

БАТУРИН АРТЕМ АЛЕКСАНДРОВИЧ

**ДИФФЕРЕНЦИАЦИЯ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА,
ЦИРКУЛИРУЮЩЕГО НА ТЕРРИТОРИИ ЕВРОПЕЙСКОЙ ЧАСТИ
РОССИИ**

1.5.10 – вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Работа выполнена в Федеральном казённом учреждении здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Научный руководитель: **Ткаченко Галина Александровна**, кандидат медицинских наук, доцент, ведущий научный сотрудник, Федеральное казённое учреждение здравоохранения «Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Официальные оппоненты: **Беклемишев Анатолий Борисович**, доктор биологических наук, профессор, руководитель лаборатории геномной инженерии, Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины» Научно-исследовательский институт биохимии

Дедков Владимир Георгиевич, кандидат медицинских наук, заместитель директора по научной работе, Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Ведущая организация: Федеральное бюджетное учреждение науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека

Защита состоится «__» 20__ г. в__ на заседании диссертационного совета 64.1.001.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека по адресу: 630559, р. п. Кольцово, Новосибирская область, тел.: +7(383) 363-47-00.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора <http://www.vector.nsc.ru>.

Автореферат разослан «__» _____ 20__ г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Непомнящих Татьяна Сергеевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) – природно-очаговая арбовирусная инфекция с трансмиссивным механизмом передачи, имеющая глобальное распространение. Клинические проявления ЛЗН разнообразны и варьируют от бессимптомного течения до развития тяжелых форм менингита и менингоэнцефалита [Львов, 2000; Sejvar et al., 2016]. Тяжесть заболевания определяется как вирулентностью возбудителя, так и иммунным статусом инфицированного.

Возбудителем заболевания является вирус Западного Нила (ВЗН, West Nile virus), который принадлежит семейству *Flaviviridae*, роду *Orthoflavivirus*, виду *Orthoflavivirus nilense* (ICTV, Release 2022). Впервые ВЗН был обнаружен в крови жительницы Уганды в 1937 году [Smithburn et al., 1940]. Дальнейшие исследования показали, что вирус широко распространен в пределах экваториального, тропического и умеренного климатических поясов в Африке, Европе, Америке, Азии и Австралии [Руководство, 2013]. В бывшем СССР циркуляция вируса и спорадическая заболеваемость установлены в Астраханской области с 1963 года [Львов и др., 2008; Руководство, 2013]. Самая крупная вспышка ЛЗН в России зарегистрирована в 1999 году. В дальнейшем на территории Российской Федерации случаи ЛЗН стали регистрировать ежегодно.

Геномы различных штаммов ВЗН характеризуются значительной генетической вариабельностью. По современным данным изоляты ВЗН можно разделить на 9 генотипов (генетических линий) [Pachler et al., 2014; Rizzoli et al., 2015]. В России зарегистрирована циркуляция ВЗН генотипов 1, 2 и 4 [Субботина и др., 2014].

На сегодняшний день предложено множество способов внутривидовой дифференциации возбудителя ЛЗН. Большинство из них основано на секвенировании полного генома ВЗН или его участков. Одной из первых и основополагающих стала работа F. Berthet с коллегами [Berthet et al., 1997]. Авторам удалось разделить штаммы ВЗН, выделенные на территории Африки, на 2 генотипа. Сравнительное исследование было построено на анализе нуклеотидной последовательности участка гена оболочечного белка E ВЗН. В работе Javier Del Amo описан подход одновременного выявления и дифференциации вируса Западного Нила 1 и 2 генотипов, а также вируса Усуту, методом количественной мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени с применением технологии «TaqMan» [Del Amo et al., 2013]. Разработаны олигонуклеотидные праймеры для идентификации 1a, 1b, 2 и 4 генотипов ВЗН методом секвенирования фрагментов генома [Жуков, 2013]. Для определения полногеномной нуклеотидной последовательности штаммов ВЗН 1, 2 и 4 генотипов методом секвенирования по Сенгеру известны специфичные праймеры, предложенные А.Г. Прилиповым [Прилипов, 2015]. Однако способ генотипирования, основанный на секвенировании, может быть реализован только для образцов с высокой концентрацией вирусной РНК, что снижает эффективность применения секвенирования для определения генотипа ВЗН в нативном материале.

Известны зарегистрированные на территории России коммерческие наборы реагентов для обнаружения РНК ВЗН в биологическом материале: «АмплиСенс WNV-FL» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия), «ОМ-скрин ЛЗН/ЛДР-РВ» (ЗАО «Синтол», Россия), «ГенНил-РЭФ» (ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, Россия). Однако с помощью данных наборов возможно только выявление генетического материала ВЗН без дифференциации его генетических линий. В настоящее время в России зарегистрированных медицинских изделий для обнаружения и дифференциации генотипов ВЗН методом ОТ-ПЦР с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов не разработано.

Таким образом, приведенные данные указывают на актуальность исследования, направленного на конструирование набора реагентов для дифференциации генотипов ВЗН методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени, что позволит усовершенствовать схему лабораторной диагностики ЛЗН.

Цель исследования

Разработка методического подхода для выявления и дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией результатов и его применение для изучения особенностей циркуляции генотипов возбудителя лихорадки Западного Нила на территории европейской части России.

Задачи исследования

1. Выбрать на основании сравнительного анализа полноразмерных нуклеотидных последовательностей геномов вируса Западного Нила РНК-мишени и разработать специфичные олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды для дифференциации 1, 2 и 4 генотипов возбудителя ЛЗН методом ОТ-ПЦР.

2. Сконструировать рекомбинантные штаммы *Escherichia coli* – продуценты плазмид, несущих участки генома вируса Западного Нила, предназначенные для использования в качестве контрольных образцов при оценке эффективности амплификации выбранных мишеней.

3. Оптимизировать условия амплификации и разработать набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

4. Определить функциональные характеристики разработанного набора реагентов при исследовании проб клинического, аутопсийного, энтомологического и зоологического материала методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.

5. Установить генотипы вируса Западного Нила методами полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и секвенирования в образцах биологического материала, полученных из Референс-центра по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила.

6. Изучить особенности циркуляции и распространенности генотипов вируса Западного Нила в различных регионах европейской части России.

Научная новизна

Впервые сконструированы 3 пары олигонуклеотидных праймеров (*WNV-1type-F/WNV-1type-R*, *WNV-2type-F/WNV-2type-R*, *WNV-4type-F/WNV-4type-R*) и 3 флуоресцентно-меченых зонда (*WNV-1type-P*, *WNV-2type-P*, *WNV-4type-P*), комплементарные фрагменту гена полипротеина (*flavivirus polyprotein gene*), кодирующего капсидный белок, для идентификации вируса Западного Нила 1, 2 и 4 генотипов.

Впервые сконструированы 3 штамма бактерий *E. coli* (JM 109 1-430, JM 109 2-428, JM 109 4-162) – продуценты рекомбинантных плазмид (pWNV1protC, pWNV2protC, pWNV4protC), несущих последовательность 5'-нетранслируемой области и участка гена полипротеина вируса Западного Нила 1, 2 и 4 генотипов соответственно.

Научная новизна сконструированных олигонуклеотидов и штаммов-продуцентов рекомбинантных плазмид подтверждена шестью патентами РФ на изобретение.

С использованием сконструированных олигонуклеотидов и рекомбинантных плазмид разработан «Набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила (*West Nile virus*) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» по ТУ 21.20.23-015-01898084-2019».

Получены новые данные об особенностях циркуляции и распространенности генотипов ВЗН в различных регионах европейской части России. В 2010 – 2022 гг. циркулировал ВЗН 1, 2 и 4 генотипов. Установлено доминирование ВЗН генотипа 2 в большинстве субъектов европейской части России, входивших в исследование.

Теоретическая и практическая значимость работы

Разработан методический подход для генотипирования вируса Западного Нила на основе полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени, который позволит повысить эффективность эпидемиологического мониторинга за возбудителем ЛЗН.

