

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2020

Тест-система для выявления IgG-антител к вирусу гепатита E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*) методом линейного иммуноанализа

Алаторцева Г.И.¹, Доценко В.В.¹, Нестеренко Л.Н.¹, Лухверчик Л.Н.¹, Кабаргина В.Ю.¹, Амиантова И.И.¹, Жукина М.В.¹, Жаворонок С.В.², Нурматов З.Ш.³, Нурматов А.З.³, Зверев В.В.¹

¹ ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова», 105064, Москва, Россия;

² Белорусский государственный медицинский университет, 220116, Минск, Республика Беларусь;

³ НПО «Профилактическая медицина», 720005, Бишкек, Кыргызская Республика

Введение. Эффективность методов серодиагностики гепатита E варьирует в широких пределах, поэтому рекомендуется комбинированное использование тестов различных форматов.

Цель исследования – разработка тест-системы для выявления IgG-антител к вирусу гепатита E (ВГЕ) в сыворотке крови человека методом линейного иммуноанализа (ЛИА).

Материал и методы. Образцы сывороток крови больных гепатитами и условно здоровых лиц типировали с применением коммерческих иммуноферментных тест-систем на IgG-антитела к возбудителям вирусных гепатитов и иных инфекций, вызывающих патологию печени. В ЛИА применяли рекомбинантные антигены ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов. В качестве тест-системы сравнения использовали набор реагентов «RecomLine HEV IgG/IgM» (Mikrogen GmbH, Германия).

Результаты. Разработана первая отечественная тест-система «Блот-ВГЕ», предназначенная для выявления IgG-антител к индивидуальным белкам ВГЕ в сыворотке крови человека методом ЛИА. Антигенная основа представлена полосками нитроцеллюлозной мембраны с иммобилизованными на ней в виде дискретных линий рекомбинантными антигенами, содержащими С-концевые фрагменты белков ORF2 (406–660 а.о.), полноразмерные последовательности белков ORF3 (1–113 а.о.) ВГЕ 1-го и 3-го генотипов, и контрольными антигенами. Конъюгат – меченные пероксидазой хрена моноклональные антитела мыши к IgG человека, раствор хромогена содержит 3,3',5,5'-тетраметилбензидин. Предусмотрен визуальный и цифровой учёт результатов. Аналитическая чувствительность тест-системы составила 0,625 МЕ/мл для антигенов ORF2 и 2,5 МЕ/мл для антигенов ORF3. Показано, что эндогенные интерференты не влияют на результаты анализа и отсутствуют перекрёстные реакции с антителами к возбудителям гепатитов иной этиологии. Чувствительность тест-системы в сравнении с набором «RecomLine HEV IgG/IgM» составила 92%, специфичность – 97%. Определён срок её годности в заданных условиях хранения – 12 мес.

Заключение. Разработана тест-система для подтверждения результатов иммуноферментного анализа в лабораторной диагностике гепатита E.

Ключевые слова: гепатит E; вирус гепатита E; серодиагностика; линейный иммуноанализ; иммуно-блоттинг.

Для цитирования: Алаторцева Г.И., Доценко В.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Кабаргина В.Ю., Амиантова И.И., Жукина М.В., Жаворонок С.В., Нурматов З.Ш., Нурматов А.З., Зверев В.В. Тест-система для выявления IgG-антител к вирусу гепатита E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*) методом линейного иммуноанализа. *Вопросы вирусологии.* 2020; 65(3): 132-142. DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-132-142>

Для корреспонденции: Алаторцева Галина Ивановна, канд. биол. наук, вед. науч. сотр., зав. лабораторией клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова, 105064, Москва, Малый Казенный пер., д 5А. E-mail: alatorseva@gmail.com

Участие авторов: Алаторцева Г.И. – концепция и дизайн исследования, сбор данных литературы, написание текста, сбор и обработка материала; Доценко В.В. – сбор данных литературы, написание текста, сбор и обработка материала; Нестеренко Л.Н. – сбор и обработка материала; Лухверчик Л.Н. – сбор и обработка материала, написание текста, статистический анализ; Кабаргина В.Ю. – сбор и обработка материала; Амиантова И.И. – сбор и обработка материала, редактирование; Жукина М.В., Жаворонок С.В., Нурматов З.Ш. Нурматов А.З. – сбор и обработка материала; Зверев В.В. – редактирование.

Финансирование. Исследование выполнено при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (Соглашение № 075-15-2019-1481 от 15.08.2019 г., уникальный идентификатор проекта RFMEFI61319X0091).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 29.05.2020

Принята в печать 09.06.2020

Line immunoassay for detection of IgG antibodies to hepatitis E virus (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*)

Galina I. Alatorseva¹, Vera V. Dotsenko¹, Lyubov N. Nesterenko¹, Lyudmila N. Luhverchik¹, Vera Yu Kabargina¹, Irina I. Amiantova¹, Marina V. Zhukina¹, Sergey V. Zhavoronok², Zuridin S. Nurmatov³, Asilbek Z. Nurmatov A.Z.³, Vitaliy V. Zverev¹

¹ I.I. Mechnikov Research Institute of Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia;

² Belarusian State Medical University, Minsk, 220116, Republic of Belarus;

³ Scientific Production Association "Preventive Medicine" Ministry of Health of the Kyrgyz Republic, Bishkek, 720005, Kyrgyz Republic

Introduction. The diagnostic efficacy of methods for hepatitis E serodiagnostic varies over a wide range; therefore, the combined use of tests of various formats is recommended. The aim of the research was to develop a test system for the detection of IgG antibodies to hepatitis E virus (HEV) in human serum by linear immunoassay (LIA).

Material and methods. Serum samples from patients with hepatitis and healthy individuals were tested using commercial enzyme-linked immunosorbent assay systems for the presence of IgG antibodies to viral agents causing hepatitis and other infections associated with liver pathology. Recombinant antigens ORF2 and ORF3 of HEV genotypes 1 and 3 were used. The "RecomLine HEV IgG/IgM" reagent kit (Mikrogen GmbH, Germany) was used as a comparison test system.

Results. The first Russian diagnostic kit "Blot-HEV", designed to detect IgG antibodies to individual HEV proteins in human serum using LIA, was developed. The antigenic base is represented by strips of a nitrocellulose membrane with immobilized recombinant antigens ORF2 (aa 406–660) and ORF3 (aa 1–113) of HEV genotypes 1 and 3, and control antigens in the form of discrete lines. The conjugate was mouse monoclonal antibodies to human class G immunoglobulins labeled with horseradish peroxidase. The chromogen solution contained the 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine. A visual and digital recording of results was provided. The analytical sensitivity of the test kit was 0.625 IU/ml for ORF2 antigens and 2.5 IU/ml for ORF3 antigens. The absence of the influence of endogenous interfering substances on the results of the analysis and the absence of cross-reactions with antibodies to hepatitis pathogens of the other etiologies had been shown. The sensitivity of the test system compared to the "RecomLine HEV IgG/IgM" kit was 92%, specificity 97%. Shelf life in condition of storage was determined to be 12 months.

Conclusions. The developed test can be used to confirm the results of ELISA in laboratory diagnosis of hepatitis E.

Keywords: hepatitis E; hepatitis E virus; serodiagnosis; line immunoassay; immunoblotting.

