachowski et al., 2014). Biosaugos reikalavimai, pavyzdžiui, nusiprausimas duše prieš patenkant į auginimo patalpas, identifikuoti kaip apsaugantys nuo HEV infekcijų veiksniai (Wilhelm et al., 2016). Taigi, yra nustatyta keletas veiksnių, kuriuos būtų galima keisti arba pritaikyti ūkininkavimo praktikoje siekiant išvengi HEV infekcijų.

Europoje šernai yra įvardijami kaip potencialus HEV rezervuaras (Jori et al., 2016, Thiry et al., 2017a). Be to, keli eksperimentiniai tyrimai nustatė, kad HEV kamienai iš šernų gali infekuoti kiaules (Wilhelm et al., 2016, Thiry et al., 2017a, Thiry et al., 2017b). Čekijoje 8,5 % tirtų šernų nustatyti antikūnai prieš HEV (Boxman et al., 2019). Vokietijoje 11,5 % tirtų šernų nustatyti antikūnai prieš HEV, o 3,85 % HEV RNR (Weigand et al., 2018). Kitas tyrimas vieno medžioklės sezono metu surinktuose mėginiuose nustatė 27,08 % tirtų šernų antikūnus prieš HEV, o 6,31 % HEV RNR. Kito medžioklės sezono metu antikūnų prieš HEV ir HEV RNR nustatymo dažnis išaugo atitinkamai 51,52 % ir 24,09 % (Weigand et al., 2018). Italijoje HEV RNR nustatyta 13,7 % tirtų šernų mėginių (Aprèa et al., 2018), 52,2 % (De Sabato et al., 2018), 16,3 % (Di Pasquale et al., 2019), o antikūnai prieš HEV – 49,73 % (Bertelloni et al., 2020). Lenkijoje atsižvelgiant į HEV RNR ir antikūnų prieš HEV nustatymo dažnį, vertinama, kad paplitimas yra 36,8 % (Dorn-In et al., 2017). Portugalijoje 14 % tirtų šernų nustatyti antikūnai prieš HEV (Gonçalves et al., 2018). Rumunijoje aprašytas 18 % HEV RNR nustatymo dažnis (Porea et al., 2018). Ispanijoje HEV RNR nustatyta 6,8 %, o antikūnai prieš HEV 5,2 % tirtų šernų (Risalde et al., 2017), kitame tyrime HEV RNR nustatyta 23,2 % šernų (Rivero-Juarez et al., 2018), dar kituose tyrimuose antikūnai prieš HEV nustatyti 57,6 % (Caballero-Gómez et al., 2019) ir 59 % (Wang et al., 2019) mėginių. Švedijoje vieno tyrimo metu nustatytas 15 % HEV infekcijų paplitimas šernų populiacijoje (Roth et al., 2016). Taigi aktyvių HEV infekcijų dažnis Europos šernuose yra nuo 3,85 iki 52,2 %, o nuo 8,5 iki 59 % šernų yra susidūrę su HEV infekcija. Tai rodo, kad HEV infekcijos yra paplitusios Europos šernų populiacijose.

Kiaulių kepenų ir mėsos produktai yra tiriami dėl HEV užkrato. Keletas mokslininkų grupių ištyrė parduodamus produktus, pavyzdžiui, šviežias

kepenis, dešreles, *figatellu* (Korsikoje gaminama kepeninė dešra), paštetą. Vokietijoje 4–10 % tirtų šviežių kepenų buvo nustatyta HEV RNR (Wenzel et al., 2011, Pallerla et al., 2020). Tiriant įvairias kiaulienos dešras Jungtinėje Karalystėje 10 % ištirtų produktų nustatyta HEV RNR (Berto et al., 2012), Ispanijoje – 6 %, Čekijoje ir Italijoje – 0 % (Di Bartolo et al., 2012). Prancūzijoje HEV RNR kiaulienos produktuose nustatomi gerokai dažniau. Vienas tyrimas virusą nustatė 58 % *figatellu* (Colson et al., 2010), kitas – 30 % (Pavio et al., 2014). Taip pat buvo nustatyta, kad 29 % kepeninių dešrų turi HEV RNR, o vyntų ir sūdytų kepenų – 3 % (Pavio et al., 2014). Nyderlanduose atliktas maisto produktų tyrimas nustatė, kad 12,7 % kiaulių kepenų, 70,7 % kepeninių dešrų, 68,9 % paštetų yra užkrėsti HEV. Tas pats tyrimas HEV RNR nenustatė kiaulienos pjausniuose, šviežiuose kiaulienos dešrelėse ir šernienoje (Boxman et al., 2019). Taigi termiškai neapdorotos ar blogai termiškai apdorotos mėsos vartojimas yra potenciali rizika visuomenės sveikatai, nes šiuose produktuose yra nustatomas HEV užkratas.

Orthohepevirus C priskiriamų žiurkių HEV paplitimas yra tiriamas serologiniais ir molekuliniais metodais. Šiuo metu virusai yra nustatyti įvairiose šalyse ir žemynuose (1.12 pav.) (Wang et al., 2020). Serologiniai



1.12 pav. *Orthohepevirus C* paplitimo žemėlapis (pagal Wang et al., 2020). Mėlynai pažymėtose šalyse nustatyti antikūnai prieš HEV-C ir viruso RNR; žaliai – tik antikūnai; oranžinė – tik RNR.

antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymo tyrimai pilkosiose žiurkėse (*Rattus norvegicus*) atlikti JAV nustatė, kad antikūnai aptikti 76,9 % mėginių, surinktų 1986-1997 m., 68,5 % – 1994-1998 m. ir 73,5 % – 2005-2006 m. (Kabrane-Lazizi et al., 1999, Favorov et al., 2000, Easterbrook et al., 2007). Tai yra gerokai daugiau negu kitose šalyse. Japonijoje 2000-2002 m. sugautose pilkosiose žiurkėse antikūnai nustatyti 31,5 % atvejų, o kitame tyrime nustatyta 28,6 % (Hirano et al., 2003, Kanai et al., 2012). Vokietijoje antikūnai nustatyti 24,5 % atvejų 2007-2010 m. (Johne et al., 2012). Panašus antikūnų nustatymo dažnis stebėtas ir Kinijoje – 27,8 % 2011-2012 m. (Li et al., 2013c). Vietname du atskiri tyrimai 2011 m. nustatė antikūnus 20,3 % ir 22,3 % pilkųjų žiurkių mėginių, o tyrimas 2012-2013 m. aprašė 12,3 % antikūnų nustatymo dažnį (Li et al., 2011, Koma et al., 2013, Obana et al., 2017). Juodųjų žiurkių (*Rattus rattus*) mėginiuose antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymo dažnis varijuoja labiau negu pilkųjų žiurkių. JAV antikūnai nustatyti 90,2 % mėginių 1986-1997 m., o 1994-1998 m. tik 38,3 % (Kabrane-Lazizi et al., 1999, Favorov et al., 2000). Indonezijoje atliktų tyrimų metu aptikta 18,1 % teigiamų mėginių 2011-2012 m., 37,1 % – 2012 m. ir 4,1 % – 2014-2016 m. (Mulyanto et al., 2013, Mulyanto et al., 2014, Primadharsini et al., 2018). Japonijoje nustatyta 13,3 % teigiamų mėginių 2000-2002 m. (Hirano et al., 2003). Lietuvoje atlikti serologiniai tyrimai antikūnus prieš žiurkių HEV nustatė 31,2 % tirtų mėginių (Simanavicius et al., 2018a). Šis tyrimas plačiau aptariamas 3.3 skyriuje. Kitose žiurkių rūšyse antikūnų prieš HEV nustatymo dažnis taip pat įvairus. Vietname atlikti *Rattus tanezumi* mėginių tyrimai atskleidė 25 % ir 33,3 % nustatymo dažnius 2011 m. ir 19,6 % 2012-2013 m. (Li et al., 2011, Koma et al., 2013, Obana et al., 2017). Plataus masto laukinių žiurkių mėginių tyrimas Kinijoje 2011-2012 m., pademonstravo, kad įvairiose rūšyse dažnis varijuoja nuo 11,8 % iki 23 % (Li et al., 2013c). Skirtingi antikūnų prieš HEV nustatymo dažniai žiurkėse greičiausiai yra dėl skirtingų serologinių testų naudotų tyrimams. Vieni tyrimai naudojo komercinius antikūnų prieš HEV nustatymo IFA testus, kuriuose naudojami žmogaus HEV antigenai, kiti – tyrimo autorių laboratorijose sukurtus imunocheminius testus, panaudojant sutrumpintus arba pilno ilgio žmogaus ir žiurkių HEV kapsidės baltymus. Be to, manoma, kad HEV yra vieno serotipo. Tai reiškia, kad serologiniai testai gali parodyti kryžmines reakcijas tarp antikūnų susidariusių prieš skirtingus HEV kamienus ir naudojamo antigeno serologiniame teste.

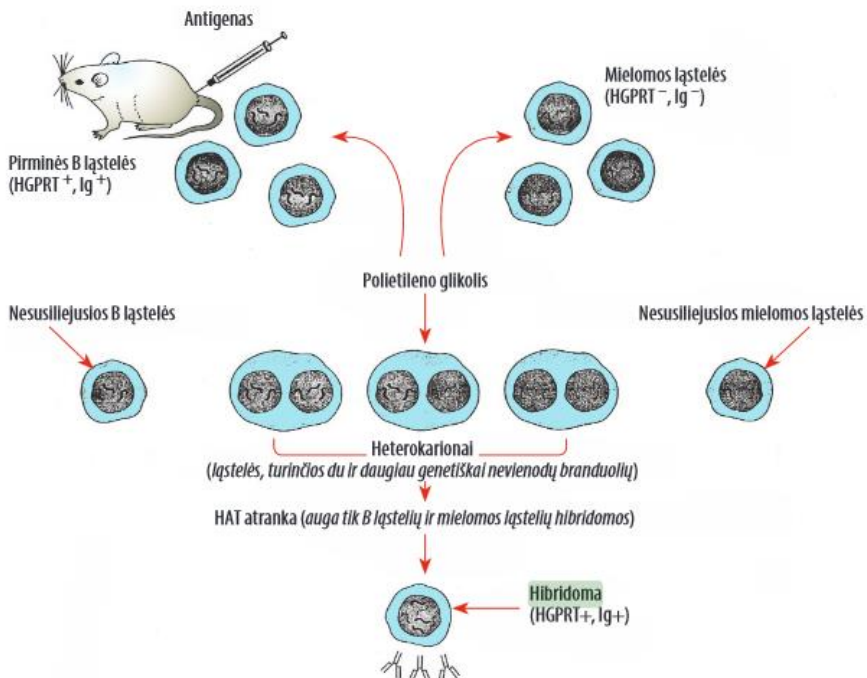
Molekulinės biologijos metodai taip pat yra naudojami tiriant HEV genomą. Žiurkių HEV RNR nustatymui yra naudojami AT-PGR metodai,

Sangerio sekoskaita ir metagenominė analizė su naujos kartos sekoskaita. RNR tyrimams yra gryninama iš įvairių gyvūnų rūšių kepenų, išmatų ir kraujo mėginių. Pirmosios žiurkių HEV sekos buvo nustatytos pilkosiose žiurkėse (Johns et al., 2010a, Johns et al., 2010b). Vėliau viruso genominės sekos identifikuotos JAV, Kinijoje, Vokietijoje, Prancūzijoje, Danijoje, Anglijoje, Vengrijoje, Austrijoje, Šveicarijoje, Italijoje, Ispanijoje, Graikijoje, Belgijoje, Čekijoje ir Vietname (Li et al., 2011, Purcell et al., 2011, Lack et al., 2012, Vollmer et al., 2012, Wolf et al., 2013, Li et al., 2013c, Widén et al., 2014, Ayrál et al., 2015, Wang et al., 2017, Ryll et al., 2017, Spahr et al., 2017, Wu et al., 2018, He et al., 2018, Murphy et al., 2019). Juodosiose žiurkėse žiurkių HEV RNR nustatyta Indonezijoje, Kinijoje, Kenijoje ir 12 Europos šalių (Mulyanto et al., 2013, Ryll et al., 2017, Primadharsini et al., 2018, Onyok et al., 2019, De Sabato et al., 2020). Lietuvoje atlikti molekuliniai tyrimai HEV RNR nustatė 8,3 % tirtų mėginių (Simanavicius et al., 2018a). Plačiau šie tyrimai aptariami 3.3 skyriuje. *Rattus tanezumi* žiurkėse HEV RNR nustatyta Vietname ir Kinijoje (Li et al., 2011, Li et al., 2013b, Wu et al., 2018, He et al., 2018). Kinijoje taip pat nustatyta ir kitose žiurkių rūšyse (Li et al., 2013c, Wang et al., 2017, He et al., 2018). *Orthohepevirus C* giminingų HEV variantų RNR nustatyta taip pat kitose graužikų rūšyse Kinijoje, Vengrijoje, Vokietijoje ir Brazilijoje (Wang et al., 2018b, de Souza et al., 2018, Wu et al., 2018, Kurucz et al., 2019, Ryll et al., 2019). Be to, *Orthohepevirus C* giminingi virusų variantai nustatyti kitose žinduolių rūšyse. Kinijoje ir Kenijoje HEV variantai nustatyti kirstukuose (Guan et al., 2013, Wang et al., 2018b, He et al., 2018, Onyok et al., 2019). Įdomiausi atvejai nustatyti Europoje. Vokietijoje zoologijos sode žiurkių HEV RNR nustatyta Sirinio rudojo lokio (*Ursus arctos syriacus*) mėginyje (Spahr et al., 2017). Spėjama, kad tai žiurkių HEV atsitiktinis peršokimas iš pilkųjų žiurkių, kurios laisvai migruoja. Nyderlanduose 2012 m. nustatytas *Orthohepevirus C* priskiriamas HEV variantas infekavęs šeškus (Raj et al., 2012). Vėliau tokie HEV variantai nustatyti šeškuose JAV, Japonijoje ir Kinijoje ir audinėse Danijoje ir Kinijoje (Krog et al., 2013, Li et al., 2014, Wang et al., 2018c). Taigi žiurkių HEV ir giminingi virusai yra nustatomi įvairiuose žinduolių rūšyse, dažniausiai žiurkėse, kituose graužikuose. Pasitaiko ir laikini viruso peršokimai į didesnius žinduolius, pavyzdžiui, rudojo lokio infekcijos atvejais ar devyni žmogaus infekcijos atvejais (Sridhar et al., 2018, Andonov et al., 2019, Sridhar et al., 2020). Deja, tokių infekcijų šaltiniai ir plitimo kelias nėra išaiškintas.

1.11 Monokloniniai antikūnai

MAk yra puikus įrankis virusų tyrimams. Jais galima specifiskai identifikuoti viruso kapsidės ar replikacijos procese dalyvaujančius baltymus (Kumar et al., 2020). MAk taip yra pritaikomi serologinėse virusų nustatymo sistemose. Vienas iš metodų yra IgM klasės antikūnų prieš virusą IFA nustatymo sistemos (Samuel et al., 2003). Kita taikymo sritis yra viruso antigenų nustatymas dviepitope IFA (Zhang et al., 2006).

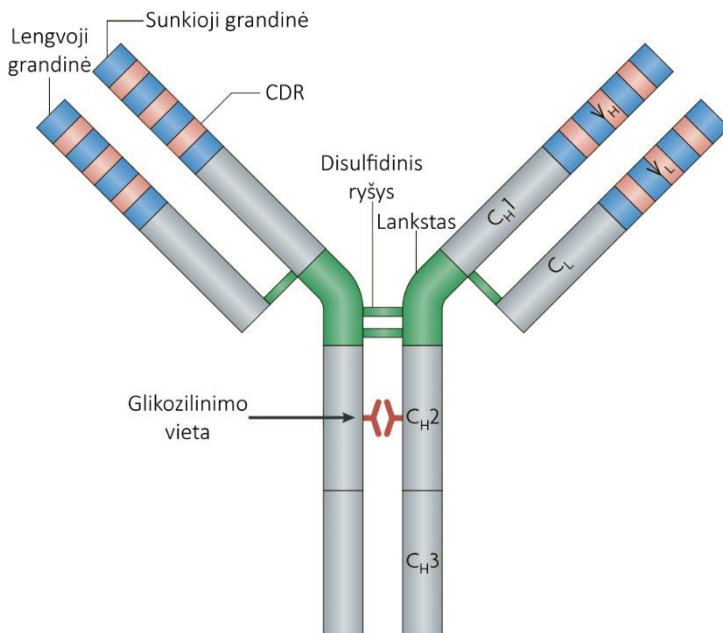
Populiariausias būdas sukurti MAk yra hibridomų technologija (Köhler ir Milstein, 1975). Hibridomos – tai hibridinės ląstelės, kurios susidaro suliejant mielomos ir blužnies ląsteles. Dažniausiai yra naudojama pelės blužnis, kuri suliejama su pelės mielomos ląstelių linija. Blužnyje yra daug B ląstelių, kurios sintetina antikūnus prieš antigenus, su kuriais būna susidūręs gyvūnas. Siekiant sukurti antikūnus prieš konkretų antigeną, juo yra imunizuojamas gyvūnas, dažniausiai kelis kartus, kol susiformuoja antrinis imuninis atsakas, kurio metu dominuoja IgG klasės antikūnai ir pasiekiamas aukštas antikūnų titras kraujyje. Mielomos ląstelių linija yra imortalizuota ląstelių linija, kuri



1.13 pav. Hibridomų technologijos schema (Tamošiūnas et al., 2012).

neturi imunoglobulinų (Ig) ir hipoksantinguaninfosforiboziltransferazės (HGPRT) ar timidinkinazės (TK) genų (Shulman et al., 1978). Pirmasis hibridomų technologijos etapas yra iš imunizuoto gyvūno išskirtų blužnies ląstelių ir mielomos suliejimas (1.13 pav.). Pavyzdžiui, polietilenglikolis (PEG) išretina ląstelių membranas ir dėl to jos gali susilieti į hibridus. Šio procesu metu susidaro keletas skirtingų hibridinių ląstelių. Gali susiformuoti blužnies ir blužnies, mielomos ir mielomos bei blužnies ir mielomos ląstelių hibridai. Taigi antrasis etapas yra blužnies ir mielomos ląstelių hibridų, vadinamų hibridomomis, atranka. Ji yra vykdoma ląstelių augimo terpėje įpilant hipoksantino, aminopterino ir timidino (HAT). Aminopterinas blokuoja purinų sintezės *de novo* kelią, tačiau terpėje esant hipoksantino ir timidino, nukleotidai yra sintetinami alternatyviuoju keliu. Taigi mielomos ir mielomos ląstelių hibridai, kurie yra imortalizuoti, žūsta, nes negamina fermentų, kurie vykdo nukleotidų sintezę alternatyviuoju keliu. Blužnies ir mielomos ląstelių hibridai išgyvena, nes mielomos ląstelių fermentų trūkumas yra kompensuojamas genais iš blužnies ląstelių. HAT terpėje blužnies ir blužnies ląstelių hibridai yra pirminė kultūra, kuri žūsta per 7–10 dienų. Trečiame etape yra vykdoma išgyvenusių hibridomų selekcija pagal jų sintetinamus antikūnus. Hibridomos antikūnus sekretuoja į augimo terpę, todėl selekcija yra atliekama imunocheminiais metodais panaudojant augimo terpę kaip antikūnų šaltinį. Dažniausiai selekcija yra vykdoma netiesioginė IFA metodu dėl galimybės patikrinti daug mėginių vienu metu, tačiau gali būti atliekama ir kitais metodais, pavyzdžiui, imunoblotingu. IFA metodu yra tikrinama, ar hibridomų augimo terpėje yra antikūnų, kurie specifiskai atpažįsta antigeną, imobilizuojamą mikrotesto plokštelių šulinėlių dugne. Hibridomos, kurių augimo terpėje yra nustatomi specifiški antikūnai, yra stabilizuojamos klonuojant. Klonavimas yra atliekamas ląsteles persėjant tokiu tankiu, kad audinių kultūrų plokštelės šulinėliuose hibridomų klonai išaugtų iš vienos ląstelės. Tokių klonų gaminami antikūnai yra vadinami MAk.

MAk struktūra yra sudaryta iš dviejų lengvųjų ir dviejų sunkiųjų grandinių (1.14 pav.). Sunkiąją grandinę sudaro 3 pastoviosios dalies domenai (C_{H1-3}) ir vienas kaičiosios dalies domenai (V_H). Lengvąją grandinę sudaro po vieną pastoviosios dalies (C_L) ir kaičiosios dalies (V_L) domeną. Abejų grandinių



1.14 pav. Antikūno struktūros schema (pagal Beck et al., 2010). C_H1-3 – sunkiosios grandinės pastoviosios dalies domenai; C_L – lengvosios grandinės pastoviosios dalies domenai; V_H – sunkiosios grandinės kaičiosios dalies domenai; V_L – lengvosios grandinės kaičiosios dalies domenai; CDR – komplementarumą nulemianti sritis (angl. *complementary determining region*).

kaičiosiose dalyse yra po tris komplementarumą nulemiančias sritis (CDR, angl. *complementary determining region*), kurios nulemia antikūno specifiškumą antigenui ir sąveikos stiprumą. Sunkiąsias ir lengvąsias baltymo grandines jungia disulfidiniai ryšiai. Antikūno molekulės taip pat yra glikozilintos.

1.12 Literatūros apžvalgos apibendrinimas

Hepatitis E yra infekcinė liga, kurią sukelia hepatito E virusas (HEV). HEV-1 ir HEV-2 infekuoją tik žmones, o HEV-3 ir HEV-4 – žmones ir kitus žinduolius, pavyzdžiui, kiaules, šernus, elnius, triušius. Ekonomiškai silpnai išsivysčiusioms šalims būdingos HEV-1 ir HEV-2 infekcijos, kurios plinta per užterštą vandenį. Šių HEV genotipų infekcijos nustatomos ir Europoje, tačiau jos siejamos su kelionėmis. HEV-3 yra zoonotinis virusas, jis būdingas ekonomiškai išsivysčiusioms šalims. HEV-3 infekuoją žmones ir kiaules, šernus, elnius. Šio viruso infekcijos pagrindinis šaltinis yra blogai termiškai

apdoroti mėsos produktai. HEV infekcijos pavojingiausios pacientams su nusilpusia imunine sistema, pavyzdžiui, transplantuotų organų recipientams. HEV infekcijos pavojingesnės ne tik kepenų transplantatų recipientams. Lėtinėmis inkstų ligomis sergantys ar inkstų recipientai yra padidintoje HEV infekcijų rizikoje. Taigi yra labai aktualu reguliariai atlikti HEV paplitimo rizikos grupėse vertinimą. Neseniai buvo nustatytas žiurkių HEV kaip naujas hepatito E sukėlėjas žmonėse. Taigi žiurkių HEV tyrimų aktualumas išaugo, kadangi tai yra taip pat potenciali grėsmė žmogaus sveikatai.

HEV infekcijos ir jų paplitimo tyrimai atliekami molekuliniiais ir serologiniais metodais. Molekuliniai tyrimai remiasi atvirkštinės transkripcijos PGR metodais, kurie yra pritaikyti įvairiems HEV genotipams. Serologiniai tyrimai atliekami naudojant įvairių gamintojų nustatymo sistemas, kurių rezultatai tiriant tuos pačius mėginius skiriasi, todėl yra poreikis kurti naujus įrankius ir sistemas HEV infekcijos diagnostikai ir tyrimams. Serologinių testų žiurkių HEV infekcijų nustatymui nėra, o jų poreikis turėtų išaugti.

HEV paplitimo tyrimai Lietuvoje iki šiol yra riboti. Mokslininkai iš Lietuvos sveikatos mokslų universiteto yra atlikę HEV infekcijos paplitimo vertinimą kiaulių, šernų ir kitų laukinių kanopinių gyvūnų populiacijose (Spancerniene et al., 2018). Gauti rezultatai parodė, kad HEV infekcija yra dažna šių gyvūnų populiacijose Lietuvoje. Papildantys HEV paplitimo kiaulių populiacijoje tyrimai yra aktualūs, nes pagrindinis HEV infekcijų šaltinis žmonėse yra maistas. HEV paplitimo žmonėse ir laukinėse žiurkėse tyrimai nėra atlikti.

Rekombinantiniai HEV kapsidės baltymai formuojantys virusą primenančias daleles yra potencialus įrankis serologinių testų kūrimui. Tokie baltymai atkartoja natūralaus viruso kapsidės struktūrą. Taip pat šie baltymai gali būti naudojami monokloninių antikūnų (MAK) kūrimui. MAK yra HEV tyrimams tinkami įrankiai. Juos galima panaudoti tiesioginiam viruso nustatymui infekuotuose audiniuose bei HEV antigeno nustatymui biologiniuose mėginiuose. Iki šiol aprašyti MAK prieš HEV-3 jungėsi tik prie vieno kapsidės baltymo domeno, todėl norint modeliuoti potencialiai plačiau pritaikomas HEV tyrimo metodikas yra detalai apibūdintų MAK, prisijungiančių prie įvairių kapsidės baltymo vietų, poreikis.

Šios disertacijos tikslas yra sukurti įrankius HEV infekcijų nustatymui ir juos panaudoti HEV paplitimo tyrimams Lietuvoje. Šiam tikslui pasiekti suformuoti uždaviniai:

1. Sukurti ir apibūdinti monokloninius antikūnus prieš mielėse susintetintus HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus bei įvertinti šių baltymų imunogeniškumą ir antigeniškumą.
2. Sukurti serologinius metodus žiurkių HEV specifiskų IgG ir IgM antikūnų nustatymui ir panaudojant juos bei molekulinis metodus ištirti HEV paplitimą laukinėse žiurkėse.
3. Serologiniais metodais ištirti HEV infekcijų paplitimą kiaulių ir žmonių mėginiuose ir įvertinti rekombinantinių HEV kapsidės baltymų tinkamumą serologiniams kiaulių ir žmonių mėginių tyrimams.
4. Įvertinti sukurtųjų monokloninių antikūnų tinkamumą HEV kapsidės baltymo nustatymui žiurkių, kiaulių ir žmonių mėginiuose.

2. MEDŽIAGOS IR METODAI

2.1 Medžiagos

2.1.1 Reagentai

Darbai su hibridomomis: L–glutaminas (Sigma-Aldrich), gentamicino sulfatas (Roth), fetalinis veršiuko serumas (FBS, angl. *fetal bovine serum*) (Biochrom), 50× HAT, 50× HT, PEG/DMSO (Sigma-Aldrich), DMSO (Roth).

Darbai su antikūnais: krienų peroksidazė (HRP) (Merck), sorbentas „rProtein A Sepharose Fast Flow“ ir kolonėlė „HiTrap Protein A HP 1 ml“ (GE Healthcare), „Sephadex G-25“ kolonėlė „PD-10“ (GE Healthcare), Alexa Fluor 555 NHS esteris (Invitrogen).

Imunocheminiams metodams: pelės MAk prieš heksahistidinių žymę (Thermo Fisher Scientific), „NeA-Blue Tetramethylbenzidine substrate“ tetrametilbenzidino (TMB) tirpalas skirtas IFA „ (Clinical Science Products), „1-Step Ultra TMB-Blotting Solution“ TMB skirtas imunoblotingui (Thermo Scientific), mikroskopijai naudota dengiamoji terpė „ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI“ (Invitrogen).

Baltymų natrio dodecilsulfato polikarilamidinio gelio elektroforezei (SDS–PAGE) denatūruojančiomis sąlygomis: baltymų mėginio paruošimo tirpalas „5× Reducing Sample Buffer“ (Thermo Scientific), gelio dažas „PageBlue Protein Staining Solution“ (Thermo Fisher Scientific).

PGR: „Maxima Hot Start Green PCR Master Mix“, „Maxima Probe qPCR Master Mix“, „DreamTaq“ DNR polimerazė, „dNTP 2 mM“ (Thermo Fisher Scientific).

RNR apsaugai „Ribolock RNase Inhibitor“ (Thermo Fisher Scientific).

Audinių saugojimo tirpalas „RNAlater“ (Qiagen).

Restrikcijos endonukleazės: *SapI*, „FastDigest“ *XbaI*, *BamHI*, *NheI*, *NdeI* (Thermo Fisher Scientific).

Kiti fermentai: T4 DNR ligazė, „FastAP“ šarminė fosfatazė, Proteinazė K, DNazė „dsDNase“ (Thermo Fisher Scientific).

Nukleorūgščių elektroforezei: ilgio standartai „GeneRuler 50 bp DNA Ladder Plus“, „O‘GeneRuler 100 bp DNA Ladder“, „O‘GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder“, „GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder“, „RiboRuler High Range RNA Ladder“ (Thermo Fisher Scientific) ir dažai „6× DNA Loading Dye“, „2× RNA Loading Dye“ (Thermo Fisher Scientific), 50× TAE buferinis

tirpalas (Thermo Fisher Scientific), agarozė (Thermo Fisher Scientific), etidžio bromido tirpalas (10 mg/ml), NaOH (Roth).

Nukleorūgščių išsodinimui: chloroformas, fenolio/chloroformo/izoamiloalkoholio mišinys (25:24:1) „Roti-P/C/I“ pH 7,5–8, fenolio/chloroformo/izoamiloalkoholio mišinys (25:24:1) „Roti-Aqua-P/C/I“ pH 4,5–5 (Roth), Natrio acetatinis buferinis tirpalas 3 M , pH 5,2 (Thermo Fisher Scientific).

Sterilus vanduo be nukleazijų (Thermo Fisher Scientific).

Antibiotikai: ampicilinas (AppliChem), kanamicinas (Sigma-Aldrich).

Izopropil-β-tiogalaktopiranozidas (IPTG) (Thermo Fisher Scientific).

2.1.2 Tirpalai ir terpės

Darbui su hibridomomis: DMEM terpė (Biochrom, HyClone arba Cegrogen Biotech), seruminė terpė (DMEM su 15 % inaktyvuoto FBS, 2 mM L-glutamino ir 200 µg/ml gentamicino), neseruminė terpė (DMEM su 2 mM L-glutamino ir 200 µg/ml gentamicino), šaldymo terpė (90 % FBS ir 10 % DMSO).

Darbui su antikūnais: fosfatinis buferinis tirpalas (PBS, 137 mM NaCl (Roth), 8,1 mM Na₂HPO₄ (Roth), 2,7 mM KCl (Roth), 1,5 mM KH₂PO₄ (Roth), pH 7,4), PBST (PBS su 0,1 % Tween-20(Roth)), Sotus (NH₄)₂SO₄ (Roth) tirpalas.

Antikūnų gryninimui: Glicino užnešimo tirpalas (1,5 M Glicino (Roth), 3 M NaCl, pH 8,9), Tris užnešimo tirpalas (0,1 mM Tris (Roth), pH 8), Eliucijos tirpalas (100 mM glicino, pH 3).

Antikūnų žymėjimui: Natrio karbonatinis buferinis tirpalas (0,2 M NaHCO₃ (Roth), 0,2 M Na₂CO₃ (Roth), pH 9,5), 4 mg/ml NaBH₄ (Sigma-Aldrich) tirpalas, 0,2 M NaIO₄ tirpalas, 1 mM Natrio acetatinis (Roth) buferinis tirpalas (pH 4,5), 0,1 M NaHCO₃ (Roth) pH 8,3 tirpalas, 10 % NaN₃ (Sigma-Aldrich) tirpalas, 1,5 M hidroksilamino (Sigma-Aldrich) pH 8,5 tirpalas.

Darbui su imunocheminiais metodais: IFA naudotas imobilizacijos buferinis tirpalas (0,05 M NaHCO₃ (Roth) pH 9,5), blokavimui naudotas 10× „RotiBlock“ (Roth), 3,6 % H₂SO₄ (Roth) tirpalas, imunoblotinge naudotas baltymų pernešimo buferinis tirpalas (25 mM Tris (Roth), 150 mM glicino (Roth)), blokavimo tirpalas (PBS su 2 % pieno miltelių (Roth)).

SDS-PAGE: 30 % akrilamido tirpalas (30 % akrilamidas (Sigma) ir 0,8 % N,N'-metilenbisakrilamidas (Sigma)), 10 % natrio dodecilsulfato tirpalas

(SDS, angl. *sodium dodecylsulphate*, Roth), 10 % amonio perokso sulfato (APS, Fluka) tirpalas, baltymų elektroforezės buferinis tirpalas (10×, 247 mM Tris, 1,92 M glicino, 35 mM SDS, pH 8,3-8,6), 12 % skiriamąjo gelio tirpalas (2 geliams: 4 ml 30 % akrilamido tirpalo, 2,5 ml 1,5 M Tris-HCl pH 8,8, 0,1 ml 10 % SDS, 0,05 ml 10 % APS, 0,005 ml N, N, N', N'-tetrametiletano-1,2-diamino (TEMED, Sigma-Aldrich) ir vanduo iki 9,8 ml tūrio), 4 % koncentruojamasis gelis (1 geliui: 0,67 ml 30 % akrilamido tirpalo, 1,25 ml 0,5 M Tris-HCl pH 6,8, 0,05 ml 10 % SDS, 0,025 ml 10 % APS, 0,005 ml TEMED ir vanduo iki 5 ml tūrio).

Bakterijų transformacijos CaCl₂ metodu tirpalai:

NaCl tirpalas: 5 mM Tris-HCl (pH 8,0) (Roth), 5 mM MgCl₂ (Roth), 100 mM NaCl (Roth).

CaCl₂ tirpalas: 5 mM Tris-HCl (pH 8,0), 5 mM MgCl₂, 100 mM CaCl₂ (Roth).

Bakterijų augimo terpės: Agarizuota LB (3,5 % tirpalas) ir LB (2 % tirpalas) (Sigma-Aldrich).

Bakterijų lizatų paruošimo tirpalai: PBS su 2 % SDS (Roth), 6 M šlapalo tirpalas (Urea, Roth).

2.1.3 Antriniai antikūnai

Ožkos polikloniniai antikūnai (PAK) prieš pelės IgG sunkiąją ir lengvąją grandines (H+L) žymėti HRP (Bio-Rad)

Ožkos PAK prieš pelės IgG žymėti Alexa Fluor 488 Plus (Invitrogen)

Ožkos PAK prieš žiurkių IgM žymėti HRP (Invitrogen)

Ožkos PAK prieš žiurkių IgG žymėti HRP (Invitrogen)

Triušio PAK prieš kiaulių IgG F(ab')₂ žymėti HRP (LSBio)

Pelės MAk prieš žmogaus IgG Fc žymėti HRP (SouthernBiotech)

2.1.4 Rinkiniai

2.1.4.1 Rinkiniai naudoti molekulinės biologijos ir genų inžinerijos metodams

DNR gryninimui: „GeneJET PCR Purification Kit“, „GeneJET Gel Extraction Kit“, „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ (Thermo Fisher Scientific).

RNR gryninimui: „GeneJET RNA Purification Kit“ (Thermo Fisher Scientific), „RNeasy Plus Mini Kit“ (Qiagen).

Klonavimui: „CloneJET PCR Cloning Kit“.

In vitro transkripcijos: „Transcript AID T7 High Yield Transcription Kit“ (Thermo Fisher Scientific).

Atvirkštinės transkripcijos: „RevertAid RT Kit“ (Thermo Fisher Scientific).

2.1.4.2 Rinkiniai naudoti antikūnų apibūdinimui ir serologinei analizei

Pelės antikūnų klasės ir poklasio nustatymo rinkinys „Mouse Immunoglobulin Isotyping ELISA Kit“ (BD Biosciences).

Kiaulių kraujo serumo mėginiai tirti „HEV-Ab EIA“ (Axiom Diagnostic).

Žmonių kraujo serumo mėginiai tirti „HEV-IgM ELISA“ ir „HEV-IgG ELISA“ (Beijing Wantai Biological Pharmacy).

HEV antigeno nustatymui naudotas „HEV Ag Elisa Plus CE IVD“ (Beijing Wantai Biological Pharmacy).

2.1.5 Rekombinantiniai baltymai

Šiame darbe naudoti Vilniaus universiteto Gyvybės mokslų centro Biotechnologijos instituto Eukariotų ir genų inžinerijos skyriuje (VU GMC BTI EGIS) mielėse susintetinti rekombinantiniai pilno ilgio HEV-3 (1-660 aminorūgštys), sutrumpintas HEV-3 (112-608 aminorūgštys), pilno ilgio žiurkių HEV (1-645 aminorūgštys) ir sutrumpintas žiurkių HEV (112-608 aminorūgštys) kapsidės baltymai, taip pat žmonių parvoviruso 4 (PARV4) kapsidės baltymas. HEV kapsidės baltymų apibūdinimo eksperimentai atlikti dr. Pauliaus Luko Tamošiūno (VU GMC BTI EGIS), medžiagos ir metodai aprašyti publikacijoje Simanavicius et al., 2018.

2.1.6 Eksperimentiniai gyvūnai

Hibridomų kūrimui buvo panaudotos BALB/c linijos pelės. Visi eksperimentai su laboratoriniais gyvūnais atlikti VMTI Inovatyvios medicinos centre (Vilnius) pagal Lietuvos ir Europos teisės aktus. Valstybinės maisto ir veterinarijos tarnybos leidimo laboratorinių pelių veisimui nr. 184, leidimo polikloninių ir monokloninių antikūnų kūrimui nr. 209 (licencijos nr. LT 59–902). Eksperimentus atliko VU GMC BTI ILBS darbuotojai (dokt. Martynas Simanavičius ir dr. Indrė Kučinskaitė-Kodžė), turintys pažymėjimus, suteikiančius teisę darbui su laboratoriniais gyvūnais.

Žiurkių polikloninių antikūnų prieš HEV kapsidės baltymus kūrimui buvo panaudotos Wistar žiurkės. Eksperimentai atlikti VU GMC Biochemijos

instituto Biologinių modelių skyriaus vivariume (Vilnius). Eksperimentus atliko vivariumo darbuotojai. Žiurkės (n=3) imunizuotos 1 kartą 100 µg žiurkių HEV kapsidės baltymo doze. Kraujo mėginiai surinkti prieš imunizaciją, praėjus 8 ir 13 dienų po imunizacijos. Gyvūnai paaukoti ir kraujas polikloninių antikūnų išsodinimui amonio sulfatu surinktas praėjus 14 dienų po imunizacijos.

2.1.7 Ląstelių linijos

Hibridomų kūrimui naudota pelės mielomos Sp2/0 ląstelių linija. Šios ląstelės panaudotos suliejimui su pelės blužnies ląstelėmis. Ląstelės augintos DMEM terpėje su 9 % FBS, 1,9 mM L-glutamino ir 145 µg/ml gentamicino, 75 cm² flakonuose.

Imunofluorescencinei mikroskopijai naudotos įvairios ląstelių linijos (lentelė 2.1). A549/D3 ląstelių infekuotų HEV-3 kamienu 47832c kultivavimas (Johns et al., 2016) ir imunofluorescencinė mikroskopija atlikta dr. Reimar Johne. Ląstelės Vero ir PK-15 kultivuotos ir užkrėstos HEV-3 kamienu WB323 Lietuvos sveikatos mokslų universitete (eksperimentus atliko dokt. Juozas Grigas) (Grigas et al., 2020). Ląstelės su virusu užfiksuotos ir užkonservuotos bei transportuotos į VU GMC dažymui ir mikroskopijai. Vero ir PK-15 ląstelės augintos MEM terpėje (Gibco) su 10 % FBS, 100 U/ml penicilino ir 100 µg/ml streptomicino, 25 cm² flakonuose, o imunofluorescencinei analizei ant 10 cm² plastikinio objektyvio stikliuko su kamera ląstelių auginimui („Clipmax“, TPP).

Lentelė 2.1. HEV infekuotos ląstelių linijos imunofluorescencinei mikroskopijai.

Ląstelių linija	Kilmė	HEV infekuotų ląstelių kultivavimo vieta (mokslininkas)
A549/D3	Žmogaus plaučių karcinoma	<i>Federalinis rizikos vertinimo institutas</i> , Berlynas, Vokietija (dr. Reimar Johne)
Vero	Beždžionės inkstai	Lietuvos sveikatos mokslų universitetas Mikrobiologijos ir virusologijos institutas, Kaunas
PK-15	Kiaulės inkstai	(dakt. Juozas Grigas).

2.1.8 Bakterijų kamienai

E. coli kamienas DH10B naudotas kuriant HEV-3, žiurkių HEV ir ACTB RNR standartus, HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų persidengiančius fragmentus.

E. coli kamienas *Tuner* (DE3) naudotas HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų persidengiančių fragmentų sintezei.

2.1.9 Pradmenys

Oligonukleotidiniai pradmenys ir zondai buvo susintetinti „Metabion International AG“ (Vokietija). Pradmenys naudoti persidengiančių HEV-3 ir žiurkių HEV fragmentų genų pagausinimui pateikti lentelėje 2.2.

Lentelė 2.2. Pradmenys, skirti pagausinti HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų persidengiančių fragmentų genus.

Pradmuo	Fragmento pavadinimas	Pradmens prisijungimo vieta HEV-3 (<i>GenBank FJ705359</i>) ir žiurkių HEV (<i>GenBank GU345042</i>) genome	Pradmens seka, 5' → 3'
rat1F	F1-žiurkių HEV	6296-6315 nt (žiurkių HEV)	AGTGGATCCTTAAGACCG
rat1R		5267-5288 nt (žiurkių HEV)	CCAGTTGGTGATGGG
rat2F	F2-žiurkių HEV	6737-6757 nt (žiurkių HEV)	AGCCATATGAATACCGCG
rat2R		5843-5864 nt (žiurkių HEV)	CCTGTCCCAGATG
rat3F	F3-žiurkių HEV	6542-6562 nt (žiurkių HEV)	AGTGGATCCTTAAGCTACT
rat3R		5588-5608 nt (žiurkių HEV)	GACGCCTGCTCAGT
hevAF	F1-HEV-3	6567-6587 nt (HEV-3)	AGCCATATGAATTTGACCC
hevAR		5502-5522 nt (HEV-3)	CTGGTAACACGA
hevBF	F2-HEV-3	6783-6800 nt (HEV-3)	ATAGGATCCTTACTGCCAA
hevBR		5739-5759 nt (HEV-3)	AAACTGATCCTTGCC
hevCF	F3-HEV-3	6972-6989 nt (HEV-3)	AGACATATGAATTCCATCA
hevCR		6099-6116 nt (HEV-3)	CTTCCACCGAC

Restrikcijos endonukleazių *Bam*HI ir *Nhe*I arba *Nde*I taikiniai pabraukti.

kPGR pradmenys ir zondai, skirti žiurkių HEV detekcijai (Widén et al., 2014), HEV-1–HEV-4 nustatymui (Jothikumar et al., 2006), ir atskaitos sistemos kPGR pradmenys, kurie pagausina žiurkių β–aktino iRNR (ACTB) fragmentą, pateikti lentelėje 2.3.

Lentelė 2.3. Pradmenys ir zondai, naudoti HEV nustatymui, atliekant AT–kPGR.

kPGR taikiny	Pradmens/ zondo pavadinimas	Pradmens/zondo seka* 5' → 3'	PGR produkto ilgis, bp
Žiurkių HEV	rHEV–F	TACCCGATGCCGGGCAGT	74
	rHEV–R2	ATCYACATCWGGGACAGG	
	rHEV–P2 (zondas)	6–FAM–AATGACAGCACAG GCACCGGCGCC–BHQ–1	
HEV-1– HEV-4	HEV1–4_F	GGTGGTTTCTGGGGTGAC	70
	HEV1–4_R	GGGTTGGTTGGATGAATATAGG	
	HEV1–4_P (zondas)	6–FAM–TTGATTCTCAGCC CTTCGCC–BHQ–1	
Žiurkių β–aktinas	ACTB_F	GATCAAGATCATTGCTCCTCCT	153
	ACTB_R	CCTAGAAGCATTTGCGGTG	
	ACTB_P2 (zondas)	Joe–ACTGTCCACCTTCCAGCAG ATGTGG–BHQ–1	

*W – A ar T; Y – C ar T. 6–FAM, Joe – fluoroforai; BHQ–1, BHQ–2 – fluorescencijos slopintojai (angl. *black hole quencher*).

Lentelė 2.4. Pradmenys, naudoti RNR standartų sintezėje, su *Xba*I ir *Bam*HI restrikcijos endonukleazių atpažinimo sritimis.

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka* 5' → 3'	PGR produkto ilgis, bp
rHEV_F_XbaI	TGACGGGCCGTAGCCCATAG ATCTAAT	104
rHEV_R_BamHI	GGACAGGGTCTACACCTATC CTAGGTAT	
HEV1–4_F_XbaI	CAGTGGGGTCTTTGGTGGAG ATCTAAT	77
HEV1–4_R_BamHI	GGATATAAGTAGGTTGGTTG GGCCTAGGTAT	
ACTB_F_XbaI	GTCCTCCTCGTTACTAGAAC TAGATCTAAT	166
ACTB_R_BamHI	GTGGCGTTTACGAAGATCCT AGGTAT	

*W – A ar T; Y – C ar T.

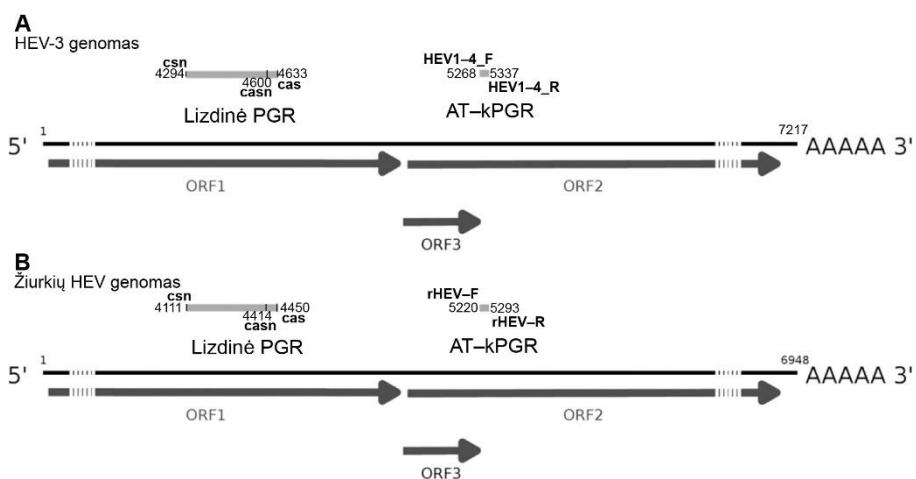
Žiurkių HEV, HEV-1–HEV-4 specifiškų ir atskaitos sistemos ACTB pradmenų sekos, turinčios *Xba*I ir *Bam*HI restrikcijos endonukleazių atpažinimo sritis, pateiktos lentelėje 2.4. Šie pradmenys naudoti minėtųjų kPGR sistemų standartų paruošime.

