



<https://doi.org/10.34883/PI.2025.14.3.024>



Задора И.С.<sup>1,2</sup>✉, Жаворонок С.В.<sup>1</sup>, Алаторцева Г.И.<sup>3</sup>, Щербань А.И.<sup>2</sup>, Давыдов В.В.<sup>1</sup>,  
Лухверчик Л.Н.<sup>3</sup>, Нестеренко Л.Н.<sup>3</sup>, Анисько Л.А.<sup>1,4</sup>, Рогачева Т.А.<sup>1,4</sup>, Баюр Н.Г.<sup>1,4</sup>,  
Щука Н.В.<sup>2</sup>, Симицкий В.В.<sup>2</sup>, Зверев В.В.<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup> Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

<sup>2</sup> Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии  
Национальной академии наук Беларуси, Минск, Беларусь

<sup>3</sup> Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова,  
Москва, Россия

<sup>4</sup> Городская клиническая инфекционная больница, Минск, Беларусь

<sup>5</sup> Первый Московский государственный медицинский университет  
имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет), Москва, Россия

## Разработка иммуноферментной тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ IgG» для определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита E в сыворотке крови людей

**Конфликт интересов:** не заявлен.

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

**Финансирование:** данная научно-исследовательская работа была выполнена в рамках финансируемого мероприятия 13 «Разработать технологию промышленного изготовления тест-систем для выявления антител IgG- и IgM-классов к вирусу гепатита E у человека и животных с использованием иммуноферментного метода анализа и организовать их производство» подпрограммы 5 «Химические продукты и молекулярные технологии» ГП «Наукоёмкие технологии и техника» на 2021–2025 годы, № государственной регистрации 20213143.

**Благодарности:** авторы благодарят главного врача Юровского Н.Н. и коллектив клинико-диагностической лаборатории Городской клинической инфекционной больницы за помощь в организации и проведении исследований (Долбуз О.Н., Метлицкая Е.А., Малиновская Н.В.).

Подана: 13.03.2025

Принята: 16.07.2025

Контакты: zadora-ilona@mail.ru

### Резюме

**Цель.** Разработать иммуноферментную тест-систему для полуколичественного определения иммуноглобулинов класса G к вирусу гепатита E (ВГЕ) в сыворотке крови людей «ИФА-анти-ВГЕ IgG» с высокой чувствительностью и специфичностью.

**Материалы и методы.** База для данной научной работы – УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска. Качественное определение анти-ВГЕ IgG в пробах сывороток крови людей осуществляли методом непрямого иммуноферментного анализа с применением референсных наборов: «ИФА-анти-HEV IgG» (НПО «Диагностические системы», РФ), «Вектоген E IgG» («Вектор-Бест», Новосибирск). При конструировании тест-системы для качественного выявления анти-ВГЕ IgG использовались разборные 96-луночные полистироловые планшеты («Хема», РФ); рекомбинантные антигены – аналоги белка ORF2 145,1 кДа, участок с 404 по 660 а. о. и ORF3

128,4 кДа ВГЕ 3-го генотипа (НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, РФ); конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к IgG человека («Биосервис», «Хема», РФ); постпокрывающий раствор (ХОП ИБОХ НАН Беларуси); раствор для разведения сывороток и раствор для разведения конъюгата (ХОП ИБОХ НАН Беларуси).

**Результаты.** Определены оптимальные концентрации для сорбции белков ORF2 и ORF3, составляющие 2,5 мг/л и 0,25 мг/л, время инкубации с ТМБ – 15 минут. Установлены высокие показатели аналитической надежности разработанной тест-системы. Диагностическая чувствительность реализуемого с использованием тест-системы теста определения антител к вирусу гепатита E составила 100%, а диагностическая специфичность – 87,5% (при пороговом значении 0,2 мг/л). Показатель внутрисерийной воспроизводимости составил 94,9%, межсерийной – 91,2%.

**Заключение.** Доказано доминирующее значение рекомбинантного полипептида ORF2 по сравнению с полипептидом ORF3 при создании тест-системы для детекции антител класса G, что объясняется расположением основных иммуногенных эпитопов в структурном ORF2, к которым вырабатываются антитела. Впервые в Республике Беларусь зарегистрирована и выпускается тест-система «ИФА-анти-ВГЕ IgG человека» для определения анамнестических антител класса G к вирусу гепатита E в сыворотке крови людей методом иммуноферментного анализа, ТУ ВУ 100185093.094-2023.

**Ключевые слова:** вирус гепатита E, иммуноферментный анализ, иммуноглобулины класса G, анти-ВГЕ IgG

---



Zadora I.<sup>1,2</sup>✉, Zhavoronok S.<sup>1</sup>, Alatorseva G.<sup>3</sup>, Shcherban A.<sup>2</sup>, Davydov V.<sup>1</sup>, Lukhverchik L.<sup>3</sup>, Nesterenko L.<sup>3</sup>, Anisko L.<sup>1,4</sup>, Rogacheva T.<sup>1,4</sup>, Baur N.<sup>1,4</sup>, Shchuka N.<sup>2</sup>, Simirsky V.<sup>2</sup>, Zverev V.<sup>3,5</sup>

<sup>1</sup> Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

<sup>2</sup> Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry of the National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

<sup>3</sup> I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute, Moscow, Russia

<sup>4</sup> City Clinical Infectious Diseases Hospital, Minsk, Belarus

<sup>5</sup> I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenov University), Moscow, Russia

## Developing an Immunoenzymatic Test System "ELISA-anti- HEV IgG" to Determine Class G Immunoglobulins against Hepatitis E Virus in Human Blood Serum

**Conflict of interest:** nothing to declare.

**Authors' contribution:** Zhavoronok S., Davydov V., Alatorseva G., Lukhverchik L., Nesterenko L., Zverev V., Simirsky V. – significant contribution in the study concept and design; Anisko L., Rogacheva T., Baur N., Zadora I. – preparation, collection of material, study design, recent and final editing; Zadora I. – design, data collection, results summarizing, editing; Alatorseva G., Lukhverchik L., Nesterenko L., Shcherban A., Shchuka N., Zhavoronok S., Davydov V. – final approval of the version for publication.

