

УДК 616.36-002:[616-071:616.15]

<https://doi.org/10.51523/2708-6011.2025-22-2-04>



Разработка и оценка иммуноферментной тест-системы для диагностики острого вирусного гепатита Е

И. С. Задора^{1,2}, С. В. Жаворонок¹, Г. И. Алаторцева³, А. И. Щербань²,
Л. Н. Притворова³, Л. Н. Нестеренко³, В. В. Давыдов¹, Л. А. Анисько^{1,4},
Т. А. Рогачева^{1,4}, Н. Г. Баюр^{1,4}, Н. В. Щука², Ю. А. Мытько², В. В. Сими́рский²,
М. И. Михайлов^{3,5}, В. В. Зверев^{3,6}

¹Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Беларусь

²Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси, г. Минск, Беларусь

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

⁴Городская клиническая инфекционная больница, г. Минск, Беларусь

⁵Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, г. Москва, Россия

⁶Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет) Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Москва, Россия

Резюме

Цель исследования. Разработать отечественную иммуноферментную тест-систему для определения иммуноглобулинов класса М к вирусу гепатита Е (ВГЕ) в сыворотке крови людей «ИФА-анти-ВГЕ IgM» с высокой чувствительностью и специфичностью.

Материалы и методы. База для данной научной работы — УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска. Качественное определение антител класса М в образцах сывороток крови людей осуществляли методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА) с применением референсных наборов — «ИФА-АНТИ-HEV-IgM», Вектоген Е-IgM. Для конструирования национальной тест-системы для качественного выявления анти-ВГЕ-IgM использовались разборные 96-луночные полистироловые планшеты; рекомбинантные антигены — аналоги белка ORF2 и ORF3 ВГЕ 3-го генотипа; конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к IgM человека; постпокрывающий раствор; раствор для разведения сывороток и раствор для разведения конъюгата.

Результаты. Определены оптимальные концентрации для сорбции белков ORF2 и ORF3, составляющие 2 мкг/мл и 1 мкг/мл соответственно, установлено время инкубации с тетраметилбензидином (ТМБ) — 20 минут. Диагностическая чувствительность тест-системы составила не менее 99 %, диагностическая специфичность — не менее 99 %. Показатель внутрисерийной воспроизводимости составил 92,3 %, межсерийной воспроизводимости — 86,1 %. Разработаны и утверждены технические условия ТУ BY 100185093.093-2023, Инструкция по применению набора реагентов тест-система «ИФА-анти-ВГЕ-IgM человека» для определения маркеров острого вирусного гепатита Е в сыворотке крови людей методом иммуноферментного анализа.

Заключение. Разработана первая отечественная тест-система для определения иммуноглобулинов класса М к ВГЕ в сыворотке крови людей «ИФА-анти-ВГЕ-IgM» методом непрямого ИФА. Проведены лабораторные и технические испытания экспериментального образца тест-системы, показавшие ее высокую диагностическую чувствительность, специфичность и воспроизводимость. Утверждена нормативно-техническая документация на тест-систему.

Ключевые слова: вирус гепатита Е, ВГЕ, иммуноферментный анализ, иммуноглобулины класса М, анти-ВГЕ-IgM

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

Благодарность. Авторы благодарят главного врача УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» Н.Н. Юровского, коллектив клинко-диагностической лаборатории УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» за помощь в организации и проведении исследований (О. Н. Долбуз, Е. А. Метлицкая, Н. В. Малиновская).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Источники финансирования. 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 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, № государственной регистрации 20213143.

Для цитирования: Задора ИС, Жаворонок СВ, Алаторцева ГИ, Щербань АИ, Притворова ЛН, Нестеренко ЛН, Давыдов ВВ, Аниско ЛА, Рогачева ТА, Байур НГ, Шука НВ, Мытько ЮА, Смирский ВВ, Михайлов МИ, Зверев ВВ. Разработка и оценка иммуноферментной тест-системы для диагностики острого вирусного гепатита Е. *Проблемы здоровья и экологии*. 2025;22(2):35–45. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2025-22-2-04>

Development and evaluation of an enzyme immunoassay for diagnosis of acute viral hepatitis E

Ilona S. Zadora^{1,2}, Sergey V. Zhavoronok¹, Galina I. Alatorseva³,
Aleksandr I. Shcherban², Lyudmila N. Pritvorova³, Lyubov N. Nesterenko³,
Vladimir V. Davydov¹, Lyudmila A. Anisko^{1,4}, Tamara A. Rogacheva^{1,4},
Nadzeya G. Bayur^{1,4}, Natalia V. Shchuka², Yulia A. Mytko², Vladimir V. Simirsky²,
Michail I. Mikhailov⁵, Vitaly V. Zverev^{3,6}

¹Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

²Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

³I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute, Moscow, Russia

⁴City Clinical Hospital of Infectious Diseases, Minsk, Belarus

⁵Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia

⁶I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University), Moscow, Russia

Abstract

Objective. To develop a national high-sensitivity and marked specificity enzyme immunoassay test system for determining class M immunoglobulins to the hepatitis E virus (HEV) in human blood serum “ELISA-anti-HEV IgM”.

Materials and methods. The base for this research is City Clinical Hospital of Infectious Diseases in Minsk. Qualitative determination of anti-HEV IgM in human blood serum samples was carried out by indirect enzyme immunoassay using reference kits – “ELISA-ANTI-HEV-IgM”, Vecto hep E-IgM. 96-well polystyrol strip plates were used to design a national test system for the qualitative detection of anti-HEV-IgM; recombinant antigens – analogues of the protein ORF2 and ORF3 HEV of the genotype 3; antibodies against human IgM conjugated with horseradish peroxidase; post-closing solution; serum dilution solution and conjugate dilution solution.

Results. Optimal concentrations for sorption of ORF2 and ORF3 proteins were determined, amounting to 2 mg/ml and 1 mg/ml. The incubation time with TMB is set to 20 minutes. Diagnostic sensitivity of the test system was no less than 99%, and diagnostic specificity was no less than 99%. The index of in-series reproducibility was 92,3%, inter-series reproducibility was 86,1%. Technical specifications TU BY 100185093.093-2023 were developed and registered. Direction for use of the reagent kit of the test system “ELISA-anti-HEV-IgM human” for determining markers of acute viral hepatitis E in human blood serum by enzyme immunoassay was approved.