Lizdinės PGR išorinių ir vidinių pradmenų poros, naudotos žiurkių HEV geno fragmentų pagausinimui, pateiktos lentelėje 2.5. Pradmenys parinkti ir modifikuoti pagal publikaciją (Johne et al., 2010b).

Lentelė 2.5. Lizdinės PGR pradmenys.

Pradmens pavadinimas	Pradmens seka* 5' → 3'	PGR produkto ilgis, bp
csn	TGTGCTCTGTTTGGCCCNTGGTTYCG	365
cas	GCCATGTTCCAGACDGTRTCCA	
csn	TGTGCTCTGTTTGGCCCNTGGTTYCG	332
casn	CCAGGCTCACCRGARTGYTTCTCCA	

* D – A, G ar T; N – A, C, G ar T; R – A ar G; Y – C ar T.



2.1 pav. HEV RNR nustatymo PGR pradmenų porų ir taikinių schema. PGR pradmenų poros ir taikiniai HEV-3 (A) ir žiurkių HEV (B) genomuose.

Lentelėse 2.3 ir 2.5 pateiktų AT-kPGR ir lizdinės PGR pradmenų prisijungimo vietas ir produktai pavaizduoti 2.1 pav. Lentelėje 2.4 pateiktų RNR standartų sintezės pradmenų prisijungimo vietas yra šiek tiek toliau nuo AT-kPGR pradmenų, kadangi RNR standartų sintezėje naudotas šiek tiek platesnis genomis fragmentas negu AT-kPGR produktas.

2.1.10 Vektoriai

pJET1.2 vektorius (Thermo Fisher Scientific) naudotas HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų persidengiančių fragmentų genų klonavimui ir sekoskaitai. Šis vektorius taip pat naudotas žiurkių HEV genomo fragmentų pagausintų lizdine PGR klonavimui ir sekoskaitai.

pET28a(+) vektorius (gautas iš dr. M. Plečkaitytės, VU GMC BTI ILBS) naudotas persidengiančių HEV kapsidės baltymų fragmentų sintezei.

pTZ57R vektorius (gautas iš dr. M. Plečkaitytės) naudotas AT-kPGR sistemų standartų sintezei.

pUC19 vektorius su žiurkių HEV (*GenBank* GU345042) genomu (gautas iš dr. Rainer G. Ulrich (*Friedrich-Loeffler-Institut, Federal Research Institute for Animal Health, Institute of Novel and Emerging Infectious Diseases, Vokietija*) – naudotas kaip matrica AT–kPGR sistemos standartų sintezei bei žiurkių HEV kapsidės baltymo persidengiančių fragmentų genų pagausinimui.

pFX7 vektorius su HEV-3 (*GenBank* FJ748531) ORF2 (gautas iš dr. Rainer G. Ulrich) – naudotas kaip matrica AT–kPGR sistemos standartų sintezei bei HEV-3 kapsidės baltymo persidengiančių fragmentų genų pagausinimui.

2.2 Biologiniai mėginiai ir jų rinkimas

Laukinės žiurkės gaudytos spąstais nuo 2014 m. sausio mėn. iki 2017 m. spalio mėn. Lietuvos teritorijoje. Gyvūnus gaudė dokt. Marius Jasiulionis (Gamtos tyrimų centras, Žinduolių ekologijos laboratorija, Vilnius). Iš viso buvo sugautos 109 žiurkės, iš kurių 27 pilkosios (*R. norvegicus*) ir 82 juodosios (*R. rattus*). Žiurkės sugautos įvairiose Lietuvos vietose, įskaitant paukštininkystės ūkius ir žmonių gyvenamosiose teritorijose, kuriose yra laikomos kiaulės, vištos ir karvės. Buvo fiksuojamos tokios žiurkių charakteristikos kaip rūšis, sugavimo vieta ir data, lytis, kūno masė ir amžius (1 priedas). Žiurkių autopsijos metu krūtinės ertmės skysčio (CCF, angl. *chest cavity fluid*) ir kepenų audinio mėginiai buvo surinkti iš gyvūnų. CCF buvo surenkamas gyvūno krūtinės ertmę plaunant 4 ml PBS. Dalis CCF centrifuguota 5 min 200×g, supernatantas sumaišytas santykiu 1:1 su sočiu amonio sulfato tirpalu. Po 16 h 4 °C mišinys centrifuguotas 5 min 12000×g. Nuosėdos ištirpintos PBS ir vėl taip pat sumaišyta su amonio sulfato tirpalu. Gautame mišinyje yra polikloniniai žiurkių antikūnai. Likusi dalis CCF

užšaldyta skystame azote ir saugoma -80 °C. Kepenų audinys išpreparuotas iš gyvūno padalinamas į kelias dalis. Viena dalis užkonservuota „RNAlater“ (Qiagen) tirpale 4 °C RNR gryninimui. Kitos dalys perkeltos į mėgintuvėlius, užšaldytos skystame azote ir saugomos -80 °C.

Kiaulių kraujo serumo mėginiai yra gauti iš dr. Raimundo Lelešiaus (LSMU). Mėginiai surinkti 2017 m. balandžio–gegužės mėn. Lietuvos teritorijoje.

Žmonių kraujo serumo mėginiai surinkti vykdant biomedicininį tyrimą „Virusinių ir imunologinių veiksnių, susijusių su inkstų veiklos sutrikimais ir inkstų transplantato atmetimo rizikos vertinimu, tyrimas“ (leidimo nr. 158200-17-901-409) bendradarbiaujant su Vilniaus universitetinė ligoninės Santaros klinikų Nefrologijos centru (gyd. Ernesta Mačionienė). Tyrimo dalyviai suskirstyti į 4 grupes:

1. Pacientai su inkstų transplantatais
2. Pacientai sergantys lėtinėmis inkstų ligomis (LIL) ir gaunantys dializės gydymą
3. LIL sergantys pacientai, kuriems netaikomas hemodializės gydymas
4. Sveiki, nesergantys lėtinėmis inkstų bei kepenų ligomis pacientai

1–3 grupių neįtraukimo į tyrimą kriterijai: amžius mažesnis negu 18 m., ŽIV infekcija, nėštumas, žindymo laikotarpis, psichikos ligos, kritinė sveikatos būklė. Šių grupių įtraukimo į tyrimą kriterijai: amžius didesnis negu 18 m. 4 grupės neįtraukimo į tyrimą kriterijai: amžius mažesnis negu 18 m., ŽIV infekcija, nėštumas, žindymo laikotarpis, psichikos ligos, onkologinės, lėtinės ligos, inkstų ir kepenų ligos, tyrėjams pavaldūs darbuotojai, studijos susijusios su tyrimo tema.

Tyrimo metu taip pat kaupiami pacientų duomenys: amžius, lytis, LIL priežastis, dializės pradžia, transplantacijos data, HBV, HCV infekcijos statusas, imunosupresantų, priešvirusinių vaistų vartojimas, alanino transaminazės (ALT), aspartato transaminazės (AST) koncentracijos. Iš viso surinktas 228 žmonių kraujo serumas. Pacientų kraujas yra surenkamas ligoninėje ir mėgintuvėliuose transportuojamas į VU GMC. Mėgintuvėliai centrifuguoti 1000×g 10 min. Supernatantą sudarantis kraujo serumas išpilstytas į mėgintuvėlius ir užšaldytas -80 °C.

2.3 Metodai

2.3.1 Monokloninių antikūnų kūrimas

2.3.1.1 Pelių imunizacija ir hibridomų kūrimas

MAK kūrimui hibridomų technologija yra reikalingos tiksliu antigenu imunizuotos pelės blužnies ląstelės. 6-8 savaitių amžiaus BALB/c linijos patelės (po tris grupėje) buvo imunizuotos HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymais mėginiais suleidžiant po oda. Imunizacijai naudota 50 µg baltymo dozė pelei. Pirmoji imunizacija atlikta sumaišius antigeno tirpalą su pilnu Freundo adjuvantu. Antroji imunizacija atlikta su nepilnu Freundu adjuvantu praėjus 28 dienoms po pirmosios. Kraujo mėginiai iš uodegos venos buvo surinkti prieš pirmą imunizaciją, praėjus 21 dienai po pirmos imunizacijos ir praėjus 14 dienų po antros imunizacijos. Šie mėginiai naudoti antikūnų titrui nustatyti netiesioginės IFA metodu naudojant HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus. Pelei su didžiausiu antikūnų titru prieš antigeną, kuriuo buvo imunizuota, buvo suleista trečia 50 µg antigeno dozė ištirpinta PBS be adjuvanto. Praėjus 3 dienoms, pelė, gavusi 3 dozes HEV-3 kapsidės baltymo, ir pelė, gavusi 3 dozes žiurkių HEV kapsidės baltymo, buvo paaukota. Iš šių pelių buvo išskirtos blužnies ląstelės, kurios panaudotos suliejimui su mielomos Sp2/0 ląstelėmis. Iš paaukotų pelių taip pat surinkti PAK. CCF surinktas plaučių ertmę praplovus 2 ml PBS. Surinktas tirpalas centrifuguotas 200×g 5 min. Supernatantas sumaišytas su sočiu amonio sulfato tirpalu santykiu 1:1 ir inkubuotas 16 h 4 °C. Suspensija centrifuguota 5 min 10000×g. Nuosėdos ištirpintos PBS ir sumaišytos su sočiu amonio sulfato tirpalu santykiu 1:1. PAK suspensija saugoma 4 °C.

Sp2/0 ląstelės prieš suliejimą su blužnies ląstelėmis užaugintos iki 90–100 % konfluentiškumo. Blužnies ir mielomos ląstelių kiekis apskaičiuotas naudojant Burker ląstelių skaičiavimo kamerą. Ląstelių suliejimas atliktas blužnies ir mielomos ląstelių skaičiaus santykiu 12,5:1 (HEV-3 kapsidės baltymo atveju) ir 5,8:1 (žiurkių HEV kapsidės baltymo atveju) panaudojant PEG-1500 kaip suliejimo agentą. Ląstelės sumaišytos ir centrifuguotos 200×g 10 min. Pašalinus supernatantą po truputi per 1 min užpiltas 1 ml suliejimo agento ir inkubuota 2 min lėtai maišant. Po to per 2 min užpilta 10 ml terpės be serumo. Po centrifugavimo 200×g 10 min ląstelės suspenduotos seruminėje terpėje iš išsėtos į 96 šulinėlių audinių kultūrų plokšteles po 200 µl/šulinėlyje, 10000 ląst./ml tankiu.

Hibridinių ląstelių atranka vykdyta po suliejimo jas auginant HAT terpėje su hipoksantinu, aminopterinu ir timidinu. Praėjus 12 dienų po suliejimo atliktas ląstelių augimo terpės testavimas netiesiogine IFA panaudojant HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus. Ląstelės, kurių augimo terpėje nustatyti antikūnai prieš HEV kapsidės baltymus, stabilizuotos klonuojant, kai atliekami serijiniai skiedimai 96 šulinėlių audinių kultūrų plokštelėse ant maitinamojo pelės peritoninių makrofagų sluoksnio. Hibridomos linija laikyta stabilia, jei atlikus klonavimą visi šulinėliai, kuriuose užauga ląstelių klonas iš vienos ląstelės (monoklonas) sintetina antigenui specifiskus antikūnus – monokloninius antikūnus. Stabilizuotos hibridomos kriokonservuotos.

2.3.1.2 Maitinamojo makrofagų sluoksnio paruošimas

Hibridomų auginimui naudotas maitinamasis pelės peritoninių makrofagų sluoksnis. Pelės makrofagai atlieka dvi funkcijas. Pirmoji yra mirusių ląstelių ir ląstelių nuolaužų fagocitozė, kuri išvalo ląstelių kultūrą nuo negyvų ląstelių. Antroji funkcija yra citokinų, skatinančių hibridomų proliferaciją, pavyzdžiui, interleukino-6, sekrecija. Pelės peritoniniai makrofagai yra surenkami iš pelės pilvo ertmės. Po šios procedūros, terpėje yra surinkti makrofagai. Ląstelės centrifuguojamos 200×g 5 min, suspenduojamos seruminėje terpėje, suskaičiuojamos ir išsėjamos į hibridomų auginimui skirtus indus. Makrofagai paliekami bent 16 h inkubatoriuje, kuriame yra 37 °C 5 % CO₂, iki hibridomų užsėjimo.

2.3.1.3 Ląstelių kriokonservavimas

Stabilizuotos hibridomos perkeltos auginimui iš 96 šulinėlių plokštelės į 24 šulinėlių plokšteles, 25 cm² ir 75 cm² flakonus. Hibridinės ląstelės persėtos jas skiedžiant terpe be ląstelių ir su ląstelėmis santykiu 1:1–1:3. Ląstelėms pasidauginus per visą šulinėlio dugną jos centrifuguotos 200×g 5 min. Ląstelių augimo terpė su MAk surinkta ir saugota 4 °C iki gryninimo. Ląstelės suskaičiuotos ir kriokonservuotos 1–5·10⁶ ląstelių/ml tankiu šaldymo terpėje. Šaldymo terpė sudaryta iš 90 % FBS ir 10 % DMSO. Ampulės su 700 μl ląstelių suspensijos šaldymo terpėje uždarytos putplasčio dėžutėje laikytos per naktį -70 °C, kad temperatūra mažėtų po maždaug 1 °C/min ir perkeltos į skysto azoto Diuaro indą ilgalaikiam saugojimui.

2.3.1.4 Antikūnų gryninimas

Antikūnų gryninimas atliktas afininės chromatografijos metodu naudojant sefarozės su baltymu A kolonėles. Baltymas A pasirinktas dėl silpnos sąveikos su jaučio imunoglobulinais, kurie hibridomų augimo terpėje yra kaip FBS dalis. Prieš gryninimą buvo nustatyta antikūnų esančių augimo terpėje klasė ir poklasis naudojant „Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit“ pagal gamintojo rekomendacijas. Tam panaudotas IFA rinkinys skirtas antikūnų izotipavimui. IgG1 poklasio antikūnų gryninimui naudotas Glicino užnešimo buferinis tirpalas, kuris pasižymi padidinta jonine jėga dėl didelės NaCl koncentracijos, kuri padidina baltymo A ir IgG1 Fc dalies sąveikos stiprumą, o IgG2a ir IgG2b – Tris užnešimo buferinis tirpalas. Antikūnų ir baltymo A sąveikai taip pat yra labai svarbus pH. Prieš užnešant augimo terpę su MAK ant kolonėlės sorbento, kolonėle yra kalibruojama 10 kolonėlių tūrių užnešimo tirpalo. Tada yra užnešami antikūnai augimo terpėje ir užnešimo tirpalu. IgG1 antikūnų gryninimui terpė ir užnešimo tirpalas sumaišomas santykiu 1:2, o IgG2a ir IgG2b – į terpę yra įpilama 1 M Tris (pH 8) buferinio tirpalo iki galutinės 0,1 M Tris koncentracijos. Po antikūnų mėginio užnešimo kolonėlė yra plaunama 10 kolonėlių tūrių užnešimo tirpalo. Eliucija atliekama užnešant 10 kolonėlių tūrių eliucijos tirpalo ir renkant frakcijas po 0,5 ml. Antikūnų ir baltymo A sąveika nutrūksta dėl eliucijos tirpalo pH 3. Po to kolonėlė yra regeneruojama 10 kolonėlių tūrių eliucijos tirpalo ir vėl kalibruojama 10 kolonėlių tūrių užnešimo tirpalo. Atliekamas kito antikūno gryninimas arba kolonėlė plaunama 10 kolonėlių tūrių vandens ir tiek pat 20 % etanolio tirpalu bei jame užkonservuojama. Antikūnų koncentracija eliucijos frakcijose pamatuojama spektrofotometriškai „Nanodrop“ prietaisu, atsižvelgiant į IgG ekstinkcijos koeficientą. Frakcijos, kuriose yra antikūnai, sumaišomos ir dializuojamos prieš PBS per naktį 4 °C. Po dializės antikūnų koncentracija pamatuojama spektrofotometriškai, įvertinant IgG koncentraciją. MAK tirpalas steriliai filtruojamas pro 0,22 μm filtrą ir saugomas 4 °C.

2.3.1.5 Antikūnų žymėjimas

Peroksidazės prijungimas prie antikūno atliekamas natrio perjodatinio metodu (Wilson ir Nakane, 1987) su modifikacijomis (Wisdom, 2005). Antikūnai dializuojami prieš natrio karbonatinį buferinį tirpalą (pH 9,5). Į vandeninį peroksidazės tirpalą pridedama 0,2 M natrio perjodato tirpalo.

Mišinys inkubuojamas 20 min kambario temperatūroje. Po to tirpalas dializuojamas prieš 0,01 M natrio acetatinį buferinį tirpalą (pH 4,2), o vėliau tirpalas kalibruojamas iki pH 9,5 pridedant 1 M natrio karbonatinio tirpalo. Po dializės peroksidazės tirpalas sumaišomas su antikūnų tirpalu: supilama į stiklinaitę santykiu 1:1 pagal baltymo kiekį. Inkubuojama 2 h kambario temperatūroje. Po to pridedama 4 mg/ml natrio borhidrido ir inkubuojama 2 h 4 °C. Borhidrido pašalinimui konjugatas dializuojamas prieš PBS. Po to į konjugatus pridedama iki 2 % BSA ir iki 50 % glicerolio. Konjugatai saugomi -20 °C. Konjugatų aktyvumas patikrintas tiesioginėje IFA atliekant skiedimų serijas.

MAk CPD9 žymėjimas Alexa Fluor 555 (AF555) dažų atliktas naudojant AF555 NHS esterį pagal gamintojo rekomendacijas. Visų pirma dažas aktyvuotas jį tirpinant DMSO iki 10 mg/ml. MAk CPD9 atskiesti iki 10,8 mg/ml 0,1 M NaHCO₃ pH 8,3 buferiniame tirpale. Į 100 µl antikūnų tirpalo įpilama 10 µl AF555 tirpalo ir inkubuojama 1 h kambario temperatūroje. Žymėjimo reakcija stabdoma įpilant 11 µl 1,5 M hidroksilamino pH 8,5 tirpalo ir inkubuojama 1 h kambario temperatūroje. Žymėtų antikūnų tirpalas dializuojamas prieš PBS 4 °C per naktį. Po to į žymėtų antikūnų tirpalus įpilama 10 % NaN₃ tirpalo iki galutinės 0,1 % koncentracijos. Žymėti antikūnai saugomi 4 °C. Antikūnų žymėjimo efektyvumas įvertintas spektrofotometriškai matuojant mėginio sugertį esant 280 nm ir 555 nm bangos ilgiams. Antikūnų aktyvumas patikrintas tiesiogine IFA atliekant serijinius skiedimus.

2.3.2 Imunocheminiai analizės metodai

Imunocheminiai analizės metodai šiame darbe naudoti įvairiais tikslais. Visų pirma buvo atliktas sukurtų MAk apibūdinimas. Vėliau imunocheminiai metodai naudoti serologiniams biologinių mėginių tyrimams, nustatant antikūnus prieš HEV, tačiau šie metodai aptarti 2.3.5 skyriuje.

2.3.2.1 Imunofermentinė analizė

Šiame darbe naudoti keturi IFA tipai: tiesioginė, netiesioginė, konkurencinė ir dviepitopė. Netiesioginės IFA pradžioje antigenas yra imobilizuojamas 96 šulinėlių plokštelės („Nunc PolySorp“) šulinėlių dugne. HEV-3 kapsidės baltymas imobilizuotas antigeną skiedžiant iki 3 µg/ml PBS, žiurkių HEV – 5 µg/ml vandenyje, o žiurkių HEV (112–608) – 3 µg/ml

imobilizacijos buferiniame tirpale. Antigeno tirpalas išpilstytas po 50 $\mu\text{l}/\text{šul}$. ir inkubuota per naktį 4 $^{\circ}\text{C}$. Išpurčius antigeno tirpalą iš plokštelės, laisvas paviršius blokuotas Roti-Block tirpalu po 300 $\mu\text{l}/\text{šul}$. 1 h kambario temperatūroje. Po blokavimo pilamas pirminių antikūnų tirpalas (pelių kraujo mėginiai, hibridomų augimo terpė, išgryninti antikūnai skiesti PBST) ar atliekamos antikūnų skiedimo serijos ir inkubuojama 1 h kambario temperatūroje. Po inkubacijos plaunama 4 kartus PBST ir išpilstomi 1:5000 PBST skiesti antriniai antikūnai – ožkos polikloniniai antikūnai prieš pelės IgG žymėti krienų peroksidaze – po 100 $\mu\text{l}/\text{šul}$. ir inkubuojama 1 h kambario temperatūroje. Po inkubacijos plokštelė plaunama 4 kartus PBST ir užpilamas IFA skirtas TMB po 100 $\mu\text{l}/\text{šul}$. Inkubuojama 5–15 min, kol išryškėja signalas. Reakcija stabdoma išpilstant po 50 $\mu\text{l}/\text{šul}$. 3,6 % H_2SO_4 tirpalo. Signalas detektuojamas išmatuojant spektrofotometru susidariusio tirpaus fermentinės reakcijos produkto optinį tankį (OT) esant 450 nm ir 620 nm bangos ilgiams. Signalas vertinamas kaip OT esant 450 nm ir 620 nm skirtumas. OT matuojamas spektrofotometru Thermo Scientific Multiskan GO.

Tiesioginė IFA naudota įvertinti MAK ir HRP konjugatų (MAK–HRP) aktyvumą. Tam viskas atliekama panašiai kaip netiesioginėje IFA, tačiau nėra naudojami antriniai antikūnai, nes pirminiai antikūnai jau turi HRP žymę. Atlikus serijinius skiedimus nustatomas optimalus MAK–HRP titras, kuris laikomas tokiu skiedimu, kai OT vertė yra 1–1,5.

Konkurencinė IFA naudota siekiant nustatyti persidengiančius MAK epitopus HEV kapsidės baltymų molekulėse. Plokštelių šulinėliai buvo padengti HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymais ir užblokuoti. Nežymėti HRP antikūnai hibridomų augimo terpėje išpilstyti į plokštelę ir inkubuoti 1 h kambario temperatūroje. Kaip neigiama kontrolė naudota seruminė terpė be MAK. Po to, toks pats tūris MAK–HRP optimalaus skiedimo tirpalo užpilta be plovimo ir inkubuota 1 h kambario temperatūroje. Signalas nustatytas taip pat kaip aprašyta aukščiau. Konkurencija tarp MAK buvo identifikuota tuose šulinėliuose, kuriuose OT sumažėjo lyginant su neigiama kontrole.

Dviepitopė IFA buvo pritaikyta nustatyti MAK sąveika su persidengiančiais HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų fragmentais. Plokštelės („Nunc MaxiSorp“) šulinėliuose buvo imobilizuoti MAK prieš heksahistidinių žymę išpilstant po 50 $\mu\text{l}/\text{šul}$. 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tirpalo PBS ir inkubuojant per naktį 4 $^{\circ}\text{C}$. Blokavimas atliktas inkubuojant 2 % BSA ištirpintą PBS po 150 $\mu\text{l}/\text{šul}$. 1 h kambario temperatūroje. *E. coli* lizatai ištirpinti 6 M šlapalo tirpale buvo atskiesti PBST su 1 % BSA ir nutitruoti. Kaip neigiama kontrolė naudotas *E. coli* su nemodifikuota pET28a(+) lizatas. Plokštelės inkubuotos 1

h kambario temperatūroje. Po plovimo, per heksahistidinių žymę išgauti oligopeptidai buvo detektuoti MAk–HRP atskiestais PBST su 1 % BSA iki optimalaus titro inkubuojant 1 h kambario temperatūroje. Signalas ryškintas kaip aprašyta aukščiau.

2.3.2.2 Imunoblotingas

Imunoblotingo metodu yra nustatoma antikūnų sąveika su antigenais, kurie yra denatūruoti ir redukuoti. Pirmasis etapas yra SDS-PAGE. Darbe naudoti 12 % skiriamasis gelio sluoksnis ir 4 % – koncentruojamasis. Baltymų mėginiai paruošti su redukuojančiu mėginių ruošimo tirpalu denatūruojami 10 min 100 °C. Į gelio šulinėlį pilama po 0,1–3 µg baltymų mėginio. Elektroforezė vykdoma 80 V įtampoje, kol mėginiai pereina koncentruojamąjį gelį ir 140 V įtampoje, kol baltymai išsifracionuoja skiriamajame gelyje. Po elektroforezės gelis yra naudojamas pernešimui ant PVDF membranos arba dažomas „PageBlue“ baltymų dažymo tirpalu pagal gamintojo rekomendacijas.

Baltymų pernešimui ant PVDF membranos gelis yra merkiamas į baltymų pernešimo buferinį tirpalą. PVDF membranos suvilgytos metanolyje ir filtrinio popierio lakštai taip pat merkiami į baltymų pernešimo buferinį tirpalą. Pernešimas ant PVDF vykdytas pusiau sausu būdu. Ant baltymų pernešimo prietaiso katodinio pado dedamas filtrinis popierius, ant jo PVDF membrana, tada polikarilamidinis gelis ir filtrinis popierius. Tada viskas užspaudžiama anodiniu dangčiu ir vykdomas pernešimas esant 1 mA/cm² PVDF membranos ploto 50 min.

Po pernešimo PVDF membranos po plovimo PBS blokuotos PBS su 2 % pieno miltelių inkubuojant 1 h kambario temperatūroje arba per naktį 4 °C. Pirminiai antikūnai skiesti PBST su 2 % pieno miltelių ir inkubuoti 1 h kambario temperatūroje. Po plovimo PBST, membranos inkubuotos su antriniais antikūnais žymėtais HRP skiestais PBST su 2 % pieno miltelių. Po plovimo antikūnų–antigeno reakcija vizualizuota TMB substratu imunoblotingui. Membranos išdžiovintos ir nuskenuotos.

2.3.2.3 Imunofluorescencinė mikroskopija

Imunofluorescencinė mikroskopija šiame darbe naudota MAk gebėjimo atpažinti natūralų virusą apibūdinimui. Rezultatai pateikti darbe yra gauti 3 skirtingų tyrėjų. A549/D3 ląsteles infekavusio HEV nuotraukos padarytos dr.

Reimar Johne ir jų metodika aprašyta (Simanavicius et al., 2018b). Disertacijos autorius atliko Vero ir PK-15 infekuotų HEV ląstelių dažymą. Infekuotų ląstelių auginimas 10 cm² flakonuose su plastikiniu objektinio stikliuko dugnu atliktas dokt. Juozo Grigo. Imunofluorescencinei mikroskopijai ląstelės naudotos praėjus 14 dienų po infekcijos pradžios. Pašalinus ląstelių augimo terpę, atliktas plovimas PBS ir užfiksuotos lediniu metanolio ir acetono mišiniu santykiu 1:1 po 1 ml stikliukui inkubuojant 5 min -20 °C. Po fiksavimo stikliukai plauti PBS ir naudoti dažymui arba išdžiovinti kambario temperatūroje ir saugoti 4 °C iki dažymo. Pirmame etape stikliukai užblokuoti 10 % normalizuoto ožkos serumo tirpalu 1 h kambario temperatūroje. HEV kapsidės baltymų dažymas atliktas naudojant MAK 5F3. Naudotas 10 µg/ml MAK tirpalas PBS su 3 % BSA, kuris inkubuotas 1 h kambario temperatūroje. Po plovimo PBS prisijungę MAK detektuoti antriniais ožkos polikloniniais antikūnais prieš pelės IgG žymėtais Alexa Fluor 488 Plus fluorescuojančiais žymais. Antriniais antikūnais skiesti 1:200 PBS su 3 % BSA ir inkubuoti 1 h kambario temperatūroje. Po plovimo PBS, stikliukai uždengti dengiamąją terpę su DAPI ir dengiamuoju stikliuku. Nudažytos ląstelės vizualizuotos „EVOS FL Auto Imaging System“ mikroskopu.

2.3.3 Molekulinės biologijos ir genų inžinerijos metodai

2.3.3.1 Persidengiančių HEV kapsidės baltymų fragmentų sintezė

MAK atpažįstamų epitopų HEV kapsidės baltymuose nustatymas atliktas panaudojant persidengiančius fragmentus. Kiekvienas HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymas buvo padalinti į 3 persidengiančius oligopeptidus, kurie buvo susintetinti *E. coli*. HEV kapsidės baltymų fragmentus koduojančios sekos pagausintos PGR naudojant vektorius pFX7 su HEV-3 ORF2 ir pUC19 su žiurkių HEV genomu kaip matricas. Pradmenys naudoti HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų fragmentų koduojančių sekų pagausinimui pateikti lentelėje 2.2. PGR komponentai ir režimas pateikti lentelėje 2.6.

PGR produktai išgryninti naudojant „GeneJET PCR Purification Kit“ ir klonuoti į pJET1.2 vektorius naudojant „CloneJET PCR Cloning Kit“. Šie vektoriai transformuoti į *E. coli* DH10B kamieną CaCl₂ transformacijos būdu. Kompetentinės ląstelės transformacijai paruoštos *E. coli* DH10B ląstelės auginant 5 ml LB terpės per naktį 37 °C 220 rpm. Po 16 h inkubacijos 50 µl naktinės kultūros užsėjama į 5 ml LB terpės ir auginama 2,5 h. Ląstelės centrifuguojamos 5 min 3000×g 4 °C ir toliau visas procedūras atliekant lede

arba 4 °C suspenduojamos 5 ml NaCl tirpalo ir vėl centrifuguojamos. Ląstelės **Lentelė 2.6.** PGR komponentai ir temperatūriniai režimai persidengiančių HEV kapsidės baltymų fragmentų DNR pagausinimui.

PGR komponentas	Galutinė komponento koncentracija
10× „DreamTaq Green buffer“	1×
2 mM dNTP	0,2 mM
Tiesioginis pradmuo, 10 μM	0,3 μM
Atvirkštinis pradmuo, 10 μM	0,3 μM
„DreamTaq“ polimerazė 5 v/μl	1 v
H ₂ O, be nukleazių	Iki 23 μl
Temperatūrinis režimas	95 °C – 10 min 95 °C – 30 s 58–60 °C – 30 s 72 °C – 45 s 72 °C – 10 min

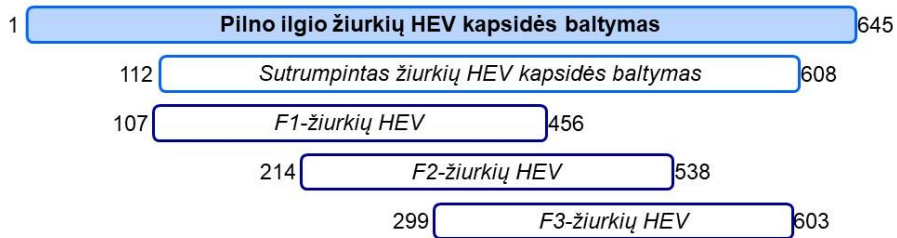
} 30 ciklų

suspenduojamos 3 ml CaCl₂ tirpalo ir inkubuojamos 30 min. Po to ląstelės centrifuguojamos, nupylus supernatantą suspenduojamos tirpalo likutyje. Transformacija atliekama 50 μl kompetentinių ląstelių sumaišant su 5–7 μl ligavimo mišinio arba 1 μl plazmidės. Mišinys laikomas lede 30 min, tada 1,5 min 42 °C ir 2 min lede. Ląstelių regeneracija atliekama jas suspenduojant 1 ml LB terpės ir inkubuojant 30 min 37 °C. Transformuotos bakterijos po centrifugavimo išsėjamos ant agarizuotos LB terpės su 0,1–0,5 μg/ml antibiotiko (pJET1.2 koduoja atsparumą ampicilinui) ir auginamos 16 h 37 °C. Po auginimo bakterijų kolonijos testuojamos PGR ir persėjamos ant agarizuotos LB terpės. Vektoriai iš teigiamų kolonijų sekoskaitai ir tolesniems klonavimo darbams išgryninami iš naktinių kultūrų naudojant „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“.

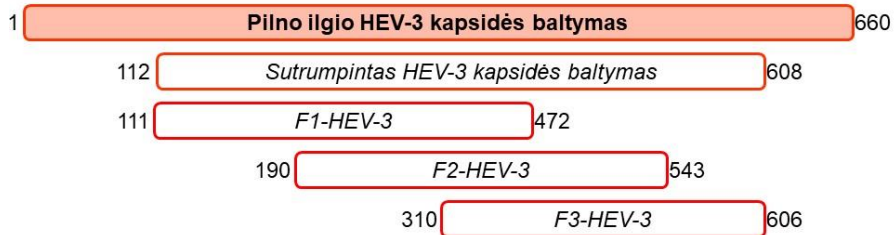
HEV kapsidės baltymų fragmentų genų DNR sekos nuskaitytos VU GMC BTI Sekoskaitos centre naudojant „BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ (Thermo Fisher Scientific) ir „ABI PRISM 3130xl“ genetinį analizatorių (Thermo Fisher Scientific). HEV-3 kapsidės baltymo persidengiančių fragmentų koduojančios sekos iškirptos naudojant *Bam*HI ir *Nhe*I restrikcijos endonukleazes, o žiurkių HEV – *Bam*HI ir *Nde*I. Iškirpta DNR išgryninta iš agarozės gelio naudojant „GeneJET Gel Extraction Kit“. Koduojančios sekos įklonuotos į pET28a(+) vektorių taip, kad būtų sintetiniai oligopeptidai su heksahistidino žyme N gale. pET28a(+) vektoriai transformuoti į *E. coli* DH10B kamieną CaCl₂ metodu kaip aprašyta aukščiau, tik atrankai naudotas antibiotikas kanamicinas. Iš teigiamų kolonijų naktinių

kultūrų išgryninti pET28a(+) vektoriai koduojantys HEV kapsidės baltymų persidengiančius fragmentus transformuoti į *E. coli* Tuner(DE3) kamieną baltymų sintezei. Oligopeptidų sintezė indukuota IPTG. Po transformacijos atrinktų teigiamų kolonijų naktinių kultūrų 50 μl persėta į 5 ml LB terpės su kanamicinu ir auginta 2,5 h. Surinktas 0,5 ml bakterijų suspensijos mėginys, centrifuguota 5 min 3000×g, supernatantas pašalintas, o ląstelės užšaldytos - 20 °C. Į likusią bakterijų kultūrą įpilta IPTG iki 0,1 mM koncentracijos ir auginta dar 2,5 h. Nutraukus auginimą ląstelių suspensija padalinta į mėgintuvėlius po 0,5 ml ir paruoštos taip pat kaip mėginys prieš indukciją. Mėginių analizei SDS-PAGE ir imunoblotingo metodais bakterijos suardytos jas suspendavus 40 μl PBS su 2 % SDS ir pakaitinus 10 min 100 °C, įpylus 10 μl 5× redukuojančio baltymų mėginio ruošimo tirpalo ir vėl pakaitinus 10 min 100 °C. Mėginiai dviepitopei IFA paruošti užšaldytas bakterijas suspenduojant 1 ml 6 M šlapalo tirpale.

a



b



2.2 pav. Sutrumpintų HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų variantų schema.

Susintetinti persidengiantys HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų fragmentai pateikti 2.2 pav. MAK sąveika su šiais baltymais tirta imunoblotingo ir dviepitopės IFA metodais.

2.3.3.2 RNR gryninimas ir AT-kPGR analizė

Žiurkių kepenų audinio mėginiai, esantys „RNALater“ tirpale, homogenizuoti sutrinant 10–20 mg. Suminė RNR išgryninta naudojant „GeneJET RNA Purification Kit“. Išgrynintos RNR tirpalas papildytas „RiboLock RNase Inhibitor“ tirpalu kaip apsauga nuo RNR degradacijos. RNR koncentracija ir grynumas nustatytas spektrofotometru „NanoDrop“. RNR saugota -70 °C iki analizės. AT–kPGR atlikta dviem etapais. Visų pirma 2 µg suminės RNR paveikta dvigrandę DNR hidrolizuojančia endonukleaze „dsDNase“ pagal gamintojo rekomendacijas. Tada atlikta kopijinės DNR (kDNR) sintezė. Atvirkštinė transkripcija atlikta naudojant „RevertAid RT Kit“ su atsitiktiniais heksameriniais pradmenimis „Applied Biosystems“ termocikleryje pagal režimą 5 min 25 °C, atvirkštinė transkripcija 1 h 42 °C ir fermentų inaktyvacija 5 min 70 °C. Toliau atlikta kPGR, kurios komponentai ir režimas pateikti lentelėje 2.7. Pradmenys ir zondai naudoti kPGR pateikti lentelėje 2.3. kPGR atlikta termociklieriu „Rotor-Gene Q MDx“, o gauti duomenys analizuoti naudojant „Rotor-Gene Q MDx“ kompiuterinę programą.

Lentelė 2.7. kPGR komponentai ir temperatūrinis režimas.

PGR komponentas	Galutinė komponento koncentracija
2× „Maxima™ Probe qPCR“	1×
Tiesioginis pradmuo, 10 µM	0,3–0,5 µM
Atvirkštinis pradmuo, 10 µM	0,3–0,5 µM
Zondas, 10 µM	0,1–0,3 µM
Vanduo, be nukleazių	Iki 18 µl
Temperatūrinis režimas	95 °C – 10 min 95 °C – 30 s 58–60 °C – 60 s 72 °C – 30 s

} 55 ciklai

Kiekybiniam HEV RNR nustatymui susintetinti HEV-3, žiurkių HEV ir žiurkių β-aktino (ACTB) RNR standartai. Visų pirma PGR su pradmenimis, pateiktais lentelėje 2.4, pagausinta standartų DNR kaip matricas naudojant pFX7 su HEV-3 ORF2 vektorių – HEV-3 standartui, pUC19 su žiurkių HEV genomu – žiurkių HEV standartui, iš žiurkių kepenų audinio išskirtos suminės RNR kDNR – ACTB standartui. PGR komponentai ir režimas pateikti lentelėje 2.8. PGR produktai išgryninti naudojant „GeneJET PCR Purification

Lentelė 2.8. PGR, AT–kPGR sistemų standartų kūrimui ir žiurkių HEV genominių fragmentų pagausinimui, komponentai ir temperatūrinis režimas.

PGR komponentas	Galutinė komponento koncentracija						
2× „Maxima Hot Start PCR“ mišinys	1×						
Tiesioginis pradmuo, 10 μM	0,5 μM						
Atvirkštinis pradmuo, 10 μM	0,5 μM						
Vanduo be nukleazių	Iki 23 μl						
Temperatūrinis režimas	<table border="0"> <tr> <td>95 °C – 5–10 min</td> <td rowspan="5">} 35–40 ciklų</td> </tr> <tr> <td>95 °C – 30 s</td> </tr> <tr> <td>54–64 °C – 30 s</td> </tr> <tr> <td>72 °C – 30–45 s</td> </tr> <tr> <td>72 °C – 10 min</td> </tr> </table>	95 °C – 5–10 min	} 35–40 ciklų	95 °C – 30 s	54–64 °C – 30 s	72 °C – 30–45 s	72 °C – 10 min
95 °C – 5–10 min	} 35–40 ciklų						
95 °C – 30 s							
54–64 °C – 30 s							
72 °C – 30–45 s							
72 °C – 10 min							

Kit“ ir įklonuoti į pJET1.2 vektorių naudojant „CloneJET PCR Cloning Kit“. Vektoriai su standartų DNR transformuoti į *E. coli* DH10B kamieną CaCl₂ metodu (2.3.3.2 skyrius). Teigiamų kolonijų atranka atlikta analogiškai 2.3.3.2 skyriuje pateikti metodikai, tik naudoti kiti PGR komponentai ir pradmenys. pJET1.2 vektoriai su standartų DNR išgryninti „GeneJET Plasmid Miniprep Kit“ rinkiniu. Šie vektoriai hidrolizuoti *Xba*I ir *Bam*HI restrikcijos endonukleazėmis, standartų DNR išgryninti iš agarozės gelio naudojant „GeneJET Gel Extraction Kit“ ir įklonuoti į pTZ57R vektorių. pTZ57R vektoriai su kPGR sistemų standartų DNR transformuoti į *E. coli* DH10B, pagausinti ir išgryninti. RNR standartų sintezei reikalinga linearizuota plazmidė, todėl atlikta vektorių hidrolizė *Sap*I pagal gamintojo rekomendacijas. Plazmidinė DNR išgryninta atliekant DNR išsodinimą fenoliu ir chloroformu. Į DNR tirpalą įpilta fenolio ir chloroformo mišinio santykiu 1:1. Po centrifugavimo 5 min 12000×g, viršutinė vandens frakcija surinkta ir sumaišyta su chloroformo tirpalu santykiu 1:1. Po centrifugavimo viršutinė vandens frakcija surinkta ir sumaišyta su 1/10 tūrio 3 M natrio acetato tirpalu pH 5,2 ir 2 tūriais 96 % etanolio tirpalu. DNR palikta išsėsti inkubuojant 16 h -20 °C. Po centrifugavimo 20 min 12000×g 4 °C, nuosėdos suspenduotos 0,5 ml 70 % etanolio tirpale. Po centrifugavimo 20 min 12000×g 4 °C nuosėdos ištirpintos 12 μl vandens be nukleazių. RNR standartų sintezė atlikta naudojant išsodintą DNR kaip matricą *in vitro* transkripcijai rinkiniu „Transcript AID T7 High Yield Transcription Kit“. Susintetinti RNR transkriptai išgryninti fenoliu ir chloroformu tokia pačia procedūra kaip ir DNR. Po išsodinimo RNR ištirpinama 19 μl vandens ir pridedama 1 μl „RiboLock RNase Inhibitor“. Iš RNR tirpalo pašalinta DNR naudojant DNR

hidrolizuojančią endonukleazę „DNase I“ pagal gamintojo rekomendacijas. Po DNR pašalinimo iš tirpalo RNR išgryninta naudojant „RNeasy Plus Mini Kit“ pagal gamintojo rekomendacijas. Į išgrynintus RNR transkriptus pridėta „Ribolock RNase Inhibitor“, pamatuota RNR koncentracija spektrofotometru „NanoDrop“, mėginių kokybė patikrinta RNR elektroforezėje ir mėginiai saugoti -70 °C. Transkriptų kopijų skaičius 1 µg RNR apskaičiuotas pagal formulę:

$$\text{Kopijų skaičius} = \frac{1 \mu\text{g} \times 6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1a}}{\text{RNR transkripto ilgis (nt)} \times 10^6 \times 333 \text{ Da}^b}$$

^a $6,02 \cdot 10^{23} \text{ mol}^{-1}$ – Avogadro konstanta, nurodanti molekulių skaičių viename molyje medžiagos.

^b 333 Da – vidutinė deoksiribonukleotido masė.

RNR transkriptai panaudoti kPGR standartinių kreivių gavimui ir virusinės RNR kiekio nustatymui.

2.3.3.3 Žiurkių HEV sekoskaita

Siekiant patvirtinti žiurkių HEV infekcijas laukinių žiurkių kepenų audinio mėginiuose buvo pagausintas žiurkių HEV ORF1 regionas naudojant lizdinę PGR. PGR pradmenys pateikti lentelėje 2.5. Lizdinė PGR atlikta dviem etapais. Pirmame etape kaip matrica naudoja kDNR ir pagausintas 365 bp fragmentas. Antrame etape kaip matrica naudotas pirmo etapo PGR mišinys ir pagausintas 332 bp fragmentas. PGR temperatūrinis režimas pateiktas lentelėje 2.8. PGR produktas išgrynintas iš agarozės gelio naudojant „GeneJET Gel Extraction Kit“ ir įklonuotas į pJET1.2 vektorių naudojant „CloneJET PCR Cloning Kit“. pJET1.2 vektoriai su žiurkių HEV genomo fragmentais pagausinti transformuojant *E. coli* DH10B ląsteles ir išgryninant su „CloneJET Plasmid Miniprep Kit“. Trijų skirtingų vektorių su tuo pačiu žiurkių HEV genomo fragmentų DNR sekoskaita atlikta VU GMC BTI Sekoskaitos centre. Nuskaitytos DNR sekos deponuotos į „GenBank“ duomenų banką (MH40071-MH400717). Taip pat atliktas sekų palyginimas ir filogenetinė analizė.

2.3.4 Bioinformatikos metodai

2.3.4.1 HEV kapsidės baltymų aminorūgščių sekų palyginimas

HEV kapsidės baltymų aminorūgščių sekų palyginimas atliktas naudojantis „Clustal Omega“ programa su standartiniais nustatymais (Madeira et al., 2019). Aminorūgščių palyginimui naudota Gonnet matrica. HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų aminorūgščių sekų palyginimo paveikslas apdorotas „Jalview“ programa (Waterhouse et al., 2009).

2.3.4.2 HEV kapsidės baltymų erdviniai modeliai

HEV-3 (GenBank FJ705359) ir žiurkių HEV (GenBank GU345042) kapsidės baltymų suformuojamų VPD teoriniai modeliai sukurtas naudojantis „SWISS-MODEL“ programa (Waterhouse et al., 2018) pagal HEV kapsidės baltymo erdvinę struktūrą (PDB: 2ZZQ). Paveikslai sudaryti naudojantis „RasMol“ programa (Sayle ir Milner-White, 1995).

2.3.4.3 Žiurkių HEV genominių sekų palyginimas ir filogenetinė analizė

Žiurkių HEV genominių fragmentų sekų palyginimas atliktas „DNASTAR Lasergene 7“ programine įranga. Palyginimui naudotos to pačio žiurkių kepenų mėginio 3 paraleliniai žiurkių HEV genominių fragmentų konstruktai ir sudarytos konsensuso sekos. Šios sekos palygintos su žinomomis žiurkių HEV sekomis bei kitų HEV atskaitos genomais. Filogenetinė analizė atlikta naudojantis „MEGA version 7“ (Kumar et al., 2016). Evoliucinis ryšys tarp žiurkių HEV sekų įvertintas maksimalios tikimybės (angl. *maximum likelihood*) metodu remiantis Tamura-Nei modeliu (Tamura ir Nei, 1993). „Bootstrap“ vertės nustatytos atliekant 2000 pakartotinių turimų duomenų analizės bandymų. „Bootstrap“ vertės lygios arba didesnės nei 70 % laikytos patikimomis.