**Funding:** this research work was carried out as a part of funded activity No. 13, "To develop a technology for industrial manufacturing of test systems for detecting IgG and IgM antibodies against hepatitis E virus in humans and animals using the enzyme-linked immunosorbent assay method, and to launch their production", in the frame of the subprogram No. 5 "Chemical products and molecular technologies" of the State Program "High-end technologies and machinery" for 2021–2025, State Registration No. 20213143.

**Acknowledgements:** the authors express their gratitude to the Head of the Clinical Diagnostic Laboratory of Minsk City Clinical Infectious Diseases Hospital, N. Yurovsky and the staff of the laboratory (O. Dolbuz, E. Metlitskaya, and N. Malinovskaya) for their assistance in research setup and conducting.

Submitted: 13.03.2025

Accepted: 16.07.2025

Contacts: zadora-ilona@mail.ru

### Abstract

**Purpose.** To develop an immunoenzymatic test system for semi-quantitative assay of class G immunoglobulins against hepatitis E virus (HEV) in human blood serum, "ELISA-anti-HEV IgG", with high sensitivity and specificity.

**Materials and methods.** The research work was conducted in the facilities of Minsk City Clinical Infectious Diseases Hospital. The qualitative determination of anti-HEV IgG in human blood serum samples was carried out by indirect enzyme immunoassay using the reference kits ELISA-anti-HEV IgG (NPO Diagnostic Systems, Russian Federation), and Vectohep E-IgG (Vector-Best, Novosibirsk). To design a national test system for anti-HCG IgG qualitative detection, collapsible 96-well polystyrene plates were used (Hema, Russian Federation; recombinant antigens – analogues of the protein ORF2 145.1 kDa, site 404 to 660 a. o. and ORF3 128.4 kDa HCG of the 3rd genotype (Mechnikov Research Institute for Vaccines and Sera, Russian Federation); human IgG antibodies conjugated with horseradish peroxidase (Bioservice, Khema, Russian Federation); post-closing solution (Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus); and serum dilution solution and conjugate dilution solution (Pilot Production

of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus).

**Results.** The optimal concentrations for ORF2 and ORF3 proteins sorption were determined as 2.5 mg/l and 0.25 mg/l, respectively, with TMB incubation time of 15 minutes. High analytical reliability indicators of the test system designed were obtained. The diagnostic sensitivity of the test system used to detect antibodies against hepatitis E virus was 100%, and the diagnostic specificity was 87.5% (with threshold value of 0.2 mg/l). The intra-assay reproducibility index was 94.9%, and the inter-assay reproducibility index was 91.2%.

**Conclusion.** The prevailing significance of the recombinant ORF2 protein compared to the ORF3 protein was proved when creating a test system for detecting class G antibodies, which could be explained by the physiology of the virus, since ORF2 is a capsid protein containing the main immunogenic epitopes against which the antibodies are produced. For the first time in the Republic of Belarus, an ELISA-anti-HEV IgG test system is registered and produced to determine class G anamnestic antibodies against hepatitis E virus in human blood serum by enzyme immunoassay, technical specifications No TU BY 100185093.094–2023.

**Keywords:** hepatitis E virus, enzyme immunoassay, immunoglobulins class G

## ■ ВВЕДЕНИЕ

Впервые вирус гепатита E (ВГЕ) был описан в 1983 г. группой ученых во главе с М.С. Балаяном как частица без оболочки размером от 27 до 30 нм с икосаэдрическим типом симметрии, визуализированная в образцах кала человека с помощью электронной микроскопии. Вирус гепатита E человека является представителем рода *Paslahepevirus*, вид *Paslahepevirus balayani* [2]. Современная классификация ВГЕ представлена в табл. 1.

Геном вируса представлен одноцепочечной положительной РНК и тремя ORF (open reading frames), при этом неструктурные белки кодируются ближе к 5'-концу генома, а структурные – к 3'-концу. Вирioны ВГЕ существуют в инфицированном хозяине в 2 формах: без оболочки, секретируемые с фекалиями, и квазиоболочечные частицы, секретируемые в кровь и устойчивые к нейтрализации антителами [3–5]. Всего выделяют 1 серотип и 8 генотипов вируса [6, 7].

**Таблица 1**  
**Современная классификация ВГЕ**  
**Table 1**  
**Modern classification of HEV**

Realm	Надцарство	Riboviria
Kingdom	Царство	Orthornavirae
Phylum	Тип	Kitrinoviricota
Class	Класс	Alsuviricetes
Order	Порядок	Hepelivirales
Family	Семейство	Hepeviridae
Subfamily	Подсемейство	Orthohepevirinae
Genus	Род	Paslahepevirus
Species	Вид	Paslahepevirus balayani



ORF1 является самым крупным в геноме ВГЕ, кодирует неструктурный белок [8, 9]. Внутри ORF1 находится гипервариабельная область, которая демонстрирует высокую степень разнообразия между всеми зарегистрированными последовательностями ВГЕ [9, 10].

