

ФЕДЕРАЛЬНОЕ КАЗЁННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
«ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ПРОТИВОЧУМНЫЙ ИНСТИТУТ»
ФЕДЕРАЛЬНОЙ СЛУЖБЫ ПО НАДЗОРУ В СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА
(ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный
институт Роспотребнадзора)

На правах рукописи

БАТУРИН АРТЕМ АЛЕКСАНДРОВИЧ

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

1.5.10 – вирусология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
кандидат медицинских наук, доцент
Ткаченко Галина Александровна

Волгоград – 2023

СОДЕРЖАНИЕ

	Стр.
ВВЕДЕНИЕ	4
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 Характеристика возбудителя лихорадки Западного Нила	15
1.2 Молекулярно-генетические методы диагностики лихорадки Западного Нила	22
1.3 Внутривидовое многообразие и методы генотипирования вируса Западного Нила.....	32
СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	38
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	38
2.1 Объекты исследования.....	38
2.2 Подготовка проб для молекулярно-генетических исследований.....	44
2.3 Выделение нуклеиновых кислот.....	45
2.4 Постановка и проведение реакции обратной транскрипции.....	46
2.5 Измерение концентрации ДНК.....	47
2.6 Синтез олигонуклеотидов.....	47
2.7 Конструирование рекомбинантных ДНК.....	47
2.8 Постановка полимеразной цепной реакции.....	48
2.9 Проведение электрофореза.....	49
2.10 Секвенирование продуктов амплификации.....	49
2.11 Программы и базы данных.....	50
2.12 Статистическая обработка полученных данных.....	50
Глава 3. РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ	51
3.1 Выбор РНК-мишеней, конструирование праймеров и флуоресцентно-меченых зондов для дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР.....	51

3.2 Конструирование рекомбинантных штаммов <i>Escherichia coli</i> для использования в качестве контрольных образцов вируса Западного Нила генотипов 1, 2 и 4	53
3.3 Оптимизация условий проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени.....	59
Глава 4. ОЦЕНКА ФУНКЦИОНАЛЬНЫХ ХАРАКТЕРИСТИК НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ.....	62
4.1 Оценка аналитических характеристик набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.....	63
4.2 Оценка диагностических характеристик набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.....	68
Глава 5. ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ ОТ-ПЦР И СЕКВЕНИРОВАНИЯ.....	74
5.1 Определение генотипов вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени.....	74
5.2 Типирование вируса Западного Нила методом секвенирования.....	79
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	86
ВЫВОДЫ.....	93
БЛАГОДАРНОСТИ.....	95
ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ.....	96
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	97

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность 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* (International Committee on Taxonomy of Viruses, Release 2022). Резервуаром ВЗН в природе являются птицы, а в качестве основных переносчиков выступают комары. Поддержанию циркуляции вируса в природных очагах ЛЗН способствуют также иксодовые, гамазовые и аргасовые клещи [Nabarugira et al., 2020]. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) человек рассматривается в качестве «случайного» хозяина ВЗН. В настоящее время нет документально зарегистрированных случаев передачи ВЗН от человека к человеку трансмиссивным путем. Однако инфицирование людей может происходить при трансплантации органов, переливании крови и грудном вскармливании. Зарегистрированы случаи трансплацентарной передачи и внутрилабораторного заражения ВЗН (Бюллетень ВОЗ от 03.10.2017 г.).

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]. Самая крупная эпидемия ЛЗН в мире описана в Южной Африке в 1974 году, во время которой было зарегистрировано 18 тысяч случаев заболевания [McIntosh et al., 1979; Jupp, 2001].

В бывшем СССР циркуляция вируса и спорадическая заболеваемость установлены в Астраханской области с 1963 года [Львов и др., 2008; Руководство, 2013]. Длительное время ВЗН в России не представлял серьезной угрозы населению. Резкое ухудшение эпидемической ситуации по ЛЗН на юге России произошло в 1999 году, когда во время крупной вспышки в Волгоградской области число лабораторно подтвержденных случаев заболевания достигало около 500. При этом смертность составляла 10% от общего количества заболевших [Львов и др., 2008]. С 1999 года 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]. Дифференциация ВЗН на генотипы основана на сравнительном анализе полноразмерных нуклеотидных последовательностей генома. Генетическая дистанция между генотипами ВЗН составляет 18-27% [Анищенко и др., 2010].

Генотип 1 подразделяется на 2 субгенотипа: 1a, 1b. Субгенотип 1a наиболее распространен в мире и циркулирует в Африке, Северной Америке, Европе и на Ближнем Востоке [Lanciotti et al., 1999; Hall et al., 2001]. Субгенотип 1b, называемый также вирусом Кунджин, включает штаммы, выделенные на Австралийском континенте и в Океании. Генотип 2 распространен в странах Африки к югу от Сахары и странах Европы, включая европейскую часть России. Зарегистрировано несколько вспышек заболевания среди людей, лошадей и птиц, вызванных вирусом Западного Нила генотипа 2 [Erdélyi et al., 2007; Botha et al., 2008; Vagnarelli et al., 2011; Papa et al., 2011; Ciccozzi et al., 2013; Mann et al., 2013; Bowen et al., 2014; Velasco et al., 2020]. К генотипу 3 относят штамм Рабенсбург из Чешской Республики [Aliota et al., 2012]. Генотип 4 представлен штаммом ВЗН LEIV-Krd88-190, выделенным от иксодовых клещей *Dermacentor marginatus*, собранных в 1988 году в предгорных районах Северного Кавказа [Lvov et al., 2004]. Штаммы генотипа 5, также известного, по мнению некоторых авторов, как субгенотип 1c, выделяли на территории Индии [Lanciotti et al., 2002; Bakonyi et al.,

2005; Mann et al., 2013]. Генотип 6 был предложен на основании анализа нуклеотидной последовательности гена NS5 ВЗН, выделенного на территории Испании (HU2925/06) [Vazquez et al., 2010]. Генотип 7 представлен вирусом Коутанго, впервые выделенным в 1968 году в Сенегале, а затем в Сомали [Butenko et al., 1986]. Вирус Коутанго первоначально считали отдельным видом флавивирусов, но позже классифицировали как штамм ВЗН [Charrel et al., 2003]. Показано, что ВЗН генотипа 7 обладает большей вирулентностью, чем другие патогенные штаммы ВЗН [Prow et al., 2014]. Вирус генотипа 8 был выявлен в комарах *Culex perfuscus* в г. Кедугу, Сенегал [Fall et al., 2014]. Штамм WNV-Uu-LN-AT-2013, выделенный в Австрии, образует линию 9 и одновременно относится к субгенотипу 4с [Pachler et al., 2014]. В России зарегистрирована циркуляция ВЗН генотипов 1, 2 и 4 [Субботина и др., 2014].

Степень разработанности темы исследования. 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 исследованиях J.Scherret получены данные о филогенетических взаимоотношениях штаммов ВЗН [Scherret et al., 2002]. В работе Javier Del Amo описан подход одновременного выявления и дифференциации вируса Западного Нила 1 и 2 генотипов, а также вируса Усугу, методом количественной мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени с применением технологии «TaqMan» [Del Amo et al., 2013]. К.В. Жуковым 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. Большинство клинических образцов имеет низкую вирусную нагрузку, 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). Данные наборы реагентов обладают высокой чувствительностью и специфичностью, однако с их помощью 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 гибридационно-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 гибридационно-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. Научная новизна сконструированных олигонуклеотидов подтверждена 3 патентами РФ на изобретения: № 2715617, опубликовано 02.03.2020 г., бюл. № 7; № 2715625, опубликовано 02.03.2020 г., бюл. № 7; № 2737396, опубликовано 30.11.2020 г., бюл. № 34.

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 штаммов-продуцентов рекомбинантных плазмид подтверждена 3 патентами РФ на изобретения: № 2739333, опубликовано 23.12.2020 г., бюл. № 36; № 2744095, опубликовано 02.03.2021 г., бюл. № 7; № 2744096, опубликовано 02.03.2021 г., бюл. № 7.

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 зооэнтомологического 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 исследование. 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 к.м.н. Шпаком И.М., к.б.н. Плехановой Н.Г., к.м.н. Прохвятиловой Е.В., к.м.н. Агеевой Н.П., к.м.н. Бондаревой О.С., Бородай Н.В., Леденевой М.Л. и сотрудником ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора к.б.н. Терновым В.А.

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.

Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Характеристика возбудителя лихорадки Западного Нила

Вирус Западного Нила (ВЗН, West Nile virus) принадлежит к виду *Orthoflavivirus nilense*, роду *Orthoflavivirus*, семейству *Flaviviridae*, отряду *Amarillovirales*, классу *Flasuviricetes*, типу *Kitrinoviricota*, царству *Orthornavirae*, реалму *Riboviria* в соответствии с классификацией Международного комитета по таксономии вирусов (International Committee on Taxonomy of Viruses, Release 2022). По классификации Балтимора ВЗН входит в группу IV – вирусов, содержащих одноцепочечные РНК положительной полярности (single-stranded RNA(+)). ВЗН является возбудителем глобально распространяющейся природно-очаговой арбовирусной инфекции с трансмиссивным механизмом передачи - лихорадки Западного Нила (ЛЗН). Впервые вирус был выделен в 1937 году от лихорадящей больной из провинции Западный Нил в Уганде [Smithburn et al., 1940; Petersen et al., 2003; Phalen et al., 2004; van der Meulen et al., 2005].

По морфологии вирионы ВЗН имеют сферическую форму и кубический тип симметрии. Геном заключен в оболочечный икосаэдрический нуклеокапсид диаметром 30 нм. Как и у всех флавивирусов генетический материал ВЗН, представлен несегментированной одноцепочечной РНК размером приблизительно 11 тысяч пар нуклеотидов [Beasley et al., 2004; Hayes et al., 2005]. Вирусный геном содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин. Расщепление полипротеина осуществляется ко- и посттрансляционно как вирусными, так и клеточными протеазами на структурные и неструктурные белки [Chambers et al., 1990; Dubrau et al., 2017]. Три структурных белка включают капсидный (С), мембранный (М) и оболочечный (Е) белки [Brinton et al., 2002]. Семь неструктурных (NS, nonstructural) белков NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B и NS5 играют решающую роль в репликации вирусной РНК [Bressanelli et al., 2004; Perera-Lecoin et al., 2013; Best et al., 2016; Chen et al., 2017]. Открытая рамка считывания окружена с обеих сторон нетранслируемыми областями (UTR,

Untranslated region) [Firth et al., 2009; Tuplin et al., 2011; Yun et al., 2012]. РНК ВЗН имеет 96 нуклеотидов на участке 5'-UTR и 632 – в области 3'-UTR с некоторыми вариациями между различными штаммами [Wengler et al., 1981]. Каждый из вирусных белков, как структурных, так и неструктурных, выполняет специфическую функцию в биологии вируса и патогенезе ЛЗН.

Капсидный белок С является коровым и состоит примерно из 105 аминокислотных остатков [Martins et al., 2012; Chowdhury et al., 2014; Londono-Renteria et al., 2016]. Основная роль данного белка заключается в сборке нуклеокапсида. Белок С участвует в репликации вирусной РНК благодаря его взаимодействию с лигазами E3 (HDM2) [Bhuvanakantham et al., 2013].

Белок Е является трансмембранным и выполняет защитную роль для других вирусных компонентов, поддерживая целостность оболочки [Heinz et al., 2012; Londono-Renteria et al., 2016]. Белок Е участвует в проникновении вируса в клетку и обладает высокой иммуногенностью.

Мембранный белок М образуется в результате расщепления гликозилированного белка ргМ ферментом фурином. Сегмент «рг» секретируется, а белок М с двумя трансмембранными доменами образует часть мембраны вириона. Считается, что белок ргМ играет ключевую роль в предотвращении преждевременного слияния белков Е с мембраной клетки-хозяина [Beasley et al., 2005]. Расщепление ргМ фурином необходимо для созревания вируса [Slon Campos et al., 2018].

Неструктурный белок NS1 присутствует как внеклеточно (связан с клеточной мембраной), так и внутриклеточно, и его роль варьирует в зависимости от локализации. Внеклеточная форма NS1 выполняет защитную функцию при воздействии врожденного иммунитета посредством ингибирования активности системы комплемента. Внутриклеточная форма косвенно участвует в репликации и созревании вируса [Mackenzie et al., 1996; Gutsche et al., 2011; Muller et al., 2013].

Белок NS2A представляет собой связанную с мембраной небольшую молекулу, состоящую из 231 аминокислоты. Этот белок играет важную роль в

репликации вируса, сборке вирусных частиц и нарушении действия интерферона хозяина [Leung et al., 2008].

Белок NS2B представляет собой важный кофактор белка NS3 [Chappell et al., 2008]. Белок NS3 обладает протеазной [Gorbalenya et al., 1989; Wengler et al., 1991] и РНК-хеликазной активностями [Mastrangelo et al., 2007; Shiryayev et al., 2009]. Комплекс NS2B-NS3 имеет решающее значение для репликации вируса и расщепления образующегося в результате трансляции полипротеина в местах соединения NS2A/NS2B, NS2B/NS3, NS3/NS4A и NS4B/NS5, а также во внутренних участках белков С и NS4A [Brinton et al., 2002]. Взаимодействие РНК-хеликазы NS3 с нуклеозидтрифосфатазой необходимо для репликации вирусной РНК и сборки вириона [Li et al., 2014].

Белок NS4A представляет собой небольшой гидрофобный, неконсервативный и исключительно трансмембранный белок, который играет роль в процессе репликации вируса посредством перестройки вирусной мембраны [White et al., 2011; Perera-Lecoin et al., 2013]. Более того, взаимодействие NS4A с NS1 необходимо для синтеза вирусной РНК [Brinton et al., 2002]. Также предполагается, что NS4A может играть роль кофактора, регулирующего АТФ-азную активность хеликазы NS3 [Shiryayev et al., 2009].

Белок NS4B выполняет защитную функцию от действия иммунного ответа хозяина [Wicker et al., 2012]. Кроме того, имеются данные об ослаблении репродукции ВЗН *in vivo* из-за различных мутаций в белке NS4B, что косвенно свидетельствует о его роли в репликации генома ВЗН [Wicker et al., 2012].

Белок NS5 является самым крупным среди неструктурных белков. N-концевой домен белка NS5 обладает активностью метилтрансферазы, а С-концевой домен – РНК-зависимой РНК-полимеразы. Обе ферментативные активности играют решающую роль в репликации РНК ВЗН [Hall et al., 2009; Li et al., 2014]. Домен NS5 участвует в кэпировании РНК [Hall et al., 2009], а также является антагонистом интерферона и, следовательно, детерминантой вирулентности. Он ингибирует трансляцию генов, стимулируемых интерфероном [Baleotti et al., 2003; Best et al., 2017; Shah et al., 2018; Wang et al., 2018].

Репродукция ВЗН начинается путем связывания белка E с мембранным рецептором дендритных клеток DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin). При этом ВЗН проникает в клетки посредством эндоцитоза [Tassaneetrithep et al., 2003; Lee et al., 2004; Davis et al., 2006]. Далее закисление содержимого эндосомы изменяет конформацию белка E, который обеспечивает слияние липидной оболочки вируса с мембраной эндосомы [Kimura et al., 1988; Davis et al., 2006]. Нуклеокапсид проникает через мембрану в цитоплазму, где происходит высвобождение геномной РНК и ее репликация [Kimura et al., 1988].

В инфицированной клетке (+)РНК ВЗН выступает в роли мРНК. Она транслируется на рибосомах с образованием полипротеина, который далее подвергается расщеплению как вирусной, так и клеточными протеазами с образованием конечных вирусных белков, одним из которых является РНК-полимераза. Она синтезирует новые копии геномной вирусной РНК через промежуточную (-) цепь РНК. Синтез геномной РНК происходит на мембранах эндоплазматического ретикулума [Nabarugira et al., 2020].

Процесс сборки и созревания вирионов за счет расщепления ргМ (удаление сегмента «рг» фурином) завершается выходом вирусных частиц через клеточную мембрану путем почкования. В процессе почкования вирус приобретает суперкапсид. Активный выход вирионов может завершаться лизисом зараженной клетки [Nabarugira et al., 2020].

На сегодняшний день ареал ВЗН в мире охватывает территории экваториального, тропического и умеренного климатических поясов. В России ВЗН распространен в регионах европейской части, юга Западной Сибири и Дальнего Востока [Руководство, 2013; Путинцева и др., 2022].

Природными резервуарами ВЗН являются дикие и синантропные птицы. Наиболее значимы в передаче вируса представители отрядов *Passeriformes* (вороны *Corvus cornix*, грачи *Corvus frugilegus*, галки *Corvus monedula*, воробьи *Passer domesticus*, синицы *Parus major*, сороки *Pica pica*) и *Charadriiformes* (чайки *Larus argentatus*, крачки *Sterna hirundo*) [Ezenwa et al., 2006; Del Amo et al., 2014;

Lim et al., 2014]. Среди других позвоночных животных, способных к передаче ВЗН, следует отметить миссисипских аллигаторов *Alligator mississippiensis*, гребнистых крокодилов *Crocodylus porosus* и озерных лягушек *Rana ridibunda* [Klenk et al., 2004; Руководство, 2013; Habarugira et al., 2020].

При исследовании млекопитающих ВЗН был выявлен у лошадей [van der Meulen et al., 2005; Long et al., 2014; Cardinale et al., 2017], овец [Rimoldi et al., 2017], кошек [Egberink et al., 2015] и грызунов [Steinman et al., 2003; van der Meulen et al., 2005; Rossi et al., 2010; Marschang et al., 2011; Root et al., 2013; Suthar et al., 2013]. Человек является «тупиковым» хозяином ВЗН, поскольку, приобретая инфекцию он не распространяет ее посредством членистоногих-переносчиков [Habarugira et al., 2020; Vidaña et al., 2020].

Основными и наиболее эффективными переносчиками ВЗН являются комары рода *Culex*. Описаны случаи передачи ВЗН и другими видами комаров [Komar et al., 2003; Balenghien et al., 2008; Golding et al., 2012; Fros et al., 2015; Vogels et al., 2017]. ВЗН был выделен также от некоторых видов клещей и клопов: *Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus sanguineus*, *Ornithodoros maritimus*, *Argas hermanni*, *Oeciacus hirundinis*, *Ornithonyssus sylviarum* [Sixl et al., 1988; Hubálek et al., 1999; Mumcuoglu et al., 2005]. Видовой состав переносчиков ВЗН варьирует в различных регионах мира. Основными переносчиками ВЗН в Европе, включая европейскую часть России, являются виды *Culex pipiens*, *Culex modestus*, *Aedes caspius*, *Anopheles maculipennis*, *Coquillettidia richiardii* [Hubálek et al., 1999; Sardelis et al., 2001; Reiter et al., 2010; Бородай и др., 2021].

Заражение человека ВЗН происходит в основном трансмиссивным путем в результате укуса инфицированным переносчиком [Habarugira et al., 2020]. Известны случаи внутриутробного инфицирования, передачи вируса в процессе грудного вскармливания, гемотрансфузии, трансплантации органов, а также внутрилабораторного заражения [Iwamoto, 2003; Rosen, 2017; Лихорадка Западного Нила, 2017].

Патогенез ЛЗН начинается с проникновения вируса в кератиноциты и специализированные дендритные клетки эпидермиса [Lim et al., 2011; Petersen et

al., 2013]. Локальная репликация вируса усиливается за счет иммуномодулирующего действия слюны комара посредством двух механизмов, включающих изменение пролиферации лейкоцитов и их привлечение к месту укуса, а также передачу сигналов цитокинов путем подавления продукции интерлейкина 2 и интерферона [Schneider et al., 2010; Briant et al., 2014]. Инфицированные клетки Лангерганса мигрируют в лимфатические узлы, в которых происходит дальнейшая репликация вируса. Часть инфицированных клеток и свободных вирусных частиц захватывается макрофагами и элиминируется за счет фагоцитоза [Ben-Nathan et al., 1996]. Параллельно поглощению вирусных частиц макрофагами продолжается репликация ВЗН в дендритных клетках лимфатических узлов [Byrne et al., 2001; Diamond et al., 2003; Martín-Fontecha et al., 2009]. На основании способности ВЗН к репликации *in vitro* в В- и Т-лимфоцитах предполагают, что эти клетки потенциально являются одними из основных мишеней на ранней стадии инфекции *in vivo* [García-Tapia et al., 2006].

Из лимфатических узлов вирус гематогенным путем распространяется в периферические органы. У человека и млекопитающих ВЗН имеет наибольшую тропность к тканям головного мозга [Bosanko et al., 2003; Kelley et al., 2003; Guarner et al., 2004]. У некоторых хозяев, таких как птицы, вирус обладает широким спектром тканевой тропности и может реплицироваться почти во всех органах и системах организма [Kramer et al., 2001; Gamino et al., 2013].

Инфицирование клеток иммунной системы и репликация вируса в них связаны с появлением первичных клинических признаков в конце инкубационного периода, который находится в диапазоне от 2 до 14 дней после заражения [Colpitts et al., 2012]. У пациентов с ослабленным иммунитетом может наблюдаться более длительный инкубационный период - до 21 дня [Petersen et al., 2013]. В 80% случаев ЛЗН у человека протекает бессимптомно. У 20% инфицированных людей наблюдается развитие гриппоподобного синдрома, характеризующегося лихорадкой, головной болью, кашлем, миалгией, артралгией, слабостью. К заболеванию восприимчивы все возрастные категории

[Pepperell et al., 2003; O'Leary et al., 2004; Nayas, Gubler, 2006]. При ЛЗН возможны нарушения со стороны желудочно-кишечного тракта, сопровождающиеся тошнотой и рвотой. У части больных появляются макулопапулезные высыпания, покрывающие туловище и конечности, чаще ладони и подошвы [Anderson et al., 2004; Del Giudice et al., 2005; Ferguson et al., 2005; Gorsche, Tilley, 2005]. Большинство заболевших полностью выздоравливает, однако у некоторых пациентов отмечаются утомляемость, слабость, головные боли и трудности в концентрации внимания, продолжающиеся в течение нескольких дней, недель и даже месяцев после видимого выздоровления [Watson et al., 2004; Sejvar et al., 2008].

Нейроинвазивная форма ЛЗН развивается менее чем в 1% случаев инфицирования вирусом. Данная форма заболевания характеризуется менингитом, энцефалитом и острым вялым параличом [Campbell et al., 2002; Granwehr et al., 2004]. Менингит при ЛЗН мало отличается от такового при других вирусных инфекциях. Энцефалит характеризуется различной степенью тяжести, вплоть до энцефалопатии, комы и смерти и чаще возникает у лиц старше 55 лет или при иммунодефицитах [Armani et al., 2003; Ravindra et al., 2004]. Летальность при этой форме ЛЗН составляет 10-30 %, преимущественно среди пожилых и лиц с дефицитом иммунитета [Campbell et al., 2002; Granwehr et al., 2004; Davis et al., 2006]. Наиболее тяжелым проявлением острого вялого паралича является поражение иннервации дыхательных мышц. При этом отмечается высокая летальность, а выжившим пациентам может потребоваться длительная вентиляция легких [Sejvar et al., 2007].

К более редким клиническим проявлениям ЛЗН относят поражения глаз [Adelman et al., 2003; Bains et al., 2003; Hershberger et al., 2003; Kuchtey et al., 2003; Vandenbelt et al., 2003; Shaikh, Trese, 2004], гепатит, панкреатит, миокардит [Perelman, Stern, 1974; Sampson et al., 2000; Fratkin et al., 2004]. Специфическое лечение и профилактика ЛЗН не разработаны.

Самая крупная эпидемия ЛЗН, во время которой зарегистрировано 18 тысяч случаев заболевания, описана в 1974 году в Южной Африке [McIntosh et al., 1979;

Jurr, 2001]. В бывшем СССР циркуляция вируса и спорадическая заболеваемость установлены в Астраханской области с 1963 года [Львов и др., 2008; Руководство, 2013]. Первая крупная вспышка ЛЗН в России произошла в 1999 году на территориях Волгоградской и Астраханской областей. При этом в Волгоградской области было выявлено около 500 заболевших с летальностью, составившей 10% [Львов и др., 2008]. В 2010 году в России произошла вторая крупная вспышка ЛЗН на территории Волгоградской области. Диагноз ЛЗН был поставлен 413 жителям данного региона [Лихорадка Западного Нила, 2017]. Распространению вируса в северные регионы способствует потепление климата. Так, в 2021 году в Москве впервые выявлено 27 местных случаев ЛЗН. Вспышка протекала на фоне эпизоотий среди птиц, сопровождавшихся их массовой гибелью [Путинцева и др., 2022].

