

acid at the exposure for 30, 60 min has been studied. The samples of biomaterial were collected from the cattle with the positive reaction to tuberculin, guinea pigs, rabbits, chicken. The above samples have been examined for tuberculosis by bacteriological method. Preliminary treatment of freshly collected biological material was performed with the use of 0.5, 1.0, 1.5% nitric acid solution, 1.0% trichloroacetic acid solution at the exposure for 30 and 60 minutes with the use of solution of 5.0% oxalic acid during 30 min exposure in comparison with standard method by A. P. Alikaeva. The best indication of the primary growth and the growth rate of mycobacteria colonies have been observed at the action of 0.5% nitric acid solution on the atypical mycobacterial culture. The growth of mycobacterial colonies have been observed in the test tubes on a nutrient medium in 87.5%, 72.5%, 75.0%, 70.0% of cases according to the preliminary treatment of biomaterial with the use of 1.0% nitric acid solution, 5.0% oxalic acid solution, 1.0% trichloroacetic solution and 5.0% sulfuric acid solution. At the same time the growth of secondary microflora was also detected in the cultures from biological samples, when the samples of biomaterial were treated by only 0.5% solution of nitric acid was 5.0–25.0% oxalic acid — 7.5%, trichloroacetic acid — 7.5–12.5% and a sulfuric acid solution — 5.0–33.0%. By the results of the studies it was found that the biomaterial preliminary treatment method with the use of 1.0% nitric acid solution at the 30 min exposure is the most informative. This method allows to get mycobacterial isolates from the biological material of animals 5–10 days earlier and it inhibits the growth of secondary microflora on the nutrient medium. This method can be used for cultural examination for tuberculosis in veterinary laboratories

Keywords: mycobacteria, contamination, nitric acid, nutrient medium

УДК 619:616.98:578.891:578.2'21:636.4:599.731.1

DOI 10.36016/VM-2022-108-3

ПОРІВНЯННЯ НАБОРІВ ПРАЙМЕРІВ ТА ЗОНДІВ ДЛЯ ДЕТЕКЦІЇ ВІРУСУ ГЕПАТИТУ Е ЗА ДОПОМОГОЮ ПЛР У РЕАЛЬНОМУ ЧАСІ

Рудова Н. Г., Солодянкін О. С., Лиманська О. Ю.

Національний науковий центр «Інститут експериментальної і клінічної ветеринарної медицини», Харків, Україна, e-mail: rudovanatawa@ukr.net

На основі комп'ютерного аналізу консервативних фрагментів відкритих рамок зчитування, що перекриваються, ORF2/ORF3 генома вірусу гепатиту Е (ВГЕ) охарактеризовано набори праймерів і зондів, наведених у наукових публікаціях, для детекції генотипів 1–4 ВГЕ за допомогою ПЛР у реальному часі. Один з наборів перевірено на стандарті ВООЗ, а на другий є багато посилань у наукових публікаціях з ПЛР детекції ВГЕ в базі біомедицинської літератури PubMed. Визначено, що по 38 ізолятів ВГЕ для зазначених вище обох наборів праймерів і зондів мають один–два некомплементарні нуклеотиди у комплексі праймер (зонд)–однонитковий продукт ПЛР для проаналізованих 108 ізолятів ВГЕ генотипів 3 та 4, для яких основними природними резервуарами є свині та дикі кабани

Ключові слова: свині, дикі кабани

Гепатит Е — хвороба печінки — є однією з п'яти відомих форм гепатиту людини [1]. Унаслідок широкого поширення в усьому світі, високого рівня захворюваності, можливості розвинення гострого гепатиту та значної кількості летальних випадків (близько 70 000 щорічно) ВООЗ вважає гепатит Е значною проблемою охорони здоров'я, яка потребує постійної уваги [2].

Збудником гепатиту Е є високоваріабельний безоболонковий вірус, геном якого представлений позитивною одноланцюговою молекулою РНК довжиною приблизно 7 200 нуклеотидів (н) [3]. На основі поверхової подібності морфології та організації генома вірус гепатиту Е (ВГЕ, HEV, *hepatitis E virus*) спочатку було віднесено до сімейства Caliciviridae [4]. Проте, у подальшому за результатами досліджень структури генома ВГЕ таксономію вірусу було офіційно змінено, і, згідно зі сучасною класифікацією, ВГЕ належить до сімейства Hepadnaviridae, який містить два роди: *Orthohepevirus* (до складу якого входять 4 види — *Orthohepevirus A, B, C, D*) та *Piscihepevirus* [5]. ВГЕ, який інфікує людину та деяких ссавців [6], належить до одного з найбільш вивчених видів *Orthohepevirus A* та має 8 генотипів — HEV1–HEV8, з яких HEV1–HEV4 є збудниками захворювання на гепатит Е у людини, HEV5–HEV6 детектовано тільки у диких кабанів у Японії [7], HEV7–HEV8 — у верблюдів [8, 9].

