



Оценка диагностической эффективности набора реагентов для *in vitro* диагностики лихорадки Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией

Е.В. Прохвятилова[✉], Г.А. Ткаченко, А.А. Батурин, Л.И. Белицкая, А.В. Топорков

Федеральное казенное учреждение здравоохранения Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, ул. Голубинская, д. 7, Волгоград, 400131, Российская Федерация

✉ Прохвятилова Елена Валерьевна; flashlight28@mail.ru

Резюме

Лихорадка Западного Нила — зоонозная природно-очаговая арбовирусная инфекция с трансмиссивным механизмом передачи возбудителя. Заболевание протекает в виде острого лихорадочного интоксикационного синдрома, в тяжелых случаях — с развитием нейроинфекции. Выделяют несколько генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила, ВЗН (*West Nile virus*, WNV), циркулирующих на территории Российской Федерации и имеющих разную патогенность для человека. В связи с этим разработка и внедрение в клиническую лабораторную практику диагностического набора реагентов для дифференциации генотипов ВЗН является актуальной задачей.

Цель работы: проведение технических и клинических испытаний для оценки качества, эффективности и безопасности диагностического набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» для выявления РНК и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Материалы и методы: определение диагностической чувствительности и специфичности набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» (ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора) проводили методом ОТ-ПЦР-РВ с использованием 216 образцов клинического и 204 образцов биологического материала. В качестве метода сравнения применяли секвенирование по Сенгеру. Статистическую обработку результатов клинических испытаний проводили в соответствии с ГОСТ Р 53022.3-2008.

Результаты: в ходе испытаний установлено, что аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР-РВ с набором реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» составила 1×10^4 ГЭ/мл при выявлении кДНК ВЗН генотипов 1, 2, 4. При оценке специфичности набора положительных результатов с кДНК гетерологичных вирусов в пробах с концентрацией 1×10^6 ГЭ/мл не выявлено. Диагностическая чувствительность набора реагентов составила не менее 98,5%, диагностическая специфичность — не менее 99%, при доверительной вероятности 90% при анализе каждого из показателей.

Выводы: набор реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» может быть рекомендован для применения в клинической лабораторной диагностике для обнаружения РНК и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила.

Ключевые слова: вирус Западного Нила; полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией; гибридационно-флуоресцентная детекция; ОТ-ПЦР-РВ; генотипирование; диагностический набор реагентов

Для цитирования: Прохвятилова Е.В., Ткаченко Г.А., Батурин А.А., Белицкая Л.И., Топорков А.В. Оценка диагностической эффективности набора реагентов для *in vitro* диагностики лихорадки Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023;23(1):90–101. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-90-101>

Evaluation of the diagnostic efficacy of a reagent kit for *in vitro* diagnosis of West Nile fever using reverse transcription polymerase chain reaction with fluorescent probe-based detection

E.V. Prokhvatilova✉, G.A. Tkachenko, A.A. Baturin, L.I. Belitskaya, A.V. Toporkov

Volgograd Research Institute for Plague Control, 7 Golubinskaya St., Volgograd 400131, Russian Federation

✉ Elena V. Prokhvatilova; flashlight28@mail.ru

Abstract

West Nile fever is a vector-borne zoonotic arbovirus infection with natural foci. Its clinical course is similar to that of acute febrile syndrome, and severe cases may result in neuroinvasive disease. Several genetic lineages (1, 2, and 4) of the *West Nile virus* (WNV) with different pathogenicity for humans are circulating in the Russian Federation. Therefore, it is an urgent task to develop a diagnostic reagent kit for differentiating between WNV genetic lineages and to implement the kit in clinical laboratory practice.

The aim of the study was to conduct technical and clinical tests and evaluate the quality, efficacy, and safety of the Ampligen-WNV-genotype-1/2/4 diagnostic reagent kit for detecting WNV RNA and differentiating between WNV genetic lineages 1, 2, and 4 by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) with fluorescent probe-based detection.

Materials and methods. The authors determined the diagnostic sensitivity and specificity of the Ampligen-WNV-genotype-1/2/4 reagent kit (Volgograd Research Institute for Plague Control, Russia) by real-time RT-PCR with 216 clinical samples and 204 biological samples. Sanger sequencing was used as a reference method. Statistical analysis of clinical test results was carried out in accordance with the Russian national standard for clinical laboratory tests (GOST R 53022.3-2008).

Results. When tested with the Ampligen-WNV-genotype-1/2/4 reagent kit, real-time RT-PCR demonstrated the analytical sensitivity of 1×10^4 GEq/mL for the detection of WNV cDNA of genetic lineages 1, 2, and 4. The assessment of its analytical specificity showed no positive results for cDNA samples of heterologous viruses at a concentration of 1×10^6 GEq/mL. The diagnostic sensitivity with the reagent kit was at least 98.5%, and the diagnostic specificity was at least 99%, with 90% confidence levels for both parameters.

Conclusions. The Ampligen-WNV-genotype-1/2/4 reagent kit can be recommended for use in clinical laboratory diagnostics to detect WNV RNA and differentiate between WNV genetic lineages 1, 2, and 4.