Наиболее иммуногенный эпитоп находится в ORF2, кодирующем капсидный белок вириона [11, 12]. Он играет ведущую роль в выживании инфицированных клеток-хозяев, регулирует репликацию и амплификацию вируса [13].

ORF3-последовательность также кодирует полипротеин, имеет несколько реактивных эпитопов, способствующих иммунному ответу организма. Обладает возможностью потенциально продлевать внутриклеточный сигнал [14], способствует выживанию клеток-хозяев и пролиферации ВГЕ. ORF3 участвует в регуляции углеводного обмена и функции митохондрий [15, 16]. Особенно важно участие этого белка в процессах коагуляции и гемостаза [17–20], так как у пациенток с ВГЕ-инфекцией отмечаются клинические симптомы нарушения свертывания крови и геморрагического аборта в конце триместра беременности [21].

При фекально-оральном механизме передачи вирус *Paslahevirus balayani* попадает в желудочно-кишечный тракт и реплицируется в эпителии кишечника. Затем вирус переходит в кровотоки и достигает печени [22], адсорбция происходит за счет связывания с рецепторами гепарансульфатпротеогликанами [23]. После депротеинизации вирусная репликаза RdRp синтезирует комплементарную РНК-матрицу для репликации ВГЕ и транскрипции субгеномной РНК, которая отвечает за трансляцию белков ORF2 и ORF3. Секретируемая форма ORF2 подвергается посттрансляционным модификациям и действует как иммунная ловушка, тогда как ассоциированная с капсидом форма ORF2 самособирается в вирусоподобные частицы и упаковывает геномную РНК в потомство вирионов гепатита Е [24]. Мультивезикулярные тельца сливаются с плазматической мембраной, вирионы высвобождаются из клеток печени либо в кровотоки, обернутые липидной мембраной, либо в желчные протоки, где квазиоболочка разрушается солями желчных кислот [25].

В большинстве случаев в странах Европы возбудитель гепатита Е – 3-й генотип вируса: установлена циркуляция 3с, 3i, 3f, 3g и 3ra субгенотипов возбудителя заболевания. Главным отличием эпидемического процесса, обусловленного данным возбудителем, является его зоонозный характер. Основным резервуаром возбудителя и источником заражения человека в данном случае – домашние и дикие свиньи, а главный путь заражения – пищевой. Для Республики Беларусь присущ спорадический характер заболеваемости гепатитом Е, обусловленный употреблением в пищу продуктов питания, содержащих печень, мясо домашних или диких свиней, не прошедших достаточную термическую обработку. В общей популяции жителей Беларуси установлена серопревалентность по анти-ВГЕ IgG-антителам 7,3% (95% ДИ 5,8–9,0), установлен факт нарастания иммунологической прослойки среди жителей Республики Беларусь с возрастом: в группе старше 64 лет серопозитивность достигает 11,4%, что достоверно выше показателя в группах менее 25 лет и 25–34 года ( $p < 0,05$ ) [26, 27].

Разработка и внедрение надежной системы лабораторной диагностики инфекции, вызванной возбудителем гепатита Е, является важной задачей, поскольку расширяет современные представления о распространенности ВГЕ-инфекции, позволяя обнаружить группы риска и потенциальные источники инфицирования.

## ■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработать иммуноферментную тест-систему для полуколичественного определения иммуноглобулинов класса G к ВГЕ в сыворотке крови людей «ИФА-анти-ВГЕ IgG» с высокой чувствительностью и специфичностью.

## ■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

База выполнения данной научной работы – УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска. Качественное определение анти-ВГЕ IgG в пробах сывороток крови людей осуществляли методом иммуноферментного анализа с применением референсных наборов: коммерческого диагностического набора «ИФА-анти-HEV IgG» (НПО «Диагностические системы», РФ), «Вектоген E IgG» («Вектор-Бест», Новосибирск, РФ) – согласно инструкции по применению к наборам реагентов.

Материалами для конструирования тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ IgG, Беларусь, УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси» для полуколичественного выявления анти-ВГЕ IgG служили плоскодонные разборные 96-луночные полистироловые планшеты Microplate breakable, кат. № N001, Lot.: D8-58-05 производства фирмы «Хема» (РФ) с высокой сорбционной активностью; рекомбинантные антигены – аналоги белка ORF2 145,1 кДа, участок с 404 по 660 а. о. [29] и ORF3 128,4 кДа – полноразмерный белковый продукт ORF3, C-концевой фрагмент [30] ВГЕ 3-го генотипа (НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, РФ); конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к IgG человека («Биосервис», «Хема», РФ); фосфатно-солевой буферный раствор (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»); соли для карбонатно-бикарбонатного буферного раствора ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{NaHCO}_3$ ); постпокрывающий раствор, включающий инертный белок, дисахарид, ингибитор протеиназ и бактериостатик (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»); раствор для разведения сывороток и раствор для разведения конъюгата (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»); субстратный раствор с тетраметилбензидином (ТМБ); 5% раствор серной кислоты ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ); термостат; универсальный фотометр «Витязь» Ф300, спектрофотометр Microplate Photometer MPP-96 BioSan.

Иммуноферментный анализ проводился по непрямому твердофазному варианту, при котором сорбированная смесь рекомбинантных антигенов к ВГЕ взаимодействует с антителами класса G в сыворотке крови людей, формируя комплекс антиген – антитело. Исследуемые сыворотки разводились в отношении 1:10. Субстратная смесь, содержащая 3,3',5,5'- тетраметилбензидин (ТМБ), готовилась непосредственно перед использованием в необходимом объеме. Для остановки реакции применялся раствор серной кислоты. Учет результатов осуществлялся спектрофотометрически при длине волны 450 нм и референс-светофильтре 620 нм на универсальном спектрофотометре «Витязь» Ф300 в течение 5 минут после внесения стоп-реагента.