2.3.5 Imunocheminiai biologinių mėginių analizės metodai

Biologinių mėginių analizei buvo naudoti įvairūs imunocheminiai metodai. Antikūnų prieš HEV nustatymui pasirinkti IFA tipai, o HEV antigeno detekcijai imunofluorescencinis metodas, kurių principas apibendrintas lentelėje 2.9, o metodikos aprašytos skirtingose skyriaus dalyse.

Lentelė 2.9. Imunocheminių biologinių mėginių analizės metodų principai.

Imunocheminis metodas	1 žingsnis	2 žingsnis	3 žingsnis	4 žingsnis
<i>Netiesioginė IFA</i>	Antigenas	Tiriamasis mėginys	Antriniai antikūnai su fermentine žyme	Kolorimetrinė detekcija
<i>Dviejų antigenų antikūnus išgaudanti IFA</i>	Antigenas		Antigenas su fermentine žyme	
<i>Dviepitopė IFA</i>	Antikūnai, išgaudantys HEV antigeną		Antikūnai su fermentine žyme, detektuojantys HEV antigeną	
<i>Dviepitopė imunofluorescencinė analizė</i>	Antikūnai, išgaudantys HEV antigeną		Antikūnai su fluorescencine žyme, detektuojantys HEV antigeną	Fluorescencinė detekcija

2.3.5.1 Žiurkių HEV serologiniai metodai

Žiurkių HEV specifiskų IgM ir IgG antikūnų kraujo mėginiuose atliktas netiesioginės IFA metodu panaudojant pilno ilgio ir sutrumpintą (112–608 aminorūgštys) žiurkių HEV kapsidės baltymus. IFA atlikta naudojant „PolySorp“ (Nunc) plokšteles. Išmatuoti OT normalizuoti apskaičiuojant tiriamojo mėginio OT santykį su teigiamos kontrolės OT (S/P, angl. *sample to positive*). Ribine verte laikytas 4 neimunizuotų Wistar žiurkių PAK S/P vidurkis + 2 standartiniai nuokrypiai.

2.3.5.2 „HEV-Ab ELISA“ rinkinys

Kiaulių kraujo mėginiai ištirti „HEV-Ab ELISA“ (Axiom) IFA rinkiniu. Šis rinkinys nustato visų klasių antikūnus prieš HEV. Šiame rinkinyje naudojamas dviejų antigenų antikūnus išgaudanti IFA, kuri nustato antikūnus nepriklausomai nuo jų kilmės. Šios IFA principas yra toks, kad plokštelės šulinėlių dugne yra imobilizuotas HEV antigenas, prie kurio prisijungia tiriamajame mėginyje esantys antikūnai prieš HEV. Toks antigeno–antikūno kompleksas yra detektuojamas HRP žymėtu HEV antigenu, kuris prisijungia prie komplekse esančio antikūno. Jei toks kompleksas susidaro, vykdamas fermentinę reakciją HRP substrato tirpalo spalva intensyvėja. Spalvos intensyvumas išmatuojamas spektrofotometriškai ir yra proporcingas

išgaudytų antikūnų kiekiui. Pagal rinkinio aprašymą OT vertės yra dalinamos iš ribinės vertės. Pagal mėginio OT ir ribinės vertės santykį, yra įvertinama, ar mėginys yra teigiamas (jei santykis daugiau arba lygu 1) ar neigiamas (jei santykis mažiau už 1).

2.3.5.3 HEV serologiniai metodai kiaulių mėginių tyrimui

Siekiant patikrinti mielėse sintetintų rekombinantinių HEV kapsidės baltymų tinkamumą serologiniams testams pasirinktas netiesioginės IFA tipas. Rekombinantiniai HEV kapsidės baltymai imobilizuoti „Polysorp“ (Nunc) plokštelėse. Blokavimui, mėginių ir antrinių antikūnų skiedimui naudotas PBST su 2 % BSA tirpalas. Tiriamieji mėginiai skiesti santykiu 1:10, išpilstyti po 100 µl į šulinėlį ir inkubuoti 1 h 37 °C. Po plovimo, pilta po 100 µl į šulinėlį HRP žymėtų antrinių antikūnų prieš kiaulių IgG F(ab')₂ fragmentą skiestų 1:15000 ir inkubuota 1 h 37 °C. Reakcija ryškinta naudojant TMB skirtą IFA.

2.3.5.4 „Wantai HEV-IgM ELISA“ ir „Wantai HEV-IgG ELISA“ rinkiniai

Žmonių kraujo serumo mėginiai tirti „Wantai HEV-IgM ELISA“ ir „Wantai HEV-IgG ELISA“ rinkiniais. „Wantai HEV-IgM ELISA“ nustato IgM klasės antikūnus prieš HEV, o „Wantai HEV-IgG ELISA“ – IgG. Testo formatas yra netiesioginė IFA. Rinkinių plokštelės dugne imobilizuoti HEV-1 antigenai, prie kurių jungiasi tiriamajame mėginyje esantys antikūnai prieš HEV. Prisijungę antikūnai yra detektuojami HRP žymėtais antriniais antikūnais prieš žmogaus IgM arba IgG. Jei susidaro antigeno–tiriamojo mėginio antikūnų–antrinių antikūnų kompleksas, vykdant fermentinę reakciją HRP substrato tirpalo spalva intensyvėja. Spalvos intensyvumas išmatuojamas spektrofotometriškai ir yra proporcingas išgaudytų antikūnų kiekiui. Pagal rinkinio aprašymą OT vertės yra dalinamos iš ribinės vertės. Pagal mėginio OT ir ribinės vertės santykį, yra įvertinama, ar mėginys yra teigiamas (jei santykis daugiau arba lygu 1) ar neigiamas (jei santykis mažiau už 1).

2.3.5.5 HEV serologiniai metodai žmonių mėginių tyrimui

Siekiant patikrinti mielėse sintetintų rekombinantinių HEV kapsidės baltymų tinkamumą serologiniams testams naudotas netiesioginės IFA tipas.

Baltymai imobilizuoti „Polysorp“ (Nunc) plokštelėse. Blokavimui, mėginių ir antrinių antikūnų skiedimui naudotas PBST su 2 % BSA tirpalas. Tiriamieji mėginiai skiesti santykiu 1:10, išpilstyti po 100 µl į šulinėlį ir inkubuoti 1 h 37 °C. Po plovimo, pilta po 100 µl į šulinėlį HRP žymėtų antrinių antikūnų prieš žmogaus IgG skiestų 1:10000. Reakcija ryškinta naudojant TMB skirtą IFA.

2.3.5.6 „Wantai HEV-Ag ELISA“ rinkinys

Seroteigiami kiaulių ir žmonių kraujo mėginiai bei teigiami žiurkių CCF mėginiai tirti „Wantai HEV-Ag ELISA“. „Wantai HEV-Ag ELISA“ nustato HEV antigeną. Testo formatas yra dviepitopė IFA. Rinkinių plokštelės dugne imobilizuoti antikūnai prieš HEV antigenus, prie kurių jungiasi tiriamajame mėginyje esantys HEV antigenai. Prisijungę HEV antigenai yra detektuojami HRP žymėtais antikūnais prieš HEV antigenus. Jei susidaro antikūno–antigeno–žymėtų antikūno kompleksas, vykdant fermentinę reakciją HRP substrato tirpalo spalva intensyvėja. Spalvos intensyvumas išmatuojamas spektrofotometriškai ir yra proporcingas išgaudytų antigenų kiekiui. Pagal rinkinio aprašymą OT vertės yra dalinamos iš ribinės vertės. Pagal mėginio OT ir ribinės vertės santykį, yra įvertinama, ar mėginys yra teigiamas (jei santykis daugiau arba lygu 1) ar neigiamas (jei santykis mažiau už 1).

2.3.5.7 Dviepitopė imunofluorescencinė analizė HEV antigeno nustatymui

HEV kapsidės baltymo nustatymui seroteigiamuose kiaulių ir žmonių kraujo mėginiuose bei HEV teigiamuose žiurkių CCF mėginiuose naudota dviepitopė IFA. MAk CPE4 imobilizuota „Maxisorp“ (Nunc) plokštelėse įpylus po 50 µl į šulinėlį 5 µg/ml PBS tirpalą ir inkubuojant 16 h 4 °C. Laisvas šulinėlio paviršius blokuotas po 300 µl į šulinėlį PBST su 2 % BSA tirpalus 1 h kambario temperatūroje. Prieš pilant tiriamąjį mėginį į šulinėlius išpilstyta po 20 µl PBST su 2 % BSA tirpalo, tada įpilta po 50 µl neskiesto mėginio ir inkubuota 1 h 37 °C. Kaip teigiama kontrolė naudotas 5 µg/ml sutrumpinto žiurkių HEV kapsidės baltymo tirpalas PBST su 2 % BSA, o kaip neigiama kontrolė – „Wantai HEV-Ag ELISA“ testo neigiama kontrolė. Po inkubacijos mėginiai neišpurtyti ir įpilta po 100 µl į šulinėlį MAk CPD9 žymėtų AF555 (CPD9–AF555) 10 µg/ml PBST + 2 % BSA tirpale ir inkubuota 1 h 37 °C. Plokštelė plauta 4 kartus PBST tirpalu. Rezultatų skenavimui į šulinėlius

išpilstyta po 100 µl PBS. AF555 fluorescencija ($\lambda_{ex} = 532 \text{ nm}$, $\lambda_{em} = 565 \text{ nm}$) matuota „Varioskan Flash“ (Thermo Scientific) plokštelių skaitytuvu. Patogesnei duomenų analizei santykiniai fluorescencijos vienetai normalizuoti Min-Max būdu pagal formulę:

$$y = \frac{(x - x_{min})}{(x_{max} - x_{min})},$$

kur y – normalizuota fluorescencija, x – išmatuoti santykiniai fluorescencijos vienetai.

Testo ribine verte laikyta neigiamų kontrolių vidurkio ir 3 standartinių nuokrypių suma.

2.3.6 Statistiniai metodai

Žiurkių populiacijoje HEV infekcijų dažnio skirtumai tarp žiurkių rūšies, lyties ir amžiaus bei antikūnų prieš HEV paplitimo dažnio skirtumas tarp tirtų žmonių grupių palygintas dvikrypčiu χ^2 testu. Statistiškai patikimu laikytas skirtumas, jeigu $p < 0,05$. 95 % pasikliautinieji intervalai (PI) apskaičiuoti modifikuotu Wald metodu. Duomenų analizei naudotas „GraphPad“ internetinis įrankis.

Šansų santykio (OR, angl. *odds ratio*) apskaičiavimui naudotas „MedCalc“ internetinis įrankis.

Patogesniam rezultatų palyginimui ir atvaizdavimui serologinių tyrimų IFA rezultatai normalizuoti pagal formulę:

$$\text{Rezultatas [s. v.]} = \frac{(OT(\text{mėginio}) - OT(\text{min}))}{(OT(\text{max}) - OT(\text{min}))}$$

IFA rezultatų koreliacija tarp skirtingų testų įvertinta apskaičiuojant Spearman koreliacijos koeficientą (r_s). Laikyta, kad stipri koreliacija, kai $r_s > 0,8$, vidutinio stiprumo – $0,6 < r_s < 0,8$, silpna – $r_s < 0,6$. Koreliacijos koeficientai apskaičiuoti naudojantis “Origin Pro 8” (OriginLab) programine įranga.

ROC analizė atlikta naudojantis „Origin Pro 8“. Pagal ROC kreivės taškų koordinates kiekvienam taškui buvo apskaičiuotas „Youden“ indeksas (angl. *Youden index*). Didžiausią „Youden“ indeksą turinčiame taške ROC kreivėje yra priskiriama ribinė vertė (angl. *cut-off*), kurią naudojant pasiekiamas didžiausias įmanomas testo jautrumas ir specifiskumas. Tokios ribinės vertės buvo apskaičiuotos kiekvienam tikrintam serologiniam testui rekombinantinių HEV kapsidės baltymų pagrindu.

3. REZULTATAI IR JŲ APTARIMAS

Šio darbo rezultatus galima suskirstyti į dvi dalis. Pirmoje dalyje yra aprašomas įrankių, skirtų HEV ir jo sukeltos infekcijos tyrimams, kūrimas ir apibūdinimas. Monokloniniai antikūnai (MAk) yra biotechnologiniai produktai, kurie gali būti pritaikomi virusų tyrimams. MAk yra naudojami tiesioginiam viruso nustatymui infekuotuose audiniuose, ląstelių linijose, taip pat gali būti pritaikyti HEV antigeno kraujyje nustatymui ūmios infekcijos fazės metu. Panaudojant MAk galima tirti viruso kapsidės antigenines savybes, nustatant antikūnų atpažįstamus epitopus. MAk kūrimui reikalingi imunogenai, kurie taip pat aprašyti pirmoje dalyje. Šiame darbe naudoti mielėse susintetinti HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymai, formuojantys virusą primenančias daleles, kurios imituoja natūralaus viruso kapsidę. Antroji darbo dalis susideda iš serologinių HEV nustatymo testų ir imunocheminio HEV nustatymo kraujyje metodo kūrimo. Šiems darbams panaudoti pirmoje dalyje sukurti MAk ir rekombinantiniai HEV kapsidės baltymai. Pasitelkiant sukurtus serologinius testus ir jau anksčiau publikuotus molekulinis metodus atlikti HEV paplitimo tyrimai laukinėse žiurkėse. Taip pat įvertintas HEV paplitimas kiaulėse ir žmonėse panaudojant naujai sukurtąsias ir įsigytas serologines sistemas. Išbandytas HEV antigeno nustatymo testas MAk pagrindu įvairios kilmės mėginių tyrimams. Pagal gautus rezultatus įvertintas sukurtų metodų efektyvumas ir tinkamumas.

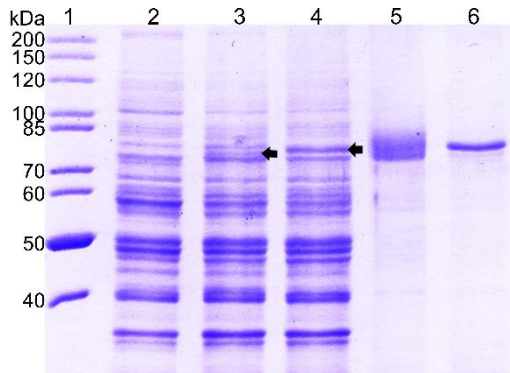
3.1 Monokloninių antikūnų prieš hepatito E virusą kūrimas

MAk kūrimas paremtas hibridomų technologija. Jos metu yra sukuriami pelės blužnies B ląstelių ir vėžinių mielomos ląstelių hibridai. Norint, kad pelėse susidariusios B ląstelės sintetintų antikūnus prieš konkretų antigeną, pelės yra juo imunizuojamos. Imunizacijoms buvo naudoti rekombinantiniai mielėse susintetinti HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymai. MAk apibūdinimui taip pat buvo panaudoti sutrumpinti (112–608 aminorūgštys) HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų variantai. Tokie baltymų formatai buvo pasirinkti dėl anksčiau paskelbtų tyrimų, kurie aprašo rekombinantinių HEV kapsidės baltymų gebėjimą suformuoti virusą primenančias daleles – natyvius HEV virionus primenančias struktūras (Li et al., 1997, Li et al., 2011). Taip pat pastebėta, kad sutrumpinti HEV kapsidės baltymai sudaro erdvines struktūras, tačiau jos nėra panašios į natūralų virusą. Baltymų sintezė atlikta mielių raiškos sistemoje. Mielės yra eukariotai, todėl baltymų sintezės

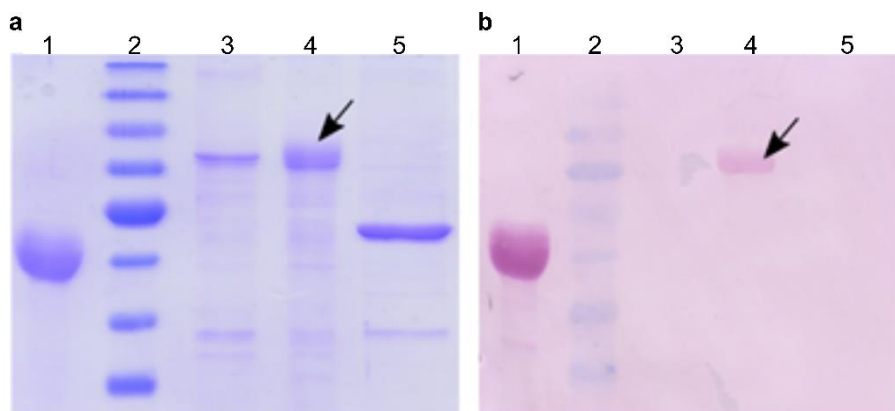
metu yra atliekamos potransliacinės modifikacijos, pavyzdžiui, glikozilinimas. Mielių glikozilinimas skiriasi nuo žinduolių ar vabzdžių ląstelių, todėl susintetinti baltymai būna unikalūs ir gali pasižymėti kitokiomis savybėmis. Be to, kadangi natūralūs HEV šeimininkai yra žinduoliai, norint imituoti natūralią viruso kapsidę reikalingas kapsidės baltymo glikozilinimas. Tokios modifikacijos neatliekamos sintetinant baltymus bakterijose. Baltymų produkcija mielėse yra ekonomiškesnis būdas lyginant su žinduolių ląstelių kultūromis. Toliau šiame skyriuje aprašomi rekombinantinių baltymų imunogeninių ir antigeninių savybių tyrimai, antikūnų prieš šiuos baltymus sukūrimas bei apibūdinimas.

3.1.1 HEV kapsidės baltymai

HEV kapsidės baltymai bei jų variantai buvo susintetinti, išgryninti ir apibūdinti fracionuojant elektroforetiškai bei elektroniniu mikroskopu VU GMC BTI Eukariotų ir genų inžinerijos skyriuje. Dr. Paulius Lukas Tamošiūnas, dr. Rasa Petraitytė-Burneikienė ir jų studentai atliko HEV-3 (1–660 aminorūgštys) ir žiurkių HEV (1–645 aminorūgštys) kapsidės baltymų bei jų sutrumpintų variantų (112–608 aminorūgštys) sintezę mielių *Saccharomyces cerevisiae* AH22 kamieno raiškos sistemoje. Mielių,



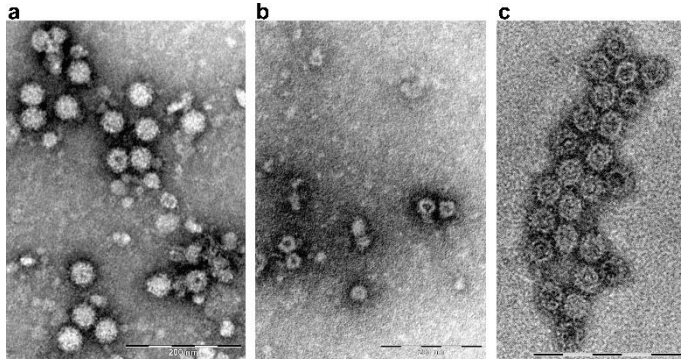
3.1 pav. Mielių, sintetinančių HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus, lizatų ir išgrynintų baltymų analizė SDS–PAGE. 1 – baltymų molekulinės masės standartas, 2 – *S. cerevisiae* su pFX7 vektoriumi be tiksinio geno lizatas, 3 – *S. cerevisiae* su pFX7 vektoriumi su žiurkių HEV kapsidės baltymo genu lizatas, 4 – *S. cerevisiae* su pFX7 vektoriumi su HEV-3 kapsidės baltymo genu lizatas, 5 – CsCl gradiente išgrynintas žiurkių HEV kapsidės baltymas, 6 – CsCl gradiente išgrynintas HEV-3 kapsidės baltymas.



3.2 pav. Baltymų glikozilinimo nustatymas Šifo dažymu. Baltymų elektroforezės gelis nudažytas Kumasi dažu (a), PVDF membrana nudažyta Šifo dažu (b). 1 – krienų peroksidazė (teigiama kontrolė), 2 – baltymų molekulinės masės standartas, 3 – HEV-3 kapsidės baltymas, 4 – žiurkių HEV kapsidės baltymas, 5 – jaučio serumo albuminas (neigiama kontrolė).

sintetinančių pilno ilgio HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus, lizatų analizė baltymų elektroforezėje (SDS-PAGE) parodė papildomas juosteles lyginant su kontrole (3.1 pav.). Žiurkių HEV kapsidės baltymą sintetinančių mielių lizate matoma maždaug 71 kDa juostelė (3.1 pav., 3 takelis, juoda rodyklė), o HEV-3 – 73 kDa (3.1 pav., 4 takelis, juoda rodyklė). Po gryninimo CsCl gradientu, SDS-PAGE gelyje identifikuoti tokios pačios masės žiurkių HEV ir HEV-3 kapsidės baltymai (3.1 pav., 5 ir 6 takeliai). Kadangi mielės yra eukariotai, Šifo dažymo būdu patikrinta, ar šie HEV kapsidės baltymai yra glikozilinami (dr. Paulius Lukas Tamošiūnas). Šifo reagentu nusidažė tik žiurkių HEV kapsidės baltymo juostelė (3.2 pav., 4 takelis, juoda rodyklė), o HEV-3 – ne. Tai rodo, kad tik žiurkių HEV kapsidės baltymas yra glikozilinamas mielėse. Tai taip pat paaiškina, kodėl šis baltymas yra matomas kaip išsiplėtusi juostelė SDS-PAGE gelio nuotraukoje (3.1 pav.). Įvairaus dydžio glikanai prisijungę prie baltymo daro įtaką baltymo migracijai gelyje.

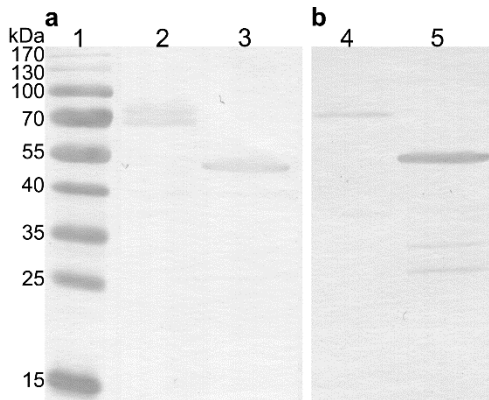
HEV kapsidės baltymų elektroninės mikroskopijos nuotraukoje matyti, kad žiurkių HEV kapsidės baltymas suformuoja apvalias virusų primenančias daleles (VPD), kurių skersmuo maždaug 40 nm (3.3 pav., a). HEV-3 kapsidės baltymas suformavo mažesnes, maždaug 30 nm skersmens VPD (3.3 pav., b). Šios VPD primena dviejų dydžių subvirusines daleles, kurias suformavo



3.3 pav. Elektroninės mikroskopijos nuotraukos: žiurkių HEV kapsidės baltymas (1–645 aminorūgštys) (a), HEV-3 kapsidės baltymas (1–660 aminorūgštys) (b), žiurkių HEV kapsidės baltymas (112–608 aminorūgštys) (c). Nuotraukos padarytos dr. Pauliaus Luko Tamošiūno.

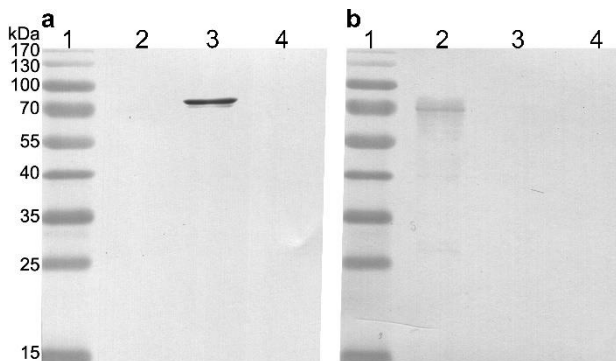
sutrumpinti HEV-1 ir žiurkių HEV kapsidės baltymai susintetinti vabzdžių ląstelėse (Li et al., 2005a, Guu et al., 2009, Li et al., 2011).

Kitų autorių tyrimuose pastebėtas efektyvesnis HEV-1 kapsidės baltymo 112–607 aminorūgščių trumpinto varianto subvirusinių dalelių formavimasis vabzdžių ląstelėse (Li et al., 2005a). Panaši strategija išbandyta ir sutrumpinto HEV-3 kapsidės baltymo (112–608 aminorūgštys) be 111 N galo ir 52 C galo aminorūgščių bei sutrumpinto žiurkių HEV kapsidės baltymo (112–608 aminorūgštys) be 111 N galo ir 37 C galo aminorūgščių sintezėje mielių ląstelėse. Imunoblotingo (IB) metodu, panaudojant pelės polikloninius antikūnus prieš HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus mielių lizatuose buvo identifikuoti HEV-3 (3.4 pav., b, 5 takelis) ir žiurkių HEV (3.4 pav., a, 3 takelis) kapsidės baltymai, kurių molekulinė masė yra apie 53 kDa. Šie sutrumpinti HEV kapsidės baltymai išgryninti centrifuguojant CsCl gradientu ir išanalizuoti elektroniniu mikroskopu (dr. Paulius Lukas Tamošiūnas). Pastebėtos apvalios sutrumpinto žiurkių HEV kapsidės baltymo (112–608 aminorūgštys) suformuotos VPD, kurių skersmuo yra 35–40 nm (3.3 pav., c). Tai rodo, kad žiurkių HEV kapsidės baltymo sutrumpinimas nepaveikia gebėjimo suformuoti VPD. Vis dėlto elektroniniu mikroskopu nebuvo pastebėtos jokios sutrumpinto HEV-3 kapsidės baltymo suformuotos struktūros. Tai leidžia manyti, kad tik viso ilgio HEV-3 kapsidės baltymas susintetintas mielėse gali suformuoti VPD.



3.4 pav. Imunoblotingo su pelės polikloniniais antikūnais prieš žiurkių HEV (a) ir HEV-3 (b) kapsidės baltymus nuotraukos. 1 – baltymų molekulinės masės standartas, *S. cerevisiae* sintetinančių žiurkių HEV kapsidės baltymą (1–645 aminorūgštys) (2 takelis), žiurkių HEV kapsidės baltymą (112–608 aminorūgštys) (3 takelis), HEV-3 kapsidės baltymą (1–660 aminorūgštys) (4 takelis) ir HEV-3 kapsidės baltymą (112–608 aminorūgštys) (5 takelis) lizatai.

IB buvo ištirta šernų ir laukinių žiurkių kraujyje natūralios HEV infekcijos metu susidariusių antikūnų reakcija su rekombinantiniais HEV kapsidės baltymais. Nustatyta, kad laukinių žiurkių kraujyje esantys antikūnai specifiskai atpažino žiurkių HEV (3.5 pav., b), o šernų – HEV-3 (3.5 pav., a). Patikrinus laukinių gyvūnų, kurie nebuvo infekuoti HEV, kraujo mėginius,



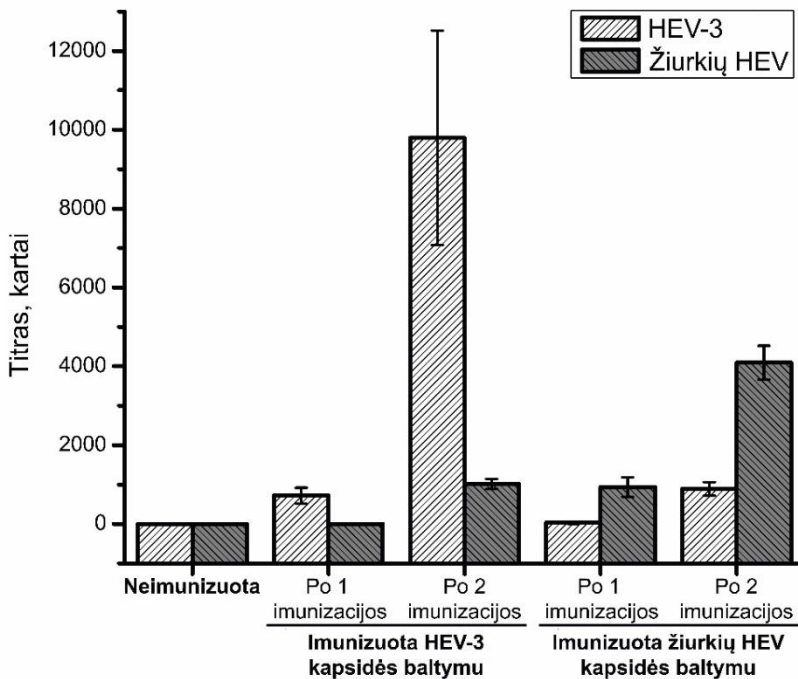
3.5 pav. Imunoblotingo su šerno (a) ir laukinės žiurkės (b) kraujo mėginiais nuotraukos. 1 – baltymų molekulinės masės standartas, 2 – žiurkių HEV kapsidės baltymas, 3 – HEV-3 kapsidės baltymas, 4 – žmogaus parvoviruso 4 kapsidės baltymas (neigiama kontrolė).

jokia reakcija nebuvo nustatyta. Nė vienas tirtas kraujo mėginys nereagavo su žmogaus parvoviruso 4 kapsidės baltymu, kuris naudotas kaip neigiama kontrolė (3.5 pav., a ir b, 4 takelis). Šie rezultatai rodo, kad HEV-3 ir žiurkių HEV sukelia viruso genotipui specifinių antikūnų prieš linijinius epitopus susidarymą. HEV genotipui specifiški linijiniai epitopai yra lokalizuoti HEV kapsidės baltymo P domene, kurį atpažįsta neutralizuojantys antikūnai (Tang et al., 2015).

Toliau MAK kūrimui pasirinkti VPD formuojantys pilno ilgio HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymai. Sutrumpintas žiurkių HEV kapsidės baltymas naudotas MAK apibūdinimui ir serologinėse HEV nustatymo sistemose.

3.1.2 Hibridomų kūrimas ir stabilizavimas

MAK sintetinančios ląstelės sukurtos hibridomų technologijos būdu. Buvo atliekamos dvi hibridizacijos. Viena BALB/c linijos pelių grupė (n = 3) buvo



3.6 pav. HEV kapsidės baltymų imunogeniškumo tyrimas IFA. Grafike pateikti pelių kraujo titro vidurkiai (n=3). Antikūnų prieš HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus titrai pažymėti skirtingomis spalvomis pagal aprašymą.

imunizuota pilno ilgio HEV-3, o kita ($n = 3$) – žiurkių HEV kapsidės baltymu. Šių baltymų imunogeniškumas buvo įvertintas netiesioginėje IFA nustatant specifiskų antikūnų titrą pelių kraujyje po kiekvienos imunizacijos praėjus 28 dienoms (3.6 pav.). Baltymai yra imunogeniški, nes kraujo titrai po kiekvienos imunizacijos didėjo ir po antros imunizacijos HEV-3 kapsidės baltymu pasiekė apie 1:9800, o žiurkių HEV kapsidės baltymu – apie 1:4100 (3.6 pav.). Taip pat pastebėta, kad imunizuojant peles kapsidės baltymais susidaro kryžminiu specifiskumu pasižymintys antikūnai. Pelių, imunizuotų HEV-3 kapsidės baltymu, kraujyje antikūnų prieš žiurkių HEV kapsidės baltymą nustatytas titras – apie 1:1000 (3.6 pav.). Pelių, imunizuotų žiurkių HEV kapsidės baltymu, kraujyje antikūnų prieš HEV-3 kapsidės baltymą nustatytas titras – apie 1:900 (3.6 pav.). Tai rodo, kad HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų antigeninės struktūros yra panašios. Tai buvo pastebėta ir anksčiau, kai laukinėse žiurkėse nustatyti antikūnai sąveikavo su žmogų infekuojančio HEV-1 kapsidės baltymu (Kabrane-Lazizi et al., 1999) bei kai žmonių kraujyje esantys antikūnai reagavo su žiurkių HEV kapsidės baltymu (Dremsek et al., 2012, Shimizu et al., 2016). Suliejus imunizuotų pelių blužnies ląsteles su mielomos ląstelėmis buvo sukurtos 7 hibridomos, sintetinančios antikūnus prieš HEV-3 kapsidės baltymą, ir 11 – prieš žiurkių HEV kapsidės baltymą.

3.1.3 Monokloninių antikūnų apibūdinimas

MAk detalus apibūdinimas yra labai svarbus. Imunocheminiais analizės metodais yra nustatomas MAk giminingumas, specifiskumas antigenui ir kryžminės reakcijos su kitais baltymais. Taip pat yra tiriama MAk prisijungimo vieta antigeno molekulėje (epitopas). Galų gale, MAk galimybės yra išbandomos juos pritaikant įvairiems metodams ir mėginių tyrimams. Taigi, kuo daugiau informacijos yra sužinoma apie MAk, tuo lengviau yra prognozuoti jų veikimą ir pritaikymą eksperimentiniams darbams.

3.1.3.1 MAk giminingumo, specifiskumo ir kryžminių reakcijų tyrimai

Visų pirma buvo atliktas MAk giminingumo, specifiskumo ir kryžminių reakcijų tyrimas. Netiesiogine IFA atliktas MAk kryžminių reakcijų su HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymais tyrimas. Pagal rezultatus, HEV-3 ir žiurkių HEV kolekcijų antikūnai suskirstyti į tris grupes: Aštuoni MAk (CPB11, CPC7, CPH6, CPE9, CPD7, 4G4, 5F3, CPC9) specifiski HEV-3

kapsidės baltymui, šeši MAK (2B2, CPE1, CPH7, CPE2, CPF6, 5G5) specifiškai žiurkių HEV kapsidės baltymui ir keturi MAK (2E6, CPE4, CPD9, 9C8) kryžmiškai specifiškai HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymams (lentelė 3.1, 2 priedas). MAK specifiškumas taip pat buvo patikrintas IB

Lentelė 3.1. MAK sukurtų prieš HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus apibūdinimas.

MAK specifiškai HEV-3 kapsidės baltymui					MAK specifiškai žiurkių HEV kapsidės baltymui			
MAK klonas	IgG poklasis	IFA (HEV-3)	IB (HEV-3)	IF (HEV-3 47832c)	MAK klonas	IgG poklasis	IFA (žiurkių HEV)	IB (žiurkių HEV)
CPB11^a	IgG2a	$2,32 \cdot 10^{-10}$	–	+	2B2	IgG1	$4,32 \cdot 10^{-9}$	–
CPC7^a	IgG2a	$1,97 \cdot 10^{-10}$	–	+	CPE1^d	IgG1	$4,19 \cdot 10^{-10}$	–
CPH6^a	IgG2a	$2,33 \cdot 10^{-10}$	–	+	CPH7^d	IgG1	$1,48 \cdot 10^{-10}$	–
CPE9^b	IgG2a	$7,28 \cdot 10^{-10}$	–	–	CPE2^e	IgG1	$2,57 \cdot 10^{-10}$	+
CPD7^b	IgG2a	$2,32 \cdot 10^{-11}$	–	–	CPF6^c	IgG1	$3,37 \cdot 10^{-10}$	+
4G4^c	IgG1	$9,91 \cdot 10^{-10}$	+	–	5G5	IgG1	$7,93 \cdot 10^{-10}$	+
5F3^c	IgG2b	$9,59 \cdot 10^{-11}$	+	+				
CPC9	IgG1	$2,56 \cdot 10^{-10}$	+	–				

MAK kryžmiškai specifiškai HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymams				
MAK klonas	IgG poklasis	IFA (HEV-3/žiurkių HEV)	IB (HEV-3/žiurkių HEV)	IF (HEV-3 47832c)
2E6^f	IgG2a	$1,46 \cdot 10^{-10}/3,15 \cdot 10^{-10}$	–/–	+
CPE4^f	IgG2a	$1,45 \cdot 10^{-10}/3,38 \cdot 10^{-10}$	–/–	+
CPD9	IgG2a	$2,32 \cdot 10^{-11}/2,39 \cdot 10^{-10}$	+/-	+
9C8	IgG1	$8,24 \cdot 10^{-11}/2,57 \cdot 10^{-10}$	+/+	+

MAK specifiškumo tyrimas IFA. Tariamasis Kd vertės (M) nustatytos netiesiogine IFA yra nurodytos. MAK tyrimas imunoblotingo (IB) ir imunofluorescencinės mikroskopijos (IF) metodais: –, neigiamas rezultatas; +, teigiamas rezultatas.

^{a-f} MAK prieš persidengiančius epitopus grupės. Tyrimas atliktas konkurencine IFA.

metodu, kuriame naudojami baltymai yra denatūruojami ir redukuojami, todėl praranda savo natyvią struktūrą (3.7 pav., 3 priedas). Penki MAK (CPB11, CPC7, CPH6, CPE9, CPD7) iš 8, specifiškų HEV-3 antigenui pagal IFA rezultatus, neatpažino antigeno IB. Tai rodo, kad jie atpažįsta konformacinius epitopus. Kiti 3 MAK (4G4, 5F3, CPC9) atpažįsta linijinius epitopus, nes reaguoja su baltymu IB (3.7 pav., c, 3 takelis, lentelė 3.1, 3 priedas). Trys (2B2, CPE1, CPH7) iš 6 MAK specifiškų žiurkių HEV kapsidės baltymui atpažįsta šio antigeno konformacinius epitopus, o 3 MAK (CPE2, CPF6, 5G5) – linijinius, nes reaguoja su žiurkių HEV kapsidės baltymu ir IFA, ir IB (3.7 pav., b, 2 takelis, lentelė 3.1, 3 priedas). Du (CPD9, 9C8) iš 4 kryžmiškai specifiškų MAK atpažįsta konformacines HEV-3 ir žiurkių HEV antigenų struktūras, nes jie nereagavo su šiais baltymais IB (Lentelė 3.1, 3 priedas).

nustatyta daug regionų, kurie yra identiški (3.8 pav., tamsiai mėlyna spalva). Apibendrinant galima teigti, kad MAK prieš HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus kolekcijas sudaro antikūnai, kurie yra specifiški HEV-3, žiurkių HEV arba abiem baltymams.

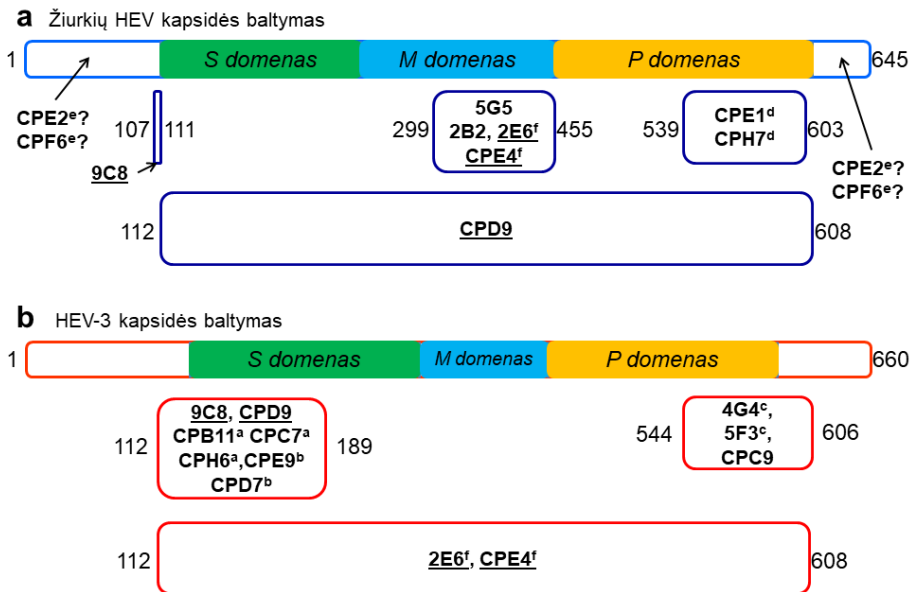
MAK giminingumas HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymams ištirtas netiesioginės IFA metodu ir išreikštas tariamąja disociacijos konstanta (K_d). MAK sukurtų prieš HEV-3 kapsidės baltymą K_d vertės varijavo nuo $9,91 \cdot 10^{-10}$ iki $2,32 \cdot 10^{-11}$ M. MAK prieš žiurkių HEV kapsidės baltymą K_d vertės varijavo nuo $4,32 \cdot 10^{-9}$ iki $1,48 \cdot 10^{-10}$ M (Lentelė 3.1, 2 priedas). Jeigu antikūno tariamosios disociacijos konstantos vertė yra mažesnė už $1 \cdot 10^{-9}$ M, toks antikūnas pasižymi aukštu giminingumu antigenui. Taigi, visi sukurti antikūnai yra giminingi antigenams.

3.1.3.2 MAK atpažįstamų sričių viruso kapsidės baltymuose nustatymas

MAK atpažįstamų epitopų tyrimas buvo atliktas dvejais būdais. Visų pirma konkurencine IFA ištirta konkurencija tarp HRP žymėtų ir nežymėtų MAK ir dviepitopėje IFA išbandytos visos galimos HRP žymėtų ir nežymėtų MAK poros. Remiantis gautais rezultatais, MAK suskirstyti į 6 grupes (Lentelė 3.1, grupės pažymėtos viršutiniu indeksu a–f). MAK priskiriami vienai grupei (a, b, c, d, e arba f) konkuruoja tarpusavyje dėl prisijungimo prie tos pačios HEV kapsidės baltymo srities. Penki MAK nepateko į šias grupes, nes nebuvo nustatyta konkurencija dėl prisijungimo vietos.

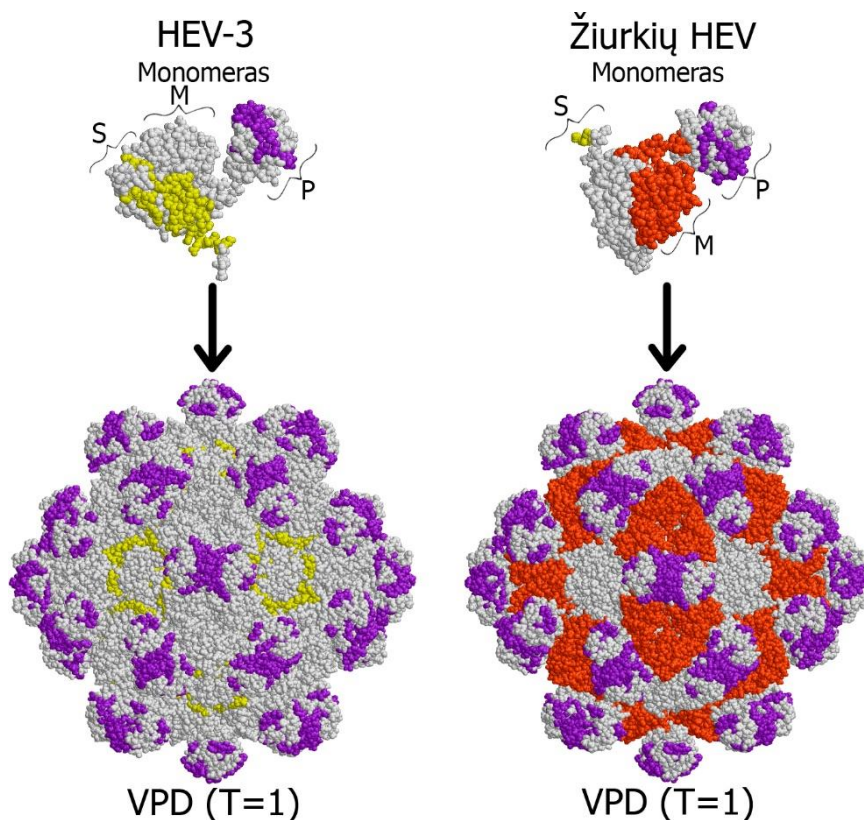
Dėl tikslesnių epitopų nustatymo *E. coli* buvo susintetinti po 3 persidengiančius HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų fragmentus (2.1 pav.). Taip pat šiam tyrimui panaudoti sutrumpinti (112–608 aminorūgštys) HEV kapsidės baltymų variantai apibūdinti 3.1.1 skyriuje. HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų persidengiančių fragmentų sintezė atlikta *E. coli* pET raiškos sistemoje. Kapsidės baltymų persidengiančių fragmentų sintezė patvirtinta SDS-PAGE ir IB su MAK prieš heksahistidinų seką (4 priedas).

MAK prisijungimo vietų nustatymas panaudojant sutrumpintus kapsidės baltymus ir jų persidengiančius fragmentus buvo atliktas išgaudančios IFA ir IB metodais (5 priedas). Jei antikūnai veikia IB, naudotas IB metodas. Jei antikūnai atpažįsta konformacinius epitopus, jų sąveika su HEV kapsidės baltymų fragmentais įvertinta dviepitope IFA, panaudojant baltymų fragmentus išgaudančius MAK prieš histidinų žymę, o MAK žymėtus HRP kaip detekcinius antikūnus. Identifikuota keletas MAK prisijungimo sričių, išsidėsčiusių HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymuose (3.9 pav.). MAK



3.9 pav. MAK atpažįstamų HEV kapsidės baltymų sričių schema. Kryžmiškai specifiški MAK pavadinimai yra pabraukti. a–f – MAK grupės pagal konkurenciją dėl prisijungimo vietas. MAK pažymėti žvaigždute nereagavo su nė vienu žiurkių HEV kapsidės baltymo sutrumpintu variantu.

5G5 ir 2B2 atpažįsta 299–455 aminorūgščių regioną, pažymėtą raudonai, žiurkių HEV kapsidės baltymo M domene (3.10 pav.). M domenai VPD modelyje yra išsidėstę tarp P domenų sudaromų išsikišusių struktūrų. Tikėtina, kad šios vietos yra lengvai pasiekiamos antikūnams. MAK CPE1 ir CPH7 atpažįsta 539–603 aminorūgščių regioną žiurkių HEV kapsidės baltymo P domene (3.10 pav., violetinė spalva). P domenai VPD modelyje sudaro labiausiai išsikišusias struktūras, todėl yra lengviausiai prieinami antikūnams. MAK CPB11, CPC7, CPH6, CPE9 ir CPD7 reaguoja su 112–189 aminorūgščių regionu HEV-3 kapsidės baltymo S domene, kuris VPD modelyje yra labiausiai nutolęs nuo paviršiaus (3.10 pav., pažymėta geltonai). Šie antikūnai galėjo susidaryti dėl imunizacijai naudoto pilno ilgio HEV-3 kapsidės baltymo, kurio VPD struktūra susidarant imuniniam atsakui pelėse buvo suardyta. MAK 4G4, 5F3 ir CPC9 reaguoja su 544–606 aminorūgščių regionu HEV-3 kapsidės baltymo P domene (3.10 pav. pažymėta violetine spalva). Kryžmiškai specifiško HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymams



3.10 pav. HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymo monomero ir VPD modelis ($T=1$), sudarytas iš 60 monomerų. (a) dalyje geltona spalva pažymėtas 112–189 aminorūgščių regionas, kuriame yra MAk 9C8, CPD9, CPB11, CPC7, CPH6, CPE9, CPD7 epitopai; violetine – 544–606, kuriame yra MAk 4G4, 5F3, CPC9 epitopai; (b) dalyje geltona spalva pažymėtas 107–111 aminorūgščių regionas, kuriame yra MAk 9C8 epitopas; raudona – 299–455, kuriame yra MAk 2B2, 5G5, 2E6, CPE4 epitopai; violetine – 539–603, kuriame yra MAk CPE1, CPH7 epitopai.

