



Жаворонок С.В.¹, Задора И.С.^{1,4} ✉, Давыдов В.В.¹, Анисько Л.А.^{1,2}, Рогачева Т.А.^{1,2},
Алаторцева Г.И.³, Лухверчик Л.Н.³, Нестеренко Л.Н.³, Зверев В.В.^{3,5}, Смирский В.В.⁴,
Щербань А.И.⁴, Шука Н.В.⁴, Мытько Ю.А.⁴

¹ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

² Городская клиническая инфекционная больница, Минск, Беларусь

³ Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова,
Москва, Россия

⁴ Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии
Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

⁵ Первый Московский государственный медицинский университет
имени И.М. Сеченова (Сеченовский университет), Москва, Россия

Использование рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3 3-го генотипа вируса гепатита Е при разработке тест-системы иммуноферментного анализа для серодиагностики иммуноглобулинов класса G

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: существенный вклад в замысел и дизайн исследования – Жаворонок С.В., Давыдов В.В., Алаторцева Г.И., Лухверчик Л.Н., Нестеренко Л.Н., Зверев В.В., Смирский В.В.; подготовка, сбор материала, дизайн исследования, текущее и окончательное редактирование статьи – Анисько Л.А., Рогачева Т.А.; замысел, сбор данных, обобщение результатов, текущее редактирование – Задора И.С., Мытько Ю.А.; окончательное одобрение варианта статьи для опубликования – Лухверчик Л.Н., Нестеренко Л.Н., Щербань А.И., Шука Н.В., Жаворонок С.В., Давыдов В.В.

Финансирование. Данная научно-исследовательская работа выполнена в рамках финансируемого проекта «Разработать медико-технические требования к иммуноферментным тест-системам для определения антител классов IgG и IgM к вирусу гепатита Е у человека. Создать контрольные панели сывороток крови человека, содержащих антитела к вирусу гепатита Е», выполняемого в рамках мероприятия 13 «Разработать технологию промышленного изготовления тест-систем для выявления антител IgG и IgM-классов к вирусу гепатита Е у человека и животных с использованием иммуноферментного метода анализа и организовать их производство» подпрограммы 5 «Химические продукты и молекулярные технологии» ГП «Наукоемкие технологии и техника» на 2021–2025 годы.

Подана: 29.08.2022

Принята: 19.09.2022

Контакты: zadora-ilona@mail.ru

Резюме

В статье приведены результаты использования в качестве иммобилизованных антигенов рекомбинантных полипептидов, содержащих белковые продукты открытых рамок считывания генов ORF2 и ORF3 вируса гепатита Е (ВГЕ) 3-го генотипа (разработаны и предоставлены ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия), разведенных в карбонатно-бикарбонатном буфере до рабочей концентрации 2 и 0,25 мкг/мл соответственно. Установлено, что иммуносорбент одинаково хорошо взаимодействует с иммуноферментными конъюгатами тест-систем Вектоген Е-IgG («Вектор-Бест», Новосибирск) и «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы», РФ), что может использоваться для адаптации тест-систем ИФА в зависимости от целей исследования. Для оценки показателей внутрисерийной воспроизводимости были исследованы одна низко- и две

высокопозитивные по содержанию анти-ВГЕ IgG сыворотки пациентов в нескольких повторях. Показатели коэффициента вариации не превышали рекомендуемую величину в 10%. При этом более специфичной в отношении низкопозитивных по анти-ВГЕ IgG сывороток крови людей является комбинация ORF2 и ORF3 2,0 и 0,25 мкг/мл и конъюгата тест-системы «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G», что определяет ее преимущественное использование в дальнейшем.