Обработка полученных данных проводилась на персональной ЭВМ с использованием статистических пакетов Excel for Windows 10.0 и пакета статистического анализа данных Statistica for Windows 10.0 (StatSoft Inc., США). Количественные переменные представляли в виде медианы (Me), средних значений, верхнего и нижнего квартилей (p25% – p75%). Количественные данные проверяли на соответствие закону нормального распределения (критерий Колмогорова – Смирнова). При нормальном распределении признака использовали методы параметрической статистики. Если гипотезу о нормальности распределения признака в совокупности отвергали при малом объеме выборки ( $n < 30$ ), для обработки данных применяли методы



непараметрической статистики – U-критерий Манна – Уитни для 2 независимых групп, а при большем количестве анализируемых групп – критерий Краскела – Уоллиса. Данные в этом случае представлялись через медианный показатель с расчетом верхнего и нижнего квартилей (25%–75%). Результаты исследования считали достоверными, если различия между показателями, значимыми при вероятности безошибочного прогноза, составляли не менее 95% ( $p < 0,05$ ). Для определения эффективности лабораторной диагностики ВГЕ методом непрямого иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов «ИФА-анти-ВГЕ IgG» в сравнении с таковой, реализуемой коммерческим зарубежным «ИФА-анти-HEV IgG» (НПО «Диагностические системы», РФ), был проведен ROC-анализ.

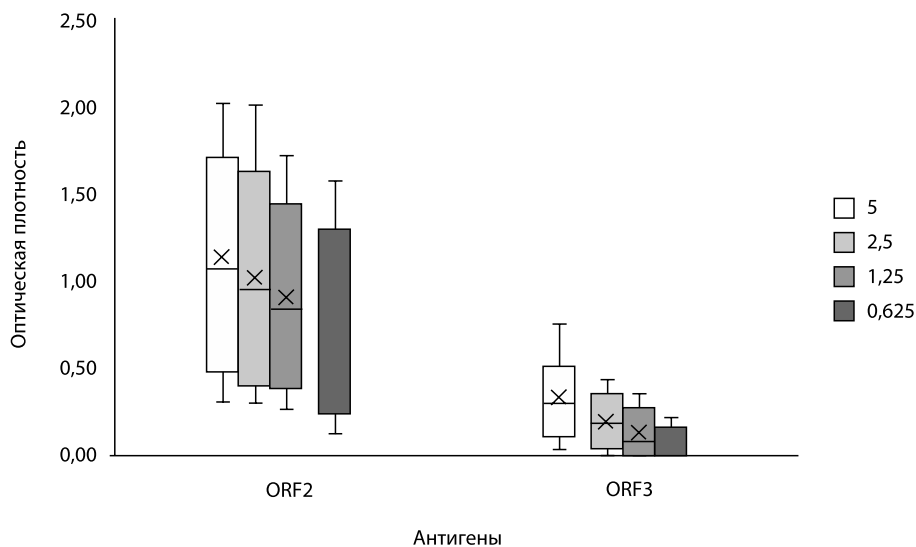
## ■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Основными этапами конструирования национальной иммуноферментной тест-системы для полуколичественного определения анти-ВГЕ IgG у людей являлись: подбор оптимальных концентраций сорбции рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3 и получение сенсibilизированного планшета; подбор рабочего разведения конъюгата; подбор оптимального времени инкубации с ТМБ; определение основных валидационных характеристик прототипа разработанной тест-системы; проведение лабораторных испытаний на положительных и отрицательных контрольных выборках сывороток.

Для создания иммуносорбента использовались рекомбинантные полипептиды ORF2 (145,1 кДа, участок с 404 по 660 а. о.) и ORF3 (128,4 кДа) вируса гепатита E 3-го генотипа, разработанные и предоставленные НИИ вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова (РФ). Рекомбинантный белок ORF2 имел следующую последовательность аминокислот: NGEPTVKLYTSVGNAAQQDKGIAIPHDIDLGDSRVVIQDYDNQHEQDRPTSPAPSRPF SVLRANDVLWLSLTAAYDQTTYGSSSTNPMYVSDTVTFVNVATGAQAVARSLDWSKVTL DGRPLT TIQQYSKTFYVPLRGRKLSFWEAGTTKAGYPYNYNTTASDQILINAAGHRVAISTYTTVGS LGAGP VSVSAVLAPHSAALAVLEDTIDYPARAHTFDDFCPECRNLGLQGCAFQSTVAELQRLKMKV GKTRES, а рекомбинантный белок ORF3 – MGSPCALGLFCCSSCFCLCCPRHRPASRLAAVVGAAAV PAVVSGVTGLILSPSPIFIQPTPLPPTSFHNPGLELALDSRPAPSAPLGLTSPSAPPLPPVV [28, 29].

Схема приготовления иммуносорбента для «ИФА-анти-ВГЕ IgG» включает следующие этапы: адсорбция рекомбинантных белков ORF2 и ORF3 в подобранных концентрациях в карбонатно-бикарбонатном буфере (КББ) в объеме 110 мкл/лунка на полистирольных планшетах производства фирмы «Хема» (РФ), инкубация в течение 16–18 ч при температуре +2 ... +8 °С, промывки и стабилизация обработкой постпокрывающим раствором в объеме 160 мкл/лунка в течение 16–18 ч при температуре +2 ... +8 °С.