Сконструирован набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» для выявления и дифференциации генотипов 1, 2, 4 вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией в пробах клинического (кровь, плазма и сыворотка крови, лейкоцитарная фракция крови, спинномозговая жидкость, моча), аутопсийного (головной мозг, печень, селезенка, почки) материала от человека, а также зооэнтмологического материала (суспензии органов животных, комаров и клещей).

Определены генотипы ВЗН, циркулирующего на территории европейской части России в период с 2010 по 2022 гг., с помощью методов ОТ-ПЦР в реальном времени и секвенирования.

Депонированы штаммы бактерий *E. coli* JM109 1-430, *E. coli* JM109 2-428, *E. coli* JM109 4-162, являющиеся продуцентами рекомбинантных плазмид

pWNV1protC, pWNV2protC, pWNV4protC соответственно, несущих участки генома вируса Западного Нила, в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Роспотребнадзора под номерами КМ 2049, КМ 2050, КМ 2051 соответственно.

Проведены контрольные лабораторные испытания для оценки аналитической чувствительности и специфичности разработанного набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» (Протокол № 5/19 от 22.05.2019 г. утвержден директором института ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский институт Роспотребнадзора и согласован с генеральным директором ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора 22.05.2019).

Проведены технические и клинические испытания для подтверждения функциональных характеристик набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» для представления к государственной регистрации в Федеральную службу по надзору в сфере здравоохранения в качестве медицинского изделия (Акт оценки результатов технических испытаний № ВМ-05-06/21 от 26.05.2021 г.; Акт оценки результатов клинических испытаний № ВМ-05-06/21-КИ от 27.11.2021 г.).

Завершены этапы государственной экспертизы в Росздравнадзоре, получено регистрационное удостоверение РЗН 2022/17020 от 27.04.2022 г., разрешены производство, реализация и применение медицинского изделия в лабораторной практике.

Разработанный методический подход используют специалисты в Референс-центре по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора для определения генотипов ВЗН при проведении эпидемиологического мониторинга (акт внедрения от 24.07.2019 г.).

Материалы диссертации используют сотрудники при проведении практических занятий и чтении лекций в рамках дополнительного профессионального образования по программам профессиональной переподготовки и повышения квалификации специалистов на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (акт внедрения от 03.06.2019 г.).

Методология и методы исследования

В работе были использованы молекулярно-генетические методы исследования (молекулярное клонирование, полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией, секвенирование) и биоинформационный анализ.

Положения, выносимые на защиту

1. Олигонуклеотидные праймеры *WNV-1type-F/WNV-1type-R*, *WNV-2type-F/WNV-2type-R*, *WNV-4type-F/WNV-4type-R* и флуоресцентно-меченые зонды *WNV-1type-P*, *WNV-2type-P*, *WNV-4type-P*, сконструированные на основе фрагмента гена полипротеина вируса Западного Нила, кодирующего капсидный белок, позволяют выявлять и дифференцировать 1, 2 и 4 генотипы вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентным учетом результатов в режиме реального времени.

2. Рекомбинантные штаммы *E. coli* JM109 1-430, *E. coli* JM109 2-428, *E. coli* JM109 4-162 стабильно продуцируют плазмиды pWNV1protC, pWNV2protC, pWNV4protC, несущие участки генома вируса Западного Нила 1, 2 и 4 генотипов, что позволяет их использовать в качестве положительных контрольных образцов.

3. Разработанный набор реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» обладает аналитической чувствительностью 1×10^4 ГЭ/мл, аналитической специфичностью – 100%, диагностической чувствительностью – 98,5%, диагностической специфичностью – 99% при исследовании проб клинического, аутопсийного, энтомологического и зоологического материала на наличие РНК вируса Западного Нила генотипов 1, 2 и 4.

4. Распространенность генотипа 2 преобладает над генотипами 1 и 4 вируса Западного Нила, циркулирующего на территории европейской части России.

Степень достоверности и апробация результатов

Научные положения и выводы, сформулированные в диссертационной работе, основываются на фактических данных, представленных в материале диссертации. Достоверность результатов, полученных в работе, подтверждена постановкой экспериментов в нескольких повторах. Результаты экспериментальных исследований обработаны с использованием методов статистического анализа. Работа выполнена на сертифицированном и прошедшем метрологическую поверку оборудовании.

Материалы диссертации представлены на ежегодных научно-практических конференциях: Очный осенний итоговый отбор победителей программы «Участник молодежного научно-инновационного конкурса» (Волжский, 2013 г.); Итоговая научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора «Эпидемиология и микробиологические аспекты инфекционных болезней, современные методы лабораторной диагностики» (Волгоград, 2017 г., 2022 г.); X Всероссийская научно-практическая конференция молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора «Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены» (Московская область, Лужки, 2018 г.); XI, XIII, XIV, XV Ежегодный Всероссийский Конгресс по инфекционным болезням с международным участием «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы» (Москва, 2019 г., 2021 г., 2022 г., 2023 г.).

Материалы диссертации вошли в отчеты по проведенным контрольным лабораторным, техническим и клиническим испытаниям набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4».

Публикации результатов исследования

По теме диссертации опубликовано 22 научные работы, из них 8 статей в периодических изданиях из перечня ведущих рецензируемых научных журналов, рекомендованных ВАК РФ и 6 патентов на изобретения.

Связь работы с научными программами и личный вклад автора в исследования

Работа выполнена на базе лаборатории генодиагностики особо опасных инфекций ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт

Роспотребнадзора в рамках плановых научно-исследовательских тем: «Эпидемиологический мониторинг за возбудителем лихорадки Западного Нила на территории Российской Федерации» (шифр темы 076-1-13, № гос. регистрации 01201351984), «Изучение генетических особенностей и экологическая характеристика возбудителей вирусных природно-очаговых инфекционных болезней юга европейской части России (шифр темы 3-1-16, № гос. регистрации АААА-А16-116022510097-4), «Конструирование диагностических наборов реагентов и внедрение их в практику для ускоренной диагностики некоторых особо опасных инфекций методом мультилокусной ПЦР» (шифр темы 086-2-16, № гос. регистрации АААА-А17-117022850059-6), «Совершенствование эпидемиологического надзора за глобально распространяющимися арбовирусными инфекциями, передающимися комарами» (шифр темы 092-1-18, № гос. регистрации АААА-А19-119091390007-4), «Разработка и внедрение новых средств диагностики инфекционных заболеваний бактериальной и вирусной природы» (шифр темы 093-2-19, № гос. регистрации АААА-А20-120012490014-2). В НИР 093-2-19 соискатель являлся ответственным исполнителем.

Личный вклад автора диссертации Батурина А.А. состоит в планировании экспериментальной работы для решения задач исследования, анализе литературных данных по проблеме, выборе оптимальных РНК-мишеней для дифференциации генотипов 1, 2 и 4 возбудителя ЛЗН, подборе на их основе специфичных праймеров и зондов, конструировании положительных контрольных образцов для оценки эффективности амплификации выбранных мишеней, разработке набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила, участии в проведении контрольных лабораторных, технических и клинических испытаний разработанного набора реагентов, осуществлении генотипирования вируса Западного Нила методами ОТ-ПЦР и секвенирования, обработке экспериментальных данных, написании статей по теме диссертации и оформлении патентов на изобретения.

Отдельные этапы исследования выполнены совместно с научными сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора и ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 119 листах компьютерного текста, состоит из введения, обзора литературы, 4 глав собственных исследований, заключения, выводов, перечня сокращений и списка литературы, включающего 217 источников, в том числе 30 отечественных и 187 – зарубежных авторов. Работа иллюстрирована 8 рисунками и 15 таблицами.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы

Объектами исследования служили пробы РНК и кДНК 12 штаммов вирусов (5 – West Nile virus и 7 штаммов гетерологичных вирусов), ДНК 4 штаммов бактерий (2 – *E. coli* и 2 штамма гетерологичных бактерий), 411 проб клинического и

зооэнтомологического материала, инфицированного вирусом Западного Нила. Все работы с ПБА проводили в соответствии с СанПиН 3.3686-21, МУ 1.3.2569-09.

Выделение тотальной РНК и ДНК из проб осуществляли с использованием коммерческих наборов «РИБО-золь-С» и «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Выделение плазмидной ДНК осуществляли щелочным методом, предложенным Бирнбоймом и Доли [Плазмиды, 1989].

