

DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-39-47

УДК 578.2

В.Г. Дедков¹, М.В. Сафонова², Е.В. Найденова³, N.F. Magassouba⁴, А.А. Айгинин⁵, В. Soropogui⁴,
F. Kourouma⁴, А.В. Camara⁴, J. Camara⁴, А.А. Крицкий³, М.Ю. Щелканов⁶, В.В. Малеев⁵

РАЗРАБОТКА И ИСПЫТАНИЕ МЕТОДА ВЫЯВЛЕНИЯ РНК ВИРУСА ЛАССА НА ОСНОВЕ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ С ОБРАТНОЙ ТРАНСКРИПЦИЕЙ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

¹ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера», Санкт-Петербург, Российская Федерация; ²ФКУЗ «Противочумный центр», Москва, Российская Федерация; ³ФКУЗ «Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб», Саратов, Российская Федерация; ⁴Университет им. Гамаль Абдель Насера, Конакри, Гвинейская Республика; ⁵ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии», Москва, Российская Федерация; ⁶Дальневосточный Федеральный университет, Владивосток, Российская Федерация

Цель. Разработка метода выявления и количественного анализа (ОТ-ПЦР в реальном времени) для выявления генетических маркеров вируса Ласса – LASV-FI. **Материалы и методы.** Для работы взяты все доступные в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) последовательности вируса Ласса, которые были выровнены для идентификации консервативных сайтов с использованием программного пакета BioEdit 7.2.5 (IbisBiosciences, США). Для апробации разработанного ПЦР-набора была использована контрольная панель РНК вируса Ласса и псевдовиральных частиц, 27 вирусных штаммов, относящихся к различным семействам, а также 37 образцов сывороток крови от пациентов с лихорадочными заболеваниями, отобранных в лечебных учреждениях Республики Гвинея в 2016–2018 гг., и 55 проб суспензий органов от многососковых мышей. **Результаты и обсуждение.** Аналитическая чувствительность метода варьировала от 10³ до 10⁵ копий/мл и имела 96,4 % диагностическую чувствительность, тогда как аналитическая и диагностическая специфичность составляли 100 %. Показано, что разработанная методика может быть успешно применена на практике для обнаружения вируса Ласса в Гвинейской Республике, с использованием различных типов материала от мелких млекопитающих, включая цельную кровь и суспензии органов *M. natalensis*, а также образцы сывороток крови людей, собранных через 3–7 дней после начала заболевания. Сделано также предположение, что данный метод может быть использован для штаммов вируса Ласса, распространенных не только в Гвинее, но и на других эндемичных территориях, но данный факт необходимо подтвердить в дальнейших исследованиях.

Ключевые слова: вирус Ласса, лихорадка Ласса, ОТ-ПЦР в реальном времени, Гвинейская Республика.

Корреспондирующий автор: Дедков Владимир Георгиевич, e-mail: vgdedkov@yandex.ru.

Для цитирования: Дедков В.Г., Сафонова М.В., Найденова Е.В., Magassouba N.F., Айгинин А.А., Soropogui B., Kourouma F., Camara A.B., Camara J., Крицкий А.А., Щелканов М.Ю., Малеев В.В. Разработка и испытание метода выявления РНК вируса Ласса на основе полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией в режиме реального времени. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2018; 4:39–47. DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-39-47

V.G. Dedkov¹, M.V. Safonova², E.V. Naidenova³, N.F. Magassouba⁴, А.А. Ayginin⁵, В. Soropogui⁴,
F. Kourouma⁴, А.В. Camara⁴, J. Camara⁴, А.А. Kritsky³, M.Yu. Shchelkanov⁶, V.V. Maleev⁵

Development and Testing of the Method for the Detection of Lassa Virus RNA, Based on Real-Time Polymerase Chain Reaction with Reverse Transcription

¹Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology, Saint-Petersburg, Russian Federation; ²Plague Control Center, Moscow, Russian Federation; ³Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”, Saratov, Russian Federation; ⁴Amal Abdel Naser University, Conakry, Republic of Guinea; ⁵Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation; ⁶Far East Federal University, Vladivostok, Russian Federation