Conclusion. The first national test system “ELISA-anti-HEV-IgM” for the determination of class M immunoglobulins against hepatitis E virus in human blood serum by indirect enzyme immunoassay was developed. Laboratory and technical tests of the experimental sample of the test system were carried out, shown its high diagnostic sensitivity, specificity and reproducibility. The regulatory, technical and operational documentation for the test system was approved.

Keywords: hepatitis E virus, HEV, enzyme immunoassay, immunoglobulins class M

Author contributions. Zhavoronok S.V., Davydov V.V., Alatorseva G.I., Pritvorova L.N., Nesterenko L.N., Zverev V.V., Simirsky V.V.: a significant contribution to the concept and design of the study; Anisko L.A., Rogacheva T.A., Zadora I.S.: preparation, collection of material, study design, current and final editing of the article; Zadora I.S.: design, data collection, summary of results, editing of results; Alatorseva G.I., Pritvorova L.N., Nesterenko L.N., Shcherban A.I., Shchuka N.V., Zhavoronok S.V., Davydov V.V.: final approval of the article for publication.

Acknowledgement: The authors thank the chief physician Yurovsky N.N., the staff of the clinical diagnostic laboratory of the City Clinical Hospital of Infectious Diseases for assistance in organizing and conducting the research (Dolbuz O.N., Metlitskaya E.A., Malinovskaya N.V.).

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

Funding. This research work was carried out within the funded activity 13 “To develop a technology for the industrial production of test systems for the detection of IgG and IgM class antibodies to the hepatitis E virus in humans and animals using the enzyme immunoassay method, and organize their production” subprogram 5 “Chemical products and molecular technologies” of the State Program “High technology and techniques” for 2021-2025, State Registration No. 20213143.

For citation: Zadora IS, Zhavoronok SV, Alatorseva GI, Shcherban AI, Pritvorova LN, Nesterenko LN, Davydov VV, Anisko LA, Rogacheva TA, Bayur NG, Shchuka NV, Mytko YuA, Simirsky VV, Mikhailov MI, Zverev VV. Development and evaluation of an enzyme immunoassay for diagnosis of acute viral hepatitis E. Health and Ecology Issues. 2025;22(2):35–45. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2025-22-2-04>

Введение

Вирус гепатита E — это квазиоболочечный вирус, содержащий одноцепочечный РНК-позитивный геном, размером 7,2 т.п.н., включающий три открытые рамки считывания (ORF) [1].

Генетически ВГЕ неоднороден, идентифицировано 8 генотипов, первые четыре (ВГЕ-1, преимущественно бирманоподобные азиатские штаммы; ВГЕ-2 — мексиканский штамм, зооантропонозы — ВГЕ-3 и ВГЕ-4) чаще всего вызывают инфекции у людей [2, 3].

Клинические и эпидемиологические характеристики гепатита E (ГЕ) в различных по уровню эндемичности странах имеют существенные отличия. Он является высокоэндемичным в ряде развивающихся стран Азии (Индия, Бангладеш, Китай и Малайзия) и Африки, где отсутствуют централизованные источники водоснабжения и возможна их контаминация [4]. В этих странах ВГЕ протекает в виде вспышек или спорадических случаев, вызванных 1-м или 2-м генотипами вируса. При этом вирусы данных генотипов циркулируют только среди людей, передаются в основном через воду, реализуя фекально-оральный механизм передачи. Они также ответственны за тяжелый гепатит у беременных, новорожденных и грудных детей. Самый высокий уровень заболеваемости наблюдается среди молодых людей в возрасте от 15 до 40 лет [5].

В развитых странах аутохтонные случаи инфицирования ВГЕ носят спорадический характер, при этом преобладающее значение имеют животные резервуары инфекции. Гепатит E чаще всего вызывается вирусами 3-го и 4-го генотипов, по источнику инфекции относится к зооантропонозам, путь передачи в большинстве случаев пищевой, передача от человека к человеку встречается редко. Данные генотипы вируса обнаруживаются у свиней, диких кабанов, кроликов, оленей, других млекопитающих, что повышает риск инфицирования людей при работе с данными животными, охоте, а также потреблении недостаточно термически обработанного мяса и субпродуктов, инфицированных ВГЕ животных. ВГЕ-3 преимущественно распространен в западных странах, тогда как ВГЕ-4 встречается в основном в азиатском регионе. Заболеваемость ВГЕ-инфекцией имеет неоднородную половозрастную структуру: мужчины в возрасте 50 лет и старше составляют большую часть от общего числа больных [6–8].

В Республике Беларусь выявлены аутохтонные и завозные случаи ГЕ. Эндемичным генотипом ВГЕ для Беларуси является генотип 3. Нуклеотидные последовательности ВГЕ, обнаруженные в организме людей и животных, обладают значительным генетическим полиморфизмом и кластеризуются с референсными последовательностями 3с, 3i, 3f, 3g и 3ra субгенотипов ВГЕ. Последовательность ВГЕ 1-го генотипа, обладающего потенциалом эпидемического распространения, обнаружена в организме пациента, как выяснилось, в результате завоза из гиперэндемичного по ГЕ региона. Могут встречаться случаи ко-инфицирования с другими вирусными гепатитами (B, C), при этом ГЕ можно выявить только с помощью лабораторных тестов, что осложняется отсутствием эпидемиологической настороженности врачей на ГЕ, поскольку инфекция часто протекает в скрытой субклинической форме [9].

Особую опасность представляет наличие вирусной РНК и иммуноглобулинов класса М к ВГЕ в донорской крови, что является общественной проблемой здравоохранения во всем мире. В Республике Беларусь также отсутствует тотальный скрининг донорской крови на РНК ВГЕ, антитела классов М и G [10].

Клиническое течение ВГЕ-инфекции различается: вирус 1-го и 2-го генотипов часто вызывает острое заболевание, может привести к острой печеночной недостаточности (ОПН) или острой печеночной недостаточности, развившейся на фоне хронической (ОХПН) с высокой летальностью беременных (до 20 %). При этом большинство случаев ВГЕ-инфекции, связанной с вирусами 3-го и 4-го генотипов, имеют клинически бессимптомное течение и лишь изредка приводят к развитию ОПН и ОХПН у пожилых людей или пациентов с сопутствующими заболеваниями печени. Известны случаи хронизации ГЕ, вызванного вирусами 3-го и 4-го генотипов, у пациентов с трансплантированными паренхиматозными органами, у лиц, получающих химиотерапию, пациентов с гематологическими заболеваниями и ревматоидной патологией, что впоследствии может привести к опасному для жизни циррозу печени [11, 12].