Реакцию обратной транскрипции с образцами РНК ВЗН проводили посредством комплекта реагентов «РЕВЕРТА-L» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора) в соответствии с инструкцией производителя.

Конструирование рекомбинантных молекул ДНК осуществляли рестриктазно-лигазным методом. В качестве клонирующего вектора использовали плазмиду pUC19 (Thermo Scientific, США). Для получения фрагментов генома ВЗН 1 и 2 генотипов, необходимых при встраивании в вектор, проводили ОТ-ПЦР с использованием РНК ВЗН и праймеров, несущих на 5'-концах сайты рестрикции для эндонуклеаз XbaI и EcoRI. Фрагмент генома ВЗН 4 генотипа получали путем химического синтеза на приборе ASM-800 (ООО «Биоссет», Россия) с последующей амплификацией методом ПЦР. Рестрикцию клонируемых участков и вектора проводили в одной реакционной смеси посредством рестриктаз XbaI и EcoRI (Thermo Scientific, США). Лигирование осуществляли с использованием лигазы фага T4 (Invitrogen, США). Рекомбинантные клоны отбирали методом бело-синей селекции на среде LB, содержащей X-gal (Thermo Scientific, США) и IPTG (Invitrogen, США).

ОТ-ПЦР проводили на приборах «Rotor-Gene 6000» (Corbett Research, Австралия), «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия). Секвенирование ВЗН осуществляли на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). Наличие РНК ВЗН в положительных образцах и отсутствие РНК ВЗН в отрицательных образцах подтверждали методом ОТ-ПЦР в реальном времени с использованием набора реагентов «АмплиСенс WNV-FL» (ФСР 2011/11503) (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия). Реакцию проводили согласно инструкции производителя.

Для анализа геномов ВЗН использовали нуклеотидные последовательности, представленные на сайте Национального Центра Биотехнологической Информации США (GenBank NCBI <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). При конструировании праймеров и зондов применяли программы Oligo 7 (Molecular Biology Insights Inc., США), PerlPrimer v1.1.21 (SourceForge, США). Результаты секвенирования анализировали с помощью программы Nucleotide BLAST (NCBI, США). Филогенетическое дерево строили методом Neighbor-joining с использованием модели для подсчета матрицы расстояний Kimura 2 посредством компьютерной программы MEGA 7 (Pennsylvania State University, США). Статистическую достоверность полученных результатов исследований оценивали при доверительной вероятности 90%, используя формулу биномиального распределения Бернулли [Зарядов, 2010].

Результаты исследований

Разработка набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. С целью выбора РНК-мишеней и конструирования олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов, необходимых для создания диагностического набора реагентов, проведен сравнительный анализ 350 геномов ВЗН, депонированных в международной генетической базе данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Наибольший процент генетического сходства получен для участков генома ВЗН, кодирующих капсидный белок protC (64,0%) и неструктурные белки NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (51,5 – 57,5%). При конструировании праймеров, предназначенных для идентификации ВЗН 1, 2 и 4 генотипов, был выбран участок гена полипротеина (*flavivirus polyprotein gene*), кодирующий белок protC (GenBank NCBI, GeneID: 912267). К выбранному участку подобраны три пары специфичных праймеров. Каждая пара праймеров фланкировала участок гена полипротеина ВЗН определенного генотипа. Для детекции ампликонов, специфичных для 1, 2 и 4 генотипов ВЗН, сконструированы три гибридизационных зонда по типу молекулярного маяка, меченых флуорофорами FAM, ROX и JOE.

Для контроля эффективности амплификации, изучения аналитической чувствительности и специфичности разработанных праймеров и зондов сконструированы положительные контрольные образцы ВЗН генотипов 1, 2 и 4. Для этого клонировали в клетках *E. coli* специфичные участки генома ВЗН в составе плазмидного вектора. В результате проведенных генно-инженерных манипуляций получено 3 рекомбинантных штамма: *E. coli* JM 109 1-430 (продуцент плазмиды pWNV1protC), *E. coli* JM 109 2-428 (продуцент плазмиды pWNV2protC), *E. coli* JM 109 4-162 (продуцент плазмиды pWNV4protC), несущих участки генома ВЗН генотипов 1 (430 п.н.), 2 (428 п.н.) и 4 (162 п.н.) соответственно.

Для подтверждения присутствия клонированных участков генома ВЗН в составе рекомбинантных плазмид ДНК трансформантов исследовали методами ПЦР и секвенирования с праймерами Universal M13 (Invitrogen, США). В качестве образца сравнения использовали ДНК плазмиды pUC19. Поскольку мишенями для отжига праймеров Universal M13 являлись участки плазмид, фланкирующие область вставки, расчетная длина полученных ампликонов превышала размеры вставок и составляла для плазмид pWNV1protC, pWNV2protC, pWNV4protC – 514, 512 и 244 п.н. соответственно. Размеры полученных специфичных ампликонов свидетельствовали о наличии в составе рекомбинантных плазмид клонируемых участков генома ВЗН (рисунок 1). По результатам секвенирования ампликонов нуклеотидные последовательности показали 100%-ную степень гомологии с последовательностями РНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов, взятых для клонирования. Это подтверждало наличие фрагментов генома ВЗН генотипов 1, 2 и 4 в составе рекомбинантных плазмид pWNV1protC, pWNV2protC, pWNV4protC, продуцируемых штаммами *E. coli* JM109 1-430, *E. coli* JM109 2-428, *E. coli* JM109 4-162.

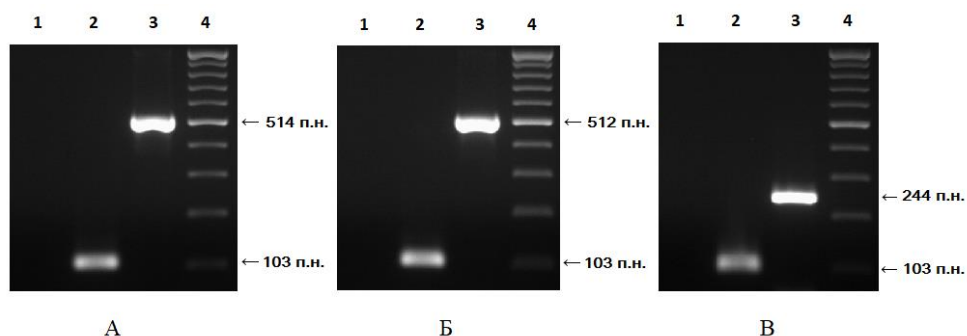


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации с помощью универсальных праймеров Universal M13 участка полилинкера исходного плазмидного вектора pUC19 и сконструированной рекомбинантной плазмиды pWNV1protC (А), pWNV2protC (Б), pWNV4protC (В)

1 – отрицательный контроль, 2 – ампликон, соответствующий фрагменту исходной плазмиды pUC19 без вставки, 3 – ампликон со вставкой, соответствующий фрагменту рекомбинантной плазмиды, 4 – маркер молекулярных масс 100-1000 п.н.

Сконструированные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды для выявления и дифференциации генотипов ВЗН использовали для отработки оптимальных условий ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Подбор параметров реакции проводили при исследовании образцов РНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов и ДНК рекомбинантных плазмид pWNV1protC, pWNV2protC, pWNV4protC, несущих фрагменты генома ВЗН.

В ходе экспериментальной работы установлено, что для проведения ОТ-ПЦР с целью выявления и дифференциации ВЗН генотипов 1, 2 и 4, в реакционной смеси оптимальная концентрация составляла для праймеров по 12 пмоль каждого, зондов – по 6 пмоль, дНТФ (эквимольярная смесь дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ) каждого в концентрации 0,2 мМ, хлорида магния – 2,5 мМ, ревертазы MM1v – 50 ед., Taq-*F*-ДНК полимеразы – 2,5 ед. Оптимальный режим ОТ-ПЦР-РВ для разработанных праймеров и зондов включал: обратную транскрипцию при 50 °С - 30 мин; предварительную денатурацию при 95 °С - 15 мин; первое циклирование (5 повторений) - денатурация при 95 °С - 5 с; отжиг праймеров при 56 °С - 25 с; элонгация цепи при 72 °С - 15 с; второе циклирование (40 повторений) - денатурация при 95 °С - 5 с; отжиг праймеров при 56 °С - 25 с; элонгация цепи при 72 °С - 15 с. Детекцию накопления продуктов реакции осуществляли на этапе отжига праймеров при проведении второго циклирования. Оптимальное значение уровня пороговой линии составило 0,03. По каналу FAM/Green детектировали продукт амплификации кДНК ВЗН 1 генотипа, по каналу ROX/Orange – кДНК ВЗН 2 генотипа, по каналу JOE/Yellow – кДНК ВЗН 4 генотипа (рисунок 2).