Поскольку протекание ЛЗН у человека не сопровождается специфическими симптомами, важную роль в диагностике данной инфекции играют лабораторные методы исследования. Традиционные методы диагностики ЛЗН включают выделение ВЗН в культуре клеток, выявление антигенов ВЗН или обнаружение специфических антител, вырабатываемых организмом в ответ на инфекцию. Однако данные методы требуют либо больших временных и трудовых затрат, либо не обладают нужными показателями чувствительности и специфичности, что может затруднить постановку верного диагноза. В связи с этим широкое применение нашли молекулярно-генетические методы, которые существенно повысили эффективность диагностики ЛЗН в клинической лабораторной практике.

1.2 Молекулярно-генетические методы диагностики лихорадки Западного Нила

Молекулярно-генетические исследования являются прямыми методами обнаружения РНК ВЗН и находят широкое применение в диагностике ЛЗН у человека, а также при проведении зоолого-энтомологического обследования

территорий, где возможна циркуляция возбудителя ЛЗН [Sambri et al., 2013; Betsem et al., 2017; Ergünay et al., 2017; Mori et al., 2021]. В соответствии с СанПиН 2.1.3684-21 при обнаружении РНК ВЗН в пробах клинического материала диагноз ЛЗН считают подтвержденным.

Материалом для исследования при проведении диагностики ЛЗН у людей молекулярно-генетическими методами служат образцы цельной крови, сыворотки и плазмы крови, лейкоцитарной фракции крови, спинномозговой жидкости, мочи и секционного материала [Лихорадка Западного Нила, 2017; Lustig et al., 2018].

Для молекулярно-генетических тестов забор крови и спинномозговой жидкости проводят не позднее 10 дней от начала заболевания, то есть в период вирусемии, которая присутствует как минимум за 7 дней до появления иммуноглобулинов класса М [Busch et al., 2008]. Поскольку вирус способен связываться с эритроцитарной мембраной и проникать внутрь эритроцитов вирусная нагрузка в цельной крови существенно выше, чем в плазме. Поэтому исследование плазмы крови не всегда позволяет обнаружить РНК ВЗН [Rios et al., 2007].

Иногда вирусная РНК может длительно сохраняется в моче, даже в течение нескольких недель после начала симптомов, и присутствует в более высокой концентрации по сравнению с другими образцами [Barzon et al., 2013]. Интересно, что обнаружение РНК ВЗН в моче возможно и после ее исчезновения из крови [Nagy et al., 2017]. При этом концентрация ВЗН в моче может достигать $8,8 \times 10^7$ копий/мл [Lustig et al., 2016]. Кроме того, молекулярно-генетическими методами продемонстрировано обнаружение РНК ВЗН в образцах мочи, собранных у выздоравливающих пациентов после продолжительного периода времени от начала заболевания [Bagnarelli et al., 2011].

Поскольку ВЗН обладает высокой тропностью к нервной ткани, от умерших пациентов для установления патологоанатомического диагноза отбирают пробы головного и спинного мозга. ВЗН также может быть обнаружен в тканях печени, селезенки, почек, легких, сердца, и лимфоузлов [Mrzljak et al., 2020].

При проведении мониторинговых исследований на наличие РНК ВЗН в полевом материале используют пробы от членистоногих и птиц, являющихся основными переносчиками и резервуарными хозяевами инфекции: пулы комаров рода *Culex*, суспензии органов птиц, преимущественно семейства *Corvidae* (Врановые) [Shirafuji et al., 2009; Habarugira et al., 2020].

В большинстве случаев молекулярно-генетические тесты основаны на использовании методов амплификации нуклеиновых кислот (МАНК). Первым способом для выявления РНК ВЗН с использованием МАНК стала традиционная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР, RT-PCR, Reverse transcription polymerase chain reaction). При добавлении фермента ревертазы в реакционную смесь для ПЦР анализ можно проводить в одной пробирке (однотайдийная ОТ-ПЦР, one-step RT-PCR). В России имеет государственную регистрацию один диагностический набор реагентов для выявления РНК ВЗН методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции с электрофоретическим учетом результатов – ГенНил-РЭФ по ТУ 9398-024-01898109-2011 (ФСР 2012/13434) производства ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора. Чувствительность набора составляет 1×10^3 ГЭ/мл. Выявление РНК ВЗН осуществляют на основании амплификации фрагмента кДНК вируса размером 106 п.н., комплементарного участку генома, кодирующего белок NS5 [Красовская, 2007]. На сегодняшний день традиционная ОТ-ПЦР с электрофоретическим учетом результатов для диагностики ЛЗН почти не используется ввиду трудоемкости и длительности выполнения анализа. Кроме того, при использовании электрофореза повышается риск контаминации исследуемых проб продуктами ПЦР и получения ложноположительных результатов.

На смену традиционной ОТ-ПЦР пришел метод ОТ-ПЦР в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ, Real-time RT-PCR, Real-time reverse transcription–polymerase chain reaction). В данном случае учет результатов осуществляют гибридационно-флуоресцентным методом. В настоящее время для проведения ОТ-ПЦР-РВ предложены различные конструкции флуоресцентных зондов.

Наибольшую популярность при разработке диагностических наборов реагентов получили линейные разрушаемые зонды «TaqMan» и молекулярные маяки «Molecular beacons» [Ребриков и др., 2009]. Существует и другой способ регистрации результатов при проведении ОТ-ПЦР-РВ, который не предусматривает использование гибридных зондов, а основан на непосредственном связывании молекул интеркалирующих флуоресцентных красителей с продуктами амплификации. В качестве таких красителей применяют SYBR Green I, SYBR Green II, SYBR Gold [Ребриков и др., 2009]. В обоих случаях не используется этап электрофореза, что снижает риск контаминации лаборатории продуктами амплификации. Применение данного метода существенно сокращает время анализа и трудовые затраты. Кроме того, ОТ-ПЦР-РВ позволяет давать количественную оценку содержания вирусной РНК в пробе на старте амплификации (RT-qPCR, Quantitative reverse transcription PCR).

ОТ-ПЦР-РВ сейчас является ключевым методом лабораторной диагностики ЛЗН. Разработано множество экспериментальных и зарегистрированных в качестве медицинских изделий наборов реагентов для выявления РНК ВЗН в биологическом материале, как отечественного, так и зарубежного производства. Один из первых экспресс-тестов для выявления РНК ВЗН в пробах от человека, комаров и птиц на основе метода ОТ-ПЦР-РВ с применением технологии «TaqMan» был разработан сотрудниками Центра по контролю и профилактике заболеваний США под руководством Robert Lanciotti [Lanciotti et al., 2000]. Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды, меченые красителями FAM и TAMRA, были сконструированы с использованием нуклеотидной последовательности штамма ВЗН NY99. В качестве РНК-мишеней использовали 3'-нетранслируемый участок генома, а также locus, кодирующий белок E ВЗН. Авторы установили, что олигонуклеотиды, подобранные к 3'-нетранслируемому участку генома, выявляют все 7 использованных в работе штаммов ВЗН, а пара праймеров и зонд, подобранные к locusу белка E, выявляют только 4 из 7 штаммов. При комбинации обеих пар праймеров и двух зондов разработанный тест позволил с высокой чувствительностью идентифицировать РНК ВЗН в

контаминированных вирусом пробах пулов комаров (100%) и тканей от птиц (98%) [Lanciotti et al., 2000].

На основе предложенных R. Lanciotti праймеров James Papin с сотрудниками разработали количественный тест для выявления РНК ВЗН с применением интеркалирующего флуоресцентного красителя SYBR Green [Papin et al., 2004]. Данный подход позволяет быстро и технически просто провести ОТ-ПЦР-РВ. Тем не менее, главным недостатком такого анализа является риск получения ложноположительных результатов, поскольку молекулы интеркалирующих красителей связываются с любой двухцепочечной ДНК, включая продукты неспецифической амплификации и димеры праймеров [Ребриков и др., 2009; Лабораторная диагностика..., 2018].

Среди широко используемых зарубежных наборов реагентов для диагностики ЛЗН методом ОТ-ПЦР-РВ следует отметить: «RealStar WNV RT-PCR Kit» (Altona Diagnostics GmbH, Германия), «cobas TaqScreen WNV Test» (Roche Diagnostics, США) [Pai et al., 2008; Dreier et al., 2015].

В России для *in vitro* диагностики разработан и зарегистрирован набор реагентов для выявления РНК ВЗН методом ОТ-ПЦР-РВ в клиническом материале от человека, материале от животных, комаров и клещей «АмплиСенс WNV-FL» (ФСР 2011/11503) производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора. В качестве РНК-мишени выбран фрагмент 5'-нетранслируемой области генома ВЗН. Аналитическая чувствительность набора составляет 5×10^3 копий/мл. При изучении аналитической специфичности с использованием гетерологичных флавивирусов (вирусов клещевого и японского энцефалита, вируса омской геморрагической лихорадки, вируса Лангат), герпесвирусов, энтеровирусов, риккетсий группы пятнистых лихорадок, спирохет, а также ДНК человека, птиц, клещей и комаров ложноположительных результатов выявлено не было [Платонов и др., 2010].

Зачастую на эндемичных по ЛЗН территориях наблюдается циркуляция других флавивирусов, вызывающих у человека неспецифические симптомы. В данном случае необходимо проведение дифференциальной диагностики между

ЛЗН и другими вирусными инфекциями. При этом требуется проведение множества анализов с диагностическими наборами на все возможные флавивирuses, эндемичные для определенной территории. Такой подход крайне трудоемкий, требует высокой технической оснащенности лаборатории и больших временных затрат. Данная проблема была решена путем разработки мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ (Multiplex Real-time RT-PCR). Суть метода заключается в использовании нескольких наборов праймеров в одной реакционной смеси, что позволяет одновременно выявлять несколько возбудителей инфекционных заболеваний. Так, сотрудниками ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора разработан набор олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации вируса клещевого энцефалита, ВЗН, боррелий и риккетсий методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. С целью выявления ВЗН в качестве мишени для посадки праймеров и зонда авторами был выбран участок генома NS5, кодирующий полимеразу [Патент 2629604 РФ].

Сотрудниками Колумбийского университета под руководством W. Ian Lipkin был разработан экспериментальный набор реагентов «СII-ArboViroPlex rRT-PCR assay» (Veroni USA Corporation, США) для одновременного обнаружения четырех вирусов (ВЗН, Зика, денге, Чикунгунья). Набор одобрен Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration) для использования в экстренных случаях [Mishra et al., 2019]. Совсем недавно Zhixiang Xu с соавторами предложили двухпробирочный мультиплексный вариант ОТ-ПЦР в режиме реального времени для одновременного обнаружения вируса Западного Нила, Зика, Чикунгунья, денге, желтой лихорадки, и японского энцефалита [Xu et al., 2022].

В России специалистами научно-производственной компании ООО «Синтол» разработан и зарегистрирован в качестве медицинского изделия набор реагентов для одновременного выявления и идентификации РНК вирусов лихорадок Западного Нила и долины Рифт «ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ» (РЗН 2015/3358). Для амплификации с помощью данного набора используют праймеры,

фланкирующие 5'-нетранслируемую область генома ВЗН. Аналитическая чувствительность набора составляет 1×10^3 копий/мл. Производитель заявляет об отсутствии ложноположительных результатов при испытании набора с использованием гетерологичных вирусов (Марбург, Эбола, Ласса, Мачупо, Хунин, венесуэльского энцефалита лошадей, клещевого энцефалита, японского энцефалита, денге, желтой лихорадки, Конго-крымской геморрагической лихорадки, коронавирусов) и бактерий (*Yersinia pestis*, *Coxiella burnetii*). Диагностическая чувствительность мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ с применением набора «ОМ-Скрин-ЛЗН/ЛДР-РВ» составляет 99%, диагностическая специфичность – 95%. Набор используют для скрининговых исследований проб клинических образцов, биопсийного и аутопсийного материала, вирусосодержащих суспензий, а также объектов окружающей среды.

За рубежом для *in vitro* диагностики ЛЗН и других вирусных инфекций методом мультиплексной ОТ-ПЦР-РВ известны следующие коммерческие наборы: «virella TBEV/WNV real time RT-PCR Kit» (gerbion GmbH & Co. KG, Германия) для одновременного выявления ВЗН и вируса клещевого энцефалита, «Viral meningitis RealTime PCR Kit» (Viracell S.L., Испания) для обнаружения ВЗН, вируса простого герпеса 1 и 2 типов, вируса ветряной оспы, энтеровируса, парэховируса и вируса Тоскана.

В молекулярной диагностике ЛЗН помимо полимеразной цепной реакции применяют также методы, основанные на изотермической амплификации нуклеиновых кислот. К ним относят: петлевую изотермическую амплификацию (LAMP, Loop-mediated isothermal amplification), амплификацию, основанную на последовательности нуклеиновых кислот (NASBA, Nucleic acid sequence-based amplification), транскрипционно-опосредованную амплификацию (ТМА, Transcription-mediated amplification), рекомбиназную полимеразную амплификацию (RPA, Recombinase polymerase amplification) и полимеразную спиральную реакцию (PSR, Polymerase spiral reaction) [Kwoh et al., 1989; Notomi et al., 2000; Liu et al., 2015; Бодулев и др., 2020].

Метод LAMP основан на использовании праймеров, гомологичных шести областям внутри целевой ДНК. В комбинации с реакцией обратной транскрипции метод LAMP используют для выявления РНК. Так, Parida с коллегами сконструировали набор праймеров, специфичных к локусу вирусного генома, кодирующему оболочечный белок (protE), для выявления РНК ВЗН методом LAMP [Parida et al., 2004]. Реакцию проводили посредством Bst-ДНК-полимеразы при температуре 63 °С. Чувствительность реакции составила 0,1 БОЕ (бляшкообразующих единиц) при использовании штаммов ВЗН NY99 и Eg101. При проведении реакции с гетерологичными вирусами (вирус денге ThNH7/93, вирус японского энцефалита JaOArS982 и вирус энцефалита Сент-Луис Parton) были получены отрицательные результаты, что указывало на высокую специфичность разработанных олигонуклеотидов.

Недавно Priyanka Tomar с соавторами предложили способ выявления РНК ВЗН методом LAMP с применением индикаторных полосок для проведения учета результатов реакции. Праймеры были подобраны к локусу гена полипротеина, кодирующему белок E. Чувствительность реакции составила 10 геномных копий [Tomar et al., 2022]. В настоящее время существует коммерческий набор реагентов, позволяющий выявлять ВЗН методом LAMP с флуоресцентной детекцией Pro-AmpRT WNV (Pro-Lab Diagnostics, США) [Burkhalter et al., 2021]. По данным производителя детекция результатов при использовании данного набора занимает 7 минут. Метод LAMP не требует для проведения сложного оборудования и может быть использован для быстрого скрининга образцов биологического материала на наличие РНК ВЗН в полевых условиях.

Суть метода NASBA заключается в непосредственной амплификации РНК с использованием трех ферментов: AMV-ревертазы вируса птичьего миелобластома, РНК-полимеразы фага T7 и РНК-азы H. На основе метода NASBA Lanciotti R.S. et al. были разработаны праймеры и зонды для выявления ВЗН в режиме реального времени [Lanciotti et al., 2001]. Чувствительность реакции составила 0,01 БОЕ. По данным Lanciotti R.S. разработанный набор олигонуклеотидов позволял выявлять 5 используемых в работе штаммов ВЗН. При испытании олигонуклеотидов в

реакции с РНК гетерологичных вирусов (вирусы денге 2 типа, желтой лихорадки, энцефалита Сент-Луис, японского энцефалита и др.) были получены отрицательные результаты [Lanciotti et al., 2001], что свидетельствовало о высокой специфичности разработанных праймеров.

Метод ТМА аналогичен NASBA, но в процессе его проведения для разрушения РНК в гибридной молекуле РНК-ДНК используют не отдельный фермент РНК-азу H, а РНК-азную активность самой ревертазы. Разработан коммерческий набор реагентов для выявления РНК ВЗН методом ТМА с гибридизационно-флуоресцентным учетом результатов «Procleix WNV Assay» (Grifols Diagnostic Solutions Inc., США) [Ziermann et al., 2008]. Заявленная производителем аналитическая чувствительность набора составляет 30-100 ГЭ/мл; диагностическая чувствительность – 99,1%, специфичность – 100%. Набор применяют в США для скрининга образцов плазмы доноров крови на наличие РНК ВЗН.

Для проведения RPA используют большой фрагмент *Bsu*-полимеразы, SSB-белок и рекомбиназу *UvsX* фага T4 [Piepenburg et al., 2006]. С целью выявления РНК необходим этап обратной транскрипции. Tomar с соавторами разработали способ быстрого обнаружения ВЗН на основе RPA с обратной транскрипцией в режиме реального времени (RT-RPA) [Tomar et al., 2021]. В качестве РНК-мишени выбрана последовательность генома ВЗН, кодирующая оболочечный белок (protE). Реакцию RPA проводили при 39 °С в течение 15 минут в термоциклере. Данный анализ позволял обнаруживать 10 геномных копий ВЗН. Эффективность анализа оценивали с использованием панели из 110 образцов клинического материала от больных пациентов с подозрением на ЛЗН. RT-RPA показала специфичность 100% (доверительный интервал 95,07–100%) и чувствительность 96,15% (доверительный интервал 80,36–99,90%) [Tomar et al., 2021]. Временные затраты для выполнения анализа RT-RPA в 10–20 раз меньше, чем для RT-qPCR. Рекомбиназная полимеразная амплификация является хорошим инструментом, который можно использовать для ускоренной диагностики ЛЗН у большого количества пациентов.

Для реализации метода PSR требуется пара праймеров и ДНК-полимераза с активностью вытеснения цепи. При амплификации молекул РНК дополнительно необходим этап обратной транскрипции. В 2020 году Tomar с коллегами сконструировали праймеры с целью выявления РНК ВЗН методом PSR с обратной транскрипцией (RT-PSR) [Tomar et al., 2020]. Олигонуклеотиды были подобраны к участку генома ВЗН, кодирующему белок Е. Реакцию проводили при 63 °С в течение 60 минут с использованием панели клинических образцов от людей с подозрением на ЛЗН. Из 107 проанализированных проб 30 оказались положительными. Чувствительность полимеразной спиральной реакции с разработанными праймерами составила 1 копию РНК на реакцию. Специфичность была доказана по отсутствию положительных результатов в реакциях с другими флавивирусами, а также альфавирусами и морбилливирусами [Tomar et al., 2020].

Несмотря на имеющиеся преимущества методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот следует учитывать ряд их недостатков, к которым относят: проблемы конструирования специфичных праймеров, сложности проведения реакций в мультиплексном формате, трудности в специфической детекции продуктов амплификации, а также высокая стоимость ферментов по сравнению с ОТ-ПЦР-РВ [Чемисова и др., 2022].

Помимо методов амплификации нуклеиновых кислот в диагностике ЛЗН применяют технологии, основанные на гибридизации ДНК и РНК. Примером является метод ДНК-микрочипов (DNA microarray). При наличии малых количеств ДНК в исследуемом образце осуществляют предварительную амплификацию. Для РНК проводится обратная транскрипция, но существуют чипы, работающие непосредственно с РНК [Лабораторная диагностика..., 2018]. Norstrom с соавторами разработали микрочип для обнаружения семи клинически значимых флавивирусов (ВЗН, вирусы денге 1–4 типов, японского энцефалита, желтой лихорадки) [Norstrom et al., 2005]. Анализ включал обратную транскрипцию, предварительную мультиплексную амплификацию и последующую гибридизацию полученных ампликонов с длинными

флуоресцентными зондами. Преимущество ДНК-чипов заключается в возможности проведения анализа с использованием большого числа флуоресцентных зондов в короткие сроки. Недостатком метода является высокий риск контаминации лаборатории молекулами РНК из положительных проб, а также продуктами предварительной амплификации.

Таким образом, существует множество молекулярно-генетических методов и разработанных на их основе наборов реагентов для диагностики ЛЗН. Тем не менее, основным методом выявления возбудителя ЛЗН в клинико-диагностических лабораториях остается ОТ-ПЦР в реальном времени. Причиной этого стала относительная простота, технологичность, надежность и воспроизводимость метода, а также сравнительно малые затраты на проведение исследования.

1.3 Внутривидовое многообразие и методы генотипирования вируса Западного Нила

Геном ВЗН обладает высокой генетической вариабельностью, следствием которой являются различия между штаммами, выражающиеся в степени вирулентности, способности к репродукции в различных клеточных линиях, а также адаптации к различным биологическим хозяевам. Дифференциация ВЗН на генотипы в настоящее время основана на выявлении различий в нуклеотидных последовательностях генома. Одной из первых работ по генотипированию ВЗН стало исследование F. Berthet [Berthet et al., 1997]. Авторами был проведен анализ нуклеотидной последовательности локуса гена белка E. Данный участок генома характеризуется высокой вариабельностью. В результате штаммы ВЗН были разделены на два генотипа – 1 и 2. Гомология между штаммами внутри каждого генотипа составляла 87% для 1 генотипа и 80,5% для генотипа 2.

Большую роль в изучении филогении ВЗН сыграли труды J. Scherret с соавторами, в которых данные о филогенетических взаимоотношениях между штаммами ВЗН были обобщены и структурированы [Scherret, 2001; Scherret,

2002]. Авторами было показано, что вирус Кунджин является не отдельным вирусом, а субтипом ВЗН 1b.

По современным данным штаммы ВЗН разделяют на 9 генотипов (генетических линий) [Pachler et al., 2014; Rizzoli et al., 2015]. Патогенность для человека установлена для ВЗН генотипов 1, 2 и 7. Причиной нескольких крупных вспышек ЛЗН во всем мире послужил ВЗН генотипов 1 и 2 [Bakonyi et al., 2006].

Генотип 1 ВЗН распространен по всему миру и представлен двумя субгенотипами 1a и 1b. К субгенотипу 1a относят штаммы, выделенные в Европе, включая европейскую часть России (Астраханская область), Африке, Северной и Южной Америке. ВЗН субгенотипа 1a являлся причиной крупных вспышек ЛЗН в России и США в 1999 году. Субгенотип 1b, называемый также вирусом Кунджин, распространен на Австралийском континенте и в Океании. Заболевания, вызванные вирусом Кунджин, крайне редки [Lanciotti et al., 1999; Murray et al., 2010]. Прототипным для ВЗН генотипа 1 является штамм Eg101, выделенный в 1951 году из крови клинически здорового ребенка в Египте (NCBI GenBank: AF260968).

Штаммы ВЗН генотипа 2 выделяли на территории Африки, Европы и европейской части России. Данный генотип послужил причиной крупных вспышек ЛЗН в России и Европе в 2010 году. Для ВЗН 2 генотипа прототипным является штамм B956, выделенный в 1937 г. из крови больной женщины в Уганде (NCBI Reference Sequence: NC_001563; GenBank: M12294). ВЗН генотипа 3, известный также как вирус Рабенсбург, был выделен в Чешской Республике в 1997 году [Aliota et al., 2012].

Варианты ВЗН генотипа 4 неоднократно выявляли в биологическом материале от озерных лягушек *Rana ridibunda* и комаров *Uranotaenia unguiculata* на территории юга Восточно-Европейской равнины. Известны единичные находки ВЗН генотипа 4 в комарах *Anopheles hyrcanus*, *Anopheles messeae* и клещах *Dermacentor marginatus*. Для ВЗН генотипа 4 прототипным является штамм LEIV-Krd88-190, выделенный от иксодовых клещей *D. marginatus*,

собранных в 1988 году в предгорных районах Северного Кавказа (NCBI GenBank: AY277251) [Анищенко и др., 2010].

ВЗН 5 генотипа был обнаружен в Индии. Некоторые исследователи относят его к отдельному субгенотипу (1c) генотипа 1 [Lanciotti et al., 1999]. Нуклеотидные последовательности фрагментов генома ВЗН 6 генотипа были получены в результате секвенирования изолятов, выделенных в Испании [Pachler et al., 2014]. Вирус Коутанго изначально считали самостоятельным видом, но на сегодняшний день его относят к ВЗН 7 генотипа. ВЗН 8 генотипа был выделен из комаров *Culex perfuscus* на территории Сенегала в 1992 году. К 9 генотипу был отнесен штамм WNV-Uu-LN-AT-2013, выделенный из комаров *Uranotaenia unguiculata*, отловленных в Австрии [Pachler et al., 2014]. На территории России в разные годы была установлена циркуляция 1, 2 и 4 генотипов ВЗН [Львов, 2000; Субботина и др., 2014].