Ключевые слова: вирус гепатита E, иммуноферментный анализ, ORF2, ORF3, иммуноглобулины класса G

Zhavoronok S.¹, Zadora I.^{1,4} ✉, Davydov V.¹, Anisko L.^{1,2}, Rogacheva T.^{1,2}, Alatortseva G.³, Lukhverchik L.³, Nesterenko L.³, Zverev V.^{3,5}, Simirsky V.⁴, Shcherban A.⁴, Shchuka N.⁴, Mytko Yu.⁴

¹ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

² City Clinical Infectious Diseases Hospital, Minsk, Belarus

³ Scientific Research Institute of Vaccines and Serums I.I. Mechnikov, Moscow, Russia

⁴ Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

⁵ I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

Using of the Recombinant ORF2 and ORF3 Polypeptides of the 3rd Genotype of the Hepatitis Virus E in the Development of an Enzyme Immunoassay Test System for the Serodiagnosis of Class G Immunoglobulins

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: Zhavoronok S., Davydov V., Alatortseva G., Lukhverchik L., Nesterenko L., Zverev V., Simirsky V. – a significant contribution to the concept and design of the study; Anisko L., Rogacheva T. – preparation, collection of material, study design, necessity and final editing of the article; Zadora I., Mytko Yu. – design, data collection, summary of results, editing of results; Lukhverchik L., Nesterenko L., Shcherban A., Shchuka N., Zhavoronok S., Davydov V. – final approval of the version of the article for publication.

Financing. This research work was carried out within the framework of the funded project "Develop medical and technical requirements for enzyme immunoassays for the detection of IgG and IgM antibodies to hepatitis E virus in humans. Create control panels of human blood sera containing antibodies to the hepatitis E virus", carried out as part of activity 13 "Develop a technology for the industrial production of test systems for the detection of antibodies of IgG and IgM classes to the hepatitis E virus in humans and animals using the enzyme immunoassay method and organize their production" of subprogram 5 "Chemical products and molecular technologies" of the SE "High Technologies and Equipment" for 2021–2025.

Submitted: 29.08.2022

Accepted: 19.09.2022

Contacts: zadora-ilona@mail.ru

Abstract

The article presents the results of using recombinant polypeptides containing protein products of the open reading frames of the ORF2 and ORF3 genes of the hepatitis E virus (HEV) of the 3rd genotype as immobilized antigens (developed and provided by

FSBSI "Scientific Research Institute of Vaccines and Serums I.I. Mechnikov", Moscow, Russian), diluted in a carbonate-bicarbonate buffer to a working concentration of 2 and 0.25 µg/ml. It was found the immunosorbent interact equally well with enzyme immunoassay conjugates of the Vectohep E-IgG test systems (Vector-Best, Novosibirsk) and DS-ELISA-ANTI-HEV-G (NPO Diagnostic Systems, RF), which can be used for adaptation ELISA test systems in depending on the objectives of the study. To assess the indicators of in-series reproducibility, one low- and two high-positive anti-HEV IgG sera of patients in several repeats were studied. The coefficient of variation when using the immunosorbent did not exceed the recommended value of 10%. At the same time, the combination of ORF2 and ORF3 2.0 µg/ml and 0.25 µg/ml with the conjugate DS-ELISA-ANTI-HEV-G is more specific for low-positive anti-HEV IgG human blood sera, which determines its preferential use in the future.

Keywords: hepatitis E virus, enzyme immunoassay, ORF2, ORF3, immunoglobulins class G

■ ВВЕДЕНИЕ

Серологические и молекулярно-генетические методы исследований показали, что вирус гепатита Е распространен во всем мире и является ведущей причиной вирусных гепатитов, передающихся фекально-оральным механизмом. Ежегодно в эндемичных районах и в развитых странах по всему миру регистрируется около 20 миллионов случаев ВГЕ, из которых 3,3 миллиона имеют клинические симптомы заболевания, а порядка 40 000 случаев заканчиваются летальным исходом [1].

Вирус гепатита Е человека является представителем семейства *Hepeviridae*, вид *Paslahepevirus balayani* (предыдущее название вида *Orthohepevirus A*), куда также относятся ВГЕ человека, свиней, оленей, кабанов, кроликов, верблюдов и др. [4]. Геном – линейная одноцепочечная РНК с положительной полярностью, содержащая 3 открытые рамки считывания (ORF). Квазиоболочечный сферический вирион диаметром 27–34 нм построен из основного высокоиммуногенного капсидного белка, кодируемого второй открытой рамкой считывания (ORF2). Данный белок связывается с поверхностными протеогликанами гепарансульфата на клетках печени [2]. Продукт ORF3 ВГЕ имеет общие структурные особенности с виропоринами класса I, гидрофобными многофункциональными вирусными белками, которые встраиваются в клеточные мембраны и облегчают освобождение вируса из инфицированных клеток. Виропорины способны собираться в олигомерные ионные каналы или поры в мембране клетки хозяина, делая ее более проницаемой [3, 4]. Генетически вирус гепатита Е неоднороден, существует 8 генотипов вируса, при этом генотипы 1–4 могут инфицировать людей.