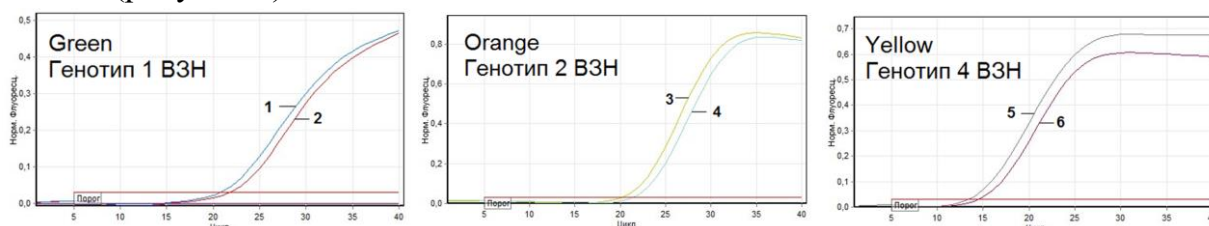


Рисунок 2 – Кривые нарастания флуоресценции, полученные при оптимальном режиме ОТ-ПЦР в реальном времени

1 - ДНК плазмиды pWNV1protC, 2 - РНК ВЗН 1 генотипа, 3 - ДНК плазмиды pWNV2protC, 4 - РНК ВЗН 2 генотипа, 5 - ДНК плазмиды pWNV4protC, 6 - РНК ВЗН 4 генотипа

Таким образом, проведен сравнительный анализ геномов ВЗН с помощью данных из генетической базы GenBank NCBI и компьютерных программ, выбраны специфичные РНК-мишени, сконструированы олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды, позволяющие выявлять и дифференцировать 1, 2 и 4 генотипы ВЗН методом ОТ-ПЦР; получены рекомбинантные штаммы *E. coli*, перспективные для использования в качестве положительных контрольных образцов при выявлении ВЗН 1, 2 и 4 генотипов методом ОТ-ПЦР; подобраны оптимальные условия проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени, а также определены критерии оценки результатов реакции с разработанными праймерами и зондами.

Оценка функциональных характеристик набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. На основе сконструированных олигонуклеотидов и рекомбинантных штаммов, предназначенных для использования в качестве положительных контрольных образцов, разработан экспериментальный «Набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила (*West Nile virus*) методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» по ТУ 21.20.23-015-01898084-2019». На набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» разработана техническая (Технические условия ТУ 21.20.23-015-01898084-2019, Промышленный регламент ПР 01898084-15-19) и эксплуатационная (инструкция по применению, макет маркировки внешней и внутренней упаковки, паспорт) документация.

Для определения функциональных характеристик набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» разработаны стандартные образцы предприятия кДНК вируса Западного Нила, близкородственных и гетерологичных вирусов: стандартный образец предприятия кДНК вируса Западного Нила 1 генотипа – СОП кДНК *WNV*-1 (раствор ДНК плазмиды p*WNV*1protC), стандартный образец предприятия кДНК вируса Западного Нила 2 генотипа – СОП кДНК *WNV*-2 (раствор ДНК плазмиды p*WNV*2protC), стандартный образец предприятия кДНК вируса Западного Нила 4 генотипа – СОП кДНК *WNV*-4 (раствор ДНК плазмиды p*WNV*4protC), стандартный образец предприятия кДНК вируса желтой лихорадки – СОП кДНК *YFV* (раствор кДНК Yellow fever virus, полученный из аттенуированного штамма Yellow fever virus 17D), стандартный образец предприятия кДНК вируса краснухи – СОП кДНК *RUBV* (раствор кДНК Rubella virus, полученный из аттенуированного штамма Rubella virus RA 27/3).

Изучение аналитических и диагностических характеристик набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» осуществляли в рамках контрольных лабораторных, технических и клинических испытаний.

Контрольные лабораторные испытания проведены на базе лаборатории молекулярной эпидемиологии ООИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и лаборатории генодиагностики ООИ ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Определение аналитической чувствительности набора осуществляли с использованием 3 стандартных образцов предприятия ВЗН 1, 2 и 4 генотипов (СОП кДНК WNV-1, СОП кДНК WNV-2, СОП кДНК WNV-4) в концентрациях 1×10^3 , 1×10^4 , 1×10^5 ГЭ/мл для каждого образца. Определение аналитической специфичности набора реагентов осуществляли на 39 пробах, из них: 3 стандартных образца предприятия кДНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов (СОП кДНК WNV-1, СОП кДНК WNV-2, СОП кДНК WNV-4) в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл; 12 образцов кДНК штаммов вирусов (West Nile virus Tomsk/Bird/2006/A4 (генотип 1), West Nile virus Volgograd 601/18 (генотип 2), West Nile virus Volgograd 696/18 (генотип 2), West Nile virus Volgograd 723/18 (генотип 2), West Nile virus Volgograd 829/18 (генотип 2), Chikungunya virus Ross late 4669, Dengue virus DENV-1/8/Tailand/01/2013, Dengue virus DENV-2/131/Philippines/12/2013, Dengue virus DENV-4/122/Vietnam/11/2013, Tick-borne encephalitis virus 205, Yellow fever virus 17D, Rubella virus RA 27/3 в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл); 4 образца ДНК штаммов бактерий (*E. coli* ATCC 25923, *E. coli* JM109, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* 4000 в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл); 6 образцов РНК ВЗН 1 генотипа из биологического материала (1 проба цельной крови человека, 1 проба сыворотки крови человека, 3 пробы суспензий головного мозга человека, 1 проба суспензии пула комаров *Cx. pipiens*); 7 образцов РНК ВЗН 2 генотипа из биологического материала (2 пробы цельной крови человека, по 1 пробе сыворотки крови, мочи, суспензии головного мозга человека, суспензии пула комаров *Cx. pipiens*, суспензии пула комаров *Cx. modestus*); 7 образцов РНК ВЗН 4 генотипа из биологического материала (суспензии пулов комаров *Uranotaenia unguiculata*).

В ходе контрольных лабораторных испытаний установлено, что аналитическая чувствительность набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» при исследовании проб, содержащих кДНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов составила 1×10^4 ГЭ/мл; аналитическая специфичность набора при исследовании проб, содержащих кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл, составила 100%; межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для проб биологического материала, содержащих РНК и кДНК ВЗН, составила 100% (Протокол № 5/19 от 22.05.2019 г.).

Технические и клинические испытания были проведены на базе лаборатории генодиагностики ООИ ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора совместно с экспертами испытательной лаборатории ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР».

При проведении технических испытаний подтверждены функциональные характеристики и эффективность применения набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4», а также согласованы вид, класс потенциального риска применения в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий. В результате испытаний проведена оценка и анализ данных, относящихся к аналитическим характеристикам медицинского изделия. Полученные результаты были оценены

экспертами как положительные. Оформлен акт оценки результатов технических испытаний № ВМ-05-06/21 от 26.05.2021 г.

В ходе клинических испытаний проанализированы 2 серии набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4», одну из которых исследовали в двух повторах. Общее количество образцов составило 420.

Для определения диагностической чувствительности протестировано: 108 образцов клинического материала от пациентов, инфицированных *West Nile virus*; 36 образцов клинического материала, искусственно контаминированного стандартными образцами предприятия *West Nile virus* (СОП кДНК *WNV-1*, СОП кДНК *WNV-2*, СОП кДНК *WNV-4*); 99 образцов биологического материала от животных, комаров и клещей, инфицированных *West Nile virus*; 33 образца биологического материала от животных и клещей, искусственно контаминированного стандартными образцами предприятия *West Nile virus* (СОП кДНК *WNV-1*, СОП кДНК *WNV-2*, СОП кДНК *WNV-4*).