Key words: *West Nile virus*; reverse transcription polymerase chain reaction; fluorescent probe-based detection; real-time RT-PCR; genotyping; diagnostic reagent kit

For citation: Prokhvatilova E.V., Tkachenko G.A., Baturin A.A., Belitskaya L.I., Toporkov A.V. Evaluation of the diagnostic efficacy of a reagent kit for *in vitro* diagnosis of West Nile fever using reverse transcription polymerase chain reaction with fluorescent probe-based detection. *Biological Products. Prevention, Diagnosis, Treatment*. 2023;23(1):90–101. <https://doi.org/10.30895/2221-996X-2023-23-1-90-101>

Введение

Лихорадка Западного Нила (ЛЗН) является опасной природно-очаговой арбовирусной инфекцией с трансмиссивным механизмом передачи. Возбудитель ЛЗН — вирус Западного Нила, ВЗН (*West Nile virus*, WNV) рода *Flavivirus*, принадлежит к антигенному комплексу японского энцефалита семейства *Flaviviridae*. Природными резервуарами инфекции служат птицы, а основными переносчиками — орнитофильные комары, иксодовые, гамазовые и аргасовые клещи [1, 2]. В естественных условиях инфицирование человека, в основном, происходит при укусе комаров и клещей. Зарегистрированы отдельные случаи заражения людей при трансплантации органов, переливании крови и грудном вскармливании [1, 3]. В соответствии с классификацией патогенов для человека биологических агентов ВЗН относят ко II группе¹.

ЛЗН — труднодиагностируемое инфекционное заболевание, протекающее с комплексом неспецифических симптомов. Спектр клинических проявлений ЛЗН широко варьирует от бессимптомной инфекции до развития тяжелых нейтроинвазивных (менингеальная, менингоэнцефалитическая) форм заболевания [1, 4, 5]. Ввиду полиморфизма клинических проявлений ЛЗН для своевременной постановки клинического диагноза необходимо использовать лабораторные методы исследования, в том числе полимеразную цепную реакцию с обратной транскрипцией в реальном времени (ОТ-ПЦР-РВ), которая позволяет выявлять РНК ВЗН в различных пробах [2, 6].

Геном ВЗН обладает высокой генетической вариабельностью [6]. В Российской Федерации преимущественно циркулирует ВЗН 2 генотипа [7, 8]. Кроме того, в Астраханской и Волгоградской областях обнаружены 1, 4 генотипы ВЗН [8, 9]. Штаммы ВЗН генотипов 1 и 2 являются патогенными для человека, птиц и некоторых видов млекопитающих, а патогенность ВЗН 4 генотипа для данных организмов пока не установлена [6, 8, 9]. Генотипирование ВЗН имеет важное значение при проведении эпидемиологического мониторинга за возбудителем ЛЗН [8, 10]. Это предопределяет необходимость разработки и внедрения в лабораторную практику новых диагностических наборов реагентов.

В целях расширения перечня средств диагностики ЛЗН специалистами Референс-центра по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора² 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 гибридационно-флуоресцентной детекцией «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» по ТУ 21.20.23-015-01898084-2019» («Амплиген-WNV-генотип-1/2/4») [8].

Контрольные (предварительные) лабораторные испытания разработанного набора были проведены на базе лаборатории молекулярной эпидемиологии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора и лаборатории генодиагностики ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора в 2019 г. Аналитическая чувствительность ОТ-ПЦР-РВ при выявлении генотипов 1, 2, 4 ВЗН составила не менее 1×10^4 ГЭ/мл. При определении показателя аналитической специфичности установлено, что набор реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» не выявляет РНК гетерологичных вирусов (Чикунгунья (*Chikungunya virus*), денге (*Dengue virus*) 1–3 типов, клещевого энцефалита (*Tick-borne encephalitis virus*), желтой лихорадки (*Yellow fever virus*), краснухи (*Rubella virus*)) и бактерий (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*) в пробах с концентрацией 1×10^6 ГЭ/мл.

Дополнительно в ходе предварительных испытаний была проведена оценка влияния некоторых потенциально интерферирующих веществ на характеристики набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4», в результате чего установлено, что отдельные компоненты, которые могут содержаться в клиническом и биологическом материале или применяться на этапах пробоподготовки и выделения нуклеиновых кислот, не влияют на его эффективность. Однако результаты предварительных испытаний не давали возможности объективно оценить диагностическую эффективность разработанного набора реагентов. В связи с этим важной задачей было изучение диагностической чувствительности и специфичности набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4».

¹ СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4).

² Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека от 01.12.2017 № 1116 «О совершенствовании системы мониторинга, лабораторной диагностики инфекционных и паразитарных болезней и индикации ПБА в Российской Федерации».

Цель работы — проведение технических и клинических испытаний для оценки качества, эффективности и безопасности диагностического набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» для выявления РНК и дифференциации генотипов (1, 2, 4) вируса Западного Нила методом полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией и гибридационно-флуоресцентной детекцией.

Материалы и методы

При выполнении работы использовали диагностический набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4», производства ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора³. Область применения набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» — клиническая лабораторная диагностика, эпидемиологический мониторинг. Согласно конструкторской документации набор реагентов предназначен для качественного обнаружения РНК и дифференциации генотипов (1, 2, 4) ВЗН в пробах клинического материала (кровь, плазма и сыворотка крови, лейкоцитарная фракция крови, спинномозговая жидкость, моча, аутопсийный материал (головной мозг, печень, селезенка, почки)), а также биологического материала от животных (головной мозг, печень, селезенка, почки, кровь), комаров и клещей методом ОТ-ПЦР-РВ.