For citation: Alatorseva G.I., Dotsenko V.V., Nesterenko L.N., Luhverchik L.N., Kabargina V.Yu., Amiantova I.I., Zhukina M.V., Zhavoronok S.V., Nurmatov Z.S., Nurmatov A.Z., Zverev V.V. Line immunoassay for detection of IgG antibodies for hepatitis virus E (*Hepeviridae*, *Orthohepevirus*, *Orthohepevirus A*). *Voprosy Virusologii (Problems of Virology)*. 2020; 65(3): 132-142. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0507-4088-2020-65-3-132-142>.

For correspondence: Galina I. Alatorseva, PhD (Biol.), Lead Researcher, Head of the laboratory for cloning of viral genomes, I.I. Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Moscow, 105064, Russia. E-mail: alatorseva@gmail.com

Information about the authors:

Alatorseva G.I., <https://orcid.org/0000-0001-9887-4061>

Dotsenko V.V., <https://orcid.org/0000-0002-5866-944X>

Nesterenko L.N., <https://orcid.org/0000-0002-3825-3906>

Luhverchik L.N., <https://orcid.org/0000-0002-2997-8892>

Kabargina V.Yu., <https://orcid.org/0000-0002-8784-4497>

Amiantova I.I., <https://orcid.org/0000-0003-3483-0128>

Zhukina M.V., <https://orcid.org/0000-0002-2329-5089>

Zhavoronok S.V., <https://orcid.org/0000-0001-9727-1103>

Nurmatov Z.S., <https://orcid.org/0000-0003-3481-227X>

Nurmatov A.Z., <https://orcid.org/0000-0002-0717-4172>

Zverev V.V., <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

Contribution: Alatorseva G.I. – research concept and design, literature data collection, material collection and processing, text writing; Dotsenko V.V. – literature data collection, material collection and processing, text writing; Nesterenko L.N. – material collection and processing; Luhverchik L.N. – material collection and processing, text writing, statistic analysis; Kabargina V.Yu. – material collection and processing; Amiantova I.I. – material collection and processing, text editing; Zhukina M.V., Zhavoronok S.V., Nurmatov Z.S., Nurmatov A.Z. – material collection and processing; Zverev V.V. – text editing.

Acknowledgment. The study was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (Agreement № 075-15-2019-1481 from 15.08.2019, unique identifier of the project RFMEFI61319X0091).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 29 May 2020
Accepted 09 June 2020

Введение

Гепатит Е (ГЕ) представляет глобальную проблему для здравоохранения, поэтому очень важно совершенствование его лабораторной диагностики. Серологическим маркером острого или недавно перенесённого ГЕ служат IgM-антитела к вирусу ГЕ (ВГЕ), которые появляются в крови заболевших в течение первых 2 нед желтушного периода и могут обнаруживаться в течение 5 мес после начала заболевания [1]. Специфические IgG-антитела, которые в острой фазе ГЕ часто появляются одновременно или вскоре после IgM-антител и могут длительно персистировать в крови пациентов [2], часто рассматриваются как индикатор перенесённой инфекции и основной показатель серопревалентности ВГЕ. Тем не менее увеличение титра IgG-антител к ВГЕ более чем в 4 раза трактуется как показатель острого ГЕ. Например, Европейская ассоциация по изучению печени (European Association for the Study of the Liver) рекомендует для установления диагноза острого ГЕ учитывать одновременное присутствие в анализируемых пробах РНК ВГЕ и специфических IgM- и/или IgG-антител, а также повышение титров IgG-антител на фоне присутствия IgM-антител [3]. Сравнительные испытания коммерческих тест-систем разных производителей, проведённые на идентичных образцах сывороток крови больных острым ГЕ, показали, что по диагностической эффективности эти тесты различаются в широких пределах. Например, 4 набора для определения IgG-антител к ВГЕ различались по чувствительности в диапазоне от 40 до 1000 МЕ/мл, а получаемые с их применением результаты совпадали в 56–87% случаев [4]. Метаанализ результатов 73 исследований серопревалентности ВГЕ в Европе, проведённых с 2003 по 2015 г., показал, что данные сероэпидемиологических исследований решающим образом зависят от чувствительности применяемых тестов. Доля серопозитивной прослойки среди населения обследованных территорий, определённая с помощью пяти коммерческих тест-систем, варьировала в широком диапазоне: 17% (Wantai, Китай), 10% (Mikrogen, Германия), 7% (MP Diagnostics, США), 4% (DiaPro, Италия), 2% (Abbott, США). Среди причин выявленных несоответствий рассматриваются переменная кинетика синтеза антител к индивидуальным вирусным белкам при ГЕ, неполная гомология антигенной структуры у белков ВГЕ разных генотипов, приводящая к различиям в составе эпитопов рекомбинантных белков, применяемых в тестах [5].

Для уточнения диагноза ГЕ рекомендуется комбинированное применение тест-систем различных форматов. Исключить ложноположительные результаты в инфекционной серодиагностике позволяет повторное исследование положительных образцов в подтверждающих тестах, один из них – линейный иммуноанализ (ЛИА), или лайн-блот, основанный на применении рекомбинантных вирусспецифических антигенов. Используемый при этом метод является вариантом мультиплексного анализа, позволяющим тестировать исследуемый образец в реакции одно-

временно с несколькими антигенами. Наряду с высокой чувствительностью и специфичностью достоинством метода является возможность его применения в отсутствие оборудования для проведения иммуноферментного анализа (ИФА). На сегодняшний день немецкая компания Mikrogen GmbH – единственный в мире производитель тест-системы для выявления антител к ВГЕ методом ЛИА [6].

Рекомбинантные антигены, на основе которых созданы коммерческие отечественные и зарубежные тест-системы для серодиагностики ГЕ, содержат различные фрагменты белков ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го, 2-го или 3-го генотипов. Известно, что для белков ВГЕ разных генотипов характерны отличия в антигенных свойствах [7]. В связи с этим для разработки диагностических тестов ранее были получены в системе экспрессии *Escherichia coli* рекомбинантные антигены, содержащие С-концевые фрагменты (406–660 а.о.) капсидных белков ORF2 и полноразмерные аналоги белков ORF3 штаммов ВГЕ 1-го и 3-го генотипов, циркулирующих на территории стран постсоветского пространства [8].

Цель данной работы – разработка тест-системы для выявления IgG-антител к ВГЕ в сыворотке крови человека методом ЛИА с применением рекомбинантных антигенов ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов.

Материал и методы

В работе использованы иммунореагенты: рекомбинантные антигены ORF2 и ORF3 1-го и 3-го генотипов [9–12], β-галактозидаза, выделенная из клеток штамма *E coli* PLT90, трансформированных плазмидой pEL5a без вставки фрагмента ДНК ВГЕ, из коллекции ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова [13, 14]; полученные в лаборатории клонирования вирусных геномов ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова методом периодатного окисления пероксидазные конъюгаты моноклональных антител (МАТ) мыши к Fab-фрагменту IgG человека (ООО «Сорбент-Сервис», Россия) – МАТ2А11-ПХ, МАТ к Fc-фрагменту IgG человека (ООО «Сорбент-Сервис», Россия) – МАТСН1-ПХ, поликлональных кроличьих антител к IgG человека – ПАТ IgG-ПХ.