Abstract. Objective of the study was the development of a method for the detection and quantitative analysis (real-time RT-PCR) to identify genetic markers of Lassa virus – LASV-FI. **Materials and methods.** We utilized all the available in the GenBank database (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) Lassa virus sequences that have been aligned to identify conservative sites applying the BioEdit 7.2.5 software package (IbisBiosciences, USA). To test the developed PCR kit, the control panel of Lassa virus RNA and pseudo-viral particles, 27 viral strains belonging to different families, as well as 37 serum samples from patients with feverish diseases selected in medical institutions of the Republic of Guinea in 2016–2018 and 55 samples of organ suspensions from multi-spiked mice were used. **Results and discussion.** The analytical sensitivity of the method varied from 10³ copies/ml to 10⁵ copies/ml and had 96.4 % diagnostic sensitivity, while the analytical and diagnostic specificity was 100 %. It is shown that the developed technique can be successfully introduced into practice for the detection of Lassa virus in the Republic of Guinea, using various types of material from small mammals, including whole blood and organ suspensions of *M. natalensis*, as well as samples of human blood sera collected 3–7 days after the onset of the disease. It is also suggested that this method can be used for strains of Lassa virus, common not only in Guinea but also in other endemic areas, but this fact must be confirmed in further studies.

Keywords: Lassa virus, Lassa fever, real-time RT-PCR, Republic of Guinea.

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

Corresponding author: Vladimir G. Dedkov, e-mail: vgdedkov@yandex.ru.

Citation: Dedkov V.G., Safonova M.V., Naidenova E.V., Magassouba N.F., Ayginin A.A., Soropogui B., Kourouma F., Camara A.B., Camara J., Kritsky A.A.,

Shchelkanov M.Yu., Maleev V.V. Development and Testing of the Method for the Detection of Lassa Virus RNA, Based on Real-Time Polymerase Chain Reaction with Reverse Transcription. *Problemy Osobo Opasnykh Infektsii [Problems of Particularly Dangerous Infections]*. 2018; 4:39–47. (In Russian). DOI: 10.21055/0370-1069-2018-4-39-47

Received 03.12.18. Accepted 10.12.18.

Вирус Ласса (LASV) представляет собой одноцепочечный вирус с амбивалентной РНК, принадлежащий к семейству *Arenaviridae*. Известно, что данный возбудитель вызывает у людей острую геморрагическую лихорадку (лихорадка Ласса), которая характеризуется повышением температуры, миалгией, тошнотой, рвотой, болью в груди и брюшной полости [1, 2]. Не является редкостью мягкое проявление лихорадки Ласса и бессимптомное течение инфекции [3, 4]. Естественные хозяева вируса в природе – мнугососковые мыши (*Mastomys natalensis*). Эти грызуны повсеместно распространены на Африканском континенте [5, 6], но лихорадка Ласса является эндемичной только для стран Западной Африки, включая Нигерию, Сьерра-Леоне, Либерию, Гвинею, Бенин, Мали и Кот-д’Ивуар [3, 7]. Годовая заболеваемость варьирует от 300000 до 500000 случаев, каждый год умирает около 5000 человек [2]. Чаще всего заражение происходит при вдыхании или проглатывании испражнений зараженных грызунов. Болезнь также может развиваться при употреблении в пищу *M. natalensis*, поскольку они являются деликатесом в Западно-Африканском регионе [8]. Сообщалось также о передаче инфекции от человека человеку, особенно в условиях медицинских стационаров [9].

Лихорадка Ласса, учитывая высокую заболеваемость и смертность, является большой проблемой для регионального здравоохранения в Западной Африке. Более того, данная инфекционная болезнь является одной из наиболее частых импортируемых экзотических лихорадок [10], в связи с чем очень важна разработка быстрых и чувствительных методов для выявления ее возбудителя.

Традиционно диагностика лихорадки Ласса осуществляется с помощью полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), иммунохроматографическим методом (ИХА) и методом иммуноферментного анализа (ИФА), однако на ранней стадии заболевания ОТ-ПЦР является наиболее эффективной [11]. Таким образом, разработка методов для выявления РНК вируса Ласса – важный этап для улучшения диагностики вызываемого им заболевания, а также для наблюдения и эпидемиологического контроля данной инфекционной болезни [12].

Целью настоящей работы стало создание и испытание одношагового количественного метода, основанного на ОТ-ПЦР в режиме реального времени, для выявления РНК вируса Ласса. Данная методика позволяет выявлять разные генетические варианты возбудителя.