В состав набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» входили следующие компоненты: смеси для проведения полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-1, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-2, ОТ-ПЦР-смесь-1 *WNV* генотип-4/ВКО, ОТ-ПЦР-смесь-2, ОТ-ПЦР-смесь-3), ферменты (ревертаза *MMIv*, *Taq-F*-ДНК-полимераза), положительные контрольные образцы (ПКО кДНК *WNV* генотип-1, ПКО кДНК *WNV* генотип-2, ПКО кДНК *WNV* генотип-4), внутренний контрольный образец (ВКО), отрицательные контрольные образцы (ОКО выделения, ОКО ОТ-ПЦР).

Аналитическую чувствительность и специфичность набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» подтверждали в ходе технических испытаний с использованием образцов для кон-

троля, содержащих кДНК ВЗН 1, 2, 4 генотипов, выделенную из стандартных образцов предприятия (СОП): СОП кДНК *WNV*-1, СОП кДНК *WNV*-2, СОП кДНК *WNV*-4, а также кДНК вируса желтой лихорадки (*Yellow fever virus*, YFV) — СОП кДНК YFV, кДНК вируса краснухи (*Rubella virus*, RUBV) — СОП кДНК RUBV.

В клинических испытаниях набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» использовали материал от пациентов, полученный при проведении диагностических мероприятий, без непосредственного участия человека в соответствии с требованиями Приказа Минздрава России от 09.01.2014 № 2н⁴. Всего было исследовано 420 образцов (табл. 1) — 216 проб клинического материала и 204 пробы биологического материала, полученных из Референс-центра по мониторингу за возбудителем ЛЗН на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и одобрено Комитетом по биоэтике ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 3 от 05.04.2019). Исследования проводили, соблюдая безопасность работы с микроорганизмами I–II групп патогенности согласно требованиям нормативных документов⁵.

Наличие РНК ВЗН в положительных и отсутствие в отрицательных образцах было подтверждено с помощью набора реагентов «АмплиСенс *WNV*-FL» производства ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора (регистрационное удостоверение на медицинское изделие ФСР 2011/11503).

Для приготовления образцов, искусственно контаминированных ВЗН 1, 2, 4 генотипов, использовали 50 мкл препарата СОП (СОП кДНК *WNV*-1, СОП кДНК *WNV*-2, СОП кДНК *WNV*-4) в концентрации 1×10^4 ГЭ/мл и 50 мкл подготовленной пробы клинического или биологического материала.

Для приготовления образцов, искусственно контаминированных гетерологичными вирусами, использовали 50 мкл препарата СОП (СОП

³ http://vnipchi.rosпотребнадзор.ru/s/203/files/directions/production/commercial/74237_493.pdf

⁴ Приказ Минздрава России от 09.01.2014 № 2н «Об утверждении порядка проведения оценки соответствия медицинских изделий в форме технических испытаний, токсикологических исследований, клинических испытаний в целях государственной регистрации медицинских изделий».

⁵ СанПиН 3.3686-21. Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней (утв. Постановлением Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 28.01.2021 № 4). МУ 1.3.2569-09. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности. МУ 3.1.3012-12. Сбор, учет и подготовка к лабораторному исследованию кровососущих членистоногих в природных очагах опасных инфекционных болезней.

Таблица 1. Образцы клинического и биологического материала, используемые в испытаниях набора реагентов «Амплиген-ВНУ-генотип-1/2/4»
Table 1. Clinical and biological samples used in the testing of Ampligen-WNV-genotype-1/2/4 reagent kit

Вид клинического и биологического материала Type of clinical and biological material	Количество образцов Number of samples															
	Образцы клинических материалов Clinical samples															
	Проба крови человека Human blood sample	3	24	0	6	3	3	3	0	0	0	3	0	3	48	
		Проба плазмы крови человека Human plasma sample	3	0	0	3	3	3	0	0	0	3	0	3	21	
			Проба сыворотки крови человека Human serum sample	3	27	0	3	3	3	3	0	0	3	0	0	45
	Проба лейкоцитарной фракции крови человека Human leucocyte fraction sample	3	3	0	3	0	0	3	0	0	0	3	0	0	15	
		Проба спинномозговой жидкости человека Human cerebrospinal fluid sample	0	3	0	0	0	0	0	3	3	0	3	0	0	12
	Проба мочи человека Human urine sample	3	3	0	3	3	3	0	0	0	0	3	0	0	18	
		Проба суспензии ткани головного мозга человека Human brain suspension sample	3	12	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	21
	Проба суспензии ткани печени человека Human liver suspension sample	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	12
		Проба суспензии ткани селезенки человека Human spleen suspension sample	3	3	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	12
	Проба суспензии ткани почки человека Human kidney suspension sample	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	3	3	0	0	12

Продолжение таблицы 1
Table 1 (continued)