Для определения диагностической специфичности использовано: 54 образца клинического материала от пациентов, инфицированных *Dengue virus* 1, 2, 3 типов, *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, *Neisseria meningitidis*; 18 образцов клинического материала, искусственно контаминированного стандартными образцами предприятия *Yellow fever virus*, *Rubella virus* (СОП кДНК *YFV*, СОП кДНК *RUBV*); 54 образца биологического материала от клещей, инфицированных *Crimean-Congo hemorrhagic fever virus*, *Borrelia burgdorferi s.l.*; 18 образцов биологического материала от животных и комаров, искусственно контаминированного стандартными образцами предприятия *Yellow fever virus*, *Rubella virus* (СОП кДНК *YFV*, СОП кДНК *RUBV*).

В ходе работы установлено, что диагностическая чувствительность набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов 1, 2 и 4 вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией при исследовании 276 проб, содержащих РНК и кДНК ВЗН генотипов 1, 2 и 4 составила 98,5% с доверительной вероятностью 90%; диагностическая специфичность набора реагентов при исследовании 144 проб, содержащих гетерологичные вирусы и бактерии, составила 99% с доверительной вероятностью 90%; межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех образцов составила 100%. Полученные результаты подтверждены с помощью метода сравнения – секвенирования (акт оценки результатов клинических испытаний № ВМ-05-06/21-КИ от 27.11.2021 г.).

На основании результатов технических и клинических испытаний набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» был представлен к государственной регистрации в Росздравнадзор в качестве медицинского изделия (Регистрационное досье РД 46456/91426 от 24.12.2021 г.). После завершения регламентированной процедуры государственной регистрации Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения принято положительное решение о регистрации медицинского изделия «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4», выдано регистрационное удостоверение

РЗН 2022/17020 от 27.04.2022 г. и разрешены производство, реализация и применение разработанного набора.

Генотипирование вируса Западного Нила на основе методов ОТ-ПЦР и секвенирования. Дифференциацию генотипов ВЗН методом ОТ-ПЦР в реальном времени с применением набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» осуществляли с использованием проб биологического материала, поступивших из 14 регионов европейской части России в Референс-центр по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила с 2010 по 2022 год. Ретроспективный анализ был проведен для 411 положительных проб (227 – клинического и 184 – зооэнтомологического материала) с вирусной нагрузкой, при которой значение порогового цикла Ct составляло не более 30 (Ct – cycle threshold).

В результате типирования методом ОТ-ПЦР проб РНК ВЗН, выделенных из клинического материала, 10 (4,41%) были отнесены к 1 генотипу (из Астраханской области, Краснодарского и Ставропольского краев, Республики Татарстан) и 217 (95,59%) – к генотипу 2 (из Астраханской, Волгоградской, Воронежской, Курской, Липецкой, Пензенской, Ростовской и Саратовской областей, Краснодарского и Ставропольского краев, Республик Дагестан и Крым). В пробах клинического материала РНК ВЗН генотипа 4 не обнаружена (Таблица 1).

Таблица 1 – Результаты генотипирования РНК вируса Западного Нила, выявленного в пробах клинического и зооэнтомологического материала методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Регион России	Общее количество исследованных проб	Количество проб с установленным генотипом ВЗН в клиническом/зооэнтомологическом материале		
		1 генотип	2 генотип	4 генотип
Астраханская область	24	7/0	3/14	0/0
Волгоградская область	211	0/5	91/112	0/3
Воронежская область	11	0/0	5/6	0/0
Курская область	3	0/0	3/0	0/0
Липецкая область	3	0/0	3/0	0/0
Пензенская область	1	0/0	1/0	0/0
Ростовская область	21	0/0	17/4	0/0
Саратовская область	102	0/0	81/21	0/0
Краснодарский край	10	1/0	9/0	0/0
Ставропольский край	5	1/0	2/2	0/0
Республика Дагестан	2	0/0	1/1	0/0
Республика Калмыкия	15	0/0	0/5	0/10
Республика Крым	2	0/0	1/0	0/1
Республика Татарстан	1	1/0	0/0	0/0
Всего	411	10/5	217/165	0/14

При типировании методом ОТ-ПЦР проб РНК ВЗН, выделенных из зоологического и энтомологического материала, 5 (2,72%) были отнесены к 1 генотипу (из Волгоградской области), 165 (89,67%) – к генотипу 2 (из Астраханской,

Волгоградской, Воронежской, Ростовской и Саратовской областей, Ставропольского края, Республик Дагестан и Калмыкия) и 14 (7,61%) – к генотипу 4 (из Волгоградской области, Республик Калмыкия и Крым) (Таблица 1). При этом ВЗН генотипа 1 выявлен в комарах *Aedes vexans*, *Coquillettidia richiardii*, *Culex pipiens* и у птиц *Larus cachinnans*. ВЗН генотипа 2 обнаружен: в комарах *Ae. caspius*, *Ae. geniculatus*, *Ae. pulchritarsis*, *Ae. vexans*, *Anopheles claviger*, *An. hyrcanus*, *An. maculipennis*, *Coquillettidia richiardii*, *Culex modestus*, *Cx. pipiens*; клещах *Hyalomma marginatum*; птицах *Aythya ferina*, *Corvus cornix*, *Corvus frugilegus*, *Corvus monedula*, *Larus argentatus*, *Luscinia svecica*, *Mareca strepera*, *Parus major*, *Pica pica*, *Phasianus colchicus*, *Podiceps cristatus*, *Sterna hirundo*. Генотип 4 ВЗН установлен для пулов комаров *Ur. unguiculata* и *Culex* spp.

Одновременно с использованием метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для подтверждения результатов ПЦР-типирования проведено секвенирование образцов РНК ВЗН, выделенных из проб клинического и зооэнтомологического материала. Анализ проводили по участку генома ВЗН размером 277 п.н., соответствующему 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) и локусу гена полипротеина, кодирующему капсидный белок (protC). Секвенированный фрагмент по локализации соответствовал позиции с 34 по 310 нуклеотид в геноме ВЗН (NCBI Reference Sequence: NC_001563).

При исследовании положительных проб методом секвенирования определить нуклеотидные последовательности ВЗН удалось в 31 случае (в пробах с высокой концентрацией вирусной РНК, Ct - 20). При сравнительном анализе нуклеотидных последовательностей ВЗН 1 генотипа из проб, собранных на территориях Астраханской и Волгоградской областей, а также Ставропольского края в период с 2012 по 2018 гг. (ASTRAKHAN 925-2012, ASTRAKHAN 143-2016, ASTRAKHAN 612-2018, STAVROPOL 810-2012, VOLGOGRAD 1115-2016), установлена высокая степень гомологии (99,28-99,64%) с последовательностью штамма ВЗН 1 генотипа, выделенного на территории Астраханской области в 1999 году (Ast99-901, GenBank AY278441) (Рисунок 3). Полученные результаты коррелировали с данными сравнительного анализа нуклеотидной последовательности (5'-UTR- protC) изолята ВЗН 141_Astr_03_M, выделенного в 2003 году специалистами ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора из пула комаров, отловленных на территории Астраханской области. Данный изолят был идентичен клиническому штамму ВЗН Ast99-901 [Платонов и др., 2011]. Нуклеотидная последовательность РНК ВЗН 1 генотипа, выделенная из пробы, собранной в 2018 году на территории Татарстана (TATARSTAN 435-2018), на дендрограмме формировала отдельную ветвь и не входила в группу астраханских штаммов. Гомология нуклеотидной последовательности TATARSTAN 435-2018 с аналогичными последовательностями для астраханского (Ast99-901, GenBank AY278441) и индийского (68856-ICDC-4, GenBank KT163243) штаммов составляла 98,56% и 96,75%, соответственно.