MAk 9C8 prisijungimo vieta buvo nustatyta detalčiau. Šis antikūnas reaguja su žiurkių HEV kapsidės baltymo 107–456, o HEV-3 – 112–189 aminorūgščių regionais. MAk 9C8 nereaguja su sutrumpintu žiurkių HEV kapsidės baltymu (112–608 aminorūgštys). Tai rodo, kad MAk 9C8 atpažįsta žiurkių HEV kapsidės baltymo epitopą 107–111 aminorūgščių srityje (3.10 pav., pažymėta geltonai). HEV-1 – HEV-4 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų aminorūgščių sekų palyginimas, atliktas naudojant Gonnet palyginimo matricą, rodo, kad galimas MAk 9C8 atpažįstamas epitopas yra sudarytas iš 4

aminorūgščių N–TAPV–C sekos, kuri yra identiška HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymams (3.11 pav.). Kitas kryžmiškai reaguojantis MAK CPD9 atpažįsta 112–189 aminorūgščių sritį HEV-3 kapsidės baltymo S domene (3.10 pav., pažymėta geltonai) ir 112–608 aminorūgščių sritį žiurkių HEV kapsidės baltyme (3.9 pav.). Kryžmiškai reaguojantys MAK 2E6 ir CPE4 jungiasi su 299–455 aminorūgščių regionu žiurkių HEV kapsidės baltymo M domene (3.10 pav., pažymėta raudonai) ir 112–608 aminorūgščių regionu HEV-3 kapsidės baltyme (3.9 pav.). Greičiausiai HEV-3 kapsidės baltymo

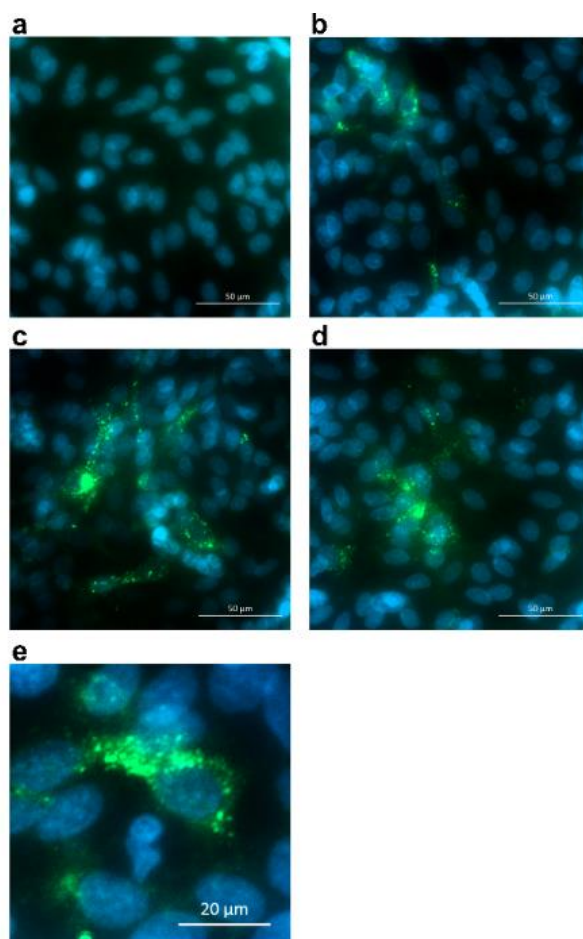
	Aminorūgščių seka	GenBank nr.
rat HEV	SPMTAQAPAP ¹⁰⁷ NTAPV ¹¹¹ PDVDSRGSIL	GU345042
HEV-1	APLTAVAPAH ¹¹⁸ DTPPV ¹²² PDVDSRGAIL	NP_056788
HEV-2	AALTAVAPAH ¹¹⁸ DTSPV ¹²² PDVDSRGAIL	AAA45732
HEV-3	APLTAISPAP ¹¹⁸ DTAPV ¹²² PDVDSRGAIL	FJ705359
HEV-4	SPLTAVAPAP ¹³⁰ DTAPV ¹³⁴ PDADSRGAIL	CAB83210
	: : ** : ** : * ** * * . * * * * : **	

3.11 pav. Žiurkių HEV ir HEV-1 – HEV-4 kapsidės baltymų aminorūgščių sekų palyginimas. Spėjamas MAK 9C8 atpažįstamas epitopas pažymėtas raudonai. „*“ – aminorūgščių sutapimas, „:“ – labai panašios aminorūgštys, „.“ – mažai panašios aminorūgštys.

fragmentuose nesusidaro šių MAK atpažįstami epitopai. MAK CPE2 ir CPF6 neatpažįsta nė vieno sutrumpinto kapsidės baltymo, todėl tikėtina, kad šių MAK prisijungimo vietos yra N arba C žiurkių HEV kapsidės baltymo gale (3.9 pav.). Toks MAK atpažįstamų epitopų išsidėstymas visuose HEV-3 kapsidės baltymų domenuose nustatytas pirmą kartą. Anksčiau aprašyti MAK reagoja tik su kapsidės baltymo P domenu (Riddell et al., 2000, Schofield et al., 2000, Meng et al., 2001, Zhang et al., 2005, He et al., 2007, Takahashi et al., 2008a, Zhang et al., 2009a, Wei et al., 2014, Gu et al., 2015, Tang et al., 2015, Kobayashi et al., 2016). Literatūroje aprašytuose tyrimuose taip pat nustatyta, kad neutralizuojantys antikūnai prieš HEV kapsidės baltymą atpažįsta konformacinius ir linijinius epitopus 458–607 (Zhou et al., 2004), 578–607 (Schofield et al., 2000) ir 452–617 (Meng et al., 2001) aminorūgščių regionuose.

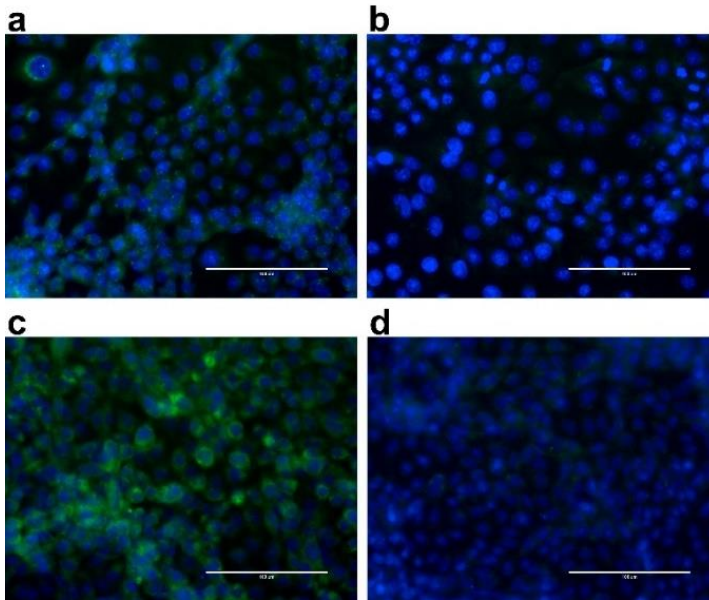
3.1.3.3 MAk gebėjimo atpažinti natūralų HEV-3 tyrimai

MAk gebėjimas atpažinti natūralų virusą yra labai svarbi antikūnų savybė – tik tokie antikūnai gali būti naudojami natyvaus viruso tyrimams. Siekiant tai iširti buvo atliktas HEV-3 infekuotų ląstelių kultūrų dažymas imunofluorescencijos metodu panaudojant sukurtus MAk prieš HEV-3. Visi MAk, kurie atpažįsta HEV-3, buvo patikrinti, ar atpažįsta HEV-3 47832c



3.12 pav. MAk gebėjimo atpažinti HEV-3 infekuotose ląstelėse tyrimo IF nuotraukos. HEV-3 kapsidės baltymas nudažytas žaliai (FITC), ląstelių branduolys mėlynai (DAPI). a – MAk CPE9 (neigiamas rezultatas), b – MAk 5F3, c – MAk CPD9, d – MAk 2E6, e – MAk CPD9 didesnis padidinimas negu (c). Mastelio juostos: 50 μm (a–d) ir 20 μm (e).

kamieno virionus. Nustatyta, kad HEV-3 specifiškai MAK CPB11, CPC7, CPH6, CPE9, CPD7 ir kryžmiškai specifiškai MAK 2E6, CPE4, CPD9, 9C8 identifiko HEV-3 žmogaus plaučių adenokarcinomos (A549/D3) ląstelėse (3.12 pav., lentelė 3.1, 6 priedas). MAK 5F3 gebėjimas identifikuoti natūralų HEV-3 taip pat patikrintas su viruso kamieniu, kuris išskirtas iš Lietuvoje sumedžioto šerno. Šie antikūnai nustatė HEV, kuris infekavo nežmoginių primatų inkstų (Vero) ir kiaulių inkstų (PK-15) ląsteles (3.13 pav.). MAK prisijungimo vietų HEV kapsidės baltyme tyrimas ir IF analizė rodo, kad



3.13 pav. MAK 5F3 gebėjimo atpažinti HEV-3 infekuotose ląstelėse tyrimo IF nuotraukos. HEV-3 kapsidės baltymas nudažytas žaliai (AlexaFluor488), ląstelių branduolys mėlynai (DAPI). a – PK-15 ląstelės, c – Vero ląstelės infekuotos HEV. Neigiamos kontrolės: b – PK-15, d – Vero ląstelės. Mastelio juosta: 100 μ m (a–d).

MAK, kurie atpažįsta viruso kapsidę infekuotose ląstelėse, jungiasi prie įvairių epitopų. MAK CPB11, CPC7, CPH6, CPD9 ir 9C8 jungiasi prie HEV-3 kapsidės baltymo S domeno, kuris erdvinėje struktūroje yra sunkiau pasiekiamas (3.9, 3.10 pav.). Tikėtina, kad šie MAK gali prisijungti, nes infekuotų ląstelių fiksavimas acetono ir metanolio tirpalu dažant mėginius IF, dalinai išardo HEV-3 virionus. MAK 5F3 ir 4G4 jungiasi prie HEV-3 kapsidės baltymo P domeno (3.9, 3.10 pav.). P domenas yra viruso kapsidės paviršiuje, todėl yra lengvai prieinamas šiems MAK. Natūralų HEV-3 atpažįstančių MAK

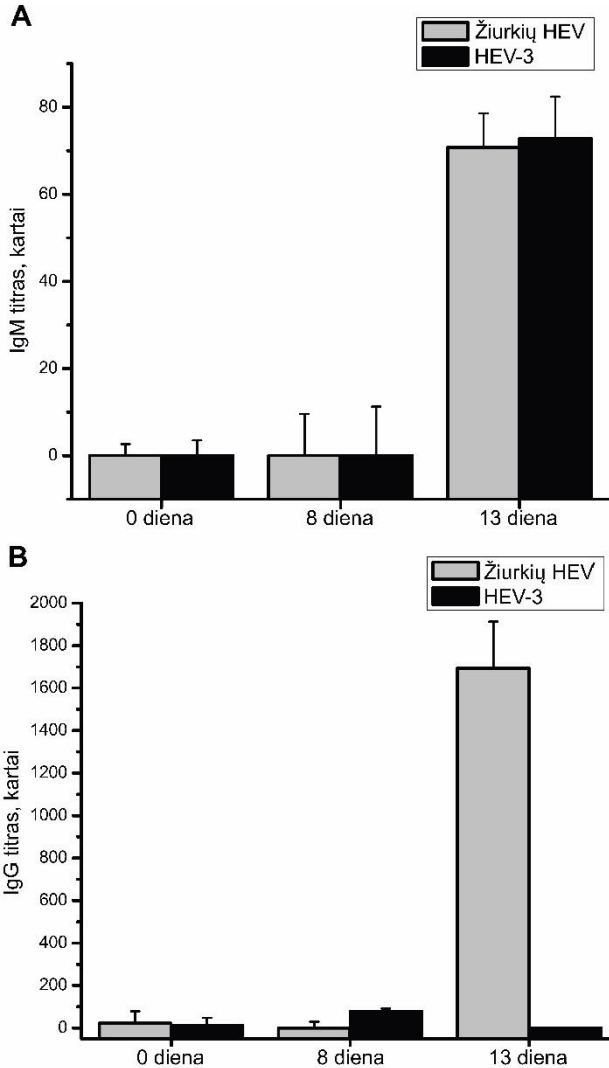
2E6 ir CPE4 prisijungimo vieta žiurkių HEV kapsidės baltyme nustatyta M domene, todėl tikėtina, kad HEV-3 kapsidės baltyme šie MAk atpažįsta taip pat M domeną (3.9 pav.). M domenas VPD modelyje yra paviršiuje tarp išsikišusių P domenų sudaromų struktūrų (3.10 pav.). Apibendrinant IFA, IB, IF ir MAk atpažįstamų epitopų nustatymo rezultatus, galima teigti, kad sukurtų kolekcijų MAk atpažįsta labai įvairias HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų vietas. Be to, tai, kad MAk sukurti prieš rekombinantinius HEV kapsidės baltymus geba atpažinti natūralų virusą, rodo, kad mielėse susintetintos VPD atkartoja natūralaus viruso struktūrą. Taip pat tai reiškia, kad sukurti MAk prieš HEV kapsidės baltymus yra puikus biotechnologijos įrankis HEV tyrimams.

3.2 Serologinių HEV nustatymo sistemų modeliavimas

Serologinės HEV nustatymo sistemos nustato antikūnus prieš virusą. IgG klasės antikūnai nustatomi infekcijos pabaigoje arba rodo praėjusią infekciją. IgM klasės antikūnai nustatomi infekcijos pradžioje ir rodo vykstančią infekciją. Norint nustatyti antikūnus kraujo mėginiuose, juos galima išgauti naudojant viruso baltymus. HEV infekcijos metu susidaro antikūnai prieš viruso kapsidės baltymą, todėl serologinių sistemų kūrimui panaudoti mielėse sintetinti HEV-3, pilno ilgio ir sutrumpintas žiurkių HEV kapsidės baltymai. Šiame darbe buvo tiriami žiurkių, kiaulių ir žmonių mėginiai, todėl kiekvienam mėginių tipui reikėjo sumodeliuoti ir išbandyti atskiras serologines sistemas. Šiame skyriuje aptariamas serologinių sistemų modeliavimas, o HEV paplitimo skirtinguose mėginiuose rezultatai aptariami tolesniuose skyriuose.

Kiaulių ir žmonių mėginių atveju, sumodeliuotų sistemų išbandymui, mėginiai visų pirma buvo apibūdinti įsigytomis komercinėmis sistemomis. Vėliau šie mėginiai ištirti sukurtais testais. Žiurkių kraujo mėginių tyrimams nėra galimybės įsigyti specializuotų antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymo sistemų. Taigi, buvo iškeltas uždavinys sukurti IFA metodą, kuris nustatytų žiurkių antikūnus prieš žiurkių HEV kapsidės baltymą. Žiurkių kraujo mėginių tyrimo IFA rezultatų interpretaciją palengvina teigiamos ir neigiamos kontrolės naudojimas. Šiuo atveju nuspręsta naudoti laboratorinių žiurkių, imunizuotų žiurkių HEV kapsidės baltymu, polikloninius antikūnus. Polikloninių antikūnų kūrimui laboratorinės žiurkės buvo imunizuotos 1 kartą. Imunizacija atlikta vieną kartą, siekiant sukurti polikloninius antikūnus, kuriuose būtų ir IgM, ir IgG klasės antikūnų, kadangi sukurta IFA sistema bus

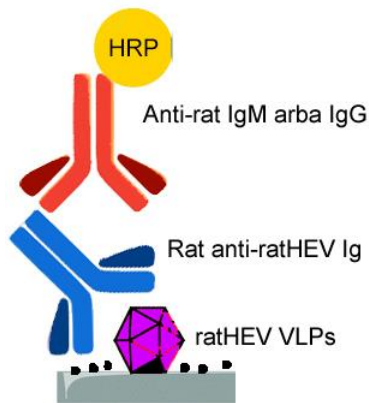
naudojama IgM ir IgG antikūnų prieš HEV nustatymui. Jeigu būtų atliekamos 2 ar daugiau imunizacijų susidarytų imuninė atmintis ir gyvūno kraujyje dominuotų IgG klasės antikūnai. Skirtingais laiko momentais surinkus kraujo mėginius buvo patikrintas žiurkių HEV ir HEV-3 kapsidės baltymams specifiskų IgM (3.14 pav., A) ir IgG (3.14 pav., B) titro susidarymas.



3.14 pav. IgM (A) ir IgG (B) klasių antikūnų titras laboratorinių žiurkių kraujyje. Skirtingomis spalvomis pažymėti stulpeliai rodo antikūnų titrą, nustatytą naudojant paveikslo aprašyme nurodytus HEV kapsidės baltymus.

Nustatyta, kad sąlyginai mažas IgM klasės antikūnų, reaguojančių su žiurkių HEV ir HEV-3 kapsidės baltymais, titras (apie 1:70) susidarė praėjus 13 dienų nuo imunizacijos. IgM antikūnų sąveika su abejais baltymais galima paaiškinti tuo, kad šios klasės antikūnai nepasižymi specifiskumu ir dideliu afiniskumu antigenams. IgG antikūnų prieš žiurkių HEV kapsidės baltymą titras (1:1693) buvo nustatytas taip pat praėjus 13 dienų po imunizacijos. Skirtingai negu IgM klasės antikūnai, IgG buvo specifiški žiurkių HEV kapsidės baltymui. IgG antikūnų titras buvo gerokai didesnis negu IgM. Taigi imunizavus laboratorines žiurkes žiurkių HEV kapsidės baltymu, IgM ir IgG antikūnai kraujyje nustatyti praėjus 13 dienų nuo imunizacijos. Serologinių metodų teigiamai kontrolei žiurkių polikloniniai antikūnai surinkti praėjus 14 dienų nuo imunizacijos.

Antikūnų prieš žiurkių HEV žiurkių mėginiuose nustatymo sistemai buvo išbandytas netiesioginės IFA formatas (3.15 pav.). Šios IFA metu plokštelės šulinėlių dugne imobilizuojami mielėse susintetinti pilno ilgio arba sutrumpintas (112–608 aminorūgštys) žiurkių HEV kapsidės baltymai. Po laisvo paviršiaus užblokavimo inkubuojamas žiurkių kraujo mėginys. Šiame



3.15 pav. Antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymo sistemos schema.

darbe antikūnai buvo nustatomi iš žiurkių krūtinės ertmės skysčio (CCF), kuris surenkamas krūtinės ertmę plaunant PBS. Imunoglobulinai esantys CCF išsodinami amonio sulfatu. Tyrimui imunoglobulinų suspensija praskiedžiama suvienodinant baltymų koncentraciją. Jei tiriamajame mėginyje yra antikūnų prieš žiurkių HEV, jie prisijungia prie antigeno ir yra detektuojami antriniais antikūnais prieš žiurkių IgG arba IgM žymėtais HRP. Tokio komplekso susidarymas yra nustatomas įpylus substrato, kuris fermentinės reakcijos metu virsta spalvotu produktu, kurio optinis tankis yra

išmatuojamas. Tokio tipo IFA sistema gali nustatyti IgM arba IgG klasės antikūnus prieš žiurkių HEV. Žiurkių HEV paplitimas tirtuose laukinių žiurkių mėginiuose aptiriamas 3.3 skyriuje. Ištyrus mėginius buvo pasirinktas sutrumpintas kapsidės baltymas, nes naudojant pilno ilgio kapsidės baltymą išmatuojamas didesnis foninis signalas (7 priedas).

Kiaulių ir žmonių IgG klasės antikūnų prieš HEV-3 ir žiurkių HEV nustatymui taip pat pasirinktas netiesioginės IFA formatas kaip ir žiurkių mėginių tyrimams. IFA plokštelės šulinėliuose pradžioje imobilizuoti VPD formuojantys HEV-3, sutrumpintas ir pilno ilgio žiurkių HEV kapsidės baltymai. Po blokavimo į šulinėlius pilti kiaulių arba žmonių kraujo serumo mėginiai skiesti 1:10. Išgaudyti IgG antikūnai prieš HEV detektuoti antrinais antikūnais atitinkamai prieš kiaulių IgG arba žmonių IgG žymėtais HRP. Pasirinkta naudoti tiek HEV-3, tiek žiurkių HEV kapsidės baltymus, nes abu viruso variantai gali infekuoti žmonės (Sridhar et al., 2020). Literatūroje galima rasti užuominas, kad kai kurių žmonių kraujyje nustatyti antikūnai stipriau reaguoja su žiurkių HEV kapsidės baltymu negu su HEV-1 ar HEV-3 (Dremsek et al., 2012, Shimizu et al., 2016). Be to, tikėtina, kad žiurkių HEV infekuoja kiaules (Pavio et al., 2017). Iškelta hipotezė, kad serologiniuose testuose naudojant skirtingų HEV variantų kapsidės baltymus galima atskirti, ar su HEV-3 ar žiurkių HEV infekcija buvo susidurta.

3.3 Laukinių žiurkių mėginių tyrimas

Žiurkės gali pernešti įvairius ligų sukėlėjus (Strand ir Lundkvist, 2019). Yra diskutuojama, ar žiurkės gali pernešti HEV-3 žmonėms. 2018–2020 m. pasirodė pirmos publikacijos, kuriose aprašyti žiurkių HEV infekcijų atvejai žmonėse (Sridhar et al., 2018, Andonov et al., 2019, Sridhar et al., 2020). Taigi labai svarbu įvertinti HEV paplitimą žiurkių populiacijoje. Tyrimo metu keliose Lietuvos vietose buvo sugautos 109 žiurkės (3.16 pav.), iš kurių 27 buvo pilkosios žiurkės (*Rattus norvegicus*) ir 82 – juodosios žiurkės (*R. rattus*). Visų pirma žiurkių kepenų mėginiai buvo ištirti molekuliniais metodais nustatant HEV RNR, o vėliau atlikta kraujo mėginių serologinė analizė. Mėginių tyrimas pradėtas nuo HEV RNR nustatymo jau aprašytais



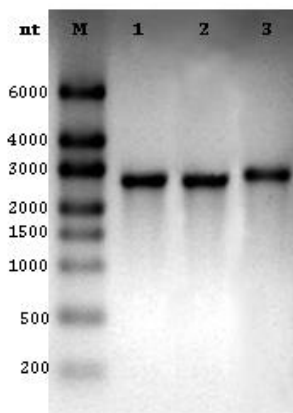
3.16 pav. Laukinių žiurkių gaudymo vietos. Žemėlapyje pateikti rajonų, kuriuose pagautos žiurkės, pavadinimai ir sugautų gyvūnų skaičius. Skrituliais pažymėtos vietos, kuriose buvo sugautos žiurkės, kurioms nustatyta HEV RNR arba antikūnai prieš HEV. Apskritimais pažymėtos vietos, kuriose sugautos žiurkės, neturinčios žiurkių HEV infekcijos žymenų.

metodais (Jothikumar et al., 2006, Widén et al., 2014), kad žinotume, kuriuose mėginiuose galima tikėtis nustatyti antikūnus.

3.3.1 HEV RNR nustatymas ir HEV genominių fragmentų filogenetinė analizė žiurkių mėginiuose

HEV RNR paieška atlikta iš žiurkių kepenų audinio išskyrus RNR. RNR mėginiai buvo tiriami AT–kPGR sistemomis specifiskomis žiurkių HEV ir HEV-1–HEV-4 genotipams. Žiurkių HEV nustatymui naudota anksčiau aprašyta kPGR pradmenų ir zondo sistema (Widén et al., 2014). Šios sistemos PGR produktas yra žiurkių HEV (*GenBank* GU345042) ORF2 74 bp konservatyvus regionas. HEV-1–HEV-4 nustatymui taip pat naudota anksčiau aprašyta kPGR pradmenų ir zondo sistema (Jothikumar et al., 2006). Šios sistemos pradmenų ir zondo sekos buvo minimaliai modifikuotos, siekiant tikslesnio nustatymo ir diferencijavimo tarp žiurkių HEV ir HEV-1–HEV-4. HEV-1–HEV-4 nustatančios kPGR produktas yra 67 bp HEV (*GenBank* FJ748531) ORF2 regionas. HEV ir iš kepenų audinio išskirtos suminės RNR

santykio įvertinimui buvo sukurti vidinės kontrolės kPGR pradmenys ir zondas. Taikiniu pasirinktas žiurkių β -aktino iRNR 153 bp regionas (ACTB). Visų paminėtų sistemų pradmenys ir zondai pateikti lentelėje 2.3. Norint kiekybiškai nustatyti RNR kiekį mėginyje, reikalingas RNR standartas, kuris naudojamas kalibracinei kreivei. RNR standartas yra RNR transkriptas, kurio ilgis ir kopijų skaičius yra žinomi. Standartai reikalingi visiems taikiniams, todėl buvo susintetinti žiurkių HEV, HEV-1–HEV-4 ir ACTB RNR



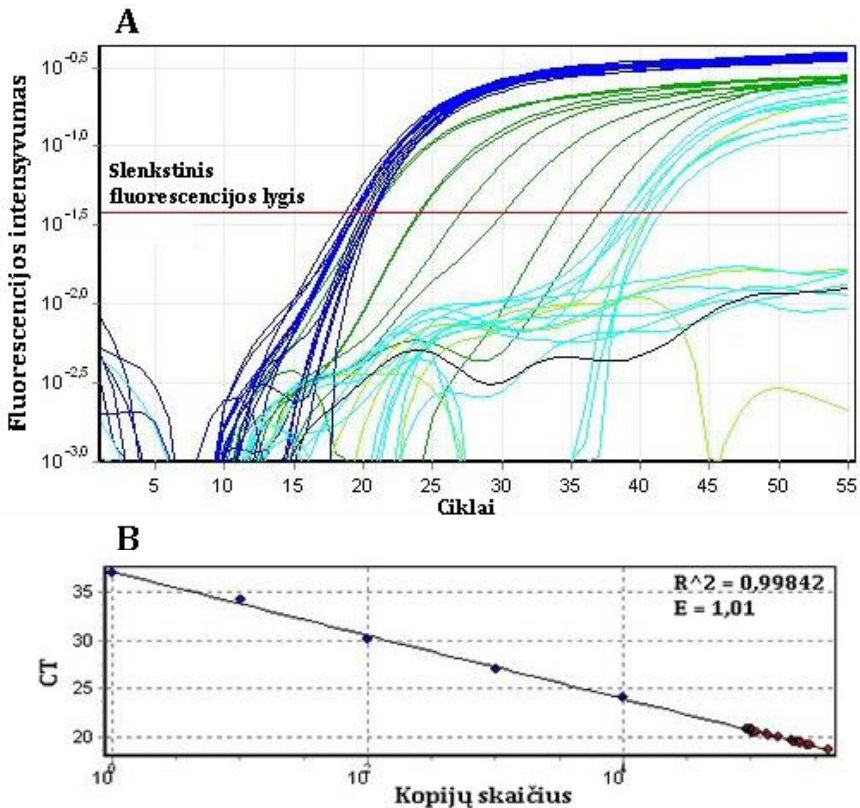
3.17 pav. RNR transkriptų kokybės įvertinimo RNR elektroforezės nuotrauka. RNR fragmentai 1 % agarozės gelyje vizualizuoti etidžio bromidu; 1 – žiurkių HEV transkriptai (2692 nt); 2 – HEV-1–HEV-4 transkriptai (2686 nt); 3 – ACTB transkriptai (2768 nt); M – RNR fragmentų ilgio standartas.

transkriptai (3.17 pav.). RNR standartų apibūdinimas pateiktas lentelėje 3.2. Pagal atliktus skaičiavimus transkriptai skiedžiami iki 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10, 1 kopijų skaičiaus PGR reakcijoje. Transkriptų kDNR naudota HEV RNR vertinimui laukinių žiurkių kepenų audiniuose žiurkių HEV, HEV-1–HEV-4 ir ACTB kPGR sistemomis. Mėginių tyrimo žiurkių HEV specifiška kPGR rezultatai pateikti 3.18 pav., o HEV-1–HEV-4 – 3.19 pav. Laikyta, jog mėginyje yra HEV RNR, kai „Rotor–Gene Q MDx“ programa pagal sudarytą

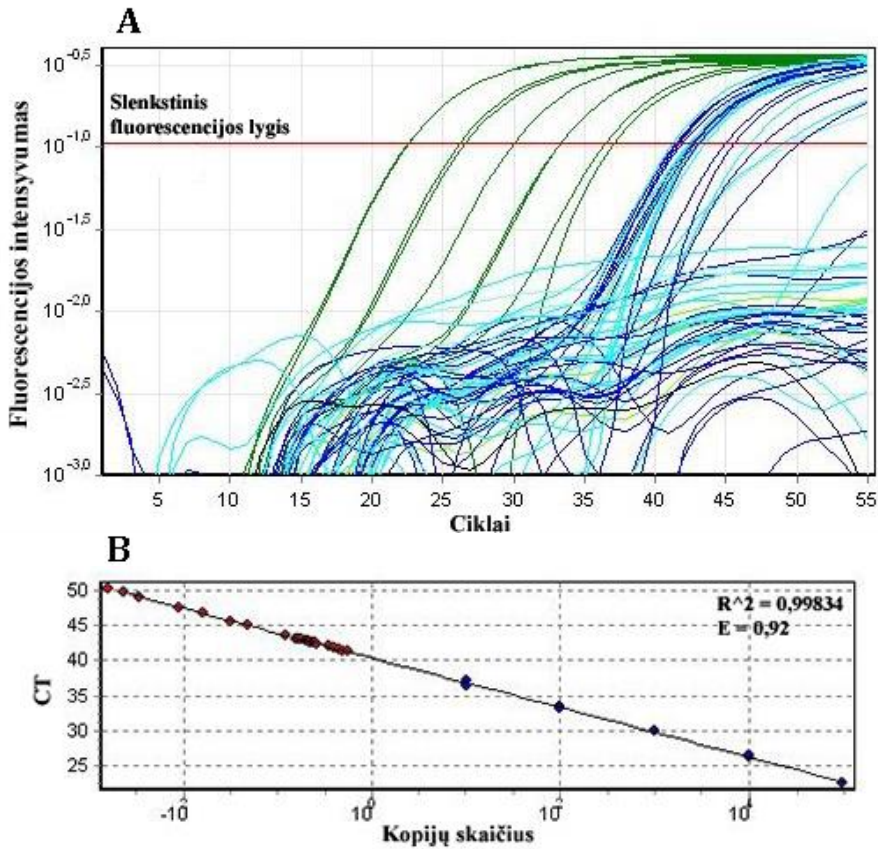
Lentelė 3.2. Susintetintų RNR standartų ilgis ir kopijų skaičius 1 μ g RNR.

Sistema	Transkripto ilgis, nt	Transkriptų kopijų skaičius 1 μ g RNR
rHEV	2692	$6,718 \cdot 10^{11}$
HEV1–4	2686	$6,733 \cdot 10^{11}$
ACTB	2768	$6,533 \cdot 10^{11}$

standartinę kreivę kPGR reakcijoje nustato 1 ir daugiau virusinės RNR kopijų bei šie rezultatai atsikartoja, atlikus 3 nepriklausomus eksperimentus.



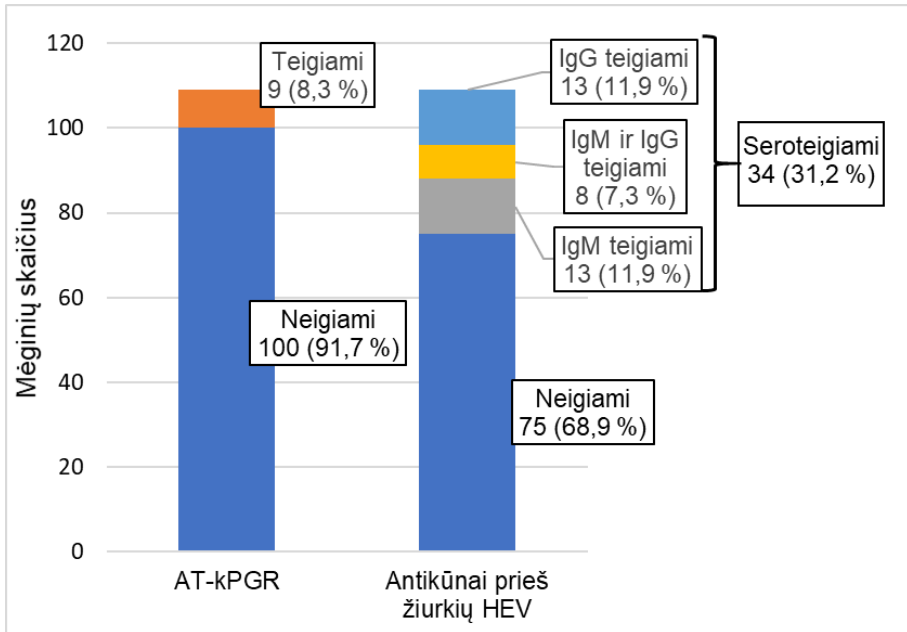
3.18 pav. Žiurkių kepenų RNR mėginių tyrimo žiurkių HEV kPGR sistema rezultatai. A – žiurkių HEV standarto ir tiriamų mėginių fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo kPGR ciklo grafikas. Tamsiai žalios kreivės – standartas; šviesiai žalios kreivės – standarto reakcijos be AT etapo; tamsiai mėlynos kreivės – tiriamų mėginių reakcijos su AT etapu; žydros kreivės – tiriamų mėginių reakcijos be AT etapo; juoda kreivė – neigiama kontrolė (švarus vanduo be nukleazių). B – kalibracinė kreivė, skirta žiurkių HEV RNR kopijų skaičiaus nustatymui kPGR reakcijoje. R^2 – koreliacijos koeficientas; E – efektyvumas; mėlyni taškai – nustatyti standarto kopijų skaičiai kPGR reakcijoje; raudoni taškai – tiriamuose mėginiuose nustatytas žiurkių HEV RNR kopijų skaičius kPGR reakcijoje.



3.19 pav. Žiurkių kepenų RNR mėginių tyrimo HEV-1–HEV-4 kPGR sistema rezultatai. A – HEV-1–HEV-4 standarto ir tiriamų mėginių fluorescencijos intensyvumo priklausomybės nuo kPGR ciklo grafikas. Tamsiai žalios kreivės – standartas; šviesiai žalios kreivės – standarto reakcijos be AT etapo; tamsiai mėlynos kreivės – tiriamų mėginių reakcijos su AT etapu; žydros kreivės – tiriamų mėginių reakcijos be AT etapo; juoda kreivė – neigiama kontrolė (švarus vanduo be nukleazų). B – kalibracinė kreivė, skirta 1–4 genotipų HEV RNR kopijų skaičiaus nustatymui kPGR reakcijoje. R^2 – koreliacijos koeficientas; E – efektyvumas; mėlyni taškai – nustatyti standarto kopijų skaičiai kPGR reakcijoje; raudoni taškai – tiriamuose mėginiuose nustatytas 1–4 genotipų HEV RNR kopijų skaičius kPGR reakcijoje.

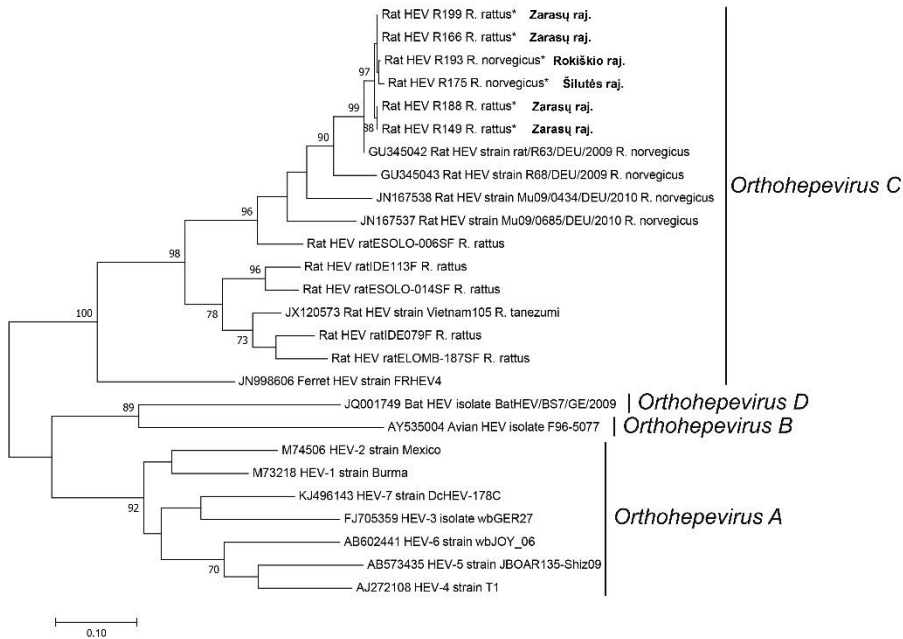
Žiurkių HEV specifiška AT–kPGR sistema nustatė 9 iš 109 teigiamus kepenų audinio mėginius (3.20 pav.). Iš jų 6 mėginiai išskirti iš *R. rattus*, o 3 – *R. norvegicus*. Visi tirti žiurkių mėginiai buvo neigiami pagal HEV-1–HEV-

4 specifiską AT–kPGR sistemą. Panašūs rezultatai buvo aprašyti ir anksčiau. Nustatyta, kad *R. norvegicus* nėra infekuojamas HEV-1, HEV-3 ir HEV-4 (Li et al., 2013a, Ryll et al., 2017). Šiame darbe gauti rezultatai patvirtina tik vieną kartą anksčiau nustatytą faktą, kad Europoje *R. rattus* yra infekuojamas žiurkių HEV (Ryll et al., 2017).



3.20 pav. Žiurkių HEV tyrimo molekuliniais ir serologiniais metodais rezultatai.

HEV infekcija žiurkėse buvo patvirtinta lizdine PGR. Šiam tyrimui pasirinkta anksčiau aprašyta plataus taikinių spektro lizdinė PGR sistema, kuri pirmą kartą panaudota žiurkių HEV nustatymui (John et al., 2010b). Šios PGR sistemos produktų sekos yra nuskaitomos DNR sekoskaita ir naudojamos filogenetiniams žiurkių HEV ryšiams įvertinti. Lizdine PGR pavyko pagausinti tik 6 iš 9 AT–kPGR teigiamų mėginių sekas. Šie PGR produktai buvo klonuoti į vektorius ir jų sekos nustatytos DNR sekoskaita. Atlikus DNR sekų palyginimą, nustatytas 98,7–99,4 % nukleotidų sekų tapatumas su žiurkių HEV genotipo C1 atskaitos genomu rat/R63/DEU/2009 (*GenBank* GU345042) (John et al., 2010a). Lietuvoje identifikuotų žiurkių HEV genominių fragmentų filogenetinė analizė maksimalios tikimybės (angl.



3.21 pav. Filogenetinis medis, kuris rodo Lietuvoje identifikuotų žiurkių HEV sekų ryšį su kitais HEV. Mastelio juostos ilgis 0,10 rodo filogenetinius atstumus pagal nukleotidų pasikeitimus vienoje pozicijoje. Žvaigždute pažymėtos sekos, kurios identifikuotos šiame darbe.

maximum likelihood) metodu parodė, kad nepriklausomai nuo žiurkių rūšies, visos nustatytos žiurkių HEV sekos yra vienoje atšakoje su žiurkių HEV nustatomu Vokietijoje (3.21 pav.). Aukštas žiurkių HEV sekų, nustatytų vienoje šalyje ar regione, panašumas yra pastebėtas ir anksčiau. Tai rodo, kad žiurkių HEV cirkuliuoja vietinėse populiacijose (Johnė et al., 2012, Li et al., 2013c, Widén et al., 2014, Ryll et al., 2017).

3.3.2 Antikūnų prieš žiurkių HEV nustatymas žiurkių mėginiuose serologiniais metodais

Išanalizavus 109 žiurkių kraujo mėginius, IgM ir/arba IgG prieš HEV nustatyti 34 žiurkėms (31,2 %) (3.20 pav.). Tokia seroteigiamų mėginių dalis yra šiek tiek didesnė už 24,5 % nustatytus Vokietijoje (Johnė et al., 2012). Sąlyginai aukštas teigiamų mėginių dažnis rodo, kad žiurkių HEV cirkuliuoja tirtose žiurkėse.

Žiurkių HEV RNR ir antikūnai prieš žiurkių HEV buvo nustatyti 4,6 % žiurkių. 26,6 % žiurkių buvo nustatyti antikūnai prieš HEV, o tik HEV RNR – 3,7 %. Šie rezultatai patvirtina ir anksčiau pastebėtas tendencijas atliekant laukinių ir laboratorinių žiurkių HEV infekcijos tyrimus. Yra pademonstruota, kad tiriant *R. norvegicus* užsikrėtusias žiurkių HEV yra nustatoma žiurkių HEV RNR arba antikūnai prieš žiurkių HEV arba abu (Purcell et al., 2011, Johne et al., 2012). Europoje duomenys apie ryšį tarp HEV RNR ir antikūnų prieš HEV nustatymą yra menki *R. rattus* populiacijoje (Ryll et al., 2017). Šiame darbe nustatytos HEV infekcijos žymenų tendencijos *R. rattus* yra panašios į anksčiau aprašytas *R. norvegicus* (Johne et al., 2012). Tai leidžia teigti, kad žiurkių HEV infekcijos metu žiurkėse gali būti nustatoma viruso RNR ir/arba antikūnai prieš HEV nepriklausomai nuo žiurkių rūšies. Vertinant antikūnų prieš HEV arba HEV RNR nustatymą kaip HEV infekcijos žymenį, nustatyti skirtumai tarp žiurkių charakteristikų (Lentelė 3.3).

Lentelė 3.3. Laukinių žiurkių HEV infekcijų dažnis pagal charakteristikas.

Charakteristika	Žiurkių skaičius	Žiurkių, kurioms nustatytas bet kuris HEV žymuo dalis, %	95 % PI
Rūšis			
<i>Rattus rattus</i>	27	55,56	37,30-72,43
<i>R. norvegicus</i>	82	28,05	19,43-38,63
Iš viso:	109		
Lytis			
Patelė	56	28,57	18,34-41,55
Patinas	49	38,78	26,41-52,78
<i>Nenustatyta</i>	4	75,00	
Iš viso:	109		
Amžiaus grupė			
jauniklis	67	22,39	13,96-33,81
suaugėlis	42	54,76	39,94-68,78
Iš viso:	109		

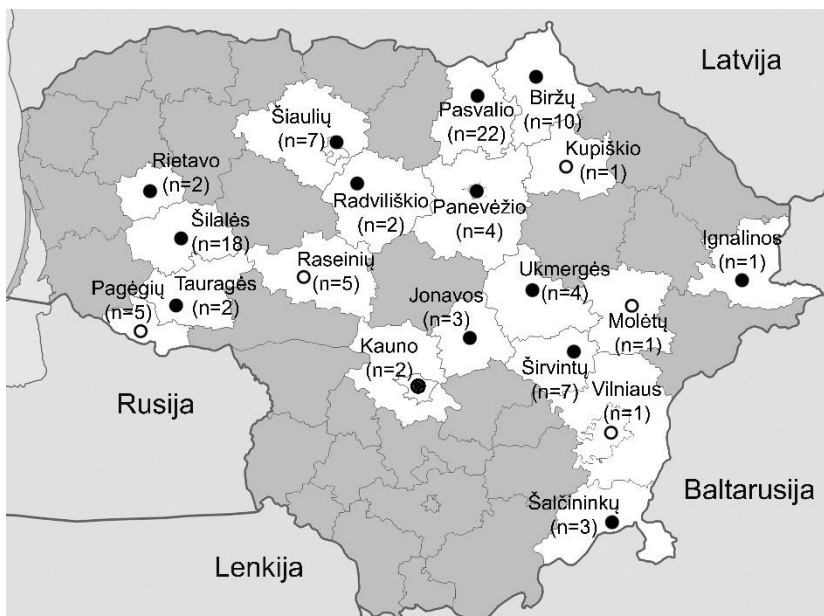
Palyginus žiurkių rūšis, nustatytas statistiškai reikšmingai didesnis HEV infekcijų dažnis *R. rattus* mėginiuose, lyginant su *R. norvegicus* ($p = 0,0176$). Visgi šį skirtumą reikėtų vertinti atsargiai, nes ištirtos 27 *R. rattus* ir 82 *R. norvegicus*. Su HEV infekcijomis taip pat statistiškai reikšmingai dažniau būna susidūrusios suaugusios žiurkės lyginant su jaunikliais ($p = 0,0012$). Tai galima paaiškinti tuo, kad vyresnės žiurkės turėjo daugiau laiko užsikrėsti

HEV. Tokia pat tendencija pastebėta tiriant ir kitus gyvūnus bei žmones (van Gageldonk-Lafeber et al., 2017). Vertinant HEV infekcijų dažnį pagal žiurkių lytį, nenustatytas statistiškai reikšmingas skirtumas tarp patinų ir patelių ($p = 0,3686$), nors patinų HEV infekcijų dažnis 38,78 % (PI 95 % 26,41–52,75) yra didesnis už patelių – 28,57 % (PI 95 % 18,34–41,55). Taigi gauti rezultatai rodo, kad Lietuvoje sugautose žiurkėse plintančio žiurkių HEV sukeltos infekcijos yra nepastovios ir yra didesnė tikimybė, kad vyresnės arba *R. rattus* rūšies žiurkės buvo susidūrusios su žiurkių HEV.