Для отработки условий анализа и испытаний тест-системы «Блот-ВГЕ» использовали Международный стандарт Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) «Anti-hepatitis E Serum, Human» 95/584 NIBSC, контрольную панель сывороток ($n=8$), содержащих и не содержащих анти-HEV-G (кат. № E-331, НПО «Диагностические системы», Россия), образцы ($n=239$) сывороток крови здоровых лиц и больных гепатитами А, В, С и Е и другими инфекционными патологиями печени, предоставленные кафедрой инфекционных болезней Белорусского государственного медицинского университета, НПО «Профилактическая медицина» Минздрава Кыргызской Республики, клинико-диагностическим отделением ФГБНУ НИИВС им. И.И. Мечникова (Россия). Образцы хранили при температуре $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Антитела IgG к ВГЕ в образцах сывороток крови выявляли с помощью иммуноферментной тест-системы «ДС-ИФА-Анти-HEV-G» (РУ № ФС 01262006/5408-06, НПО «Диагностические системы», Россия). Каждый образец исследовали в повторах. Для каждого положительного образца рассчитывали коэффициент позитивности (КП) по формуле:

$$КП = \frac{ОП_{обр.}}{ОП_{крит.}}$$

где $ОП_{обр.}$ – оптическая плотность образца, $ОП_{крит.}$ – её пороговое значение, рассчитанное в соответствии с инструкциями производителя. Серологические маркеры инфицирования вирусами гепатитов А (ВГА), В (ВГВ), С (ВГС) и возбудителями инфекционной патологии печени иной вирусной этиологии определяли с помощью коммерческих иммуноферментных тест-систем «ДС-ИФА-Анти-HAV-G-РЕКОМБ» (кат. № А-151, ООО «НПО «Диагностические системы», Россия), БЛОТ ВИЧ 1/2+0 (РУ № ФСР 2009/04019, АО «Биосервис», Россия) и тест-систем производства АО «Вектор-Бест», Россия: «Вектогеп В-НВс-антиген» (РУ № РЗН 2015/2887), «ГепаБест анти-НВс-IgG» (РУ РЗН 2017/5606), «Бест анти-ВГС-авто» (РУ № РЗН 2015/2674), «Бест анти-ВГС-подтверждающий тест» (РУ № РЗН 2015/2895), «ВектоЦМВ-IgG-авидность» (РУ № РЗН 2014/2219), «ВектоВЭБ-ЕА-IgG» (РУ № РЗН 2013/1274), «ВектоВЭБ-НА-IgG» (РУ № РЗН 2013/1273). В качестве тест-системы сравнения использовали набор реагентов «RecomLine HEV IgG/IgM» (РУ № ФСЗ 2012/13543 кат. № 5072, Mikrogen Diagnostik GmbH, Германия). Анализ выполняли в соответствии с инструкциями производителей соответствующих тест-систем.

Для проведения ЛИА на поверхности иммуносорбента (полосок нитроцеллюлозной мембраны) в виде поперечных линий сорбировали очищенные рекомбинантные антигены ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го (ORF2(1) и ORF3(1)) и 3-го (ORF2(3) и ORF3(3)) генотипов (линии № 1–4 на **рис. 1**) и контрольные антигены. Контрольным антигеном специфичности реакции ($K_{АГ}$ линия № 5) был синтезированный в *E. coli* рекомбинантный полипептид, содержащий аминокис-

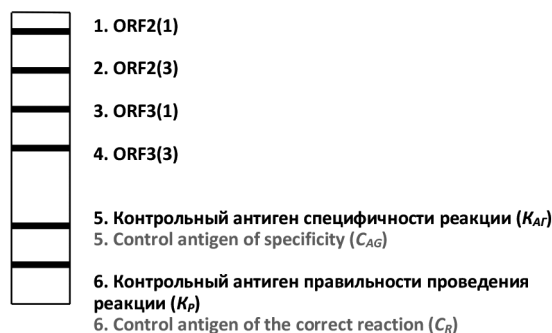


Рис. 1. Размещение линий с иммобилизованными специфическими и контрольными антигенами на полоске нитроцеллюлозной мембраны.

Fig. 1. Positions of lines with immobilized specific and control antigens on a strip of nitrocellulose membrane.

лотную последовательность фрагмента β -галактозидазы *E. coli* и не содержащий фрагментов белков ВГЕ. Для контроля правильности проведения реакции (K_p , линия № 6) использовали иммунную сыворотку против IgG человека. Иммобилизацию антигенов проводили, выдерживая растворы с их разведениями в течение 16 ч при температуре 9 °С в канальцах прибора для пассивной сорбции белков на поверхности мембран. В качестве положительного контрольного образца K^+ использовали сыворотку крови человека, содержащую IgG-антитела к белкам ВГЕ и не содержащую антител к ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС, антигена р24 ВИЧ-1 и НВсAg. Отрицательным контрольным образцом K^- была сыворотка крови человека, не содержащая антител к белкам ВГЕ, к ВИЧ-1, ВИЧ-2, ВГС, антигена р24 ВИЧ-1 и НВсAg. Контрольные образцы инактивировали прогреванием при температуре от 54 до 56 °С в течение 3 ч. Для выявления вступивших в реакцию с антигенами антител применяли пероксидазный конъюгат МАТ мыши или поликлональных антител кролика к IgG человека. Хромогеном был 3,3',5,5'-тетраметилбензидин, раствор для разведения хромогена содержал перекись водорода.

При проведении ЛИА в канавки реакционной ванночки погружали иммуносорбент – нитроцеллюлозные стрипы с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВГЕ, добавляли раствор для разведения образцов, содержащий лизат клеток *E. coli*, и испытуемые образцы в конечном разведении 1:50. Инкубировали в течение 2 ч (в варианте дневной постановки) или 16–18 ч (в варианте ночной постановки) при комнатной температуре, используя лабораторный орбитальный шейкер. Не вступившие в реакцию антитела сыворотки крови удаляли 3-кратным промыванием. По 1 мл рабочего разведения конъюгата вносили в каждую канавку реакционной ванночки, инкубировали 1 ч (в варианте дневной постановки) или 30 мин (в варианте ночной постановки) при комнатной температуре, затем 3-кратно промывали. В каждую ванночку вносили по 1 мл субстратного раствора и инкубировали в течение 15 мин в защищённом от света месте. Реакционную смесь удаляли, реакцию останавливали, внося в каждую канавку по 1 мл фосфатно-солевого буфера. Через 5 мин стрипы промывали дистиллированной водой, высушивали и проводили визуальный или цифровой учёт результатов по наличию окрашенных линий на полосках иммуносорбента. Для цифрового учёта окрашенные стрипы сканировали с помощью планшетного сканера и анализировали интенсивность окрашивания с помощью программы TotalLab. На каждом стрипе для отдельных линий антигенов определяли КП по отношению площадей пиков, соответствующих полосам индивидуального вирусспецифического антигена и $K_{АГ}$ на денситограмме.

Результаты

Перед разработкой тест-системы для определения антител к ВГЕ методом ЛИА была создана стандартная лабораторная панель сывороток крови человека,

содержащих и не содержащих IgG-антитела к ВГЕ, из проб от здоровых и больных людей с предварительным диагнозом «вирусный гепатит» из лечебно-профилактических учреждений Республики Беларусь, Кыргызстана и России. Все полученные образцы исследовали на антитела к ВГС, *T. pallidum*, ВИЧ-1, ВИЧ-2 и антигены р24 ВИЧ и HBsAg ВГВ. В дальнейших исследованиях использовали только отрицательные по этим показателям образцы. Отобранные образцы протестировали в тест-системе «ДС-ИФА-Анти-HEV-G». Сформированная таким образом лабораторная панель (ЛП) включала 25 (№ 1–25) положительных образцов (восемь – с КП от 6,0 до 8,5; десять – с КП от 3,7 до 5,7; семь – с КП от 2,0 до 3,6 и 50 (№ 26–75) отрицательных образцов с КП от 0,2 до 0,9. В соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 23640-2015 проведено предварительное испытание стабильности образцов ЛП в течение 21 сут в двух режимах: при температуре $4,0 \pm 1^\circ\text{C}$ и в условиях моделирования ускоренного старения при температуре $37,0 \pm 1^\circ\text{C}$. Анализ результатов исследования образцов по истечении срока хранения в наборе «ДС-ИФА-Анти-HEV-G» показал, что КП образцов ЛП, хранившихся при $4,0 \pm 1^\circ\text{C}$, оставались неизменными, в то же время образцы, выдержанные при $37,0 \pm 1^\circ\text{C}$ в течение 21 сут, не теряли специфичности, при этом их КП снижался не более чем на 20%, что соответствует стабильности в течение 1 года при температуре от 2 до 8°C .