Материалы и методы

Образцы, использованные в исследовании. Образцы цельной крови от *M. natalensis* (20 индиви-

дуальных образцов, 8 пулов из 3 животных), а также сыворотки крови людей (37 образцов) предоставлены для исследования сотрудниками вирусологической лаборатории Университета им. Гамаль Абдель Насера (г. Конакри, Гвинейская Республика). Другая часть биологических образцов (суспензия легкого и селезенки) от *M. natalensis* (27 экземпляров) взята специалистами Российско-Гвинейского центра эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней. Сбор материала и подготовку проб проводили в соответствии с общепринятыми методиками.

Вирусную РНК из цельной крови *M. natalensis* экстрагировали с использованием набора QIAmp (Qiagen, Германия) согласно инструкциям производителя. Экстракцию нуклеиновых кислот из остальных образцов проводили с использованием комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (AmpliSens, Россия).

Идентификация консервативных участков. Для работы были взяты все доступные в базе данных GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) последовательности вируса Ласса, которые были выровнены для идентификации консервативных сайтов с использованием программного пакета BioEdit 7.2.5 (IbisBiosciences, США). В качестве мишени для амплификации с помощью программы PLOTCON (<http://emboss.bioinformatics.nl/cgi-bin/emboss/plotcon>) выбран фрагмент L-гена размером 119 н.п. (позиция 106-225 в контрольной последовательности вируса Ласса, штамм *Josiah*, JN650518) [13, 14, 15].

Реакционная смесь и режим амплификации. Реакцию ОТ-ПЦР в режиме реального времени проводили в объеме 25 мкл, из которых: 10 мкл – образец выделенной РНК; 0,2 мкМ каждого праймера и зондов (LVL-forw1, LVL-forw2, LVL-rev1, LVL-rev2, LVL-prb1a, lvl-prb1b, lvl-prb1c) и 0,12 мкМ каждого IC-forwA, IC-revA, IC-prbA, 2,5 мкл dNTP; 5 мкл RT-PCRmix2 FEP/FRT; 0,25 мкл обратной транскриптазы MMLV; 0,25 мкл RTG-mix2 и 0,5 мкл полимеразы TaqF. В работе использованы реактивы производства компании «AmpliSens» Россия.

Параметры амплификации следующие: 50 °С в течение 15 мин, 95 °С – 15 мин, а затем 95 °С – 10 с, 55 °С – 20 с – 42 цикла. Флуоресценция наблюдалась при 55 °С. Результаты реакции считались положительными, если был пересечен пороговый уровень флуоресценции.

Для контроля ПЦР и реакции обратной транскрипции сконструированы положительные контрольные образцы (К+) и (ПКО). Для мониторинга экстракции РНК использовали коммерческий внутренний контроль IC-F1 (AmpliSens, Россия). Кроме того, для исключения ложноположительных результатов предусмотрен отрицательный контроль ПЦР

(К-) и отрицательный контроль выделения (ОКО).

Создание положительных контрольных образцов. Фрагмент кДНК (126 п.о.), эквивалентный последовательности L-гена вируса Ласса (штамм *Josiah*), включающий последовательности праймеров и флуоресцентных зондов, получен с использованием ступенчатой амплификации по методике, описанной ранее [16]. Конечный продукт ПЦР очищали с использованием набора для экстракции из геля MinElute (Qiagen, Германия), лигировали в плазмидный вектор pGEM-T (Promega, США) и трансформировали в *Escherichia coli* (штамм XL1-Blue) [17]. Рекомбинантные плазмиды из отдельных клонов выделяли с набором PlasmidMiniprep (Axugen, США), ориентацию и отсутствие мутаций в клонированном фрагменте ПЦР определяли секвенированием по методу Сэнгера. Растворенные плазмиды известных концентраций использовали в качестве положительного контроля для оценки эффективности стадии ПЦР.