3.4 Antikūnų prieš HEV nustatymas kiaulių mėginiuose serologiniais metodais

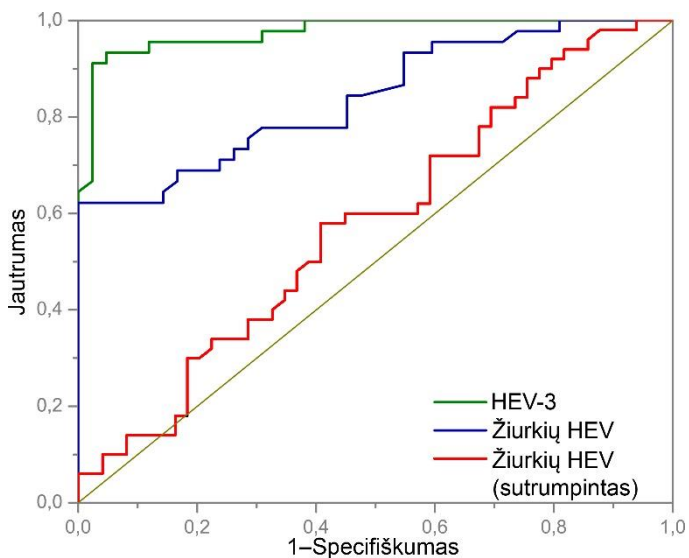
Europoje HEV-3 infekcijų žmonėse pagrindinis šaltinis yra maistas. Šis viruso genotipas yra zoonotinis, nes yra kamienų, kurie infekuoja ir kiaules, ir žmones. HEV kiaulėms nesukelia simptomų, tačiau infekuotos kiaulės yra HEV infekcijų šaltinis žmonėms (Pavio et al., 2017). Taip pat yra tikimybė, kad kiaulėse susidaro antikūnai ne tik prieš HEV-3, bet ir kitus HEV variantus, pavyzdžiui, žiurkių. Žiurkės gali gyventi kiaulių ūkiuose ir juose platinti žiurkių HEV. Taigi yra labai svarbu stebėti seroepidemiologinius HEV paplitimo kiaulių populiacijoje duomenis.

Šio darbo metu kiaulių kraujo serumo mėginiai visų pirma buvo apibūdinti komercine IFA sistema „HEV-Ab ELISA“ (Axiom). Ši sistema nustato visų klasių antikūnus specifiskus HEV. Iš viso ištirti 99 kiaulių serumo mėginiai. Nustatyta, kad 50 kiaulių (50,51 %) turi antikūnus prieš HEV. Ankstesniame Lietuvos kiaulių tyrime nustatytas 43,75 % paplitimas (Spancerniene et al., 2016). Europoje panašus paplitimas nustatytas Italijoje (Martinelli et al., 2011, Caruso et al., 2017), Estijoje (Ivanova et al., 2015), Ispanijoje (Seminati et al., 2008, Casas et al., 2009) ir Šveicarijoje (Burri et al., 2014). Visą tirtą kiaulių populiaciją galima suskirstyti pagal Lietuvos rajonus, kuriuose surinkti mėginiai (3.22 pav.). Pagėgių, Raseinių, Molėtų ir Vilniaus rajonuose tirtos kiaulės nebuvo susidūrusios su HEV infekcija. Tokį rezultatą galėjo nulemti mažas tirtų gyvūnų skaičius. Kituose rajonuose antikūnai prieš HEV nustatyti 10–100 % tirtų kiaulių. Daugiausia kiaulių ištirta Pasvalio, Šilalės ir Biržų rajonuose. Pasvalio rajone nustatytos 7 iš 22 kiaulių (31,82 %), kurios buvo užsikrėtusios HEV, Šilalės – 15 iš 18 (83,33 %), o Biržų – 1 iš 10 (10 %).



3.22 pav. Kiaulių mėginių surinkimo vietos. Žemėlapyje pateikti rajonų, kuriuose surinkti kiaulių mėginiai, pavadinimai, centrai ir gyvūnų skaičius. Skrituliais pažymėti centrai rajonų, kuriuose surinktuose mėginiuose nustatyti antikūnai prieš HEV. Apskritimais pažymėti centrai rajonų, kuriuose surinktuose mėginiuose nenustatyti antikūnai prieš HEV.

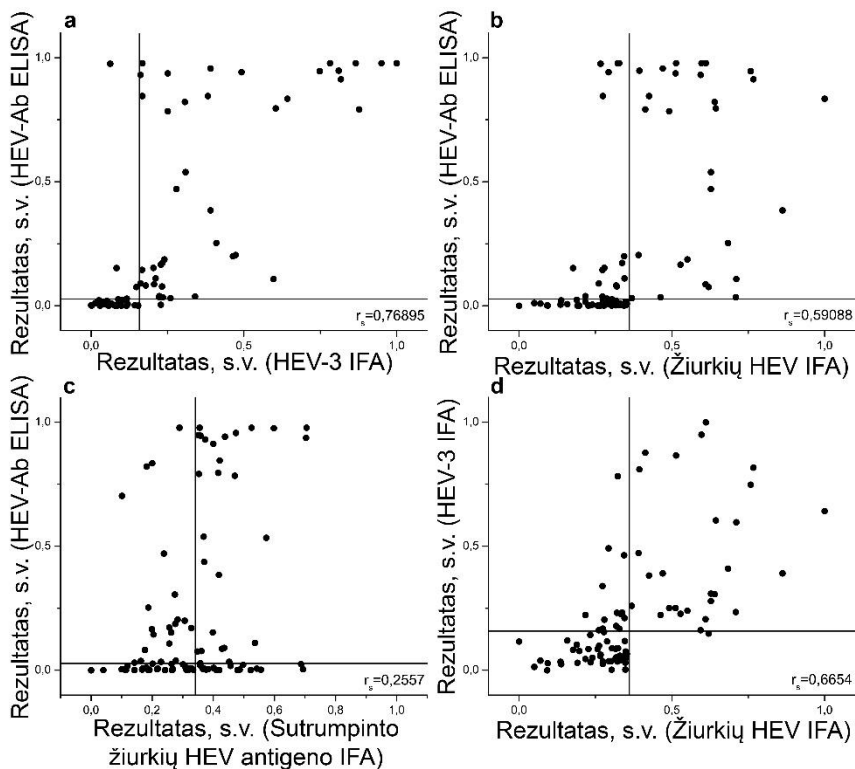
Kiaulių kraujo serumo mėginiai taip pat buvo ištirti nustatant IgG antikūnus prieš HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus. Šiam tyrimui buvo naudota netiesioginė IFA, sukurta rekombinantinių HEV kapsidės baltymų pagrindu (3.2 skyrius), siekiant įvertinti šių baltymų efektyvumą tiriant kiaulių kraujo mėginius. Lyginant su „HEV-Ab ELISA“ kaip atskaitos testu atlikta IFA su skirtingais HEV kapsidės baltymais ROC (angl. *receiver operating curve*) analizė (3.23 pav.). Remiantis šiuo metodu apskaičiuojamas ploto po ROC kreive (AUC, angl. *area under the curve*) rodiklis, kuris parodo tikimybę, kad testas nustatys didesnę signalą tiriant teigiamą mėginį negu neigiamą. Tai yra parodo testo efektyvumą nustatant, ar tiriamasis mėginys yra teigiamas ar neigiamas. Kuo AUC arčiau 1, tuo sistema efektyvesnė. IFA HEV-3 kapsidės baltymo pagrindu (HEV-3 IFA) yra efektyviausia, nes jos AUC (angl. *area under the curve*) yra $0,975 \pm 0,014$. IFA žiurkių HEV kapsidės baltymo pagrindu (Žiurkių HEV IFA) AUC = $0,840 \pm 0,042$, o sutrumpinto žiurkių HEV (Sutrumpinto žiurkių HEV antigeno IFA) – AUC = $0,578 \pm 0,058$. ROC analizė taip pat nustato optimaliausią testo signalo ribinę



Testas	AUC	Standartinė paklaida	95 % PI
HEV-3 IFA	0,975	0,014	0,947–1,003
Žiurkių HEV IFA	0,840	0,042	0,757–0,923
Sutrumpinto žiurkių HEV antigeno IFA	0,578	0,058	0,465–0,690

3.23 pav. IFA su rekombinantiniais HEV baltymais ROC analizė. AUC – plotas po ROC kreive, PI – pasikliautinieji intervalai.

vertę. Jei tiriamojo mėginio signalo vertė didesnė už ribinę, jis laikomas teigiamu. Ribinė vertė ROC analizės metu yra parenkama tokia, kad ją naudojant pasiekiamas didžiausias įmanomas jautrumas ir specifiškumas. Kiekvienai tirtai IFA nustačius ribinę vertę paaiškėjo, kad IFA HEV-3 kapsidės baltymo pagrindu jautrumas 91,1 %, specifiškumas 97,6 %, žiurkių HEV – jautrumas 62,2 %, specifiškumas 100 %, o sutrumpinto žiurkių HEV – jautrumas 60 %, specifiškumas 59,5 %. Kuo jautrumas yra didesnis, tuo mažesnė tikimybė, kad testas nustatys klaidingai neigiamus mėginius. Kuo specifiškumas yra didesnis, tuo mažesnė tikimybė, kad testas nustatys klaidingai teigiamus mėginius. Įvertinus skirtingais testais gautų rezultatų koreliaciją, nustatyta, kad HEV-3 IFA rezultatai vidutiniškai stipriai koreliuoja su „HEV-Ab ELISA“ ($r_s = 0,76895$, 3.24 pav. a). Žiurkių HEV IFA rezultatai silpnai koreliuoja su „HEV-Ab ELISA“ ($r_s = 0,59088$, 3.24 pav. b) ir vidutiniškai stipriai su HEV-3 IFA ($r_s = 0,6654$, 3.24 pav. d), o sutrumpinto žiurkių HEV antigeno IFA rezultatai su „HEV-Ab ELISA“ – silpnai ($r_s = 0,2557$, 3.24 pav. c). Tai rodo, kad HEV-3 IFA testas iš tiriamųjų yra



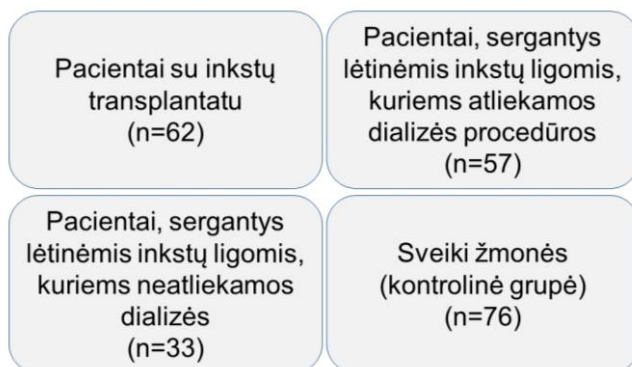
3.24 pav. Koreliacija tarp skirtingais testais gautų rezultatų. „HEV-Ab ELISA“ rezultatų koreliacija su HEV-3 IFA (a), žiurkių HEV IFA (b), sutrumpinto žiurkių HEV IFA (c), HEV-3 IFA ir žiurkių HEV IFA rezultatų koreliacija (d). r_s – Spearman koreliacijos koeficientas. Tiesė, lygiagreti ordinačių ašiai, yra testo, nurodyto abscisių ašyje, ribinė vertė ir atvirkščiai.

tinkamiausias kiaulių mėginių analizei. IFA žiurkių HEV kapsidės baltymo pagrindu rezultatai silpnai koreliuoja su komerciniu testu. Be to, žiurkių HEV IFA jautrumas yra 62,2 %. Tai reiškia, kad tokioje dalyje teigiamų mėginių yra antikūnų reaguojančių ir su žiurkių HEV kapsidės baltymu. Lyginant žiurkių HEV IFA rezultatus su HEV-3 IFA ir „HEV-Ab ELISA“ nustatyta, kad dalis mėginių (28 iš 99) yra teigiami visuose testuose, dalis (22 iš 99) – tik HEV-3 IFA ir/arba „HEV-Ab ELISA“, o tik žiurkių HEV IFA testu teigiamų mėginių nenustatyta (3.24 pav. b ir d). Panašias kryžmines reakcijas nustatėme ir tiriant rekombinantinių HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų imunogeniškumą pelėse. Imunizacijų metu susidarė kryžmiškai specifiški antikūnai abiemis baltymams (3.1.2 skyrius). Šių kryžmiškai specifiškių HEV-3 ir žiurkių HEV antikūnų nustatymas atmeta 3.2 skyriuje iškeltą hipotezę,

kad serologiniais testais naudojant HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus galima atskirti, kurio viruso infekcijos paplitusios kiaulių populiacijoje. Apibendrinant HEV-3 IFA veikia geriausiai, tačiau efektyvumu nusileidžia komerciniam „HEV-Ab ELISA“ testui. Tai būtų galima paaiškinti tuo, kad mūsų sukurtame ir komerciniame teste naudojami skirtingi HEV antigenai ir tuo, kad mūsų sukurta HEV-3 IFA nustato tik IgG klasės antikūnus, o „HEV-Ab“ – visų klasių antikūnus prieš HEV.

3.5 Žmonių kraujo mėginių tyrimas

Europoje HEV infekcijos yra pavojingiausios pacientams su nusilpusia imunine sistema. Lėtinėmis inkstų ligomis ar inkstų transplantatus turintys asmenys yra rizikos grupėje. Vykdamt biomedicininį tyrimą „Virusinių ir imunologinių veiksnių, susijusių su inkstų veiklos sutrikimais ir inkstų transplantato atmetimo rizikos vertinimu, tyrimas“ buvo ištirti iš viso 228 kraujo serumo mėginiai. Mėginiai yra suskirstyti į 4 grupes: pacientų su inkstų transplanatatu; pacientai, sergantys lėtinėmis inkstų ligomis, kuriems atliekamos dializės ir kuriems neatliekamos dializės; sveiki žmonės (kontrolinė grupė) (3.25 pav.). Organų transplantatų recipientai yra padidintos rizikos grupėje, nes jie vartoja imunosupresinius vaistus tam, kad persodintas organas nebūtų atmetas. Be to, yra nustatyta, kad HEV taip pat gali būti perduotas su organų transplantatais (Kamar et al., 2017). Pacientai, kurie serga lėtinėmis inkstų ligomis, taip pat yra padidintos rizikos grupėje, nes jų imuninė sistema dėl ligos yra nusilpusi. Šie žmonės gali būti skirstomi į dvi grupes pagal tai, ar jiems atliekamos dializės procedūros. Dializės procedūros atlikimas yra blogesnio inkstų veiklos efektyvumo ar neveikimo pasekmė.

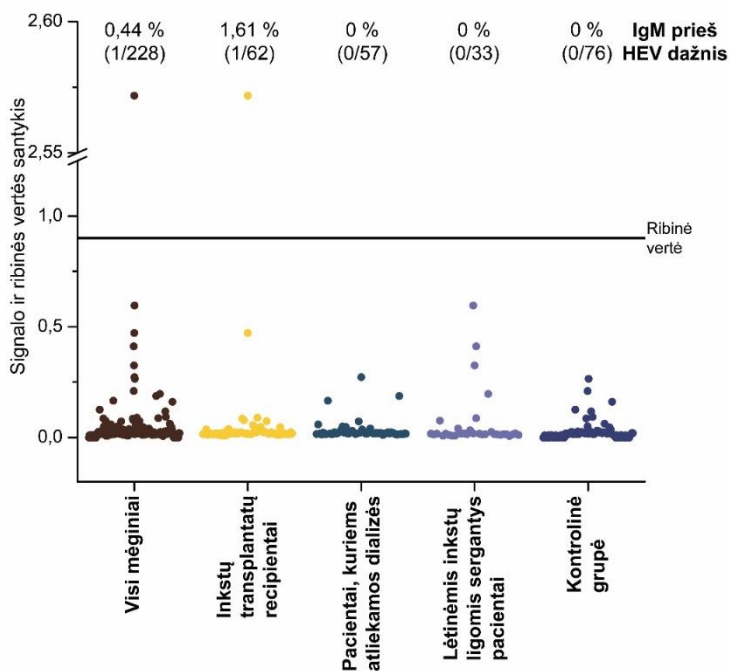


3.25 pav. Tiriamųjų asmenų dėl HEV infekcijos grupės.

Taigi pacientai, kuriems atliekamos dializės yra sergantys sudėtingesne ar pažengusios stadijos inkstų liga. Kontrolinė grupė yra sveiki žmonės, kurie neserga lėtinėmis inkstų bei kepenų ligomis.

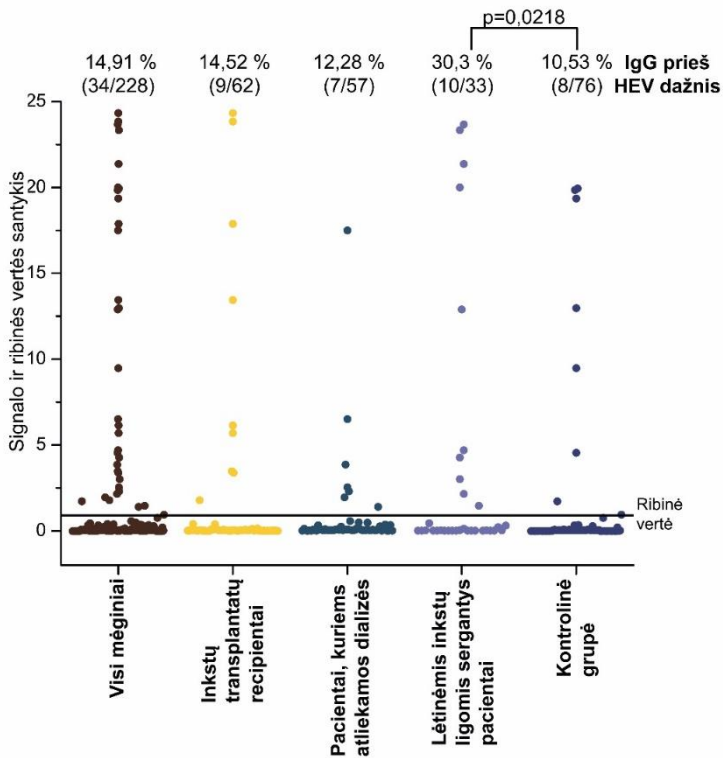
3.5.1 Antikūnų prieš HEV nustatymas žmonių kraujo mėginiuose serologiniais metodais

Visų pacientų kraujo serumo mėginiai buvo ištirti pagal literatūros šaltinius dažniausiai naudojamais komerciniais IFA rinkiniais („Wantai HEV-IgG ELISA“, „Wantai HEV-IgM ELISA“), kurie nustato IgG ir IgM klasės antikūnus prieš HEV. Naudojant „Wantai HEV-IgM ELISA“ IgM antikūnai prieš HEV buvo nustatyti tik 1 inkstų transplantato recipientui (3.26 pav.). IgM antikūnai prieš HEV yra pirmieji, kurie nustatomi kraujyje nuo infekcijos pradžios. Šių antikūnų kiekis yra didžiausias ūmios infekcijos fazės metu, o vėliau palaipsniui mažėja (1.9 skyrius). Tai rodo didelę tikimybę, kad kraujo mėginio paėmimo metu pacientas buvo infekuotas HEV. IgG klasės antikūnai prieš HEV rodo, kad HEV infekcija yra perėjusi į lėtinę fazę arba praėjusi (1.9 skyrius). „Wantai HEV-IgG ELISA“ testu IgG antikūnai prieš HEV buvo



3.26 pav. IgM prieš HEV nustatymo „Wantai HEV-IgM ELISA“ rezultatai.

nustatyti 34 (14,91 %, PI 95 % 10,84–20,15) iš 228 mėginių (3.27 pav.). Visgi tai negali parodyti tendencijos, koks paplitimas būdingas Lietuvoje. Užuominą apie buvusias HEV infekcijas Lietuvoje galima matyti atsižvelgiant į sveikų žmonių grupę. Joje nustatyta, kad 10,53 % (PI 95 % 5,19–19,66) turi IgG antikūnus prieš HEV. Toks paplitimas yra panašus į 8,7–19,96 % nustatytą Italijoje, Jungtinėje Karalystėje, Norvegijoje, Danijoje ir Ispanijoje. Didesnis HEV paplitimas yra 22,4 % Prancūzijoje, 27–31 % Nyderlanduose ir 43,52 % Lenkijoje (1.6 skyrius). Deja, tokia imtis negali būti pagrindu daryti išvadas. Tai leidžia tik kelti hipotezę. Šio tyrimo tikslas yra įvertinti IgG prieš HEV nustatymo dažnį skirtingose rizikos grupėse. Didžiausias antikūnų prieš HEV paplitimas 30,3 % (PI 95 % 17,25–47,46) nustatytas pacientų, sergančių lėtinėmis inkstų ligomis, grupėje. Pacientų, sergančių lėtinėmis inkstų ligomis, kuriems atliekamos dializės, grupėje paplitimas yra 12,28 % (PI 95 % 5,77–23,55), o inkstų transplantatų recipientų grupėje – 14,52 % (PI 95 % 7,6–25,57). Lyginant antikūnų prieš HEV

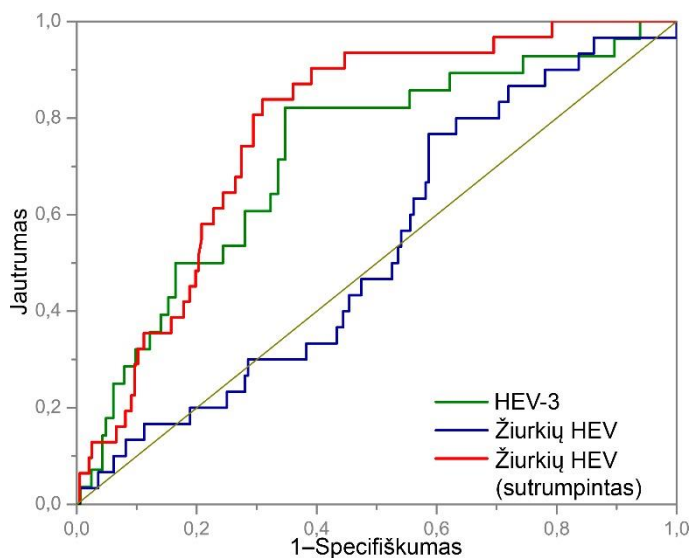


3.27 pav. IgG prieš HEV nustatymo „Wantai HEV-IgG ELISA“ rezultatai.

paplitimą kontrolinėje grupėje (10,53 %) su pacientų, kuriems persodinti inkstai, grupės ir pacientų, kuriems atliekamos dializės, paplitimu nėra nustatytas statistiškai patikimas skirtumas (atitinkamai $p = 0,6534$ ir $p = 0,9684$). Palyginus kontrolinės grupės antikūnų prieš HEV nustatymo dažnį su didžiausiu dažniu, nustatytu lėtinėmis inkstų ligomis sergančių pacientų grupėje, nustatytas statistiškai patikimas skirtumas ($p = 0,0218$, 3.27 pav.). Lėtinėmis inkstų ligomis sergantys pacientai turi 3,7 karto (OR = 3,70 (PI 95 % 1,30–10,49), $p = 0,014$) didesnius šansus užsikrėsti HEV. Tai parodo, kad lėtinės inkstų ligos yra padidintos HEV infekcijos rizikos veiksnys. Vertinant antikūnų prieš HEV nustatymo dažnio skirtumus pagal lytį, amžių, imunosupresantų vartojimą ir gretutinių ligų buvimą statistiškai patikimų skirtumų nenustatyta.

3.5.2 Antikūnų prieš HEV nustatymas žmonių kraujo mėginiuose panaudojant rekombinantinius HEV kapsidės baltymus

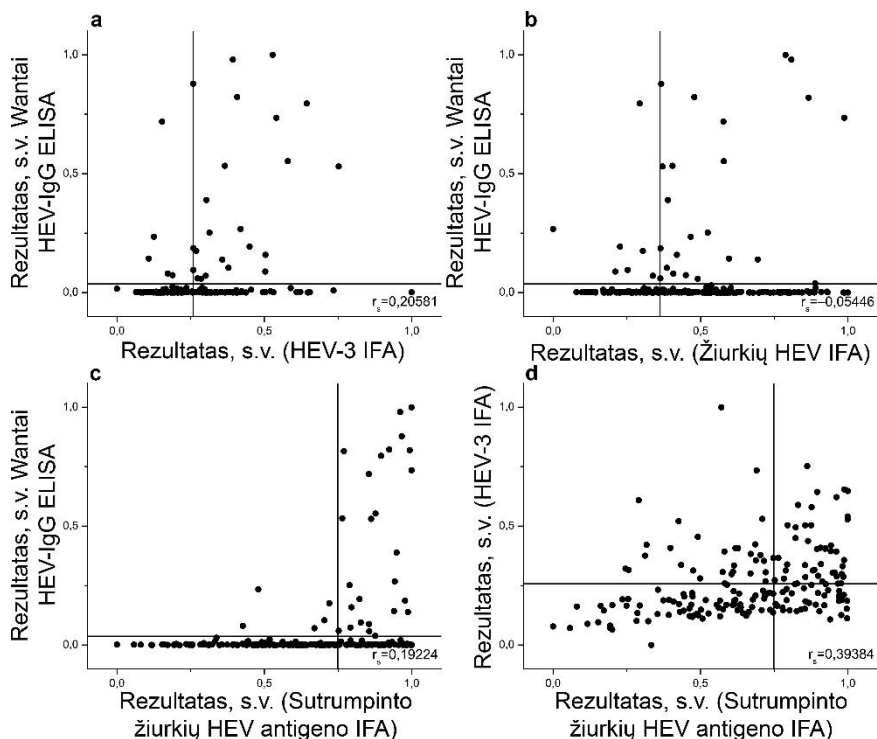
Apibūdinus žmonių kraujo mėginius komerciniais IFA rinkiniais, buvo ištirtas mielėse susintetintų HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų tinkamumas serologiniams testams. Kadangi daugumoje mėginių naudojant „Wantai HEV-IgG ELISA“ nustatyti IgG antikūnai prieš HEV, buvo išbandytas IgG antikūnus nustatančios netiesioginės IFA formatas (3.2 skyrius). Išbandyti visi baltymai, kurie formuoja VPD (HEV-3 (HEV-3 IFA), žiurkių HEV pilno ilgio (žiurkių HEV IFA) ir žiurkių HEV 112–608 aminorūgščių sutrumpintas kapsidės baltymas (sutrumpinto žiurkių HEV antigeno IFA)). Visų baltymų tinkamumas nustatymo sistemoms vertintas atliekant ROC analizę, kai „Wantai HEV-IgG ELISA“ yra laikomas atskaitos testu (3.28 pav.). HEV-3 IFA ir sutrumpinto žiurkių HEV IFA yra efektyviausios, nes jų AUC atitinkamai yra $0,721 \pm 0,053$ (HEV-3 IFA) ir $0,777 \pm 0,053$ (sutrumpinto žiurkių HEV IFA). Žiurkių HEV IFA AUC yra $0,530 \pm 0,062$, tai rodo, kad ši sistema veikia prasčiausiai. Pagal ROC analizę nustatytos testų signalų ribinės vertės, kurias taikant pasiekiamas didžiausias įmanomas jautrumas ir specifiškumas. Jei tiriamojo mėginio signalo vertė didesnė už ribinę, jis laikomas teigiamu. Paaiškėjo, kad HEV-3 IFA jautrumas yra 82,1 %, specifiškumas – 65 %, sutrumpinto žiurkių HEV IFA – jautrumas 82,1 %, specifiškumas 63,8 %, o žiurkių HEV IFA – jautrumas 75 %, specifiškumas 46 %. Tai rodo, kad sutrumpinto žiurkių HEV antigeno IFA ir HEV-3 IFA veikia tiksliausiai iš išbandytų testų rekombinantinių baltymų pagrindu. Įvertinus skirtingais testais gautų rezultatų koreliaciją, nustatyta,



Testas	AUC	Standartinė paklaida	95 % PI
HEV-3 IFA	0,721	0,053	0,617–0,826
Žiurkių HEV IFA	0,530	0,062	0,409–0,652
Sutrumpinto žiurkių HEV IFA	0,777	0,053	0,673–0,881

3.28 pav. IFA su rekombinantiniais HEV baltymais ROC analizė. AUC – plotas po ROC kreive, PI – pasikliautiniai intervalai.

kad HEV-3 IFA ir sutrumpinto žiurkių HEV antigeno IFA rezultatai silpnai koreliuoja su „Wantai HEV-IgG ELISA“ (atitinkamai $r_s = 0,20581$ ir $r_s = 0,19224$, 3.29 pav. a ir c). Žiurkių HEV IFA rezultatai nekoreliuoja su „Wantai HEV-IgG ELISA“ ($r_s = -0,05446$, 3.29 pav. b). Tokių rezultatų neatitikimą galima paaiškinti mažu visų tikrintų testų specifiškumu. Žmonių kraujo serumo antikūnų nespecifinės reakcijos galimai nustatytos su baltyminėmis priemonėmis likusiomis po HEV kapsidės baltymų gryninimo. Daugumą neteisingai identifikuotų mėginių sudaro klaidingai teigiami mėginiai grafikuose esantys apatiniame dešiniame kampe (3.29 pav. a, b, c). Tiriant žmonių mėginius, iš visų išbandytų žiurkių HEV kapsidės baltymų geriau veikia sutrumpintas variantas. Tiriant kiaulių mėginius geriau veikė pilno ilgio žiurkių HEV kapsidės baltymas (3.4 skyrius). Tokio pat rezultato, kaip kiaulių mėginių tyrimo atveju, kai žiurkių HEV IFA nustato tik kryžmiškai



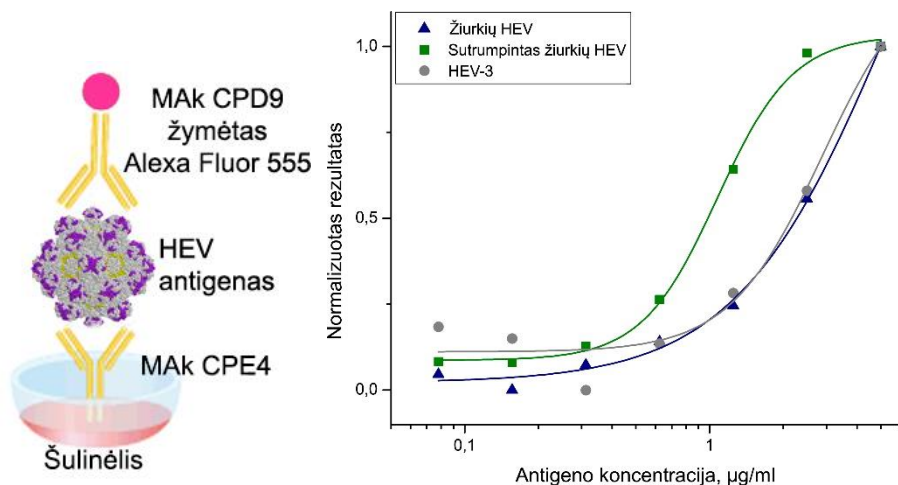
3.29 pav. Koreliacija tarp skirtingais testais gautų rezultatų. „Wantai HEV-IgG ELISA“ rezultatų koreliacija su HEV-3 IFA (a), žiurkių HEV IFA (b), sutrumpinto žiurkių HEV antigeno IFA (c), HEV-3 IFA ir sutrumpinto žiurkių HEV antigeno IFA rezultatų koreliacija (d). r_s – Spearman koreliacijos koeficientas. Tiesė, lygiagreti ordinačių ašiai, yra testo, nurodyto abscisių ašyje, ribinė vertė ir atvirkščiai.

specifiškus HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymams antikūnus, bet specifiškų tik žiurkių HEV nenustato, vertinant sutrumpinto žiurkių HEV antigeno IFA nenustatyta (3.29 pav. c ir d). Apibendrinant galima teigti, kad išbandyti mielėse sintetinti HEV kapsidės baltymai nėra tinkami antikūnų prieš HEV nustatymui žmonių kraujo serumo mėginiuose. Tinkamo testo mėginių tyrimui AUC turi būti 1 arba arti 1, o jautrumas ir specifiškumas bent 90 % ir daugiau. Taip pat tai neleidžia patikrinti 3.2 skyriuje iškeltos hipotezės, kad serologiniais testais galima vertinti HEV-3 ir žiurkių HEV infekcijų paplitimą žmonių mėginiuose.

3.6 HEV kapsidės baltymų nustatymas kraujo mėginiuose

HEV antigeno nustatymas yra rodiklis, kuris parodo aktyvią HEV replikaciją. Žmonių ir kiaulių HEV seroteigiami ir žiurkių HEV teigiami mėginiai buvo ištirti „Wantai HEV-Ag ELISA“ ir dviepitopės IFA, panaudojant šiame darbe sukurtus MAK, testais. Dviepitopė IFA yra IFA variantas, kuriuo panaudojant MAK yra išgaudomas antigenas. Išbandžius įvairias MAK poras buvo pasirinkti MAK CPE4, kurie išgaudo HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus ir MAK CPD9 žymėti Alexa Fluor 555, kurie detektuoja MAK CPE4 išgaudytus antigenus (3.30 pav.). Fluorescencinė antikūno–antigeno–antikūno komplekso detekcija pasirinkta dėl didesnio jautrumo. Siekiant išsiaiškinti šios sistemos specifiškumą, buvo išbandyti rekombinantiniai HEV-3, sutrumpintas ir pilno ilgio žiurkių HEV kapsidės baltymai (3.30 pav.). Dviepitopė IFA išgaudo visus rekombinantinius HEV kapsidės baltymus, o nustatant sutrumpintą žiurkių HEV kapsidės baltymą gaunamas stipresnis signalas.

„Wantai HEV-Ag ELISA“ testu ištyrus žmonių mėginius, kuriuose buvo nustatyti antikūnai prieš HEV, nustatyti 2 teigiami mėginiai iš 34 tirtų (lentelė 3.4). Mėginyje, kuriame nustatyti IgM ir IgG antikūnai prieš HEV, HEV antigenas nenustatytas. Dviepitopė IFA nustatė 9 iš 34, tarp jų ir abu mėginiai, teigiami „Wantai HEV-Ag ELISA“ testu.



3.30 pav. Dviepitopės IFA HEV kapsidės baltymo nustatymui schema ir specifiškumas.

Kiaulių mėginiuose HEV antigenas nustatytas 11 iš 72 tirtų mėginių („Wantai HEV-Ag ELISA“), o dviepitope IFA 45 iš 72 mėginių. Tik 2 iš 11 teigiamų mėginių pagal „Wantai HEV-Ag ELISA“ buvo teigiami dviepitopėje IFA.

Žiurkių mėginiuose HEV antigenas dviepitope IFA nustatytas 2 iš 31 mėginio. „Wantai HEV-Ag ELISA“ testu nė vienas tirtas žiurkių mėginys nebuvo teigiamas.

Lentelė 3.4. HEV antigeno nustatymo skirtinguose mėginiuose rezultatai.

Mėginiai	„Wantai HEV-Ag ELISA“ teigiami (%)	Dviepitope IFA teigiami (%)	Teigiami abejais testais (%)
Žmonių HEV seroteigiami	2 iš 34 (5,88)	9 iš 34 (26,47)	2 iš 34 (5,88)
Kiaulių HEV seroteigiami	11 iš 72 (15,28)	45 iš 72 (62,5)	2 iš 72 (2,78)
Žiurkių HEV teigiami	0 iš 31 (0)	2 iš 31 (6,45)	0 iš 31 (0)

Gauti duomenys rodo, kad rezultatai gauti „Wantai HEV-Ag ELISA“ ir dviepitopės IFA, panaudojant šiame darbe sukurtus MAK, nesutampa. Tai gali nulemti skirtingas testų specifiškumas žmonių ir kiaulių mėginių atveju. Jeigu laikytume, kad „Wantai HEV-Ag ELISA“ yra atskaitos testas, tada dviepitopė IFA nustato daug klaidingai teigiamų mėginių. Kiaulių mėginių tyrimas taip pat verčia abejoti dviepitopės IFA jautrumu, nes iš 11 „Wantai HEV-Ag ELISA“ testu teigiamų mėginių dviepitopė IFA nustato tik 2. Toks rezultatų nesutapimas taip pat gali būti sąlygotas testuose naudojamų antikūnų specifiškumo. Nėra žinoma, ar „Wantai HEV-Ag ELISA“ testo išgaudantys antikūnai yra kryžmiškai specifiški žmonių ir žiurkių HEV. Ištyrus skirtingų koncentracijų rekombinantinių HEV kapsidės baltymų tirpalus, nustatyta, kad „Wantai HEV-Ag ELISA“ nustato tik HEV-3 kapsidės baltymą (8 priedas). Dviepitopėje IFA naudojami MAK CPE4 ir CPD9 yra kryžmiškai specifiški HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymams (3.30 pav.). Tai rodo, kad testai nustato HEV antigeną prisijungdami prie skirtingų epitopų. Be to, tiriant žiurkių mėginius dviepitopė IFA nustatė teigiamų mėginių, o „Wantai HEV-Ag ELISA“ – ne. Tai leidžia spėti, kad „Wantai HEV-Ag ELISA“ gali būti netinkamas testas žiurkių HEV antigeno nustatymui. Visgi norint tiksliau apibūdinti ir palyginti tirtų testų veikimą reikėtų iširti didesnę HEV antigeną turinčių mėginių kiekį.

3.7 Rezultatų apibendrinimas

Disertacijos metu panaudojant mielėse susintetintus HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus kaip imunogenus buvo sukurta MAK kolekcija. Ištyrus MAK specifiškumą IFA metodu paaiškėjo, kad 6 MAK (2B2, CPE1, CPH7, CPE2, CPF6, 5G5) sukurti imunizuojant žiurkių HEV kapsidės baltymu yra jam specifiški. Aštuoni MAK (CPB11, CPC7, CPH6, CPE9, CPD7, 4G4, 5F3, CPC9) sukurti imunizuojant HEV-3 kapsidės baltymu yra jam specifiški. Keturi MAK (2E6, CPE4, CPD9, 9C8) reagavo su abejais HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymais. Įvertinus MAK giminingumą HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymams nustatyta, kad MAK specifiškų HEV-3 tariamosios disociacijos konstantos yra $9,91 \times 10^{-10}$ – $2,32 \times 10^{-11}$ M, o MAK specifiškų žiurkių HEV – $4,32 \times 10^{-9}$ – $1,48 \times 10^{-10}$ M. Tai rodo, kad MAK pasižymi aukštu giminingumu antigenams. Atlikus MAK atpažįstamų epitopų HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymuose analizę ištirta, kad MAK prisijungimo vietos tiek HEV-3, tiek žiurkių HEV kapsidės baltymuose yra išsidėsčiusios visuose šių baltymų domenuose. Toks MAK atpažįstamų epitopų išsidėstymas HEV-3 kapsidės baltyme nustatytas pirmą kartą. Patikrinus HEV-3 specifiškų MAK gebėjimą atpažinti natūralų virusą, nustatyta, kad 9 iš 12 MAK reaguojančių su rekombinantiniu HEV-3 kapsidės baltymų taip pat atpažįsta ir natūralų virusą. Su virusu reaguojančių MAK CPB11, CPC7, CPH6, 9C8 ir CPD9 epitopai yra HEV-3 kapsidės baltymo S domene, o MAK 4G4 ir 5F3 – P domene. MAK 2E6 ir CPE4 tikslaus epitopo HEV-3 kapsidės baltyme nustatyti nepavyko, tačiau šie MAK žiurkių HEV kapsidės baltyme atpažįsta M domeną. Siekiant detaliau apibūdinti MAK prieš žiurkių HEV kapsidės baltymą, būtų galima atlikti laukinių žiurkių infekuotų žiurkių HEV kepenų audinio pjūvių dažymą imunofluorescencijos metodu. Tokį eksperimentą būtų galima atlikti ir su ląstelių linijoje kultivuotu žiurkių HEV. Tikėtina, kad neseniai nustatytos žiurkių HEV zoonozės padidins įrankių skirtų žiurkių HEV tyrimams poreikį.

Darbo metu buvo sukurtos ir išbandytos antikūnų prieš HEV nustatymo sistemos rekombinantinių HEV kapsidės baltymų pagrindu. Šios sistemos išbandytos tiriant laukinių žiurkių, kiaulių ir žmonių mėginius. Visos sistemos paremtos netiesioginės IFA tipu. Laukinių žiurkių mėginiai Lietuvoje tirti pirmą kartą. Visų pirma žiurkių kepenų audinio mėginiai ištirti nustatant žiurkių HEV RNR PGR metodais. Nustatyta, kad 8,3 % žiurkių užsikrėtusios žiurkių HEV. Apibūdinti mėginiai patikrinti serologiniais testais, kurie nustato IgM ir IgG klasių antikūnus prieš žiurkių HEV. Paaiškėjo, kad 31,2 %

žiurkių turi antikūnus prieš žiurkių HEV. Tai rodo, kad žiurkių HEV plinta Lietuvos laukinėse žiurkėse.

Kiaulių mėginiai buvo visų pirma apibūdinti įsigytu serologiniu testu. Nustatyta, kad 50,51 % tirtų kiaulių buvo susidūrusios su HEV infekcija. Kiaulių kraujo mėginiai tuomet buvo ištirti sukurtais serologiniais testais panaudojant mielėse susintetintu HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus. Įvertinus šių testų veikimą, paaiškėjo, kad netiesioginė IFA naudojant HEV-3 kapsidės baltymą yra efektyviausia. Sukurto antikūnų prieš HEV nustatymo kiaulių mėginiuose testo parametrai yra perspektyvūs, todėl ateityje būtų galima, su išbandytu rekombinantiniu HEV-3 kapsidės baltymu, vystyti testą toliau ištiriant didesnę mėginių imtį.

Žmonių mėginių tyrimui buvo surinkti mėginiai suskirstyti į 4 grupes. Trys grupės yra teoriškai HEV infekcijos padidintos rizikos: pacientai su transplantuotais inkstais, pacientai sergantys lėtinėmis inkstų ligomis, kuriems atliekamos dializės procedūros ir kuriems nėra atliekamos. Ketvirtoji grupė sudaryta iš sveikų, lėtinėmis kepenų ir inkstų ligomis nesergančių, individų. Visų pirma žmonių kraujo serumo mėginiai apibūdinti įsigytais IgM ir IgG klasių antikūnais prieš HEV nustatančiais testais. Paaiškėjo, kad tik 1 inkstų transplantato recipientas mėginio surinkimo metu turėjo IgM, taip pat ir IgG prieš HEV. Tai rodo, kad tuo metu vyko aktyvi HEV infekcija. IgG prieš HEV nustatyti 14,91 % tirtų žmonių. Kontrolinėje grupėje antikūnai prieš HEV nustatyti 10,53 % žmonių. Deja, bet kontrolinėje grupėje buvo 76 individai ir tokia imtis nėra tinkama paplitimo vertinimui bendroje populiacijoje. Palyginus antikūnų prieš HEV nustatymo dažnį skirtingose grupėse, nustatyta, kad lėtinėmis inkstų ligomis sergančių pacientų grupėje paplitimas yra didžiausias – 14,52 %. Tai rodo, kad šie pacientai turi 3,7 karto didesnę šansą būti susidūrę su HEV infekcija. Tai reiškia, kad lėtinės inkstų ligos yra HEV infekcijos padidintos rizikos veiksnys. Žmonių mėginius ištyrus su sukurtais serologiniais testais rekombinantinių HEV kapsidės baltymų pagrindu, nustatyta, kad šie testai veikia blogiau negu komerciniai.

Laukinių žiurkių teigiami, kiaulių ir žmonių seroteigiami kraujo mėginiai ištirti įsigytu HEV antigeno nustatymo testu ir sukurtu imunocheminiu metodu MAk pagrindu. Gauti rezultatai skirtingomis sistemomis beveik visiškai nesutapo. Išbandžius abu testus su rekombinantiniais HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymais, paaiškėjo, kad įsigytas testas yra specifiškas HEV-3 antigenui, o sukurtas nustato HEV-3 ir žiurkių HEV antigenus. Tai rodo, kad šių testų rezultatai nesutampa dėl skirtingo specifškumo. Taigi tikrintų testų efektyvumas skiriasi. Įsigytas HEV antigeno testas taip pat

negali būti naudojamas žiurkių HEV antigeno nustatymui. Kadangi sukurtas imunocheminis metodas nustato ir HEV-3, ir žiurkių HEV antigenus, tai galėtų būti naudingas įrankis neseniai nustatytų žiurkių HEV zoonozių tyrimams.

IŠVADOS

1. Mielėse susintetinti HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymai sukelia stiprų imuninį atsaką pelėse. Naudojant imunizuotų pelių blužnies ląsteles, sukurta 18 hibridomų, iš kurių 8 sintetina monokloninius antikūnus specifiskus HEV-3 kapsidės baltymui, 6 – žiurkių HEV ir 4 – kryžmiškai specifiskus abiejų virusų kapsidės baltymams. 9 iš 18 antikūnų geba identifikuoti natūralų virusą.
2. Panaudojant monokloninius antikūnus, iširta HEV kapsidės baltymų antigeninė struktūra, nustatytos imunodominuojančios sritys išsidėsčiusios visuose HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų domenuose. Toks HEV-3 kapsidės baltymo epitopų išsidėstymas nustatytas pirmą kartą.
3. Sukurtu serologiniu ir molekuliniais HEV nustatymo metodais ištyrus laukinių žiurkių mėginius, antikūnai prieš HEV nustatyti 31,2 %, o HEV RNR – 8,3 % tirtų Lietuvos laukinių žiurkių mėginių.
4. Serologiniais metodais ištyrus kiaulių kraujo mėginius, nustatyta 50,51 % HEV seroteigiamų mėginių. Įvertinus rekombinantinių HEV kapsidės baltymų tinkamumą antikūnų prieš HEV nustatymui kiaulių mėginiuose nustatyta, kad rekombinantinio HEV-3 kapsidės baltymo pagrindu sukurta IFA yra efektyviausia.
5. Ištyrus HEV specifiskus antikūnus žmonių kraujo mėginiuose, nustatyta, kad 14,91 % tirtų asmenų buvo susidūrę su HEV infekcija, nes jiems nustatyti IgG antikūnai prieš HEV. Palyginus HEV serologinį paplitimą tiriamosiose grupėse patvirtinta, kad lėtinės inkstų ligos yra HEV infekcijos padidintos rizikos veiksnys.
6. Dėl mažo mėginių su ūmios HEV infekcijos žymenimis skaičiaus nepavyko įvertinti naujai sukurto IFA testo monokloninių antikūnų pagrindu efektyvumo nustatant HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymus tiriant žiurkių HEV teigiamus, kiaulių ir žmonių HEV seroteigiamus mėginius.

FINANSINĖ PARAMA

Doktorantūros metu atlikti eksperimentai finansuoti Lietuvos mokslo tarybos projekto nr. MIP-039/2015 „Naujų hepatito E viruso (HEV) diagnostikos priemonių kūrimas ir HEV paplitimo Lietuvoje tyrimai“ (vadovė dr. Indrė Kučinskaitė-Kodžė) lėšomis.