Одним из первых методических подходов для генотипирования ВЗН стала комбинация ОТ-ПЦР и анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ОТ-ПЦР-ПДРФ, RT-PCR-RFLP, RT-PCR with Restriction fragment length polymorphism). Метод основан на том, что локализация сайтов для эндонуклеаз рестрикции может быть полиморфной для разных штаммов ВЗН. На основе метода ОТ-ПЦР-ПДРФ К. Shirato с соавторами разработали способ дифференциации высоковирулентного штамма ВЗН NY99 от других штаммов ВЗН [Shirato et al., 2003]. Для проведения анализа использовали продукт амплификации локуса NS1-NS2A размером 957 п.н., обработанный рестриктазой TaqI. Размеры полученных рестрикционных фрагментов для штамма NY99 составляли 357, 289 и 311 п.н., для штамма Eg101 – 526, 120 и 311 п.н., соответственно [Shirato et al., 2003].

Существенными преимуществами метода ОТ-ПЦР-ПДРФ являются низкая стоимость и короткие сроки проведения анализа. Однако применение метода требует наличия информации о последовательности генома ВЗН для подбора рестриктаз и праймеров. Кроме того, не для всех генотипов ВЗН можно подобрать сайты рестрикции для эндонуклеаз.

Наибольшую популярность приобрели методы генотипирования, основанные на секвенировании участков или полного генома ВЗН. Сотрудниками ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора разработаны олигонуклеотидные праймеры для идентификации 1a, 1b, 2 и 4 генотипов ВЗН методом секвенирования фрагментов генома [Жуков, 2013]. В качестве ДНК-мишеней были выбраны участки 5'-UTR, prot C, prot E, NS3, NS5 генома ВЗН. С использованием данных праймеров методом секвенирования была подтверждена принадлежность ВЗН ко 2 генотипу при исследовании проб клинического материала в Волгоградской области за период 2010-2012 гг. [Жуков, 2013]. Для определения полногеномной нуклеотидной последовательности штаммов ВЗН 1a, 2, 4 и 5 генотипов методом секвенирования по Сенгеру известны наборы специфичных праймеров, предложенных А.Г. Прилиповым [Прилипов, 2015]. При секвенировании 31 штамма ВЗН из Государственной коллекции вирусов Института вирусологии им. Д.И.Ивановского с помощью данных праймеров было установлено, что 28 штаммов ВЗН относились к генотипу 1a и по 1 штамму – к генотипам 2, 4, 5. Показано, что 18 штаммов ВЗН, выделенных с 2001 по 2005 гг. на территории Астраханской области, имели высокую гомологию со штаммами ВЗН Ast99-901 и Ast99-986 (99,1-99,7%), которые вызвали эпидемические вспышки в этом регионе с 1999 по 2000 гг. [Прилипов, 2015].

Styliani Pappa с соавторами разработали два набора праймеров для дифференциации 1 и 2 генотипов ВЗН методом высокопроизводительного секвенирования, основанного на ПЦР (PCR-based NGS, PCR-based next-generation sequencing) [Pappa et al., 2021]. Предложенный авторами подход был основан на получении методом вложенной ОТ-ПЦР шести перекрывающихся ампликонов для каждого из двух генотипов ВЗН и последующем их секвенировании с использованием платформы Ion PGM. Апробацию разработанных наборов праймеров проводили на штаммах ВЗН Eg101 и Nea Santa-Greece-2010. Процент покрытия от общего числа прочтений составил 98,6%. Средняя длина прочтений – 233 п.н. Авторы указывают, что данный подход может быть применен не только

для штаммов ВЗН, но и для проб биологического материала с низкой концентрацией вирусной РНК [Parra et al., 2021].

На сегодняшний день секвенирование считается «золотым» стандартом генотипирования возбудителей вирусных инфекций, в том числе и ВЗН [Лабораторная диагностика..., 2018]. Однако данный метод требует больших временных затрат, проведения биоинформационного анализа полученных нуклеотидных последовательностей, а также сведений о последовательностях геномов родственных видов вирусов для сравнительного анализа. Кроме того, способ генотипирования, основанный на секвенировании, может быть реализован только для образцов с высокой концентрацией вирусной РНК. Большинство клинических проб имеет низкую вирусную нагрузку, что снижает эффективность применения секвенирования для определения генотипа ВЗН в нативном материале.

В клинической лабораторной практике для генотипирования возбудителей вирусных инфекций широко применяется метод типоспецифичной ОТ-ПЦР (TS-RT-PCR, Type-specific RT-PCR). Принцип TS-RT-PCR заключается в подборе специфичных генотипу пар праймеров на основании различия между участками генома. При этом мишени для подбора праймеров должны быть достаточно консервативными для всех штаммов одного генотипа. Учет результатов можно проводить как электрофоретическим, так и гибридизационно-флуоресцентным методами. В последнем случае к участку генома, фланкированному праймерами, для каждого генотипа подбирают флуоресцентно-меченый зонд. Если зонды несут разные флуоресцентные метки, реакцию осуществляют в одной пробирке – мультиплексный формат TS-RT-PCR. На основе данного метода Fall с соавторами разработали тест для выявления и генотипирования изолятов ВЗН 1 и 2 генотипов [Fall et al., 2016]. В качестве РНК-мишени для подбора праймеров и зондов авторы использовали последовательность 3'-нетранслируемой области генома ВЗН. При подборе праймеров использовали принцип амплификации рефрактерной мутационной системы ARMS (amplification-refractory mutation system). Данный подход основан на неспособности ДНК-полимеразы к

амплификации при наличии несоответствия между нуклеотидами матричной кДНК и 3'-концом праймера [Горбунова и др., 1997]. Разработанный тест позволил выявить и генотипировать ВЗН в пробах культуральной жидкости, сыворотке крови человека, тканях позвоночных животных, а также комаров [Fall et al., 2016].

В некоторых случаях для амплификации варибельного участка генома подбирают универсальные праймеры, выявляющие все генотипы, а для дифференциации используют только типоспецифичные зонды. Так, для одновременного выявления и дифференциации ВЗН 1 и 2 генотипов, а также близкородственного вируса Усуту разработан способ, основанный на проведении количественной мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени с применением технологии «TaqMan» [Del Amo et al., 2013]. Для получения ампликонов Del Amo с соавторами использовали универсальную пару праймеров, а для выявления генотипов ВЗН применяли специфичные зонды, меченые разными флуорофорами. Похожий тест для дифференциации ВЗН 1 и 2 генотипов разработан Faggioni с соавторами [Faggioni et al., 2014]. К участку 5'-нетранслируемой области генома ВЗН была подобрана одна пара праймеров и два зонда. Чувствительность реакции составила 10^{-1} ТЦПД₅₀/мл (50%-ная тканевая цитопатическая доза). Как и в предыдущей работе, дифференциацию генотипов ВЗН проводили на основе типоспецифичных зондов.

Таким образом, анализ имеющихся источников литературы по проблеме показал, что использование метода типоспецифической ОТ-ПЦР для обнаружения и генотипирования ВЗН является весьма перспективным в сравнении с другими молекулярно-генетическими методами. Данный подход может быть использован с целью создания на его основе диагностического набора реагентов для выявления и дифференциации циркулирующих на территории России генотипов ВЗН в пробах биологического материала в короткие сроки.

СОБСТВЕННЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1 Объекты исследования

Объектами исследования служили инактивированные штаммы вируса Западного Нила, образцы кДНК штаммов гетерологичных вирусов, живые и инактивированные штаммы кишечной палочки, образцы ДНК штаммов гетерологичных бактерий, пробы клинического материала (кровь, сыворотка и плазма крови, спинномозговая жидкость, моча, головной мозг, почки), пробы зоологического и энтомологического материала (суспензии головного мозга птиц, пулов комаров и клещей), инфицированные вирусом Западного Нила. Все работы с ПБА проводили в соответствии с СанПиН 3.3686-21, МУ 1.3.2569-09.

Работа выполнена с использованием 12 штаммов вирусов: 5 – West Nile virus и 7 штаммов гетерологичных вирусов, из них 1 – Chikungunya virus; 3 – Dengue virus, 1 – Tick-borne encephalitis virus, 1 – Yellow fever virus, 1 – Rubella virus (таблица 1). Инактивированные штаммы West Nile virus генотипа 2 получены из коллекции лаборатории арбовирусных инфекций ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Образцы кДНК штаммов West Nile virus генотипа 1 и гетерологичных вирусов получены из лаборатории молекулярной эпидемиологии ООИ ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора.

В работе использовано 4 штамма бактерий: 2 – *Escherichia coli*, 1 – *Staphylococcus aureus*, 1 – *Pseudomonas aeruginosa* (таблица 2). Штаммы бактерий кишечной палочки получены из лаборатории коллекционных штаммов ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. ДНК штаммов гетерологичных бактерий получены из лаборатории генодиагностики ООИ ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Таблица 1 – Характеристика штаммов вирусов, использованных в работе

Название штамма	Источник выделения	Год выделения	Место выделения
West Nile virus Volgograd 601/18	Комары <i>Culex modestus</i>	2018	Россия, Волгоградская область
West Nile virus Volgograd 696/18	Комары <i>Culex pipiens</i>	2018	Россия, Волгоградская область
West Nile virus Volgograd 723/18	Комары <i>Culex pipiens</i>	2018	Россия, Волгоградская область
West Nile virus Volgograd 829/18	Комары <i>Culex pipiens</i>	2018	Россия, Волгоградская область
West Nile virus Tomsk/Bird/2006/A4	Птица <i>Acrocephalus dumetorum</i>	2006	Россия, Томская область
Chikungunya virus Ross late 4669	Человек	1953	Танзания
Dengue virus DENV- 1/8/Tailand/01/2013	Человек	2013	Россия, Томская область
Dengue virus DENV- 2/131/Philippines/12/2013	Человек	2013	Россия, Новосибирская область
Dengue virus DENV- 4/122/Vietnam/11/2013	Человек	2013	Россия, Новосибирская область
Tick-borne encephalitis virus 205	Клещи <i>Ixodes persulcatus</i>	1973	СССР, г. Хабаровск
Yellow fever virus 17Д	Вакцина желтой лихорадки, серия 297	нет данных	нет данных
Rubella virus RA 27/3	Вакцина против краснухи, серия M820	нет данных	нет данных

Таблица 2 – Характеристика штаммов бактерий, использованных в работе

Название штамма	Источник выделения	Год выделения	Место выделения
<i>Escherichia coli</i> JM 109	Нет данных	Нет данных	США
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25923	Нет данных	1946	США
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Нет данных	1945	США
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 4000	Нет данных	1978	СССР

В качестве биологического материала использовали 411 проб, инфицированных вирусом Западного Нила, от больных, переносчиков и резервуаров инфекции, из них 227 проб клинического и секционного материала от человека и 184 пробы зоологического и энтомологического материала (таблицы 3, 4). Биологический материал получен из Референс-центра по мониторингу за возбудителем ЛЗН на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Исследование одобрено Комитетом по биоэтике ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 3 от 05.04.2019 г.).

Таблица 3 – Характеристика проб клинического материала, использованных в работе

Место отбора (регион РФ)	Вид материала	Год отбора	Кол-во проб
1	2	3	4
Астраханская область	Головной мозг	2013, 2015- 2016, 2018	4
	Моча	2012	1
	Сыворотка крови	2012-2013, 2018	5
Волгоградская область	Головной мозг	2010, 2012- 2013, 2019	9
	Ликвор	2011, 2013	2
	Моча	2011	1
	Плазма крови	2018	1

Продолжение таблицы 3

1	2	3	4
Волгоградская область	Почка	2013	1
	Сыворотка крови	2011-2014, 2016, 2018-2019	41
	Цельная кровь	2010-2014, 2018-2019, 2021	36
Воронежская область	Головной мозг	2018	1
	Сыворотка крови	2011-2012	4
Курская область	Цельная кровь	2019	3
Липецкая область	Сыворотка крови	2012, 2019	2
	Цельная кровь	2016	1
Пензенская область	Сыворотка крови	2013	1
Ростовская область	Головной мозг	2018-2019	4
	Ликвор	2019	2
	Плазма крови	2012	2
	Сыворотка крови	2012-2013, 2018-2019	9
Саратовская область	Сыворотка крови	2013	2
	Цельная кровь	2012-2016	79
Краснодарский край	Плазма крови	2022	1
	Сыворотка крови	2011, 2019	2
	Цельная кровь	2019	7
Ставропольский край	Головной мозг	2012	1
	Цельная кровь	2018-2019	2
Республика Дагестан	Сыворотка крови	2021	1
Республика Крым	Цельная кровь	2018	1
Республика Татарстан	Цельная кровь	2018	1

Таблица 4 – Характеристика проб энтомологического и зоологического материала, использованных в работе

Место отбора (регион РФ)	Вид биологического материала	Вид животного	Год отбора	Кол-во проб (пулов)
1	2	3	4	5
Астраханская область	Пул комаров	<i>Culex modestus</i>	2021	1
		<i>Culex pipiens</i>	2019-2022	13

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
Волгоградская область	Пул комаров	<i>Aedes caspius</i>	2018-2019, 2022	11
		<i>Aedes pulchritarsis</i>	2018	1
		<i>Aedes vexans</i>	2013, 2022	8
		<i>Anopheles hyrcanus</i>	2018, 2021-2022	3
		<i>Coquillettidia richiardii</i>	2018-2019, 2021	6
		<i>Culex modestus</i>	2014, 2017-2019, 2021-2022	25
		<i>Culex pipiens</i>	2013-2014, 2016-2022	54
		<i>Uranotaenia unguiculata</i>	2018, 2021	3
	Пул клещей	<i>Hyalomma marginatum</i>	2019, 2021	3
	Головной мозг птицы	<i>Aythya ferina</i>	2020	1
		<i>Corvus cornix</i>	2016	1
		<i>Larus cachinnans</i>	2015	1
		<i>Mareca strepera</i>	2020	1
		<i>Phasianus colchicus</i>	2011	1
		<i>Podiceps cristatus</i>	2020	1
Воронежская область	Пул комаров	<i>Aedes geniculatus</i>	2021	1
		<i>Anopheles claviger</i>	2021	1
		<i>Anopheles maculipennis</i>	2021	2
		<i>Culex pipiens</i>	2021	2

Продолжение таблицы 4

1	2	3	4	5
Ростовская область	Пул комаров	<i>Aedes caspius</i>	2022	1
	Пул клещей	<i>Hyalomma marginatum</i>	2022	1
	Головной мозг птицы	<i>Corvus frugilegus</i>	2020	2
Саратовская область	Головной мозг птицы	<i>Corvus cornix</i>	2014, 2016	3
		<i>Corvus frugilegus</i>	2016	7
		<i>Corvus monedula</i>	2016	3
		<i>Larus argentatus</i>	2015	1
		<i>Luscinia svecica</i>	2015	1
		<i>Parus major</i>	2015	1
		<i>Pica pica</i>	2016, 2018	4
		<i>Sterna hirundo</i>	2016	1
Ставропольский край	Пул комаров	<i>Culex pipiens</i>	2022	2
Республика Дагестан	Пул комаров	<i>Culex pipiens</i>	2021	1
Республика Калмыкия	Пул комаров	<i>Culex modestus</i>	2018	1
		<i>Culex pipiens</i>	2020, 2022	4
		<i>Uranotaenia unguiculata</i>	2018, 2020	10
Республика Крым	Пул комаров	<i>Culex spp.</i>	2018	1

2.2 Подготовка проб для молекулярно-генетических исследований

Цельную кровь, содержащую ЭДТА- Na_2 , отбирали в объеме 100 мкл и переносили в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл для выделения нуклеиновых кислот.

Плазму крови получали центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800-1600 g в течение 20 мин при комнатной температуре. Отбирали 100 мкл плазмы в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 для выделения нуклеиновых кислот.

Сыворотку получали из цельной крови без добавления антикоагулянта. Для этого кровь отстаивали при комнатной температуре в течение 30 мин до полного образования сгустка, затем центрифугировали при 800-1600 g в течение 10 мин при комнатной температуре. Сыворотку в количестве 100 мкл переносили в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл для выделения нуклеиновых кислот.

Спинальную жидкость отбирали в объеме 100 мкл в отдельную микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 для выделения нуклеиновых кислот без предварительной обработки.

Мочу в объеме 1 мл переносили в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл. Центрифугировали 5 мин при 10000 g. Используя вакуумный отсасыватель с колбой-ловушкой, полностью удаляли супернатант, не захватывая осадок. К осадку добавляли 0,9% раствор хлорида натрия до конечного объема 0,2 мл, тщательно перемешивали содержимое на вортексе.

Аутопсийный материал от человека или животного растирали до гомогенного состояния в стерильной охлажденной ступке, после чего добавляли охлажденный 0,9% раствор натрия хлорида в соотношении 1:5 (масса/объем). Отбирали с помощью пипетки через ватный тампон по 1 мл надосадочной жидкости в отдельные пробирки объемом 1,5 мл, центрифугировали в течение 10 мин при 10000 g. Осадок ресуспендировали в 100 мкл 0,9% раствора натрия хлорида.

При подготовке проб комаров и клещей предварительно формировали пулы по видам. Группировку проб осуществляли в соответствии с МУ 3.1.3012-12 «Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней». Членистоногих помещали в стерильную фарфоровую ступку, добавляли 0,7-1,0 мл 0,9% раствор хлорида натрия и гомогенизировали пробу. Наконечником с фильтром переносили пробу в микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и центрифугировали при 1200 g в течение 2 мин для осветления пробы. Нуклеиновые кислоты выделяли из 0,1 мл надосадочной жидкости.

Обеззараживание подготовленных проб проводили в соответствии с приложением 5 МУ 1.3.2569-09 «Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I-IV групп патогенности».

2.3 Выделение нуклеиновых кислот

Выделение тотальной РНК и ДНК из проб бактериальных взвесей, плазмы крови и спинномозговой жидкости осуществляли с использованием коммерческого набора «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). К подготовленным в соответствии с п. 2.2 пробам добавляли лизирующий раствор и инкубировали 20 мин при температуре 65 °С. Затем в пробирки с лизатами проб вносили раствор для преципитации и осаждали его с последующим удалением супернатанта. Пробы отмывали спиртовыми растворами 3, 4 и полностью удаляли супернатант, подсушивали при 65 °С в течение 5 мин и растворяли осадок в РНК-буфере при 65 °С в течение 5 мин.

Выделение РНК из вирусосодержащей культуральной жидкости, цельной крови, сыворотки крови, мочи, суспензий органов человека и животных, суспензий комаров и клещей проводили в 2 этапа. Для первого этапа выделения РНК из биологического материала использовали коммерческий набор «РИБО-золь-С» (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). К подготовленным в

соответствии с п. 2.2 пробам добавляли лизирующий раствор и инкубировали 20 мин при температуре 65 °С. Затем посредством растворов Е, А, В осуществляли фенольно-хлороформную депротеинизацию проб с последующим разделением водной и фенольной фаз центрифугированием при 10000 g. Водную фазу переносили в чистые пустые микроцентрифужные пробирки объемом 1,5 мл и проводили второй этап выделения нуклеиновых кислот с использованием набора реагентов «РИБО-преп» как описано выше.

Выделение плазмидной ДНК осуществляли щелочным методом, предложенным Бирнбоймом и Доли [Плазмиды, 1989]. Микроцентрифужную пробирку с 1 мл культуры кишечной палочки центрифугировали при 10000 g. Отбирали надосадочную жидкость. В микроцентрифужную пробирку с осадком вносили 100 мкл раствора I (глюкоза 0,05 М; ЭДТА- Na_2 0,01 М, рН 8,0; трис-НСI 0,025 М, рН 8,0; лизоцим 1 мг/мл), перемешивали и выдерживали при комнатной температуре 15 мин. Затем добавляли 200 мкл раствора II (гидроксид натрия 0,2 М; додецилсульфат натрия 1%). Повторно перемешивали и выдерживали при комнатной температуре 10 мин. Добавляли 150 мкл раствора III (ацетат натрия 3М, рН 4,8) и инкубировали на ледяной бане в течение 30 мин. Центрифугировали при 10000 g 5 мин. Надосадочную жидкость переносили в новую пустую микроцентрифужную пробирку объемом 1,5 мл и проводили переосаждение плазмидной ДНК 95%-ным этиловым спиртом. Далее центрифугировали пробу при 10000 g 10 минут, полностью удаляли супернатант, подсушивали при комнатной температуре и растворяли осадок ДНК в бидистиллированной воде.

2.4 Постановка и проведение реакции обратной транскрипции

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

2.5 Измерение концентрации ДНК

Концентрацию ДНК измеряли флуориметрическим методом с помощью прибора Qubit 2.0 (Life Technologies, США) посредством набора реагентов Qubit dsDNA HS Assay Kit (Life Technologies, США) в соответствии с инструкцией производителя.

2.6 Синтез олигонуклеотидов

Синтез праймеров, а также клонируемого фрагмента кДНК ВЗН 4 генотипа осуществляли фосфитамидным методом на автоматическом синтезаторе ДНК ASM-800 (ООО «Биоссет», Россия). Флуоресцентно-меченые зонды синтезированы в ЗАО «Синтол» (Россия).

2.7 Конструирование рекомбинантных ДНК

В качестве клонирующего вектора использовали плазмиду pUC19 (Thermo Scientific, США). Рестрикцию клонируемого участка и вектора проводили в одной реакционной смеси посредством рестриктаз XbaI и EcoRI (Thermo Scientific, США) при температуре 37 °С в течение 24 ч. Лигирование клонируемого участка и вектора проводили с использованием лигазы фага T4 (Invitrogen, США) при температуре 14 °С в течение 24 ч.

Для клонирования рекомбинантных плазмид использовали штамм *E. coli* JM109 (Promega, США). Культивирование *E. coli* осуществляли в течение суток при 37 °С на среде LB по Ленноксу: триптон (Becton Dickinson, США) – 10 г/л; дрожжевой экстракт (Becton Dickinson, США) – 5 г/л; натрия хлорид (Panreac, Испания) – 5 г/л; агар-агар – 15 г/л (Becton Dickinson, США). Компетентные клетки готовили посредством обработки раствором хлорида кальция (100 мМ CaCl₂, 10 мМ трис-HCl, pH 8,0) по методике, описанной Маниатис [Маниатис, 1984]. Отбор рекомбинантных клонов осуществляли методом бело-синей

селекции на среде LB, содержащей 40 мкг/мл X-gal (Thermo Scientific, США), 50 мкг/мл IPTG (Invitrogen, США). Скрининг клонов проводили методом ПЦР и секвенирования с праймерами Universal M13 (Invitrogen, США).

2.8 Постановка полимеразной цепной реакции

Для выявления генотипов ВЗН в отдельных микропробирках объемом 0,6 мл готовили 3 реакционные смеси (для выявления 1, 2 и 4 генотипов ВЗН соответственно), смешивая основные компоненты в следующем порядке: вода, праймеры и гибридизационно-флуоресцентные зонды (синтез ЗАО «Синтол», Россия), раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), раствор магния хлорида (Thermo Scientific, США), 5×кратный ПЦР-буфер (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия), фермент ревертаза (Thermo Scientific, США), фермент *Taq-F*-ДНК полимеразы (ФБУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Приготовленные реакционные смеси тщательно перемешивали на микроцентрифуге/встряхивателе и вносили по 15 мкл в микропробирки объемом 0,2 мл. В микропробирки для проб вносили по 10 мкл РНК из исследуемых проб. Для каждой из 3 реакционных смесей готовили 3 контрольные пробирки: 1) отрицательный контрольный образец выделения – вместо пробы РНК вносили 10 мкл образца, выделенного из пробы отрицательного контроля выделения; 2) отрицательный контрольный образец ОТ-ПЦР – вместо пробы РНК вносили 10 мкл ТЕ-буфера; 3) положительный контрольный образец ПКО – вместо пробы РНК вносили 10 мкл раствора кДНК ВЗН 1, 2 или 4 генотипа соответственно. Общий объем реакционной смеси составлял 25 мкл, включая объем РНК-пробы – 10 мкл.

Микропробирки помещали в прибор «Rotor-Gene 6000» (Corbett Research, Австралия) или «Rotor-Gene Q» (Qiagen, Германия) и проводили амплификацию. Полученные данные ОТ-ПЦР интерпретировали с помощью программного обеспечения приборов «Rotor-Gene 6000», «Rotor-Gene Q». Результаты анализировали на основании наличия или отсутствия пересечения кривой

флуоресценции исследуемой пробы с установленной на определенном уровне пороговой линией, что соответствовало наличию или отсутствию значения порогового цикла «Ct» (cycle threshold).

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 ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Реакцию проводили согласно инструкции производителя.