Лабораторная верификация ГЕ основывается на обнаружении вирусной РНК в биологическом материале (кровь, кал и т. д.) методом полимеразной цепной реакции, а также иммуно-

глобулинов классов G и M в сыворотке (плазме) крови с помощью ИФА.

В соответствии с нормативными актами и санитарными правилами, действующими в Республике Беларусь, диагностика острого ВГЕ включает комплексный подход на основе клинических, лабораторных и эпидемиологических данных. При этом окончательная верификация проводится на основании выявления иммуноглобулинов класса M к ВГЕ (анти-ВГЕ-IgM).

Цель исследования

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

Материалы и методы

В работе использованы образцы сывороток крови, собранные в УЗ «Городская клиническая инфекционная больница» г. Минска, где для определения анти-ВГЕ-IgM применялись коммерческие наборы реагентов «ИФА-АНТИ-HEV-IgM» (НПО «Диагностические системы», Россия) и «Векторген E-IgM» («Вектор-Бест», Россия) в соответствии с инструкциями производителей.

Для разработки тест-системы были использованы следующие материалы: 96-луночные полистироловые планшеты с высокой сорбционной активностью («Хема», Россия); рекомбинантные антигены ORF2 и ORF3 ВГЕ 3-го генотипа, предоставленные ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова» (Россия); конъюгированные с пероксидазой хрена антитела к IgM человека («Полигност», Россия); соли для карбонатно-бикарбонатного буферного раствора (Na_2CO_3 , NaHCO_3); постпокрывающий раствор, включающий инертный белок, дисахарид, ингибитор протеиназ и бактериостатик (УП «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии НАН Беларуси» (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»)); раствор для разведения сывороток и раствор для разведения конъюгата (УП «ХОП ИБОХ НАН Беларуси»); субстратный раствор с ТМБ; 5% раствор серной кислоты (H_2SO_4); термостат; универсальный фотометр «Витязь» Ф300, спектрофотометр Microplate Photometer MPP-96 BioSan (Латвия).

Обработка полученных данных проводилась с использованием статистических пакетов Excel for Windows, 10.0 и пакета статистического анализа данных Statistica for Windows, 10.0 (StatSoft Inc., Талса, США). Количественные переменные представляли в виде медианы (Me), средних значений, верхнего и нижнего квартилей (p25%–p75%). Количественные данные проверяли на соответствие закону нормального распределе-

ния (критерий Колмогорова – Смирнова). При ненормальном распределении признака и при малом объеме выборки ($n < 30$) для обработки данных использовали методы непараметрической статистики — U-критерий Манна – Уитни для двух независимых групп, при большем количестве анализируемых групп использовали критерий Краскела – Уоллиса. В качестве критерия статистической достоверной значимости результатов рассматривается уровень $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Для создания иммуносорбента использовали рекомбинантные полипептиды ORF2 (145,1 кДа, участок с 404 по 660 а.о) и ORF3 (128,4 кДа) ВГЕ 3-го генотипа, разработанные и предоставленные ФГБНУ «НИИ вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова» (Россия). Рекомбинантный белок ORF2 содержал следующую последовательность аминокислот: NGEPTVKLYTSVGNAAQQDK GIAIPHDIDLGDSRVVIQDYDNQHEQDRPTSPAP SRPFSVLRLANDVLWLSLTAAEYDQTTYGSSTNPM YVSDTVTFVNVATGAQAVARSLDWSKVTL DGRPL TTIQQYSKTFYVPLPLRGKLSFWEAGTTKAGYPYN YNTTASDQILIEAAGHRVAISTYTTVGSLGAGPV SVSAVLAPHSALAVLEDITIDYPARAHTFDDFCPEC RNLGLQGCAFGQSTVAELQRLKMKVGKTRES.

Рекомбинантный белок ORF3 содержал следующую последовательность аминокислот: MGS PCALGLFCCCSCFCCLCCPRHRPASRLAAVVGGA AAVPAVVSGVTGLILSPSPSPIFIQPTPLPPTSFN NPGLELALDSRPAPSAPLGLTSPSAPPLPPVV [13, 14].

Схема приготовления иммуносорбента для «ИФА-анти-ВГЕ-IgM человека» включает следующие этапы:

1. Приготовление разведений рекомбинантных белков ORF2 и ORF3 в карбонатно-бикарбонатном буфере и внесение их по 110 мкл в лунки полистироловых планшетов.
2. Инкубация в течение 16–18 ч при температуре от +2 до +8 °С.
3. Промывание и обработка постпокрывающим раствором в объеме 160 мкл/лунка в течение 16–18 ч при температуре от +2 до +8 °С.
4. Удаление раствора из всех лунок планшета, высушивание в течение 16–18 ч при температуре от +20 до +25 °С.

Для выбора ориентировочных диапазонов рекомендуемых концентраций для сорбции белки разводились в 0,05M карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 8,5) до концентрации 5 мкг/мл и последовательно разводились в 2 раза до концентраций 2,5, 1,25 и 0,625 мкг/мл. Конъюгат антител к IgM человека с пероксидазой («Биосервис», Россия) использовался в рабочем значении 1:800 000.

Планшеты сенсibilизировали в разные дни, образцы сывороток крови людей в процессе проведения анализа разводили 1:10, из них положительные контрольные образцы содержали иммуноглобулины класса М в высоких, средних и низких титрах. Продолжительность инкубаций исследуемых образцов и конъюгата составляла 30 минут, температура инкубаций — 37 °С.

На первом этапе определения оптимальных диапазонов разведений исследуемые рекомбинантные полипептиды ORF2 и ORF3 вносились в лунки полистироловых планшетов раздельно (рисунки 1, 2).

В результате исследования были получены достоверные различия значений оптической плотности (ОП) положительных и отрицательных образцов для всех использованных разведений антигена ORF2 ($p < 0,001$) при определении анти-ВГЕ-IgM. На основании критерия Краскела – Уоллиса устанавливались статистические различия между всеми концентрациями рекомбинантного полипептида ORF2, используемого для сорбции ($H = 19,190$, $p = 0,0002$). Определены статистически значимые различия в парах концентраций 5 и 0,625 мкг/мл ($z = 4,139$, $p = 0,0002$), а также в паре 2,5 и 0,625 мкг/мл ($z = 3,057$, $p = 0,013$).