За забруднення води та низького рівня санітарії HEV1–HEV2 є причиною спалахів гострого гепатиту у країнах Азії, Африки, Латинської Америки [10]. Випадки захворювання на гепатит Е як у країнах, що розвиваються, так і у країнах Європи, США, КНР пов'язані з ВГЕ генотипів 3 та 4. HEV3–HEV4 характеризується зоонозним потенціалом, основні природні резервуари цього вірусу — свині та дикі кабани [11–15]. Крім того, HEV3 був виявлений в оленів, дельфінів, а також кролів, дрібної (вівці, кози) та великої рогатої худоби, що є додатковим фактором ризику міжвидової трансмісії вірусу до організму людини від свійських тварин [16–21].

Європейська асоціація з дослідження печінки (EASL) пропонує низку методів визначення ВГЕ, зокрема, таких, що базуються на ампліфікації специфічних фрагментів геномної РНК вірусу за допомогою різних форматів полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) [2], які до того ж є незамінними для детекції геномного матеріалу ВГЕ у продукції свинарства та, отже, оцінки її якості [22].

У роботі Germer et al. [23] з використанням зондів і набору праймерів, які фланкують фрагмент відкритих рамок зчитування, що перекриваються, ORF2/ORF3 ВГЕ, які є мішенню для праймерів і зондів, розроблено чутливий, точний та відтворюваний метод для детекції та кількісного визначення штамів ВГЕ всіх чотирьох головних генотипів на основі зворотно-транскриптазної (ЗТ) кількісної ПЛР у реальному часі (РЧ).

В роботі Gerber et al. [24] з проведеного експериментального порівняння наборів для детекції та диференціації чотирьох генотипів ВГЕ за допомогою ЗТ ПЛР-РЧ показано, що один з наборів (з роботи Jothikumar et al. [28]) дозволяє виявляти 96 % РНК ВГЕ зі зразків фекалій експериментально інокульованих ВГЕ генотипу 3 свиней та 67 % — для польових зразків.

У даній роботі на основі комп'ютерного аналізу фрагментів ORF2/ORF3 генома ВГЕ з точки зору наявності некомплементарних нуклеотидів у комплексі з мішенню охарактеризовано два набори праймерів і зондів для детекції ВГЕ, один з яких перевірено на першому міжнародному стандарті ВООЗ для РНК ВГЕ для детекції ВГЕ [23] за допомогою ПЛР у реальному часі, а на другий, з роботи Gerber et al. [24], найчастіше є посилання у наукових статтях з ПЛР детекції ВГЕ у базі біомедичної літератури PubMed.

Матеріали та методи. Множинне вирівнювання проводили на основі комп'ютерного аналізу нуклеотидних послідовностей фрагментів відкритих рамок зчитування ORF2/ORF3 для 108 ізолятів геномної РНК ВГЕ з бази даних GenBank за допомогою вбудованої в пакеті програм MEGA 6.0 програми ClustalW [25]. Термодинамічний аналіз праймерів і зондів — за допомогою програм MeltCalc, що є у вільному доступі [26], та Oligo (версія 3.0) [27].

Температуру плавлення праймерів і зондів визначали для таких параметрів (якщо не вказано інше): концентрація праймера — 0,1 мкМ, іонна сила — 60 мМ Na⁺ (відповідне значення для програми MeltCalc становить 220, що було емпірично знайдено нами шляхом порівняння експериментально та теоретично визначених температур плавлення олігонуклеотидів з літературних джерел, результати не наведено).

Результати досліджень. Низку наборів праймерів і зондів розроблено для детекції РНК ВГЕ в різних зразках (сироватка, фекалії, з оточуючого середовища) шляхом ЗТ ПЛР-РЧ з урахуванням гетерогенності штамів ВГЕ. Чутливість аналізів за допомогою ПЛР-РЧ відрізнялася від 10 до 1 000 разів при паралельному тестуванні зразків в одній і тій же лабораторії [24]. Нашу увагу привернули два набори. Один з них, розроблений у 2006 році [28], найбільш широко застосовують для детекції ВГЕ у людини, має високу чутливість (4 еквіваленти генома вірусу) та дозволяє виявляти усі чотири генотипи вірусу, у тому числі HEV3–HEV4 із зоонозним потенціалом.