Клинические и эпидемиологические характеристики гепатита Е в странах, различных по уровню эндемичности, имеют несколько отличий. Гепатит Е является высокоэндемичным в ряде развивающихся стран Азии и Африки, где ввиду отсутствия надлежащих санитарно-гигиенических условий существуют загрязненные источники водоснабжения. В развивающихся странах ВГЕ возникает в виде вспышек или спорадических случаев, вызванных 1-м или 2-м генотипами вируса, которые встречаются только у людей и приматов и распространяются чаще всего посредством водного пути передачи. При этом самый высокий уровень заболеваемости

наблюдается среди молодых людей в возрасте от 15 до 40 лет. По клиническому течению инфекция ВГЕ является самоограничивающейся, обычно без последующей хронизации. Однако при заражении беременных гепатит Е может протекать в тяжелой форме и приводить к высокой летальности плода.

В развитых странах аутохтонные случаи инфицирования ВГЕ носят спорадический характер, при этом преобладающее значение имеют животные резервуары инфекции. Гепатит Е чаще всего вызывается генотипом 3 и 4 вируса, по источнику инфекции относится к зооантропонозам, путь передачи в большинстве случаев пищевой, передача от человека к человеку встречается редко. Данные генотипы обнаруживаются у свиней, диких кабанов, кроликов, оленей и мангустов, что повышает риск инфицирования людей при работе с данными животными, охоте, употреблении в пищу плохо обработанного зараженного мяса и печени [5, 6]. Генотип 3 преимущественно распространен в западных странах, тогда как генотип 4 в основном встречается в азиатском регионе. Заболеваемость ВГЕ-инфекцией неоднородна среди возрастных групп, установлено, что мужчины в возрасте 50 лет и старше составляют большую часть от общего числа пациентов. Также наблюдаются случаи хронического ВГЕ у пациентов с ослабленным иммунитетом, особенно у реципиентов паренхиматозных органов [7].

Согласно исследованиям, в Республике Беларусь распространенность специфических антител к вирусу гепатита Е у пациентов с повышенным уровнем аланинаминотрансферазы составляет 11,2%, в группе условно здоровых людей частота встречаемости вируса составила 7,3%, при этом фактическое распространение инфекции превосходит этиологическую диагностику, так как ВГЕ часто протекает в скрытой субклинической форме [8].

Использование белков 3-го генотипа для создания тест-систем иммуноферментного анализа для качественной оценки наличия специфических антител класса М и G в сыворотках крови людей основано на преобладающей циркуляции ВГЕ данного генотипа в Республике Беларусь и на территории государств постсоветского пространства [11].

Высокая распространенность ВГЕ и возможность передачи вируса показывают, что наличие чувствительных и высокоспецифичных тест-систем для определения антител к вирусу гепатита Е способствует верификации диагноза, повышает выявляемость инфекции и предупреждает дальнейшее ее распространение.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить возможность использования рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3 ВГЕ 3-го генотипа в качестве иммобилизованных антигенов для создания иммуноферментной тест-системы для качественного определения анти-ВГЕ IgG в сыворотке (плазме) крови людей.

■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве твердой фазы использовались неразборные 96-луночные полистироловые планшеты Sarstedt (Германия), а также разборные 96-луночные полистирольные планшеты («Хема», РФ), на которые в объеме 100 мкл в каждую лунку наносились рекомбинантные полипептиды, содержащие белковые продукты открытых рамок считывания ORF2 и ORF3 ВГЕ 3-го генотипа (разработан и предоставлен ФГБНУ

«Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», Москва, Россия), разведенные в карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ pH 9,6) до рабочей концентрации 2 и 0,25 мкг/мл соответственно.