Планшеты сенсibilизировали в разные дни, непрямой вариант ИФА проводили несколько раз. Рекомбинантные полипептиды ORF2 и ORF3 наносились по отдельности и вместе, образцы сывороток крови людей в процессе постановки анализа разводили 1:10, из них положительные контрольные образцы содержали необходимые анти-ВГЕ IgG-антитела в высоком, среднем и низком титре. Обращали на себя внимание более низкие показатели оптической плотности образцов при использовании только антигена ORF3 3-го генотипа. Группы рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3 также были проанализированы между собой в зависимости от наносимых концентраций при исследовании на одинаковых пробах сыворотки крови людей (рис. 1).



**Рис. 1. Значения показателей оптической плотности контрольных положительных образцов при сепарированном использовании ORF2 и ORF3**

**Fig. 1. Optical densities of control positive samples using separated ORF2 and ORF3**

Для подтверждения различного диагностического вклада при использовании рекомбинантных белков ORF2 и ORF3 был произведен статистический анализ по U-критерию Манна – Уитни. Определены достоверные различия показателей оптических плотностей положительных сывороток при всех сорбируемых концентрациях рекомбинантных полипептидов: 5 мг/л ( $U=28,0$ ,  $p=0,000177$ ), 2,5 мг/л ( $U=9,0$ ,  $p=0,000008$ ), 1,25 мг/л ( $U=6,0$ ,  $p=0,000005$ ), 0,625 мг/л ( $U=12,0$ ,  $p=0,000015$ ).

Для установления точного значения концентрации наносимых антигенов на планшеты (для создания иммуносорбента) белки наносились также вместе для оценки возможного потенцирующего эффекта (табл. 2).

**Таблица 2**

**Медианные значения оптических плотностей сывороток крови людей в зависимости от концентрации сорбируемых антигенов ORF2 и ORF3 при совместном нанесении**

**Table 2**

**Median OD values of human blood serum depending on the concentration of together sorbed antigens ORF2 and ORF3**

Образцы сывороток крови людей	Исследуемые совместные концентрации рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3, мг/л			
	5+5	2,5+2,5	1,25+1,25	0,625+0,625
1 КО+	1,905	1,828	1,490	1,121
2 КО+	0,928	0,889	0,864	0,588
3 КО+	0,320	0,301	0,333	0,278
4 КО+	1,063	1,152	1,095	0,845
5 КО-	0,015	0,018	0,012	0,017
6 КО-	0,018	0,017	0,012	0,009



Установлены достоверные различия значений оптических плотностей положительных и отрицательных образцов ( $p < 0,001$ ) при совместном использовании рекомбинантных полипептидов. Однако при сравнении данных с показателями оптических плотностей сывороток при использовании только антигена ORF2 статистически значимых различий выявлено не было ( $U=1993,0$ ,  $p=0,795077$ ), что подтверждает гипотезу о доминирующем влиянии структурного белка ORF2. Далее изучались комбинации иммуносорбента, в которых антиген ORF2 наносился в существенно большей концентрации (табл. 3).

Значения оптической плотности положительных и отрицательных образцов достоверно различались при всех исследуемых концентрациях ( $p < 0,001$ ) при совместном использовании рекомбинантных полипептидов. Для оценки статистически значимых различий между исследуемыми концентрациями смеси антигенов ORF2 и ORF3 (2,5 и 1; 2,5 и 0,5; 2,5 и 0,25 мг/л), а также 1,5 мг/л белка ORF2 использовался критерий Краскела – Уоллиса ( $H=13,41490$ ,  $p=0,0038$ ). Установлены статистически значимые различия в парах концентраций 2,5+1 и 1,5 мг/л ( $z=3,2470956$ ,  $p=0,006995$ ), 2,5+0,5 и 1,5 мг/л ( $z=2,867318$ ,  $p=0,024838$ ), а также в паре 2,5+0,25 и 1,5 мг/л ( $z=2,772374$ ,  $p=0,033389$ ). Таким образом, впервые установлено, что минимальное разведение 2,5 мг/л ORF2 и 0,25 мг/л ORF3 является оптимальным для создания иммуносорбента для определения антител класса G к вирусу гепатита E.

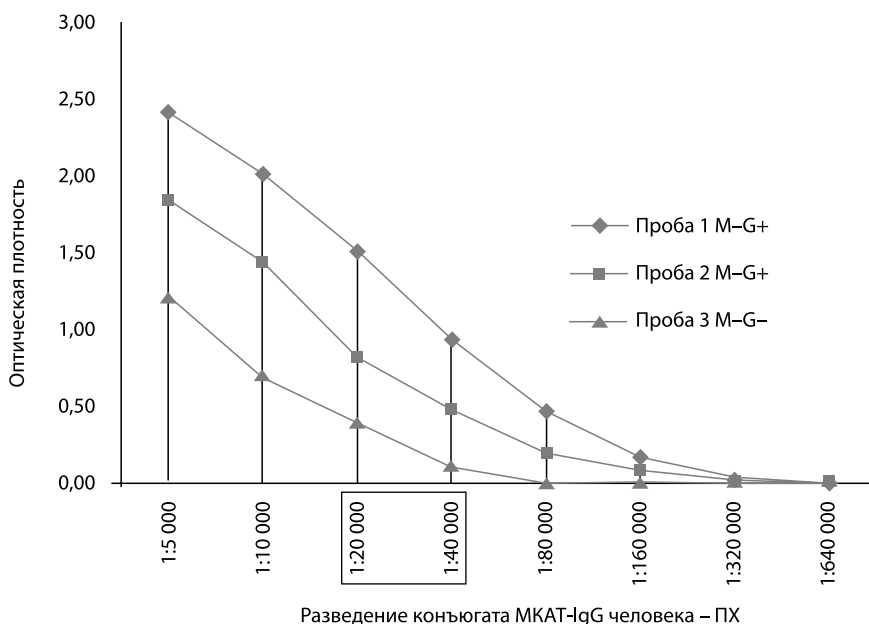
Для определения ориентировочного диапазона разведения иммунопероксидазного конъюгата МКАТ-IgG человека – ПХ («Хема», РФ) использовался раствор для разведения конъюгата, приготовленный на основании аналитического буферного раствора и стабилизирующего раствора с применением NaCl, Tween-20 и БСА. МКАТ-IgG человека – ПХ разводили в значениях от 1:5 000 до 1:640 000 и ставили в нескольких повторах с использованием положительных и отрицательной сывороток (рис. 2). Критерием выбора диапазона конъюгата является способность связывать максимальное количество иммуноглобулинов класса G при минимальном неспецифическом связывании.