Другий набір, розроблений в роботі Germer et al. [23] з використанням зондів, які автори назвали зонди Pleiades (плеяди, після спостереження свічення одного найяскравішого сузір'я зірок у нічному небі) [29], для детекції та кількісного визначення штамів ВГЕ всіх чотирьох головних генотипів ВГЕ, перевірено на першому міжнародному стандарті ВООЗ для РНК ВГЕ (код 6329/10) [30].

Результати множинного вирівнювання для фрагментів ORF2/ORF3 38 ізолятів, що мають недосконалі праймери/зонди, з 108 проаналізованих ізолятів ВГЕ генотипів 3 та 4, які містять мішені для праймерів та зондів з двох зазначених вище наборів праймерів і зондів, наведено у табл. 1–2.

Таблиця 1 — Результати множинного вирівнювання для фрагментів ORF2/ORF3 38 зі 108 проаналізованих ізолятів ВГЕ генотипів 3 та 4, що містять ділянки зв'язування праймерів/зонда та які мають недосконалі праймери/зонди з роботи Germer et al. [23], які перевірено на стандарті ВООЗ для детекції РНК ВГЕ за допомогою ЗТ ПЛР-РЧ *

Номер в GenBank	Гено-тип ВГЕ	Прямий праймер 5' -GGTGGTTTCTGGGGTGAC-3'	Зонд 5' -GTGATTCTCAGCCCTTCG-3'	Зворотний праймер 5' -TTCATCCAACCAACCCC-3'	Позиція
AF060669	Н л	GGTGGTTTCTGGGGTGAC	TTGATTCTCAGCCCTTCG	TTCATCCAACCAACCCC	5333
AB425831	3 кк	Т...С.....	5308
AB481228	Н	Т.....С.....	5326
AB593690	3 кк	Т...С.....	5308
AY575857	Н	Т.....С...G.....	5324
AY575859	Н	Т.....	5324
AY594199	Н	А.....	Т.....	5332
DQ279091	4	А.....	Т.....А.....	5319
EU676172	4	А.....	Т.....	5318
FJ426404	3	Т.....С.....	5303
FJ610232	4	А.....	Т.....	5325
FJ998008	3	А.....	Т.....С.....	5283
GU119960	4	А.....	Т.....	5321
KY780957	3 л	А.....	Т.....	5308
KT581445	3fС.....	Т.....	5311
KT581448	3f	А.....	Т.....	5398
KT727028	3	Т.....А.....	5330
KX827238		А.....	Т.....	5324
MN614429	Н	Т.....С.....	5303
MN614430	Н	Т.....С.....	5303
MW355382	3	А.....	Т.....	5299
MW355383	3	А.....	Т.....Т.	5506
MW355384	3	А.....	Т.....	5386
MW355385	3	А.....	Т.....	5297
MW355386	3	А.....	Т.....	5297
MW355387	3	А.....	Т.....	5297
MW355389	3	А.....	Т.....	5299
MK410049	4	А.....	Т.....	5324
MW355390	3	А.....	Т.....	5297
MW355388	3	А.....	Т.....	5387
MW355391	3	А.....	Т.....	5296
MW355393	3	А.....	Т.....Т.	5301
MW355394	3	А.....	Т.....	5385
MW355395	3	А.....	Т.....	5385
MW355396	3	А.....	Т.....	5300
MW355397	3	А.....	Т.....	5389
MW355400	3	А.....	Т.....	5298
MW355402	3	А.....	Т.....	5300

Примітки: * — нуклеотиди, які не збігаються з нуклеотидами консенсусної послідовності ізоляту ВГЕ 6892 AF060669, показано буквами. Н — невідомий генотип. Для зворотного праймера наведено комплементарну послідовність. Позиція — для 5'-кінцевого нуклеотида зонда. Біологічний матеріал: кк — культура клітин; л — людина.