PADĖKA

Nuoširdžiai dėkoju darbo vadovei dr. Indrei Kučinskaitei-Kodzei už suteiktą galimybę atlikti doktorantūrą jos vadovaujamoje temoje, taip pat už patarimus, pagalbą, pastabas, kantrybę, pasitikėjimą ir rūpestį viso vadovavimo doktorantūrai metu bei rašant šį darbą.

Už galimybę dirbti ir atlikti tyrimus Imunologijos ir ląstelės biologijos skyriuje, pastabas, patarimus ir palaikymą dėkoju skyriaus vadovei prof. Aurelijai Žvirblienei. Už gerą atmosferą, vaisingas diskusijas ir idėjas dėkoju esamiems ir buvusiems skyriaus kolegoms dr. Dovilei Stravinskienei, Indrei Dalgėdienei, dr. Mildai Zilnytei, Karolinai Juškaitei, dr. Vaidai Simanavičienei, Aušrai Vaitiekaitei, Ritai Lasickienei ir kt.

Dėkoju savo studentams ir praktikantams Gretai Kontvainytei, Pauliui Krišpinovičiui, Augustei Ruginytei, Vytautui Rudokui, Vytautui Mickevičiui, Pauliui Matuliui ir kt., kurie prisidėjo bendrais eksperimentais arba savo darbais leido skirti daugiau laiko disertacijos eksperimentams.

Taip pat esu labai dėkingas dr. Rasai Petraitytei-Burneikienei ir jos laboratorijos nariams dr. Pauliui Lukui Tamošiūnui, Arūnei Verbickaitei ir Kornelijai Marcinkevičiūtei už HEV kapsidės baltymų sintezę, o Pauliui ir už jų apibūdinimą. Dėkoju dr. Rainer G. Ulrich už pasiūlytą HEV tyrimų kryptį ir pagalbą rašant publikacijas.

Dėkoju dr. Mariui Jasilioniui už laukinių žiurkių gaudymą, kolegėms Karolinai Juškaitei, dr. Dovilei Stravinskienei ir Aistei Imbrasaitei už indėlių HEV nustatymą molekuliniais metodais. Taip pat esu dėkingas dr. Raimundui Lelešiui už kiaulių kraujo mėginius ir gyd. Ernestai Mačionienei už bendradarbiavimą vykdant biomedicininį tyrimą ir žmonių mėginių rinkimą. Dėkoju Juozui Grigui už bendrus eksperimentus, diskusijas ir bendradarbiavimą HEV tematikoje ir dr. Reimar Johnė už mikroskopijos eksperimentus.

Esu dėkingas dr. Mildai Plečkaitytei ir dr. Virginijai Bukelskienei už galimybę naudotis jų laboratorijų įranga eksperimentams. Dėkoju Lietuvos mokslo tarybai už suteiktą MIP-039/2015 projekto finansavimą ir skirtas doktoranto stipendijas.

Ypatingai dėkoju savo nuostabiai žmonai Rūtai, be kurios palaikymo, paskatinimo ir supratingumo doktorantūra ir disertacijos rašymas būtų daug sudėtingesnis. Dėkoju savo tėvams Aušrai ir Raimundui už suteiktą galimybę gyvenime veikti tai, kas man įdomu.

LITERATŪROS SĄRAŠAS

1. Abravanel F, Chapuy-Regaud S, Lhomme S, Miedougé M, Peron JM, Alric L, Rostaing L, Kamar N, Izopet J. Performance of anti-HEV assays for diagnosing acute hepatitis E in immunocompromised patients. *J Clin Virol*. 2013; 58:624–628.

2. Abravanel F, Lhomme S, El Costa H, Schwartz B, Peron JM, Kamar N, Izopet J. Rabbit hepatitis E virus infections in humans, France. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23:1191–1193.

3. Abravanel F, Pique J, Couturier E, Nicot F, Dimeglio C, Lhomme S, Chiabrando J, Saune K, Péron JM, Kamar N, Evrard S, de Valk H, Cintas P, Izopet J. Acute hepatitis E in French patients and neurological manifestations. *J Infect*. 2018; 77:220–226.

4. Abravanel F, Sandres-Saune K, Lhomme S, Dubois M, Mansuy JM, Izopeta J. Genotype 3 diversity and quantification of hepatitis E virus RNA. *J Clin Microbiol*. 2012; 50:897–902.

5. Aggarwal R. Diagnosis of hepatitis E. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2013; 10:24–33.

6. Aggarwal R, Goel A. Advances in hepatitis E – I: virology, pathogenesis and diagnosis. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*. 2016; 10:1053–1063.

7. Al-Absi ES, Al-Sadeq DW, Younis MH, Yassine HM, Abdalla OM, Mesleh AG, Hadwan TA, Amimo JO, Thalib L, Nasrallah GK. Performance evaluation of five commercial assays in assessing seroprevalence of HEV antibodies among blood donors. *J Med Microbiol*. 2018; 67:1302–1309.

8. Al-Sadeq DW, Majdalawieh AF, Mesleh AG, Abdalla OM, Nasrallah GK. Laboratory challenges in the diagnosis of hepatitis E virus. *J Med Microbiol*. 2018; 67:466–480.

9. Allweiss L, Gass S, Giersch K, Groth A, Kah J, Volz T, Rapp G, Schöbel A, Lohse AW, Polywka S, Pischke S, Herker E, Dandri M, Lütgehetmann M. Human liver chimeric mice as a new model of chronic hepatitis e virus infection and preclinical drug evaluation. *J Hepatol*. 2016; 64:1033–1040.

10. Andonov A, Robbins M, Borlang J, Cao J, Hachette T, Stueck A, Deschambault Y, Murnaghan K, Varga J, Johnston L. Rat Hepatitis E Virus Linked to Severe Acute Hepatitis in an Immunocompetent Patient. *J Infect Dis*. 2019; 220:951–955.

11. Anheyer-Behmenburg HE, Szabo K, Schotte U, Binder A, Klein G, Johne R. Hepatitis E Virus in Wild Boars and Spillover Infection in Red and Roe Deer, Germany, 2013–2015. *Emerg Infect Dis*. 2017; 23:130–133.

12. Ankavay M, Montpellier C, Sayed IM, Saliou JM, Wychowski C, Saas L, Duvet S, Aliouat-Denis CM, Farhat R, de Masson d'Autume V, Meuleman P, Dubuisson J, Cocquerel L. New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. *Sci Rep*. 2019; 9:6243.

13. Aprea G, Amoroso MG, Di Bartolo I, D'Alessio N, Di Sabatino D, Boni

A, Cioffi B, D'Angelantonio D, Scattolini S, De Sabato L, Cotturone G, Pomilio F, Migliorati G, Galiero G, Fusco G. Molecular detection and phylogenetic analysis of hepatitis E virus strains circulating in wild boars in south-central Italy. *Transbound Emerg Dis.* 2018; 65:e25–e31.

14. Arankalle VA, Joshi M V., Kulkarni AM, Gandhe SS, Chobe LP, Rautmare SS, Mishra AC, Padbidri VS. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in different Indian animal species. *J Viral Hepat.* 2001; 8:223–227.

15. Avellon A, Morago L, Garcia-Galera del Carmen M, Munoz M, Echevarría J-M. Comparative sensitivity of commercial tests for hepatitis E genotype 3 virus antibody detection. *J Med Virol.* 2015; 87:1934–1939.

16. Ayral F, Artois J, Zilber A-L, Widén F, Pounder KC, Aubert D, Bicout DJ, Artois M. The relationship between socioeconomic indices and potentially zoonotic pathogens carried by wild Norway rats: a survey in Rhône, France (2010-2012). *Epidemiol Infect.* 2015; 143:586–99.

17. Banks M, Heath GS, Grierson SS, King DP, Gresham A, Girones R, Widen F, Harrison TJ. Evidence for the presence of hepatitis E virus in pigs in the United Kingdom. *Vet Rec.* 2004; 154:223–227.

18. Bányai K, Tóth ÁG, Ivanics É, Glávits R, Szentpáli-Gavallér K, Dán Á. Putative Novel Genotype of Avian Hepatitis E Virus, Hungary, 2010. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18

19. Bauer H, Luxembourger C, Gottenberg J-E, Fournier S, Abravanel F, Cantagrel A, Chatelus E, Claudepierre P, Hudry C, Izopet J, Fabre S, Lefevre G, Marguerie L, Martin A, Messer L, Molto A, Pallot-Prades B, Pers Y-M, Roque-Afonso A-M, Roux C, Sordet C, Soubrier M, Veissier C, Wendling D, Péron J-M, Sibia J. Outcome of Hepatitis E Virus Infection in Patients With Inflammatory Arthritides Treated With Immunosuppressants. *Medicine (Baltimore).* 2015; 94:e675.

20. Baylis SA, Hanschmann KMO, Matsubayashi K, Sakata H, Roque-Afonso AM, Kaiser M, Corman VM, Kamili S, Aggarwal R, Trehanpati N, Gärtner T, Thomson EC, Davis CA, da Silva Filipe A, Abdelrahman TT, Blümel J, Terao E. Development of a World Health Organization International Reference Panel for different genotypes of hepatitis E virus for nucleic acid amplification testing. *J Clin Virol.* 2019; 119:60–67.

21. Beale MA, Tettmar K, Szypulska R, Tedder RS, Ijaz S. Is there evidence of recent hepatitis E virus infection in English and North Welsh blood donors? *Vox Sang.* 2011; 100:340–342.

22. Beck A, Wurch T, Bailly C, Corvaia N. Strategies and challenges for the next generation of therapeutic antibodies. *Nat Rev Immunol.* 2010; 10:345–352.

23. Behrendt P, Bremer B, Todt D, Brown RJP, Heim A, Manns MP, Steinmann E, Wedemeyer H. Hepatitis e Virus (HEV) ORF2 Antigen Levels Differentiate between Acute and Chronic HEV Infection. *J Infect Dis.* 2016; 214:361–368.

24. Bendall R, Ellis V, Ijaz S, Ali R, Dalton H. A comparison of two commercially available anti-HEV IgG kits and a re-evaluation of anti-HEV IgG seroprevalence data in developed countries. *J Med Virol*. 2010; 82:799–805.
25. Bertelloni F, Mazzei M, Cilia G, Forzan M, Felicioli A, Sagona S, Bandecchi P, Turchi B, Cerri D, Fratini F. Serological Survey on Bacterial and Viral Pathogens in Wild Boars Hunted in Tuscany. *Ecohealth*. 2020; 17:85–93.
26. Berto A, Martelli F, Grierson S, Banks M. Hepatitis e virus in pork food chain, United Kingdom, 2009-2010. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18:1358–1360.
27. Billam P, Pierson FW, Li W, LeRoith T, Duncan RB, Meng XJ. Development and validation of a negative-strand-specific reverse transcription-PCR assay for detection of a chicken strain of hepatitis E virus: Identification of nonliver replication sites. *J Clin Microbiol*. 2008; 46:2630–2634.
28. Bodewes R, van der Giessen J, Haagmans BL, Osterhaus ADME, Smits SL. Identification of Multiple Novel Viruses, Including a Parvovirus and a Hepevirus, in Feces of Red Foxes. *J Virol*. 2013; 87:7758–7764.
29. Boland F, Martinez A, Pomeroy L, O’Flaherty N. Blood Donor Screening for Hepatitis E Virus in the European Union. *Transfus Med Hemotherapy*. 2019; 46:95–103.
30. Boutrouille A, Bakkali-Kassimi L, Crucière C, Pavio N. Prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies in French blood donors. *J Clin Microbiol*. 2007; 45:2009–2010.
31. Boxman ILA, Jansen CCC, Hägele G, Zwartkruis-Nahuis A, Tijisma ASL, Vennema H. Monitoring of pork liver and meat products on the Dutch market for the presence of HEV RNA. *Int J Food Microbiol*. 2019; 296:58–64.
32. Breum S, Hjulsgaard CK, de Deus N, Segalés J, Larsen LE. Hepatitis E virus is highly prevalent in the Danish pig population. *Vet Microbiol*. 2010; 146:144–149.
33. Bura M, Łagiedo M, Michalak M, Sikora J, Mozer-Lisewska I. Hepatitis E virus IgG seroprevalence in HIV patients and blood donors, west-central Poland. *Int J Infect Dis*. 2017; 61:20–22.
34. Burri C, Vial F, Ryser-Degiorgis MP, Schwermer H, Darling K, Reist M, Wu N, Beerli O, Schöning J, Cavassini M, Waldvogel A. Seroprevalence of Hepatitis E Virus in Domestic Pigs and Wild Boars in Switzerland. *Zoonoses Public Health*. 2014; 61:537–544.
35. Caballero-Gómez J, Jiménez-Ruiz S, Lopez-Lopez P, Vicente J, Riscalde MA, Cano-Terriza D, Frias M, Barasona JA, Rivero A, García-Bocanegra I, Rivero-Juarez A. Emergent subtype of hepatitis E virus genotype 3 in wild boar in Spain. *Transbound Emerg Dis*. 2019; 66:1803–1808.
36. Cao D, Huang Y-W, Meng X-J. The Nucleotides on the Stem-Loop

RNA Structure in the Junction Region of the Hepatitis E Virus Genome Are Critical for Virus Replication. *J Virol.* 2010; 84:13040–13044.

37. Capai L, Falchi A, Charrel R. Meta-Analysis of Human IgG anti-HEV Seroprevalence in Industrialized Countries and a Review of Literature. *Viruses.* 2019; 11:84.

38. Capelli N, Marion O, Dubois M, Allart S, Bertrand-Michel J, Lhomme S, Abravanel F, Izopet J, Chapuy-Regaud S. Vectorial Release of Hepatitis E Virus in Polarized Human Hepatocytes. *J Virol.* 2018; 93

39. Carpentier A, Chaussade H, Rigaud E, Rodriguez J, Berthault C, Boué F, Tognon M, Touzé A, Garcia-Bonnet N, Choutet P, Coursaget P. High hepatitis E virus seroprevalence in forestry workers and in wild boars in France. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:2888–2893.

40. Caruso C, Modesto P, Prato R, Scaglione FE, De Marco L, Bollo E, Acutis PL, 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.

41. Caruso C, Peletto S, Rosamilia A, Modesto P, Chiavacci L, Sona B, Balsamelli F, Ghisetti V, Acutis PL, Pezzoni G, Brocchi E, Vitale N, Masoero L. Hepatitis E Virus: A Cross-Sectional Serological and Virological Study in Pigs and Humans at Zoonotic Risk within a High-Density Pig Farming Area. *Transbound Emerg Dis.* 2017; 64:1443–1453.

42. 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. *Vet Microbiol.* 2009; 135:248–252.

43. Chapuy-Regaud S, Dubois M, Plisson-Chastang C, Bonnefois T, Lhomme S, Bertrand-Michel J, You B, Simoneau S, Gleizes PE, Flan B, Abravanel F, Izopet J. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie.* 2017; 141:70–79.

44. Chaussade H, Rigaud E, Allix A, Carpentier A, Touzé A, Delzescaux D, Choutet P, Garcia-Bonnet N, Coursaget P. Hepatitis E virus seroprevalence and risk factors for individuals in working contact with animals. *J Clin Virol.* 2013; 58:504–508.

45. Chen Q, Yuan L, Wan J, Chen Y, Du C. Colorimetric detection of hepatitis E virus based on reverse transcription loop mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay. *J Virol Methods.* 2014; 197:29–33.

46. Christensen PB, Engle RE, Hjort C, Homburg KM, Vach W, Georgsen J, Purcell RH. Time Trend of the Prevalence of Hepatitis E Antibodies among Farmers and Blood Donors: A Potential Zoonosis in Denmark. *Clin Infect Dis.* 2008; 47:1026–1031.

47. Cleland A, Smith L, Crossan C, Blatchford O, Dalton HR, Scobie L, Petrik J. Hepatitis E virus in Scottish blood donors. *Vox Sang.* 2013; 105:283–289.

48. Coilly A, Haïm-Boukobza S, Roche B, Antonini TM, Pause A, Mokhtari C, Becq A, Farahmand H, Hauser L, Duclos-Vallée J-C, Samuel D, Adam R, Roque-Afonso A-M. Posttransplantation Hepatitis E. *Transplant J*. 2013; 96:e4–e6.
49. Colson P, Borentain P, Queyriaux B, Kaba M, Moal V, Gallian P, Heyries L, Raoult D, Gerolami R. Pig Liver Sausage as a Source of Hepatitis E Virus Transmission to Humans. *J Infect Dis*. 2010; 202:825–834.
50. Colson P, Kaba M, Moreau J, Brouqui P. Hepatitis E in an HIV-infected patient. *J Clin Virol*. 2009; 45:269–271.
51. Cossaboom CM, Córdoba L, Dryman BA, Meng XJ. Hepatitis E virus in rabbits, Virginia, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011; 17:2047–2049.
52. Costanzo N, Sarno E, Peretti V, Ciambrone L, Casalnuovo F, Santoro A. Serological and molecular investigation of swine hepatitis e virus in pigs raised in southern Italy. *J Food Prot*. 2015; 78:2099–2102.
53. Crossan C, Grierson S, Thomson J, Ward A, Nunez-Garcia J, Banks M, Scobie L. Prevalence of hepatitis e virus in slaughter-age pigs in Scotland. *Epidemiol Infect*. 2014; 31:2237–2240.
54. D’Amico G. Renal involvement in hepatitis C infection: Cryoglobulinemic glomerulonephritis. *Kidney Int*. 1998; 54:650–671.
55. Dalton H, Hazeldine S, Banks M, Ijaz S, Bendall R. Locally acquired hepatitis E in chronic liver disease. *Lancet*. 2007a; 369:1260.
56. Dalton HR, Bendall RP, Keane FE, Tedder RS, Ijaz S. Persistent Carriage of Hepatitis E Virus in Patients with HIV Infection. *N Engl J Med*. 2009; 361:1025–1027.
57. Dalton HR, Fellows HJ, Gane EJ, Wong P, Gerred S, Schroeder B, Croxson MC, Garkavenko O. Hepatitis E in New Zealand. *J Gastroenterol Hepatol*. 2007b; 22:1236–1240.
58. Dalton HR, Kamar N, van Eijk JJJ, Mclean BN, Cintas P, Bendall RP, Jacobs BC. Hepatitis E virus and neurological injury. *Nat Rev Neurol*. 2016; 12:77–85.
59. Dalton HR, van Eijk JJJ, Cintas P, Madden RG, Jones C, Webb GW, Norton B, Pique J, Lutgens S, Devooght-Johnson N, Woolson K, Baker J, Saunders M, Househam L, Griffiths J, Abravanel F, Izopet J, Kamar N, van Alfen N, van Engelen BGM, Hunter JG, van der Eijk AA, Bendall RP, Mclean BN, Jacobs BC. Hepatitis E virus infection and acute non-traumatic neurological injury: A prospective multicentre study. *J Hepatol*. 2017; 67:925–932.
60. Das A, Maury W, Lemon SM. TIM1 (HAVCR1): an Essential “Receptor” or an “Accessory Attachment Factor” for Hepatitis A Virus? *J Virol*. 2019; 93
61. De Sabato L, Di Bartolo I, Montomoli E, Trombetta C, Ruggeri FM, Ostanello F. Retrospective Study Evaluating Seroprevalence of Hepatitis E Virus in Blood Donors and in Swine Veterinarians in Italy (2004). *Zoonoses*

Public Health. 2017; 64:308–312.

62. De Sabato L, Ianiro G, Monini M, De Lucia A, Ostanello F, Di Bartolo I. Detection of hepatitis E virus RNA in rats caught in pig farms from Northern Italy. *Zoonoses Public Health*. 2020; 67:62–69.

63. De Sabato L, Ostanello F, De Grossi L, Marcario A, Franzetti B, Monini M, Di Bartolo I. Molecular survey of HEV infection in wild boar population in Italy. *Transbound Emerg Dis*. 2018; 65:1749–1756.

64. de Souza WM, Romeiro MF, Sabino-Santos G, Maia FGM, Fumagalli MJ, Modha S, Nunes MRT, Murcia PR, Figueiredo LTM. Novel orthohepeviruses in wild rodents from São Paulo State, Brazil. *Virology*. 2018; 519:12–16.

65. Del Bello A, Guilbeau-Frugier C, Josse A-G, Rostaing L, Izopet J, Kamar N. Successful treatment of hepatitis E virus-associated cryoglobulinemic membranoproliferative glomerulonephritis with ribavirin. *Transpl Infect Dis*. 2015; 17:279–283.

66. Di Bartolo I, Diez-Valcarce M, Vasickova P, Kralik P, Hernandez M, Angeloni G, Ostanello F, Bouwknegt M, Rodríguez-Lázaro D, Pavlik I, Ruggeri FM. Hepatitis E virus in pork production chain in Czech Republic, Italy, and Spain, 2010. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18:1282–1289.

67. Di Bartolo I, Martelli F, Inglese N, Pourshaban M, Caprioli A, Ostanello F, Ruggeri FM. Widespread diffusion of genotype 3 hepatitis E virus among farming swine in Northern Italy. *Vet Microbiol*. 2008; 132:47–55.

68. Di Bartolo I, Ponterio E, Castellini L, Ostanello F, Ruggeri FM. Viral and antibody HEV prevalence in swine at slaughterhouse in Italy. *Vet Microbiol*. 2011; 149:330–338.

69. Di Pasquale S, De Santis P, La Rosa G, Di Domenico K, Iaconelli M, Micarelli G, Martini E, Bilei S, De Medici D, Suffredini E. Quantification and genetic diversity of Hepatitis E virus in wild boar (*Sus scrofa*) hunted for domestic consumption in Central Italy. *Food Microbiol*. 2019; 82:194–201.

70. Ding Q, Heller B, Capuccino JM V., Song B, Nimgaonkar I, Hrebikova G, Contreras JE, Ploss A. Hepatitis E virus ORF3 is a functional ion channel required for release of infectious particles. *Proc Natl Acad Sci*. 2017; 114:1147–1152.

71. Dorn-In S, Schwaiger K, Twaruzek M, Grajewski J, Gottschalk C, Gareis M. Hepatitis e virus in wild boar in northwest Poland: Sensitivity of methods of detection. *Foodborne Pathog Dis*. 2017; 14:103–108.

72. Dremsek P, Wenzel JJ, Johne R, Ziller M, Hofmann J, Groschup MH, Werdermann S, Mohn U, Dorn S, Motz M, Mertens M, Jilg W, Ulrich RG. Seroprevalence study in forestry workers from eastern Germany using novel genotype 3- and rat hepatitis E virus-specific immunoglobulin G ELISAs. *Med Microbiol Immunol*. 2012; 201:189–200.

73. Drexler JF, Seelen A, Corman VM, Fumie Tateno A, Cottontail V,

Melim Zerbinati R, Gloza-Rausch F, Kloze SM, Adu-Sarkodie Y, Oppong SK, Kalko EK V, Osterman A, Rasche A, Adam A, Muller MA, Ulrich RG, Leroy EM, Lukashev AN, Drosten C. Bats Worldwide Carry Hepatitis E Virus-Related Viruses That Form a Putative Novel Genus within the Family Hepeviridae. *J Virol*. 2012; 86:9134–9147.

74.Easterbrook JD, Kaplan JB, Vanasco NB, Reeves WK, Purcell RH, Kosoy MY, Glass GE, Watson J, Klein SL. A survey of zoonotic pathogens carried by Norway rats in Baltimore, Maryland, USA. *Epidemiol Infect*. 2007; 135:1192–1199.

75.El-Tras WF, Tayel AA, El-Kady NN. Seroprevalence of Hepatitis E Virus in Humans and Geographically Matched Food Animals in Egypt. *Zoonoses Public Health*. 2013; 60:244–251.

76.Emerson SU, Nguyen H, Torian U, Purcell RH. ORF3 Protein of Hepatitis E Virus Is Not Required for Replication, Virion Assembly, or Infection of Hepatoma Cells In Vitro. *J Virol*. 2006; 80:10457–10464.

77.Emerson SU, Nguyen HT, Torian U, Burke D, Engle R, Purcell RH. Release of Genotype 1 Hepatitis E Virus from Cultured Hepatoma and Polarized Intestinal Cells Depends on Open Reading Frame 3 Protein and Requires an Intact PXXP Motif. *J Virol*. 2010; 84:9059–9069.

78.Faber M, Willrich N, Schemmerer M, Rauh C, Kuhnert R, Stark K, Wenzel JJ. Hepatitis E virus seroprevalence, seroincidence and seroreversion in the German adult population. *J Viral Hepat*. 2018; 25:752–758.

79.Favorov MO, Fields HA, Purdy MA, Yashina TL, Aleksandrov AG, Alter MJ, Yarasheva DM, Bradley DW, Margolis HS. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J Med Virol*. 1992; 36:246–250.

80.Favorov MO, Kosoy MY, Tsarev SA, Childs JE, Margolis HS. Prevalence of Antibody to Hepatitis E Virus among Rodents in the United States. *J Infect Dis*. 2000; 181:449–455.

81.Fearon MA, O'Brien SF, Delage G, Scalia V, Bernier F, Bigham M, Weger S, Prabhu S, Andonov A. Hepatitis E in Canadian blood donors. *Transfusion*. 2017; 57:1420–1425.

82.Fields HA, Khudyakov YE, Favorov MO, Khudyakova NS, Cong M, Holloway BF, Lambert SB, Jue DL. Artificial mosaic proteins as new immunodiagnostic reagents: the hepatitis E virus experience. *Clin Diagn Virol*. 1996; 5:167–179.

83.Fischer C, Hofmann M, Danzer M, Hofer K, Kaar J, Gabriel C. Seroprevalence and Incidence of hepatitis E in Blood Donors in Upper Austria. *PLoS One*. 2015; 10:e0119576.

84.Forgách P, Nowotny N, Erdélyi K, Boncz A, Zentai J, Szűcs G, Reuter G, Bakonyi T. Detection of Hepatitis E virus in samples of animal origin collected in Hungary. *Vet Microbiol*. 2010; 143:106–116.

85.Forni D, Cagliani R, Clerici M, Sironi M. Origin and dispersal of

Hepatitis e virus article. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7:1–13.

86.Fritz M, Berger B, Schemmerer M, Endres D, Wenzel JJ, Stich O, Panning M. Pathological Cerebrospinal Fluid Findings in Patients with Neuralgic Amyotrophy and Acute Hepatitis e Virus Infection. *J Infect Dis.* 2018; 217:1897–1901.

87.Fukae J, Tsugawa J, Ouma S, Umezu T, Kusunoki S, Tsuboi Y. Guillain–Barré and Miller Fisher syndromes in patients with anti-hepatitis E virus antibody: a hospital-based survey in Japan. *Neurol Sci.* 2016; 37:1849–1851.

88.Galli C, Fomiatti L, Tagliacarne C, Velati C, Zanetti AR, Castaldi S, Romanò L. Seroprevalence of hepatitis e virus among blood donors in northern Italy (Sondrio, Lombardy) determined by three different assays. *Blood Transfus.* 2017; 15:502–505.

89.Gao S, Li D, Liu Y, Zha E, Wang S, Li Y, Zhou T, Yue X. Development and evaluation of a RT-LAMP assay for rapid detection of hepatitis E virus from shellfish. *Int J Food Microbiol.* 2016; 220:1–5.

90.Garg G, Kumar D, Asim M, Husain SA, Das BC, Kar P. Multiplex Reverse Transcriptase-PCR for Simultaneous Detection of Hepatitis B, C, and E Virus. *J Clin Exp Hepatol.* 2016; 6:33–39.

91.Geng Y, Zhang H, Huang W, J Harrison T, Geng K, Li Z, Wang Y. Persistent Hepatitis E Virus Genotype 4 Infection in a Child With Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hepat Mon.* 2013; 14

92.Geng Y, Zhao C, Huang W, Harrison TJ, Zhang H, Geng K, Wang Y. Detection and assessment of infectivity of hepatitis E virus in urine. *J Hepatol.* 2016; 64:37–43.

93.Gérolami R, Moal V, Colson P. Chronic Hepatitis E with Cirrhosis in a Kidney-Transplant Recipient. *N Engl J Med.* 2008; 358:859–860.

94.Geurts van Kessel CH, Islam Z, Mohammad QD, Jacobs BC, Endtz HP, Osterhaus ADME. Hepatitis E and Guillain-Barré Syndrome. *Clin Infect Dis.* 2013; 57:1369–1370.

95.Gissen P, Arias IM. Structural and functional hepatocyte polarity and liver disease. *J Hepatol.* 2015; 63:1023–1037.

96.Gokhale NS, McIntyre ABR, McFadden MJ, Roder AE, Kennedy EM, Gandara JA, Hopcraft SE, Quicke KM, Vazquez C, Willer J, Ilkayeva OR, Law BA, Holley CL, Garcia-Blanco MA, Evans MJ, Suthar MS, Bradrick SS, Mason CE, Horner SM. N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. *Cell Host Microbe.* 2016; 20:654–665.

97.Gonçalves D, Pereira-Vaz J, Duque V, Bandeira V, Fonseca C, Donato A, Luxo C, Matos AM. First Serological Evidence on Endemicity of HEV Infection in Wild Boar (*Sus scrofa*) Populations from Portugal. *Virology.* 2018; 533:197–200.

98.Gouttenoire J, Pollán A, Abrami L, Oechslin N, Mauron J, Matter M, Oppliger J, Szkolnicka D, Dao Thi VL, van der Goot FG, Moradpour D.

Palmitoylation mediates membrane association of hepatitis E virus ORF3 protein and is required for infectious particle secretion. *PLoS Pathog.* 2018; 14:e1007471.

99. Grabarczyk P, Sulkowska E, Gdowska J, Kopacz A, Liszewski G, Kubicka-Russel D, Baylis SA, Corman VM, Noceń E, Piotrowski D, Antoniewicz-Papis J, Łętowska M. Molecular and serological infection marker screening in blood donors indicates high endemicity of hepatitis E virus in Poland. *Transfusion.* 2018; 58:1245–1253.

100. Graff J, Torian U, Nguyen H, Emerson SU. A Bicistronic Subgenomic mRNA Encodes both the ORF2 and ORF3 Proteins of Hepatitis E Virus. *J Virol.* 2006; 80:5919–5926.

101. Grierson S, Heaney J, Cheney T, Morgan D, Wyllie S, Powell L, Smith D, Ijaz S, Steinbach F, Choudhury B, Tedder RS. Prevalence of hepatitis E virus infection in pigs at the time of slaughter, United Kingdom, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2015; 21:1396–1401.

102. Grigas J, Simkute E, Simanavicius M, Pautienius A, Streimikyte-Mockeliune Z, Razukevicius D, Stankevicius A. Hepatitis E genotype 3 virus isolate from wild boar is capable of replication in non-human primate and swine kidney cells and mouse neuroblastoma cells. *BMC Vet Res.* 2020; 16:95.

103. Grove J, Marsh M. The cell biology of receptor-mediated virus entry. *J Cell Biol.* 2011; 195:1071–1082.

104. Gu Y, Tang X, Zhang X, Song C, Zheng M, Wang K, Zhang J, Ng M-H, Hew C-L, Li S, Xia N, Sivaraman J. Structural basis for the neutralization of hepatitis E virus by a cross-genotype antibody. *Cell Res.* 2015; 25:604–620.

105. Guan D, Li W, Su J, Fang L, Takeda N, Wakita T, Li T-C, Ke C. Asian Musk Shrew as a Reservoir of Rat Hepatitis E Virus, China. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19:1341–1343.

106. Guillois Y, Abravanel F, Miura T, Pavio N, Vaillant V, Lhomme S, Le Guyader FS, Rose N, Le Saux J-C, King LA, Izopet J, Couturier E. High Proportion of Asymptomatic Infections in an Outbreak of Hepatitis E Associated With a Spit-Roasted Piglet, France, 2013. *Clin Infect Dis.* 2016; 62:351–357.

107. Guinault D, Ribes D, Delas A, Milongo D, Abravanel F, Puissant-Lubrano B, Izopet J, Kamar N. Hepatitis E Virus–Induced Cryoglobulinemic Glomerulonephritis in a Nonimmunocompromised Person. *Am J Kidney Dis.* 2016; 67:660–663.

108. Gupta E, Pandey P, Pandey S, Sharma MK, Sarin SK. Role of hepatitis E virus antigen in confirming active viral replication in patients with acute viral hepatitis E infection. *J Clin Virol.* 2013; 58:374–377.

109. Gupta J, Kaul S, Srivastava A, Kaushik N, Ghosh S, Sharma C, Batra G, Banerjee M, Shalimar M, Nayak B, Ranjith-Kumar CT, Surjit M.

Expression, Purification and Characterization of the Hepatitis E Virus Like-Particles in the *Pichia pastoris*. *Front Microbiol.* 2020; 11

110.Guu TSY, Liu Z, Ye Q, Mata DA, Li K, Yin C, Zhang J, Tao YJ. Structure of the hepatitis E virus-like particle suggests mechanisms for virus assembly and receptor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009; 106:12992–12997.

111.Haagsma EB, van den Berg AP, Porte RJ, Benne CA, Vennema H, Reimerink JHJ, Koopmans MPG. Chronic hepatitis E virus infection in liver transplant recipients. *Liver Transplant.* 2008; 14:547–553.

112.Hammerschmidt F, Schwaiger K, Dähnert L, Vina-Rodriguez A, Höper D, Gareis M, Groschup MH, Eiden M. Hepatitis E virus in wild rabbits and European brown hares in Germany. *Zoonoses Public Health.* 2017; 64:612–622.

113.Hanson PI, Cashikar A. Multivesicular Body Morphogenesis. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2012; 28:337–362.

114.Haqshenas G, Huang FF, Fenaux M, Guenette DK, Pierson FW, Larsen CT, Shivaprasad HL, Toth TE, Meng XJ. The putative capsid protein of the newly identified avian hepatitis E virus shares antigenic epitopes with that of swine and human hepatitis E viruses and chicken big liver and spleen disease virus. *J Gen Virol.* 2002; 83:2201–2209.

115.Haqshenas G, Shivaprasad HL, Woolcock PR, Read DH, Meng XJ. Genetic identification and characterization of a novel virus related to human hepatitis E virus from chickens with hepatitis–splenomegaly syndrome in the United States The GenBank accession no. of the sequence reported in this paper is AY043166. *J Gen Virol.* 2001; 82:2449–2462.

116.Hartl J, Otto B, Madden R, Webb G, Woolson K, Kriston L, Vettorazzi E, Lohse A, Dalton H, Pischke S. Hepatitis E Seroprevalence in Europe: A Meta-Analysis. *Viruses.* 2016; 8:211.

117.He J, Kuschner RA, Dewar V, Voet P, Asher L V, Vaughn DW. Characterization of monoclonal antibodies to hepatitis E virus (HEV) capsid protein and identification of binding activity. *J Biomed Sci.* 2007; 14:555–563.

118.He W, Wen Y, Xiong Y, Zhang M, Cheng M, Chen Q. The prevalence and genomic characteristics of hepatitis e virus in murine rodents and house shrews from several regions in China. *BMC Vet Res.* 2018; 14:414.

119.Herremans M, Duizer E, Jusic E, Koopmans MPG. Detection of hepatitis E virus-specific immunoglobulin A in patients infected with hepatitis E virus genotype 1 or 3. *Clin Vaccine Immunol.* 2007; 14:276–280.

120.Hewitt J, Harte D, Sutherland M, Croucher D, Fouche L, Flanagan P, Williamson D. Prevalence of hepatitis E virus antibodies and infection in New Zealand blood donors. *N Z Med J.* 2018; 131:38–43.

121.Hinjoy S, Nelson KE, Gibbons R V., Jarman RG, Chinnawirotpisan P, Fernandez S, Tablerk P, Labrique AB, Patchanee P. A cross-sectional study

of Hepatitis e virus infection in pigs in different-sized farms in Northern Thailand. *Foodborne Pathog Dis.* 2013; 10:698–704.

122.Hirano M, Ding X, Li TC, Takeda N, Kawabata H, Koizumi N, Kadosaka T, Goto I, Masuzawa T, Nakamura M, Taira K, Kuroki T, Tanikawa T, Watanabe H, Abe K. Evidence for widespread infection of hepatitis E virus among wild rats in Japan. *Hepatol Res.* 2003; 27:1–5.

123.Holm DK, Moessner BK, Engle RE, Zaaijer HL, Georgsen J, Purcell RH, Christensen PB. Declining prevalence of hepatitis E antibodies among Danish blood donors. *Transfusion.* 2015; 55:1662–1667.

124.Hsu IWY, Tsai HJ. Avian hepatitis E virus in chickens, Taiwan, 2013. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20:149–151.

125.Huang F, Li Y, Yu W, Jing S, Wang J, Long F, He Z, Yang C, Bi Y, Cao W, Liu C, Hua X, Pan Q. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology.* 2016; 64:350–359.

126.Huang FF, Haqshenas G, Shivaprasad HL, Guenette DK, Woolcock PR, Larsen CT, Pierson FW, Elvinger F, Toth TE, Meng XJ. Heterogeneity and Seroprevalence of a Newly Identified Avian Hepatitis E Virus from Chickens in the United States. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:4197–4202.

127.Ichihama K, Yamada K, Tanaka T, Nagashima S, Jirintai, Takahashi M, Okamoto H. Determination of the 5'-terminal sequence of subgenomic RNA of hepatitis E virus strains in cultured cells. *Arch Virol.* 2009; 154:1945–1951.

128.Ivanova A, Tefanova V, Reshetnjak I, Kuznetsova T, Geller J, Lundkvist Å, Janson M, Neare K, Velström K, Jokelainen P, Lassen B, Hütt P, Saar T, Viltrop A, Golovljova I. Hepatitis E Virus in Domestic Pigs, Wild Boars, Pig Farm Workers, and Hunters in Estonia. *Food Environ Virol.* 2015; 7:403–412.

129.Izopet J, Dubois M, Bertagnoli S, Lhomme S, Marchandeanu S, Boucher S, Kamar N, Abravanel F, Guérin J-L. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18:1274–81.

130.Izopet J, Labrique AB, Basnyat B, Dalton HR, Kmush B, Heaney CD, Nelson KE, Ahmed ZB, Zaman K, Mansuy JM, Bendall R, Sauné K, Kamar N, Arjyal A, Karkey A, Dongol S, Prajapati KG, Adhikary D. Hepatitis E virus seroprevalence in three hyperendemic areas: Nepal, Bangladesh and southwest France. *J Clin Virol.* 2015; 70:39–42.

131.Jemielity S, Wang JJ, Chan YK, Ahmed AA, Li W, Monahan S, Bu X, Farzan M, Freeman GJ, Umetsu DT, DeKruyff RH, Choe H. TIM-family Proteins Promote Infection of Multiple Enveloped Viruses through Virion-associated Phosphatidylserine. *PLoS Pathog.* 2013; 9:e1003232.

132.Jiménez De Oya N, De Blas I, Blázquez AB, Martín-Acebes MA, Halaihel N, Gironés O, Saiz JC, Escribano-Romero E. Widespread distribution of hepatitis e virus in Spanish pig herds. *BMC Res Notes.* 2011;

4:412.

133. Jinshan, Jirintai, Manglai D, Takahashi M, Nagashima S, Okamoto H. Molecular and serological survey of hepatitis E virus infection among domestic pigs in Inner Mongolia, China. *Arch Virol.* 2010; 155:1217–1226.

134. Johne R, Dremsek P, Kindler E, Schielke A, Plenge-Bönig A, Gregersen H, Wessels U, Schmidt K, Rietschel W, Groschup MH, Guenther S, Heckel G, Ulrich RG. Rat hepatitis E virus: Geographical clustering within Germany and serological detection in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Infect Genet Evol.* 2012; 12:947–956.

135. Johne R, Dremsek P, Reetz J, Heckel G, Hess M, Ulrich RG. Hepeviridae: An expanding family of vertebrate viruses. *Infect Genet Evol.* 2014; 27:212–229.

136. Johne R, Heckel G, Plenge-Bönig A, Kindler E, Maresch C, Reetz J, Schielke A, Ulrich RG. Novel Hepatitis E Virus Genotype in Norway Rats, Germany. *Emerg Infect Dis.* 2010a; 16:1452–1455.

137. Johne R, Plenge-Bönig A, Hess M, Ulrich RG, Reetz J, Schielke A. Detection of a novel hepatitis E-like virus in faeces of wild rats using a nested broad-spectrum RT-PCR. *J Gen Virol.* 2010b; 91:750–758.

138. Johne R, Trojnar E, Filter M, Hofmann J. Thermal Stability of Hepatitis E Virus as Estimated by a Cell Culture Method. *Appl Environ Microbiol.* 2016; 82:4225–4231.

139. 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; 8

140. Jothikumar N, Aparna K, Kamatchiammal S, Paulmurugan R, Saravanadevi S, Khanna P. Detection of hepatitis E virus in raw and treated wastewater with the polymerase chain reaction. *Appl Environ Microbiol.* 1993; 59:2558–2562.

141. 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.

142. Ju X, Ding Q. Hepatitis E Virus Assembly and Release. *Viruses.* 2019; 11:539.

143. Kabrane-Lazizi Y, Glass GE, Higa H, Diwan A, Gibbs CJ, Purcell RH, Fine JB, Meng XJ, Elm J, Emerson SU. Evidence for widespread infection of wild rats with hepatitis E virus in the United States. *Am J Trop Med Hyg.* 1999; 61:331–335.

144. Kalia M, Chandra V, Rahman SA, Sehgal D, Jameel S. Heparan Sulfate Proteoglycans Are Required for Cellular Binding of the Hepatitis E Virus ORF2 Capsid Protein and for Viral Infection. *J Virol.* 2009; 83:12714–12724.

145. Kamar N, Garrouste C, Haagsma EB, Garrigue V, Pischke S, Chauvet C, Dumortier J, Cannesson A, Cassutoviguier E, Thervet E, Conti F, Lebray

P, Dalton HR, Santella R, Kanaan N, Essig M, Mousson C, Radenne S, Roqueafonso AM, Izopet J, Rostaing L. Factors associated with chronic hepatitis in patients with hepatitis e virus infection who have received solid organ transplants. *Gastroenterology*. 2011; 140:1481–1489.

146.Kamar N, Izopet J, Cintas P, Garrouste C, Uro-Coste E, Cointault O, Rostaing L. Hepatitis E Virus-Induced Neurological Symptoms in a Kidney-Transplant Patient with Chronic Hepatitis. *Am J Transplant*. 2010; 10:1321–1324.

147.Kamar N, Izopet J, Pavio N, Aggarwal R, Labrique A, Wedemeyer H, Dalton HR. Hepatitis E virus infection. *Nat Rev Dis Prim*. 2017; 3:17086.

148.Kamar N, Mansuy JM, Cointault O, Selves J, Abravanel F, Danjoux M, Otal P, Esposito L, Durand D, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E virus-related cirrhosis in kidney-and kidney-pancreas- transplant recipients. *Am J Transplant*. 2008a; 8:1744–1748.

149.Kamar N, Mansuy JM, Esposito L, Legrand-Abravanel F, Peron JM, Durand D, Rostaing L, Izopet J. Acute hepatitis and renal function impairment related to infection by hepatitis E virus in a renal allograft recipient. *Am J Kidney Dis*. 2005; 45:193–196.

150.Kamar N, Rostaing L, Legrand-Abravanel F, Izopet J. How Should Hepatitis E Virus Infection Be Defined in Organ-Transplant Recipients? *Am J Transplant*. 2013; 13:1935–1936.

151.Kamar N, Selves J, Mansuy J-M, Ouezzani L, Péron J-M, Guitard J, Cointault O, Esposito L, Abravanel F, Danjoux M, Durand D, Vinel J-P, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E Virus and Chronic Hepatitis in Organ-Transplant Recipients. *N Engl J Med*. 2008b; 358:811–817.

152.Kamar N, Weclawiak H, Guilbeau-Frugier C, Legrand-Abravanel F, Cointault O, Ribes D, Esposito L, Cardeau-Desangles I, Guitard J, Sallusto F, Muscari F, Peron JM, Alric L, Izopet J, Rostaing L. Hepatitis E Virus and the Kidney in Solid-Organ Transplant Patients. *Transplantation*. 2012; 93:617–623.

153.Kanai Y, Miyasaka S, Uyama S, Kawami S, Kato-Mori Y, Tsujikawa M, Yunoki M, Nishiyama S, Ikuta K, Hagiwara K. Hepatitis E virus in Norway rats (*Rattus norvegicus*) captured around a pig farm. *BMC Res Notes*. 2012; 5:4.

154.Kannan H, Fan S, Patel D, Bossis I, Zhang Y-J. The Hepatitis E Virus Open Reading Frame 3 Product Interacts with Microtubules and Interferes with Their Dynamics. *J Virol*. 2009; 83:6375–6382.

155.Kantala T, Kinnunen PM, Oristo S, Jokelainen P, Vapalahti O, Maunula L. Hepatitis E Virus Antibodies in Finnish Veterinarians. *Zoonoses Public Health*. 2017; 64:232–238.

156.Kantala T, Oristo S, Heinonen M, von Bonsdorff CH, Maunula L. A longitudinal study revealing hepatitis E virus infection and transmission at a swine test station. *Res Vet Sci*. 2013; 95:1255–1261.