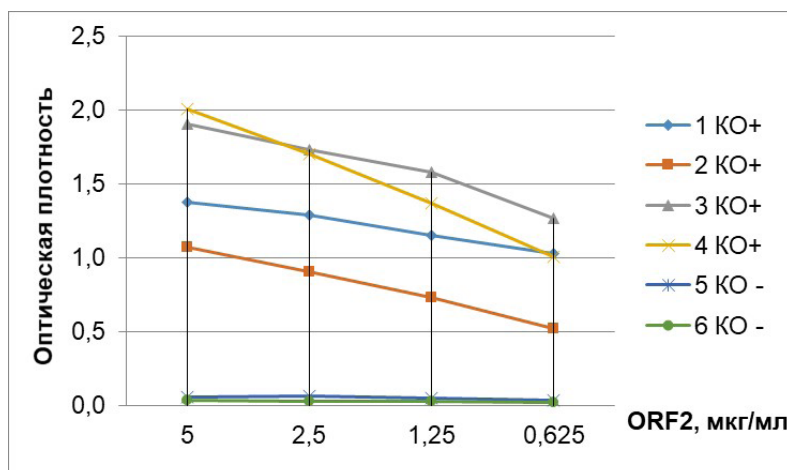


Рисунок 1. Показатели оптических плотностей контрольных анти-ВГЕ-IgM образцов сывороток крови людей в зависимости от концентрации рекомбинантного полипептида ORF2. 1KO+, 2KO+, 3KO+, 4KO+ — положительные контрольные образцы, 5KO-, 6KO- — отрицательные контрольные образцы

Figure 1. Optical density indices of control anti-HEV-IgM human blood serum samples depending on the concentration of recombinant ORF2 polypeptide. 1KO+, 2KO+, 3KO+, 4KO+ – positive control samples, 5KO-, 6KO- – negative control samples

Для белка ORF3 также были установлены медианные значения оптических плотностей положительных и отрицательных образцов сыворо-

ток крови людей, а также определены статистически значимые различия в исследуемых группах концентраций (рисунок 2).

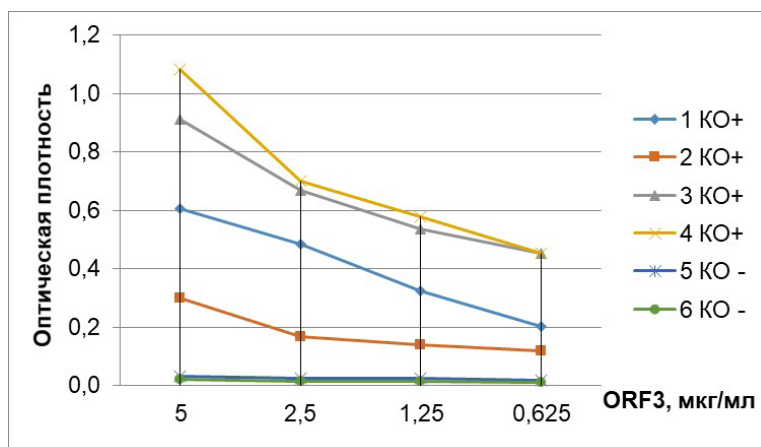


Рисунок 2. Показатели оптических плотностей контрольных анти-ВГЕ-IgM образцов сывороток крови людей в зависимости от концентраций рекомбинантного полипептида ORF3. 1KO+, 2KO+, 3KO+, 4KO+ — положительные контрольные образцы, 5KO-, 6KO- — отрицательные контрольные образцы

Figure 2. Optical density indices of control anti-HEV-IgM samples of human blood serum depending on the concentration of recombinant ORF3 polypeptide. 1KO+, 2KO+, 3KO+, 4KO+ – positive control samples, 5KO-, 6KO- – negative control samples

При анализе различий значений ОП положительных и отрицательных образцов установлены достоверные различия всех использованных концентраций полипептида ORF3 ($U = 19$, $p < 0,001$). С помощью критерия Краскела – Уоллиса были оценены статистически достоверные различия между всеми используемыми для сорбции концентрациями рекомбинантного полипептида ($H = 20,607$, $p = 0,0001$). Установлены статистически значимые различия в парах концентраций 5 и 0,625 мкг/мл ($z = 4,315$, $p = 0,000096$), а также в паре 5 и 1,25 мкг/мл ($z = 4,315$, $p = 0,0087$).

Для определения диагностической значимости рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3

при детекции маркеров острого инфекционного процесса проведено сравнительное исследование зависимости ОП положительных образцов от концентраций антигенов, использованных для получения иммуносорбента (рисунок 3). Обращают на себя внимание более низкие значения ОП исследуемых сывороток при использовании белка ORF3, что подтверждено статистически. Определены достоверные различия показателей ОП положительных сывороток при всех сорбируемых концентрациях антигенов: 5 мкг/мл ($U = 21,0$, $p = 0,000060$), 2,5 мкг/мл ($U = 5,0$, $p = 0,000004$), 1,25 мкг/мл ($U = 2,0$, $p = 0,000002$), 0,625 мкг/мл ($U = 10,0$, $p = 0,000009$).

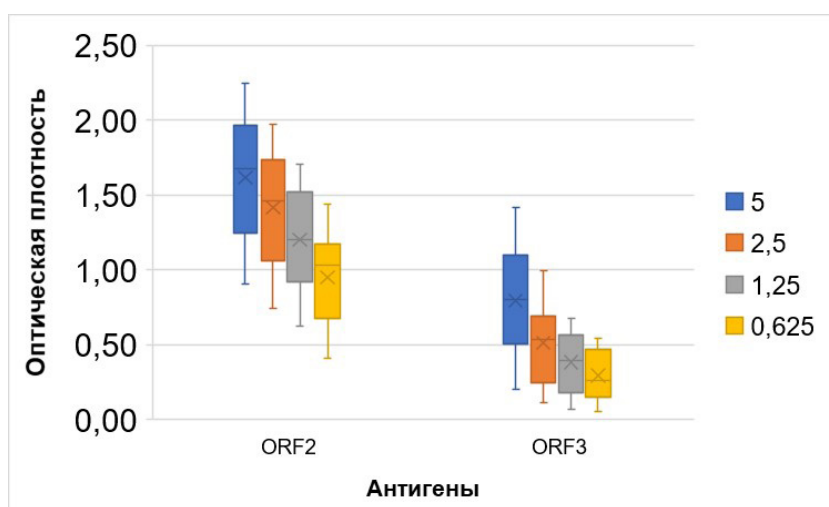


Рисунок 3. Значения оптических плотностей контрольных положительных образцов при раздельном использовании ORF2 и ORF3

Figure 3. Optical densities values of control positive samples using separated ORF2 and ORF3

Для определения точного значения конечной концентрации антигенов ORF2 и ORF3 при внесении в лунки планшета для создания твердой

фазы «ИФА-анти-ВГЕ-IgM», белки сорбировались также совместно (таблица 1).