В результате анализа оптических плотностей сывороток крови людей установлен оптимальный диапазон разведения 1:40 000 – 1:80 000. Поскольку приоритетом для создания тест-систем является максимальный показатель оптической плотности

**Таблица 3**  
**Медианные значения оптических плотностей сывороток крови людей в зависимости от концентрации сорбируемых антигенов ORF2 и ORF3 при совместном нанесении**

**Table 3**  
**Median OD values of human blood serum depending on the concentration of together sorbed antigens ORF2 and ORF3**

Образцы сывороток крови людей	Исследуемые совместные концентрации рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3, мг/л			
	2,5+1	2,5+0,5	2,5+0,25	1,5 ORF2
1 КО+	1,798	1,802	1,784	1,128
2 КО+	0,881	0,856	0,833	0,341
3 КО+	0,499	0,450	0,445	0,162
4 КО+	1,262	1,217	1,228	0,711
5 КО–	0,004	0,007	0,001	0,004
6 КО–	0,007	0,010	0,002	0,005



**Рис. 2. Результаты титрования конъюгата к IgG человека на положительных и отрицательном образцах сывороток крови людей**

**Fig. 2. Results of anti-human IgG conjugate titration on positive and negative human blood serum samples**

положительных образцов при минимальном значении оптической плотности отрицательных проб конечный титр был установлен 1:60 000.

Для определения оптимального времени инкубации с ТМБ использовались позитивная и негативная по анти-ВГЕ IgG сыворотки крови людей при разном времени инкубации с раствором (табл. 4). Другие параметры тест-системы не изменялись.

Время инкубации исследуемых образцов с тетраметилбензидином составляло 5, 10, 15, 20 и 25 минут соответственно. При анализе результатов исследования выявлено, что коэффициент позитивности достигал максимального значения при инкубации в течение 15 минут. Таким образом, установлено рекомендуемое время инкубации с ТМБ – 15 минут.

**Таблица 4**

**Значения коэффициента позитивности в зависимости от времени инкубации с ТМБ**

**Table 4**

**CP values depending on the time of incubation with TMB**

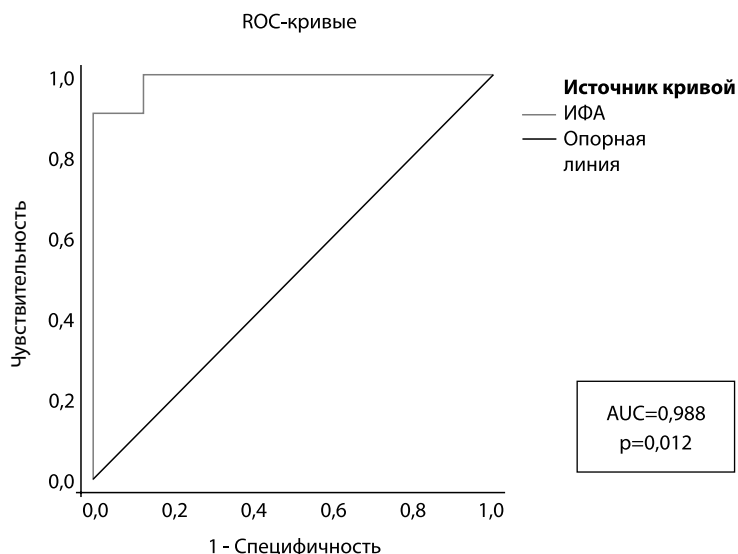
Время инкубации (мин.)	Медианное значение оптической плотности КО+ (25%–75%)	Медианное значение оптической плотности КО– (25%–75%)	Коэффициент позитивности
5	0,129 (0,120–0,136)	0,005 (0,003–0,007)	28,556
10	0,397 (0,380–0,411)	0,007 (0,005–0,009)	61,000
15	0,692 (0,680–0,707)	0,006 (0,004–0,008)	125,727
20	0,919 (0,904–0,937)	0,044 (0,040–0,047)	21,126
25	1,080 (1,044–1,109)	0,052 (0,050–0,055)	20,769



Воспроизводимость метода определяли посредством тестирования 5 образцов сывороток крови людей в 8 параллельных повторах для каждого образца в пределах одного планшета (внутрисерийная воспроизводимость) с повторением анализа в 4 независимых экспериментах (межсерийная воспроизводимость). Среднее значение показателя коэффициента вариации составило 5,1%, а сам показатель внутрисерийной воспроизводимости составил 94,9%. Для оценки межсерийной воспроизводимости учитывались показатели оптической плотности всех образцов. Показатель коэффициента вариации при оценке всех 4 планшетов составил 8,8%, а межсерийная воспроизводимость была на уровне 91,2%.