Критерием выбора при отработке оптимальных условий проведения ЛИА считали максимальное соотношение между значениями КП для положительных и отрицательных образцов при отсутствии окрашивания полосы K_{AG} . Концентрацию каждого из рекомбинантных антигенов ВГЕ и K_{AG} для сорбции на поверхности нитроцеллюлозных мембран определяли в сериях их разведений в концентрациях от 10 до 40 мкг/мл. По результатам анализа реакций с положительными и отрицательными образцами были установлены оптимальные концентрации антигенов ВГЕ для сорбции: ORF2(1) – 8,75 мкг/мл, ORF2(3) – 8,75 мкг/мл, ORF3(1) – 35 мкг/мл, ORF3(3) – 35 мкг/мл, K_{AG} – 45 мкг/мл. С целью выбора наиболее специфичного препарата пероксидазного конъюгата антител к IgG человека и определения его рабочего разведения было протестировано 3 вида антител к IgG человека, меченных пероксидазой хрена: МАТ2А11-ПХ, МАТ-СН1-ПХ и ПАТ IgG-ПХ. Конъюгаты тестировали в разведениях от 1 : 20 000 до 1 : 60 000 в режиме ночной постановки. Анализ полученных результатов позволил выбрать оптимальный вариант конъюгата – МАТ2А11-ПХ в разведении 1 : 60 000. Для отработки наиболее приемлемых режимов инкубации иммуносорбента с исследуемыми образцами сывороток и конъюгатом изучили влияние продолжительности инкубации сывороток с иммобилизованными рекомбинантными антигенами ВГЕ от 1 до 3 ч в при дневной постановке и длительности реакции с конъюгатом в течение 30, 60 и 90 мин после дневной и ночной реакции иммуносорбента с сыворотками. Установле-

но, что в дневном варианте постановки оптимальное время инкубации с образцами сывороток составляет 120 мин, с конъюгатом – 60 мин. В ночном варианте постановки необходимая продолжительность реакции с конъюгатом составила 30 мин. За более короткое время не происходило достаточного окрашивания стрипов в реакциях с положительными образцами ЛП, а увеличение продолжительности инкубаций приводило к фоновому неспецифическому окрашиванию нитроцеллюлозных мембран. В серии отдельных экспериментов также были определены оптимальный режим послеинкубационной промывки стрипов, условия и время взаимодействия с субстратной смесью, время останова ферментативной реакции и составы соответствующих растворов.

Апробирован визуальный и цифровой учёт результатов и отработана их интерпретация.

Визуальный учёт результатов осуществляли по окрашиванию участков мембран с иммобилизованными вирусспецифическими и контрольными антигенами. Визуальный учёт результатов исследования проводили, если в реакции с контрольными сыворотками (K^+ и K^-) происходило фиолетово-синее окрашивание линии № 6 (K_p : контрольный антиген правильности проведения реакции) и отсутствовало в области линии № 5 (K_{AG} : контрольный антиген специфичности реакции), а также, если линии № 1–4 чётко окрашены в реакции с K^+ и не окрашены в реакции с K^- . Результат исследования образца учитывали как положительный, если окрасились две и более линий № 1–4; как неопределённый, если произошло окрашивание не более одной из линий № 1–4; как отрицательный, если не окрасилась ни одна из линий.

Окрашивание линии № 5 (K_{AG}) в реакциях с испытуемыми образцами рассматривали как неспецифическое взаимодействие за счёт присутствия антител к бактериальным антигенам *E. coli* или вследствие несоблюдения правил приготовления и хранения образца сыворотки. В этом случае окрашивание любой из линий № 1–4 учитывали как специфическое, если его интенсивность заметно превышала интенсивность окрашивания полосы № 5. При одинаковом или менее выраженном окрашивании любой из линий № 1–4 в сравнении с линией № 5 результат окрашивания этой линии учитывали как отрицательный. Если при исследовании по варианту с 2-часовой инкубацией образцов происходило окрашивание только одной полосы (неопределённый результат) или наблюдалось столь слабое окрашивание линий № 1–4 мембраны, что это не давало возможности учитывать результат, то анализ такого образца сыворотки повторяли по схеме с 18-часовой инкубацией. Повторное получение неопределённого результата рассматривали как свидетельство необходимости дополнительно исследования образца другими методами.

По результатам тестирования массива отрицательных в тест-системе «ДС-ИФА-Анти-HEV-G» сывороток ($n=140$) пороговое значение КП ($KP_{пор}$) по каждому из антигенов определено равным 2,1 ($p < 0,05$) для цифрового учёта результатов. Интерпретацию резуль-

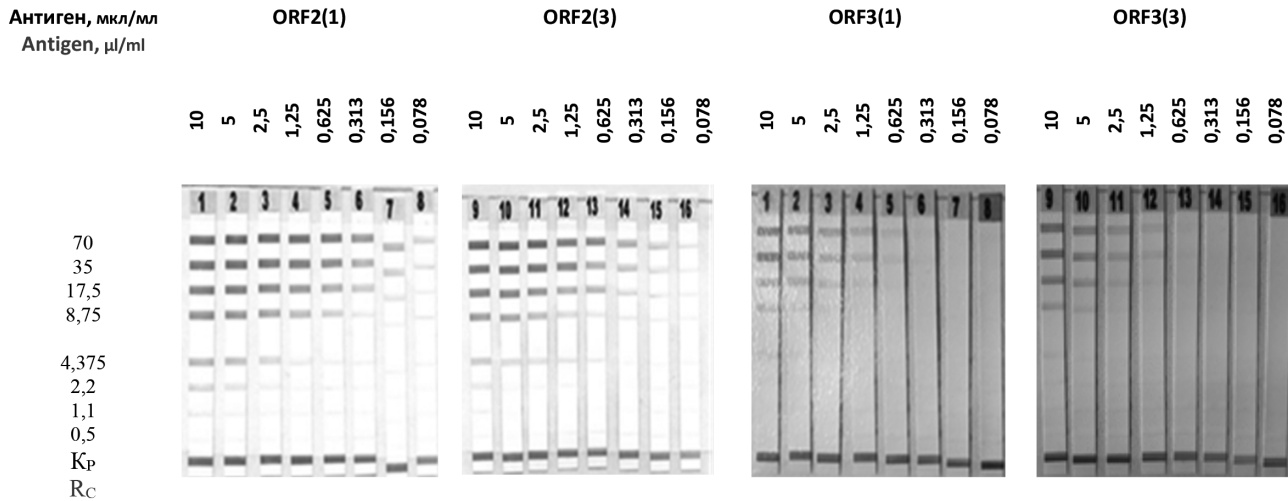


Рис. 2. Титрование Международного стандарта ВОЗ «Anti-hepatitis E Serum, Human» 95/584 NIBSC на рекомбинантных антигенах ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го (ORF2(1), ORF3(1)) и 3-го (ORF2(3), ORF3(3)) генотипов, К_р – контроль реакции.