Вид клинического и биологического материала <i>Type of clinical and biological material</i>	Количество образцов <i>Number of samples</i>													Всего <i>Total</i>
	ВЗН генотипа 1 <i>WNV lineage 1</i>	ВЗН генотипа 2 <i>WNV lineage 2</i>	ВЗН генотипа 4 <i>WNV lineage 4</i>	ВЗН генотипа 1 <i>DENV type 1</i>	ВЗН генотипа 2 <i>DENV type 2</i>	ВЗН генотипа 3 <i>DENV type 3</i>	ВЗН генотипа 4 <i>DENV type 4</i>	ВЗН генотипа 1 <i>DENV type 1</i>	ВЗН генотипа 2 <i>DENV type 2</i>	ВЗН генотипа 3 <i>DENV type 3</i>	ВЗН генотипа 4 <i>DENV type 4</i>	ВЗН генотипа 1 <i>DENV type 1</i>	ВЗН генотипа 2 <i>DENV type 2</i>	
Образцы биологического материала <i>Biological samples</i>	Проба суспензии ткани головного мозга птицы <i>Bird brain suspension</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	Проба суспензии ткани печени птицы <i>Bird liver suspension sample</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	Проба суспензии ткани селезенки птицы <i>Bird spleen suspension sample</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	Проба суспензии ткани почки птицы <i>Bird kidney suspension sample</i>	3	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	6
	Проба крови птицы <i>Bird blood sample</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	Проба суспензии пула комаров <i>Mosquito pool suspension sample</i>	3	72	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	78
Всего <i>Total</i>	Проба суспензии пула клещей <i>Tick pool suspension sample</i>	0	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3
	Всего <i>Total</i>	33	171	3	18	12	12	60	3	3	18	3	48	420 ^a

Примечание. ВЗН, WNV – вирус Западного Нила; DENV – вирус денге; вирус ККГП, CCHFV – вирус Крымской-Конго геморрагической лихорадки; YFV – вирус желтой лихорадки; RUBV – вирус краснухи; СОП – стандартный образец предприятия.
^a 140 индивидуальных образцов клинического и биологического материала, исследованных в трех повторных с использованием двух серий испытываемого набора реагентов.
Note. WNV, West Nile virus; DENV, Dengue virus; CCHFV, Crimean-Congo haemorrhagic fever virus; YFV, Yellow fever virus; RUBV, Rubella virus.
^a 140 individual clinical and biological samples were tested in triplicate each using two batches of the reagent kit.

кДНК YFV, СОП кДНК RUBV) в концентрации 1×10^6 ГЭ/мл и 50 мкл подготовленной пробы клинического или биологического материала.

Для экстракции РНК из проб сыворотки и плазмы крови, ликвора, а также кДНК из СОП применяли набор реагентов «РИБО-преп» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) в соответствии с инструкцией производителя. Экстракцию РНК из образцов лейкоцитарной фракции крови, цельной крови, мочи и суспензий тканей внутренних органов, суспензий пулов членистоногих проводили в два этапа с использованием наборов реагентов «РИБО-золь-С» (ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора, Россия) и «РИБО-преп». Работу проводили в соответствии с инструкциями производителя. На этапе экстракции РНК/кДНК к исследуемым образцам добавляли 10 мкл ВКО. Лизис проб в присутствии ВКО осуществляли при 65 °C в течение 20 мин⁶.

Постановку ОТ-ПЦР-РВ осуществляли с использованием термоциклера Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия). Готовили три реакционные смеси, содержащие специфичные праймеры и зонды для выявления 1, 2 и 4 генотипов ВЗН. При проведении амплификации использовали следующий режим: обратная транскрипция при температуре 50 °C – 30 мин; предварительная денатурация при температуре 95 °C – 15 мин; циклирование при температуре 95 °C – 5 с, при 56 °C – 25 с, при 72 °C – 15 с (40 повторений). Результаты ОТ-ПЦР-РВ детектировали путем измерения интенсивности флуоресцентных сигналов при накоплении ампликонов. По каналу флуоресценции FAM/Green проводили детекцию продукта амплификации кДНК ВЗН 1 генотипа, по каналу ROX/Orange – кДНК ВЗН 2 генотипа, по каналу JOE/Yellow – кДНК ВЗН 4 генотипа, по каналу Cy5/Red – ВКО [8].

Учет результатов проводили в случае прохождения положительных контрольных образцов, ПКО (ПКО кДНК WNV генотип-1, ПКО кДНК WNV генотип-2, ПКО кДНК WNV генотип-4) и отрицательных контрольных образцов, ОКО (ОКО выделения и ОКО ОТ-ПЦР).

Для определения межпостановочной и межсерийной воспроизводимости положитель-

ные и отрицательные образцы исследовали повторно с использованием двух серий набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4». Внутривариационную воспроизводимость определяли при исследовании одинаковых положительных проб в пяти повторах с использованием двух серий набора «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4».

Дифференциацию генотипов (1, 2, 4) ВЗН подтверждали с использованием метода сравнения – секвенирования по Сенгеру, принцип которого заключался в определении нуклеотидных последовательностей с помощью генетического анализатора «НАНОФОР 05» (ФГБУН Институт аналитического приборостроения РАН, Россия). Для секвенирования исследуемых проб использовали набор реагентов BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Baltics, Литва). Анализ результатов секвенирования осуществляли с применением программного обеспечения Unipro UGENE (ООО «НЦИТ УНИПРО», Россия)⁷.