Таблица 1. Медианные значения ОП сывороток крови при нанесении одинаковой концентрации антигенов ORF2 и ORF3

Table 1. Median OD values of human blood serum depending on applying the same concentration of antigens ORF2 and ORF3

Образцы сывороток крови людей	Концентрации рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3, мкг/мл при совместной сорбции			
	5 + 5	2,5 + 2,5	1,25 + 1,25	0,625 + 0,625
1 КО+	1,190	1,125	0,959	0,786
2 КО+	0,735	0,722	0,617	0,536
3 КО+	1,256	1,167	1,046	0,984
4 КО+	1,355	1,282	1,059	0,907
5 КО–	0,023	0,028	0,024	0,020
6 КО–	0,025	0,024	0,021	0,030

Источник: составлено авторами.

Source: compiled by the authors.

Значения ОП положительных и отрицательных образцов при детекции на иммуносорбентах, полученных при совместной сорбции рекомбинантных полипептидов, статистически различаются между собой ($p < 0,001$). Также установлены статистически значимые различия при сравнении данных с показателями ОП сывороток при использовании для сорбции только антигена ORF2 ($U = 1201,0$, $p = 0,00005$). Найдены достоверные различия в паре 5 мкг/мл ORF2 и совместной сорбции по 5 мкг/мл каждого белка ORF2 и ORF3

($U = 50,0$, $p = 0,0035$), паре 2,5 мкг/мл ORF2 и совместной сорбции по 2,5 мкг/мл каждого белка ORF2 и ORF3 ($U = 66,0$, $p = 0,020$), паре 1,25 мкг/мл ORF2 и совместной сорбции по 1,25 мкг/мл каждого белка ORF2 и ORF3 ($U = 71,0$, $p = 0,033$).

В связи с этим на следующем этапе нашей работы по созданию тест-системы для определения IgM-антител к ВГЕ исследовались иммуносорбенты с рекомбинантным полипептидом ORF2 в более высокой концентрации по сравнению с антигеном ORF3 (таблица 2).

Таблица 2. Медианные значения ОП сывороток крови людей в зависимости от концентрации сорбируемых антигенов ORF2 и ORF3

Table 2. Median OD values of human blood serum depending on the concentration of sorbed antigens ORF2 and ORF3

Образцы сывороток крови людей	Концентрации рекомбинантных полипептидов ORF2 и ORF3, мкг/мл при совместной сорбции			
	3 + 1	2,5 + 1	2 + 1	1,5 ORF2
1 КО+	1,236	1,204	1,175	0,769
2 КО+	0,498	0,449	0,445	0,306
3 КО+	0,835	0,817	0,758	0,479
4 КО+	1,326	1,288	1,372	0,738
5 КО-	0,014	0,018	0,022	0,022
6 КО-	0,010	0,010	0,006	0,011

Источник: составлено авторами.

Source: compiled by the authors.

Значения ОП положительных и отрицательных образцов достоверно различались при всех исследуемых концентрациях сорбируемых антигенов ($p < 0,001$). Для оценки статистически значимых различий между исследуемыми концентрациями смеси антигенов ORF2 и ORF3 (3 и 1; 2,5 и 1; 2 и 1 мкг/мл), а также 1,5 мкг/мл белка ORF2, использовался критерий Краскела – Уоллиса ($H = 13,538$, $p = 0,003$). Установлены статистически значимые различия в парах концентраций 3 + 1 и 1,5 мкг/мл ($z = 3,199$, $p = 0,008$), 2,5 + 1 и 1,5 мкг/мл ($z = 2,943$, $p = 0,019$), а также в паре 2 + 1 и 1,5 мкг/мл ($z = 2,819$, $p = 0,028$). Разведение 2 мкг/мл ORF2 и 1 мкг/мл ORF3 установлено как наиболее оптимальное для создания иммуносорбента разрабатываемой тест-системы.

Для определения рекомендуемого диапазона разведений конъюгат моноклональных антител к IgM-антителам человека с пероксидазой хрена (МКАТ-IgM человека — ПХ) (ООО «Полигност», Россия) титровали в значениях от 1:1000 до 1:128 000 в растворе, приготовленном на основании аналитического буферного раствора и стабилизирующего раствора для блокирования неспецифического взаимодействия с

другими белками. ИФА проводился в повторях с использованием положительных и отрицательной сывороток (рисунок 4). Условия инкубации с конъюгатом — 30 минут при температуре 37 °С. Критерием выбора диапазона разведений конъюгата являлась способность связывать максимальное количество иммуноглобулинов класса М к ВГЕ при минимальном фоновом показателе.

В результате сравнения значений ОП положительных и отрицательных образцов сывороток при титровании МКАТ-IgM-ПХ установлен оптимум разведения 1:4000–1:8000. Конечное разведение конъюгата к IgM человека было определено 1:8000 для предупреждения неспецифического связывания и возникновения ложноположительных результатов.

Для определения рекомендуемого времени инкубации с ТМБ использовались позитивный и негативный по анти-ВГЕ-IgM образцы сывороток. Анализировалась продолжительность инкубации с добавленным ТМБ: 5, 10, 15, 20, 25 минут. Концентрация полипептидов (2 мкг/мл ORF2 и 1 мкг/мл ORF3) и титр разведения конъюгата («Полигност», 1:8 000) не изменялись. Критерием выбора являлось достижение максимального значения коэффициента позитивности (КП) (таблица 3).