Fig. 2. Titration of the WHO International Standard «Anti-hepatitis E Serum, Human» 95/584 NIBSC against the recombinant antigens ORF2 and ORF3 of HEV 1 (ORF2(1), ORF3(1)) and 3 (ORF2(3), ORF3(3)) genotypes, R_c – reaction control.

татов окрашивания линий на стрипе проводили с соблюдением тех же условий и в том же порядке, что и при визуальном учёте, при этом окрашивание линий антигенов подлежало учёту при КП более КП_{нор.}

Для оценки аналитической чувствительности тест-системы выполняли титрование Международного стандарта ВОЗ «Anti-hepatitis E Serum, Human» 95/584 NIBSC на отдельных антигенах ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го (ORF2(1), ORF3(1)) и 3-го (ORF2(3), ORF3(3)) генотипов. Лиофильно высушенный препарат стандарта восстанавливали согласно инструкции производителя и готовили его последовательные двукратные разведения, начиная от 10 МЕ/мл, используя раствор для разведения образцов из тест-системы «Блот-ВГЕ». На **рис. 2** представлены результаты титрования образца ВОЗ на рекомбинантных антигенах, сорбированных на стрипах нитроцеллюлозных мембран в двукратных разведениях от 70 до 0,5 мкг/мл. Аналитическая чувствительность разработанного экспериментального образца тест-системы составила 0,625 МЕ/мл при сорбции антигенов ORF2(1) и ORF2(3) в концентрации 8,75 мкг/мл и 2,5 МЕ/мл при сорбции антигенов ORF3(1) ORF3(3) в концентрации 35 мкг/мл.

Аналитическую специфичность исследовали как способность теста обнаруживать только исследуемый аналит при наличии в пробе потенциально интерферирующих веществ или антител к возбудителям вирусных гепатитов и патологий печени иной этиологии. На искусственно смоделированных образцах сыворотки крови, содержащих потенциальные эндогенные интерференты, исследовано влияние на результат анализа с положительными и отрицательными образцами ЛП их нормальных и повышенных концентраций: ревматоидный фактор – 20 (норма), 40–50 и 80–90 МЕ/мл; церулоплазмин – 0,6 (норма), 1–3 и 6–8 г/л; триглицериды –

0,75 (норма), 3,75 и 7,5 мг/мл; глюкоза – до 6,1 (норма), 16,5 и 33,5 ммоль/л; билирубин – 20 (норма), 30–40 и 55–65 мкмоль/л. Анализ полученных результатов показал, что интенсивность окрашивания полос с рекомбинантными и контрольными антигенами не зависит от присутствия в образцах интерферирующих агентов (**рис. 3**).

Чувствительность экспериментального образца тест-системы «Блот-ВГЕ» вначале была оценена на положительных и отрицательных образцах контрольной панели производства ООО «НПО «Диагностические системы» (Россия). Из результатов, представленных в **табл. 1**, видно, что значения КП по отдельным антигенам, полученные в тест-системе «Блот-ВГЕ», в среднем превышают этот показатель при тестировании образцов методом ИФА.

При проведении испытаний с использованием сывороток ЛП была установлена 100% чувствительность и 100% специфичность экспериментального образца тест-системы «Блот-ВГЕ».

Диагностическую чувствительность и диагностическую специфичность тест-системы «Блот-ВГЕ» исследовали в сравнении с единственным коммерческим аналогом – зарегистрированной в России тест-системой «RecomLine HEV IgG/IgM», основанной на использовании рекомбинантных антигенов, содержащих С-концевые (антигены O2C(1) и O2C(3)), N-концевые (антигены O2N(1) и O2N(3)) фрагменты ORF2 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов, срединного участка белка ORF2 ВГЕ 1-го генотипа (антиген O2M) и аминокислотные последовательности белков ORF3 (антигены O3(1) и O3(2)) ВГЕ 1-го и 3-го генотипов. Всего в обеих тест-системах в соответствии с ГОСТ Р 51352-2013 было исследовано 75 образцов ЛП (№ 1–75) и 30 образцов контрольной группы, содержащих специфические IgG-антитела к другим возбудителям вирусных гепатитов и инфекционной

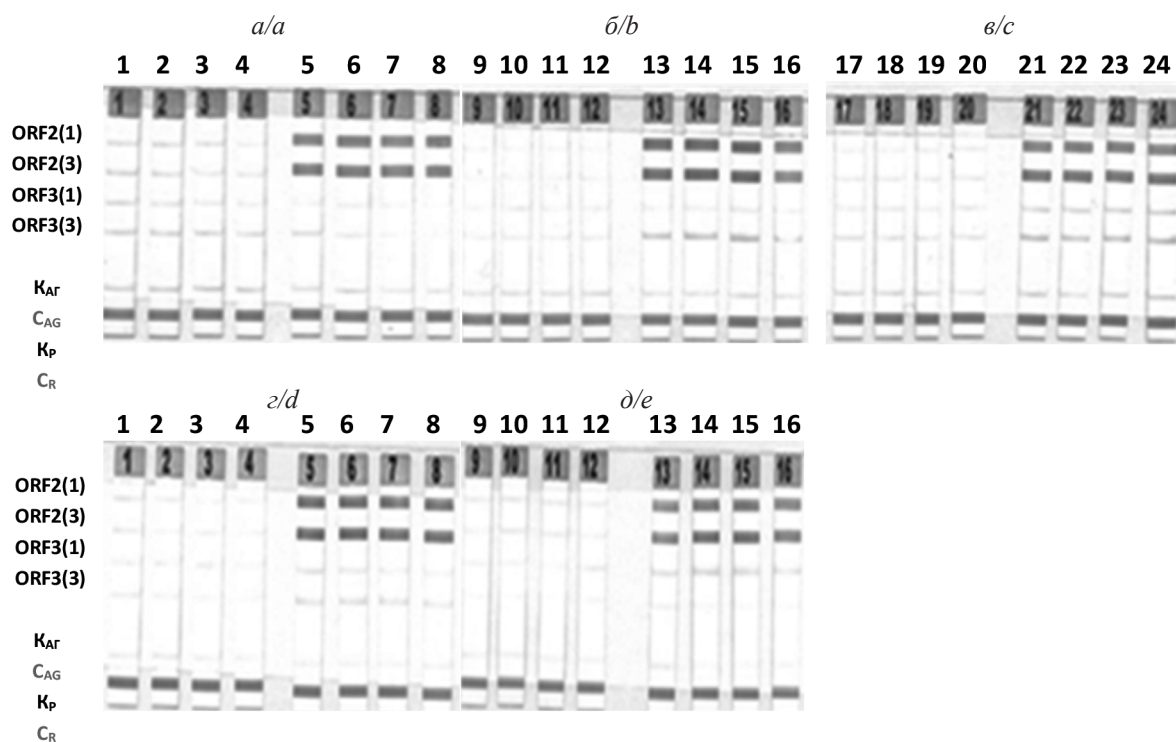


Рис. 3. Влияние интерферентов на результаты реакции с отрицательными (верхний ряд: стрипы 1–4, 9–12, 17–20; нижний ряд: стрипы 1–4, 9–12) и положительными (верхний ряд: стрипы 5–8, 13–16, 21–24; нижний ряд: стрипы 8, 13–16) образцами лабораторной панели в присутствии возрастающих концентраций ревматоидного фактора (а), церулоплазмينا (б), триглицеридов (в), глюкозы (г), билирубина (д).