После инкубации в течение 16–18 ч. при температуре +2...+8 °С планшеты промывались 4 раза промывочным раствором фосфатно-солевого буфера с помощью автоматизированного вошера Intelispeed Washer IW-8 Biosan, заклеивались защитной пленкой и хранились в холодильнике при температуре +2...+8 °С.

Биологический материал получали от условно здоровых людей (доноров); пациентов отделений городской клинической инфекционной больницы, имевших повышенную активность в сыворотке (плазме) крови гепатотропных ферментов (АлАТ более 100 МЕ/мл); лиц с хроническими вирусными гепатитами консультативно-диагностического кабинета, а также из других учреждений здравоохранения г. Минска. Образцы хранились при температуре не выше минус 20 °С. Также использовались аликвотированные и хранившиеся в морозильнике при –80 °С сыворотки пациентов с уже установленным наличием IgG с помощью референсных тест-систем «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» и «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-M» (НПО «Диагностические системы», Российская Федерация).

При проведении «непрямого» варианта иммуноферментного анализа использовались инаktivированные положительные, содержащие специфические антитела класса G к вирусу гепатита Е, и отрицательные контрольные образцы сывороток крови человека, не содержащие HBsAg, антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, вирусу гепатита С (наборы «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» НПО «Диагностические системы», РФ, «Вектоген E-IgG», «Вектор-Бест»). Исследуемые образцы сывороток крови людей разводили 1 к 10. Конъюгат использовался также из набора «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы», РФ) и разводился согласно инструкции производителя. Для проведения сравнительной оценки работы сенсibilизированных рекомбинантных полипептидов также использовался готовый конъюгат набора «Вектоген E-IgG» («Вектор-Бест»).

Учет результатов проводили в течение 5 минут после добавления в каждую лунку 50 мкл стоп-реагента (раствор серной кислоты 0,75 моль/л) на спектрофотометре «Витязь» Ф300 при длине волны 450 нм и референс-светофилт্রে 620–680 нм. Рассчитывали средние значения оптических плотностей (ОП) для положительного и отрицательного контрольных образцов. Для расчета критического значения ОП (cut-off) добавляли константную величину 0,2 к среднему значению ОП отрицательных контролей.

Статистическую обработку полученных результатов производили с использованием пакетов статистического анализа данных Statistica for Windows 10.0 и программы анализа данных Microsoft Excel пакета Microsoft Office операционной системы Windows 10.0. Коэффициент позитивности (КП) рассчитывался отношением ОП в лунке с образцом пациента относительно критической ОП. Воспроизводимость, которую характеризует коэффициент вариации (CV%), рассчитывалась по формуле:

$$CV = \frac{\sigma}{\text{ОП}_{\text{ср}}},$$

где σ – среднеквадратическое отклонение;

ОП_{ср} – среднее значение оптической плотности.



■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для выбора оптимальной рабочей концентрации рекомбинантных антигенов ORF2 и ORF3 для сенсибилизации были исследованы различные варианты нанесения на твердую фазу с высокой сорбируемой способностью как комбинаций данных полипептидов, так и в отдельности каждого из них (рис. 1, 2).

По результатам многократных повторов и оценки значений оптических плотностей положительных и отрицательных контролей и проб сывороток установлено, что в одиночном варианте использования рекомбинантный полипептид ORF2 является доминантным и может обеспечить достоверное высокоспецифичное