Та же область кДНК применялась и для получения ПКО на основе ранее описанной процедуры для защищенных псевдовирусных частиц на основе MS2-фага [2] с некоторыми незначительными модификациями [18, 19]. Таким образом, фрагмент ПЦР, содержащий область мишени и дополнительные фланкирующие нуклеотиды, лигировали в линеаризованный плазмидный вектор, содержащий ген белка оболочки MS2. После проверки полученную рекомбинантную плазмиду трансформировали в *E. coli* (штамм B21) и экспрессию белка индуцировали изопропил-L-тио-D-галактопиранозидом (IPTG). После индукции клетки собирали, лизировали, используя способ, включающий обработку лизоцимом и замораживание-оттаивание, обрабатывали ДНКазой I и РНКазой А (Fermentas, США). Затем дериват очищали с помощью центрифугирования в градиенте CsCl, определяли количественно и разбавляли в стабилизирующем растворе (Life Technologies, США). Отсутствие остаточной ДНК в обработанном образце проверяли с использованием разработанного метода ПЦР в реальном времени без стадии обратной транскрипции. Концентрации К+ и ПКО измеряли с помощью системы QX100 с использованием набора РСМ Supermix для зондов и одноступенчатого набора ddPCR Supermix для зондов (Bio-Rad, США), специфических праймеров и соответствующих зондов, согласно инструкциям изготовителя.

Внутренний контрольный образец. Для оценки эффективности экстракции РНК к смеси реагентов добавлен экзогенный внутренний контроль IC-FI (AmpliSens, Россия), представляющий искусственную последовательность РНК (150–170 п.о., содержание GC – 50 %), окруженную полученным на основе MS2 фага защитным белковым слоем.

Аналитическая чувствительность. Для проведения работы использовали штамм *Josiah* вируса Ласса. Инактивацию и оценку концентрации вирусных частиц проводили в Центре вирусологии и био-

технологии «Вектор» (Кольцово, Новосибирская область). Защищенные псевдовирусные частицы синтезированы в Центральном научно-исследовательском институте эпидемиологии Роспотребнадзора (Москва).

Аналитическую чувствительность оценивали с использованием серии 10-кратных разведений псевдовирусных частиц и штамма *Josiah* вируса Ласса, для чего к известным разведениям добавляли интактную человеческую сыворотку до конечного объема 100 мкл, экстрагировали с использованием набора для экстракции «Рибо-преп» (AmpliSens, Россия), а затем проверяли в трех повторах с использованием разработанной методики, чтобы определить стандартные кривые и пределы детекции [20].

Аналитическая специфичность. Потенциальную перекрестную реактивность оценивали с использованием высокотитражных растворов вирусной РНК и ДНК представителей 27 видов вирусов, принадлежащих к 13 семействам, которые входят в коллекцию ЦНИИЭ Роспотребнадзора.

Диагностическая чувствительность и специфичность. Чувствительность и специфичность метода определяли с использованием образцов сыворотки от пациентов с клиническими симптомами лихорадки, которые были определены как Ласса-позитивные (18), а также изучены отрицательные на вирус Ласса образцы (19) и дополнительно образцы цельной крови и тканей от *M. natalensis* (37 положительных и 18 отрицательных).

Статистический анализ. Оценку 95 % доверительного интервала (ДИ) значений аналитической специфичности и диагностической чувствительности оценивали по методике, описанной R. Newcombe и изложенной E.B. Wilson в 1927 г. [21, 22].

Результаты и обсуждение

Лабораторная диагностика лихорадки Ласса осуществляется с использованием вирусологических, иммуносерологических и молекулярно-генетических методов. Вирусный антиген может быть обнаружен с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием специфических антител [23–25]. Однако этот метод имеет относительно низкую чувствительность (от 10^2 до 10^5 ФОЕ/мл) [26]. Эта особенность ограничивает его использование, особенно на ранней стадии заболевания, из-за низкой вирусной нагрузки в биологических жидкостях пациентов. Метод ИФА, основанный на обнаружении специфических антител, также не может быть использован в первые дни после начала заболевания, поскольку значительная концентрация антител класса IgM к возбудителю проявляется через 7–10 дней. Таким образом, метод ОТ-ПЦР наиболее подходит для выявления вируса Ласса в первые дни болезни и является необходимым для быстрой и ранней диагностики из-за высокой чувствительности и простоты реализации [27]. В этой парадигме