2.9 Проведение электрофореза

Детекцию продуктов ПЦР, используемых для клонирования и секвенирования, осуществляли методом электрофореза в 2% агарозном геле, приготовленном на трис-боратном буфере (0,002 М ЭДТА, рН 8,0; 0,089 М трис; 0,089 М борной кислоты), по общепринятой методике [Маниатис, 1984]. Электрофорез проводили при напряженности электрического поля 5 В/см в течение 50 минут. Фрагменты ДНК в геле окрашивали этидиум бромидом (0,5 мкг/мл). Результаты визуализировали в проходящем ультрафиолетовом свете и документировали с помощью системы «GelDoc XR» (Bio-Rad, США). Полученные данные оценивали по наличию или отсутствию в геле ампликонов необходимого размера. Специфичность полос амплифицированной ДНК подтверждали ее положением (размером), сравнивая с маркером молекулярных масс DNA Ladder 100-1500 п.н. (Thermo Fisher Scientific, США).

2.10 Секвенирование продуктов амплификации

Секвенирование ВЗН проводили на автоматическом генетическом анализаторе ABI Prism 3130 (Applied Biosystems, США). Ампликоны получали методом ОТ-ПЦР с использованием амплификатора «Терцик» (ООО «НПО ДНК-Технология», Россия). Для проведения реакции циклического секвенирования

использовали набор BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, США).

2.11 Программы и базы данных

Для анализа геномов ВЗН использованы 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). Анализ результатов секвенирования проводили путем сравнения полученных нуклеотидных последовательностей с таковыми из международной генетической базы данных GenBank (NCBI, США) 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).

2.12 Статистическая обработка полученных данных

Статистическую обработку результатов осуществляли с применением пакета прикладных программ «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., США). При обработке результатов клинических испытаний использовали нормативные документы: «Методические рекомендации по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации», утверждены ФГБУ «ЦМИКЭЭ» Росздравнадзора и ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора от 24.08.2018 г.; ГОСТ Р 53022.3-2008. Статистическую достоверность полученных результатов испытаний оценивали в зависимости от числа параллельных опытов при доверительной вероятности 90%, используя формулу биномиального распределения Бернулли [Зарядов, 2010].

Глава 3. РАЗРАБОТКА НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ И ДИФФЕРЕНЦИАЦИИ ГЕНОТИПОВ ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

3.1 Выбор РНК-мишеней, конструирование праймеров и флуоресцентно-меченых зондов для дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР

С целью выбора РНК-мишеней и конструирования олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов, необходимых для создания диагностического набора реагентов, был проведен сравнительный анализ геномов ВЗН, депонированных в международной генетической базе данных GenBank NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). При молекулярно-генетическом анализе 350 полноразмерных нуклеотидных последовательностей ВЗН выявлена высокая генетическая вариабельность, выражающаяся в наличии на всей протяженности генома возбудителя ЛЗН большого количества нуклеотидных замен. Сравнительный анализ нуклеотидных последовательностей ВЗН различных генотипов позволил выявить степень гомологии, составляющую 54,5%. 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%). Для участков, кодирующих мембранный (protM) и оболочечный (protE) белки, гомология составляла 40,5–52,5%. При исследовании нуклеотидных последовательностей группы штаммов ВЗН генотипов 1, 2 и 4 гомология была выражена в большей степени и составляла 95,0–96,5%.

Результаты сравнительного анализа позволили определить консервативные и вариабельные участки аннотированных геномов ВЗН и осуществить выбор мишеней, пригодных для генотипирования. При конструировании праймеров, предназначенных для идентификации ВЗН 1, 2 и 4 генотипов, был выбран участок гена полипротеина (*flavivirus polyprotein gene*), кодирующего капсидный белок

protC (GenBank NCBI, GeneID: 912267). К выбранному участку были подобраны три пары специфичных праймеров. Каждая пара праймеров фланкировала участок гена полипротеина ВЗН определенного генотипа. Для детекции ампликонов, специфичных для каждого генотипа ВЗН, были сконструированы три гибридных зонда, меченых флуорофорами FAM, ROX и JOE (таблица 5). Комплементарные концевые последовательности зонда образуют «шпильку» по принципу «молекулярного маяка». По каналу Green детектировали продукт амплификации кДНК ВЗН 1 генотипа, по каналу Orange – кДНК ВЗН 2 генотипа, по каналу Yellow – кДНК ВЗН 4 генотипа [Патент 2715617 РФ; Патент 2715625 РФ; Патент 2737396 РФ].

Таблица 5 - Характеристика сконструированных олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченых зондов для идентификации 1, 2 и 4 генотипов вируса Западного Нила

Наименование праймеров и зондов	Последовательность праймеров и зондов (5'→3')	Идентификационный номер последовательности генома в GenBank	Позиция олигонуклеотида в последовательности генома	Расчетная длина ампликона
Олигонуклеотиды для обнаружения ВЗН 1 генотипа				
<i>WNV-1type-F</i>	GCGTGTGTCCTTGATTG	AY278441	164-181	152 п.н.
<i>WNV-1type-R</i>	GTTCACACCTCTCCATCG		298-315	
<i>WNV-1type-P</i>	(FAM)CCTGTGTTGGCGTTC TTCAGGTTACAGG(BHQ1)		241-269	
Олигонуклеотиды для обнаружения ВЗН 2 генотипа				
<i>WNV-2type-F</i>	GCTATGCTGAGTCTGATTG	KJ934710	193-211	116 п.н.
<i>WNV-2type-R</i>	CCTCTCCATCTGTCCAG		292-308	
<i>WNV-2type-P</i>	(ROX)CCCAATACGTTTCGT GTTGGCTCTTTGGG(BHQ2)		222-250	
Олигонуклеотиды для обнаружения ВЗН 4 генотипа				
<i>WNV-4type-F</i>	GCGTGTGTCCTTAATAG	FJ159129	131-148	147 п.н.
<i>WNV-4type-R</i>	CACCTCTCCATCTGTCC		261-277	
<i>WNV-4type-P</i>	(JOE)CTCGTGGCCTTGTTG ACGTTTTTCACGAG(BHQ1)		202-230	

Конструирование олигонуклеотидов осуществляли с помощью программ Oligo 7. При использовании компьютерной программы PerlPrimer v1.1.21 была проанализирована структура выбранных пар праймеров (образование димеров, шпилек и других вторичных структур) и показана их теоретическая пригодность для успешной инициации реакции амплификации. В онлайн-режиме с использованием программы Mfold на интернет-сайте <http://unafold.rna.albany.edu> оценивали вторичную структуру и термодинамические параметры разработанных зондов.

Сконструированные праймеры и зонды были проанализированы с помощью компьютерной программы BLAST на web-сервере Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) для установления гомологии между ними и нуклеотидными последовательностями близкородственных вирусов и гетерологичных микроорганизмов, присутствующих в базе данных GenBank. На момент проведения компьютерного анализа гомологии выявлено не было.

Таким образом, проведен сравнительный анализ геномов ВЗН с помощью данных из генетической базы GenBank NCBI и компьютерных программ, выбраны вариабельные участки РНК для ВЗН генотипов 1, 2 и 4, являющиеся специфичными для каждого из трех генотипов. К данным РНК-мишеням сконструированы олигонуклетидные праймеры и флуоресцентно-меченые зонды, перспективные для создания набора реагентов, позволяющего выявлять и дифференцировать 1, 2 и 4 генотипы ВЗН методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией.

3.2 Конструирование рекомбинантных штаммов *Escherichia coli* для использования в качестве контрольных образцов вируса Западного Нила генотипов 1, 2 и 4

Для контроля эффективности амплификации, изучения аналитической чувствительности и специфичности разработанных праймеров и зондов,

позволяющих проводить дифференциацию генотипов ВЗН методом ОТ-ПЦР, необходимо использование положительных контрольных образцов. Положительные контрольные образцы ВЗН генотипов 1, 2 и 4 конструировали с помощью генно-инженерных методов. Для этого осуществляли клонирование в клетках *E. coli* JM 109 специфичных участков генома ВЗН в составе вектора, в качестве которого использовали плазмиду pUC19.

Для получения фрагментов генома ВЗН 1 и 2 генотипов, необходимых при встраивании в вектор, проводили ОТ-ПЦР с использованием РНК ВЗН, выделенной из проб биологического материала, и праймеров, несущих на 5'-концах сайты рестрикции для эндонуклеаз XbaI и EcoRI (таблица 6).

Таблица 6 – Праймеры для получения клонируемых фрагментов генома ВЗН 1 и 2 генотипов

Генотип ВЗН	Наименование праймера	Последовательность праймера для получения клонируемого фрагмента генома ВЗН 5'→3'
1, 2	<i>WNV-XbaI-F</i>	TTATCATCTAGATAGTAGTTCGCCTGTGTGA GCTGA
1	<i>WNV1a-EcoRI-R</i>	ТТААСТГААТТСТСААТТССGGТТТТСССТС СТСТТТТС
2	<i>WNV2-EcoRI-R</i>	ТТААСТГААТТСТАAGСССGGCTGTGCСТССТ СТТТТС

При проведении ОТ-ПЦР с целью получения клонируемого фрагмента использовали следующий режим: обратная транскрипция 50 °С – 30 мин; предварительная денатурация 95 °С – 15 мин; циклирование (95 °С – 10 с, 72 °С – 50 с) × 50 циклов.

Клонируемый фрагмент при амплификации кДНК ВЗН 1 генотипа состоял из 430 нуклеотидов, кДНК ВЗН 2 генотипа - 428 нуклеотидов. Позиции клонируемых фрагментов кДНК в геноме ВЗН указаны в таблице 7. Полученные ампликоны подвергали рестрикции для формирования липких концов.

Таблица 7 – Позиции клонируемых фрагментов кДНК в геноме ВЗН

Генотип ВЗН	Идентификационный номер последовательности генома ВЗН в базе данных GenBank	Позиция клонируемого фрагмента кДНК в геноме ВЗН	Расчетная длина клонируемого фрагмента генома ВЗН
1	AU278441	1-430	430 п.н.
2	KJ934710	1-428	428 п.н.
4	FJ159129	130-291	162 п.н.

Поскольку в Референс-центре по мониторингу за возбудителем ЛЗН на момент проведения исследования отсутствовали пробы биоматериала, инфицированного ВЗН 4 генотипа, это обстоятельство существенно усложнило задачу получения клонируемого участка генома вируса данного генотипа.

В связи с этим, фрагмент генома ВЗН 4 генотипа получали путем химического синтеза с последующей амплификацией методом ПЦР. Для синтеза была предварительно сконструирована *in silico* одноцепочечная последовательность ДНК размером 212 нуклеотидов на основе полноразмерной нуклеотидной последовательности ВЗН 4 генотипа, GenBank NCBI, Accession number: FJ159129. Данная последовательность ДНК включала в себя 5 основных участков: адаптерную последовательность на 5'-конце (5'-СТСАГТССТАСАГТССАСА-); сайт рестрикции для эндонуклеазы XbaI (-ТСТАГА-); клонируемый участок размером 162 нуклеотида, представленный фрагментом гена полипротеина ВЗН 4 генотипа (с 130 по 291 нуклеотид в геноме GenBank NCBI, Accession number: FJ159129); сайт рестрикции для эндонуклеазы EcoRI (-GAATTC-); адаптерную последовательность на 3'-конце (-АСТГТГГАСТТСТГАТСТГ-3'). Адаптерные последовательности на концах синтезируемой молекулы были необходимы для ее последующей амплификации посредством ПЦР, а сайты рестрикции – для получения липких концов ДНК-

вставки. Синтезированную одноцепочечную ДНК амплифицировали методом ПЦР с оригинальными праймерами, структура которых представлена в таблице 8.

Таблица 8 – Праймеры для амплификации синтетической ДНК, содержащей клонируемый участок генома ВЗН 4 генотипа

Наименование праймера	Последовательность праймера для получения клонируемого фрагмента генома ВЗН 5'→3'
<i>AdapterS212-F</i>	CTCAGTCCTACAGTCCAC
<i>AdapterS212-R</i>	CAGATCAGAAGTCCACAG

При проведении амплификации синтетической ДНК использовали следующий режим: предварительная денатурация 95 °С – 15 мин; циклирование (95 °С – 10 с, 55 °С – 15 сек; 72 °С – 15 сек) × 50 циклов.

Ампликоны, полученные в результате ПЦР с синтетической ДНК, подвергали реакции рестрикции с использованием рестриктаз *XbaI* и *EcoRI*. Одновременно данными эндонуклеазами осуществляли рестрикцию вектора, в качестве которого использовали плазмиду pUC19.

Лигирование каждого из трех ампликонов с вектором осуществляли с использованием лигазы фага T4. Полученные три рекомбинантные молекулы трансформировали в компетентные клетки *E. coli* JM109.

В результате проведенных генно-инженерных манипуляций было 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) [Патент 2739333 РФ; Патент 2744095 РФ; Патент 2744096 РФ]. Полученные штаммы сохраняли характерные для вида *E. coli* свойства. При посеве в LB-бульон (pH 7,2) через 24 часа при 37 °С культуры полученных штаммов давали рост в виде равномерного помутнения питательной среды с образованием небольшого легко разбивающегося сероватого осадка, а также пристеночного кольца. На LB-агаре (pH 7,2) культуры рекомбинантных штаммов образовывали полупрозрачные колонии цвета среды,

легко сливающиеся между собой, на среде Эндо – образовывали бесцветные (лактозонегативные) колонии. В мазках из бульонных и агаровых культур клетки имели вид грамотрицательных палочек.

Штаммы *E. coli* JM 109 1-430, JM 109 2-428, JM 109 4-162 имели следующий спектр биохимической активности: ферментировали глюкозу с образованием кислоты и газа, не ферментировали лактозу и мочевины; не утилизировали из минимальной среды цитрат натрия; не обладали декарбоксилазой орнитина, а также дезаминазой фенилаланина; образовывали индол, но не образовывали сероводород.

Штаммы *E. coli* JM 109 1-430, JM 109 2-428, JM 109 4-162 не обладали гемолитической активностью, не были патогенными для белых мышей и золотистых хомячков (LD_{50} штаммов $> 1 \times 10^7$ м.к.), являлись устойчивыми к антибиотикам ампициллину и чувствительными к моновалентному бактериофагу коли и пибактериофагу поливалентному «Секстафагу» (АО НПО «Микроген», Россия).

Для достижения эффективной репликации рекомбинантных плазмид pWNV1protC, pWNV2protC, pWNV4protC с высоким выходом штаммы *E. coli* JM109 1-430, JM 109 2-428, JM 109 4-162 культивировали на среде LB по Ленноксу с содержанием ампициллина в концентрации 100 мкг/мл среды.

Для подтверждения присутствия клонированных участков генома ВЗН 1, 2 и 4 генотипов в составе рекомбинантных плазмид pWNV1protC, pWNV2protC, pWNV4protC ДНК трансформантов исследовали методом ПЦР с универсальными праймерами Universal M13 (Invitrogen, США) и последующей электрофоретической детекцией. 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).

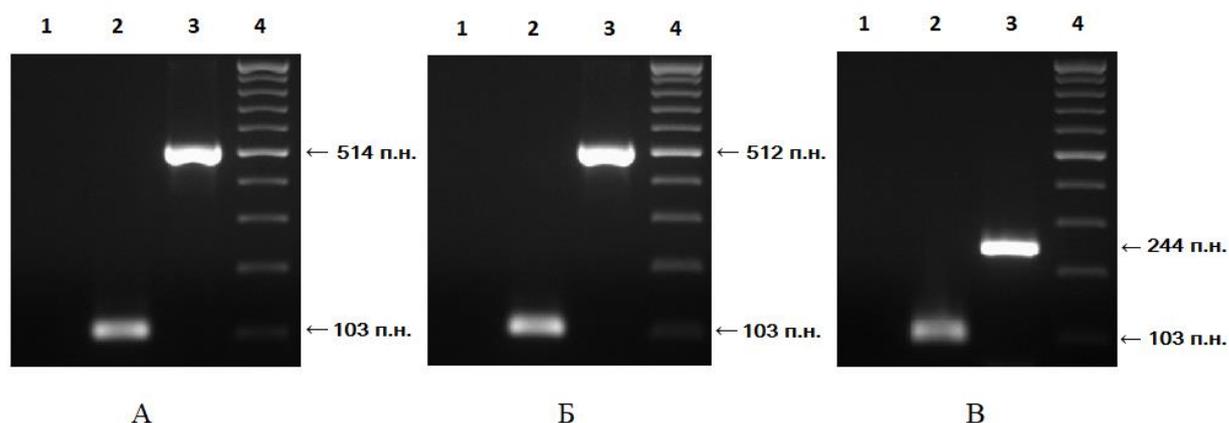


Рисунок 1 – Электрофореграмма продуктов амплификации с помощью универсальных праймеров Universal M13 участка полилинкера исходного плазмидного вектора pUC19 и сконструированной рекомбинантной плазмиды pWNV1protC (А), pWNV2protC (Б), pWNV4protC (В).

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.

Определение нуклеотидной последовательности участков кДНК ВЗН генотипов 1, 2 и 4 в составе рекомбинантных плазмид pWNV1protC, pWNV2protC, pWNV4protC проводили посредством секвенирования ампликонов с помощью универсальных праймеров Universal M13. По результатам секвенирования 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 1, 2 и 4 генотипов в составе рекомбинантных плазмид pWNV1protC, pWNV2protC, pWNV4protC соответственно.

Таким образом, в результате проведенной работы получены штаммы *E. coli* JM 109 1-430, *E. coli* JM 109 2-428, *E. coli* JM 109 4-162, которые являются продуцентами рекомбинантных плазмид pWNV1protC, pWNV2protC, pWNV4protC, несущих фрагменты генома ВЗН 1, 2 и 4 генотипов размером 430, 428 и 162 п.н. соответственно. Сконструированные штаммы не являются патогенными, стабильно продуцируют рекомбинантные плазмиды и могут использоваться в качестве положительных контрольных образцов в производстве

и испытаниях диагностического набора для выявления и дифференциации генотипов 1, 2, 4 вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР.

Рекомбинантные штаммы *E. coli* JM 109 1-430, JM 109 2-428, JM 109 4-162 депонированы в Государственной коллекции патогенных бактерий ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» под номерами КМ 2049, КМ 2050, КМ 2051 соответственно.

3.3 Оптимизация условий проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени

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 работы по оптимизации условий проведения ОТ-ПЦР варьировали следующие диапазоны концентраций реагентов, входящих в состав реакционной смеси: количество праймеров в пределах 6-15 пмоль, зондов – 3-7 пмоль, концентрация хлорида магния – 0,5-5 мМ, дезоксирибонуклеозидтрифосфатов (дНТФ) – 0,1-1 мМ, ревертазы MMlv – 5-500 ед., *Taq-F*-ДНК полимеразы – 1-5 ед. Параметры программы амплификации подбирали путем изменения продолжительности каждой стадии цикла от 5 до 30 с и количества циклов – от 35 до 50. Температурный режим отжига праймеров варьировали от 53 до 62 °С.

В ходе экспериментов установлено, что для проведения ОТ-ПЦР, позволяющей выявлять и дифференцировать ВЗН 1, 2 и 4 генотипов, в реакционной смеси оптимальная концентрация составляла для праймеров по 12 пмоль каждого, зондов – по 6 пмоль, дНТФ (эквимольная смесь дАТФ, дГТФ, дЦТФ, дТТФ) каждого в концентрации 0,2 мМ, хлорида магния – 2,5 мМ, ревертазы MMlv – 50 ед., *Taq-F*-ДНК полимеразы – 2,5 ед.

Оптимальная температура отжига для комбинации праймеров *WNV-1type-F/WNV-1type-R*, *WNV-2type-F/WNV-2type-R*, *WNV-4type-F/WNV-4type-R* составила 56 °С, что позволило проводить реакцию с использованием трех пар праймеров одновременно. Количество циклов, обеспечивающее полноту выхода продуктов амплификации, составило 45. Режим ОТ-ПЦР-РВ для разработанных праймеров и зондов представлен в таблице 9.

Таблица 9 – Оптимальный режим ОТ-ПЦР в реальном времени с разработанными праймерами и зондами для выявления и дифференциации генотипов ВЗН

Цикл	Температура, °С	Время	Измерение флуоресценции	Количество циклов
1	50	30 мин	-	1
2	95	15 мин	-	1
3	95	5 с	-	5
	56	25 с	-	
	72	15 с	-	
4	95	5 с	-	40
	56	25 с	FAM/Green, JOE/Yellow, ROX/Orange*	
	72	15 с	-	

*Примечание: детекцию флуоресцентного сигнала назначали по каналам для флуорофоров FAM, JOE, ROX

Для детекции результатов оптимальное значение уровня пороговой линии по всем каналам составило 0,03. В пробе считали обнаруженной РНК/кДНК ВЗН 1 генотипа, если в таблице результатов по каналу FAM/Green было определено значение порогового цикла $Ct < 35$, по каналам JOE/Yellow, ROX/Orange значения Ct отсутствовали или $Ct > 33$. В пробе считали обнаруженной РНК/кДНК ВЗН 2 генотипа, если в таблице результатов по каналу ROX/Orange определено значение порогового цикла $Ct < 33$, по каналу FAM/Green значение Ct отсутствовало или $Ct > 35$, по каналу JOE/Yellow – значение Ct отсутствовало или $Ct > 33$. В пробе считали обнаруженной РНК/кДНК ВЗН 4 генотипа, если в таблице результатов по каналу JOE/Yellow определено значение порогового цикла $Ct < 33$, по каналу FAM/Green значение Ct отсутствовало или $Ct > 35$, по каналу ROX/Orange значение Ct отсутствовало или $Ct > 33$ (рисунок 2).

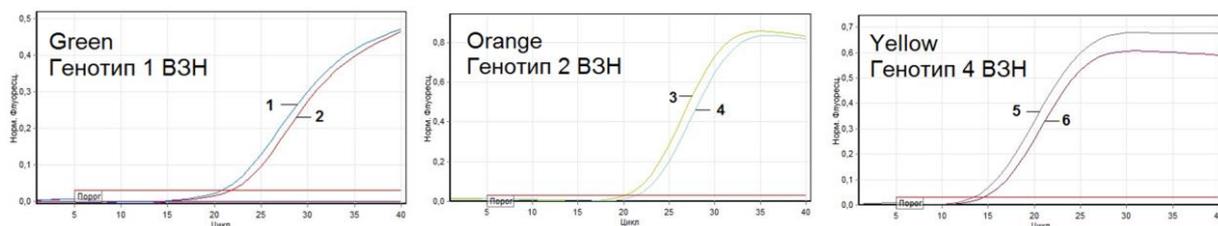


Рисунок 2 – Кривые нарастания флуоресценции, полученные при оптимальном режиме ОТ-ПЦР в реальном времени.

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, в ходе работы были подобраны оптимальные условия проведения ОТ-ПЦР в режиме реального времени, а также критерии оценки результатов реакции с разработанными праймерами и зондами для выявления и дифференциации генотипов 1, 2, 4 ВЗН.

Глава 4. 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» [Прохватилова и др., 2023].

В состав набора «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» входили следующие компоненты: ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-1 (1 пробирка, содержащая смесь праймеров *WNV-1type-F/WNV-1type-R*, зонда *WNV-1type-P*, дНТФ), ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-2 (1 пробирка, содержащая смесь праймеров *WNV-2type-F/WNV-2type-R*, зонда *WNV-2type-P*, дНТФ), ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-4/ВКО (1 пробирка, содержащая смесь праймеров *WNV-4type-F/WNV-4type-R/ВКО-pUC19-3s/ВКО-pUC19-4as*, зондов *WNV-4type-P/ВКО-pUC19-Flip*, дНТФ), ОТ-ПЦР-смесь-2 (3 пробирки, содержащие ПЦР-буфер с хлоридом магния), ОТ-ПЦР-смесь-3 (1 пробирка, содержащая ингибитор рибонуклеаз дитиотрейтол), Ревертаза *MMiv* (1 пробирка, содержащая фермент Ревертазу *MMiv* и глицерин), *Taq-F*-ДНК-полимераза (1 пробирка, содержащая фермент *Taq-F*-ДНК-полимеразу и глицерин), ПКО кДНК *WNV* генотип-1 (1 пробирка, содержащая ДНК рекомбинантной плазмиды *pWNV1protC*), ПКО кДНК *WNV* генотип-2 (1 пробирка, содержащая ДНК рекомбинантной плазмиды *pWNV2protC*), ПКО кДНК *WNV* генотип-4 (1 пробирка, содержащая ДНК рекомбинантной плазмиды *pWNV4protC*), ВКО (1 пробирка, содержащая ДНК плазмиды *pUC19*), ОКО выделения (2 пробирки, содержащие деионизованную воду), ОКО ОТ-ПЦР (1 пробирка, содержащая ТЕ-буфер).

На набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» была 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 изучения аналитических и диагностических характеристик набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» были 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 *pWNV1protC*), стандартный образец предприятия кДНК вируса Западного Нила 2 генотипа – СОП кДНК *WNV-2* (раствор ДНК плазмиды *pWNV2protC*), стандартный образец предприятия кДНК вируса Западного Нила 4 генотипа – СОП кДНК *WNV-4* (раствор ДНК плазмиды *pWNV4protC*), 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*). Разработаны свидетельства и инструкции по применению стандартных образцов предприятия (утверждены директором ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора от 25.03.2021 г.).

4.1 Оценка аналитических характеристик набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Оценку аналитической чувствительности и специфичности набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» осуществляли в рамках контрольных лабораторных и технических 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, *S. aureus* ATCC 25923, *P. 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 *Ur. unguiculata*).

Для определения межпостановочной и межсерийной воспроизводимости результатов одинаковые пробы исследовали с использованием двух серий набора

«Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» в двух повторах.

Сводные данные по контрольным лабораторным испытаниям набора «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» представлены в таблицах 10, 11.

Таблица 10 – Сводные данные по результатам контрольных лабораторных испытаний с использованием проб, содержащих РНК (кДНК) ВЗН

Наименование проб		Число проб	Положительный ответ ОТ-ПЦР «Амплиген- <i>WNV</i> -генотип-1/2/4»			
			Серия 6/19		Серия 7/19	
			Повтор 1	Повтор 2	Повтор 1	Повтор 2
1		2	3	4	5	6
Контрольный образец предприятия (кДНК ВЗН 1 генотипа)	1×10 ³ ГЭ/мл	1	0	1	1	1
	1×10 ⁴ ГЭ/мл	1	1	1	1	1
	1×10 ⁵ ГЭ/мл	1	1	1	1	1
	1×10 ⁶ ГЭ/мл	1	1	1	1	1
кДНК штаммов ВЗН 1 генотипа		1	1	1	1	1
РНК проб биологического материала, инфицированных ВЗН 1 генотипа		6	6	6	6	6
Контрольный образец предприятия (кДНК ВЗН 2 генотипа)	1×10 ³ ГЭ/мл	1	0	1	1	1
	1×10 ⁴ ГЭ/мл	1	1	1	1	1
	1×10 ⁵ ГЭ/мл	1	1	1	1	1
	1×10 ⁶ ГЭ/мл	1	1	1	1	1
кДНК штаммов ВЗН 2 генотипа		4	4	4	4	4
РНК проб биологического материала, инфицированных ВЗН 2 генотипа		7	7	7	7	7

Продолжение таблицы 10

1		2	3	4	5	6
Контрольный образец предприятия (кДНК ВЗН 4 генотипа)	1×10^3 ГЭ/мл	1	1	0	0	1
	1×10^4 ГЭ/мл	1	1	1	1	1
	1×10^5 ГЭ/мл	1	1	1	1	1
	1×10^6 ГЭ/мл	1	1	1	1	1
РНК проб биологического материала, инфицированных ВЗН 4 генотипа		7	7	7	7	7
Итого положительных проб, содержащих РНК (кДНК) ВЗН 1 генотипа		11	10	11	11	11
Итого положительных проб, содержащих РНК (кДНК) ВЗН 2 генотипа		15	14	15	15	15
Итого положительных проб, содержащих РНК (кДНК) ВЗН 4 генотипа		11	11	10	10	11
Итого положительных проб, содержащих РНК (кДНК) ВЗН		37	35	36	36	37

В ходе контрольных лабораторных испытаний было 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.).

Таблица 11 – Сводные данные по результатам контрольных лабораторных испытаний с использованием проб, содержащих РНК/кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий

Наименование проб	Число проб	Отрицательный ответ ОТ-ПЦР «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4»			
		Серия 6/19		Серия 7/19	
		Повтор 1	Повтор 2	Повтор 1	Повтор 2
кДНК штаммов гетерологичных вирусов	7	7	7	7	7
ДНК штаммов бактерий	4	4	4	4	4
Итого отрицательных проб, содержащих кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий	11	11	11	11	11

На следующем этапе были проведены технические испытания Испытательной лабораторией ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» на базе лаборатории генодиагностики ООИ ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. При проведении технических испытаний набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» были подтверждены функциональные характеристики и эффективность применения МИ, а также согласованы вид, класс потенциального риска применения в соответствии с номенклатурной классификацией МИ. В результате испытаний проведена оценка и анализ данных, относящихся к аналитическим характеристикам МИ. Полученные результаты были оценены экспертами как положительные. Оформлен акт оценки результатов технических испытаний № ВМ-05-06/21 от 26.05.2021 г. [Прохватилова и др., 2023].

4.2 Оценка диагностических характеристик набора реагентов для выявления и дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Разработанный 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 обладал высокими показателями аналитической чувствительности и специфичности. Однако полученные результаты исследования не давали возможности объективно оценить диагностические характеристики сконструированного набора реагентов. Поэтому важной задачей было изучение диагностической эффективности применения набора «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» при исследовании клинического материала от пациентов с подтвержденным диагнозом ЛЗН, а также энтомологического и зоологического материала.

Оценку диагностических характеристик набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» осуществляли в рамках клинических испытаний, которые проведены Испытательной лабораторией ООО «ВЫМПЕЛ-МЕДЦЕНТР» на базе лаборатории генодиагностики ООИ ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Испытания осуществляли на 140 пробах клинического и биологического материала. Проанализированы 2 серии набора реагентов (серия 6/21, серия 7/21), одну из них 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*).

Определение межпостановочной и межсерийной воспроизводимости осуществляли с использованием стандартных образцов предприятия вируса Западного Нила и гетерологичных вирусов. Для этого каждую пробу СОП кДНК *WNV-1*, СОП кДНК *WNV-2*, СОП кДНК *WNV-4*, СОП кДНК *YFV*, СОП кДНК *RUBV* исследовали в пяти повторах с использованием двух серий препарата двукратно. Сводные данные по изучению диагностических характеристик набора «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» представлены в таблицах 12, 13.

При проведении клинических испытаний МИ «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» на 276 положительных образцах, содержащих РНК/кДНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов, был получен положительный результат в 100% случаев; на 144 отрицательных образцах, содержащих РНК/кДНК/ДНК близкородственных и гетерологичных вирусов и бактерий, был получен отрицательный результат в 100% случаев [Прохватилова и др., 2023].

В качестве метода сравнения применяли секвенирование по Сенгеру, позволяющее определять нуклеотидную последовательность локуса *protC* гена полипротеина ВЗН. Выбор данного способа был обусловлен отсутствием наборов реагентов для дифференциации генотипов ВЗН с помощью ОТ-ПЦР-РВ на момент исследования.

Таблица 12 – Сводные данные по результатам клинических испытаний с использованием проб, содержащих РНК (кДНК) ВЗН

Наименование проб	Число проб	Положительный ответ		
		«Амплиген WNV-генотип-1/2/4»		Метод сравнения
		Серия 6/21	Серия 7/21*	
1	2	3	4	5
Пробы клинического материала, содержащие РНК/кДНК West Nile virus 1 генотипа	10	10	10/10	10
Пробы клинического материала, содержащие РНК/кДНК West Nile virus 2 генотипа	28	28	28/28	28
Пробы клинического материала, содержащие РНК/кДНК West Nile virus 4 генотипа	10	10	10/10	10
Пробы биологического материала от животных, комаров и клещей, содержащие РНК/кДНК West Nile virus 1 генотипа	7	7	7/7	7
Пробы биологического материала от животных, комаров и клещей, содержащие РНК/кДНК West Nile virus 2 генотипа	30	30	30/30	30
Пробы биологического материала от животных, комаров и клещей, содержащие РНК/кДНК West Nile virus 4 генотипа	7	7	7/7	7
Итого положительных проб, содержащих РНК/кДНК West Nile virus 1 генотипа	17	17	17/17	17

Продолжение таблицы 12

1	2	3	4	5
Итого положительных проб, содержащих РНК/кДНК West Nile virus 2 генотипа	58	58	58/58	58
Итого положительных проб, содержащих РНК/кДНК West Nile virus 4 генотипа	17	17	17/17	17
Итого положительных проб, содержащих РНК/кДНК West Nile virus 1, 2, 4 генотипов	92	92	92/92	92

*Примечание – серия 7/21 исследована в двух повторах

Таблица 13 – Сводные данные по результатам клинических испытаний с использованием проб, содержащих РНК/кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий

Наименование проб	Число проб	Отрицательный ответ		Метод сравнения
		«Амплиген WNV-генотип-1/2/4»		
		Серия 6/21	Серия 7/21*	
1	2	3	4	5
Пробы клинического материала, содержащие РНК/кДНК/ДНК гетерологичных вирусов и бактерий	24	24	24/24	24
Пробы биологического материала от животных, комаров и клещей, содержащие РНК/кДНК/ДНК гетерологичных вирусов и бактерий	24	24	24/24	24
Итого отрицательных проб, содержащих РНК/кДНК/ДНК гетерологичных вирусов и бактерий	48	48	48/48	48

*Примечание – серия 7/21 исследована в двух повторах

По результатам секвенирования РНК/кДНК ВЗН 1 генотипа обнаружена в 17 образцах, определена степень гомологии со стандартным образцом предприятия вируса Западного Нила 1 генотипа (СОП кДНК *WNV-1*) от 98,03 до 100%. РНК/кДНК ВЗН 2 генотипа обнаружена в 58 образцах, определена степень гомологии со стандартным образцом предприятия вируса Западного Нила 2 генотипа (СОП кДНК *WNV-2*) от 98,28 до 100%. РНК/кДНК ВЗН 4 генотипа обнаружена в 17 образцах, определена степень гомологии со стандартным образцом предприятия вируса Западного Нила 4 генотипа (СОП кДНК *WNV-4*) 100% [Прохватилова и др., 2023].

В ходе клических испытаний было установлено, что диагностическая чувствительность набора реагентов для выявления и дифференциации 1, 2 и 4 генотипов вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-флуоресцентной детекцией при исследовании проб, содержащих РНК и кДНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов, составила 98,5% с доверительной вероятностью 90%; диагностическая специфичность набора реагентов при исследовании проб, содержащих гетерологичные вирусы и бактерии, составила 99% с доверительной вероятностью 90%; межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для инфицированных ВЗН проб биологического материала и положительных стандартных образцов предприятия в концентрации $\geq 1 \times 10^4$ ГЭ/мл 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.) [Прохватилова и др., 2023].

На основании результатов технических и клинических испытаний набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» был представлен к государственной регистрации в Федеральную службу по надзору в сфере здравоохранения 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 в 2022 году принято положительное решение о регистрации МИ

«Амплиген-WNV-генотип-1/2/4», выдано регистрационное удостоверение РЗН 2022/17020 от 27.04.2022 г. и разрешены производство, реализация и применение МИ [Прохватилова и др., 2023].

Таким образом, в рамках контрольных лабораторных, технических и клинических испытаний проведена оценка аналитических и диагностических характеристик разработанного набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4». Аналитическая чувствительность набора составила 1×10^4 ГЭ/мл. Аналитическая специфичность при исследовании проб, содержащих кДНК штаммов гетерологичных вирусов и ДНК штаммов бактерий в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл, составила 100%. Диагностическая чувствительность набора реагентов при исследовании проб, содержащих РНК и кДНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов, составила 98,5%. Диагностическая специфичность набора при исследовании проб, содержащих гетерологичные вирусы и бактерии, составила 99%. Межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для проб биологического материала, содержащих РНК и кДНК ВЗН, составила 100%. Набор реагентов может быть рекомендован для использования в клинической лабораторной диагностике лихорадки Западного Нила, а также в ходе эпидемиологического мониторинга при исследовании энтомологического и зоологического материала на наличие РНК ВЗН.

Глава 5. ГЕНОТИПИРОВАНИЕ ВИРУСА ЗАПАДНОГО НИЛА НА ОСНОВЕ МЕТОДОВ ОТ-ПЦР И СЕКВЕНИРОВАНИЯ

5.1 Определение генотипов вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Апробацию разработанного набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» для дифференциации генотипов ВЗН методом ОТ-ПЦР в реальном времени проводили 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 *С_t* составляло не более 30.

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) (Таблица 14; Рисунок 3, 4). В пробах клинического материала РНК ВЗН генотипа 4 не обнаружена.

При типировании методом ОТ-ПЦР проб РНК ВЗН, выделенных из зоологического и энтормологического 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 15; Рисунок 3-5).

Таблица 14 – Результаты генотипирования РНК вируса Западного Нила, выявленного в пробах клинического материала методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Регион России	Общее количество исследованных проб	Количество проб с установленным генотипом ВЗН	
		1 генотип	2 генотип
Астраханская область	10	7	3
Волгоградская область	91	0	91
Воронежская область	5	0	5
Курская область	3	0	3
Липецкая область	3	0	3
Пензенская область	1	0	1
Ростовская область	17	0	17
Саратовская область	81	0	81
Краснодарский край	10	1	9
Ставропольский край	3	1	2
Республика Дагестан	1	0	1
Республика Крым	1	0	1
Республика Татарстан	1	1	0
Всего	227	10	217

Таблица 15 – Результаты генотипирования РНК вируса Западного Нила, выявленного в пробах энтомологического и зоологического материала методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени

Регион России	Вид животного	Общее количество во исследованных пробах	Количество проб с установленным генотипом ВЗН		
			1 генотип	2 генотип	4 генотип
1	2	3	4	5	6
Астраханская область	<i>Culex modestus</i>	1	0	1	0
	<i>Culex pipiens</i>	13	0	13	0
Волгоградская область	<i>Aedes caspius</i>	11	0	11	0
	<i>Aedes pulchritarsis</i>	1	0	1	0

Продолжение таблицы 15

1	2	3	4	5	6
Волгоградская область	<i>Aedes vexans</i>	8	1	7	0
	<i>Anopheles hyrcanus</i>	3	0	3	0
	<i>Coquillettidia richiardii</i>	6	1	5	0
	<i>Culex modestus</i>	25	0	25	0
	<i>Culex pipiens</i>	54	2	52	0
	<i>Uranotaenia unguiculata</i>	3	0	0	3
	<i>Hyalomma marginatum</i>	3	0	3	0
	<i>Aythya ferina</i>	1	0	1	0
	<i>Corvus cornix</i>	1	0	1	0
	<i>Larus cachinnans</i>	1	1	0	0
	<i>Mareca strepera</i>	1	0	1	0
	<i>Phasianus colchicus</i>	1	0	1	0
	<i>Podiceps cristatus</i>	1	0	1	0
Воронежская область	<i>Aedes geniculatus</i>	1	0	1	0
	<i>Anopheles claviger</i>	1	0	1	0
	<i>Anopheles maculipennis</i>	2	0	2	0
	<i>Culex pipiens</i>	2	0	2	0
Ростовская область	<i>Aedes caspius</i>	1	0	1	0
	<i>Hyalomma marginatum</i>	1	0	1	0
	<i>Corvus frugilegus</i>	2	0	2	0

Продолжение таблицы 15

1	2	3	4	5	6
Саратовская область	<i>Corvus cornix</i>	3	0	3	0
	<i>Corvus frugilegus</i>	7	0	7	0
	<i>Corvus monedula</i>	3	0	3	0
	<i>Larus argentatus</i>	1	0	1	0
	<i>Luscinia svecica</i>	1	0	1	0
	<i>Parus major</i>	1	0	1	0
	<i>Pica pica</i>	4	0	4	0
	<i>Sterna hirundo</i>	1	0	1	0
Ставропольский край	<i>Culex pipiens</i>	2	0	2	0
Республика Дагестан	<i>Culex pipiens</i>	1	0	1	0
Республика Калмыкия	<i>Culex modestus</i>	1	0	1	0
	<i>Culex pipiens</i>	4	0	4	0
	<i>Uranotaenia unguiculata</i>	10	0	0	10
Республика Крым	<i>Culex spp.</i>	1	0	0	1
Всего		184	5	165	14

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. hircanus*, *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.*

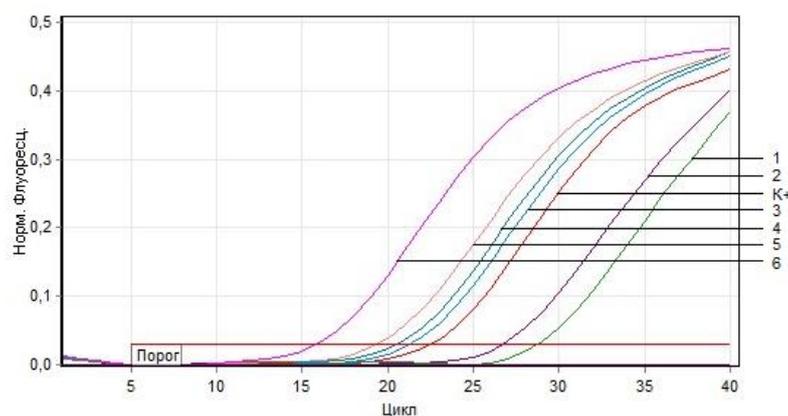


Рисунок 3 – Кривые нарастания флуоресценции по каналу Green, полученные при исследовании одной из серий проб биологического материала методом ОТ-ПЦР в реальном времени с помощью сконструированного набора реагентов «Амплиген *WNV*-генотип-1/2/4».

Цифрами 1-6 обозначены пробы, инфицированные ВЗН 1 генотипа (1 – проба суспензии комаров *Sx. pipiens*; 2 – проба цельной крови человека; 3-6 – пробы суспензий головного мозга человека). «К+» – положительный контроль. Отрицательный контроль, а также пробы, инфицированные ВЗН 2 и 4 генотипов, располагались ниже пороговой линии

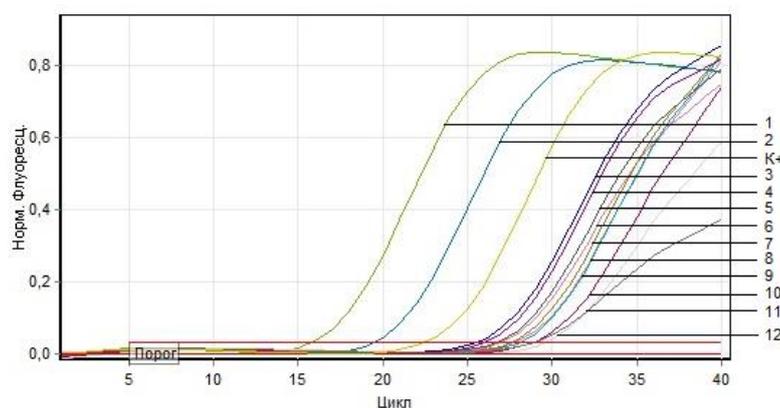


Рисунок 4 – Кривые нарастания флуоресценции по каналу Orange, полученные при исследовании одной из серий проб биологического материала методом ОТ-ПЦР в реальном времени с помощью сконструированного набора реагентов «Амплиген *WNV*-генотип-1/2/4».

Цифрами 1-12 обозначены пробы, инфицированные ВЗН 2 генотипа (1 – проба суспензии комаров *Sx. pipiens*; 2-3, 9-11 – пробы цельной крови человека; 4-5 – пробы суспензий головного мозга человека; 6 – проба суспензии головного мозга большой синицы; 7 – проба мочи человека; 8 – проба сыворотки крови человека; 12 – проба суспензии комаров *Sx. modestus*). «К+» – положительный контроль. Отрицательный контроль, а также пробы, инфицированные ВЗН 1 и 4 генотипов, располагались ниже пороговой линии

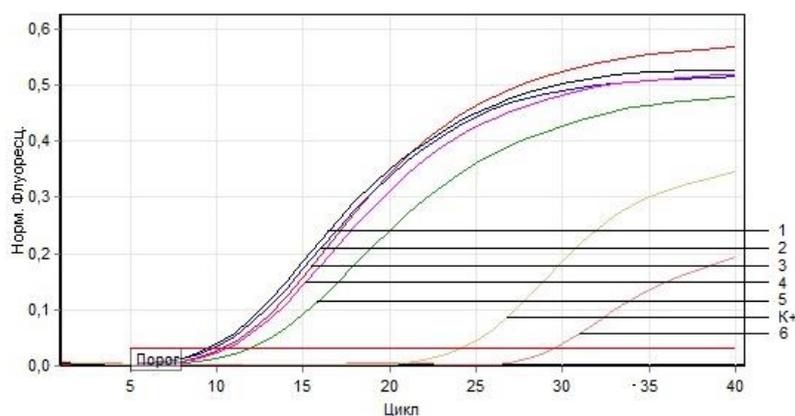


Рисунок 5 – Кривые нарастания флуоресценции по каналу Yellow, полученные при исследовании одной из серий проб биологического материала методом ОТ-ПЦР в реальном времени с помощью сконструированного набора реагентов «Амплиген WNV-генотип-1/2/4».

Цифрами 1-6 обозначены пробы, инфицированные ВЗН 4 генотипа (1-5 – пробы суспензий комаров *Uranotaenia unguiculata*; 6 – проба суспензии комаров *Culex spp.*). «К+» – положительный контроль. Отрицательный контроль, а также пробы, инфицированные ВЗН 1 и 2 генотипов, располагались ниже пороговой линии

Таким образом, апробация разработанного набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» на пробах клинического, энтомологического и зоологического материала позволила изучить генетическое разнообразие возбудителя ЛЗН, циркулировавшего в различных регионах европейской части России в период с 2010 по 2022 год.

5.2 Типирование вируса Западного Нила методом секвенирования

Одновременно с использованием метода ОТ-ПЦР в режиме реального времени для подтверждения результатов ПЦР-типирования было 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): 6 проб РНК ВЗН 1 генотипа (ASTRAKHAN 925-2012; ASTRAKHAN 143-2016; ASTRAKHAN 612-2018; STAVROPOL 810-2012; TATARSTAN 435-2018; VOLGOGRAD 1115-2016), 19 проб РНК ВЗН 2 генотипа (ASTRAKHAN 962-2021; DAGESTAN 751-2021; ROSTOV 1471-2012; ROSTOV 633-2018; ROSTOV 7-2021; SARATOV 1367-2012; SARATOV 2954-2013; SARATOV 403-2015; VOLGOGRAD 613-2010; VOLGOGRAD 410-2012; VOLGOGRAD 2481-2013; VOLGOGRAD 833-2014; VOLGOGRAD 2924-2014; VOLGOGRAD 703-2018; VOLGOGRAD 810-2019; VOLGOGRAD 305-2020; VOLGOGRAD 703-2021; VORONEZH 718-2018; VORONEZH 794-2021) и 6 проб РНК ВЗН 4 генотипа (CRIMEA-1078-2018; KALMYKIA-958-2018; KALMYKIA-960-2018; KALMYKIA-962-2018; KALMYKIA-971-2018; VOLGOGRAD-973-2018).

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), была 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 6) [Батулин и др., 2021].

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 [Батурин и др., 2021].

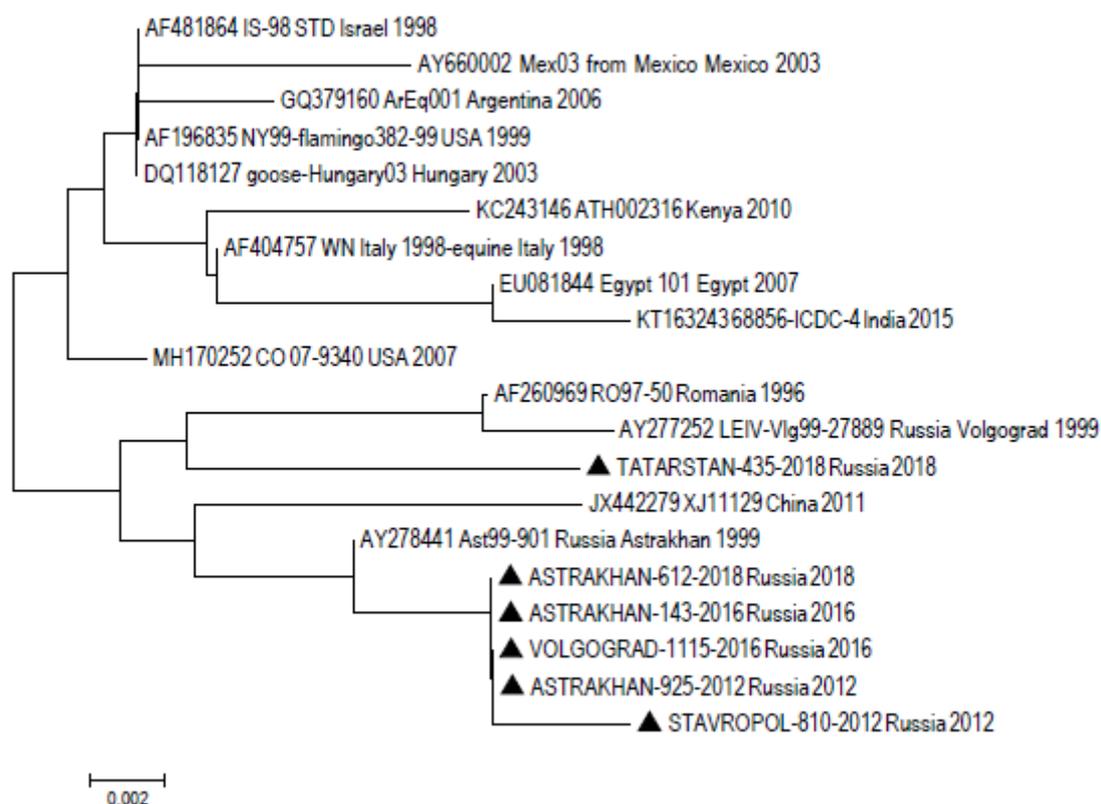


Рисунок 6 – Дендрограмма, построенная по локусу 5'-UTR-protC ВЗН 1 генотипа методом Neighbor-joining. Треугольниками отмечены образцы, секвенированные в ходе работы

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 7) [Батурин и др.,

2021]. 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].