Контроль без добавки интерферентов: стрипы 1, 5, 9, 13, 17, 21 (верхний ряд); 1, 5, 9, 13 (нижний ряд).

Fig. 3. Influence of interfering substances on the reaction results with negative (upper row: strips 1–4, 9–12, 17–20, bottom row: strips 1–4, 9–12) and positive (upper row: strips 5–8, 13–16, 21–24, bottom row: strips 5–8, 13–16) samples from laboratory panel in the presence of increasing concentrations of rheumatoid factor (a), ceruloplasmin (b), triglycerides (c), glucose (d), bilirubin (e).

Controls without the addition of interfering substances: strips 1, 5, 9, 13, 17, 21 (upper row); strips 1, 5, 9, 13 (bottom row).

Таблица 1. Оценка чувствительности тест-системы «Блот-ВГЕ» на сыворотках контрольной панели

Table 1. Assessment of the sensitivity of the test system Blot-HEV on the sera of the control panel

Линии на полосе иммуносорбента Lines on the strip of immunosorbent	Образцы контрольной панели «Анти-HEV-G» (ООО «НПО «Диагностические системы», Россия) Samples of the "Anti-HEV-G control panel" (RPC Diagnostic Systems, Russia)							
	1+	2+	3+	4+	1-	2-	3-	4-
Результаты исследования методом ЛИА (Блот-ВГЕ), КП The results of the study by the LIA method (Blot-HEV), COI								
1 – ORF2(1)	10,26	32,57	18,16	16,36	0,94	1,35	1,17	1,13
2 – ORF2(3)	14,13	37,86	20,10	17,17	0,93	0,93	0,93	1,00
3 – ORF3(1)	1,26	2,03	1,41	1,12	0,56	0,76	0,64	1,00
4 – ORF3(3)	1,02	2,41	1,54	0,87	0,64	0,62	0,64	0,81
5 – K _{Ag}								
5 – C _{Ag}	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
6 – K _p								
6 – C _R	15,36	39,11	13,93	15,60	9,23	8,86	7,44	9,03
Результаты исследования методом ИФА, КП The results of the study by ELISA, COI								
ДС-ИФА-Анти-HEV-G DS-IFA-Anti-HEV-G	7,4	5,9	5,80	8	0,04	0,02	0,03	0,02
Вектоген E-IgG Vectogen E-IgG	17,1	10,8	14,2	20,3	0,87	0,87	0,74	0,5

Примечание. ЛИА – линейный иммуноанализ; ИФА – иммуноферментный анализ; КП – коэффициент позитивности.

Note. LIA – Line immunoassay, ELISA – enzyme-linked immunosorbent assay, COI – cut-off index.

Таблица 2. Результаты испытаний тест-системы «Блот-ВГЕ» в сопоставлении с набором «RecomLine HEV IgG/IgM» на образцах лабораторной панели и контрольной группы**Table 2.** Comparison of the test system Blot-HEV and a set “RecomLine HEV IgG/IgM” in testing of samples from LP and control group

№ образца Sample No.	Блот-ВГЕ Blot-HEV				Результат Result	RecomLine HEV IgG/IgM						Результат Result	
	Белковый «профиль» Protein «profile»					Белковый «профиль» Protein «profile»							
	ORF2(1)	ORF2(3)	ORF3(1)	ORF3(3)		O2N(1)	O2N(3)	O2M	O2C(1)	O2C(3)	O3(1)		O3(3)
Образцы стандартной лабораторной панели Samples of a standard laboratory panel													
1–12	+	+	-	-	Пол. Pos.	-	-	-	+	+	-	-	Пол. pos.
13–16	+	+	+	+	Пол. Pos.	-	-	-	+	+	+	-	Пол. Pos.
17–19	+	+	-	+	Пол. Pos.	-	-	-	+	+	-	-	Пол. Pos.
20, 21	+	+	+	+	Пол. Pos.	-	-	-	+	+	+	+	Пол. Pos.
22, 23	+	+	+	-	Пол. Pos.	-	-	-	-	+	-	-	Пол. Pos.
24, 25	+	+	-	+	Пол. Pos.	+	-	-	+	+	+	-	Пол. Pos.
26–75	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
Контрольная группа Control group													
76–80	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
81–85	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
86–90	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
91–95	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
96–100	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
101, 102	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
103	-	+	-	-	Н/о* U/d	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.
104, 105	-	-	-	-	Отр. Neg.	-	-	-	-	-	-	-	Отр. Neg.

Примечание. * Пол. – положительный; Отр. – отрицательный; Н/о – неопределенный результат.

Note. * Pos. – positive, Neg. – negative, U/d – undetermined result.

патологии печени – ВГА (№ 76–80), ВГВ (№ 81–85), ВГС (№ 86–90), цитомегаловирусу (№ 91–95), вирусу Эпштейна–Барр (№ 96–100), ВИЧ-1 (№ 101–105) (табл. 2). Проведён визуальный учёт результатов, поскольку только он предусмотрен инструкцией к набору «RecomLine HEV IgG/IgM».

В группе сывороток ЛП, содержащих IgG-антитела к ВГЕ, доля положительных результатов анализа в обеих тест-системах была одинаковой и составила 100%. В контрольной группе сывороток в наборе Блот-ВГЕ был получен один неопределённый результат при отрицательном в наборе сравнения. Таким образом, диагностическая эффективность экспериментального образца тест-системы «Блот-ВГЕ», оценённая в соответствии с Методическими рекомендациями ФГБУ «ВНИИМТ» Росздравнадзора от 03.08.2016, при исследовании 105 образцов сыворотки крови человека

(25 положительных и 80 отрицательных) относительно ограниченного количества экземпляров набора сравнения «RecomLine HEV IgG/IgM» соответствовала 92% чувствительности и 97% специфичности. О высокой диагностической специфичности разработанной тест-системы свидетельствует и отсутствие перекрёстных реакций с возбудителями гепатитов иной этиологии. Воспроизводимость тест-системы, рассчитанная на трёх лабораторных сериях её экспериментального образца по величине КП для каждого из антигенов на четырёх положительных образцах ЛП, соответствует коэффициенту вариации от 6,29 до 12,43%, что не превышает допустимых пределов (менее 15%).

Изучение стабильности экспериментального образца тест-системы в соответствии с требованиями ГОСТ Р ИСО 23640-2015 показало, что тест-система