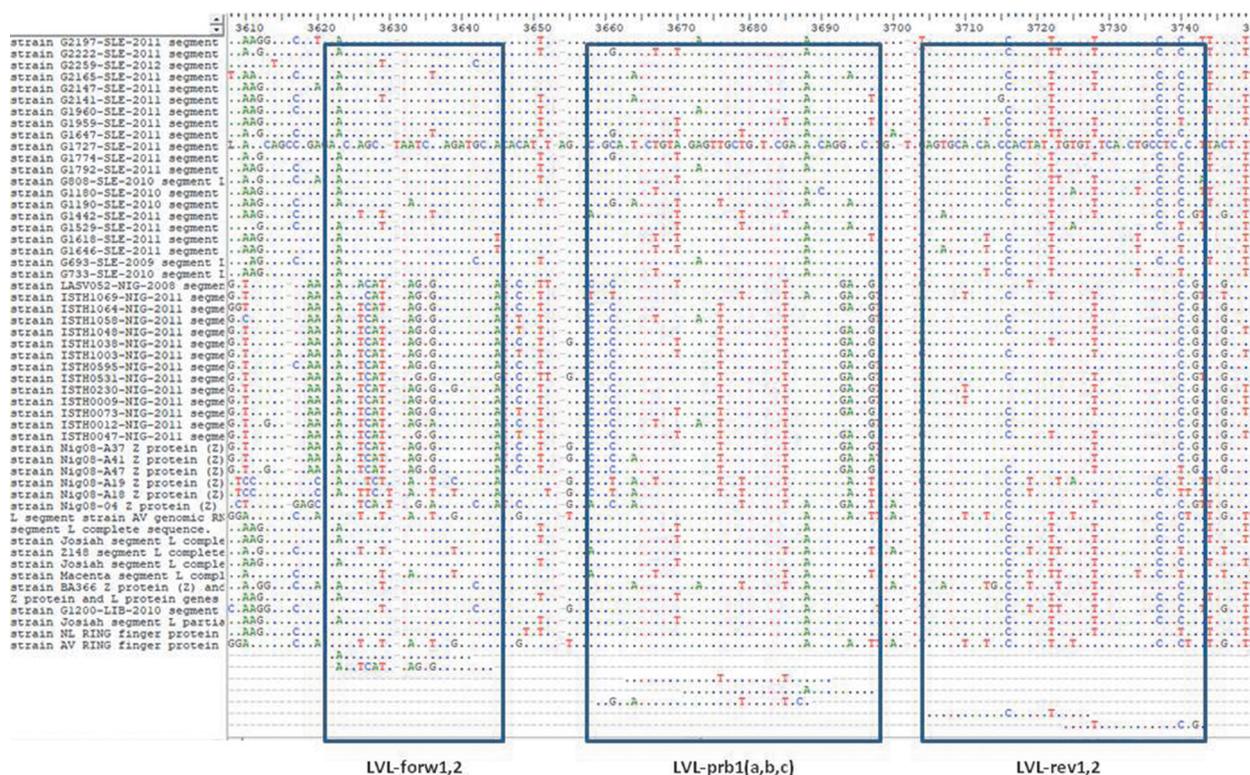


Рис. 1. Частичное выравнивание последовательностей L-генавируса Ласса, использованных для дизайна праймеров и зондов

Fig. 1. Partial alignment of Lassa L-gene-virus sequences used for primers and probes designing

разработан и оценен ряд ОТ-ПЦР-методов для выявления РНК вируса Ласса. Большинство из них нацелены на S-сегмент, кодирующий предшественник гликопротеина (GPC) и нуклеопротеин (NP) [28, 29]. Это связано с ограниченной информацией о генетических последовательностях вируса Ласса. Однако, как выяснилось в последние годы, некоторые штаммы данного вируса не выявлялись разработанными ОТ-ПЦР методами [30]. По мере появления новой информации о последовательностях S-сегмента стало очевидным, что Ласса является вирусом с высокой генетической изменчивостью, и разработка надежных специфических праймеров и зондов является проблемой [28]. Появление достаточного количества последовательностей L-генов позволило разработать методику, которая могла бы быть более надежной для обнаружения маркеров вируса Ласса, поскольку РНК-полимеразы, которые кодируются L-геном, имеют консервативные аминокислотные мотивы даже между различными представителями семейства аренавирусов [31–33]. За последние десять лет секвенировано множество полных геномов вируса, и практика показала, что L-генные последовательности возбудителя также демонстрируют высокую генетическую изменчивость, даже в пределах одной генетической линии. Таким образом, генетическое разнообразие вируса Ласса является естественной особенностью, которая, скорее всего, будет являться ограничением для использования ОТ-ПЦР в диагностике вызываемого им заболевания.