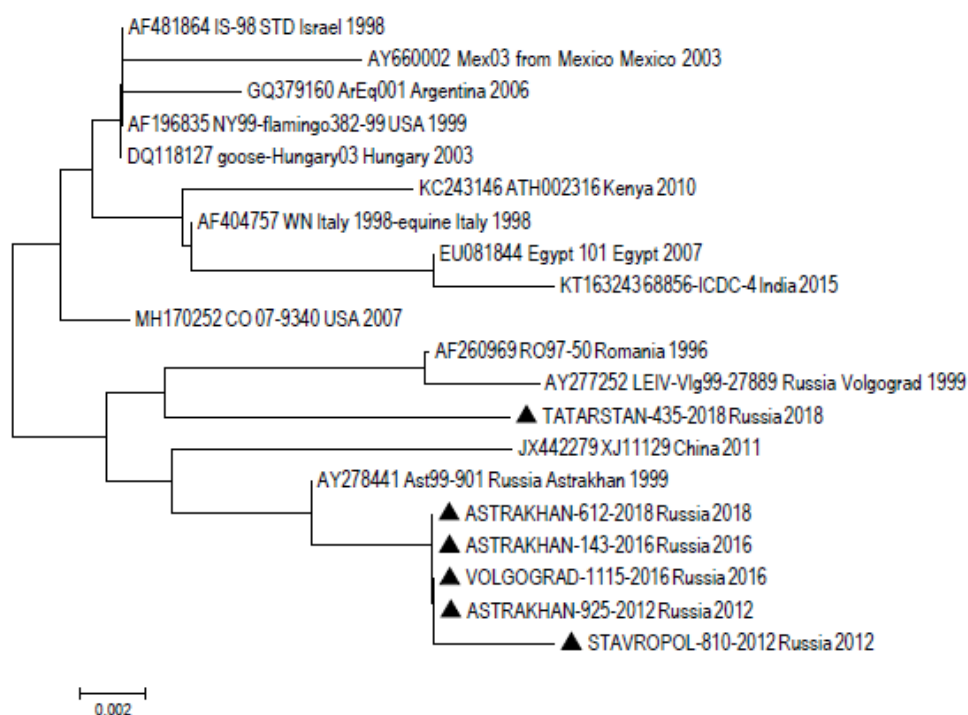


Рисунок 3 – Дендрограмма, построенная по локусу 5'-UTR-protC ВЗН 1 генотипа методом Neighbor-joining. Треугольниками отмечены образцы, секвенированные в ходе работы

Секвенирование образцов РНК ВЗН 2 генотипа, выделенных в разных регионах, показало их генетическую неоднородность, выражающуюся в наличии однонуклеотидных замен. Последовательности, полученные для образцов РНК ВЗН, выделенных до 2021 года на территориях Волгоградской, Ростовской и Саратовской областей, обладали гомологией до 99-100% с последовательностями РНК ВЗН 2 генотипа, циркулировавшего на территории Волгоградской области в 2007 году (Reb_VLG_07_H, GenBank FJ425721) и на территории Румынии в 2013 году (Hyalomma/Romania/2013, GenBank KJ934710) (Рисунок 4).

Похожие данные были получены А.Е. Платоновым с соавторами в 2010 году при секвенировании изолятов ВЗН, выявленных в аутоптатах и сыворотках крови пациентов из Волгоградской области. При этом отмечена гомология 99,5-99,9% с изолятами ВЗН, выделенными на той же территории в 2007 году [Платонов и др., 2011].

Для образца РНК ВЗН 2 генотипа из Воронежа VORONEZH 718-2018 полученная нуклеотидная последовательность имела 100%-ную гомологию с последовательностями РНК ВЗН 2 генотипа, циркулировавшего в период 2004-2015 гг. на территории Болгарии, Греции, Венгрии и Италии, что, возможно, свидетельствует о заносе вируса на территорию России из стран Европы.

Последовательности, полученные для проб РНК ВЗН, собранных в 2021 году в Астраханской, Волгоградской, Воронежской, Ростовской областях и Республике Дагестан, формировали отдельную группу и обладали меньшей гомологией с РНК ВЗН 2 генотипа, циркулировавшего на территории Волгоградской области в 2007 году.

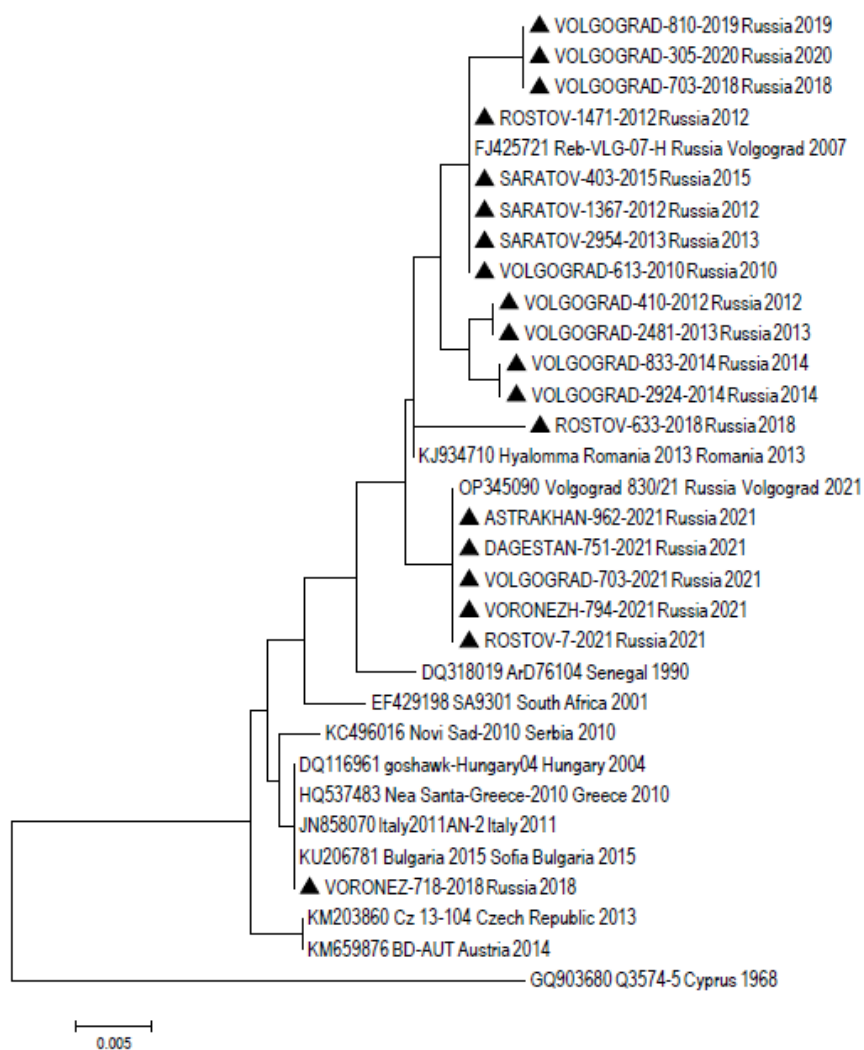


Рисунок 4 – Дендрограмма, построенная по локусу 5'-UTR-protC ВЗН 2 генотипа методом Neighbor-joining. Треугольниками отмечены образцы, секвенированные в ходе работы

При секвенировании образцов РНК ВЗН 4 генотипа из Волгоградской области и Республики Калмыкия была выявлена их идентичность волгоградскому изоляту (100%-ная гомология), выделенному в 2006 году (101_5-06-Uu, GenBank FJ159129). А последовательность, полученная для образца РНК ВЗН из Крыма (CRIMEA-1078-2018) существенно отличалась по числу и локализации нуклеотидных замен от остальных последовательностей генома ВЗН российских изолятов и формировала обособленную ветвь на дендрограмме (Рисунок 5). Гомология нуклеотидной последовательности ВЗН из Крыма (CRIMEA-1078-2018) с последовательностями прототипного штамма (LEIV-Krd88-190) и изолята из Волгограда (101_5-06-Uu) составляла 98,56% и 98,19%, соответственно.