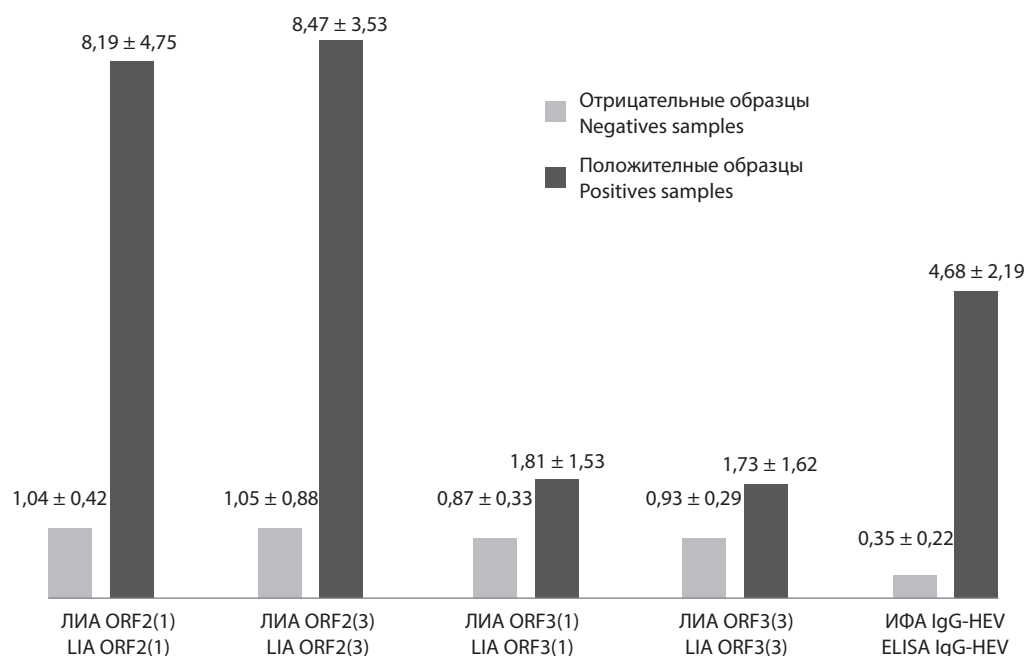


Рис. 4. Испытание тест-системы «Блот-ВГЕ» (линейный иммуноанализ, ЛИА) на образцах, типированных в тест-системе «ДС-ИФА-АНТИ-HEV-G» (иммуноферментный анализ, ИФА).

Цифрами указаны средние значения коэффициента позитивности.

Fig. 4. Performance of “Blot-HEV” test system (Line immunoassay, LIA) with samples tested using «DS-IFA-ANTI-HEV-G» kit (Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA).

Average values of the cut-off index are indicated by numbers.

ма сохраняет свои диагностические характеристики в течение 3 нед хранения в условиях ускоренного старения, что соответствует 12 мес хранения при температуре от 4 до 8 °С, остаётся стабильной в условиях лабораторного моделирования транспортирования в течение 3 сут при температуре от 9 до 30 °С, а все её готовые компоненты после вскрытия индивидуальной упаковки сохраняют стабильность в течение 2 мес.

С целью уточнения практической значимости тест-системы «Блот-ВГЕ», протестированы 134 образца сывороток, из них 68 были положительными в тест-системе «ДС-ИФА-Анти-HEV-G». Подтверждено присутствие IgG-антител к ВГЕ во всех положительных образцах. При исследовании сывороток крови контрольной группы отрицательные результаты были получены в 65 случаях, с одним образцом получен слабоположительный результат, причём произошло окрашивание линий с антигенами ORF2(1) и ORF2(3). Средние значения КП положительных образцов, определённые с помощью тест-системы «Блот-ВГЕ» по антигенам ORF2(1) и ORF2(3), превышали данный показатель, определённый методом ИФА (рис. 4). Для антигенов ORF3 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов показано более редкое и менее выраженное взаимодействие с положительными образцами.

Обсуждение

ЛИА является альтернативой классическому иммуноблоттингу, или вестерн-блоту. Известно, что по чувствительности и специфичности тесты, осно-

ванные на ЛИА, не уступают вестерн-блоту, а также превосходят по этим показателям ИФА за счёт анализа взаимодействия антител с несколькими индивидуальными антигенами инфекционного агента, представленными в большем содержании, чем позволяет сорбционная ёмкость планшета для ИФА. В настоящее время этот метод признан «золотым стандартом» для подтверждения результатов ИФА. Нами разработан первый отечественный экспериментальный образец тест-системы, предназначенной для определения IgG-антител к индивидуальным белкам ВГЕ в сыворотке крови человека методом ЛИА для подтверждения положительных или уточнения сомнительных результатов ИФА. В тест-системе используются очищенные рекомбинантные антигены, что гарантирует воспроизводимо высокую чувствительность и специфичность. Применение гомологичных белков двух разных генотипов вируса обеспечивает эффективность применения теста для анализа образцов не только из высокоэндемичных регионов, но и из регионов с невысокой спорадической заболеваемостью или преобладанием завозных случаев ГЕ.

Результаты сравнительных испытаний позволили заключить, что разработанная тест-система практически не уступает импортному коммерческому аналогу по показателям чувствительности и специфичности. Кроме того, она превосходит его по ряду потребительских свойств. В частности, все её компоненты представлены в жидком виде, в её составе есть положительный и отрицательный контрольные образцы,

а также предусмотрена возможность 16–18-часовой ночной постановки, которая часто бывает более удобна при проведении клинических исследований. Важным преимуществом тест-системы является также цифровой учёт результатов с использованием общедоступного офисного оборудования.

Выявление специфических антител в отрицательном образце по результатам тестирования в ИФА-наборе может свидетельствовать о более высокой чувствительности тест-системы «Блот-ВГЕ». В пользу такой трактовки результатов свидетельствуют отсутствие в антигенной основе тест-системы, в которой были отобраны образцы, белков ВГЕ 3-го генотипа [15], а также особенности конструкции используемых в тест-системе «Блот-ВГЕ» рекомбинантных антигенов, содержащих более протяжённый участок белков ORF2, а следовательно, и дополнительные вирусспецифические эпитопы. Более редкое и менее выраженное взаимодействие с положительными образцами белков ORF3 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов можно объяснить тем, что данные антигены индуцируют преимущественно образование IgM- и ранних IgG-антител [7], а отбор образцов опытной группы проводили на тест-системе, содержащей в антигенной основе фрагменты белка ORF2 ВГЕ и предназначенной для выявления IgG-антител.

Учитывая различия в результатах, получаемых с применением производимых разными компаниями тест-систем [16, 17], проблема разработки надёжных тестов для подтверждающей диагностики ГЕ и их стандартизации остаётся актуальной. В частности, пока не решена задача по созданию тестов, подтверждающих наличие специфических IgM-антител – важного маркера ранней стадии заболевания, когда IgG-антител ещё не вырабатываются, а период вирусемии продолжается и больной ГЕ является источником инфекции. В качестве развития выбранного направления исследований запланирована разработка метода ЛИА для выявления антител класса IgM к белкам ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов.

Следует отметить, что корректная диагностика ГЕ должна обеспечиваться комплексным анализом всех лабораторных (биохимических, серологических, молекулярно-генетических) показателей и клинических проявлений заболевания [3].

Выводы

1. Разработана первая отечественная тест-система «Блот-ВГЕ» для выявления IgG-антител к индивидуальным белкам ВГЕ в сыворотке крови человека методом ЛИА с применением ранее полученных авторами рекомбинантных ORF2 и ORF3 ВГЕ 1-го и 3-го генотипов.

2. Аналитическая чувствительность тест-системы по Международному стандарту ВОЗ «Anti-hepatitis E Serum, Human» 95/584 NIBSC составила 0,625 МЕ/мл для антигенов ORF2 и 2,5 МЕ/мл для антигенов ORF3. Чувствительность тест-системы в сравнении с коммерческим аналогом – набором «RecomLine HEV IgG/IgM» (Mikrogen Diagnostik GmbH, Германия) – составила 92%, специфичность – 97%.

3. Доказано отсутствие влияния эндогенных интерферонов и отсутствие перекрёстных реакций с антителами к возбудителям гепатитов иной этиологии на результаты анализа.

4. Определён срок годности тест-системы «Блот-ВГЕ» в заданных условиях хранения – 12 мес.