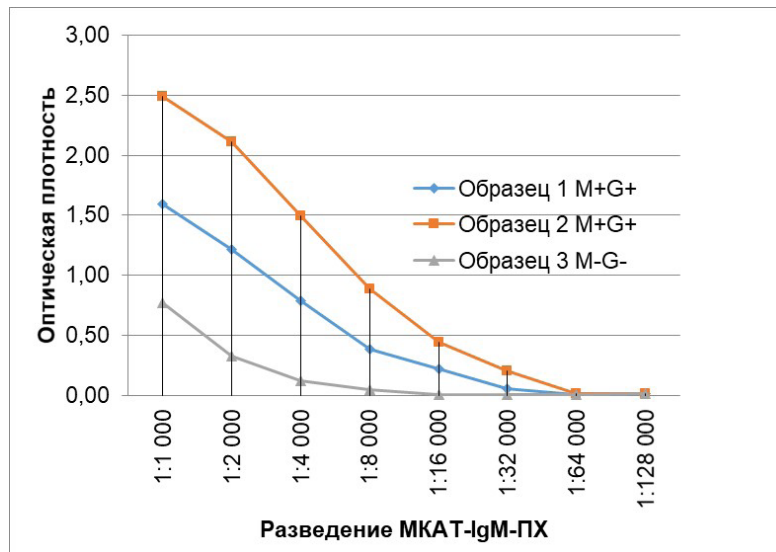


Рисунок 4. Титрование конъюгата к IgM человека в лунках с положительными и отрицательным образцами сывороток крови людей

Figure 4. Titration of the conjugate to human IgM in slots with positive and negative human blood serum samples

Таблица 3. Значения КП в зависимости от продолжительности инкубации с ТМБ

Table 3. CP values depending on the time of incubation with TMB

Время инкубации (мин)	Медианное значение ОП КО+ (25%–75%)	Медианное значение ОП КО– (25%–75%)	КП
5	0,052 (0,050–0,064)	0,006 (0,004–0,007)	8,583
10	0,331 (0,278–0,363)	0,004 (0,004–0,005)	82,750
15	0,442 (0,409–0,457)	0,007 (0,007–0,010)	63,357
20	0,842 (0,819–0,871)	0,005 (0,002–0,008)	168,300
25	1,121 (1,110–1,131)	0,058 (0,049–0,062)	19,319

Источник: составлено авторами.

Source: compiled by the authors.

Максимального значения КП достигал (168,300) при инкубации с ТМБ в течение 20 минут, соответственно эта продолжительность реакции с хромогеном была определена как наиболее оптимальная.

Для оценки качества и эффективности разработанного набора «ИФА-анти-ВГЕ-IgM человека» определялись показатели воспроизводимости, чувствительности и специфичности.

Воспроизводимость метода определяли посредством тестирования пяти положительных образцов сывороток крови людей в 8 параллельных повторях для каждого образца в пределах одного планшета (внутрисерийная воспроизводимость) с повторением анализа в четырех независимых экспериментах (межсерийная воспроизводимость). Показатель внутрисерийной воспроизводимости для набора «ИФА-анти-ВГЕ-IgM» составил 92,3 % при среднем показателе коэффициента вариации 7,7 %. Показатель ко-

эффициента вариации при оценке ОП образцов на всех 4 планшетах составил 13,9 %, соответственно межсерийная воспроизводимость равна 86,1 %.

Для оценки аналитических свойств разработанного нами экспериментального образца тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ-IgM» для определения антител класса М в сыворотке (плазме) крови человека, проведены ее лабораторные испытания в сравнении с референсным коммерческим набором «ИФА-АНТИ-HEV-IgM» (НПО «Диагностические системы», Россия). Для этого исследовались образцы 37 позитивных и негативных сывороток крови людей, входящих в контрольную панель. В соответствии с ROC-анализом (рисунок 5) автоматически была установлена точка отсечения (cut-off) 0,261. Площадь под кривой (AUC) составила 1,0 (95 % ДИ 1,000–1,000, $p < 0,001$), что полностью соответствует показателям коммерческой тест-системы сравнения.

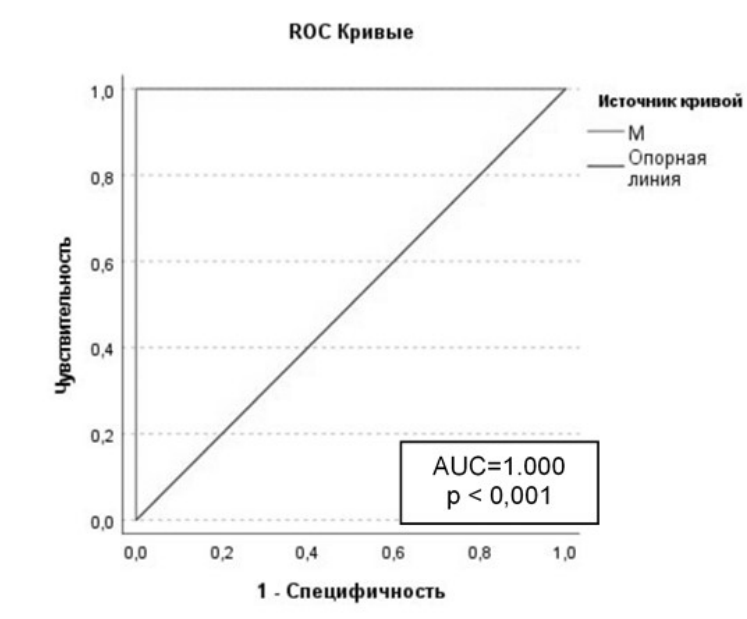


Рисунок 5. ROC-кривая для оценки разработанной национальной тест-системы «ИФА-анти-ВГЕ-IgM»
Figure 5. ROC curve for evaluation of the developed national test system «ELISA-anti-HEV-IgM»

Диагностическая специфичность, представляющая отношение истинно отрицательных к числу фактически отрицательных случаев, составила 100 %, точность теста — 100 %. Диагностическая чувствительность, соответствующая отношению истинно положительных к числу фактически положительных случаев, была равна 100 %, что характеризует высокую надежность разработанного набора «ИФА-анти-ВГЕ-IgM».

На основании полученных данных о концентрации рекомбинантных полипептидов, титра разведения иммуноконъюгата, времени инкубации с тетраметилбензидином зарегистрированы технические условия ТУ ВУ 100185093.093-2023, утверждена Инструкция по применению набора реагентов для определения антител класса IgM к ВГЕ в сыворотке или плазме крови человека методом иммуноферментного анализа «ИФА-анти-ВГЕ-IgM человека».