157. Kapur N, Thakral D, Durgapal H, Panda SK. Hepatitis e virus enters liver cells through receptor-dependent clathrin-mediated endocytosis. *J Viral Hepat.* 2012; 19:436–448.
158. Karpe YA, Lole KS. RNA 5'-Triphosphatase Activity of the Hepatitis E Virus Helicase Domain. *J Virol.* 2010a; 84:9637–9641.
159. Karpe YA, Lole KS. NTPase and 5' to 3' RNA Duplex-Unwinding Activities of the Hepatitis E Virus Helicase Domain. *J Virol.* 2010b; 84:3595–3602.
160. Katzmann DJ, Odorizzi G, Emr SD. Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:893–905
161. Kenfak-Foguena A, Schöni-Affolter F, Bürgisser P, Witteck A, Darling KEA, Kovari H, Kaiser L, Evison J-M, Elzi L, De La Fuente VG, Jost J, Moradpour D, Abravanel F, Izopet J, Cavassini M. Hepatitis E Virus Seroprevalence and Chronic Infections in Patients with HIV, Switzerland. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:1074–1078.
162. Kenney SP. The Current Host Range of Hepatitis E Viruses. *Viruses.* 2019; 11:452.
163. Khuroo MS, Kamili S, Khuroo MS. Clinical course and duration of viremia in vertically transmitted hepatitis e virus (HEV) infection in babies born to HEV-infected mothers. *J Viral Hepat.* 2009; 16:519–523.
164. Kobayashi T, Murakami S, Yamamoto T, Mineshita K, Sakuyama M, Sasaki R, Maeda K, Horimoto T. Detection of bat hepatitis E virus RNA in microbats in Japan. *Virus Genes.* 2018; 54:599–602.
165. Kobayashi T, Takahashi M, Tanggis, Mulyanto, Jirintai S, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H. Characterization and epitope mapping of monoclonal antibodies raised against rat hepatitis E virus capsid protein: An evaluation of their neutralizing activity in a cell culture system. *J Virol Methods.* 2016; 233:78–88.
166. Köhler G, Milstein C. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature.* 1975; 256:495–497.
167. Koma T, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Li T, Amada T, Shimizu K, Isozumi R, Mai LTQ, Hoa NT, Nguyen V, Yamashiro T, Hasebe F, Arikawa J. A survey of rodent-borne pathogens carried by wild *Rattus* spp. in Northern Vietnam. *Epidemiol Infect.* 2013; 141:1876–1884.
168. Krain LJ, Nelson KE, Labrique AB. Host Immune Status and Response to Hepatitis E Virus Infection. *Clin Microbiol Rev.* 2014; 27:139–165.
169. Krog JS, Breum SØ, Jensen TH, Larsen LE. Hepatitis E Virus Variant in Farmed Mink, Denmark. *Emerg Infect Dis.* 2013; 19:2028–2030.
170. Krumbholz A, Joel S, Dremsek P, Neubert A, Johne R, Dürrwald R, Walther M, Müller TH, Kühnel D, Lange J, Wutzler P, Sauerbrei A, Ulrich RG, Zell R. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) in humans living in high pig density areas of Germany. *Med Microbiol Immunol.* 2014; 203:273–

282.

171.Kumar M, Hooda P, Khanna M, Patel U, Sehgal D. Development of BacMam Induced Hepatitis E Virus Replication Model in Hepatoma Cells to Study the Polyprotein Processing. *Front Microbiol.* 2020; 11:1347.

172.Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. *Mol Biol Evol.* 2016; 33:1870–1874.

173.Kurucz K, Hederics D, Bali D, Kemenesi G, Horváth G, Jakab F. Hepatitis E virus in Common voles (*Microtus arvalis*) from an urban environment, Hungary: Discovery of a Cricetidae-specific genotype of Orthohepevirus C. *Zoonoses Public Health.* 2019; 66:259–263.

174.Lack JB, Volk K, Van Den Bussche RA. Hepatitis E virus genotype 3 in wild rats, United States. *Emerg Infect Dis.* 2012; 18:1268–1273.

175.Lan X, Yang B, Bao YL, Xiang PY, Xue RL, Ji XL. Reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of hepatitis E virus. *J Clin Microbiol.* 2009; 47:2304–2306.

176.Lange H, Overbo J, Borgen K, Dudman S, Hoddevik G, Urdahl AM, Vold L, Sjurseth SK. Hepatitis e in Norway: Seroprevalence in humans and swine. *Epidemiol Infect.* 2017; 145:181–186.

177.Lee G-H, Tan B-H, Chi-Yuan Teo E, Lim S-G, Dan Y-Y, Wee A, Kim Aw PP, Zhu Y, Hibberd ML, Tan C-K, Purdy MA, Teo C-G. Chronic Infection With Camelid Hepatitis E Virus in a Liver Transplant Recipient Who Regularly Consumes Camel Meat and Milk. *Gastroenterology.* 2016; 150:355--357.e3.

178.Lewis HC, Wichmann O, Duizer E. Transmission routes and risk factors for autochthonous hepatitis E virus infection in Europe: a systematic review. *Epidemiol Infect.* 2010; 138:145–66.

179.Lhomme S, Gallian P, Dimeglio C, Assal A, Abravanel F, Tiberghien P, Izopet J. Viral load and clinical manifestations of hepatitis E virus genotype 3 infections. *J Viral Hepat.* 2019; 26:1139–1142.

180.Lhomme S, Marion O, Abravanel F, Izopet J, Kamar N. Clinical Manifestations, Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infections. *J Clin Med.* 2020; 9:331.

181.Li S-W, Zhang J, He Z-Q, Gu Y, Liu R-S, Lin J, Chen Y-X, Ng M-H, Xia N-S. Mutational Analysis of Essential Interactions Involved in the Assembly of Hepatitis E Virus Capsid. *J Biol Chem.* 2005a; 280:3400–3406.

182.Li S, Liu M, Cong J, Zhou Y, Miao Z. Detection and Characterization of Hepatitis E Virus in Goats at Slaughterhouse in Tai'an Region, China. *Biomed Res Int.* 2017; 2017:1–5.

183.Li S, Tang X, Seetharaman J, Yang C, Gu Y, Zhang J, Du H, Shih JWK, Hew C-L, Sivaraman J, Xia N. Dimerization of Hepatitis E Virus Capsid Protein E2s Domain Is Essential for Virus–Host Interaction. *PLoS Pathog.* 2009a; 5:e1000537.

- 184.Li SW, Zhang J, Li YM, Ou SH, Huang GY, He ZQ, Ge SX, Xian YL, Pang SQ, Ng MH, Xia NS. A bacterially expressed particulate hepatitis E vaccine: antigenicity, immunogenicity and protectivity on primates. *Vaccine*. 2005b; 23:2893–2901.
- 185.Li T-C, Bai H, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Doan YH, Takahashi K, Mishiro S, Takeda N, Wakita T. Genotype 5 Hepatitis E Virus Produced by a Reverse Genetics System Has the Potential for Zoonotic Infection. *Hepato Comm*. 2019; 3:160–172.
- 186.Li T-C, Yamakawa Y, Suzuki K, Tatsumi M, Azeez Razak MA, Uchida T, Takeda N, Miyamura T. Expression and Self-Assembly of Empty Virus-Like Particles of Hepatitis E Virus. *J Virol*. 1997; 71:7207–7213.
- 187.Li T-C, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Arikawa J, Koma T, Kataoka M, Ami Y, Suzaki Y, Mai LTQ, Hoa NT, Yamashiro T, Hasebe F, Takeda N, Wakita T. Characterization of self-assembled virus-like particles of rat hepatitis E virus generated by recombinant baculoviruses. *J Gen Virol*. 2011; 92:2830–2837.
- 188.Li T-C, Yoshizaki S, Ami Y, Suzaki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takeda N, Wakita T. Susceptibility of laboratory rats against genotypes 1, 3, 4, and rat hepatitis E viruses. *Vet Microbiol*. 2013a; 163:54–61.
- 189.Li TC, Ami Y, Suzaki Y, Yasuda SP, Yoshimatsu K, Arikawa J, Takeda N, Takaji W. Characterization of full genome of rat hepatitis e virus strain from Vietnam. *Emerg Infect Dis*. 2013b; 19:115–118.
- 190.Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerg Infect Dis*. 2005c; 11:1958–1960.
- 191.Li TC, Saito M, Ogura G, Ishibashi O, Miyamura T, Takeda N. Serologic evidence for hepatitis E virus infection in mungoose. *Am J Trop Med Hyg*. 2006; 74:932–936.
- 192.Li TC, Yang T, Ami Y, Suzaki Y, Shirakura M, Kishida N, Asanuma H, Takeda N, Takaji W. Complete genome of hepatitis E virus from laboratory ferrets. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20:709–712.
- 193.Li W, Guan D, Su J, Takeda N, Wakita T, Li T-CC, Ke CW. High prevalence of rat hepatitis E virus in wild rats in China. *Vet Microbiol*. 2013c; 165:275–280.
- 194.Li W, She R, Wei H, Zhao J, Wang Y, Sun Q, Zhang Y, Wang D, Li R. Prevalence of hepatitis E virus in swine under different breeding environment and abattoir in Beijing, China. *Vet Microbiol*. 2009b; 133:75–83.
- 195.Lin C-C, Wu J-C, Chang T-T, Chang W-Y, Yu M-L, Tam AW, Wang S-C, Huang Y-H, Chang F-Y, Lee S-D. Diagnostic Value of Immunoglobulin G (IgG) and IgM Anti-Hepatitis E Virus (HEV) Tests Based on HEV RNA in an Area Where Hepatitis E Is Not Endemic. *J Clin Microbiol*. 2000; 38:3915–

3918.

196.Lin J, Norder H, Uhlhorn H, Belák S, Widén F. Novel hepatitis E like virus found in Swedish moose. *J Gen Virol.* 2014; 95:557–570.

197.Lipej Z, Novosel D, Vojta L, Roić B, Šimpraga M, Vojta A. Detection and characterisation of hepatitis e virus in naturally infected swine in Croatia. *Acta Vet Hung.* 2013; 61:517–528.

198.Liu B, Fan M, Zhang B, Chen Y, Sun Y, Du T, Nan Y, Zhou E-M, Zhao Q. Avian hepatitis E virus infection of duck, goose, and rabbit in northwest China. *Emerg Microbes Infect.* 2018; 7:1–3.

199.Long F, Yu W, Yang C, Wang J, Li Y, Li Y, Huang F. High prevalence of hepatitis E virus infection in goats. *J Med Virol.* 2017; 89:1981–1987.

200.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.

201.Lucarelli C, Spada E, Taliani G, Chionne P, Madonna E, Marcantonio C, Pezzotti P, Bruni R, La Rosa G, Pisani G, Dell’Orso L, Ragone K, Tomei C, Ciccaglione AR. High prevalence of anti-hepatitis E virus antibodies among blood donors in central Italy, February to March 2014. *Eurosurveillance.* 2016; 21:30299.

202.Madeira F, Park YM, Lee J, Buso N, Gur T, Madhusoodanan N, Basutkar P, Tivey ARN, Potter SC, Finn RD, Lopez R. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. *Nucleic Acids Res.* 2019; 47:W636–W641.

203.Magden J, Takeda N, Li T, Auvinen P, Ahola T, Miyamura T, Merits A, Kaariainen L. Virus-Specific mRNA Capping Enzyme Encoded by Hepatitis E Virus. *J Virol.* 2001; 75:6249–6255.

204.Mansuy J, Sauné K, Rech H, Abravanel F, Mengelle C, L’Homme S, Destruel F, Kamar N, Izopet J. Seroprevalence in blood donors reveals widespread, multi-source exposure to hepatitis E virus, southern France, October 2011. *Eurosurveillance.* 2015; 20:21127.

205.Mansuy JM, Bendall R, Legrand-Abravanel F, Sauné K, Miédouge M, Ellis V, Rech H, Destruel F, Kamar N, Dalton HR, Izopet J. Hepatitis E virus antibodies in blood donors, France. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:2309–2312.

206.Mansuy JM, Gallian P, Dimeglio C, Saune K, Arnaud C, Pelletier B, Morel P, Legrand D, Tiberghien P, Izopet J. A nationwide survey of hepatitis E viral infection in French blood donors. *Hepatology.* 2016; 63:1145–1154.

207.Mardanov ES, Takova KH, Toneva VT, Zahmanova GG, Tsybalova LM, Ravin N V. A plant-based transient expression system for the rapid production of highly immunogenic Hepatitis E virus-like particles. *Biotechnol Lett.* 2020; 1–6.

208.Marek A, Bilic I, Prokofieva I, Hess M. Phylogenetic analysis of avian hepatitis E virus samples from European and Australian chicken flocks supports the existence of a different genus within the Hepeviridae comprising

at least three different genotypes. *Vet Microbiol.* 2010; 145:54–61.

209. Marion O, Abravanel F, Del Bello A, Esposito L, Lhomme S, Puissant-Lubrano B, Alric L, Faguer S, Izopet J, Kamar N. Hepatitis E virus-associated cryoglobulinemia in solid-organ-transplant recipients. *Liver Int.* 2018; 38:2178–2189.

210. Marion O, Capelli N, Lhomme S, Dubois M, Pucelle M, Abravanel F, Kamar N, Izopet J. Hepatitis E virus genotype 3 and capsid protein in the blood and urine of immunocompromised patients. *J Infect.* 2019; 78:232–240.

211. Martinelli N, Luppi A, Cordioli P, Lombardi G, Lavazza A. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in pigs in Northern Italy. *Infect Ecol Epidemiol.* 2011; 1:7331.

212. Mast EE, Alter MJ, Holland P V., Purcell RH. Evaluation of assays for antibody to hepatitis E virus by a serum panel. *Hepatology.* 1998; 27:857–861.

213. Meister TL, Bruening J, Todt D, Steinmann E. Cell culture systems for the study of hepatitis E virus. *Antiviral Res.* 2019; 163:34–49.

214. Meng J, Dai X, Chang JC, Lopareva E, Pillot J, Fields HA, Khudyakov YE. Identification and Characterization of the Neutralization Epitope(s) of the Hepatitis E Virus. *Virology.* 2001; 288:203–211.

215. Meng X-J. Novel strains of hepatitis E virus identified from humans and other animal species: is hepatitis E a zoonosis? *J Hepatol.* 2000; 33:842–845.

216. Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ, Emerson SU. A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:9860–9865.

217. Meng XJ, Wiseman B, Elvinger F, Guenette DK, Toth TE, Engle RE, Emerson SU, Purcell RH. Prevalence of antibodies to hepatitis E virus in veterinarians working with swine and in normal blood donors in the United States and other countries. *J Clin Microbiol.* 2002; 40:117–122.

218. Miyamura T. Hepatitis E virus infection in developed countries. *Virus Res.* 2011; 161:40–46.

219. Montpellier C, Wychowski C, Sayed IM, Meunier JC, Saliou JM, Ankavay M, Bull A, Pillez A, Abravanel F, Helle F, Brochet E, Drobecq H, Farhat R, Aliouat-Denis CM, Haddad JG, Izopet J, Meuleman P, Goffard A, Dubuisson J, Cocquerel L. Hepatitis E Virus Lifecycle and Identification of 3 Forms of the ORF2 Capsid Protein. *Gastroenterology.* 2018; 154:211–223.e8.

220. Mooij SH, Hogema BM, Tulen AD, van Pelt W, Franz E, Zaaijer HL, Molier M, Hofhuis A. Risk factors for hepatitis E virus seropositivity in Dutch blood donors. *BMC Infect Dis.* 2018; 18:173.

221. Mori Y, Matsuura Y. Structure of hepatitis E viral particle. *Virus Res.* 2011; 161:59–64.

222. Mover E, Wu Y, Lambeau G, Kahn F, Touqui L, Areschoug T. Using

Patient Pathways to Accelerate the Drive to Ending Tuberculosis. *J Infect Dis.* 2013; 208:2025–2035.

223. Mulyanto, Depamede SN, Sriasih M, Takahashi M, Nagashima S, Jirintai S, Nishizawa T, Okamoto H. Frequent detection and characterization of hepatitis E virus variants in wild rats (*Rattus rattus*) in Indonesia. *Arch Virol.* 2013; 158:87–96.

224. Mulyanto, Suparyatmo JB, Andayani IGAS, Khalid, Takahashi M, Ohnishi H, Jirintai S, Nagashima S, Nishizawa T, Okamoto H. Marked genomic heterogeneity of rat hepatitis E virus strains in Indonesia demonstrated on a full-length genome analysis. *Virus Res.* 2014; 179:102–112.

225. Murphy EG, Williams NJ, Jennings D, Chantrey J, Verin R, Grierson S, McElhinney LM, Bennett M. First detection of Hepatitis E virus (Orthohepevirus C) in wild brown rats (*Rattus norvegicus*) from Great Britain. *Zoonoses Public Health.* 2019; 66:686–694.

226. Nagashima S, Jirintai S, Takahashi M, Kobayashi T, Tanggis, Nishizawa T, Kouki T, Yashiro T, Okamoto H. Hepatitis E virus egress depends on the exosomal pathway, with secretory exosomes derived from multivesicular bodies. *J Gen Virol.* 2014a; 95:2166–2175.

227. Nagashima S, Takahashi M, Jirintai S, Tanggis, Kobayashi T, Nishizawa T, Okamoto H. The membrane on the surface of hepatitis E virus particles is derived from the intracellular membrane and contains trans-Golgi network protein 2. *Arch Virol.* 2014b; 159:979–991.

228. Nagashima S, Takahashi M, Kobayashi T, Nishizawa T, Nishiyama T, Primadharsini PP, Okamoto H. Characterization of the Quasi-Enveloped Hepatitis E Virus Particles Released by the Cellular Exosomal Pathway. *J Virol.* 2017; 91

229. Nakamura M, Takahashi K, Taira K, Taira M, Ohno A, Sakugawa H, Arai M, Mishiro S. Hepatitis E virus infection in wild mongooses of Okinawa, Japan: Demonstration of anti-HEV antibodies and a full-genome nucleotide sequence. *Hepatology Res.* 2006; 34:137–140.

230. Nan Y, Wu C, Zhao Q, Zhou E-M. Zoonotic Hepatitis E Virus: An Ignored Risk for Public Health. *Front Microbiol.* 2017; 8:2396.

231. Nasrallah GK, Al Absi ES, Ghandour R, Ali NH, Taleb S, Hedaya L, Ali F, Huwaidy M, Hussein A. Seroprevalence of hepatitis E virus among blood donors in Qatar (2013-2016). *Transfusion.* 2017; 57:1801–1807.

232. Navaneethan U, Al Mohajer M, Shata MT. Hepatitis E and pregnancy: understanding the pathogenesis. *Liver Int.* 2008; 28:1190–1199.

233. 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.

234. Nimgaonkar I, Ding Q, Schwartz RE, Ploss A. Hepatitis E virus:

- advances and challenges. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2018; 15:96–110.
235. Norder H, Karlsson M, Mellgren Å, Konar J, Sandberg E, Lasson A, Castedal M, Magnus L, Lagging M. Diagnostic Performance of Five Assays for Anti-Hepatitis e Virus IgG and IgM in a Large Cohort Study. *J Clin Microbiol*. 2016; 54:549–555.
236. O'Connor M, Roche SJ, Sammin D. Seroprevalence of Hepatitis e virus infection in the Irish pig population. *Ir Vet J*. 2015; 68
237. O'Riordan J, Boland F, Williams P, Donnellan J, Hogema BM, Ijaz S, Murphy WG. Hepatitis E virus infection in the Irish blood donor population. *Transfusion*. 2016; 56:2868–2876.
238. Obana S, Shimizu K, Yoshimatsu K, Hasebe F, Hotta K, Isozumi R, Nguyen HT, Le MQ, Yamashiro T, Tsuda Y, Arikawa J. Epizootiological study of rodent-borne hepatitis E virus HEV-C1 in small mammals in Hanoi, Vietnam. *J Vet Med Sci*. 2017; 79:76–81.
239. Ollier L. Chronic Hepatitis After Hepatitis E Virus Infection in a Patient With Non-Hodgkin Lymphoma Taking Rituximab. *Ann Intern Med*. 2009; 150:430.
240. Onyuok SO, Hu B, Li B, Fan Y, Kering K, Ochola GO, Zheng X-S, Obanda V, Ommeh S, Yang X-L, Agwanda B, Shi Z-L. Molecular Detection and Genetic Characterization of Novel RNA Viruses in Wild and Synanthropic Rodents and Shrews in Kenya. *Front Microbiol*. 2019; 10:2696.
241. Pallerla SR, Schembecker S, Meyer CG, Linh LTK, John R, Wedemeyer H, Bock C -Thoma., Kremsner PG, Velavan TP. Hepatitis E virus genome detection in commercial pork livers and pork meat products in Germany. *J Viral Hepat*. 2020; jvh.13396.
242. Park HK, Jeong SH, Kim JW, Woo BH, Lee DH, Kim HY, Ahn S. Seroprevalence of anti-hepatitis E virus (HEV) in a Korean population: comparison of two commercial anti-HEV assays. *BMC Infect Dis*. 2012; 12:142.
243. Parvez MK. Molecular characterization of hepatitis E virus ORF1 gene supports a papain-like cysteine protease (PCP)-domain activity. *Virus Res*. 2013; 178:553–556.
244. Parvez MK, Khan AA. Molecular modeling and analysis of hepatitis E virus (HEV) papain-like cysteine protease. *Virus Res*. 2014; 179:220–224.
245. Pas SD, de Man RA, Mulders C, Balk AHMM, van Hal PTW, Weimar W, Koopmans MPG, Osterhaus ADME, van der Eijk AA. Hepatitis E virus infection among solid organ transplant recipients, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18:869–872.
246. Pas SD, Streefkerk RHRA, Pronk M, de Man RA, Beersma MF, Osterhaus ADME, Van der Eijk AA. Diagnostic performance of selected commercial HEV IgM and IgG ELISAs for immunocompromised and immunocompetent patients. *J Clin Virol*. 2013; 58:629–634.
247. Pavio N, Doceul V, Bagdassarian E, John R. Recent knowledge on

hepatitis E virus in Suidae reservoirs and transmission routes to human. *Vet Res.* 2017; 48:78.

248.Pavio N, Meng X-J, Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res.* 2010; 41:46.

249.Pavio N, Merbah T, Thébault A. Frequent Hepatitis E Virus Contamination in Food Containing Raw Pork Liver, France. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20:1925–1927.

250.Pawlotsky J-M. Hepatitis E screening for blood donations: an urgent need? *Lancet.* 2014; 384:1729–1730.

251.Payne C., Ellis T., Plant S., Gregory A., Wilcox G. Sequence data suggests big liver and spleen disease virus (BLSV) is genetically related to hepatitis E virus. *Vet Microbiol.* 1999; 68:119–125.

252.Peralta B, Casas M, de Deus N, Martín M, Ortuño A, Pérez-Martín E, Pina S, Mateu E. Anti-HEV antibodies in domestic animal species and rodents from Spain using a genotype 3-based ELISA. *Vet Microbiol.* 2009; 137:66–73.

253.Peron J-M, Mansuy J-M, Recher C, Bureau C, Poirson H, Alric L, Izopet J, Vinel J-P. Prolonged hepatitis E in an immunocompromised patient. *J Gastroenterol Hepatol.* 2006; 21:1223–1224.

254.Péron JM, Bureau C, Poirson H, Mansuy JM, Alric L, Selves J, Dupuis E, Izopet J, Vinel JP. Fulminant liver failure from acute autochthonous hepatitis E in France: description of seven patients with acute hepatitis E and encephalopathy. *J Viral Hepat.* 2007; 14:298–303.

255.Pischke S, Peron J-M, von Wulffen M, von Felden J, Höner zu Siederdisen C, Fournier S, Lütgehetmann M, Iking-Konert C, Bettinger D, Par G, Thimme R, Cantagrel A, Lohse A, Wedemeyer H, de Man R, Mallet V. Chronic Hepatitis E in Rheumatology and Internal Medicine Patients: A Retrospective Multicenter European Cohort Study. *Viruses.* 2019; 11:186.

256.Pischke S, Suneetha P V., Baechlein C, Barg-Hock H, Heim A, Kamar N, Schlue J, Strassburg CP, Lehner F, Raupach R, Bremer B, Magerstedt P, Cornberg M, Seehusen F, Baumgaertner W, Klempnauer J, Izopet J, Manns MP, Grummer B, Wedemeyer H. Hepatitis E virus infection as a cause of graft hepatitis in liver transplant recipients. *Liver Transplant.* 2010; 16:74–82.

257.Porea D, Anita A, Demange A, Raileanu C, Oslobanu (Ludu) L, Anita D, Savuta G, Pavio N. Molecular detection of hepatitis E virus in wild boar population in eastern Romania. *Transbound Emerg Dis.* 2018; 65:527–533.

258.Primadharsini PP, Mulyanto, Wibawa IDN, Anggoro J, Nishizawa T, Takahashi M, Jirintai S, Okamoto H. The identification and characterization of novel rat hepatitis E virus strains in Bali and Sumbawa, Indonesia. *Arch Virol.* 2018; 163:1345–1349.

259.Purcell RH, Engle RE, Rood MP, Kabrane-Lazizi Y, Nguyen HT, Govindarajan S, St. Claire M, Emerson SU. Hepatitis E Virus in Rats, Los Angeles, California, USA. *Emerg Infect Dis.* 2011; 17:2216–2222.

260. Purdy MA, Sue A. The effect of phylogenetic signal reduction on genotyping of hepatitis E viruses of the species *Orthohepevirus A*. *Arch Virol*. 2017; 162:645–656.
261. Qi Y, Zhang F, Zhang L, Harrison TJ, Huang W, Zhao C, Kong W, Jiang C, Wang Y. Hepatitis e virus produced from cell culture has a lipid envelope. *PLoS One*. 2015; 10:e0132503.
262. Raj VS, Smits SL, Pas SD, Provacia LBV, Moorman-Roest H, Osterhaus ADME, Haagmans BL. Novel Hepatitis E Virus in Ferrets, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*. 2012; 18:1369–1370.
263. Raposo G, Stoorvogel W. Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *J Cell Biol*. 2013; 200:373–383.
264. Reuter G, Boros Á, Mátics R, Kapusinszky B, Delwart E, Pankovics P. Divergent hepatitis E virus in birds of prey, common kestrel (*Falco tinnunculus*) and red-footed falcon (*F. vespertinus*), Hungary. *Infect Genet Evol*. 2016a; 43:343–346.
265. Reuter G, Boros Á, Mátics R, Kapusinszky B, Delwart E, Pankovics P. A novel avian-like hepatitis E virus in wild aquatic bird, little egret (*Egretta garzetta*), in Hungary. *Infect Genet Evol*. 2016b; 46:74–77.
266. Reuter G, Fodor D, Forgách P, Kátai A, Szűcs G. Characterization and zoonotic potential of endemic hepatitis E virus (HEV) strains in humans and animals in Hungary. *J Clin Virol*. 2009; 44:277–281.
267. Riddell MA, Li F, Anderson DA. Identification of immunodominant and conformational epitopes in the capsid protein of hepatitis E virus by using monoclonal antibodies. *J Virol*. 2000; 74:8011–8017.
268. Risalde MA, Rivero-Juárez A, Romero-Palomo F, Frías M, López-López P, Cano-Terriza D, García-Bocanegra I, Jiménez-Ruíz S, Camacho Á, Machuca I, Gomez-Villamandos JC, Rivero A. Persistence of hepatitis E virus in the liver of non-viremic naturally infected wild boar. *PLoS One*. 2017; 12:e0186858.
269. Rivero-Juarez A, Risalde MA, Frias M, García-Bocanegra I, Lopez-Lopez P, Cano-Terriza D, Camacho A, Jimenez-Ruiz S, Gomez-Villamandos JC, Rivero A. Prevalence of hepatitis E virus infection in wild boars from Spain: A possible seasonal pattern? *BMC Vet Res*. 2018; 14:54.
270. Robinson RA, Burgess WH, Emerson SU, Leibowitz RS, Sosnovtseva SA, Tsarev S, Purcell RH. Structural Characterization of Recombinant Hepatitis E Virus ORF2 Proteins in Baculovirus-Infected Insect Cells. *Protein Expr Purif*. 1998; 12:75–84.
271. Rose N, Lunazzi A, Dorenlor V, Merbah T, Eono F, Eloit M, Madec F, Pavio N. High prevalence of Hepatitis E virus in French domestic pigs. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis*. 2011; 34:419–427.
272. Rossi-Tamisier M, Moal V, Gerolami R, Colson P. Discrepancy between anti-hepatitis E virus immunoglobulin G prevalence assessed by two assays in kidney and liver transplant recipients. *J Clin Virol*. 2013; 56:62–64.

273.Roth A, Lin J, Magnius L, Karlsson M, Belák S, Widén F, Norder H. Markers for ongoing or previous hepatitis E virus infection are as common in wild ungulates as in humans in Sweden. *Viruses*. 2016; 8:259.

274.Rutjes SA, Bouwknegt M, Van Der Giessen JW, De Roda Husman AM, Reusken CBEM. Seroprevalence of hepatitis e virus in pigs from different farming systems in the Netherlands. *J Food Prot*. 2014; 77:640–642.

275.Ryll R, Bernstein S, Heuser E, Schlegel M, Dremsek P, Zumpe M, Wolf S, Pépin M, Bajomi D, Müller G, Heiberg A-C, Spahr C, Lang J, Groschup MH, Ansorge H, Freise J, Guenther S, Baert K, Ruiz-Fons F, Pikula J, Knap N, Tsakmakidis I, Dovas C, Zanet S, Imholt C, Heckel G, Johne R, Ulrich RG. Detection of rat hepatitis E virus in wild Norway rats (*Rattus norvegicus*) and Black rats (*Rattus rattus*) from 11 European countries. *Vet Microbiol*. 2017; 208:58–68.

276.Ryll R, Heckel G, Corman VM, Drexler JF, Ulrich RG. Genomic and spatial variability of a European common vole hepevirus. *Arch Virol*. 2019; 164:2671–2682.

277.Said B, Ijaz S, Kafatos G, Booth L, Thomas HL, Walsh A, Ramsay M, Morgan D. Hepatitis E outbreak on cruise ship. *Emerg Infect Dis*. 2009; 15:1738–1744.

278.Salines M, Andraud M, Rose N. From the epidemiology of hepatitis E virus (HEV) within the swine reservoir to public health risk mitigation strategies: a comprehensive review. *Vet Res*. 2017; 48:31.

279.Samuel D, Sasnauskas K, Jin L, Gedvilaite A, Slibinskas R, Beard S, Zvirbliene A, Oliveira SA, Staniulis J, Cohen B, Brown D. Development of a measles specific IgM ELISA for use with serum and oral fluid samples using recombinant measles nucleoprotein produced in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Clin Virol*. 2003; 28:121–129.

280.Sanford BJ, Emerson SU, Purcell RH, Engle RE, Dryman BA, Cecere TE, Buechner-Maxwell V, Sponenberg DP, Meng XJ. Serological Evidence for a Hepatitis E Virus-Related Agent in Goats in the United States. *Transbound Emerg Dis*. 2013; 60:538–545.

281.Sauleda S, Ong E, Bes M, Janssen A, Cory R, Babizki M, Shin T, Lindquist A, Hoang A, Vang L, Piron M, Casamitjana N, Koppelman M, Danzig L, Linnen JM. Seroprevalence of hepatitis E virus (HEV) and detection of HEV RNA with a transcription-mediated amplification assay in blood donors from Catalonia (Spain). *Transfusion*. 2015; 55:972–979.

282.Sayle RA, Milner-White EJ. RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci*. 1995; 20:374–376.

283.Schofield DJ, Glamann J, Emerson SU, Purcell RH. Identification by phage display and characterization of two neutralizing chimpanzee monoclonal antibodies to the hepatitis E virus capsid protein. *J Virol*. 2000; 74:5548–5555.

284.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. *Vet J.* 2008; 175:130–132.

285. Shimizu K, Hamaguchi S, Ngo CC, Li T-C, Ando S, Yoshimatsu K, Yasuda SP, Koma T, Isozumi R, Tsuda Y, Fujita H, Pham TT, LE MQ, Dang AD, Nguyen TQ, Yoshida L-M, Ariyoshi K, Arikawa J. Serological evidence of infection with rodent-borne hepatitis E virus HEV-C1 or antigenically related virus in humans. *J Vet Med Sci.* 2016; 78:1677–1681.

286. Shiota T, Li TC, Nishimura Y, Yoshizaki S, Sugiyama R, Shimojima M, Saijo M, Shimizu H, Suzuki R, Wakita T, Muramatsu M, Ishii K. Integrin $\alpha 3$ is involved in non-enveloped hepatitis E virus infection. *Virology.* 2019; 536:119–124.

287. Shrestha AC, Flower RLP, Seed CR, Stramer SL, Faddy HM. A Comparative Study of Assay Performance of Commercial Hepatitis E Virus Enzyme-Linked Immunosorbent Assay Kits in Australian Blood Donor Samples. *J Blood Transfus.* 2016; 2016:1–6.

288. Shrestha AC, Seed CR, Flower RLP, Rooks KM, Keller AJ, Harley RJ, Chan H-T, Holmberg JA, Faddy HM. Hepatitis E Virus and Implications for Blood Supply Safety, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2014; 20:1940–1942.

289. Shulman M, Wilde CD, Köhler G. A better cell line for making hybridomas secreting specific antibodies. *Nature.* 1978; 276:269–270.

290. Simanavicius M, Juskaite K, Verbickaite A, Jasiulionis M, Tamosiunas PL, Petraityte-Burneikiene R, Zvirbliene A, Ulrich RG, Kucinskaite-Kodze I. Detection of rat hepatitis E virus, but not human pathogenic hepatitis E virus genotype 1-4 infections in wild rats from Lithuania. *Vet Microbiol.* 2018a; 221:129–133.

291. Simanavicius M, Tamosiunas PL, Petraityte-Burneikiene R, Johne R, Ulrich RG, Zvirbliene A, Kucinskaite-Kodze I. Generation in yeast and antigenic characterization of hepatitis E virus capsid protein virus-like particles. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2018b; 102:185–198.

292. Slot E, Hogema B, Riezebos-Brilman A, Kok T, Molier M, Zaaijer H. Silent hepatitis E virus infection in Dutch blood donors, 2011 to 2012. *Eurosurveillance.* 2013; 18:20550.

293. Smith DB, Izopet J, Nicot F, Simmonds P, Jameel S, Meng XJ, Norder H, Okamoto H, van der Poel WHM, Reuter G, Purdy MA. Update: Proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A). *J Gen Virol.* 2020; 101:692–698.

294. Smith DB, Purdy MA, Simmonds P. Genetic variability and the classification of hepatitis E virus. *J Virol.* 2013; 87:4161–4169.

295. Smith DB, Simmonds P. Classification and genomic diversity of enterically transmitted hepatitis viruses. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2018; 8:1–16.

296. Smith DB, Vanek J, Ramalingam S, Johannessen I, Templeton K, Simmonds P. Evolution of the hepatitis E virus hypervariable region. *J Gen*

Viol. 2012; 93:2408–2418.

297.Sonoda H, Abe M, Sugimoto T, Sato Y, Bando M, Fukui E, Mizuo H, Takahashi M, Nishizawa T, Okamoto H. Prevalence of Hepatitis E Virus (HEV) Infection in Wild Boars and Deer and Genetic Identification of a Genotype 3 HEV from a Boar in Japan. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:5371–5374.

298.Spada E, Pupella S, Pisani G, Bruni R, Chionne P, Madonna E, Villano U, Simeoni M, Fabi S, Marano G, Marcantonio C, Pezzotti P, Ciccaglione AR, Liembruno GM. A nationwide retrospective study on prevalence of hepatitis E virus infection in Italian blood donors. *Blood Transfus.* 2018; 16:413–421.

299.Spahr C, Ryll R, Knauf-Witzens T, Vahlenkamp TW, Ulrich RG, Johne R. Serological evidence of hepatitis E virus infection in zoo animals and identification of a rodent-borne strain in a Syrian brown bear. *Vet Microbiol.* 2017; 212:87–92.

300.Spancerniene U, Buitkuvienne J, Grigas J, Pampariene I, Salomskas A, Cepulienė R, Zymantiene J, Stankevicius A. Seroprevalence of hepatitis E virus in lithuanian domestic pigs and wildlife. *Acta Vet Brno.* 2016; 85:319–327.

301.Spancerniene U, Grigas J, Buitkuvienne J, Zymantiene J, Juozaitiene V, Stankeviciute M, Razukevicius D, Zienius D, Stankevicius A. Prevalence and phylogenetic analysis of hepatitis E virus in pigs, wild boars, roe deer, red deer and moose in Lithuania. *Acta Vet Scand.* 2018; 60:13.

302.Spina A, Lenglet A, Beversluis D, de Jong M, Vernier L, Spencer C, Andayi F, Kamau C, Vollmer S, Hogema B, Irwin A, Ngueremi Yary R, Mahamat Ali A, Moussa A, Alfani P, Sang S. A large outbreak of Hepatitis E virus genotype 1 infection in an urban setting in Chad likely linked to household level transmission factors, 2016-2017. *PLoS One.* 2017; 12:e0188240.

303.Sridhar S, Teng J, Chiu T-H, Lau S, Woo P. Hepatitis E Virus Genotypes and Evolution: Emergence of Camel Hepatitis E Variants. *Int J Mol Sci.* 2017; 18:869.

304.Sridhar S, Yip CC, Wu S, Chew NF, Leung K, Chan JF, Zhao PS, Chan W, Poon RW, Tsoi H, Cai J, Chan HS, Leung AW, Tse CW, Zee JS, Tsang OT, Cheng VC, Lau SK, Woo PC, Tsang DN, Yuen K. Transmission of rat hepatitis E virus infection to humans in Hong Kong: a clinical and epidemiological analysis. *Hepatology.* 2020; hep.31138.

305.Sridhar S, Yip CCY, Wu S, Cai J, Zhang AJ-X, Leung K-H, Chung TWH, Chan JFW, Chan W-M, Teng JLL, Au-Yeung RKH, Cheng VCC, Chen H, Lau SKP, Woo PCY, Xia N-S, Lo C-M, Yuen K-Y. Rat Hepatitis E Virus as Cause of Persistent Hepatitis after Liver Transplant. *Emerg Infect Dis.* 2018; 24:2241–2250.

306.Stevens O, Claeys KG, Poesen K, Saegeman V, Van Damme P. Diagnostic Challenges and Clinical Characteristics of Hepatitis E Virus–

Associated Guillain-Barré Syndrome. *JAMA Neurol.* 2017; 74:26.

307.Strand TM, Lundkvist Å. Rat-borne diseases at the horizon. A systematic review on infectious agents carried by rats in Europe 1995–2016. *Infect Ecol Epidemiol.* 2019; 9:1553461.

308.Su Q, Li Y, Meng F, Cui Z, Chang S, Zhao P. Hepatic rupture hemorrhage syndrome in chickens caused by a novel genotype avian hepatitis E virus. *Vet Microbiol.* 2018; 222:91–97.

309.Sun ZF, Larsen CT, Huang FF, Billam P, Pierson FW, Toth TE, Meng XJ. Generation and infectivity titration of an infectious stock of avian hepatitis E virus (HEV) in chickens and cross-species infection of turkeys with avian HEV. *J Clin Microbiol.* 2004; 42:2658–2662.

310.Surjit M, Jameel S, Lal SK. The ORF2 Protein of Hepatitis E Virus Binds the 5' Region of Viral RNA. *J Virol.* 2004; 78:320–328.

311.Surjit M, Oberoi R, Kumar R, Lal SK. Enhanced α 1 microglobulin secretion from hepatitis E virus ORF3-expressing human hepatoma cells is mediated by the tumor susceptibility gene 101. *J Biol Chem.* 2006; 281:8135–8142.

312.Takahashi M, Hoshino Y, Tanaka T, Takahashi H, Nishizawa T, Okamoto H. Production of monoclonal antibodies against hepatitis E virus capsid protein and evaluation of their neutralizing activity in a cell culture system. *Arch Virol.* 2008a; 153:657–666.

313.Takahashi M, Kusakai S, Mizuo H, Suzuki K, Fujimura K, Masuko K, Sugai Y, Aikawa T, Nishizawa T, Okamoto H. Simultaneous detection of immunoglobulin A (IgA) and IgM antibodies against hepatitis E virus (HEV) is highly specific for diagnosis of acute HEV infection. *J Clin Microbiol.* 2005; 43:49–56.

314.Takahashi M, Nishizawa T, Nagashima S, Jirintai S, Kawakami M, Sonoda Y, Suzuki T, Yamamoto S, Shigemoto K, Ashida K, Sato Y, Okamoto H. Molecular characterization of a novel hepatitis E virus (HEV) strain obtained from a wild boar in Japan that is highly divergent from the previously recognized HEV strains. *Virus Res.* 2014; 180:59–69.

315.Takahashi M, Nishizawa T, Sato H, Sato Y, Jirintai, Nagashima S, Okamoto H. 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. *J Gen Virol.* 2011; 92:902–908.

316.Takahashi M, Tamura K, Hoshino Y, Nagashima S, Yazaki Y, Mizuo H, Iwamoto S, Okayama M, Nakamura Y, Kajii E, Okamoto H. A nationwide survey of hepatitis E virus infection in the general population of Japan. *J Med Virol.* 2010; 82:271–281.

317.Takahashi M, Yamada K, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Tanaka T, Okamoto H. Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis e virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol.* 2008b; 153:1703–

1713.

318. Tam AW, Smith MM, Guerra ME, Huang CC, Bradley DW, Fry KE, Reyes GR. Hepatitis E virus (HEV): Molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*. 1991; 185:120–131.

319. Tamošiūnas VA, Dubakienė R, Žvirblienė A. Aiškinamasis imunologijos ir alergologijos terminų žodynas. Mokslo ir enciklopedijų leidybos centras, Vilnius

320. Tamura A, Shimizu YK, Tanaka T, Kuroda K, Arakawa Y, Takahashi K, Mishiro S, Shimizu K, Moriyama M. Persistent infection of hepatitis E virus transmitted by blood transfusion in a patient with T-cell lymphoma. *Hepatol Res*. 2007; 37:113–120.

321. Tamura K, Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol Biol Evol*. 1993; 10:512–526.

322. Tang Z-M, Tang M, Zhao M, Wen G-P, Yang F, Cai W, Wang S-L, Zheng Z-Z, Xia N-S. A novel linear neutralizing epitope of hepatitis E virus. *Vaccine*. 2015; 33:3504–3511.

323. Teixeira J, Mesquita JR, Pereira SS, Oliveira RMS, Abreu-Silva J, Rodrigues A, Myrmel M, Stene-Johansen K, Øverbø J, Gonçalves G, Nascimento MSJ. Prevalence of hepatitis E virus antibodies in workers occupationally exposed to swine in Portugal. *Med Microbiol Immunol*. 2017; 206:77–81.

324. TEO C-G. Fatal outbreaks of jaundice in pregnancy and the epidemic history of hepatitis E. *Epidemiol Infect*. 2012; 140:767–787.

325. Thiry D, Mauroy A, Saegerman C, Licoppe A, Fett T, Thomas I, Brochier B, Thiry E, Linden A. Belgian Wildlife as Potential Zoonotic Reservoir of Hepatitis E Virus. *Transbound Emerg Dis*. 2017a; 64:764–773.

326. Thiry D, Mauroy A, Saegerman C, Thomas I, Wautier M, Miry C, Czaplicki G, Berkvens D, Praet N, van der Poel W, Cariolet R, Brochier B, Thiry E. Estimation of hepatitis E virus (HEV) pig seroprevalence using ELISA and Western blot and comparison between human and pig HEV sequences in Belgium. *Vet Microbiol*. 2014; 172:407–414.

327. Thiry D, Rose N, Mauroy A, Paboeuf F, Dams L, Roels S, Pavio N, Thiry E. Susceptibility of Pigs to Zoonotic Hepatitis E Virus Genotype 3 Isolated from a Wild Boar. *Transbound Emerg Dis*. 2017b; 64:1589–1597.

328. Thom K, Gilhooly P, McGowan K, Malloy K, Jarvis LM, Crossan C, Scobie L, Blatchford O, Smith-Palmer A, Donnelly MC, Davidson JS, Johannessen I, Simpson KJ, Dalton HR, Petrik J. Hepatitis E virus (HEV) in Scotland: evidence of recent increase in viral circulation in humans. *Eurosurveillance*. 2018; 23:17–00174.

329. Tomiyama D, Inoue E, Osawa Y, Okazaki K. Serological evidence of infection with hepatitis E virus among wild Yezo-deer, *Cervus nippon yesoensis*, in Hokkaido, Japan. *J Viral Hepat*. 2009; 16:524–528.

330. Trémeaux P, Lhomme S, Chapuy-Regaud S, Peron JM, Alric L, Kamar N, Izopet J, Abravanel F. Performance of an antigen assay for diagnosing acute hepatitis E virus genotype 3 infection. *J Clin Virol.* 2016; 79:1–5.
331. Tyagi S, Korkaya H, Zafrullah M, Jameel S, Lal SK. The phosphorylated form of the ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with its non-glycosylated form of the major capsid protein, ORF2. *J Biol Chem.* 2002; 277:22759–22767.
332. Van Den Berg B, Van Der Eijk AA, Pas SD, Hunter JG, Madden RG, Tio-Gillen AP, Dalton HR, Jacobs BC. Guillain-Barré syndrome associated with preceding hepatitis E virus infection. *Neurology.* 2014; 82:491–497.
333. Van Eijk JJJ, Dalton HR, Ripellino P, Madden RG, Jones C, Fritz M, Gobbi C, Melli G, Pasi E, Herrod J, Lissmann RF, Ashraf HH, Abdelrahim M, Masri OABAL, Fraga M, Benninger D, Kuntzer T, Aubert V, Sahli R, Moradpour D, Blasco-Perrin H, Attarian S, Gérolami R, Colson P, Giordani MT, Hartl J, Pischke S, Lin NX, McLean BN, Bendall RP, Panning M, Peron JM, Kamar N, Izopet J, Jacobs BC, Van Alfen N, Van Engelen BGM. Clinical phenotype and outcome of hepatitis e virus-associated neuralgic amyotrophy. *Neurology.* 2017; 89:909–917.
334. Van Eijk JJJ, Madden RG, Van Der Eijk AA, Hunter JG, Reimerink JHJ, Bendall RP, Pas SD, Ellis V, Van Alfen N, Beynon L, Southwell L, McLean B, Jacobs BC, Van Engelen BGM, Dalton HR. Neuralgic amyotrophy and hepatitis E virus infection. *Neurology.* 2014; 82:498–503.
335. van Gageldonk-Lafeber AB, van der Hoek W, Borlée F, Heederik DJJ, Mooi SH, Maassen CBM, Yzermans CJ, Rockx B, Smit LAM, Reimerink JHJ. Hepatitis E virus seroprevalence among the general population in a livestock-dense area in the Netherlands: A cross-sectional population-based serological survey. *BMC Infect Dis.* 2017; 17:21.
336. Varma SPK, Kumar A, Kapur N, Durgapal H, Acharya SK, Panda SK. Hepatitis E virus replication involves alternating negative- and positive-sense RNA synthesis. *J Gen Virol.* 2011; 92:572–581.
337. Versluis J, Pas SD, Agteresch HJ, de Man RA, Maaskant J, Schipper MEI, Osterhaus ADME, Cornelissen JJ, van der Eijk AA. Hepatitis E virus: an underestimated opportunistic pathogen in recipients of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood.* 2013; 122:1079–1086.
338. Villalba MCM, Martínez DC, Ahmad I, Lay LAR, Corredor MB, March CG, Martínez LS, Martínez-Campo LS, Jameel S. Hepatitis e virus in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *Dis Aquat Organ.* 2017; 123:13–18.
339. Vollmer T, Diekmann J, Johne R, Eberhardt M, Knabbe C, Dreier J. Novel approach for detection of hepatitis E virus infection in German blood donors. *J Clin Microbiol.* 2012; 50:2708–2713.
340. Vollmer T, Knabbe C, Dreier J. Comparison of real-time PCR and antigen assays for detection of hepatitis e virus in blood donors. *J Clin*

Microbiol. 2014; 52:2150–2156.