В качестве референтных последовательностей вируса Западного Нила использовали нуклеотидные последовательности СОП кДНК WNV-1 (Государственная коллекция патогенных бактерий ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, № КМ 2049), СОП кДНК WNV-2 (Государственная коллекция патогенных бактерий ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, № КМ 2050), СОП кДНК WNV-4 (Государственная коллекция патогенных бактерий ФКУН РосНИПЧИ «Микроб» Роспотребнадзора, № КМ 2051).

Технические и клинические испытания набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» проводили на базе клинко-диагностической лаборатории ООО «Вымпел-Медцентр» и ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора.

Статистическую обработку результатов клинических испытаний набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» проводили в соответствии с требованиями нормативных документов⁸. Достоверность полученных результатов оценивали в зависимости от числа параллельных опытов при доверительной вероятности 90%,

⁶ МУ 1.3.2569-09. Организация работы лабораторий, использующих методы амплификации нуклеиновых кислот при работе с материалом, содержащим микроорганизмы I–IV групп патогенности.

⁷ <https://unipro.ru>

⁸ Методические рекомендации по порядку проведения экспертизы качества, эффективности и безопасности медицинских изделий для государственной регистрации (утв. ФГБУ «ЦМИКЭЭ» Росздравнадзора и ФГБУ «ВНИИИМТ» Росздравнадзора от 24.08.2018).

ГОСТ Р 53022.3-2008. Технологии лабораторные клинические. Требования к качеству клинических лабораторных исследований. Часть 3. Правила оценки клинической информативности лабораторных тестов.

используя формулу биномиального распределения Бернулли⁹.

Результаты и обсуждение

При проведении технических испытаний набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» были подтверждены заявленные разработчиками функциональные характеристики: аналитическая чувствительность и специфичность. Показано, что набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» выявляет и дифференцирует в ОТ-ПЦР-РВ кДНК ВЗН генотипа 1 с концентрацией не менее 1×10^4 ГЭ/мл, кДНК ВЗН генотипа 2 с концентрацией не менее 1×10^4 ГЭ/мл, кДНК ВЗН генотипа 4 с концентрацией не менее 1×10^4 ГЭ/мл; набор реагентов не дает положительных результатов с кДНК гетерологичных вирусов в пробах с концентрацией 1×10^6 ГЭ/мл по ТУ 21.20.23-015-01898084-2019. В ходе проведения испытаний были согласованы вид, класс потенциального риска применения данного набора в соответствии с номенклатурной классификацией медицинских изделий (МИ)¹⁰. В результате испытаний проведена доработка технической и эксплуатационной документации.

При проведении испытаний набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» с использованием 276 положительных образцов, содержащих РНК/кДНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов, был получен положительный результат в 100% случаев; при анализе 144 отрицательных образцов, содержащих РНК/кДНК/ДНК близкородственных и гетерологичных вирусов и бактерий, был получен отрицательный результат в 100% случаев (табл. 2, 3). Результаты проведенных испытаний свидетельствовали о том, что внутривыпускная, межвыпускная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов составляла 100%.

В ходе проведения испытаний выполнена оценка функциональных характеристик набора реагентов «Амплиген *WNV*-генотип-1/2/4» методом сравнения. Поскольку аналогичных наборов реагентов в настоящее время не существует, использовали другой молекулярно-генетический метод – секвенирование по Сенгеру.

По результатам секвенирования РНК/кДНК ВЗН 1 генотипа обнаружена в 17 образцах, определена степень гомологии с СОП ВЗН 1 генотипа (СОП кДНК *WNV*-1) от 98,03 до 100%. РНК/кДНК ВЗН 2 генотипа обнаружена в 58 образцах, опре-

делена степень гомологии с СОП ВЗН 2 генотипа (СОП кДНК *WNV*-2) от 98,28 до 100%. РНК/кДНК ВЗН 4 генотипа обнаружена в 17 образцах, определена степень гомологии с СОП ВЗН 4 генотипа (СОП кДНК *WNV*-4), равная 100%.

При использовании референтного метода на 92 образцах РНК/кДНК ВЗН 1, 2 и 4 генотипов получен положительный результат в 100% случаев, на 48 пробах, содержащих РНК/кДНК близкородственных и гетерологичных вирусов (вирусы денге 1, 2, 3 типов, Крымской-Конго геморрагической лихорадки, желтой лихорадки, краснухи) и ДНК бактерий (*Neisseria meningitidis*, *Borrelia burgdorferi* s.l.), был получен отрицательный результат в 100% случаев.

Результаты испытаний подтвердили воспроизводимость исследований, проводимых с набором реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» для всех образцов. Доказана диагностическая эффективность набора «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» в лабораторных условиях: диагностическая чувствительность составила не менее 98,5% с доверительной вероятностью 90%; диагностическая специфичность составила не менее 99% с доверительной вероятностью 90%.

При проведении испытаний были оценены эксплуатационные характеристики набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» как положительные. Недостатков конструкции и упаковки набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» при использовании в условиях практической лаборатории не выявлено.

Проведена оценка соответствия условий работы с набором «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» требованиям по обеспечению безопасности. Поскольку исследуемые образцы (пробы клинического или биологического материала) необходимо рассматривать как инфекционно-опасные, были представлены данные об оценке рисков и мерах предосторожности при работе с набором «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4». Сведения об инфекционных или микробных, физических, экологических рисках для оператора, а также рисках, связанных с применением набора, приводящих к ошибочным результатам ОТ-ПЦР-РВ, внесены в эксплуатационную документацию производителя.