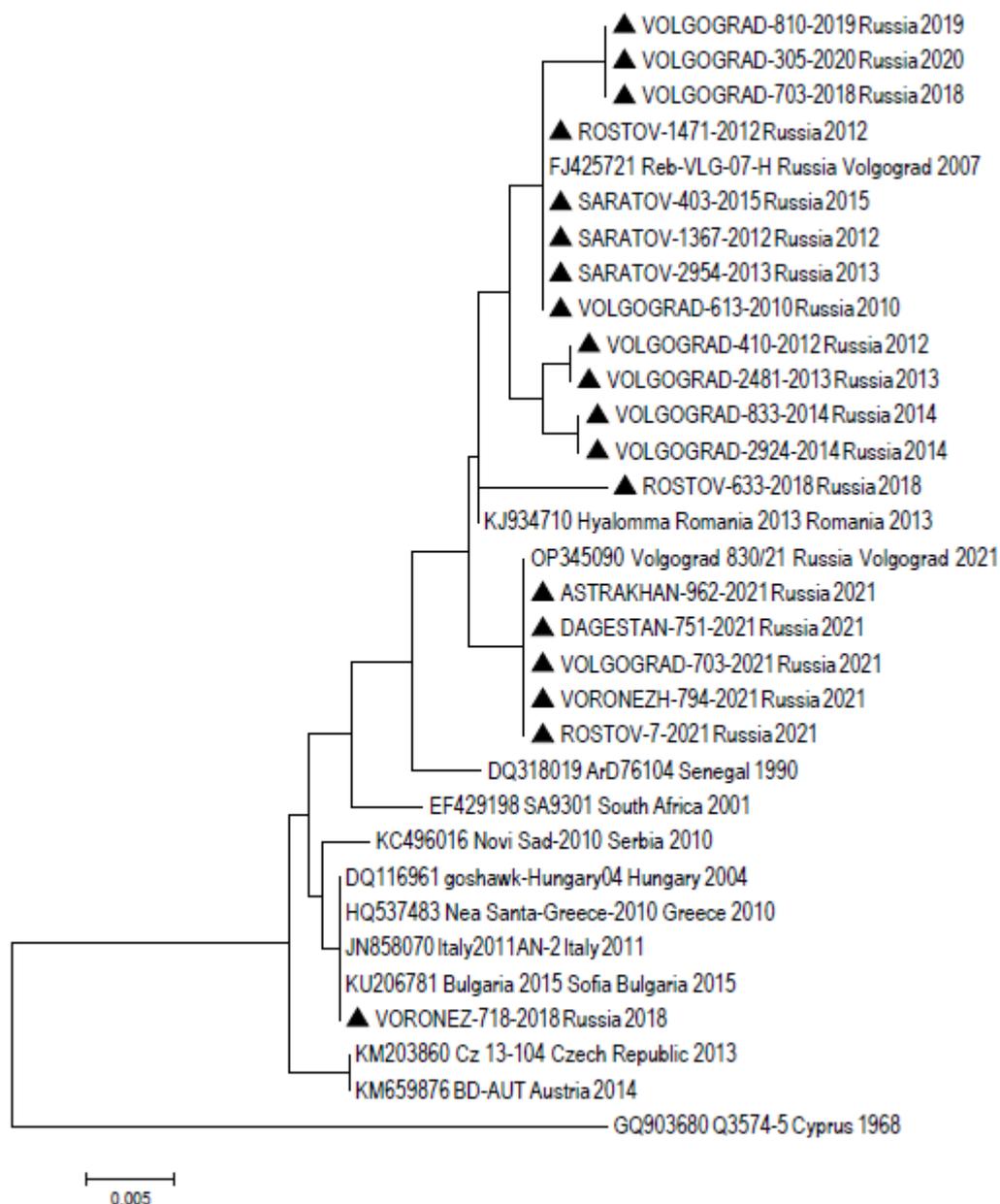


Рисунок 7 – Дендрограмма, построенная по локусу 5'-UTR-protC ВЗН 2 генотипа методом Neighbor-joining. Треугольниками отмечены образцы, секвенированные в ходе работы

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 [Батурин и др., 2021].

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

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 8). 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 [Батурин и др., 2021].

При сравнительном анализе полученных результатов типирования с учетом данных эпиданамнеза установлено, что единичный случай ЛЗН 2018 года в Татарстане, вызванный вирусом 1 генотипа, вероятно являлся результатом завоза инфекции из Индии. Выявленные в 2012 году в Ставрополе и 2016 году на территории Волгограда образцы РНК ВЗН 1 генотипа, вероятно, свидетельствуют о заносе вируса перелетными птицами из Астраханской области, на территории которой в дельте Волги располагаются природные очаги ВЗН 1 генотипа [Батурин и др., 2021].

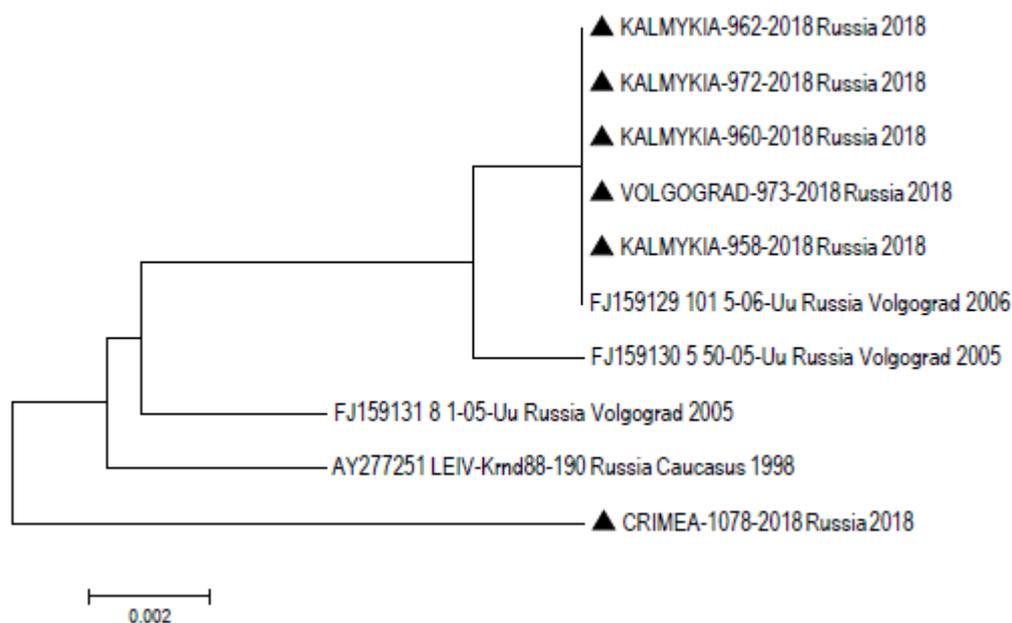


Рисунок 8 – Дендрограмма, построенная по локусу 5'-UTR-protC ВЗН 4 генотипа методом Neighbor-joining. Треугольниками отмечены образцы, секвенированные в ходе работы

Генотип 4, на наш взгляд, изучен недостаточно. Однако на данный момент можно сказать, что тростниковые заросли Сарпинских озер Волгоградской области и Республики Калмыкия являются биотопами, на территориях которых циркулирует такой достаточно редкий тип ВЗН, о чем свидетельствуют выявленные на данных территориях образцы РНК ВЗН 4 генотипа (KALMYKIA-958-2018, KALMYKIA-960-2018, KALMYKIA-962-2018, KALMYKIA-971-2018, VOLGOGRAD-973-2018). Полученные данные коррелировали с результатами исследований сотрудников Центрального научно-исследовательского института эпидемиологии, которые в период с 2005 по 2006 год на территории Сарпинских озер Волгоградской области неоднократно выявляли вирус 4 генотипа в пулах комаров *Ur. unguiculata* и суспензиях органов озерных лягушек [Шопенская и др., 2008].

Следует отметить, что в 2013 году на территории Австрии из пула комаров *Ur. unguiculata* был выделен штамм ВЗН WNV-Uu-LN-AT-2013 [Pachler et al., 2014]. Однако гомология полученной полногеномной последовательности данного штамма с таковой для российского изолята ВЗН 4 генотипа 101_5-06-Uu

составляла всего 96,2%. Существенные различия в гомологии заставили авторов отнести штамм ВЗН WNV-Uu-LN-AT-2013 к отдельному – 9 генотипу [Pachler et al., 2014].

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.

При сравнении полученных результатов с литературными данными выявлено, что широкое распространение ВЗН 2 генотипа, наблюдаемое в изучаемый период на территории европейской части России, имело место и в странах Европы. Так, с 2010 по 2022 гг. циркуляция ВЗН 2 генотипа была зарегистрирована на территориях Греции, Венгрии, Румынии, Чехии, Австрии, Болгарии, Германии, Италии и Испании [Jungbauer et al., 2015; Nagy et al., 2016; Baymakova et al., 2016; Busquets et al., 2019; Veo et al., 2019; Ziegler et al., 2019; Holicki et al., 2020; Pacenti et al., 2020].

Таким образом, методом секвенирования подтверждены результаты ПЦР-типирования и изучены особенности распространенности генотипов ВЗН в различных регионах европейской части России за исследуемый период.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одной из актуальных арбовирусных инфекций в России является лихорадка Западного Нила, природные очаги которой охватывают территории европейской части (ландшафтные пояса пустынь, полупустынь, степи, лесостепи), юга Западной Сибири и Дальнего Востока. В течение двух последних десятилетий на территории России произошли две крупные вспышки ЛЗН, а единичные случаи заболеваемости среди населения регистрируют почти ежегодно [Львов и др., 2008; Лихорадка Западного Нила, 2017; Путинцева и др., 2022].

Возбудителем заболевания служит вирус Западного Нила, геном которого характеризуется значительной генетической вариабельностью. На современном этапе известно 9 генотипов возбудителя ЛЗН [Pachler et al., 2014; Rizzoli et al., 2015]. В России установлена циркуляция вируса, относящегося к генотипам 1, 2 и 4 [Субботина и др., 2014]. Генотипирование ВЗН необходимо для совершенствования мониторинга за возбудителем лихорадки Западного Нила, изучения путей распространения инфекции.

Предложено множество способов внутривидовой дифференциации возбудителя ЛЗН, большинство из которых основано на секвенировании его генома [Жуков, 2013; Прилипов, 2015; Parra et al., 2021]. Однако способ генотипирования, основанный на секвенировании, может быть реализован только для образцов с высокой концентрацией вирусной РНК. В большинстве клинических образцов и проб зооэнтомологического материала концентрация вируса низкая, что делает менее эффективным применение секвенирования для определения генотипа ВЗН в нативном материале. Имеется ряд диагностических наборов реагентов на основе ОТ-ПЦР-РВ, обладающих высокой чувствительностью и специфичностью. Тем не менее, с их помощью возможно только выявление РНК ВЗН без дифференциации его генетических линий.

Одним из перспективных направлений в диагностике лихорадки Западного Нила является разработка набора реагентов на основе метода ПЦР с обратной

транскрипцией в режиме реального времени, который позволит осуществлять обнаружение и дифференциацию РНК ВЗН разных генотипов в короткие сроки.

Целью данной работы являлась разработка методического подхода для выявления и дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией и его применение для изучения особенностей циркуляции генотипов возбудителя лихорадки Западного Нила на территории европейской части России.

В начале исследования с использованием данных генетической базы GenBank NCBI проведен сравнительный анализ 350 геномов ВЗН, результаты которого позволили определить консервативные и варибельные участки аннотированных нуклеотидных последовательностей ВЗН и осуществить выбор РНК-мишеней, пригодных для генотипирования. В качестве перспективной мишени для амплификации специфичных фрагментов генома возбудителя ЛЗН 1, 2 и 4 генотипов выбран участок гена полипротеина (*flavivirus polyprotein gene*), кодирующего капсидный белок protC (GenBank NCBI, GeneID: 912267). К выбранному участку были подобраны три пары специфичных праймеров и три флуоресцентных зонда по типу «молекулярного маяка», позволяющие выявлять и дифференцировать 1, 2 и 4 генотипы ВЗН методом ОТ-ПЦР в реальном времени.

Затем сконструированные праймеры и зонды были проанализированы с помощью компьютерной программы BLAST на web-сервере Национального Центра Биотехнологической Информации (NCBI) для установления гомологии между ними и нуклеотидными последовательностями близкородственных вирусов и гетерологичных микроорганизмов, присутствующих в базе данных GenBank. На момент проведения компьютерного анализа гомологии выявлено не было.

Далее методами генной инженерии разработаны штаммы *E. coli* JM 109 1-430, *E. coli* JM 109 2-428, *E. coli* JM 109 4-162, являющиеся продуцентами рекомбинантных плазмид pWNV1protC, pWNV2protC, pWNV4protC, несущих фрагменты генома ВЗН 1, 2 и 4 генотипов соответственно. 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, которые могут быть использованы для оценки эффективности амплификации при проведении ОТ-ПЦР с целью дифференциации генотипов ВЗН.

В дальнейшем проведена оптимизация условий ОТ-ПЦР в реальном времени с разработанными праймерами и флуоресцентно-мечеными зондами, определены критерии учета результатов реакции при анализе проб, содержащих РНК ВЗН 1, 2, 4 генотипов и ДНК положительных контрольных образцов. В ходе исследований установлено, что ОТ-ПЦР со специфичными олигонуклеотидными праймерами и гибридизационно-флуоресцентными зондами позволяет выявлять и дифференцировать ВЗН 1, 2 и 4 генотипов в режиме реального времени.

На основе сконструированных олигонуклеотидов и рекомбинантных штаммов, предназначенных для использования в качестве положительных контрольных образцов, 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 оригинальные праймеры, флуоресцентно-меченые зонды и штаммы-продуценты рекомбинантных плазмид, получены патенты на изобретения (патент РФ № 2715617, опубликовано 02.03.2020 г., бюл. № 7; патент РФ № 2715625, опубликовано 02.03.2020 г., бюл. № 7; патент РФ № 2737396, опубликовано 30.11.2020 г., бюл. № 34; патент РФ № 2739333, опубликовано 23.12.2020 г., бюл. № 36; патент РФ № 2744095, опубликовано 02.03.2021 г., бюл. № 7; патент РФ № 2744096, опубликовано 02.03.2021 г., бюл. № 7).

Для оценки аналитических характеристик разработанного набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» проведены контрольные лабораторные и технические испытания. В ходе исследований было установлено, что аналитическая чувствительность набора при анализе проб, содержащих кДНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов составила 1×10^4 ГЭ/мл. Аналитическая специфичность

набора при исследовании проб, содержащих РНК и кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл, составила 100%.

В рамках клинических испытаний проведена оценка диагностических характеристик разработанного набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4». Установлено, что диагностическая чувствительность набора при исследовании 276 образцов, содержащих РНК и кДНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов составила 98,5%. Диагностическая специфичность набора при исследовании 144 образцов, содержащих РНК и кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий, составила 99%. Межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для инфицированных ВЗН образцов биологического материала и положительных стандартных образцов предприятия в концентрации $\geq 1 \times 10^4$ ГЭ/мл составила 100%.

По результатам технических и клинических испытаний на набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» разработана и согласована с экспертами эксплуатационная документация (инструкция по применению, макет маркировки внешней и внутренней упаковки, паспорт) и техническая документация (Технические условия ТУ 21.20.23-015-01898084-2019; Промышленный регламент ПР 01898084-15-19). После завершения регламентированной процедуры государственной регистрации Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения принято решение о регистрации набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4», оформлено регистрационное удостоверение РЗН 2022/17020 и разрешены производство, реализация и применение медицинского изделия.

Разработанный набор «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» был апробирован при проведении генотипирования ВЗН в 411 положительных пробах клинического, секционного, энтомологического и зоологического материала, поступивших в Референс-центр по мониторингу за возбудителем ЛЗН в период 2010-2022 гг. из 14 регионов европейской части России. В результате типирования методом ОТ-ПЦР 227 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). При типировании методом ОТ-ПЦР 184 проб РНК ВЗН, выделенных из зооэнтомологического 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). При сравнительном анализе полученных результатов отмечено, что в период 2010-2022 гг. ВЗН 2 генотипа являлся доминирующим для европейской части России.

Результаты ПЦР-типирования, полученные с использованием разработанного набора, были подтверждены методом секвенирования образцов РНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов по участку генома ВЗН размером 277 п.н., соответствующему 5'-нетранслируемой области (5'-UTR) и локусу гена полипротеина, кодирующему капсидный белок (protC).

При анализе результатов секвенирования установлено, что ВЗН генотипа 1 в пробах, собранных период с 2012 по 2018 гг. на территориях Астраханской и Волгоградской областей, а также Ставропольского края, обладал высокой степенью гомологии с последовательностью штамма ВЗН 1 генотипа, выделенного на территории Астраханской области в 1999 году. Варианты ВЗН 2 генотипа являлись генетически неоднородными. Наибольшая гомология установлена с изолятами ВЗН, циркулировавшими в 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. ВЗН 4 генотипа из Волгоградской области и Республики Калмыкия оказались идентичными волгоградскому изоляту, выделенному в 2006 году. А последовательность, полученная для образца РНК ВЗН из Крыма, существенно отличалась по числу и локализации нуклеотидных замен от остальных последовательностей генома ВЗН российских изолятов.

При сравнительном анализе полученных результатов с данными литературы установлено, что широкое распространение ВЗН 2 генотипа, наблюдаемое в

изучаемый период на территории европейской части России, имело место и в странах Европы. Так, во время крупной вспышки ЛЗН 2010 года на территории Греции в пуле комаров *Cx. pipiens*, отловленных в окрестностях города Неа Санта, методом секвенирования был определен 2 генотип ВЗН. Анализ полученной нуклеотидной последовательности показал высокую степень гомологии с последовательностью штамма, выделенного в Венгрии в 2004 году [Papa et al., 2011]. В августе 2013 года из клеща *H. marginatum*, собранного с певчего дрозда в дельте Дуная на территории Румынии, был также выделен ВЗН 2 генотипа. Результаты секвенирования показали, что данный штамм является генетически родственным российскому штамму ВЗН Reb_VLG_07_H, выделенному в 2007 году в Волгограде [Kolodziejek et al., 2014]. В том же году были обнаружены и выделены четыре практически идентичных штамма ВЗН 2 генотипа от комаров *Cx. modestus*, собранных в Южной Моравии, Чешская Республика. Филогенетический анализ показал, что данные штаммы ВЗН тесно связаны с австрийскими, итальянскими и сербскими штаммами [Rudolf et al., 2014]. ВЗН 2 генотипа в дальнейшем выявляли также на территориях Австрии, Венгрии, Болгарии, Германии, Италии и Испании [Jungbauer et al., 2015; Baymakova et al., 2016; Nagy et al., 2016; Busquets et al., 2019; Veo et al., 2019; Ziegler et al., 2019; Holicki et al., 2020; Pacenti et al., 2020]. Тем не менее, наряду со 2 генотипом в Европе регистрировали случаи ЛЗН, вызванные вирусом 1 генотипа. Так в осенний период 2011 года на острове Сардиния (Италия) было зарегистрировано 9 случаев заболевания лихорадкой Западного Нила. Методом секвенирования у 3 больных удалось установить наличие ВЗН 1 генотипа, а у одного – генотипа 2 [Magurano et al., 2012].

Приведенные данные сравнительного анализа указывают на то, что в последние годы ВЗН 2 генотипа является наиболее распространенным на территории европейского континента. Наблюдается расширение его ареала.

Таким образом, в ходе исследований разработан методический подход для выявления и дифференциации генотипов вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридизационно-

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 зооэнтومологического 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.

БЛАГОДАРНОСТИ

Благодарю администрацию ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в лице директора д.м.н. Топоркова А.В. за предоставленную возможность выполнения работы. Выражаю глубокую признательность и благодарность научному руководителю работы к.м.н. Ткаченко Г.А. за профессиональные советы и поддержку в процессе работы. Выражаю искреннюю благодарность сотрудникам ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора к.м.н. Агеевой Н.П., к.м.н. Бондаревой О.С., Бородай Н.В., к.м.н. Корсаковой И.И., Леденевой М.Л., к.б.н. Молчановой Е.В., к.б.н. Плехановой Н.Г., к.м.н. Прохвятиловой Е.В., к.м.н. Шпаку И.М. за помощь при выполнении различных этапов работы и обсуждении результатов исследования. Выражаю искреннюю благодарность сотруднику ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора к.б.н. Терновому В.А. за помощь при проведении контрольных лабораторных испытаний разработанного диагностического набора реагентов.

ПЕРЕЧЕНЬ СОКРАЩЕНИЙ

ВЗН	–	вирус Западного Нила
ГЭ	–	геном-эквивалент
ДНК	–	дезоксирибонуклеиновая кислота
кДНК	–	комплементарная дезоксирибонуклеиновая кислота
ЛЗН	–	лихорадка Западного Нила
ООИ	–	особо опасные инфекции
ОТ-ПЦР	–	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией
ОТ-ПЦР-РВ	–	полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени
ПДРФ	–	полиморфизм длины рестрикционных фрагментов
ПЦР	–	полимеразная цепная реакция
РНК	–	рибонуклеиновая кислота
DNA	–	deoxyribonucleic acid (дезоксирибонуклеиновая кислота)
FAM	–	6-Carboxyfluorescein (6-карбоксифлуоресцин)
JOE	–	6-Carboxy-4',5'-Dichloro-2',7'-Dimethoxyfluorescein (6-карбоксии-4',5'-дихлор-2',7'-диметоксифлуоресцин)
LAMP	–	Loop mediated isothermal amplification (петлевая изотермическая амплификация)
NASBA	–	Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (амплификация, основанная на последовательности нуклеиновых кислот)
ROX	–	6-Carboxy-X-Rhodamine (6-карбоксии- X-родамин)
RPA	–	Recombinase polymerase amplification (рекомбиназная полимеразная амплификация)
RT-PCR	–	Reverse transcription polymerase chain reaction (полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией)
RT-qPCR	–	Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (количественная полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией)
RT-RPA	–	Reverse transcription recombinase polymerase amplification (рекомбиназная полимеразная амплификация с обратной транскрипцией)
TMA	–	Transcription-mediated amplification (транскрипционно-опосредованная амплификация)
TS-RT-PCR	–	Type-specific reverse transcription polymerase chain reaction (типоспецифическая полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анищенко, М. Молекулярные маркеры патогенности вируса Западного Нила / М. Анищенко, М.Ю. Щелканов, В.В. Алексеев и др. // Вопросы вирусологии. – 2010; № 1. – С. 4–10.
2. Батурин А.А. Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории европейской части России в 2010-2019 гг / А.А. Батурин, 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.
3. Бодулев, О.Л. Изотермические методы амплификации нуклеиновых кислот и их применение в биоанализе / О.Л. Бодулев, И.Ю. Сахаров // Биохимия. – 2020. Т. 85. № 2. – С. 174 – 196.
4. Бородай, Н.В. Выбор точек мониторинга численности и инфицированности основных переносчиков вируса Западного Нила в Волгоградской области / Н.В. Бородай, А.В. Несговорова, В.К. Фомина и др. // Эпидемиология и вакцинопрофилактика. – 2021. – Т. 20. № 6. – С. 20 – 27.
5. Горбунова, В.Н. Ведение в молекулярную диагностику и генотерапию наследственных заболеваний / В.Н. Горбунова, В.С. Баранов – СПб.: «Специальная Литература», 1997. – 287 с.
6. Жуков, К.В. Эпидемиологическая характеристика лихорадки Западного Нила и молекулярно-генетические особенности изолятов, циркулирующих на территории Волгоградской области: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.02.02 / Волгоград, 2013. – 22 с.
7. Зарядов, И.С. Статистический пакет R: теория вероятностей и математическая статистика / И.С. Зарядов. – Москва: Издательство Российского университета дружбы народов, 2010. – 141 с.