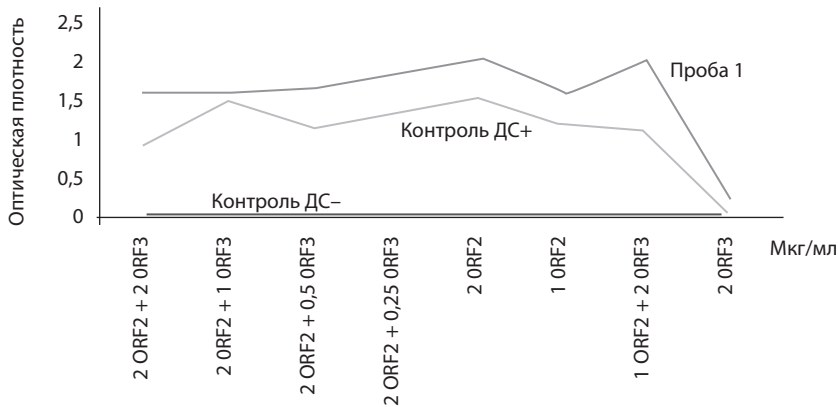


Рис. 1. Пример результата определения оптической плотности положительного и отрицательного контролей (ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G), а также положительной пробы № 1 сыворотки пациента
Fig. 1. An example of the result of determining the optical density of positive and negative controls (DS-ELISA-ANTI-HEV-G), as well as positive sample No. 1 of the patient's serum

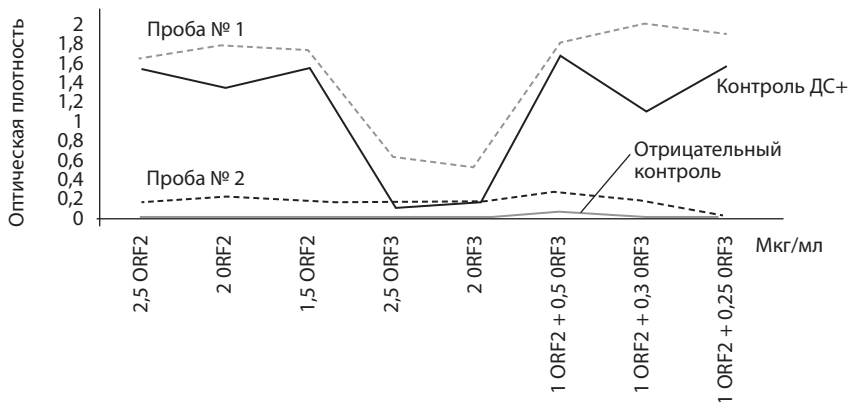


Рис. 2. Пример результата определения оптической плотности положительного контроля (ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G), отрицательной по анти-ВГЕ IgG сыворотки, также положительных проб № 1, 2 сывороток пациентов
Fig. 2. An example of the result of determining the optical density of positive control (DS-ELISA-ANTI-HEV-G), negative for anti-HEV IgG serum, as well as positive samples No. 1, 2 sera of patients

выявление иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита Е, тогда как антиген ORF3 самостоятельно не обеспечивает выявление IgG с высокими показателями оптических плотностей, на что указывали низкие, не превышающие контрольные значения критических, оптические плотности положительных по анти-ВГЕ IgG сывороток и контролей в постановках. Вероятнее всего, это связано с морфофункциональной характеристикой белка ORF2, который не только защищает целостность вирусного генома, но также участвует во многих важных физиологических процессах, таких как сборка вириона, инфекционность, а также выработка специфических антител именно к этому основному капсидному белку [7]. Также применение антигена ORF2 позволяет изучать сероконверсию на более поздних сроках реконвалесценции и обнаруживать анамнестические антитела. Относительно низкие значения ОП при использовании только рекомбинантного аналога белка ORF3 можно объяснить меньшим количеством диагностически значимых эпитопов в его составе по сравнению с ORF2, а также способностью данных белков индуцировать образование преимущественно специфических IgM и ранних IgG ВГЕ [9–11]. При этом комбинация данных антигенов демонстрирует высокие показатели контролей при низких фоновых значениях отрицательных проб сывороток, что обуславливает использование ORF2 в концентрации 2,0 и ORF3 в концентрации 0,25 мкг/мл в дальнейшем.

Для оценки внутрисерийной воспроизводимости сенсibiliзируемых рекомбинантных полипептидов в выбранной рабочей концентрации при проведении иммуноферментного анализа использовались одна низкопозитивная (образец № 1) и две высокопозитивные (образцы № 2 и № 3) по содержанию анти-ВГЕ IgG сыворотки от пациентов в нескольких повторях с применением двух разных конъюгатов из наборов «Вектоген Е-IgG» («Вектор-Бест», Новосибирск) и «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G», НПО «Диагностические системы», РФ (табл. 1, 2).