Для определения эффективности лабораторной диагностики ВГЕ методом прямого иммуноферментного анализа с использованием разработанного набора реагентов «ИФА-анти-ВГЕ IgG» в сравнении с коммерческим российским «ИФА-анти-HEV IgG» (НПО «Диагностические системы», РФ) был проведен ROC-анализ (рис. 3). Референсная тест-система, относительно которой определялась чувствительность и специфичность разработанной тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ IgG», применялась для детекции иммуноглобулинов класса G на 37 позитивных и негативных сыворотках крови людей, входящих в контрольную панель. Ложноположительных и ложноотрицательных результатов не зафиксировано, соответственно, чувствительность и специфичность для российской тест-системы (системы сравнения) составляют 100%.

В соответствии с ROC-анализом данной модели площадь под кривой (AUC) составила 0,988 (95% ДИ 0,964–1,012,  $p=0,012$ ), что соответствует отличному качеству прогностической модели. Поскольку большинство современных иммуноферментных тест-систем предлагают устанавливать точку cut-off на уровне 0,2, для этого порога были рассчитаны аналитические показатели качества: точность теста – 94,6%, диагностическая специфичность – 87,5%, диагностическая чувствительность – 100%.



**Рис. 3. ROC-кривая для оценки разработанной тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ IgG»**  
**Fig. 3. ROC curve for evaluation of the created test system "ELISA-anti-HEV IgG"**

что обеспечивает оптимальное соотношение аналитических характеристик надежности разработанной тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ IgG» при более высоком показателе точности исследования.

Для регистрации разработанной тест-системы были созданы технические условия ТУ ВУ 100185093.094-2023, Министерством здравоохранения Республики Беларусь утверждена Инструкция по применению набора реагентов для определения антител класса IgG к вирусу гепатита E в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа «ИФА-анти-ВГЕ IgG человека».

## ■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доказано доминирующее влияние рекомбинантного полипептида ORF2 по сравнению с таковым полипептида ORF3 в ходе создания тест-системы для детекции антител класса G, объясняемое тем, что ORF2 – это капсидный белок, в котором располагаются основные иммуногенные эпитопы. Определены показатели оптимальной концентрации для сорбции белков ORF2 и ORF3, составляющие 2,5 мг/л и 0,25 мг/л, рекомендуемое время инкубации с ТМБ – 15 минут. Установлены высокие показатели аналитической надежности разработанной тест-системы. Диагностическая чувствительность реализуемого с использованием тест-системы теста определения антител к вирусу гепатита E составила 100%, диагностическая специфичность – 87,5% (при точке отсечки 0,2 мг/л). Показатель внутрисерийной воспроизводимости составил 94,9%, межсерийной воспроизводимости – 91,2%. Впервые в Республике Беларусь зарегистрированы технические условия ТУ ВУ 100185093.094-2023, утверждена Инструкция по применению набора реагентов для определения антител класса IgG к вирусу гепатита E в сыворотке крови человека методом иммуноферментного анализа «ИФА-анти-ВГЕ IgG человека».

---

## ■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Balayan M.S., Andjaparidze A.G., et al. Evidence for a virus in non-A, non-B hepatitis transmitted via the fecal-oral route. *Intervirology*. 1983;20(1):23–31. DOI: 10.1159/000149370
2. ICTV Report Chapters. Family: Hepeviridae. Available at: <https://ictv.global/report/chapter/hepeviridae/hepeviridae> (accessed 06 July 2023).
3. Takahashi M., Yamada K., Hoshino Y., et al. Monoclonal antibodies raised against the ORF3 protein of hepatitis E virus (HEV) can capture HEV particles in culture supernatant and serum but not those in feces. *Arch Virol*. 2008;153(9):1703–1713. DOI: 10.1007/s00705-008-0179-6
4. Nagashima S., et al. Characterization of the quasi-enveloped hepatitis E virus particles released by the cellular exosomal pathway. *Journal of virology*. 2017;91(22):10. DOI: 10.1128/JVI.00822-17
5. Chapuy-Regaud S., Dubois M., Plisson-Chastang C., et al. Characterization of the lipid envelope of exosome encapsulated HEV particles protected from the immune response. *Biochimie*. 2017;141:70–797. DOI: 10.1016/j.biochi.2017.05.003
6. Sun P., Lin S., He S., et al. Avian Hepatitis E Virus: With the Trend of Genotypes and Host Expansion. *Front Microbiol*. 2019 Jul 24;10:1696. DOI: 10.3389/fmicb.2019.01696
7. Smith D.B., Izopet J., Nicot F., et al. Update: proposed reference sequences for subtypes of hepatitis E virus (species Orthohepevirus A). *J Gen Virol*. 2020 Jul;101(7):692–698. DOI: 10.1099/jgv.0.001435
8. Koonin E.V. The phylogeny of RNA-dependent RNA polymerases of positive-strand RNA viruses. *J Gen Virol*. 1991;72(Pt 9):2197–2206. DOI: 10.1099/0022-1317-72-9-2197
9. Koonin E.V., Gorbalenya A.E., Purdy M.A., et al. Computer-assisted assignment of functional domains in the nonstructural polyprotein of hepatitis E virus: delineation of an additional group of positive-strand RNA plant and animal viruses. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992;89(17):8259–8263. DOI: 10.1073/pnas.89.17.8259
10. Kenney S.P., Xiang-Jin M. The lysine residues within the human ribosomal protein S17 sequence naturally inserted into the viral nonstructural protein of a unique strain of hepatitis E virus are important for enhanced virus replication. *J Virol*. 2015;89:3793. DOI: 10.1128/JVI.03582-14
11. Ankavay M., Montpellier C., Sayed I.M., et al. New insights into the ORF2 capsid protein, a key player of the hepatitis E virus lifecycle. *Sci Rep*. 2019;9(1):6243. DOI: 10.1038/s41598-019-42737-2
12. Montpellier C., Wychowski C., Sayed I.M., et al. Hepatitis E virus lifecycle and identification of 3 forms of the ORF2 capsid protein. *Gastroenterology*. 2018;154(1):211–223. e218. DOI: 10.1053/j.gastro.2017.09.020
13. Surjit M., Varshney B., Lal S.K. The ORF2 glycoprotein of hepatitis E virus inhibits cellular NF-kappaB activity by blocking ubiquitination mediated proteasomal degradation of IkappaBalpha in human hepatoma cells. *BMC Biochem*. 2012;13:7. DOI: 10.1186/1471-2091-13-7