8. Красовская, Т.Ю. Разработка и апробация тест-системы для выявления РНК вируса Западного Нила методом обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 03.00.06 / Кольцово, 2007. – 24 с.
9. Лабораторная диагностика вирусных инфекций по Леннету / пер. с англ. Под ред. д-ра мед. наук, проф. В.Б. Белобородова, д-ра мед. наук, проф. А.Н. Лукашева и д-ра биол. наук Ю.Н. Хомякова; под. Ред. К. Джерома. – М.: Лаборатория знаний, 2018. – 774 с.
10. Лихорадка Западного Нила / под. ред. А.В. Топоркова. Волгоград: «Волга-Пресс»; 2017. - 304 с.
11. Львов, Д.К. Лихорадка Западного Нила / Львов Д.К. Вопросы вирусологии. – 2000. № 2. – С. 4–9.
12. Львов, Д.К. Эпидемиологическая ситуация и прогноз заболеваемости лихорадкой Западного Нила на территории Российской Федерации / Д.К. Львов, С.Т. Савченко, В.В. Алексеев и др. // Пробл. особо опасных инф. – 2008. – № 1. – С. 10–12.
13. Маниатис, Т. Методы генетической инженерии. Молекулярное клонирование: Пер. с англ. / Т. Маниатис, Э. Фрич, Дж. Сэмбрук – М.: Мир, 1984. – 480 с.
14. Патент 2629604 РФ, МПК C12Q1/68, G01N 33/58, Набор олигонуклеотидных праймеров и зондов для идентификации вируса клещевого энцефалита, вируса лихорадки Западного Нила, боррелий и риккетсий методом мультиплексной ПЦР в режиме реального времени / А.О. Семенцова, В.А. Терновой, Е.В. Чуб и др., заявитель и патентообладатель ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор». – № 2016125498/16; заявл. 24.06.2016; опубл. 30.08.2017, Бюл. №25.
15. 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. Батурин, 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.

16. 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. Батулин, 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.
17. Патент 2737396 РФ, МПК C12Q1/68, Набор олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентно-меченого зонда для идентификации вируса Западного Нила 4 генотипа (West Nile virus lineage 4) / А.А. Батулин, 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.
18. Патент 2739333 РФ, МПК C12N 1/21, C12N 15/40, C12N 15/70, Штамм бактерий *Escherichia coli* JM 109 4-162 - продуцент рекомбинантной плазмиды pWNV4protC, несущей последовательность участка гена полипротеина *West Nile virus* 4 генотипа, кодирующего капсидный белок / А.А. Батулин, 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.
19. Патент 2744095 РФ, МПК C12N 1/21, C12N 15/40, C12N 15/70, Штамм бактерий *Escherichia coli* JM 109 1-430 – продуцент рекомбинантной плазмиды pWNV1protC, несущей последовательность 5'-нетранслируемой области и участка гена полипротеина *West Nile virus* 1 генотипа, кодирующего капсидный белок / А.А. Батулин, 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.
20. Патент 2744096 РФ, МПК C12N 1/21, C12N 15/40, C12N 15/70, Штамм бактерий *Escherichia coli* JM 109 2-428 – продуцент рекомбинантной плазмиды pWNV2protC, несущей последовательность 5'-нетранслируемой области и участка

гена полипротеина West Nile virus 2 генотипа, кодирующего капсидный белок / А.А. Батури́н, 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.

21. Плазмиды. Методы: Пер. с англ. / Под ред. К. Харди. – М.: Мир, 1989. – 276 с.

22. Платонов, А.Е. Генотипирование штаммов вируса лихорадки Западного Нила, циркулирующих на юге России, как метод эпидемиологического расследования: принципы и результаты / А.Е. Платонов, Л.С. Карань, Т.А. Шопенская и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2011; № 2. – С. 29–37.

23. Прилипов, А.Г. Генетическая характеристика штаммов вируса Западного Нила: Автореф. дис. ... доктора. биол. наук: 03.01.03, 03.02.02 / Москва, 2016. – 49 с.

24. 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. Батури́н, Л.И. Белицкая, А.В. Топорков // БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение. – 2023. – Т. 23. № 1. – С. 90–101.

25. Путинцева, Е.В. Лихорадка Западного Нила: результаты мониторинга за возбудителем в 2021 г. в Российской Федерации, прогноз заболеваемости на 2022 г. / Е.В. Путинцева, С.К. Удовиченко, Д.Н. Никитин и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2022. № 1. – С. 43 – 53.

26. Ребриков, Д.В. ПЦР в реальном времени / Д.В. Ребриков, Г.А. Саматов, Д.Ю. Трофимов и др. // – М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2009. – 223 с.: ил.

27. Руководство по вирусологии: Вирусы и вирусные инфекции человека и животных / под. ред. Д.К. Львова. М.: «Медицинское информационное агентство»; 2013. – 1200 с.

28. Субботина, Е.Л. Молекулярная эволюция вируса Западного Нила / Е.Л. Субботина, В.Б. Локтев // Мол. генетика, микробиол. и вирусол. – 2014. – № 1. – С. 31–37.
29. Чемисова, О.С. Сравнительный анализ методов изотермической амплификации нуклеиновых кислот / О.С. Чемисова, О.А. Цырулина, А.Л. Трухачев и др. // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. – 2022. № 1. – С. 126–138.
30. Шопенская, Т.А. Новый вариант вируса Западного Нила и его потенциальное эпизоотическое и эпидемиологическое значение / Т.А. Шопенская, М.В. Федорова, Л.С. Карань и др. // Эпидемиол. и инф. болезни. – 2008. №5. – С. 38-44.
31. Adelman, R.A. West Nile virus chorioretinitis / R.A. Adelman, J.H. Membreno, N.A. Afshari et al. // Retina. – 2003. № 1. – P. 100-101.
32. Aliota, M.T. Characterization of Rabensburg Virus, a Flavivirus Closely Related to West Nile Virus of the Japanese Encephalitis Antigenic Group / M.T. Aliota, S.A. Jones, A.P. Dupuis et al. // PLoS ONE. – 2012. № 6. – e39387.
33. Anderson, R.C. Punctate exanthem of West Nile Virus infection: report of 3 cases / R.C. Anderson, K.B. Horn, M.P. Hoang et al. // J Am Acad Dermatol. – 2004. № 5. – P. 820-823.
34. Armali, Z. West Nile meningo-encephalitis infection in a kidney transplant recipient / Z. Armali, R. Ramadan, A. Chlebowski et al. // Transplant Proc. – 2003. № 8. – P. 2935-2936.
35. Bagnarelli, P. Human case of autochthonous West Nile virus lineage 2 infection in Italy, September 2011 / P. Bagnarelli, K. Marinelli, D. Trotta et al. // Euro. Surveill. – 2011. № 43. – 20002.
36. Bains, H.S. Vitritis and chorioretinitis in a patient with West Nile virus infection / H.S. Bains, L.M. Jampol, M.C. Caughron et al. // Arch Ophthalmol. – 2003. № 2. – P. 205-207.

37. Bakonyi, T. Lineage 1 and 2 strains of encephalitic West Nile virus, central Europe / T. Bakonyi, E. Ivanics, K. Erdélyi et al. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2006. № 12. P. 618–623.
38. Bakonyi, T. Novel flavivirus or new lineage of West Nile virus, central Europe / T. Bakonyi, Z. Hubálek, I. Rudolf et al. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2005. № 11. – P. 225–231.
39. Balenghien, T. Vector competence of some French Culex and Aedes mosquitoes for West Nile virus / T. Balenghien, M. Vazeille, M. Grandadam et al. // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2008. № 8. P. 589–596.
40. Baleotti, F.G. Brazilian Flavivirus phylogeny based on NS5 / F.G. Baleotti, M.L. Moreli, L.T. Figueiredo et al. // *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* – 2003. – № 98. P. 379–382.
41. Barzon, L. Excretion of West Nile virus in urine during acute infection / L. Barzon, M. Pacenti, E. Franchin et al. // *J Infect Dis.* – 2013. № 7. – P. 1086-1092.
42. Baymakova, M. Fatal case of West Nile neuroinvasive disease in Bulgaria / M. Baymakova, I. Trifonova, E. Panayotova et al. // *Emerg Infect Dis.* – 2016. № 12. – P. 2203-2204.
43. Beasley, D. Molecular determinants of virulence of West Nile virus in North America. In *Emergence and Control of Zoonotic Viral Encephalitides* / D. Beasley, C. Davis, M. Whiteman et al. // Springer. – 2004. – P. 35–41.
44. Beasley, D.W. Envelope protein glycosylation status influences mouse neuroinvasion phenotype of genetic lineage 1 West Nile virus strains / D.W. Beasley, M.C. Whiteman, S. Zhang et al. // *J. Virol.* – 2005. № 79. – P. 8339–8347.
45. Ben-Nathan, D. West Nile virus neuroinvasion and encephalitis induced by macrophage depletion in mice / D. Ben-Nathan, I. Huitinga, S. Lustig et al. // *Arch. Virol.* – 1996. № 141. P. 459–469.
46. Berthet, F.X. Extensive nucleotide changes and deletions within the envelope glycoprotein gene of Euro-African West Nile viruses / F.X. Berthet, H.G. Zeller, M.T. Drouet et al. // *J Gen Virol.* – 1997. № 78. – P. 2293-2297.
47. Best, S.M. Flaviviruses / S.M. Best // *Curr. Biol.* – 2016. № 26. – P. 1258–1260.

48. Best, S.M. The many faces of the Flavivirus NS5 protein in antagonism of type I interferon signaling / S.M. Best // *J. Virol.* – 2017. № 3. – e01970-16.
49. Betsem, E. Correlation of West Nile virus incidence in donated blood with West Nile neuroinvasive disease rates, United States, 2010-2012 / E. Betsem, Z. Kaidarova, S.L. Stramer et al. // *Emerg Infect Dis.* – 2017. № 2. – P. 212-219.
50. Bhuvanakantham, R. West Nile virus and dengue virus capsid protein negates the antiviral activity of human Sec3 protein through the proteasome pathway / R. Bhuvanakantham, M. Ng // *Cell. Microbiol.* – 2013. № 15. P. 1688–1706.
51. Bosanko, C.M. West Nile virus encephalitis involving the substantia nigra: neuroimaging and pathologic findings with literature review / C.M. Bosanko, J. Gilroy, A.M. Wang et al. // *Arch Neurol.* – 2003. № 10. – P. 1448-1452.
52. Botha, E.M. Genetic determinants of virulence in pathogenic lineage 2 West Nile virus strains / E.M. Botha, W. Markotter, M. Wolfaardt et al. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2008. № 14. – P. 222–230.
53. Bowen, R.A. Protection of horses from West Nile virus Lineage 2 challenge following immunization with a whole, inactivated WNV lineage 1 vaccine / R.A. Bowen, A. Bosco-Lauth, K. Syvrud et al. // *Vaccine.* – 2014. № 32. – P. 5455–5459.
54. Bressanelli, S. Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation / S. Bressanelli, K. Stiasny, S.L. Allison et al. // *EMBO J.* – 2004. № 23. – P. 728–738.
55. Briant, L. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses / L. Briant, P. Desprès, V. Choumet et al. // *Virology.* – 2014. № 464. – P. 26–32.
56. Brinton, M.A. The molecular biology of West Nile Virus: A new invader of the western hemisphere / M.A. Brinton // *Annu Rev. Microbiol.* – 2002. № 56. – P. 371–402.
57. Burkhalter, K.L. Laboratory and field evaluations of a commercially available real-time loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of West Nile virus in mosquito pools / K.L. Burkhalter, M. O'Keefe, Z. Holbert-Watson et al. // *J Am Mosq Control Assoc.* – 2021. № 4. – P. 256-262.

58. Busch, M.P. Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection / M.P. Busch, S.H. Kleinman, L.H. Tobler et al. // *J Infect Dis.* – 2008. № 7. – P. 984-993.
59. Busquets, N. Detection of West Nile virus lineage 2 in North-Eastern Spain (Catalonia) / N. Busquets, M. Laranjo-González, M. Soler et al. // *Transbound Emerg Dis.* – 2019. № 2. – P. 617-621.
60. Butenko, A.M. Detection of the Koutango virus (Flavivirus, Togaviridae) in Somalia / A.M. Butenko, I.V. Semashko, T.M. Skvortsova et al. // *Med Parazitol (Mosk).* – 1986. № 3. – P. 65-68.
61. Byrne, S.N. Interleukin-1 but not tumor necrosis factor is involved in West Nile virus-induced Langerhans cell migration from the skin in C57BL/6 mice / S.N. Byrne, G.M. Halliday, L.J. Johnston et al. // *J. Investig. Dermatol.* – 2001. № 117. – P. 702–709.
62. Campbell, G.L. West Nile virus / G.L. Campbell, A.A. Marfin, R.S. Lanciotti et al. // *Lancet Infect Dis.* – 2002. № 9. – P. 519-529.
63. Cardinale, E. West Nile virus infection in horses, Indian ocean / E. Cardinale, C. Bernard, S. Lecollinet et al. // *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 2017. № 53. – P. 45–49.
64. Chambers, T.J. Flavivirus genome organization, expression, and replication. / T.J. Chambers, C.S. Hahn, R. Galler et al. // *Annu. Rev. Microbiol.* – 1990. № 44. –P. 649–688.
65. Chappell, K. West Nile Virus NS2B/NS3 protease as an antiviral target / K. Chappell, M. Stoermer, D. Fairlie et al. // *Curr. Med. Chem.* – 2008. № 15. P. 2771–2784.
66. Charrel, R. Evolutionary relationship between Old World West Nile virus strains: Evidence for viral gene flow between Africa, the Middle East, and Europe / R. Charrel, A. Brault, P. Gallian et al. // *Virology.* – 2003. № 315. – P. 381–388.
67. Chen, S. Innate immune evasion mediated by flaviviridae non-structural proteins / S. Chen, Z. Wu, M. Wang et al. // *Viruses.* – 2017. № 9. – P. 291.

68. Chowdhury, P. Characterization of West Nile virus (WNV) isolates from Assam, India: Insights into the circulating WNV in northeastern India / P. Chowdhury, S.A. Khan, P. Dutta et al. // *J. Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* – 2014. № 37. – P. 39–47.
69. Ciccozzi, M. Epidemiological history and phylogeography of West Nile virus lineage 2 / M. Ciccozzi, S. Peletto, E. Cella et al. // *Infect. Genet. Evol.* – 2013. № 17. – P. 46–50.
70. Colpitts, T.M. West Nile Virus: Biology, transmission, and human infection / T.M. Colpitts, M.J. Conway, R.R. Montgomery et al. // *Clin. Microbiol. Rev.* – 2012. № 25. – P. 635.
71. Davis, C.W. West Nile virus discriminates between DC-SIGN and DC-SIGNR for cellular attachment and infection / C.W. Davis, H.-Y. Nguyen, S.L. Hanna et al. // *J. Virol.* – 2006. № 80. – P. 1290–1301.
72. Davis, L.E. West Nile virus neuroinvasive disease / L.E. Davis, R. DeBiasi, D.E. Goade et al. // *Ann Neurol.* – 2006. № 3. – P. 286-300.
73. Del Amo, J. A novel quantitative multiplex real-time RT-PCR for the simultaneous detection and differentiation of West Nile virus lineages 1 and 2, and of Usutu virus / J. Del Amo, E. Sotelo, J. Fernández-Pinero et al. // *J Virol Methods.* – 2013. № 2. – P. 321-327.
74. Del Amo, J. Experimental infection of house sparrows (*Passer domesticus*) with West Nile virus isolates of Euro-Mediterranean and North American origins / J. Del Amo, F. Llorente, J. Figuerola et al. // *Vet Res.* – 2014. № 1. – P. 1-9.
75. Del Giudice, P. Skin manifestations of West Nile virus infection / P. Del Giudice, I. Schuffenecker, H. Zeller et al. // *Dermatology.* – 2005. № 4. – P. 348-350.
76. Diamond, M.S. B cells and antibody play critical roles in the immediate defense of disseminated infection by West Nile encephalitis virus / M.S. Diamond, B. Shrestha, A. Marri et al. // *J. Virol.* – 2003. № 77. – P. 2578–2586.
77. Dreier, J. Implementation of NAT screening for West Nile virus and experience with seasonal testing in Germany / J. Dreier, T. Vollmer, D. Hinse et al. // *Transfus Med Hemother.* – 2016. № 1. – P. 28-36.

78. Dubrau, D. A positive-strand RNA virus uses alternative protein-protein interactions within a viral protease/cofactor complex to switch between RNA replication and virion morphogenesis / D. Dubrau, M.A. Tortorici, F.A. Rey et al. // *PLoS Pathog.* – 2017. № 13. – e1006134.
79. Egberink, H. West Nile virus infection in cats: ABCD guidelines on prevention and management / H. Egberink, D.D. Addie, C. Boucraut-Baralon et al. // *J. Feline Med. Surg.* – 2015. № 17. – P. 617–619.
80. Erdélyi, K. Clinical and pathologic features of lineage 2 West Nile virus infections in birds of prey in Hungary / K. Erdélyi, K. Ursu, E. Ferenczi et al. // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2007. № 7. – P. 181–188.
81. Ergünay, K. Co-circulation of West Nile virus and distinct insect-specific flaviviruses in Turkey / K. Ergünay, N. Litzba, A. Brinkmann et al. // *Parasit Vectors.* – 2017. № 1. – P. 1-14.
82. Ezenwa, V.O. Avian diversity and West Nile virus: testing associations between biodiversity and infectious disease risk / V.O. Ezenwa, M.S. Godsey, R.J. King et al. // *Proc Biol Sci.* – 2006. № 1582. – P. 109-117.
83. Faggioni, G. Rapid molecular detection and genotyping of West Nile Virus lineages 1 and 2 by real time PCR and melting curve analysis / G. Faggioni, R. De Santis, A. Pomponi et al. // *J Virol Methods.* – 2014. № 207. – P. 54-59.
84. Fall, G. Real-time RT-PCR assays for detection and genotyping of West Nile virus lineages circulating in Africa / G. Fall, M. Faye, M. Weidmann et al. // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2016. № 12. – P. 781-789.
85. Fall, G. Vector Competence of *Culex neavei* and *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) from Senegal for Lineages 1, 2, Koutango and a Putative New Lineage of West Nile Virus / G. Fall, M. Diallo, C. Loucoubar et al. // *Am. J. Trop. Med. Hyg.* – 2014. № 90. – P. 747–754.
86. Ferguson, D.D. Characteristics of the rash associated with West Nile virus fever / D.D. Ferguson, K. Gershman, A. LeBailly et al. // *Clin Infect Dis.* – 2005. № 8. – P. 1204-1207.

87. Firth, A.E. A conserved predicted pseudoknot in the NS2A-encoding sequence of West Nile and Japanese encephalitis flaviviruses suggests NS1 may derive from ribosomal frameshifting / A.E. Firth, J.F. Atkins // *Viol. J.* – 2009. № 6. – P. 14.
88. Fratkin, J.D. Spinal cord neuropathology in human West Nile virus infection / J.D. Fratkin, A.A. Leis, D.S. Stokic et al. // *Arch Pathol Lab Med.* – 2004. № 5. – P. 533-537.
89. Fros, J.J. Comparative Usutu and West Nile virus transmission potential by local *Culex pipiens* mosquitoes in north-western Europe / J.J. Fros, P. Miesen, C.B. Vogels et al. // *One Health.* – 2015. № 1. – P. 31–36.
90. Gamino, V. Pathology and tissue tropism of natural West Nile virus infection in birds: A review / V. Gamino, U. Höfle // *Vet. Res.* – 2013. № 1. – P. 1–15.
91. Garcia-Tapia, D. Replication of West Nile virus in equine peripheral blood mononuclear cells / D. Garcia-Tapia, C.M. Loiacono, S.B. Kleiboeker et al. // *Vet. Immunol. Immunopathol.* – 2006. № 110. – P. 229–244.
92. Golding, N. West Nile virus vector *Culex modestus* established in southern England / N. Golding, M.A. Nunn, J.M. Medlock et al. // *Parasites Vectors.* – 2012. № 32. – P. 1–5.
93. Gorbalenya, A.E. N-terminal domains of putative helicases of flavi- and pestiviruses may be serine proteases / A.E. Gorbalenya, A.P. Donchenko, E.V. Koonin et al. // *Nucleic Acids Res.* – 1989. № 17. – P. 3889–3897.
94. Gorsche, R. The rash of West Nile virus infection / R. Gorsche, P. Tilley // *CMAJ.* – 2005. № 11. – P. 1440.
95. Granwehr, B.P. West Nile virus: where are we now? // B.P. Granwehr, K.M. Lillibrige, S. Higgs et al. // *Lancet Infect Dis.* – 2004. № 4. – P. 547-556.
96. Guarner, J. Clinicopathologic study and laboratory diagnosis of 23 cases with West Nile virus encephalomyelitis / J. Guarner, W.J. Shieh, S. Hunter et al. // *Hum Pathol.* – 2004. № 5. – P. 983-990.
97. Gutsche, I. Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein / I. Gutsche, F. Coulibaly, J.E. Voss et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2011. № 108. – P. 8003–8008.

98. Habarugira, G. West Nile virus: an update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and «One health» implications / G. Habarugira, W.W. Suen, J. Hobson-Peters et al. // *Pathogens*. – 2020. № 9. – P. 1-51.
99. Hall, R.A. Kunjin virus: An Australian variant of West Nile / R.A. Hall, J.H. Scherret, J.S. Mackenzie // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2001. № 951. – P. 153–160.
100. Hall, R.A. Monoclonal antibodies to the West Nile virus NS5 protein map to linear and conformational epitopes in the methyltransferase and polymerase domains / R.A. Hall, S.E. Tan, B. Selisko et al. // *J. Gen. Virol.* – 2009. № 90. – P. 2912–2922.
101. Hayes, E.B. Virology, pathology, and clinical manifestations of West Nile virus disease / E.B. Hayes, J.J. Sejvar, S.R. Zaki et al. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2005. № 11. – P. 1174–1179.
102. Hayes, E.B. West Nile virus: epidemiology and clinical features of an emerging epidemic in the United States / E.B. Hayes, D.J. Gubler // *Annu Rev Med.* – 2006. № 57. – P. 181-194.
103. Heinz, F. Flaviviruses and their antigenic structure / F. Heinz, K. Stiasny // *J. Clin. Virol.* – 2012. № 55. – P. 289–295.
104. Hershberger, V.S. Chorioretinal lesions in nonfatal cases of West Nile virus infection / V.S. Hershberger, J.J. Augsburger, R.K. Hutchins et al. // *Ophthalmology*. – 2003. № 110. – P. 1732-1736.
105. Holicki, C.M. West Nile virus lineage 2 vector competence of indigenous *Culex* and *Aedes* mosquitoes from Germany at temperate climate conditions / C.M. Holicki, U. Ziegler, C. Răileanu et al. // *Viruses*. – 2020. № 12. – P. 1-13.
106. Hubálek, Z. West Nile fever a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe / Z. Hubálek, J. Halouzka // *Emerg. Infect. Dis.* – 1999. № 5. – P. 643-650.
107. Iwamoto, M. Transmission of West Nile virus from an organ donor to four transplant recipients / M. Iwamoto, D.B. Jernigan, A. Guasch et al. // *N Engl J Med.* – 2003. № 22. – P. 2196-2203.
108. Jungbauer, C. West Nile virus lineage 2 infection in a blood donor from Vienna, Austria, August 2014 / C. Jungbauer, M.K. Hourfar, K. Stiasny et al. // *J Clin Virol.* – 2015. № 64. – P. 16-19.