В результате проведенных исследований установлено, что иммуносорбент на основе рекомбинантных белков может эффективно использоваться для определения анти-ВГЕ класса G с конъюгатами разных наборов, что может применяться для адаптации ИФА тест-систем в зависимости от целей исследования. Однако образец № 1 является положительным и близким к границе cut-off только при использовании конъюгата «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы», РФ) с

Таблица 1
Оценка воспроизводимости разрабатываемой тест-системы ИФА при использовании конъюгата «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» при сенсibiliзации рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3 2,0 мкг/мл и 0,25 мкг/мл
Table 1
Evaluation of reproducibility of the developed ELISA test system using the "DS-ELISA-ANTI-HEV-G" conjugate during sensibiliization of recombinant polypeptides ORF2 and ORF3 2.0 µg/ml and 0.25 µg/ml

Номер образца	Конъюгат набора «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (НПО «Диагностические системы», РФ) в 4 повторях			
	Среднее значение ОП	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, CV, %	Коэффициент позитивности (КП)
1	0,235	0,059	25,1	1,11
2	1,171	0,150	12,8	5,53
3	1,464	0,113	7,7	6,90



Таблица 2

Оценка воспроизводимости разрабатываемой тест-системы ИФА при использовании конъюгата «Вектоген E-IgG» при сенсibilизации рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3 2,0 мкг/мл и 0,25 мкг/мл

Table 2

Evaluation of reproducibility of the developed ELISA when using a conjugate "Vectohep E-IgG" during sensibilization of recombinant polypeptides ORF2 and ORF3 2.0 µg/ml and 0.25 µg/ml

Номер пробы	Конъюгат набора «Вектоген E-IgG» («Вектор-Бест») в 3 повторах			
	Среднее значение ОП	Стандартное отклонение	Коэффициент вариации, CV, %	Коэффициент позитивности (КП)
1	0,011	0,003	25,7	–
2	1,519	0,046	3,0	7,0
3	1,749	0,041	2,4	8,21

достаточно высоким коэффициентом вариации в 25,1%. Это может быть объяснимо низким содержанием иммуноглобулинов класса G в сыворотке, а также частичным инаktivированием антител в сыворотке. При использовании конъюгата «Вектоген E-IgG» данная сыворотка является отрицательной, поэтому коэффициент позитивности не рассчитывался.

При анализе коэффициентов позитивности проб № 2 и № 3 при использовании разных конъюгатов (табл. 1 и 2) отмечаются более высокие значения КП при применении конъюгата «Вектоген E-IgG», коэффициент вариации при этом составляет менее 5%, что гораздо меньше рекомендуемых значений в 10% согласно руководствам по разработке ИФА [11].

При оценке внутрисерийной воспроизводимости на позитивных сыворотках установлено, что коэффициент вариации составляет менее 10%, что также соответствует рекомендуемым значениям при разработке тест-систем ИФА [11]. В целом отмечаются более высокие показатели оптических плотностей, следовательно, и коэффициента позитивности при использовании конъюгата «Вектоген E-IgG» («Вектор-Бест»).

Различия результатов исследования могут быть связаны с особенностями технологии разработки тест-систем разными производителями, в частности использованием различных специфических белков, кодирующих разные эпитопы вируса гепатита E, а также использованием различных по составу растворов для разведения конъюгата и растворов для разведения сывороток.

Для оценки антигенной специфичности рекомбинантных антигенов ORF2 и ORF3 ВГЕ 3-го генотипа было проведено несколько постановок иммуноферментного анализа с более широким набором исследуемых сывороток в параллели с референсной тест-системой «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G», НПО «Диагностические системы», РФ (табл. 3).

Обращают на себя внимание высокие значения средней величины оптических плотностей положительных по анти-ВГЕ IgG сывороток при использовании иммуносorbента с ORF2 и ORF3 ВГЕ 3-го генотипа по сравнению с контрольной референсной тест-системой, что является хорошим показателем работы сенсibilизируемых антигенов. При этом ложноотрицательные результаты отсутствовали, соответственно, от-носительная чувствительность составила не менее 99%.