5. Разработанная тест-система может применяться для подтверждения результатов ИФА в лабораторной диагностике ГЕ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Favorov M.O., Fields H.A., Purdy M.A., Yashina T.L., Aleksandrov A.G., Alter M.J., et al. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J. Med. Virol.* 1992; 36(4): 246-50. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.1890360403>
2. Khudyakov Y.E., Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* 2011; 161(1): 84-92. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.06.006>
3. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J. Hepathol.* 2018; 68(6): 1256-71. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.005>
4. Kodani M., Kamili N.A., Tejada-Strop A., Poe A., Denniston M.M., Drobeniuc J., et al. Variability in the performance characteristics of IgG anti-HEV assays and its impact on reliability of seroprevalence rates of hepatitis E. *J. Med. Virol.* 2017; 89(6): 1055-61. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.24741>
5. Hartl J., Otto B., Madden R.G., Webb G., Woolson K.L., Kriston L., et al. Hepatitis E seroprevalence in Europe: a meta-analysis. *Viruses.* 2016; 8(8): 211. DOI: <http://doi.org/10.3390/v8080211>
6. Mikrogen. recomLine HEV IgG/IgM. Available at: <https://mikrogen.de/english/deutschland/products/product-overview/testsystem/hev-iggigm.html>
7. Ma H., Song X., Li Z., Harrison T.J., Zhang H., Huang W., et al. 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): 1052-61. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.21484>
8. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Амиантова И.И., Доценко В.В. и др. Рекомбинантный белок, содержащий антигенно-значимые фрагменты белков вируса гепатита Е, используемый в тест-системах для серодиагностики гепатита Е (варианты). Патент РФ № 2711907С2; 2020.
9. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И. и др. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита Е 1-го генотипа с применением метода оптимизации кодонов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2017; 94(6): 63-72. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-6-63-72>
10. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И. и др. Получение рекомбинантного аналога капсидного белка вируса гепатита Е первого генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2017; 94(6): 72-80. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-6-72-80>
11. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Милованова А.В., Амму Ю.И. и др. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита Е 3 генотипа и оценка его антигенных свойств. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2018; 95(5): 46-53. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-46-53>
12. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Доценко В.В., Амиантова И.И. и др. Разработка рекомбинантного белка капсида вируса гепатита е третьего генотипа: клонирование, экспрессия, очистка, оценка антигенных свойств. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунологии.* 2019; 96(1): 10-7. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-10-17>
13. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Штамм бактерий *Escherichia coli*, используемый для получения рекомбинантных белков. Патент РФ № 2043409; 1992.

14. Алаторцев В.Е., Алаторцева Г.И. Вектор pEL5a, предназначенный для экспрессии чужеродной ДНК. Патент РФ № 2071501; 1992.
15. Ulanova T.I., Obriadina A.P., Talekar G., Burkov A.N., Fields H.A., Khudyakov Y.E. A new artificial antigen of the hepatitis E virus. *J. Immunoassay Immunochem.* 2009; 30(1): 18-39. DOI: <http://doi.org/10.1080/15321810802570269>
16. Avellon A., Morago L., Garcia-Galera del Carmen M., Munoz M., Echevarria J.M. Comparative sensitivity of commercial tests for hepatitis E genotype 3 virus antibody detection. *J. Med. Virol.* 2015; 87(11): 1934-9. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.24251>
17. Al-Sadeq Duaa W., Majdalawieh A.F., Mesleh A.G., Abdalla O.M., Nasrallah G.K. Laboratory challenges in the diagnosis of hepatitis E virus. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(4): 466-80. DOI: <http://doi.org/10.1099/jmm.0.000706>

REFERENCES

1. Favorov M.O., Fields H.A., Purdy M.A., Yashina T.L., Aleksandrov A.G., Alter M.J., et al. Serologic identification of hepatitis E virus infections in epidemic and endemic settings. *J. Med. Virol.* 1992; 36(4): 246-50. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.1890360403>
2. Khudyakov Y.E., Kamili S. Serological diagnostics of hepatitis E virus infection. *Virus Res.* 2011; 161(1): 84-92. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.virusres.2011.06.006>
3. EASL Clinical Practice Guidelines on hepatitis E virus infection. *J. Hepathol.* 2018; 68(6): 1256-71. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.03.005>
4. Kodani M., Kamili N.A., Tejada-Strop A., Poe A., Denniston M.M., Drobeniuc J., et al. Variability in the performance characteristics of IgG anti-HEV assays and its impact on reliability of seroprevalence rates of hepatitis E. *J. Med. Virol.* 2017; 89(6): 1055-61. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.24741>
5. Hartl J., Otto B., Madden R.G., Webb G., Woolson K.L., Kriston L., et al. Hepatitis E seroprevalence in Europe: a meta-analysis. *Virus-es.* 2016; 8(8): 211. DOI: <http://doi.org/10.3390/v8080211>
6. Mikrogen. recomLine HEV IgG/IgM. Available at: <https://mikrogen.de/english/deutschland/products/product-overview/testsystem/hev-iggigm.html>
7. Ma H., Song X., Li Z., Harrison T.J., Zhang H., Huang W., et al. 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): 1052-61. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.21484>
8. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Likhverchik L.N., Amiantova I.I., Dotsenko V.V., et al. Recombinant protein contain-

- ing antigenically significant fragments of hepatitis E virus proteins, used in test kits for serodiagnosis of hepatitis E (options). Patent RF № 2711907C2; 2020. (in Russian)
9. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Likhverchik L.N., Dotsenko V.V., Amiantova I.I., et al. Design of hepatitis E virus genotype 1 recombinant ORF3 protein by codon optimization method. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2017; 94(6): 63-72. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-6-63-72> (in Russian)
10. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Likhverchik L.N., Dotsenko V.V., Amiantova I.I., et al. Design of hepatitis E virus genotype 1 recombinant capsid protein: cloning, expression, purification, evaluation of the antigenic properties. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2017; 94(6): 72-80. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2017-6-72-80> (in Russian)
11. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Likhverchik L.N., Milovanova A.V., Ammur Yu.I., et al. Obtaining the recombinant ORF3 protein of hepatitis E genotype 3 and evaluation of its antigenic properties. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2018; 95(5): 46-53. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-46-53> (in Russian)
12. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., Likhverchik L.N., Dotsenko V.V., Amiantova I.I., et al. Development of hepatitis E 3 genotype recombinant protein capsid of: cloning, expression, purification, evaluation of the antigenic properties. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii.* 2019; 96(1): 10-7. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-10-17> (in Russian)
13. Alatorsev V.E., Alatorseva G.I. Escherichia coli bacterial strain used to produce recombinant proteins. Patent RF № 2043409; 1992. (in Russian)
14. Alatorsev V.E., Alatorseva G.I. Vector pEL5a designed for the expression of foreign DNA. Patent RF № 2071501; 1992. (in Russian)
15. Ulanova T.I., Obriadina A.P., Talekar G., Burkov A.N., Fields H.A., Khudyakov Y.E. A new artificial antigen of the hepatitis E virus. *J. Immunoassay Immunochem.* 2009; 30(1): 18-39. DOI: <http://doi.org/10.1080/15321810802570269>
16. Avellon A., Morago L., Garcia-Galera del Carmen M., Munoz M., Echevarria J.M. Comparative sensitivity of commercial tests for hepatitis E genotype 3 virus antibody detection. *J. Med. Virol.* 2015; 87(11): 1934-9. DOI: <http://doi.org/10.1002/jmv.24251>
17. Al-Sadeq Duaa W., Majdalawieh A.F., Mesleh A.G., Abdalla O.M., Nasrallah G.K. Laboratory challenges in the diagnosis of hepatitis E virus. *J. Med. Microbiol.* 2018; 67(4): 466-80. DOI: <http://doi.org/10.1099/jmm.0.000706>