Заключение

В результате проведенных исследований в Республике Беларусь была разработана первая национальная тест-система «ИФА-анти-ВГЕ-IgM человека» для определения маркеров острого ВГЕ в сыворотке крови лю-

дей методом ИФА в непрямом формате. Определены оптимальные концентрации для сорбции белков ORF2 и ORF3, составляющие 2 мкг/мл и 1 мкг/мл соответственно, оптимальное значение разведения иммунопероксидазного конъюгата 1:8000, продолжительность инкубации с ТМБ — 20 минут. Проведенные лабораторные испытания экспериментального образца тест-системы показали высокую аналитическую надежность разработанной тест-системы. Диагностическая чувствительность тест-системы составила не менее 99 %, диагностическая специфичность — не менее 99 %. Показатель внутрисерийной воспроизводимости составил 92,3 %, межсерийной воспроизводимости — 86,1 %. Разработаны и зарегистрированы технические условия ТУ ВУ 100185093.093-2023, утверждена Инструкция по применению набора реагентов. Созданная тест-система «ИФА-анти-ВГЕ-IgM человека» обладает высокой чувствительностью и специфичностью, что позволяет использовать данный набор реагентов для диагностики *in vitro* в лабораториях учреждений здравоохранения, проводящих иммуноферментные исследования.

Список литературы / References

1. Purdy MA, Drexler JF, Meng XJ, Norder H, Okamoto H, Van der Poel WHM, et al. ICTV Virus Taxonomy Profile: Hepeviridae 2022. *J Gen Virol*. 2022 Sep;103(9). DOI: <https://doi.org/10.1099/jgv.0.001778>
2. Rein DB, Stevens GA, Theaker J, Wittenborn JS, Wiersma ST. The global burden of hepatitis E virus genotypes 1 and 2 in 2005. *Hepatology*. 2012 Apr;55(4):988-997. DOI: <https://doi.org/10.1002/hep.25505>
3. Li B, Wu H, Miao Z, Hu L, Zhou L, Lu Y. Codon Usage of Hepatitis E Viruses: A Comprehensive Analysis. *Front Microbiol*. 2022 Jun 21;13:938651. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.938651>

4. Marano G, Vaglio S, Pupella S, Faccio G, Bianchi M, Calizzani G, et al. Hepatitis E: an old infection with new implications. *Blood Transfus*. 2015 Jan;13(1):6-17. DOI: <https://doi.org/10.2450/2014.0063-14>
5. Aslan AT, Balaban HY. Hepatitis E virus: Epidemiology, diagnosis, clinical manifestations, and treatment. *World J Gastroenterol*. 2020 Oct 7;26(37):5543-5560. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v26.i37.5543>
6. Meng XJ. Hepatitis E virus: animal reservoirs and zoonotic risk. *Vet Microbiol*. 2010 Jan 27;140(3-4):256-265. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2009.03.017>
7. Pavio N, Meng XJ, Renou C. Zoonotic hepatitis E: animal reservoirs and emerging risks. *Vet Res*. 2010 Nov-Dec;41(6):46. DOI: <https://doi.org/10.1051/vetres/2010018>
8. Vina-Rodriguez A, Schlosser J, Becher D, Kaden V, Groschup MH, Eiden M. Hepatitis E virus genotype 3 diversity: phylogenetic analysis and presence of subtype 3b in wild boar in Europe. *Viruses*. 2015 May 22;7(5):2704-2726. DOI: <https://doi.org/10.3390/v7052704>
9. Жаворонко С.В., Карпов И.А., Михайлов М.И., Арабей А.А., Кашкур Ю.В., Кюрегян К.К. [и др.]. Интенсивность эпидемического и эпизоотического процессов инфекции, вызванной вирусом гепатита Е, на территории Республики Беларусь. *Инфекционные болезни: новости, мнения, обучение*. 2019;8(1):11-22. DOI: <https://doi.org/10.2441/2305-3496-2019-11001>
- Zhavoronok SV, Karpov IA, Mikhaylov MI, Arabey AA, et al. Epidemiological and epizootic intensity of HEV in Belarus. *Infectious Diseases: News, Opinions, Training*. 2019;8(1):11-22. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.2441/2305-3496-2019-11001>
10. Давыдов В.В., Жаворонко С.В., Задора И.С., Новак Л.В., Карпенко Ф.Н., Левандовская О.В. [и др.]. Распространенность антител к вирусу гепатита Е в крови белорусских доноров. *Медицинский журнал*. 2022;(4):53-59. DOI: <https://doi.org/10.51922/1818-426X.2022.4.53>
- Davydov VV, Zhavoronok SV, Zadora IS, Novak LV, Karpenko FN, Levandovskaya OV, et al. *Prevalence of antibodies to the hepatitis E virus in the blood of belarusian donors*. *Medical Journal*. 2022;(4):53-59. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.51922/1818-426X.2022.4.53>
11. Krumova-Valcheva GL, Di Bartolo I, Smith RP, Gyurova E, Mateva G, Milanov M, et al. Detection of HEV RNA Using One-Step Real-Time RT-PCR in Farrow-to-Finish Pig Farms in Bulgaria. *Pathogens*. 2023;12(5):673. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens12050673>
12. Pischke S, Wedemeyer H. Hepatitis E virus infection: multiple faces of an underestimated problem. *J Hepatol*. 2013 May;58(5):1045-1046. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.12.013>
13. 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 иммунобиологии*. 2019;96(1):10-17. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-10-17>
- Alatortseva GI, Sidorov AV, Nesterenko LN, Luhverchik LN, Dotsenko VV, Amiantova II, 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. (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2019-1-10-17>
14. Алаторцева Г.И., Сидоров А.В., Нестеренко Л.Н., Лухверчик Л.Н., Милованова А.В., Аммури Ю.И. [и др.]. Получение рекомбинантного белка ORF3 вируса гепатита Е 3 генотипа и оценка его антигенных свойств. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;95(5):46-53. DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-46-53>
- Alatortseva GI, Sidorov AV, Nesterenko LN, Luhverchik LN, Milovanova AV, Ammur YI, 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. (in Russ.). DOI: <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-5-46-53>