Розділ 2. Ветеринарна вірусологія та мікробіологія

Таблиця 2 — Результати множинного вирівнювання для фрагментів ORF2/ORF3 38 зі 108 проаналізованих ізолятів ВГЕ генотипів 3 та 4, що містять ділянки зв'язування праймерів/зонда та які мають недосконалі праймери/зонди з роботи Gerber et al. [24] з посиланням на роботу Jothikumar et al. [28] *

Номер в GenBank	Гено-тип ВГЕ	Прямий праймер	Зонд	Зворотний праймер	Позиція
		5' -GGTGGTТТТСТGGGGTGAC-3'	5' -TGATTCTCAGCCCTTCGC-3'	5' -ТТСАТССААССААССССТ-3'	
AF060669	Н л	GGTGGTТТТСТGGGGTGAC	TGATTCTCAGCCCTTCGC	ТТСАТССААССААССССТ	5334
AB425831	3 ккC.....	5309
AB481228	НC.....	5327
AB593690	3 ккC.....	5309
AY575857	НC.....G.....	5325
AY594199	Н	A.....	5333
DQ279091	4	A.....A.....	5320
EU676172	4	A.....	5319
FJ426404	3C.....	5304
FJ610232	4	A.....	5326
FJ998008	3	A.....C.....	5284
GU119960	4	A.....	5322
KT727028	3A.....	5331
KY780957	3 л	A.....	5309
KT581445	3fC.....	5312
KT581448	3f	A.....	5399
KX827238	Н	A.....	5325
KX981911	3A.....	5331
MN614429	НC.....	5304
MN614430	НC.....	5304
MW355382	3	A.....	5300
MW355383	3	A.....T..	5507
MW355384	3	A.....	5387
MW355385	3	A.....	5298
MW355386	3	A.....	5298
MW355387	3	A.....	5298
MW355389	3	A.....	5300
MK410049	4	A.....	5325
MW355390	3	A.....	5298
MW355388	3	A.....	5388
MW355391	3	A.....	5297
MW355393	3	A.....T..	5300
MW355394	3	A.....	5384
MW355395	3	A.....	5384
MW355396	3	A.....	5299
MW355397	3	A.....	5388
MW355400	3	A.....	5297
MW355402	3	A.....	5299

Примітки: * — нуклеотиди, які не збігаються з нуклеотидами консенсусної послідовності ізоляту ВГЕ 6892 AF060669, показано буквами. Н — невідомий генотип. Для зворотного праймера наведено комплементарну послідовність. Позиція — для 5'-кінцевого нуклеотида зонда. Біологічний матеріал: кк — культура клітин; л — людина.

Аналіз ізолятів ВГЕ людини і тварин з повністю секвенованим геномом показав, що геном ВГЕ є варіабельним навіть у консервативних фрагментах, таких, зокрема, як ORF2/ORF3, що ускладнює розробку наборів праймерів і зондів.

Чутливість ПЛР-аналізу може значно змінюватися в залежності від вибраних мішеней для праймерів і зонду, а також від генотипу ВГЕ. Попередні порівняння наборів праймерів і зондів для детекції РНК ВГЕ за допомогою ПЛР-РЧ показали, що вибір як мішені консервативної ділянки ORF2/ORF3 є надійнішим порівняно з використанням недосконалих праймерів і зондів, мішенню для яких є менш консервативні фрагменти генома, ніж ORF2/ORF3.

Висновки. У роботі показано, що всі проаналізовані праймери та зонди є недосконалими, у тому числі, з роботи Jothikumar et al. [28], які дослідники часто вибирають для ПЛР-детекції без їх попереднього аналізу з урахуванням нових сиквенсів ізолятів ВГЕ, незважаючи на те, що їх розроблено понад 15 років тому назад, оскільки для 38 ізолятів ВГЕ мають один–два некомплементарні нуклеотиди у комплексі праймер (зонд)–одноритковий продукт ПЛР для проаналізованих 108 ізолятів ВГЕ генотипів 3 та 4. Такі недосконалості можуть знижувати чутливість і специфічність ПЛР-аналізу через зменшення ефективної концентрації праймера, ускладнення оцінки температури відпалу.

Перспективи використання отриманих результатів. Використання понад одного набору праймерів і зондів, мішенню для яких є різні фрагменти генома ВГЕ з високим рівнем подібності, може підвищити вірогідність детекції ВГЕ. Для РНК-вірусів такими фрагментами є, зокрема, довгі кінцеві повтори.

Проведене порівняння наборів, які використовують, показало можливість створення наборів праймерів і зондів, які не містять некомплементарні нуклеотиди у комплексі праймер (зонд)–одноритковий продукт ПЛР для секвенованих ізолятів ВГЕ.