Таким образом, в рамках клинических испытаний доказана диагностическая эффективность и безопасность набора реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4». Установлено, что набор реагентов «Амплиген-*WNV*-генотип-1/2/4» может

⁹ Зарядов ИС, ред. Статистический пакет R: теория вероятностей и математическая статистика: учебно-методическое пособие. М.: Издательство Российского университета дружбы народов; 2010.

¹⁰ Приказ Минздрава России от 06.06.2012 № 4н «Об утверждении номенклатурной классификации медицинских изделий».

Таблица 2. Результаты испытаний набора реагентов «Амплиген WNV-генотип-1/2/4» с использованием проб клинического материала

Table 2. Test results for the Ampligen WNV-genotype-1/2/4 reagent kit and clinical samples

Наименование пробы Sample name	Число проб Number of samples	Число образцов, имеющих положительный результат при анализе Number of samples with positive results			
		«Амплиген WNV-генотип-1/2/4» Ampligen WNV-genotype-1/2/4			Метод сравнения ^a Reference method ^a
		Серия 6/21 Batch 6/21	Серия 7/21 повтор 1 Batch 7/21 replicate 1	Серия 7/21 повтор 2 Batch 7/21 replicate 2	
Проба клинического материала, содержащая РНК/кДНК ВЗН генотипа 1 Clinical samples containing RNA/cDNA of WNV lineage 1	10	10	10	10	10
Проба клинического материала, содержащая РНК/кДНК ВЗН генотипа 2 Clinical samples containing RNA/cDNA of WNV lineage 2	28	28	28	28	28
Проба клинического материала, содержащая РНК/кДНК ВЗН генотипа 4 Clinical samples containing RNA/cDNA of WNV lineage 4	10	10	10	10	10
Проба клинического материала, содержащая РНК/кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий Clinical samples containing RNA/cDNA of heterologous viruses and DNA of bacteria	24	0	0	0	0
Всего положительных проб, содержащих РНК/кДНК ВЗН генотипов 1, 2, 4 Total positive samples containing RNA/cDNA of WNV lineage 1, 2, 4	48	48	48	48	48
Всего отрицательных проб, содержащих РНК/кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий Total negative samples containing RNA/cDNA of heterologous viruses and DNA of bacteria	24	0	0	0	0

Примечание. ВЗН, WNV — вирус Западного Нила.

^a Метод сравнения — секвенирование по Сенгеру.

Note. WNV, West Nile virus.

^a The comparison method is Sanger sequencing.

использоваться в клинической лабораторной диагностике ЛЗН, а также в ходе эпидемиологического мониторинга специалистами лабораторий: клинко-диагностических, специализированных по проведению санитарно-эпидемиологических исследований и экспертиз, референс-центров по мониторингу за возбудителями инфекционных болезней, центров индикации возбудителей инфекционных болезней I–II групп патогенности, центров верификации диагностической деятельности, научных лабораторий.

В соответствии с регламентированными Правилами регистрации медицинских изделий¹¹ в Федеральной службе по надзору

в сфере здравоохранения проведена регистрация набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» в качестве медицинского изделия на основании результатов технических и клинических испытаний, а также экспертизы документов регистрационного досье. Подтверждено, что набор реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» может быть использован по назначению. В 2022 г. Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения выдано регистрационное удостоверение на МИ «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4» (№ РЗН 2022/17020)¹² и разрешены производство, реализация и применение МИ.

¹¹ Постановление Правительства Российской Федерации от 27.12.2012 № 1416 «Об утверждении Правил государственной регистрации медицинских изделий».

¹² http://vnipchi.rosпотребнадзор.ru/s/203/files/directions/production/commercial/74237_493.pdf

Таблица 3. Результаты испытаний набора реагентов «Амплиген WNV-генотип-1/2/4» с использованием проб биологического материала

Table 3. Test results for the Ampligen WNV-genotype-1/2/4 reagent kit and biological samples

Наименование пробы Sample name	Число проб Number of samples	Число образцов, имеющих положительный результат при анализе Number of samples with positive results			
		«Амплиген WNV-генотип-1/2/4» Ampligen WNV-genotype-1/2/4			Метод сравнения ^а Reference method ^а
		Серия 6/21 Batch 6/21	Серия 7/21 повтор 1 Batch 7/21 replicate 1	Серия 7/21 повтор 2 Batch 7/21 replicate 2	
Проба биологического материала от животных, содержащая РНК/кДНК ВЗН генотипа 1 Biological samples from animals, mosquitoes, and ticks containing RNA/cDNA of WNV lineage 1	7	7	7	7	7
Проба биологического материала от животных, содержащая РНК/кДНК ВЗН генотипа 2 Biological samples from animals, mosquitoes, and ticks containing RNA/cDNA of WNV lineage 2	30	30	30	30	30
Проба биологического материала от животных, содержащая РНК/кДНК ВЗН генотипа 4 Biological samples from animals, mosquitoes, and ticks containing RNA/cDNA of WNV lineage 4	7	7	7	7	7
Проба биологического материала от животных, содержащая РНК/кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий Biological samples from animals, mosquitoes, and ticks containing RNA/cDNA of heterologous viruses and DNA of bacteria	24	0	0	0	0
Всего положительных проб, содержащих РНК/кДНК ВЗН генотипов 1, 2, 4 Total positive samples containing RNA/cDNA of WNV lineage 1, 2, 4	44	44	44	44	44
Всего отрицательных проб, содержащих РНК/кДНК гетерологичных вирусов и ДНК бактерий Total negative samples containing RNA/cDNA of heterologous viruses and DNA of bacteria	24	0	0	0	0

Примечание. ВЗН, WNV — вирус Западного Нила.