По результатам исследования установлено, что ВЗН 2 генотипа являлся доминирующим для европейской части России за изучаемый период. По данным секвенирования циркулировавшие варианты ВЗН 2 генотипа являлись генетически неоднородными. Наибольшая гомология установлена с изолятами ВЗН, циркулировавшими на территории России в 2007 и 2021 гг., а также Румынии в 2013 г., Болгарии в 2015 г., Венгрии в 2004 г., Греции в 2010 г. и Италии в 2011 г.

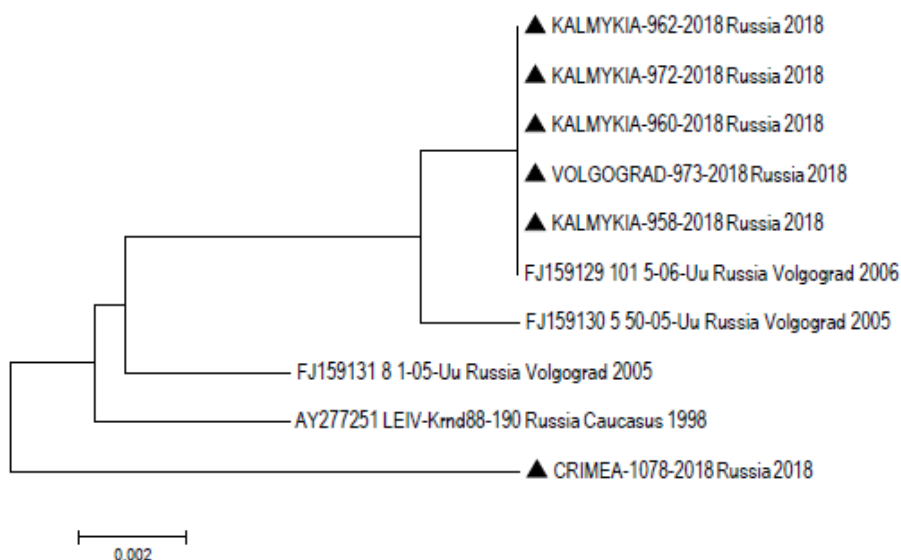


Рисунок 5 – Дендрограмма, построенная по локусу 5'-UTR-protC ВЗН 4 генотипа методом Neighbor-joining. Треугольниками отмечены образцы, секвенированные в ходе работы

Таким образом, методами ОТ-ПЦР и секвенирования определены генотипы ВЗН в пробах клинического, энтомологического и зоологического материала, что позволило изучить генетическое разнообразие возбудителя ЛЗН, циркулирующего в различных регионах европейской части России за исследуемый период.

Заключение, практические рекомендации и перспективы дальнейшей разработки темы

В ходе исследований разработан методический подход для выявления и дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией. Применение данного подхода позволило изучить особенности циркуляции и распространенности генотипов вируса Западного Нила в различных регионах европейской части России. Показано, что в период 2010-2022 гг. ВЗН генотипа 2 являлся наиболее распространенным на изучаемой территории. Разработанный подход может быть рекомендован для усовершенствования схемы лабораторной диагностики ЛЗН. В перспективе набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов ВЗН может быть использован для типирования ВЗН в пробах клинического и зооэнтомологического материала при проведении эпидемиологического мониторинга на территориях, где возможна циркуляция возбудителя ЛЗН.

Выводы

1. Проведен сравнительный анализ полноразмерных нуклеотидных последовательностей геномов вируса Западного Нила, в результате которого выбраны РНК-мишени для дифференциации 1, 2 и 4 генотипов возбудителя ЛЗН методом ОТ-ПЦР в реальном времени, подобраны специфичные олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды, комплементарные локусу гена полипротеина, кодирующего капсидный белок.

2. Сконструированы рекомбинантные штаммы *E. coli* JM 109 1-430, *E. coli* JM 109 2-428, *E. coli* JM 109 4-162, являющиеся продуцентами плазмид pWNV1protC,

pWNV2protC, pWNV4protC, несущих фрагменты генома ВЗН 1, 2 и 4 генотипов. На основе штаммов *E. coli* JM 109 1-430, *E. coli* JM 109 2-428, *E. coli* JM 109 4-162 получены положительные контрольные образцы и стандартные образцы предприятия ВЗН 1, 2 и 4 генотипов, используемые для контроля эффективности амплификации при проведении ОТ-ПЦР для дифференциации генотипов ВЗН.

3. Разработан «Набор реагентов для выявления и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» по ТУ 21.20.23-015-01898084-2019» на основе сконструированных олигонуклеотидов и положительных контрольных образцов.

4. Определены функциональные характеристики разработанного набора реагентов при исследовании проб клинического, аутопсийного и полевого материала. Аналитическая чувствительность набора реагентов при анализе проб, содержащих кДНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов, составила 1×10^4 ГЭ/мл, аналитическая специфичность при исследовании проб, содержащих РНК и кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл, – 100%, диагностическая чувствительность – 98,5%, диагностическая специфичность – 99%.

5. Проведена апробация набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» при исследовании 411 положительных проб, поступивших в Референс-центр по мониторингу за возбудителем ЛЗН из 14 регионов европейской части России в период 2010 – 2022 гг. В результате типирования РНК ВЗН из проб клинического материала генотип 1 определен в 4,41% случаев, генотип 2 - в 95,59%; из проб зооэнтомологического материала генотип 1 установлен в 2,72% образцов, генотип 2 - в 89,67%, генотип 4 - в 7,61%.

6. Изучены особенности распространенности генотипов ВЗН в различных регионах европейской части России. Отмечено, что в период 2010 – 2022 гг. ВЗН генотипа 2 являлся доминирующим для европейской части России.

Список работ по теме диссертации

1. Савченко, С.С. Молекулярный мониторинг вируса лихорадки Западного Нила / С.С. Савченко, В.А. Антонов, Г.А. Ткаченко, В.В. Алексеева, О.В. Зинченко, К.В. Жуков, И.М. Шпак, **А.А. Батури**н, В.П. Смелянский, Е.В. Путинцева // Вестник Волгоградского государственного медицинского университета. – 2012. – Т. 42. № 2. – С. 53-55. **(Журнал из перечня ВАК)**

2. **Батури**н, А.А. Роль птиц как потенциальных резервуаров вируса Западного Нила на территории Российской Федерации / **А.А. Батури**н, В.А. Антонов, В.П. Смелянский, К.В. Жуков, В.Ф. Чернобай, Н.Н. Колякина // Проблемы особо опасных инфекций. – 2012. – Т. 114. № 4. – С. 18-21. **(Журнал из перечня ВАК)**

3. Zamarina, T.V. Application of a complex of methods in laboratory diagnostics of West Nile fever / T.V. Zamarina, N.P. Khrapova, G.A. Tkachenko, **А.А. Baturin**, M.L. Ledeneva, L.V. Lemasova, T.N. Sharov, Y.A. Kuzyutina, A.M. Markin, N.N. Teteryatnikova // Инфекция и иммунитет. – 2018. – Т. 8. № 4. - С. 541. **(Журнал из перечня ВАК)**

4. **Батури**, А.А. Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории европейской части России в 2010-2019 гг. / А.А. **Батури**, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, Л.В. Лемасова, О.С. Бондарева, И.Д. Кайсаров, И.М. Шпак, Н.В. Бородай, Е.В. Король, Н.Н. Тетерятникова // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2021. – Т. 98. № 3. – С. 308-318. (**Журнал из перечня ВАК**)

5. Молчанова, Е.В. Оценка влияния биологической модели на формирование патогенных свойств изолята вируса Западного Нила / Е.В. Молчанова, А.О. Негоденко, Д.Н. Лучинин, Д.Р. Прилепская, И.А. Хабарова, Н.В. Бородай, А.А. **Батури**, Б.В. Андрианов // Клеточные технологии в биологии и медицине. – 2021. – № 2. – С. 85-89. (**Журнал из перечня ВАК**)

6. Молчанова, Е.В. Компетентность комаров *Culex pipiens f. molestus* как переносчиков вируса Западного Нила при различных температурных условиях / Е.В. Молчанова, Д.Н. Лучинин, А.Ю. Мачнева, А.Д. Герасимова, А.В. Несговорова, Н.В. Бородай, Н.Г. Плеханова, А.А. **Батури** // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. – Т. 99. № 5. – С. 540-544. (**Журнал из перечня ВАК**)