Информация об авторах / Information about the authors

Задора Илона Сергеевна, старший преподаватель кафедры микробиологии, вирусологии, иммунологии, УО «Белорусский государственный медицинский университет»; младший научный сотрудник, УП «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2231-1785>

e-mail: zadora-ilona@mail.ru

Жаворонко Сергей Владимирович, д.м.н., профессор, профессор кафедры инфекционных болезней, УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9727-1103>

e-mail: zhavoronok.s@mail.ru

Алаторцева Галина Ивановна, к.б.н., заведующая лабораторией клонирования вирусных геномов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва, Россия

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9887-4061>

e-mail: alatortseva@gmail.com

Щербань Александр Иванович, к.б.н., начальник научно-технического отдела, УП «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1929-0901>

e-mail: a.scherban53@mail.ru

Притворова Людмила Николаевна, к.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва, Россия

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2997-8892>

e-mail: mech.inst@mail.ru

Ilona S. Zadora, Senior Lecturer at the Department of Microbiology, Virology, Immunology, Belarusian State Medical University; Junior Researcher, Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2231-1785>

e-mail: zadora-ilona@mail.ru

Sergey V. Zhavoronok, Doctor of Medical Sciences, Professor, Professor at the Department of Infectious Diseases, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9727-1103>

e-mail: zhavoronok.s@mail.ru

Galina I. Alatortseva, Candidate of Biological Sciences, Head of the Laboratory of Cloning Viral Genomes, I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute, Moscow, Russia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9887-4061>

e-mail: alatortseva@gmail.com

Aleksandr I. Shcherban, Candidate of Biological Sciences, Head of the Scientific and Technical Department, Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1929-0901>

e-mail: a.scherban53@mail.ru

Lyudmila N. Pritvorova, Candidate of Medical Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Cloning of Viral Genomes, I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute, Moscow, Russia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2997-8892>

e-mail: mech.inst@mail.ru

Нестеренко Любовь Николаевна, к.х.н., ведущий научный сотрудник лаборатории клонирования вирусных геномов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва, Россия

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3825-3906>

Давыдов Владимир Витольдович, к.б.н., доцент, заведующий кафедрой биологии, УО «Белорусский государственный медицинский университет», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5672-9509>

e-mail: davidovvv@bsmu.by

Анисько Людмила Александровна, к.м.н., доцент, доцент кафедры инфекционных болезней, УО «Белорусский государственный медицинский университет»; врач высшей категории, заведующая лабораторией, УЗ «Городская клиническая инфекционная больница», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5466-2590>

e-mail: luidok@mail.ru

Рогачева Тамара Альбертовна, к.м.н., доцент, доцент кафедры инфекционных болезней, УО «Белорусский государственный медицинский университет»; врач лабораторной диагностики высшей квалификации, УЗ «Городская клиническая инфекционная больница», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3729-5730>

Баюр Надежда Геннадьевна, внешний совместитель кафедры инфекционных болезней, УО «Белорусский государственный медицинский университет»; биолог клинико-диагностической лаборатории, УЗ «Городская клиническая инфекционная больница», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-1752-5440>

e-mail: dan12.10@mail.ru

Щука Наталья Владимировна, научный сотрудник, УП «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

Смирский Владимир Викторович, к.х.н., директор УП «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

Михайлов Михаил Иванович, д.м.н., профессор, член-корр. РАН, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией вирусных гепатитов, ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И.И. Мечникова»; главный научный сотрудник, ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Мытько Юлия Александровна, научный сотрудник, УП «Хозрасчетное опытное производство Института биоорганической химии Национальной академии наук Беларуси», Минск, Беларусь

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-8611-2844>

Зверев Виталий Васильевич, д.б.н., профессор, академик РАН, заведующий кафедрой микробиологии, вирусологии и иммунологии, ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет имени И. М. Сеченова (Сеченовский Университет)» Министерства здравоохранения Российской Федерации; научный руководитель ФГБНУ «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток имени И. И. Мечникова», Москва, Россия

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

Lyubov N. Nesterenko, Candidate of Chemical Sciences, Leading Researcher of the Laboratory of Cloning of Viral Genomes, I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute, Moscow, Russia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3825-3906>

Vladimir V. Davydov, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Biology, Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5672-9509>

e-mail: davidovvv@bsmu.by

Lyudmila A. Anisko, Candidate of Medical Sciences, Associate professor, Associate professor at the Departments of Infectious Diseases, Belarusian State Medical University; Board Certified Physician, Head of the Laboratory, City Clinical Hospital of Infectious Diseases, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-5466-2590>

e-mail: luidok@mail.ru

Tamara A. Rogacheva, Candidate of Medical Sciences, Associate professor, Associate Professor at the Departments of Infectious Diseases, Belarusian State Medical University; Board Certified in Laboratory Diagnostics, City Clinical Hospital of Infectious Diseases, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3729-5730>

Nadzeya G. Bayur, External Part-timer of the Department of Infectious Diseases, Belarusian State Medical University; Biologists at the Clinical Diagnostic Laboratory, City Clinical Hospital of Infectious Diseases, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0009-0008-1752-5440>

e-mail: dan12.10@mail.ru

Natalia V. Shchuka, Researcher, Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Vladimir V. Simirsky, Candidate of Technical Sciences, Director of the Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

Mikhail I. Mikhailov, Doctor of Medical Sciences, Professor, Corresponding Member of the Russian Academy of Sciences, Chief Researcher, Head of the Laboratory of Viral Hepatitis, I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute; Chief Researcher of the Central Research Institute of Epidemiology of Rospotrebnadzor, Moscow, Russia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6636-6801>

Yulia A. Mytko, Researcher, Pilot Production of the Institute of Bioorganic Chemistry National Academy of Sciences of Belarus, Minsk, Belarus

ORCID: <https://orcid.org/0009-0000-8611-2844>

Vitaly V. Zverev, Doctor of Biological Sciences, Professor, Academician of the Russian Academy of Sciences, Head of the Department of Microbiology, Virology and Immunology, I.M. Sechenov First Moscow State Medical University (Sechenovskiy University); Academic Advisor, I.I. Mechnikov Vaccine and Serum Research Institute, Moscow, Russia

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-0017-1892>

Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Задора Илона Сергеевна
e-mail: zadora-ilona@mail.ru

Ilona S. Zadora
e-mail: zadora-ilona@mail.ru

Поступила в редакцию / Received 08.04.2025

Поступила после рецензирования / Accepted 30.04.2024

Принята к публикации / Revised 12.05.2025