Множественные выравнивания (рис. 1) вирус-

ных последовательностей, доступных в GenBank, позволили идентифицировать высоко консервативные области, необходимые для дизайна специфических праймеров и соответствующих зондов. На основании данных секвенирования были разработаны и синтезированы олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды, а также разработан специфический метод для выявления РНК вируса Ласса методом ОТ-ПЦР с учетом результатов в режиме реального времени. Разработанная методика включала все компоненты, необходимые для проведения реакции, что позволило контролировать все этапы анализа, включая экстракцию РНК, обратную транскрипцию и ПЦР. За счет использования ОКО и К- риск ложноположительных результатов также был сведен к минимуму. Аналитическая чувствительность, оцененная с использованием разведений ПКО, была в диапазоне 10^3 – 10^5 копий/мл, а чувствительность, проверенная со штаммом *Josiah* вируса Ласса, составила 10 ФОЕ/мл (табл. 1, 2). Стандартная детекция была линейной в диапазоне от 10^6 копий/мл (пороговое значение реакции (Ct) составило 25,5–28,1) до $5 \cdot 10^2$ – 10^2 копий/мл (Ct 37,9–38,4) LASVПКО ($R^2 = 0,97$ – $0,99$) (рис. 2). Потенциал перекрестных реакций оценивали с использованием панели образцов высокотитражной РНК/ДНК представителей 27 вирусов. Ни один из образцов не зарегистрирован как положительный (табл. 3). Следовательно, оцененная аналитическая специфичность составила 100 % (85–100 %, при 95 % ДИ).

В общей сложности с использованием разра-

Таблица 1/Table 1

Псевдовирусные частицы, использованные для оценки аналитической чувствительности метода
Pseudo-viral particles utilized for evaluation of analytical sensitivity of the method

Название	Штамм	Номер в GenBank	Источник изоляции	Дата изоляции	Страна	Линия	Предел детекции, копий/мл
LVL1	ISTH-2358-NIG-2012	KM821995	<i>H. sapiens</i>	2012	Nigeria	н.д.	10 ³
LVL2	LASV046-NIG-2009	KM822009	<i>H. sapiens</i>	2009	Nigeria	н.д.	10 ³
LVL3	LASV274-NIG-2010	KM822056	<i>H. sapiens</i>	2010	Nigeria	н.д.	10 ³
LVL4	LASV975-NIG-2009	KM822075	<i>H. sapiens</i>	2009	Nigeria	н.д.	10 ⁴
LVL5	G3151-SLE-2013	KM821893	<i>H. sapiens</i>	2013	Sierra-Leone	IV	5·10 ⁴
LVL6	Josiah	JN650518	<i>H. sapiens</i>	1976	Sierra-Leone	IV	10 ³
LVL7	G3148-SLE-2013	KM821891	<i>H. sapiens</i>	2013	Sierra-Leone	IV	10 ⁵
LVL8	LM765-SLE-2012	KM822116	<i>H. sapiens</i>	2012	Sierra-Leone	IV	10 ⁴

Примечание: н.д. – нет данных.