7. Прохватилова, Е.В. Оценка диагностической эффективности набора реагентов для *in vitro* диагностики лихорадки Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией / Е.В. Прохватилова, Г.А. Ткаченко, А.А. **Батури**, Л.И. Белицкая, А.В. Топорков // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2023. – Т. 23. № 1. – С. 90–101. (**Журнал из перечня ВАК**)

8. Путинцева, Е.В. Лихорадка Западного Нила в Российской Федерации в 2022 г., прогноз заболеваемости на 2023 г. / Е.В. Путинцева, С.К. Удовиченко, Д.Н. Никитин, Н.В. Бородай, А.А. **Батури**, А.Ю. Мачнева, А.С. Антонов, Н.А. Зарубин, А.В. Топорков // Проблемы особо опасных инфекций. – 2023. – № 1. – С. 75-84. (**Журнал из перечня ВАК**)

9. **Батури**, А.А. Генотипирование возбудителя лихорадки Западного Нила и генотипирование возбудителя в 2015 году / А.А. **Батури**, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, Л.В. Лемасова // Медицинский академический журнал. – 2016. – Т. 16. № 4. – С. 99-100.

10. Путинцева, Е.В. Итоги мониторинга возбудителя лихорадки Западного Нила в 2017 г. на территории Российской Федерации. Прогноз развития ситуации в 2018 г. в России / Е.В. Путинцева, В.П. Смелянский, И.О. Алексейчик, Н.В. Бородай, С.Н. Чеснокова, А.К. Алиева, Е.А. Агаркова, А.А. **Батури**, Д.В. Виктор, А.В. Топорков // Проблемы особо опасных инфекций. – 2018. – № 1. – С. 56-62.

11. Алексейчик, И.О. Особенности эпидемической ситуации по лихорадке Западного Нила на территории Российской Федерации в 2018 г. и прогноз ее развития на 2019 / И.О. Алексейчик, Е.В. Путинцева, В.П. Смелянский, Н.В. Бородай, А.К. Алиева, Е.А. Агаркова, С.Н. Чеснокова, В.К. Фомина, А.А. **Батури**, К.В. Жуков, Л.О. Шахов, Н.Д. Пакскина, Ю.В. Демина, Е.Б. Ежлова, Д.В. Виктор, А.В. Топорков // Проблемы особо опасных инфекций. – 2019. – № 1. – С. 17-25.

12. Путинцева, Е.В. Результаты мониторинга возбудителя лихорадки Западного Нила в Российской Федерации в 2019 г. и прогноз развития эпидемической ситуации на 2020 г / Е.В. Путинцева, И.О. Алексейчик, С.Н. Чеснокова, С.К. Удовиченко, Н.В. Бородай, Д.Н. Никитин, Е.А. Агаркова, **А.А. Батури**н, И.М. Шпак, В.К. Фомина, А.В. Несговорова, В.П. Смелянский, Д.В. Викторов, А.В. Топорков // Проблемы особо опасных инфекций. – 2020. – № 1. – С. 51-60.

13. Molchanova, E.V. Influence of biological model on the formation of the pathogenic properties of the West Nile virus isolate / E.V. Molchanova, A.O. Negodenko, D.N. Luchinin, D.R. Prilepskaya, I.A. Khabarova, N.V. Boroday, **A.A. Baturin**, V.V. Andrianov // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. – 2021. – Т. 171. № 4. – С. 513-516.

14. Путинцева, Е.В. Особенности эпидемиологической ситуации по лихорадке Западного Нила в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз ее развития в 2021 г / Е.В. Путинцева, С.К. Удовиченко, Н.В. Бородай, Д.Н. Никитин, Е.В. Молчанова, **А.А. Батури**н, И.М. Шпак, В.К. Фомина, А.В. Несговорова, А.С. Антонов, Д.Р. Прилепская, Д.В. Викторов, А.В. Топорков // Проблемы особо опасных инфекций. – 2021. – № 1. – С. 63-72.

15. **Батури**н, А.А. Молекулярно-эпидемиологическая характеристика завозного случая лихорадки Западного Нила из Индии на территории России в 2018 году / **А.А. Батури**н, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, Л.В. Лемасова, О.С. Бондарева, И.М. Шпак, Н.Н. Тетерятникова, В.П. Смелянский, Е.В. Пименова, Н.П. Храпова // Современные проблемы эпидемиологии, микробиологии и гигиены. Материалы X Всероссийской научно-практической конференции молодых ученых и специалистов Роспотребнадзора. – 2018. - С. 17-19.

16. **Батури**н, А.А. Генетическое разнообразие РНК-изолятов вируса Западного Нила, циркулирующих на юге России в 2018 году / **А.А. Батури**н, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, Л.В. Лемасова, О.С. Бондарева, Е.Ф. Авдюшева, А.С. Антонов, Н.В. Бородай, В.П. Смелянский // Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы. Материалы XI Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. - 2019. - С. 20.

17. Патент 2715617 РФ, МПК C12Q1/68, G01N 33/58, Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации вируса Западного Нила 2 генотипа / **А.А. Батури**н, Г.А. Ткаченко, И.М. Шпак, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2019115620; заявл. 21.05.2019; опубл. 02.03.2020, Бюл. №7.

18. Патент 2715625 РФ, МПК C12Q1/68, G01N 33/58, Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации вируса Западного Нила 1 генотипа / **А.А. Батури**н, Г.А. Ткаченко, И.М. Шпак, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2019115607; заявл. 21.05.2019; опубл. 02.03.2020, Бюл. №7.

19. Патент 2737396 РФ, МПК С12Q1/68, Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации вируса Западного Нила 4 генотипа (*West Nile virus lineage 4*) / **А.А. Батури**н, Г.А. Ткаченко, И.М. Шпак, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2020113833; заявл. 03.04.2020; опубл. 30.11.2020, Бюл. №34.

20. Патент 2739333 РФ, МПК С12N 1/21, С12N 15/40, С12N 15/70, Штамм бактерий *Escherichia coli* JM 109 4-162 - продуцент рекомбинантной плазмиды рWNV4protC, несущей последовательность участка гена полипротеина *West Nile virus* 4 генотипа, кодирующего капсидный белок / **А.А. Батури**н, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2020113796; заявл. 03.04.2020; опубл. 23.12.2020, Бюл. №36.

21. Патент 2744095 РФ, МПК С12N 1/21, С12N 15/40, С12N 15/70, Штамм бактерий *Escherichia coli* JM 109 1-430 – продуцент рекомбинантной плазмиды рWNV1protC, несущей последовательность 5'-нетранслируемой области и участка гена полипротеина *West Nile virus* 1 генотипа, кодирующего капсидный белок / **А.А. Батури**н, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2020113832; заявл. 03.04.2020; опубл. 02.03.2021, Бюл. №7.

22. Патент 2744096 РФ, МПК С12N 1/21, С12N 15/40, С12N 15/70, Штамм бактерий *Escherichia coli* JM 109 2-428 – продуцент рекомбинантной плазмиды рWNV2protC, несущей последовательность 5'-нетранслируемой области и участка гена полипротеина *West Nile virus* 2 генотипа, кодирующего капсидный белок / **А.А. Батури**н, Г.А. Ткаченко, М.Л. Леденева, заявитель и патентообладатель ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. – № 2020113835; заявл. 03.04.2020; опубл. 02.03.2021, Бюл. №7.

Список сокращений

ВЗН – вирус Западного Нила; ГЭ – геном-эквивалент; ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота; дНТФ – дезоксирибонуклеозидтрифосфат; кДНК – комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота; ЛЗН – лихорадка Западного Нила; ОТ-ПЦР – полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; РНК – рибонуклеиновая кислота; FAM – 6-Carboxyfluorescein (6-карбоксихлорофлуоресцин); JOE – 6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Di-methoxyfluorescein (6-карбоксихлоро-4',5'-дихлоро-2',7'-диметоксихлорофлуоресцин); ROX – 6-Carboxy-X-Rhodamine (6-карбоксихлоро-Х-родамин); WNV – West Nile virus (вирус Западного Нила).