^а Метод сравнения — секвенирование по Сэнгеру.

Note. WNV, West Nile virus.

^а The comparison method is Sanger sequencing.

Закключение

Разработка и внедрение в практику лабораторий новых наборов реагентов для *in vitro* диагностики, обеспечивающих с высокой чувствительностью и специфичностью выявление маркеров вируса Западного Нила, являются важными направлениями деятельности Референс-центра по мониторингу за возбудителем лихорадки Западного Нила на базе ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора. Проведенные испытания доказали диагностическую эффективность и безопасность набора реагентов «Амплиген-WNV-генотип-1/2/4».

Диагностическая чувствительность набора составила не менее 98,5%, диагностическая специфичность — не менее 99%; внутрипостановочная, межпостановочная и межсерийная воспроизводимость для всех положительных образцов составила 100%. Применение разработанного набора реагентов обеспечит в короткие сроки выявление и дифференциацию 1, 2, 4 генотипов вируса Западного Нила методом ОТ-ПЦР-РВ в клиническом и биологическом материале, что позволит изучить распространение данных вариантов вируса на территории Российской Федерации при проведении эпидемиологического мониторинга.

Литература/References

1. Львов ДК, ред. *Руководство по вирусологии. Вирусы и вирусные инфекции человека и животных*. М.: МИА; 2013.
Lvov DK, ed. *Guide to virology. Viruses and viral infections of humans and animals*. Moscow: MIA; 2013 (In Russ.).
2. Habarugira G, Suen WW, Hobson-Peters J, Hall RA, Bielefeldt-Ohmann H. *West Nile virus: an update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and «One health» implications*. *Pathogens*. 2020;9(7):589. <https://doi.org/10.3390/pathogens9070589>
3. Ferrarini I, Rigo A, Gandini A, Vinante F. *West Nile virus encephalitis in haematological setting: report of two cases and a brief review of the literature*. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2019;11(1):e2019033. <https://doi.org/10.4084/MJHID.2019.033>
4. Popescu CP, Florescu SA, Cotar AI, Badescu D, Ceianu CS, Zaharia M, et al. Re-emergence of severe *West Nile virus* neuroinvasive disease in humans in Romania, 2012 to 2017—implications for travel medicine. *Travel Med Infect Dis*. 2018;22:30–5. <https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.03.001>
5. Byas AD, Ebel GD. Comparative pathology of *West Nile virus* in humans and non-human animals. *Pathogens*. 2020;9(1):48. <https://doi.org/10.3390/pathogens9010048>
6. Топорков АВ, ред. *Лихорадка Западного Нила*. Волгоград: Волга-Пресс; 2017.
Toporkov AV, ed. *West Nile fever*. Volgograd: Volga-Press; 2017 (In Russ.).
7. Путинцева ЕВ, Удовиченко СК, Бородай НВ, Никитин ДН, Батурин АА, Молчанова ЕВ и др. Особенности эпидемиологической ситуации по лихорадке Западного Нила в Российской Федерации в 2020 г. и прогноз ее развития в 2021 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2021;(1):63–72.
Putintseva EV, Udovichenko SK, Boroday NV, Nikitin DN, Baturin AA, Molchanova EV, et al. Peculiarities of epidemiological situation on the West Nile fever in the Russian Federation in 2020 and forecast for its development in 2021. *Problems of Particularly Dangerous Infections*. 2021;(1):63–72 (In Russ.). <https://doi.org/10.21055/0370-1069-2021-1-63-72>
8. Батурин АА, Ткаченко ГА, Леденева МЛ, Лемасова ЛВ, Бондарева ОС, Кайсаров ИД и др. Молекулярно-генетический анализ вариантов вируса Западного Нила, циркулировавших на территории европейской части России в 2010–2019 гг. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2021;98(3):308–18.
Baturin AA, Tkachenko GA, Ledeneva ML, Lemasova LV, Bondareva OS, Kaysarov ID, et al. Molecular genetic analysis of *West Nile virus* variants circulating in European Russia between 2010 and 2019. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2021;98(3):308–18 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-85>
9. Платонов АЕ, Карань ЛС, Шопенская ТА, Федорова МВ, Колясникова НМ, Русакова НМ и др. Генотипирование штаммов вируса лихорадки Западного Нила, циркулирующих на юге России, как метод эпидемиологического расследования: принципы и результаты. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2011;88(2):29–37.
Platonov AE, Karan LS, Shopenskaya TA, Fedorova MV, Kolyasnikova NM, Rusakova NM, et al. Genotyping of *West Nile virus* strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2011;88(2):29–37 (In Russ.).
10. Жуков КВ, Топорков АВ, Викторов ДВ. Эпидемиологические аспекты и современная эволюция глобально распространяющихся арбовирусов. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2018;95(6):94–102.
Zhukov KV, Toporkov AV, Viktorov DV. Epidemiological aspects and modern evolution of globally spreading arboviruses. *Journal of Microbiology, Epidemiology and Immunobiology*. 2018;95(6):94–102 (In Russ.). <https://doi.org/10.36233/0372-9311-2018-6-94-102>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: **Е.В. Прохватилова** — анализ и систематизация экспериментальных данных, разработка нормативных документов на технологию производства и контроля набора реагентов, подготовка графического материала, написание, редактирование и оформление текста рукописи; **Г.А. Ткаченко** — разработка концепции и дизайна исследования, планирование этапов разработки и испытаний набора реагентов, руководство при проведении этапов испытаний (контрольные, технических, клинических), разработка технической и эксплуатационной документации на набор реагентов, анализ и обобщение результатов исследований, формулировка выводов, систематизация данных исследований, редактирование текста рукописи; **А.А. Батурин** — разработка дизайна и проведение экспериментальных исследований молеку-