14. Chandra V., Kar-Roy A., Kumari S., et al. The hepatitis E virus ORF3 protein modulates epidermal growth factor receptor trafficking, STAT3 translocation, and the acute-phase response. *J Virol.* 2008;82(14):7100–7110. DOI: 10.1128/JVI.00403-08
15. Moin S.M., Panteva M., Jameel S. The hepatitis E virus ORF3 protein protects cells from mitochondrial depolarization and death. *J Biol Chem.* 2007;282(29):21124–21133. DOI: 10.1074/jbc.M701696200
16. Moin S.M., Chandra V., Arya R., et al. The hepatitis E virus ORF3 protein stabilizes HIF-1 alpha and enhances HIF-1-mediated transcriptional activity through p300/CBP. *Cell Microbiol.* 2009;11(9):1409–1421. DOI: 10.1111/j.1462-5822.2009.01340.x
17. Tyagi S., Surjit M., Lal S.K. The 41-amino-acid C-terminal region of the hepatitis E virus ORF3 protein interacts with bikunin, a kunitz-type serine protease inhibitor. *J Virol.* 2005;79(18):12081–12087. DOI: 10.1128/JVI.79.18.12081-12087.2005
18. Tyagi S., Surjit M., Roy A.K., et al. The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with liver-specific alpha1-microglobulin and its precursor alpha1-microglobulin/bikunin precursor (AMB) and expedites their export from the hepatocyte. *J Biol Chem.* 2004;279(28):29308–29319. DOI: 10.1074/jbc.M402017200
19. Ratra R., Kar-Roy A., Lal S.K. The ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with hemopexin by means of its 26 amino acid N-terminal hydrophobic domain II. *Biochemistry.* 2008;47(7):1957–1969. DOI: 10.1021/bi7016552
20. Ratra R., Kar-Roy A., Lal S.K. ORF3 protein of hepatitis E virus interacts with the Bbeta chain of fibrinogen resulting in decreased fibrinogen secretion from HuH-7 cells. *J Gen Virol.* 2009;90(pt 6):1359–1370. DOI: 10.1099/vir.0.009274-0
21. Geng Y., Yang J., Huang W., et al. Virus Host Protein Interaction Network Analysis Reveals That the HEV ORF3 Protein May Interrupt the Blood Coagulation Process. *PLoS.* 2013;ONE 8(2):e56320. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056320>
22. Williams T.P., Kasornrorkbua C., Halbur P.G., et al. Evidence of extrahepatic sites of replication of the hepatitis E virus in a swine model. *J Clin Microbiol.* 2001;39:3040–3046. DOI: 10.1128/JCM.39.9.3040-3046.2001
23. Kalia M., Chandra V., Rahman S.A., et al. Heparan sulfate proteoglycans are required for cellular binding of the hepatitis E virus ORF2 capsid protein and for viral infection. *J Virol.* 2009;83:12714–12724. DOI: 10.1128/JVI.00717-09
24. Yin X., Ying D., Lhomme S., et al. Origin, antigenicity, and function of a secreted form of ORF2 in hepatitis E virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2018;115:4773–4778. DOI: 10.1073/pnas.1721345115
25. Nagashima S., et al. Characterization of the quasi-enveloped hepatitis E virus particles released by the cellular exosomal pathway. *Journal of virology.* 2017;91(22). DOI: 10.1128/JVI.00822-17
26. Zhavoronok S., Davydau V., Arabey A., et al. Transmission mechanisms and ways of infecting human hepatitis E in the endemic region. *Clinical infectology and parasitology.* 2019;8(3):322–336. (in Russian)
27. Davydau V.V., Zhavoronok S.V., Babenko A.S., et al. Epidemiological characteristics of hepatitis E in the Republic of Belarus. *Hepatology and Gastroenterology.* 2022;6(1):11–19. (in Russian) DOI: 10.25298/2616-5546-2022-6-1-11-19
28. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., et al. Development of hepatitis E 3 genotype recombinant protein capsid of: cloning, expression, purification, evaluation of the antigenic properties. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2019;96(1):10–17. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-10-17> (in Russian)
29. Alatorseva G.I., Sidorov A.V., Nesterenko L.N., et al. Obtaining the recombinant ORF3 protein of hepatitis E genotype 3 and evaluation of its antigenic properties. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2018;95(5):46–53. DOI: <http://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-46-53> (in Russian)