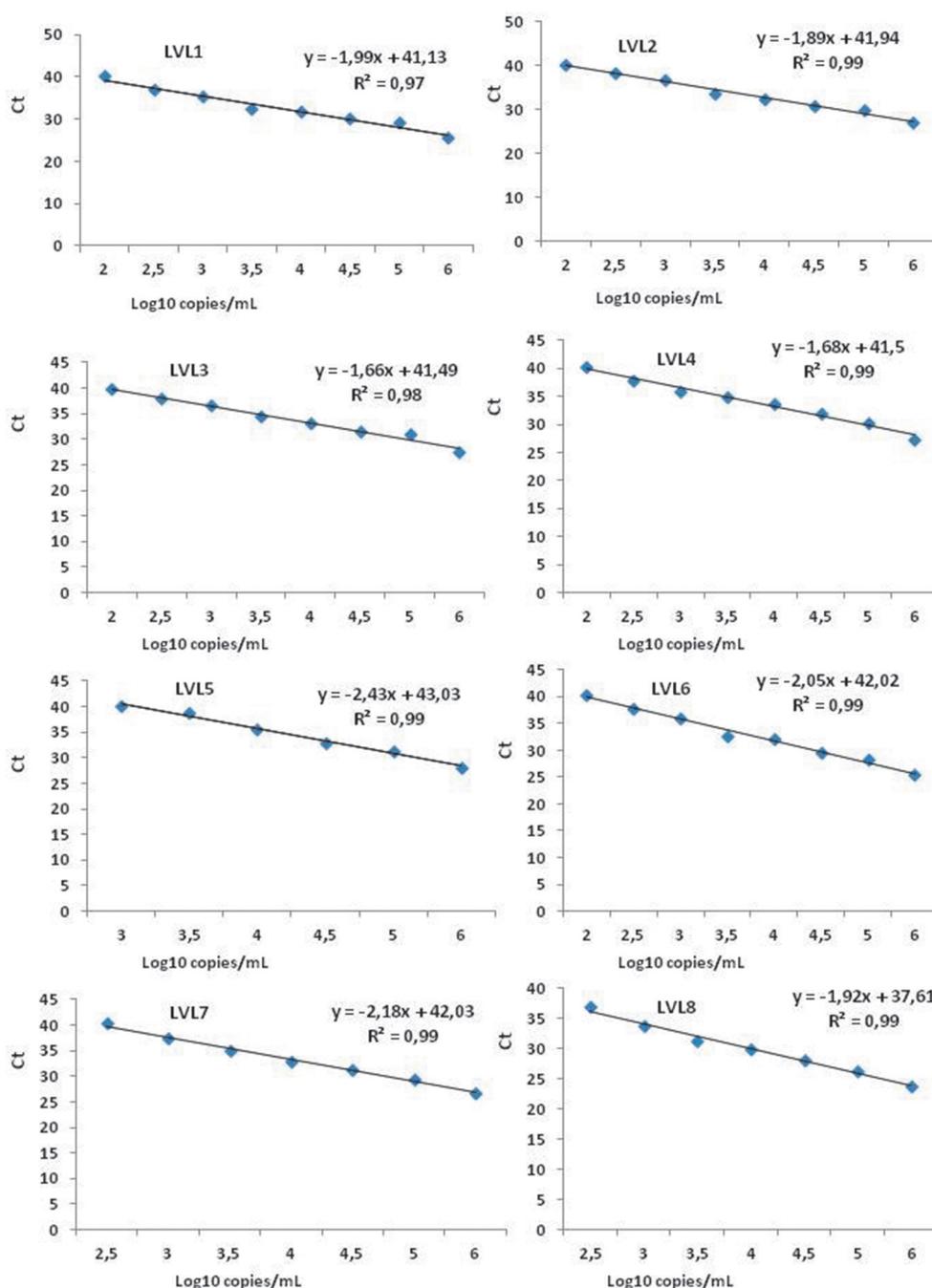


Рис. 2. Оценка аналитической чувствительности разработанного метода с помощью псевдовирусных частиц

Fig. 2. Evaluation of analytical sensitivity of the developed method, using pseudo-viral particles

Таблица 2/Table 2

Аналитическая чувствительность метода, оцененная с помощью разведений штамма *Josiah* вируса Ласса
Analytical sensitivity of the method, assessed using Lassa virus *Josiah* strain solutions

Концентрация, ФОЕ/мл	Повторы		
	Ct	Ct	Ct
10 ⁴	28,2	29,0	28,6
10 ³	32,0	31,9	31,7
10 ²	35,8	36,1	35,9
10 ¹	39,5	39,8	39,1
5	40,4	N/D	N/D

ботанного метода в лаборатории вирусологии геморрагических лихорадок Университета им. Гамаль Абдель Насера (г. Конакри, Гвинея) и Российско-Гвинейском центре эпидемиологии и профилактики инфекционных болезней (Киндия, Гвинея) проведено исследование 92 биологических образцов, причем 53 образца детектированы как положительные и 38 – как отрицательные (табл. 4, 5). Значения Ct

положительных образцов находились в диапазоне 21,9–39,2 циклов. Таким образом, диагностическая чувствительность разработанного метода выявления РНК вируса Ласса составляла 86–99 %, при 95 % ДИ, а диагностическая специфичность – 100 %.