109. Jupp, P.G. The ecology of West Nile virus in South Africa and the occurrence of outbreaks in humans / Jupp P.G. // *Ann N Y Acad Sci.* – 2001. № 951. – P. 143-152.
110. Kelley, T.W. The neuropathology of West Nile virus meningoencephalitis. A report of two cases and review of the literature / T.W. Kelley, R.A. Prayson, A.I. Ruiz et al. // *Am J Clin Pathol.* – 2003. № 119. – P. 749-753.
111. Kimura, T. Association between the pH-dependent conformational change of West Nile flavivirus E protein and virus-mediated membrane fusion / T. Kimura, A. Ohyama // *J. Gen. Virol.* – 1988. № 69. – P. 1247–1254.
112. Klenk, K. Alligators as West Nile virus amplifiers / K. Klenk, J. Snow, K. Morgan et al. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2004. № 10. – P. 2150–2155.
113. Kolodziejek, J. The complete sequence of a West Nile virus lineage 2 strain detected in a *Hyalomma marginatum marginatum* tick collected from a song thrush (*Turdus philomelos*) in eastern Romania in 2013 revealed closest genetic relationship to strain Volgograd 2007 / J. Kolodziejek, M. Marinov, B.J. Kiss et al. // *PLoS One.* – 2014. № 9. – e109905.
114. Komar, N. West Nile virus: Epidemiology and ecology in North America / N. Komar // *Adv. Virus Res.* – 2003. № 61. – P. 185–234.
115. Kramer, L.D. West Nile virus infection in birds and mammals / L.D. Kramer, K.A. Bernard // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* – 2001. № 951. – P. 84–93.
116. Kuchtey, R.W. Uveitis associated with West Nile virus infection / R.W. Kuchtey, G.S. Kosmorsky, D. Martin et al. // *Arch Ophthalmol.* – 2003. № 121. – P. 1648-1649.
117. Kwoh, D.Y. Transcription-based amplification system and detection of amplified human immunodeficiency virus type 1 with a bead-based sandwich hybridization format / D.Y. Kwoh, G.R. Davis, K.M. Whitfield et al. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1989. № 86. – P. 1173-1177.
118. Lanciotti, R.S. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East / R.S. Lanciotti, G.D. Ebel, V. Deubel et al. // *Virology.* – 2002. № 298. – P. 96–105.

119. Lanciotti, R.S. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses / R.S. Lanciotti, A.J. Kerst // *J Clin Microbiol.* – 2001. № 39. – P. 4506-5413.
120. Lanciotti, R.S. Origin of the West Nile virus responsible for an outbreak of encephalitis in the Northeastern United States / R.S. Lanciotti, J.T. Roehrig, V. Deubel et al. // *Science.* – 1999. № 286. – P. 2333-2337.
121. Lanciotti, R.S. Rapid detection of west nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan reverse transcriptase-PCR assay / R.S. Lanciotti, A.J. Kerst, R.S. Nasci et al. // *J Clin Microbiol.* – 2000. № 11. – P. 4066-4071.
122. Lee, E. Common E protein determinants for attenuation of glycosaminoglycan-binding variants of Japanese encephalitis and West Nile viruses / E. Lee, R.A. Hall, M. J. Lobigs // *Viol.* – 2004. № 78. – P. 8271–8280.
123. Leung, J.Y. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly / J.Y. Leung, G.P. Pijlman, N. Kondratieva et al. // *J. Virol.* – 2008. № 82. – P. 4731-4741.
124. Li, K. Functional interplay among the flavivirus NS3 protease, helicase, and cofactors / K. Li, W.W. Phoo, D. Luo // *Viol. Sin.* – 2014. № 29. – P. 74–85.
125. Li, X.-D. The interface between methyltransferase and polymerase of NS5 is essential for flavivirus replication / X.-D. Li, C. Shan, C.-L. Deng et al. // *PLoS Negl. Trop. Dis.* – 2014. № 8. – e2891.
126. Lim, S.M. Susceptibility of European jackdaws (*Corvus monedula*) to experimental infection with lineage 1 and 2 West Nile viruses / S.M. Lim, A.C. Brault, G. van Amerongen et al. // *J Gen Virol.* – 2014. № 95. – P. 1320-1329.
127. Lim, S.M. West Nile virus: Immunity and pathogenesis / S.M. Lim, P. Koraka, A.D. Osterhaus et al. // *Viruses.* – 2011. № 3. – P. 811–828.
128. Liu, W. Polymerase Spiral Reaction (PSR): A novel isothermal nucleic acid amplification method / W. Liu, D. Dong, Z. Yang et al. // *Sci Rep.* – 2015. № 5. – P. 1-8.
129. Londono-Renteria, B. A Brief review of West Nile virus biology / B. Londono-Renteria, T.M. Colpitts // *Methods Mol. Biol.* – 2016. № 1435. – P. 1–13.

130. Long, M.T. West Nile virus and Equine Encephalitis viruses / M.T. Long // *Vet. Clin. N. Am. Equine Pract.* – 2014. № 30. – P. 523–542.
131. Lustig, Y. Mutation in West Nile virus structural protein prM during human infection / Y. Lustig, R.S. Lanciotti, M. Hindiyeh et al. // *Emerg Infect Dis.* – 2016. № 9. – P. 1647-1649.
132. Lustig, Y. Surveillance and diagnosis of West Nile virus in the face of flavivirus cross-reactivity / Y. Lustig, D. Sofer, E.D. Bucris et al. // *Front Microbiol.* – 2018. № 9. – P. 1-10.
133. Lvov, D.K. West Nile virus and other zoonotic viruses in Russia: examples of emerging-reemerging situations / D.K. Lvov, A.M. Butenko, V.L. Gromashevsky et al. // *Arch Virol Suppl.* – 2004. № 18. – P. 85-96.
134. Mackenzie, J.M. Immunolocalization of the dengue virus nonstructural glycoprotein NS1 suggests a role in viral RNA replication / J.M. Mackenzie, M.K. Jones, P.R. Young // *Virology.* – 1996. № 220. P. 232–240.
135. Magurano, F. Circulation of West Nile virus lineage 1 and 2 during an outbreak in Italy / F. Magurano, M.E. Remoli, M. Baggieri et al. // *Clin Microbiol Infect.* – 2012. № 12. – P. 545-547.
136. Mann, R.A. Molecular characterization and phylogenetic analysis of Murray Valley encephalitis virus and West Nile virus (Kunjin subtype) from an arbovirus disease outbreak in horses in Victoria, Australia, in 2011 / R.A. Mann, M. Fegan, K. O'Riley et al. // *J Vet Diagn Invest.* – 2013. № 1. – P. 35-44.
137. Marschang, R.E. Viruses infecting reptiles / R.E. Marschang // *Viruses.* – 2011. № 3. – P. 2087–2126.
138. Martín-Fontecha, A. Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes / A. Martín-Fontecha, A. Lanzavecchia, F. Sallusto // *Handb Exp Pharmacol.* – 2009. № 188. – P. 31-49.
139. Martins, I.C. The disordered N-terminal region of dengue virus capsid protein contains a lipid-droplet-binding motif / I.C. Martins, F. Gomes-Neto, A.F. Faustino et al. // *Biochem. J.* – 2012. № 444. – P. 405–415.

140. Mastrangelo, E. Crystal structure and activity of Kunjin virus NS3 helicase; protease and helicase domain assembly in the full length NS3 protein / E. Mastrangelo, M. Milani, M. Bollati et al. // *J. Mol. Biol.* – 2007. № 372. – P. 444–455.
141. McIntosh, B.M. Infections in sentinel pigeons by Sindbis and West Nile viruses in South Africa, with observations on *Culex* (*Culex*) *univittatus* (Diptera: Culicidae) attracted to these birds / B.M. McIntosh, P.G. Jupp // *J Med Entomol.* – 1979. № 3. – P. 234-239.
142. Mishra, N. One-step pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of zika, dengue, chikungunya, West Nile viruses and a human housekeeping gene / N. Mishra, J. Ng, J.L. Rakeman et al. // *J Clin Virol.* – 2019. № 120. – P. 44-50.
143. Mori, A. Molecular techniques for the genomic viral RNA detection of West Nile, Dengue, Zika and Chikungunya arboviruses: a narrative review / A. Mori, E. Pomari, M. Deiana et al. // *Expert Rev Mol Diagn.* – 2021. № 6. – P. 591-612.
144. Mrzljak, A. West Nile Virus: An emerging threat in transplant population / A. Mrzljak, P. Dinjar-Kujundzic, M. Santini et al. // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2020. № 8. – P. 613-618.
145. Muller, D.A. The flavivirus NS1 protein: Molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker / D.A. Muller, P.R. Young // *Antivir. Res.* – 2013. № 98. – P. 192–208.
146. Mumcuoglu, K.Y. Argasid ticks as possible vectors of West Nile virus in Israel / K.Y. Mumcuoglu, C. Banet-Noach, M. Malkinson et al. // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2005. № 5. – P. 65–71.
147. Murray, K.O. West Nile virus and its emergence in the United States of America / K.O. Murray, E. Mertens, P. Despres // *Vet Res.* – 2010. № 6. – P. 1-14.
148. Nagy, A. A nyugat-nílusi vírus kimutatása humán betegmintákból: nyomon követéses vizsgálatok a 2015. évi szezonális időszakban [Detection of West Nile virus in human samples: follow-up studies during the 2015 seasonal period] / A. Nagy, O. Nagy, E. Bán et al. // *Orv Hetil.* – 2017. № 20. – P. 791-796.

149. Nagy, A. Detection and sequencing of West Nile virus RNA from human urine and serum samples during the 2014 seasonal period / A. Nagy, E. Bán, O. Nagy et al. // *Arch Virol.* – 2016. № 7. – P. 1797-1806.
150. Nordström, H. DNA microarray technique for detection and identification of seven flaviviruses pathogenic for man / H. Nordström, K.I. Falk, G. Lindegren et al. // *J Med Virol.* – 2005. № 4. – P. 528-540.
151. Notomi, T. Loop-mediated isothermal amplification of DNA / T. Notomi, H. Okayama, H. Masubuchi et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2000. № 12. – P. 1-7.
152. O'Leary, D.R. The epidemic of West Nile virus in the United States, 2002 / D.R. O'Leary, A.A. Marfin, S.P. Montgomery et al. // *Vector Borne Zoonotic Dis.* – 2004. № 1. – P. 61-70.
153. Pacenti, M. Human West Nile virus lineage 2 infection: epidemiological, clinical, and virological findings / M. Pacenti, A. Sinigaglia, E. Franchin et al. // *Viruses.* – 2020. № 4. – P. 1-14.
154. Pachler, K. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013 / K. Pachler, K. Lebl, D. Berer et al. // *Emerg Infect Dis.* – 2014. № 12. – P. 2119-2122.
155. Pai, A. Performance characteristics of the Food and Drug Administration-licensed Roche Cobas TaqScreen West Nile virus assay / A. Pai, S. Kleinman, K. Malhotra et al. // *Transfusion.* – 2008. № 10. – P. 2184-2189.
156. Papa, A. Genetic characterization of West Nile virus lineage 2, Greece, 2010 / A. Papa, T. Bakonyi, K. Xanthopoulou et al. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2011. № 5. – P. 920-922.
157. Papin, J.F. SYBR green-based real-time quantitative PCR assay for detection of West Nile Virus circumvents false-negative results due to strain variability / J.F. Papin, W. Vahrson, D.P. Dittmer // *J Clin Microbiol.* – 2004. № 4. – P. 1511-1518.
158. Pappa, S. PCR-based next-generation West Nile virus sequencing protocols / S. Pappa, S.C. Chaintoutis, C.I. Dovas et al. // *Mol Cell Probes.* – 2021. Vol. 60. doi: 10.1016/j.mcp.2021.101774.

159. Parida, M. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus / M. Parida, G. Posadas, S. Inoue et al. // *J Clin Microbiol.* – 2004. № 1. – P. 257-263.
160. Pepperell, C. West Nile virus infection in 2002: morbidity and mortality among patients admitted to hospital in southcentral Ontario / C. Pepperell, N. Rau, S. Kraiden et al. // *CMAJ.* – 2003. № 11. – P. 1399-1405.
161. Perelman, A. Acute pancreatitis in West Nile Fever / A. Perelman, J. Stern // *Am J Trop Med Hyg.* – 1974. № 6. – P. 1150-1152.
162. Perera-Lecoin, M. Flavivirus entry receptors: an update / M. Perera-Lecoin, L. Meertens, X. Carnec et al. // *Viruses.* – 2013. № 6. – P. 69–88.
163. Petersen, L.R. West Nile virus / L.R. Petersen, A.A. Marfin, D.J. Gubler // *JAMA.* – 2003. № 4. – P. 524–528.
164. Petersen, L.R. West Nile virus: Review of the literature / L.R. Petersen, A.C. Brault, R.S. Nasci // *JAMA.* – 2013. № 3. – P. 308–315.
165. Phalen, D.N. West Nile virus / D.N. Phalen, B. Dahlhausen // *Semin. Avian Exot. Pet. Med.* – 2004. № 13. – P. 67–78.
166. Piepenburg, O. DNA detection using recombination proteins / O. Piepenburg, C.H. Williams, D.L. Stemple et al. // *PLoS Biol.* – 2006. № 7. – P. 1115-1121.
167. Prow, N.A. The West Nile virus-like flavivirus Koutango is highly virulent in mice due to delayed viral clearance and the induction of a poor neutralizing antibody response / N.A. Prow, Y.X. Setoh, R.M. Biron et al. // *J. Virol.* – 2014. № 88. – P. 9947-9962.
168. Ravindra, K.V. West Nile virus-associated encephalitis in recipients of renal and pancreas transplants: case series and literature review / K.V. Ravindra, A.G. Freifeld, A.C. Kalil et al. // *Clin Infect Dis.* – 2004. № 9. – P. 1257-1260.
169. Reiter, P. West Nile virus in Europe: Understanding the present to gauge the future / P. Reiter // *Eurosurveillance.* – 2010. № 10. – P. 1-7.
170. Rimoldi, G. West Nile virus infection in sheep / G. Rimoldi, A. Mete, J. Adaska et al. // *Vet. Pathol.* – 2017. № 54. – P. 155-158.

171. Rios, M. West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood / M. Rios, S. Daniel, C. Chancey et al. // *Clin Infect Dis.* – 2007. № 2. – P. 181-186.
172. Rizzoli, A. The challenge of West Nile virus in Europe: knowledge gaps and research priorities / A. Rizzoli, M.A. Jimenez-Clavero, L. Barzon et al. // *Euro. Surveill.* – 2015. № 20. – P. 1-15.
173. Root, J.J. West Nile virus associations in wild mammals: A synthesis / J.J. Root // *Arch. Virol.* – 2013. № 158. – P. 735–752.
174. Rosen, A. Screening of living organ donors for endemic infections: Understanding the challenges and benefits of enhanced screening / A. Rosen, M.G. Ison // *Transpl Infect Dis.* – 2017. № 1. – e12633.
175. Rossi, S.L. West Nile virus / S.L. Rossi, T.M. Ross, J.D. Evans // *Clin. Lab. Med.* – 2010. № 30. – P. 47–65.
176. Rudolf, I. West Nile virus lineage 2 isolated from *Culex modestus* mosquitoes in the Czech Republic, 2013: expansion of the European WNV endemic area to the North? / I. Rudolf, T. Bakonyi, O. Sebesta et al. // *Euro Surveill.* – 2014. № 31. – P. 2-5.
177. Sambri, V. Diagnosis of west nile virus human infections: overview and proposal of diagnostic protocols considering the results of external quality assessment studies / V. Sambri, M.R. Capobianchi, F. Cavrini et al. // *Viruses.* – 2013. № 10. – P. 2329-2348.
178. Sampson, B.A. The pathology of human West Nile Virus infection / B.A. Sampson, C. Ambrosi, A. Charlot et al. // *Hum Pathol.* – 2000 № 5. – P. 527-531.
179. Sardelis, M.R. Vector competence of selected North American *Culex* and *Coquillettidia* mosquitoes for West Nile virus / M.R. Sardelis, M.J. Turell, D.J. Dohm et al. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2001. № 7. – P. 1018–1022.
180. Scherret, J.H. Phylogeny and molecular epidemiology of West Nile and Kunjin viruses / J.H. Scherret, J.S. Mackenzie, R.A. Hall et al. // *Curr Top Microbiol Immunol.* – 2002. № 267. – P. 373-390.
181. Scherret, J.H. The relationships between West Nile and Kunjin viruses / J.H. Scherret, M. Poidinger, J.S. Mackenzie et al. // *Emerg Infect Dis.* – 2001. № 4. – P. 697-705.

182. Schneider, B.S. *Aedes aegypti* saliva alters leukocyte recruitment and cytokine signaling by antigen-presenting cells during West Nile virus infection / B.S. Schneider, L. Soong, L.L. Coey et al. // *PLoS ONE*. – 2010. № 7. – e11704.
183. Sejvar, J. West Nile virus infection / J. Sejvar // *Microbiol Spectr*. – 2016. № 3. – doi: 10.1128/microbiolspec.EI10-0021-2016.
184. Sejvar, J.J. Neurocognitive and functional outcomes in persons recovering from West Nile virus illness / J.J. Sejvar, A.T. Curns, L. Welburg et al. // *J Neuropsychol*. – 2008. № 2. – P. 477-499.
185. Sejvar, J.J. The long-term outcomes of human West Nile virus infection / J.J. Sejvar // *Clin Infect Dis*. – 2007. № 12. – P. 1617-1624.
186. Shah, P.S. Comparative flavivirus-host protein interaction mapping reveals mechanisms of dengue and Zika virus pathogenesis / P.S. Shah, N. Link, G.M. Jang et al. // *Cell*. – 2018. № 175. – P. 1931-1945.
187. Shaikh, S. West Nile virus chorioretinitis / S. Shaikh, M.T. Trese // *Br J Ophthalmol*. – 2004. № 12. – P.1599-1600.
188. Shirafuji, H. Experimental West Nile virus infection in aigamo ducks, a cross between wild ducks (*Anas platyrhynchos*) and domestic ducks (*Anas platyrhynchos* var. *domesticus*) / H. Shirafuji, K. Kanehira, M. Kubo et al. // *Avian Dis*. – 2009. № 2. – P. 239-244.
189. Shirato, K. Discrimination of West Nile virus and Japanese encephalitis virus strains using RT-PCR RFLP analysis / K. Shirato, T. Mizutani, H. Kariwa et al. // *Microbiol Immunol*. – 2003. № 6. – P. 439-445.
190. Shiryayev, S.A. NS4A regulates the ATPase activity of the NS3 helicase: a novel cofactor role of the non-structural protein NS4A from West Nile virus / S.A. Shiryayev, A.V. Chernov, A.E. Aleshin et al. // *J Gen Virol*. – 2009. № 90. – P. 2081-2085.
191. Sixl, W. Serological examinations for antibodies against West Nile virus, Semliki virus and chikungunyavirus in laboratory mice, parasitized by nidicole fauna from swallow's nests / W. Sixl, D. Stünzner, H. Withalm et al. // *Geogr. Med. Suppl*. – 1988. № 1. – P. 51–55.

192. Slon Campos, J.L. The immune response against flaviviruses / J.L. Slon Campos, J. Mongkolsapaya, G.R. Screaton // *Nat. Immunol.* – 2018. № 19. – P. 1189–1198.
193. Smithburn, K.C. A neurotropic virus isolated from the blood of a native of Uganda / K. C. Smithburn, T.P. Hughes, A.W. Burke et al. // *Am. J. Trop. Med Hyg.* – 1940. № 20. – P. 471-492.
194. Steinman, A. West Nile virus infection in crocodiles / A. Steinman, C. Banet-Noach, S. Tal et al. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2003. № 9. – P. 887–889.
195. Suthar, M.S. West Nile virus infection and immunity / M.S. Suthar, M.S. Diamond, M. Gale Jr // *Nat. Rev. Microbiol.* – 2013. № 11. – P. 115–128.
196. Tassaneeritthep, B. DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells / B. Tassaneeritthep, T.H. Burgess, A. Granelli-Piperno et al. // *J Exp. Med.* – 2003. № 197. – P. 823–829.
197. Tomar, P.S. Development and evaluation of real-time reverse transcription recombinase polymerase amplification assay for rapid and sensitive detection of West Nile virus in human clinical samples / P.S. Tomar, S. Kumar, S. Patel et al. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2021. Vol. 10. – P. 1-10.
198. Tomar, P.S. Polymerase spiral reaction assay for rapid and real time detection of West Nile virus from clinical samples / P.S. Tomar, J.S. Kumar, S. Patel et al. // *Front Cell Infect Microbiol.* – 2020. № 10. – P. 1-10.
199. Tomar, P.S. Simple and field amenable loop-mediated isothermal amplification-lateral flow dipstick assay for detection of west Nile virus in human clinical samples / P.S. Tomar, S. Patel, P.K. Dash et al. // *J Appl Microbiol.* – 2022. № 6. – P. 3512-3522.
200. Tuplin, A. Replication enhancer elements within the open reading frame of tick-borne encephalitis virus and their evolution within the Flavivirus genus / A. Tuplin, D. Evans, A. Buckley et al. // *Nucleic Acids Res.* – 2011. № 39. – P. 7034-7048.
201. van der Meulen, K.M. West Nile virus in the vertebrate world / K.M. van der Meulen, M.B. Pensaert, H.J. Nauwynck // *Arch. Virol.* – 2005. № 150. – P. 637–657.
202. Vandenbelt, S. Multifocal choroiditis associated with West Nile virus encephalitis / S. Vandenbelt, S. Shaikh, A. Capone Jr et al. // *Retina.* – 2003. № 1. – P. 97-99.

203. Vazquez, A. Putative new lineage of west nile virus, Spain / A. Vazquez, M.P. Sanchez-Seco, S. Ruiz et al. // *Emerg. Infect. Dis.* – 2010. № 16. – P. 549–552.
204. Velasco, M. Imported human West Nile virus lineage 2 infection in Spain: neurological and gastrointestinal complications / M. Velasco, M.P. Sanchez-Seco, C. Campelo et al. // *Viruses.* – 2020. № 12. – P. 1-7.
205. Veo, C. Evolutionary dynamics of the lineage 2 West Nile virus that caused the largest european epidemic: Italy 2011-2018 / C. Veo, C. Della Ventura, A. Moreno et al. // *Viruses.* – 2019. № 11. – P. 1-15.
206. Vidaña, B. The role of birds of prey in West Nile virus epidemiology / B. Vidaña, N. Busquets, S. Napp et al. // *Vaccines (Basel).* – 2020. № 3. – P. 1-31.
207. Vogels, C.B. Vector competence of European mosquitoes for West Nile virus / C.B. Vogels, G.P. Göertz, G.P. Pijlman et al. // *Emerg. Microbes Infect.* – 2017. № 6. – P. 1–13.
208. Wang, B. Structure and function of Zika virus NS5 protein: Perspectives for drug design / B. Wang, S. Thurmond, R. Hai et al. // *Cell. Mol. Life Sci.* – 2018. № 75. – P. 1723–1736.
209. Watson, J.T. Clinical characteristics and functional outcomes of West Nile Fever / J.T. Watson, P.E. Pertel, R.C. Jones et al. // *Ann Intern Med.* – 2004. № 5. – P. 360-365.
210. Wengler, G. In vitro synthesis of West Nile virus proteins indicates that the amino-terminal segment of the NS3 protein contains the active centre of the protease which cleaves the viral polyprotein after multiple basic amino acids / G. Wengler, G. Czaya, P.M. Färber et al. // *J. Gen. Virol.* – 1991. № 72. – P. 851–858.
211. Wengler, G. Terminal sequences of the genome and replicative-form RNA of the flavivirus West Nile virus: absence of poly(A) and possible role in RNA replication / G. Wengler, G. Wengler // *Virology.* – 1981. № 2. – P. 544-555.
212. White, G. Competency of reptiles and amphibians for eastern equine encephalitis virus / G. White, C. Ottendorfer, S. Graham et al. // *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* – 2011. № 85. – P. 421–425.

213. Wicker, J.A. Mutational analysis of the West Nile virus NS4B protein / J.A. Wicker, M.C. Whiteman, D.W. Beasley et al. // *Virology*. – 2012. № 426. – P. 22–33.
214. Xu, Z. Simultaneous detection of Zika, chikungunya, dengue, yellow fever, West Nile, and Japanese encephalitis viruses by a two-tube multiplex real-time RT-PCR assay / Z. Xu, Y. Peng, M. Yang et al. // *J Med Virol*. – 2022. № 6. – P. 2528-2536.
215. Yun, T. Identification and molecular characterization of a novel flavivirus isolated from Pekin ducklings in China / T. Yun, W. Ye, Z. Ni et al. // *Vet. Microbiol.* – 2012. № 157. – P. 311-319.
216. Ziegler, U. West Nile virus epizootic in Germany, 2018 / U. Ziegler, R. Lühken, M. Keller et al. // *Antiviral Res.* – 2019. № 162. – P. 39-43.
217. Ziermann, R. PROCLEIX West Nile virus assay based on transcription-mediated amplification / R. Ziermann, S.A. Sánchez-Guerrero // *Expert Rev Mol Diagn.* – 2008. № 3. – P. 239-245.