Список літератури

1. Kamar N. et al. Hepatitis E virus infection. *Nature Reviews. Disease Primers*. 2017. Vol. 3. P. 17086. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.86>.
2. Kamani L., Padhani Z. A., Das J. K. Hepatitis E: Genotypes, strategies to prevent and manage, and the existing knowledge gaps. *JGH Open: An Open Access Journal of Gastroenterology and Hepatology*. 2021. Vol. 5, No 10. P. 1127–1134. DOI: <https://doi.org/10.1002/jgh3.12646>.
3. Tam A. W. et al. Hepatitis E virus (HEV): molecular cloning and sequencing of the full-length viral genome. *Virology*. 1991. Vol. 185, No 1. P. 120–131. DOI: [https://doi.org/10.1016/0042-6822\(91\)90760-9](https://doi.org/10.1016/0042-6822(91)90760-9).
4. Meng X. J. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Veterinary Microbiology*. 2010. Vol. 14, No 3-4. P. 256–265. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.017>.
5. Purdy M. A. et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae 2022. *The Journal of General Virology*. 2022. Vol. 103, No 9. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001778>.
6. Smith D. B. et al. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species *Orthohepevirus A*). *The Journal of General Virology*. 2020. Vol. 101, No 7. P. 692–698. DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001435>.
7. Takahashi M. et al. Analysis of the full-length genome of a hepatitis E virus isolate obtained from a wild boar in Japan that is classifiable into a novel genotype. *The Journal of General Virology*. 2011. Vol. 92, Pt 4. P. 902–908. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.029470-0>.
8. Woo P. C. et al. New hepatitis E virus genotype in camels, the Middle East. *Emerging Infectious Diseases*. 2014. Vol. 20, No 6. P. 1044–1048. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2006.140140>.
9. Woo P. C. et al. New hepatitis E virus genotype in bactrian camels, Xinjiang, China, 2013. *Emerging Infectious Diseases*. 2016. Vol. 22, No 12. P. 2219–2221. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid2212.160979>.
10. Pérez-Gracia M. T. et al. Current knowledge on hepatitis E. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. 2015. Vol. 3, No 2. P. 117–126. DOI: <https://doi.org/10.14218/JCTH.2015.00009>.
11. Wang B., Meng X. J. Hepatitis E virus: host tropism and zoonotic infection. *Current Opinion in Microbiology*. 2021. Vol. 59. P. 8–15. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mib.2020.07.004>.
12. Jemersic L. et al. Genetic diversity of hepatitis E virus (HEV) strains derived from humans, swine and wild boars in Croatia from 2010 to 2017. *BMC Infectious Diseases*. 2019. Vol. 19, No 1. P. 269. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12879-019-3906-6>.
13. Kozyra I. et al. Genetic diversity and epidemiological significance of wild boar HEV-3 strains circulating in Poland. *Viruses*. 2021. Vol. 13, No 6. P. 1176. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13061176>.
14. Passos-Castilho A. M., Hernandez Granato C. F. High frequency of hepatitis E virus infection in swine from South Brazil and close similarity to human HEV isolates. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2017. Vol. 48, No 2. P. 373–379. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.022>.
15. Liao M.-H. et al. Hepatitis E virus infection in 6-month-old pigs in Taiwan. *Scientific Reports*. 2020. Vol. 10, No 1. P. 16869. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-74034-8>.
16. Palombieri A. et al. Surveillance study of hepatitis E virus (HEV) in domestic and wild ruminants in northwestern Italy. *Animals*. 2020. Vol. 10, No 12. P. 2351. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10122351>.