341. Wacheck S, Werres C, Mohn U, Dorn S, Soutschek E, Fredriksson-Ahomaa M, Märklbauer E. Detection of IgM and IgG against hepatitis E virus in serum and meat juice samples from pigs at slaughter in Bavaria, Germany. *Foodborne Pathog Dis.* 2012; 9:655–660.

342. Walachowski S, Dorenlor V, Lefevre J, Lunazzi A, Eono F, Merbah T, Eveno E, Pavio N, Rose N. Risk factors associated with the presence of hepatitis E virus in livers and seroprevalence in slaughter-age pigs: A retrospective study of 90 swine farms in France. *Epidemiol Infect.* 2014; 142:1934–1944.

343. Wang B, Akanbi OA, Harms D, Adesina O, Osundare FA, Naidoo D, Deveaux I, Ogundiran O, Ugochukwu U, Mba N, Ihekweazu C, Bock CT. A new hepatitis e virus genotype 2 strain identified from an outbreak in Nigeria, 2017. *Virol J.* 2018a; 15:163.

344. Wang B, Cai CL, Li B, Zhang W, Zhu Y, Chen WH, Zhuo F, Shi ZL, Yang X Lou. Detection and characterization of three zoonotic viruses in wild rodents and shrews from Shenzhen city, China. *Virol Sin.* 2017; 32:290–297.

345. Wang B, Harms D, Yang X-L, Bock C-T. Orthohepevirus C: An Expanding Species of Emerging Hepatitis E Virus Variants. *Pathogens.* 2020; 9:154.

346. Wang B, Li W, Zhou J-H, Li B, Zhang W, Yang W-H, Pan H, Wang L-X, Bock CT, Shi Z-L, Zhang Y-Z, Yang X-L. Chevrier's Field Mouse (*Apodemus chevrieri*) and Père David's Vole (*Eothenomys melanogaster*) in China Carry Orthohepeviruses that form Two Putative Novel Genotypes Within the Species Orthohepevirus C. *Virol Sin.* 2018b; 33:44–58.

347. Wang B, Meng X-J. Hepatitis E virus: host tropism and zoonotic infection. *Curr Opin Microbiol.* 2021; 59:8–15.

348. Wang H, Castillo-Contreras R, Saguti F, López-Olvera JR, Karlsson M, Mentaberre G, Lindh M, Serra-Cobo J, Norder H. Genetically similar hepatitis E virus strains infect both humans and wild boars in the Barcelona area, Spain, and Sweden. *Transbound Emerg Dis.* 2019; 66:978–985.

349. Wang L, Gong W, Fu H, Li M, Zhang Y, Luo Z, Xu Q, Wang L. Hepatitis E virus detected from Chinese laboratory ferrets and farmed mink. *Transbound Emerg Dis.* 2018c; 65:e219–e223.

350. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, Heer FT, De Beer TAP, Rempfer C, Bordoli L, Lepore R, Schwede T. SWISS-MODEL: Homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res.* 2018; 46:W296–W303.

351. Waterhouse AM, Procter JB, Martin DMA, Clamp M, Barton GJ. Jalview Version 2-A multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics.* 2009; 25:1189–1191.

352. Wedemeyer H, Pischke S, Manns MP. Pathogenesis and Treatment of Hepatitis E Virus Infection. *Gastroenterology.* 2012; 142:1388-1397.e1.

353. Wei M, Zhang X, Yu H, Tang Z-M, Wang K, Li Z, Zheng Z, Li S, Zhang J, Xia N, Zhao Q. Bacteria expressed hepatitis E virus capsid proteins maintain virion-like epitopes. *Vaccine*. 2014; 32:2859–2865.
354. Weigand K, Weigand K, Schemmerer M, Müller M, Wenzel JJ. Hepatitis E Seroprevalence and Genotyping in a Cohort of Wild Boars in Southern Germany and Eastern Alsace. *Food Environ Virol*. 2018; 10:167–175.
355. Wenzel JJ, Preiss J, Schemmerer M, Huber B, Jilg W. Test performance characteristics of anti-HEV IgG assays strongly influence hepatitis e seroprevalence estimates. *J Infect Dis*. 2013; 207:497–500.
356. Wenzel JJ, Preiß J, Schemmerer M, Huber B, Plentz A, Jilg W. Detection of hepatitis E virus (HEV) from porcine livers in Southeastern Germany and high sequence homology to human HEV isolates. *J Clin Virol*. 2011; 52:50–54.
357. Widén F, Ayrál F, Artois M, Olofson A-S, Lin J. PCR detection and analysis of potentially zoonotic Hepatitis E virus in French rats. *Virol J*. 2014; 11:90.
358. Wilhelm B, Leblanc D, Leger D, Gow S, Deckert A, Pearl DL, Friendship R, Rajić A, Houde A, McEwen S. Farm-level prevalence and risk factors for detection of hepatitis E virus, porcine enteric calicivirus, and rotavirus in Canadian finisher pigs. *Can J Vet Res*. 2016; 80:95–105.
359. Wilson MB, Nakane PK. Recent developments in the periodate method of conjugating horseradish peroxidase (HRPO) to antibodies. In: Knapp W, Holubar K, Wick G, editors. *Immunofluorescence and related techniques*. Amsterdam: Elsevier; 1978.
360. Wisdom GB. Conjugation of antibodies to horseradish peroxidase. *Methods Mol Biol*. 2005; 295:127–130.
361. Wißing MH, Brüggemann Y, Steinmann E, Todt D. Virus–Host Cell Interplay during Hepatitis E Virus Infection. *Trends Microbiol*. 2020; 0
362. Wolf S, Reetz J, Johne R, Heiberg A-C, Petri S, Kanig H, Ulrich RG. The simultaneous occurrence of human norovirus and hepatitis E virus in a Norway rat (*Rattus norvegicus*). *Arch Virol*. 2013; 158:1575–1578.
363. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Cao K-Y, Wernery U, Schountz T, Chiu TH, Tsang AKL, Wong P-C, Wong EYM, Yuen K-Y. New Hepatitis E Virus Genotype in Bactrian Camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerg Infect Dis*. 2016; 22:2219–2221.
364. Woo PCY, Lau SKP, Teng JLL, Tsang AKL, Joseph M, Wong EYM, Tang Y, Sivakumar S, Xie J, Bai R, Wernery R, Wernery U, Yuen K-Y. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerg Infect Dis*. 2014; 20:1044–1048.
365. Wu J-C, Sheen I-J, Chiang T-Y, Sheng W-Y, Wang Y-J, Chan C-Y, Lee S-D. The impact of traveling to endemic areas on the spread of hepatitis E virus infection: Epidemiological and molecular analyses. *Hepatology*. 1998;

27:1415–1420.

366. Wu J, Si F, Jiang C, Li T, Jin M. Molecular detection of hepatitis E virus in sheep from southern Xinjiang, China. *Virus Genes*. 2015; 50:410–417.

367. Wu WC, Su CW, Yang JY, Lin SF, Chen JY, Wu JC. Application of serologic assays for diagnosing acute hepatitis E in national surveillance of a nonendemic area. *J Med Virol*. 2014; 86:720–728.

368. Wu Z, Lu L, Du J, Yang L, Ren X, Liu B, Jiang J, Yang J, Dong J, Sun L, Zhu Y, Li Y, Zheng D, Zhang C, Su H, Zheng Y, Zhou H, Zhu G, Li H, Chmura A, Yang F, Daszak P, Wang J, Liu Q, Jin Q. Comparative analysis of rodent and small mammal viromes to better understand the wildlife origin of emerging infectious diseases 06 Biological Sciences 0604 Genetics 11 Medical and Health Sciences 1108 Medical Microbiology. *Microbiome*. 2018; 6:178.

369. Xie X-T, Macdonald RE, Tapscott B, Nagy E, Turner P V. Detection of Astrovirus, Rotavirus C, and Hepatitis E Viral RNA in Adult and Juvenile Farmed Mink (*Neovison vison*). *Front Vet Sci*. 2018; 5:132.

370. Xing L, Li T-C, Mayazaki N, Simon MN, Wall JS, Moore M, Wang C-Y, Takeda N, Wakita T, Miyamura T, Cheng RH. Structure of Hepatitis E Virion-sized Particle Reveals an RNA-dependent Viral Assembly Pathway. *J Biol Chem*. 2010; 285:33175–33183.

371. Xu C, Wang RY, Schechterly CA, Ge S, Shih JW, Xia N-S, Luban NLC, Alter HJ. An assessment of hepatitis E virus (HEV) in US blood donors and recipients: no detectable HEV RNA in 1939 donors tested and no evidence for HEV transmission to 362 prospectively followed recipients. *Transfusion*. 2013; 53:2505–2511.

372. Yamada K, Takahashi M, Hoshino Y, Takahashi H, Ichiyama K, Nagashima S, Tanaka T, Okamoto H. ORF3 protein of hepatitis E virus is essential for virion release from infected cells. *J Gen Virol*. 2009; 90:1880–1891.

373. Yamashita T, Mori Y, Miyazaki N, Cheng RH, Yoshimura M, Unno H, Shima R, Moriishi K, Tsukihara T, Tian CL, Takeda N, Miyamura T, Matsuura Y. Biological and immunological characteristics of hepatitis E virus-like particles based on the crystal structure. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106:12986–12991.

374. Yan B, Zhang L, Gong L, Lv J, Feng Y, Liu J, Song L, Xu Q, Jiang M, Xu A. Hepatitis E Virus in Yellow Cattle, Shandong, Eastern China. *Emerg Infect Dis*. 2016; 22:2211–2212.

375. Yang C, Wang L, Shen H, Zheng Y, Gauger PC, Chen Q, Zhang J, Yoon K-J, Harmon KM, Main RG, Li G. Detection and genomic characterization of new avian-like hepatitis E virus in a sparrow in the United States. *Arch Virol*. 2018; 163:2861–2864.

376. Yin X, Ambardekar C, Lu Y, Feng Z. Distinct Entry Mechanisms for

Nonenveloped and Quasi-Enveloped Hepatitis E Viruses. *J Virol.* 2016; 90:4232–4242.

377. Yin X, Ying D, Lhomme S, Tang Z, Walker CM, Xia N, Zheng Z, Feng Z. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *Proc Natl Acad Sci.* 2018; 115:4773–4778.

378. Zafrullah M, Ozdener MH, Panda SK, Jameel S. The ORF3 protein of hepatitis E virus is a phosphoprotein that associates with the cytoskeleton. *J Virol.* 1997; 71:9045–9053.

379. Zafrullah M, Zhang X, Tran C, Nguyen M, Kamili S, Purdy MA, Stramer SL. Disparities in detection of antibodies against hepatitis E virus in US blood donor samples using commercial assays. *Transfusion.* 2018; 58:1254–1263.

380. Zhang F, Li X, Li Z, Harrison TJ, Chong H, Qiao S, Huang W, Zhang H, Zhuang H, Wang Y. Detection of HEV antigen as a novel marker for the diagnosis of hepatitis E. *J Med Virol.* 2006; 78:1441–1448.

381. Zhang H, Dai X, Shan X, Meng J. Characterization of antigenic epitopes of the ORF2 protein from hepatitis E virus genotype 4. *Virus Res.* 2009a; 142:140–143.

382. Zhang HY, Chen DS, Wu YQ, He QG, Chen HC, Liu ZF. Both swine and human cells are capable to support the replication of swine hepatitis E virus type 4 in vitro. *Virus Res.* 2011; 158:289–293.

383. Zhang J, Gu Y, Ge SX, Li SW, He ZQ, Huang GY, Zhuang H, Ng MH, Xia NS. Analysis of hepatitis E virus neutralization sites using monoclonal antibodies directed against a virus capsid protein. *Vaccine.* 2005; 23:2881–2892.

384. Zhang L, Tian Y, Wen Z, Zhang F, Qi Y, Huang W, Zhang H, Wang Y. Asialoglycoprotein receptor facilitates infection of PLC/PRF/5 cells by HEV through interaction with ORF2. *J Med Virol.* 2016; 88:2186–2195.

385. Zhang LQ, Zhao FR, Liu ZG, Kong WL, Wang H, Ouyang Y, Liang H Bin, Zhang CY, Qi HT, Huang CL, Guo SH, Zhang GH. Simple and rapid detection of swine hepatitis E virus by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Arch Virol.* 2012; 157:2383–2388.

386. Zhang S, Tian D, Zhang Z, Xiong J, Yuan Q, Ge S, Zhang J, Xia N. Clinical significance of anti-HEV IgA in diagnosis of acute genotype 4 hepatitis e virus infection negative for anti-HEV IgM. *Dig Dis Sci.* 2009b; 54:2512–2518.

387. Zhang W, Shen Q, Mou J, Gong G, Yang Z, Cui L, Zhu J, Ju G, Hua X. Hepatitis E Virus Infection among Domestic Animals in Eastern China. *Zoonoses Public Health.* 2008; 55:291–298.

388. Zhang X, Bilic I, Troxler S, Hess M. Evidence of genotypes 1 and 3 of avian hepatitis E virus in wild birds. *Virus Res.* 2017; 228:75–78.

389. Zhao C, Ma Z, Harrison TJ, Feng R, Zhang C, Qiao Z, Fan J, Ma H, Li M, Song A, Wang Y. A novel genotype of hepatitis E virus prevalent

among farmed rabbits in China. *J Med Virol.* 2009; 81:1371–1379.

390. Zhao Q, Zhou EM, Dong SW, Qiu HK, Zhang L, Hu S Bin, Zhao FF, Jiang SJ, Sun YN. Analysis of Avian Hepatitis E virus from chickens, China. *Emerg Infect Dis.* 2010; 16:1469–1472.

391. Zhou Y-H, Purcell RH, Emerson SU. An ELISA for putative neutralizing antibodies to hepatitis E virus detects antibodies to genotypes 1, 2, 3, and 4. *Vaccine.* 2004; 22:2578–2585.

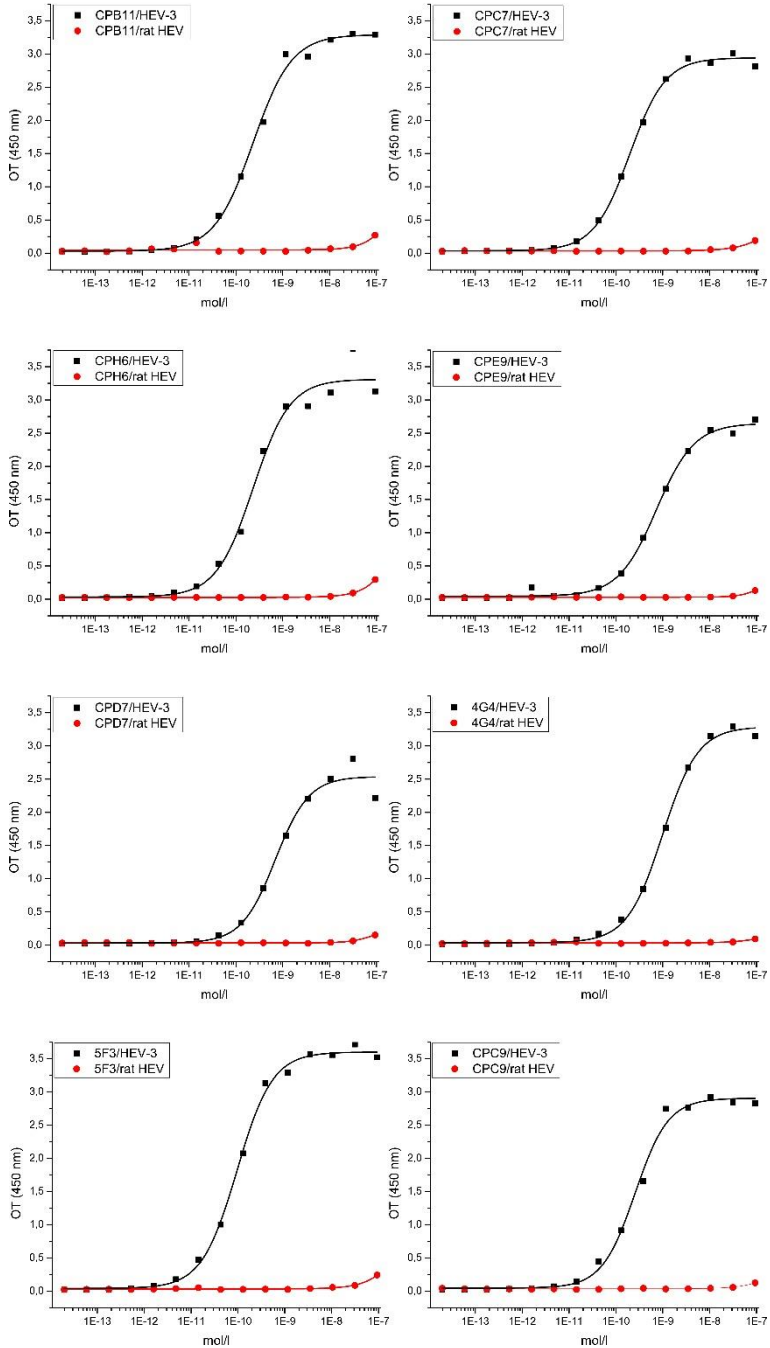
PRIEDAI

1 priedas. Laukinių žiurkių duomenys.

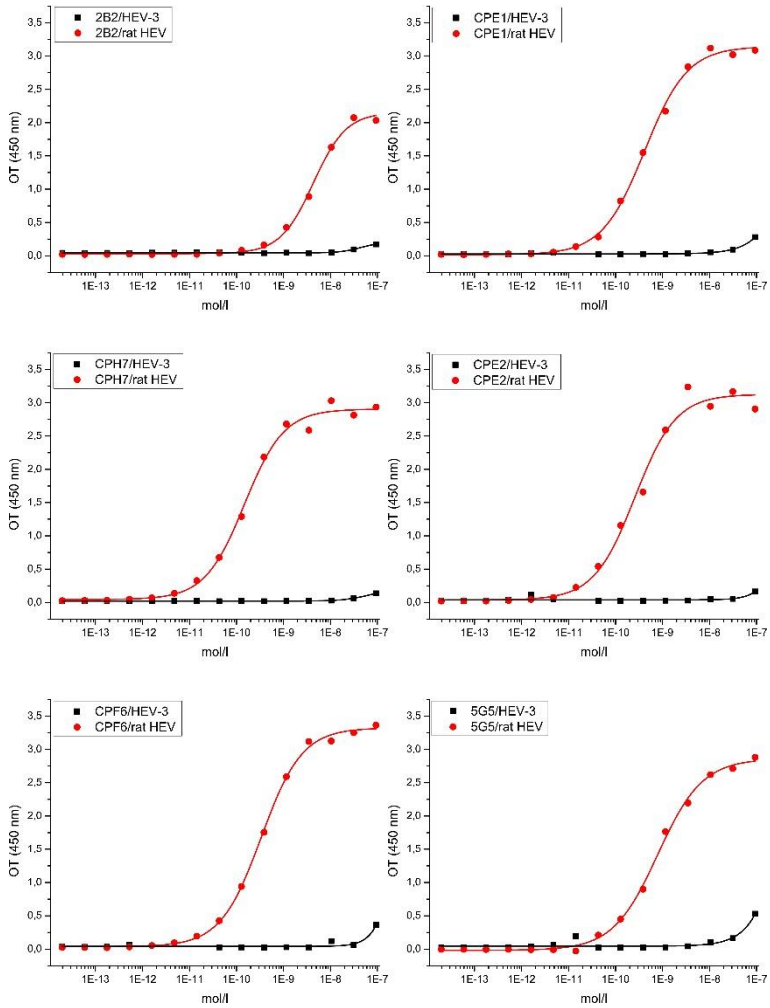
	Charakteristika	Žiurkių skaičius	%
Rūšis	<i>R. norvegicus</i>	27	24,77
	<i>R. rattus</i>	76	69,72
	<i>R. rattus (ruda forma)</i>	6	5,50
<i>Iš viso:</i>		109	100
Vieta	Šilutės raj.	6	5,50
	Joniškio raj.	3	2,75
	Rokiškio raj.	12	11,01
	Utenos raj.	1	0,92
	Vilniaus raj.	6	5,50
	Zarasų raj.	81	74,31
<i>Iš viso:</i>		109	100,00
Data	2014 m.	12	11,01
	2015 m.	45	41,28
	2016 m.	23	21,10
	2017 m.	29	26,61
<i>Iš viso:</i>		109	100,00
Lytis	mot.	56	51,38
	vyr.	49	44,95
	nenustatyta	4	3,67
<i>Iš viso:</i>		109	100,00
Masė, g	0-100	54	49,54
	100-200	33	30,28
	200-300	10	9,17
	300 ir daugiau	12	11,01
<i>Iš viso:</i>		109	100,00
Amžius	jauniklis	67	61,47
	suaugėlis	42	38,53
<i>Iš viso:</i>		109	100,00

2 priedas. MAk kryžminio specifiškumo ir giminingumo tyrimas IFA.

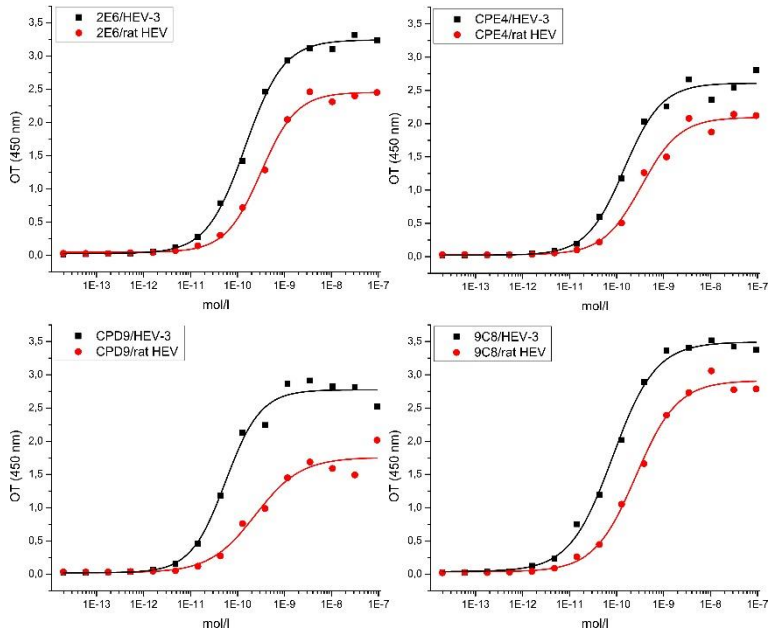
Specifiški HEV-3



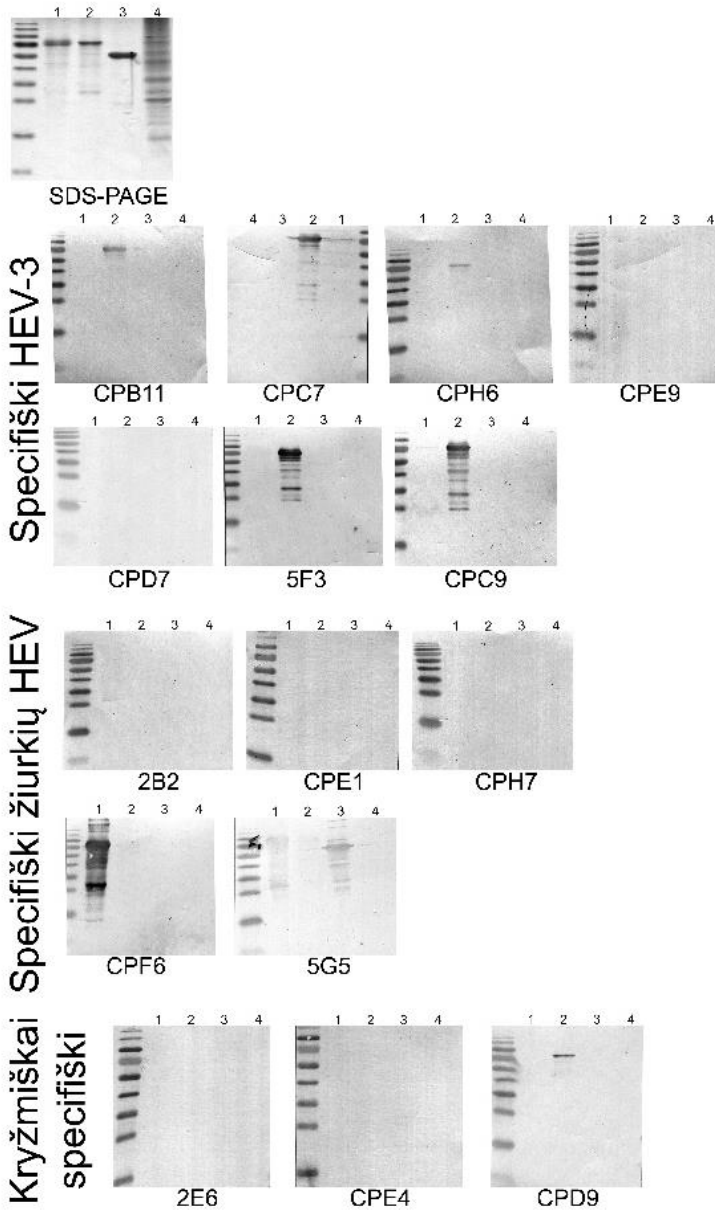
Specifiški žiurkių HEV



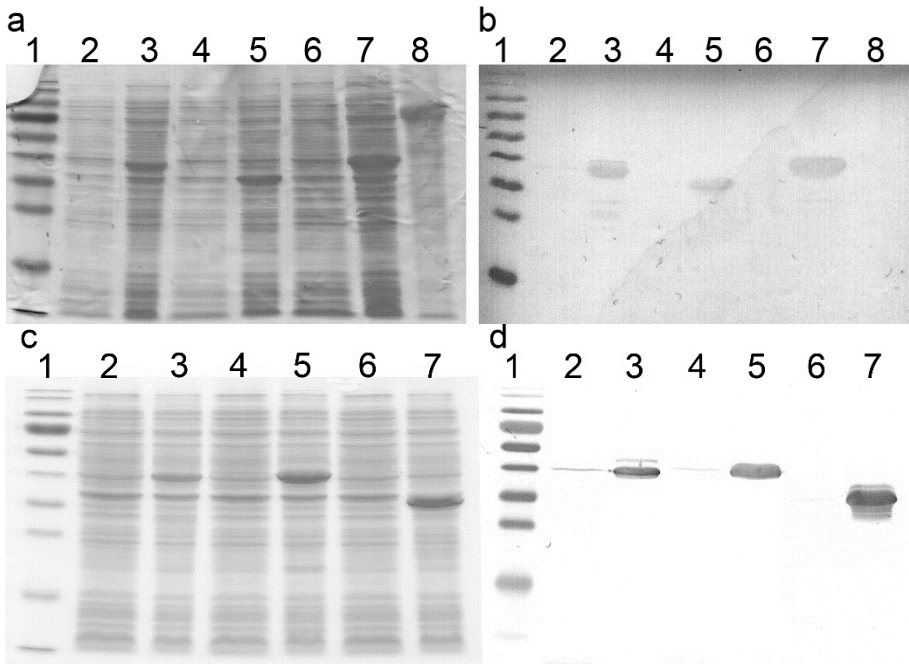
Kryžmiškai specifiški



3 priedas. Imunoblotingo su MAK prieš HEV kapsidės baltymus nuotraukos. SDS-PAGE – baltymų elektroforezė, nuotraukų pavadinimai atitinka MAK klonų pavadinimus. 1 – Žiurkių HEV, 2 – HEV-3 kapsidės baltymai (1 µg takelyje), 3 – *E. coli* susintetintas žiurkių HEV kapsidės baltymas (gauta iš prof. dr. Rainer G. Ulrich), 4 – *S. cerevisiae* lizatas.



4 priedas. HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymų persidengiančių fragmentų sintezė *E. coli* raiškos sistemoje. Žiurkių HEV kapsidės baltymo fragmentų sintezės baltymų elektroforezės (a) ir IB (b) nuotraukos: 1 – baltymų molekulinės masės standartas; 2, 3 – *E. coli* sintetinančių, F1-žiurkių HEV oligopeptidą, lizatas atitinkamai prieš ir po indukcijos IPTG; 4, 5 – *E. coli* sintetinančių, F2-žiurkių HEV oligopeptidą, lizatas atitinkamai prieš ir po indukcijos IPTG; 6, 7 – *E. coli* sintetinančių, F3-žiurkių HEV oligopeptidą, lizatas atitinkamai prieš ir po indukcijos IPTG; 8 – žiurkių HEV kapsidės baltymas (1 µg). HEV-3 kapsidės baltymo fragmentų sintezės baltymų elektroforezės (c) ir IB (d) nuotraukos: 1 – baltymų molekulinės masės standartas; 2, 3 – *E. coli* sintetinančių, F1-HEV-3 oligopeptidą, lizatas atitinkamai prieš ir po indukcijos IPTG; 4, 5 – *E. coli* sintetinančių, F2-HEV-3 oligopeptidą, lizatas atitinkamai prieš ir po indukcijos IPTG; 6, 7 – *E. coli* sintetinančių, F3-HEV-3 oligopeptidą, lizatas atitinkamai prieš ir po indukcijos IPTG.

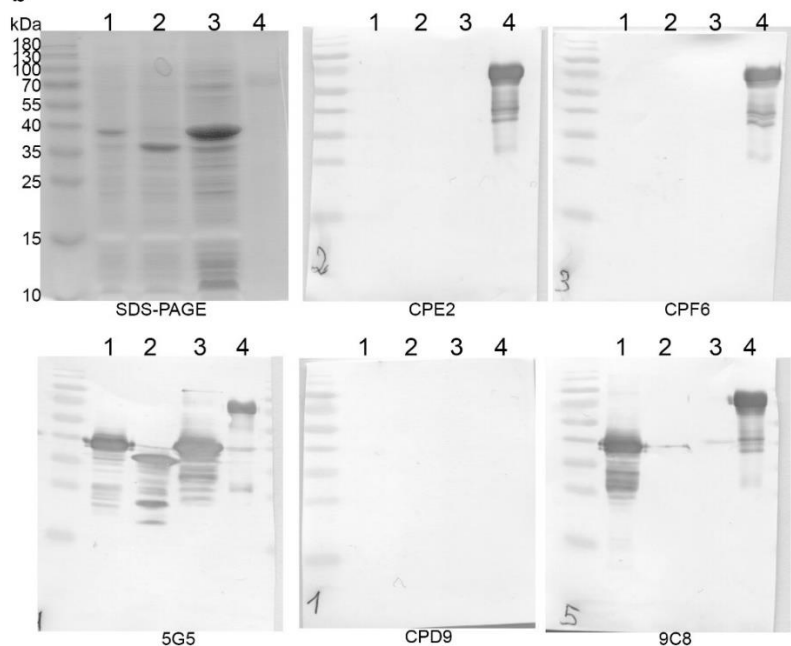


5 priedas. MAk sąveika su žiurkių HEV kapsidės baltymo persidengiančiais fragmentais IFA (a) ir IB (b) ir su HEV-3 kapsidės baltymo fragmentais IFA (c) ir IB (d). (a) ir (c) IFA naudoti MAk-HRP optimaliu skiedimu, lentelėje pateikti OT, „–“ – netikrinta, teigiamu rezultatu laikomas OT > 0,2. (b) Imunoblotingo nuotraukų pavadinimai atitinka MAk kloną, *E. coli*, sintetinančių 1 – F1-žiurkių HEV, 2 – F2-žiurkių HEV, 3 – F3-žiurkių HEV fragmentus, lizatai, 4 – žiurkių HEV kapsidės baltymas. (d) Imunoblotingo nuotraukų pavadinimai atitinka MAk kloną, *E. coli*, sintetinančių 1 – F1-HEV-3, 2 – F2-HEV-3, 3 – F3-HEV-3 fragmentus lizatai, 4 – HEV-3 kapsidės baltymas.

a

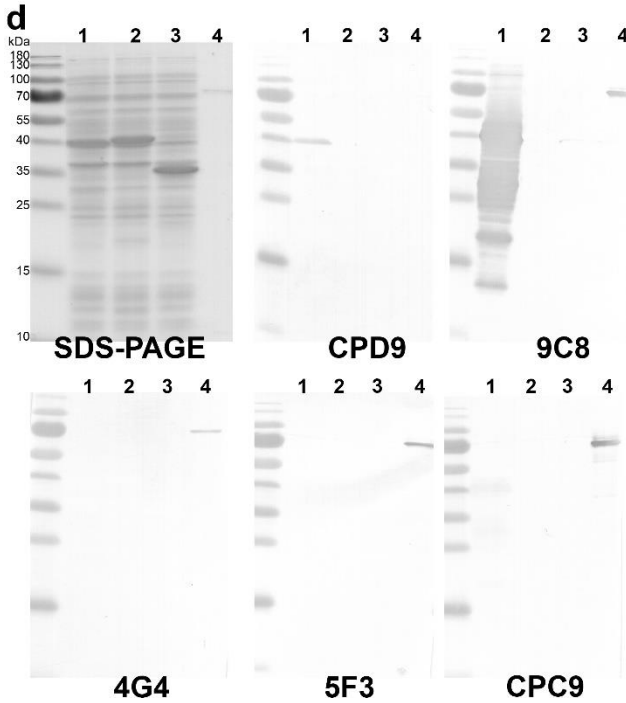
MAk	F1-žiurkių HEV	F2-žiurkių HEV	F3-žiurkių HEV	Žiurkių HEV 112-608 aminor.	Žiurkių HEV kapsidės baltymas
2E6	0,6724	0,3633	0,3742	2,0198	2,4290
CPE4	0,7494	0,5989	0,3752	1,9579	2,6748
CPD9	0,1314	0,0629	0,1274	1,2402	2,7627
9C8	–	–	–	0,0560	2,6157
2B2	0,7621	0,9565	1,0245	2,8567	2,0124
CPE1	0,0466	2,9724	0,0686	2,9765	2,5753
CPH7	0,0135	2,9206	0,0214	3,0387	2,5909
CPE2	–	–	–	0,0497	2,8506
CPF6	–	–	–	0,0441	2,8612
5G5	–	–	–	2,8866	2,0301

b



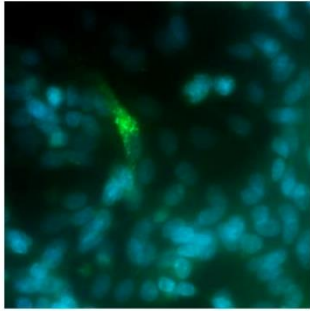
C

MAk	F1-HEV-3	F2-HEV-3	F3-HEV-3	HEV-3	HEV-3
				112-608	kapsidés aminor. baltymas
2E6	0,0306	0,0370	0,0304	0,9390	1,6460
CPE4	0,0330	0,0321	0,0405	1,2990	2,4540
CPD9	0,7926	0,0435	0,1617	1,1190	2,0500
9C8	1,0464	0,0301	0,1033	1,7070	2,8755
CPB11	2,9014	0,0443	0,0681	1,3300	2,5690
CPC7	1,1587	0,0349	0,0536	0,9460	1,2650
CPH6	1,9165	0,0362	0,0775	2,5390	3,3750
CPE9	0,5552	0,0923	0,1729	1,3350	0,9930
CPD7	0,4051	0,0639	0,0974	2,8510	3,6420
4G4	0,0929	0,1036	0,4484	2,0930	2,3175
5F3	0,1237	0,1316	0,5354	1,6480	1,9865
CPC9	0,1177	0,1083	0,3589	1,8705	2,1520

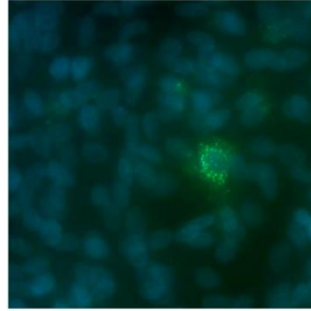


6 priedas. MAk gebėjimo atpažinti HEV-3 infekuotose ląstelėse tyrimo IF nuotraukos. Nuotraukų pavadinimas atitinka MAk kloną naudoto dažymui pavadinimą. Mėlyna spalva – branduoliai, žalia spalva – HEV kapsidės. Mastelis toks kaip 3.11 pav.

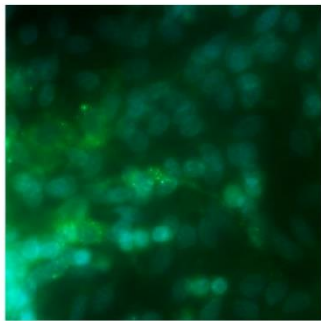
Specifiški HEV-3 kapsidės baltymui



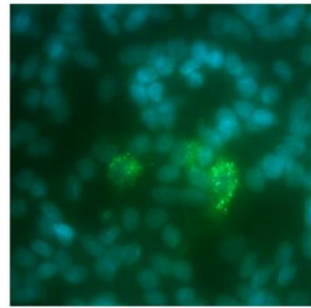
CPB11



CPC7

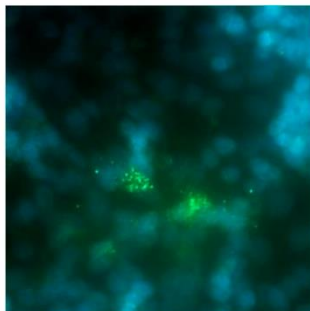


CPH6

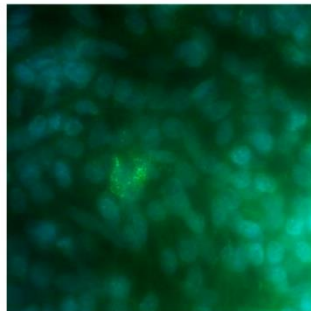


4G4

Kryžmiškai specifiški HEV-3 ir žiurkių HEV kapsidės baltymams

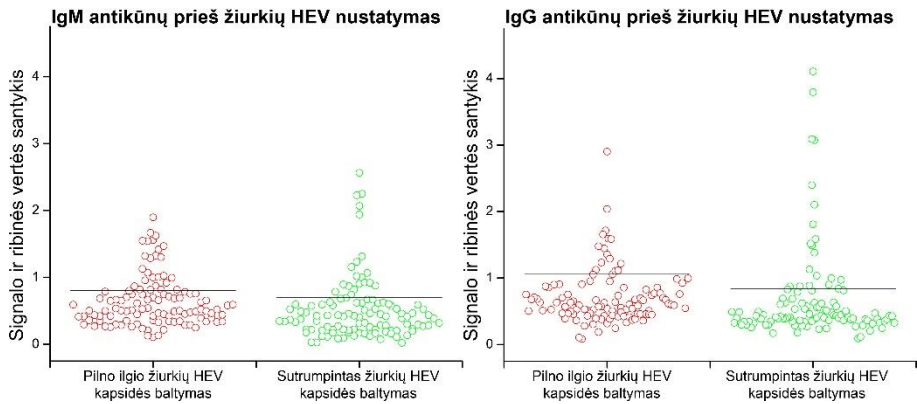


CPE4

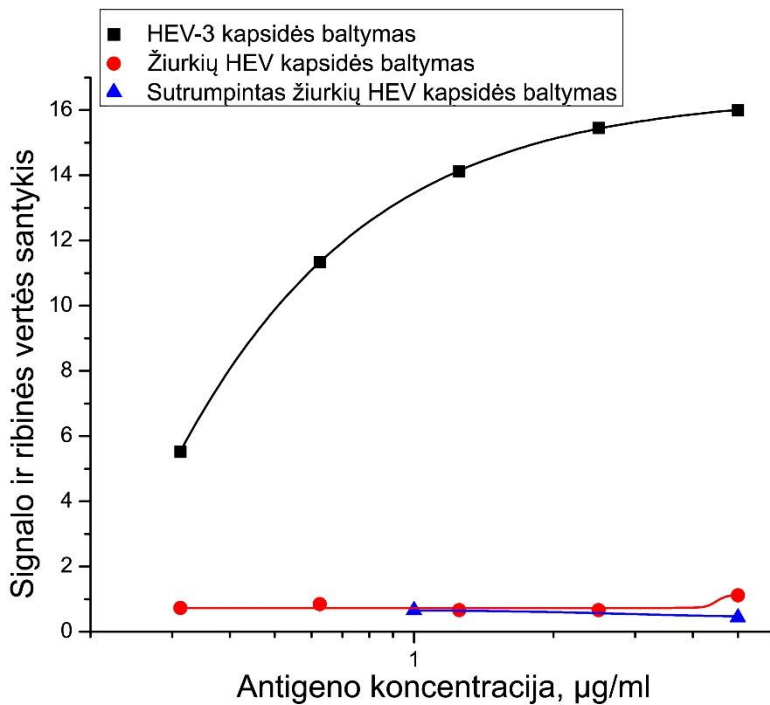


9C8

7 priedas. Žiurkių mėginių tyrimas netiesiogine IFA naudojant pilno ilgio ir sutrumpintą žiurkių HEV kapsidės baltymus, nustatant IgM ir IgG klasių antikūnus prieš žiurkių HEV.



8 priedas. Rekombinantinių HEV kapsidės baltymų detekcija naudojant „Wantai HEV-Ag ELISA“ testą.



PUBLIKACIJŲ SĄRAŠAS

- **Simanavicius M**, Tamosiunas PL, Petraityte–Burneikiene R, Johne R, Ulrich RG, Zvirbliene A, Kucinskaite–Kodze I. Generation in yeast and antigenic characterization of hepatitis E virus capsid protein virus–like particles. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2018; 102:185–198.

- **Simanavicius M**, Juskaite K, Verbickaite A, Jasiulionis M, Tamosiunas PL, Petraityte–Burneikiene R, Zvirbliene A, Ulrich RG, Kucinskaite–Kodze I. Detection of rat hepatitis E virus, but not human pathogenic hepatitis E virus genotype 1–4 infections in wild rats from Lithuania. *Vet Microbiol*. 2018; 221:129–133.

- Grigas J, Simkute E, **Simanavicius M**, Pautienius A, Streimikyte–Mockeliune Z, Razukevicius D, Stankevicius A. Hepatitis E genotype 3 virus isolate from wild boar is capable of replication in non–human primate and swine kidney cells and mouse neuroblastoma cells. *BMC Vet Res*. 2020; 16:95. (Disertantas imunofluorescencijos eksperimentams panaudojo darbe sukurtus MAk prieš HEV.)

PRANEŠIMŲ SĄRAŠAS

- **Simanavicius M**, Tamosiunas PL, Petraityte–Burneikiene R, Johne R, Zvirbliene A, Ulrich RG, Kucinskaite–Kodze I. „Production and characterization of monoclonal antibodies against yeast–expressed hepatitis E virus capsid proteins“. Stendinis pranešimas. „6th European Congress of Virology (ECV2016)“, Hamburgas, Vokietija, 2016 m. spalio 19–22 d.

- **Simanavičius M**, Tamošiūnas PL, Petraitytė–Burneikienė R, Žvirblienė A, Johne R, Ulrich RG, Kučinskaitė–Kodžė I. „Production and characterization of monoclonal antibodies against yeast–expressed hepatitis E virus capsid proteins“. Stendinis pranešimas. „THE COINS 2017“, Vilnius, Lietuva, 2017 m. vasario 28 d. – kovo 2 d.

- **Simanavicius M**, Tamosiunas PL, Petraityte–Burneikiene R, Johne R, Zvirbliene A, Ulrich RG, Kucinskaite–Kodze I. „Application of yeast–expressed hepatitis E virus capsid proteins for generation and characterization of monoclonal antibodies“. Stendinis pranešimas. „EFIS–EJI South Eastern European Immunology School (SEEIS2017)“, Lvovas, Ukraina, 2017 m. rugsėjo 8–11 d.

- **Simanavičius M**, Tamošiūnas PL, Petraitytė–Burneikienė R, Johne R, Ulrich RG, Žvirblienė A, Kučinskaitė–Kodžė I. „Hepatitis E virus capsid proteins“.

baltymų antigeninės struktūros tyrimai ir juos atpažįstančių monokloninių antikūnų apibūdinimas“. Žodinis pranešimas. LMA 10-oji Jaunųjų mokslininkų konferencija „Bioateitis“, Vilnius, Lietuva, 2017 m. gruodžio 7 d.

- Juškaitė K, **Simanavičius M**, Johne R, Ulrich RG, Žvirblienė A, Kučinskaitė–Kodžė I. „Application of quantitative reverse transcription PCR for investigation of rat hepatitis E virus prevalence“. Stendinis pranešimas. „Vita Scientia“, Vilnius, Lietuva, 2018 m. vasario 3 d.

- **Simanavičius M**, Juškaitė K, Verbickaitė A, Jasiulionis M, Tamošiūnas PL, Petraitytė–Burneikienė R, Žvirblienė A, Ulrich RG, Kučinskaitė–Kodžė I. „The evidence of hepatitis E virus infection in wild rats from Lithuania“. Žodinis pranešimas. XV-oji Lietuvos biochemikų draugijos konferencija, Dubingiai, Lietuva, 2018 m. birželio 26 d.

- **Simanavičius M**, Juskaite K, Verbickaite A, Jasiulionis M, Tamosiunas PL, Petraityte–Burneikiene R, Zvirbliene A, Ulrich RG, Kucinskaite–Kodze I. „The evidence of hepatitis E virus infection in wild rats from Lithuania“. Stendinis pranešimas. „5th European Congress of Immunology (ECI2018)“, Amsterdamas, Nyderlandai, 2018 m. rugsėjo 2–5 d.

- **Simanavičius M**, Juskaite K, Verbickaite A, Jasiulionis M, Tamosiunas PL, Petraityte–Burneikiene R, Zvirbliene A, Ulrich RG, Kucinskaite–Kodze I. „Hepatitis E virus in wild rats from Lithuania“. Žodinis pranešimas. „FEBS3+ conference“, Ryga, Latvija, 2019 m. birželio 17–19 d.

- **Simanavičius M**, Verbickaitė A, Tamošiūnas PL, Mačionienė E, Kučinskaitė–Kodžė I. „Serologic analysis of hepatitis E virus infection in patients with kidney-related illnesses“. Stendinis pranešimas. „Viruses 2020“, Barselona, Ispanija, 2020 m. vasario 5–7 d.

UŽRAŠAMS

UŽRAŠAMS

Vilniaus universiteto leidykla
Saulėtekio al. 9, III rūmai, LT-10222 Vilnius
El. p.: info@leidykla.vu.lt, www.leidykla.vu.lt
Tiražas 15 egz.