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet the ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. **E.V. Prokhvatilova** analysed and systemised the experimental data; developed manufacturing and control specifications for the reagent kit; worked with the graphic material; drafted, edited, and formatted the manuscript. **G.A. Tkachenko** conceptualised and designed the study; planned reagent kit development and testing stages; supervised control, technical, and clinical testing; developed technical and operational documentation for the reagent kit; analysed and summarised the study results; formulated the conclusions; systemised the study data; and edited the manuscript. **A.A. Baturin** designed and conducted the experiments (control, technical, and clinical tests) using molecular genetics methods, analysed and interpreted the study results, formulated the conclusions, developed technical and operational documentation for the reagent kit, collected and sys-

лярно-генетическими методами (контрольных, технических, клинических испытаний), анализ и интерпретация результатов исследований, формулировка выводов, разработка технической и эксплуатационной документации на набор реагентов, сбор и систематизация данных научной литературы, редактирование текста рукописи; **Л.И. Белицкая** — выполнение этапов работы по разработке технической документации на набор реагентов, редактирование текста рукописи; **А.В. Топорков** — руководство при проведении испытаний и регистрации набора реагентов, утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Соответствие принципам этики. Исследование выполнено в соответствии с требованиями Хельсинкской декларации и одобрено Комитетом по биоэтике ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора (протокол № 3 от 05.04.2019).

Согласие пациентов. Получено информированное добровольное согласие пациентов на обработку персональных данных и их использование с научной и образовательной целью.

Благодарности. Работа выполнена в рамках отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2016–2020 гг. «Проблемно-ориентированные научные исследования в области эпидемиологического надзора за инфекционными и паразитарными болезнями» (номер НИР 086-2-16) и отраслевой научно-исследовательской программы Роспотребнадзора на 2021–2025 гг. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней» (номер НИР 093-2-19).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

temised scientific literature data, and edited the manuscript. **L.I. Belitskaya** participated in the development of technical documentation for the reagent kit and edited the manuscript. **A.V. Toporkov** supervised the testing and registration of the reagent kit and approved the final version of the manuscript for publication.

Ethics approval. The study was conducted in full compliance with the ethical principles of the Declaration of Helsinki and approved by the Bioethics Committee of the Volgograd Research Institute for Plague Control (Protocol No. 3 of 05.04.2019).

Informed consent. The patients gave informed consent for the processing of their protected personal and health information for scientific and educational purposes.

Acknowledgements. The study reported in this publication was carried out as part of the research programme of the Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Well-being (Rospotrebnadzor) for 2016–2020 “Problem-oriented scientific research in the field of epidemiological surveillance of infectious and parasitic diseases” (R&D project No. 086-2-16) and the research programme of Rospotrebnadzor for 2021–2025 “Scientific support of epidemiological surveillance and sanitary protection of the territory of the Russian Federation. Creation of new technologies, means and methods of control and prevention of infectious and parasitic diseases” (R&D project No. 093-2-19).

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Об авторах / Authors

Прохватилова Елена Валерьевна, канд. мед. наук, доц.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9947-7711>
flashlight28@mail.ru

Ткаченко Галина Александровна, канд. мед. наук, доц.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0199-3342>
tkachenko_g@mail.ru

Батурин Артем Александрович.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>
chemistry1987@mail.ru

Белицкая Людмила Ивановна.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1803-9443>
ludmila.belitzkaya@yandex.ru

Топорков Андрей Владимирович, д-р мед. наук, доц.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>
vari2@sprint-v.com.ru

Elena V. Prokhvatilova, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9947-7711>
flashlight28@mail.ru

Galina A. Tkachenko, Cand. Sci. (Med.), Assoc. Prof.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0199-3342>
tkachenko_g@mail.ru

Artem A. Baturin.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>
chemistry1987@mail.ru

Liudmila I. Belitskaya.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-1803-9443>
ludmila.belitzkaya@yandex.ru

Andrey V. Toporkov, Dr. Sci. (Med.), Assoc. Prof.
ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3449-4657>
vari2@sprint-v.com.ru

Поступила 17.06.2022

После доработки 02.03.2023

Принята к публикации 13.03.2023

Received 17 June 2022

Revised 2 March 2023

Accepted 13 March 2023