17. Fonti N. et al. Molecular and pathological detection of hepatitis E Virus in roe deer (*Capreolus capreolus*) and fallow deer (*Dama dama*) in central Italy. *Veterinary Sciences*. 2022. Vol. 9, No 3. P. 100. DOI: <https://doi.org/10.3390/vetsci9030100>.
18. Villalba M. C. M. et al. Hepatitis E virus in bottlenose dolphins *Tursiops truncatus*. *Diseases of Aquatic Organisms*. 2017. Vol. 123, No 1. P. 13–18. DOI: <https://doi.org/10.3354/dao03085>.
19. Ciemiak F. et al. A putative novel hepatitis E Virus genotype 3 subtype identified in rabbit, Germany 2016. *Viruses*. 2021. Vol. 13, No 6. P. 1065. DOI: <https://doi.org/10.3390/v13061065>.
20. Izopet J. et al. Hepatitis E virus strains in rabbits and evidence of a closely related strain in humans, France. *Emerging Infectious Diseases*. 2012. Vol. 18, No 8. P. 1274–1281. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1808.120057>.
21. Huang F. et al. Excretion of infectious hepatitis E virus into milk in cows imposes high risks of zoonosis. *Hepatology*. 2016. Vol. 64, No 2. P. 350–359. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.28668>.
22. Trojnar E. et al. Interlaboratory validation of a detection method for hepatitis E virus RNA in pig liver. *Microorganisms*. 2020. Vol. 8, No 10. P. 1460. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8101460>.
23. Germer J. J. et al. Hepatitis E virus (HEV) detection and quantification by a real-time reverse transcription-PCR assay calibrated to the World Health Organization Standard for HEV RNA. *Journal of Clinical Microbiology*. 2017. Vol. 55, No 5. P. 1478–1487. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.02334-16>.
24. Gerber P. F. et al. Comparison of real-time reverse transcriptase PCR assays for detection of swine hepatitis E virus in fecal samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 2014. Vol. 52, No 4. P. 1045–1051. DOI: <https://doi.org/10.1128/JCM.03118-13>.
25. Tamura K. et al. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Molecular Biology and Evolution*. 2007. Vol. 24, No 8. P. 1596–1599. DOI: <https://doi.org/10.1093/molbev/msm092>.
26. Schütz E., Von Ahsen N. Spreadsheet software for thermodynamic melting point prediction of oligonucleotide hybridization with and without mismatches. *BioTechniques*. 1999. Vol. 27, No 6. P. 1218–1224. DOI: <https://doi.org/10.2144/99276bc04>.
27. Rychlik W., Spencer W., Rhoads R. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. *Nucleic Acids Research*. 1990. Vol. 18, No 21. P. 6409–6412. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/18.21.6409>.
28. Jothikumar N. et al. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *Journal of Virological Methods*. 2006. Vol. 131, No 1. P. 65–71. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2005.07.004>.
29. Lukhtanov E. A. et al. Novel DNA probes with low background and high hybridization-triggered fluorescence. *Nucleic acids Research*. 2007. Vol. 35, No 5. P. e30. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkl1136>.
30. Baylis S. A. et al. World Health Organization International Standard to harmonize assays for detection of hepatitis E virus RNA. *Emerging Infectious Diseases*. 2013. Vol. 19, No 5. P. 729–735. DOI: <https://doi.org/10.3201/eid1905.121845>.

COMPARISON OF PRIMER AND PROBE SETS FOR HEPATITIS E VIRUS DETECTION BY REAL TIME PCR

Rudova N. G., Solodiiankin O. S., Lymanska O. Yu.

National Scientific Center "Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine", Kharkiv, Ukraine

Hepatitis E virus (HEV) infects humans and several mammals and it has eight genotypes (HEV1–HEV8). HEV1–HEV4 is the causative agent of hepatitis E in humans. HEV5–HEV6 was detected only in wild boar in Japan. HEV7–HEV8 was detected in camels. HEV3–HEV4 is characterized by zoonotic potential and main natural reservoirs for this virus are swines and wild boars. Besides, HEV3 was detected in deers, dolphins, rabbits, cattle, goats that is additional risk for virus interspecies transmission from domestic animals to humans. In this paper two primer and probe sets for HEV detection by real time PCR were characterized on the basis of computer analysis of conservative fragments of overlapping open reading frames ORF2/ORF3 of HEV genome. Availability of mismatched nucleotides in the complexes of primer/probe with viral targets was applied for estimation of primer sets. One of those primer sets from literature data was tested on the first World Health Organization International Standard for HEV RNA. The second primer set is highly cited in scientific articles on PCR HEV detection in PubMed biomedical literature database. Multiple alignment was performed on the basis of computer analysis of nucleotide sequences of overlapping open reading frames ORF2/ORF3 for 108 isolates of RNA HEV genomes from GenBank by MEGA 6.0 software. It was determined that 38 HEV isolates from 108 HEV3–HEV4 analyzed isolates for mentioned above primer and probe sets have one or two mismatched nucleotides for primer (probe) complex with single-stranded amplicon. These degeneracies may reduce sensitivity and specificity of PCR assay due to decreasing effective primer concentration, complication of estimating primer annealing temperatures

Keywords: swines, wild boars