Таблица 3
Оценка антигенной специфичности рекомбинантных антигенов ORF2 и ORF3 ВГЕ 3-го генотипа по сравнению с референсной тест-системой методом ИФА
Table 3
Evaluation of antigenic specificity of the recombinant antigens ORF2 and ORF3 of the 3rd genotypes in comparison with the reference test system by the ELISA method

Исследуемая группа		Кол-во проб	Средняя величина оптической плотности разных сывороток при λ=450 нм, ОП _{ср.ед.} (M±m)	
			Иммуносорбент с ORF2 и ORF3 ВГЕ 3-го генотипа	Референс-набор «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-Г»
Поста-новка 1	Пациенты с повышенной АЛТ	6	0,007±0,003	0,016±0,008
	Пациенты с выявленным анти-ВГЕ IgG	3	1,385±0,881	0,917±0,464
	Пациенты с выявленным ВГА	1	0,010	0,012
	Другие пациенты	3	0,007±0,004	0,028±0,014
Поста-новка 2	Здоровые доноры	18	0,010±0,006	0,008±0,004
	Пациенты с выявленным анти-ВГЕ IgG	1	1,197	0,924
	Пациенты с повышенной АЛТ	15	0,009±0,005	0,009±0,005
	Пациенты с выявленным ВГА	2	0,012±0,003	0,008±0,005
	Другие пациенты	4	0,020±0,027	0,008±0,007

■ **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Использование в качестве иммобилизованных антигенов для иммуноферментного анализа комбинации рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3 3-го генотипа ВГЕ перспективно для последующего создания тест-систем для качественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита Е. Иммуносорбент демонстрирует хорошие показатели специфичности, чувствительности и небольшой коэффициент вариации при оценке внутрисерийной воспроизводимости при использовании разных конъюгатов.

■ **ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES**

1. Hepatitis E – Fact sheets 24 June 2022. World Health Organization. Available at: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e> (accessed 24 August 2022).

2. Kalia M., Chandra V., Rahman S.A., Sehgal D. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J Virol.* 2009;83(24):12714–24. doi: 10.1128/JVI.00717-09

3. Tanggis K.T., Kobayashi T., Takahashi M., Jirintai S., Nishizawa T., Nagashima S., Nishiyama T., Kunita S., Hayama E., Tanaka T., Mulyanto, Okamoto H. An analysis of two open reading frames (ORF3 and ORF4) of rat hepatitis E virus genome using its infectious cDNA clones with mutations in ORF3 or ORF4. *Virus Res.* 2018;249:16–30. doi: 10.1016/j.virusres.2018.02.014

4. Purdy M.A., Harrison T.J., Jameel S., Meng X.J., Okamoto H., Van der Poel W.H.M., Smith D.B. Ictv Report Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae. *J Gen Virol.* 2017;98(11):2645–2646. doi: 10.1099/jgv.0.000940

5. Meng X.J. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol.* 2010;140:256–265. doi: 10.1016/j.vetmic.2009.03.017

6. Pavio N., Meng X.J., Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res.* 2010;41:46. doi: 10.1051/vetres/2010018

7. Wang Y. Hepatitis E Virus: *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer: Dordrecht. 2016;948. doi:10.1007/978-94-024-0942-0_1

8. Davydov V., Zhavoronok S., Rogacheva T. Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in the population of the Republic of Belarus. *Journal of microbiology, epidemiology and immunology.* 2022;99(2):160–171. doi:10.36233/0372-9311-236 (in Russian)

9. Ma H., Song X., Li Z. Varying abilities of recombinant polypeptides from different regions of hepatitis E virus ORF2 and ORF3 to detect anti-HEV immunoglobulin M. *J. Med. Virol.* 2009;81(6):1052–1061.

10. Obriadina A., Meng J.H., Ulanova T. A new enzyme immunoassay for the detection of antibody to hepatitis E virus. *J. Gastroenterol Hepatol.* 2002;3:360–364.

11. Alatortseva G., Sidorov A., Nesterenko L. Obtaining the recombinant ORF3 protein of hepatitis E genotype 3 and evaluation of its antigenic properties. *Journal of microbiology, epidemiology and immunology.* 2018;5:46–53. Available at: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-46-53> (in Russian)

12. John R. (ed.) *The ELISA Guidebook. Second Edition.* 2009. Crowther.