Таким образом, разработанная методика успешно применялась на практике для обнаружения вируса Ласса в Гвинейской Республике, используя различные типы материала от мелких млекопитающих, включая цельную кровь и суспензии органов *M. natalensis*, а также образцы сывороток крови людей, собранных через 3–7 дней после начала заболевания. Сделано предположение, что данный метод может быть использован для штаммов вируса Ласса, распространенных не только в Гвинее, но и на других эндемичных территориях, но данный факт необходимо подтвердить в дальнейших исследованиях.

Исследование выполнялось в рамках Распоряжения Правительства РФ от 22 декабря 2017 г. № 2904-р о Российско-Гвинейском научно-техническом сотрудничестве в области эпидемиологии, профилактики и мониторинга бактериальных

Таблица 3/Table 3

Виды вирусов, использованных для оценки аналитической специфичности
Types of viruses used for analytical specificity evaluation

Вирус	Акроним	Семейство	Род	Тип нуклеиновой кислоты
<i>Zaireebolavirus</i>	EBOV	<i>Filoviridae</i>	<i>Ebolavirus</i>	РНК
<i>Sudanebolavirus</i>	SUDV	<i>Filoviridae</i>	<i>Ebolavirus</i>	РНК
<i>Marburgvirus</i>	MARV	<i>Filoviridae</i>	<i>Marburgvirus</i>	РНК
<i>Tahynavirus</i>	TAHV	<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	РНК
<i>Bataivirus</i>	BATV	<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	РНК
<i>Inkoovirus</i>	INKV	<i>Peribunyaviridae</i>	<i>Orthobunyavirus</i>	РНК
<i>Crimean-Congo hemorrhagic fever virus</i>	CCHFV	<i>Nairoviridae</i>	<i>Orthonairovirus</i>	РНК
<i>Dhorivirus</i>	DHOV	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Thogotovirus</i>	РНК
<i>FluA/H1N3</i>	FLUAV(H1N3)	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenzavirus A</i>	РНК
<i>FluA/H3N2</i>	FLUAV(H3N2)	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenzavirus A</i>	РНК
<i>FluB</i>	FLUBV	<i>Orthomyxoviridae</i>	<i>Influenzavirus B</i>	РНК
<i>Yellowfevervirus</i>	YFV	<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	РНК
<i>WestNilevirus</i>	WNV	<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	РНК
<i>Zikavirus</i>	ZIKV	<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	РНК
<i>Tickborneencephalitisvirus</i>	TBEV	<i>Flaviviridae</i>	<i>Flavivirus</i>	РНК
<i>Sindbisvirus</i>	SNDBV	<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	РНК
<i>Chikungunyavirus</i>	CHIKV	<i>Togaviridae</i>	<i>Alphavirus</i>	РНК
<i>Rubellavirus</i>	RUBV	<i>Togaviridae</i>	<i>Rubivirus</i>	РНК
<i>Kemerovovirus, strain 21/10</i>	KEMV-21/10	<i>Reoviridae</i>	<i>Orbivirus</i>	РНК
<i>Tribecvirus, strain Tr19</i>	TRBV-Tr19	<i>Reoviridae</i>	<i>Orbivirus</i>	РНК
<i>HumanRotavirus A</i>	RVA	<i>Reoviridae</i>	<i>Rotavirus</i>	РНК
<i>Enteric Cytopathic Human Orphanvirus 11</i>	ECHO11	<i>Picornaviridae</i>	<i>Enterovirus</i>	РНК
<i>Humanimmunodeficiencyvirus 1</i>	HIV-1	<i>Retroviridae</i>	<i>Lentivirus</i>	РНК
<i>Rabiesvirus</i>	RABV	<i>Rhabdoviridae</i>	<i>Lyssavirus</i>	РНК
<i>HumanCytomegalovirus 5</i>	HCMV-5	<i>Herpesviridae</i>	<i>Cytomegalovirus</i>	ДНК
<i>Humanparvovirus B19</i>	B19	<i>Parvoviridae</i>	<i>Erythroparvovirus</i>	ДНК
<i>Middle East respiratory syndrome coronavirus</i>	MERS	<i>Coronaviridae</i>	<i>Betacoronavirus</i>	РНК

Таблица 4/Table 4

Образцы биологического материала от *M. natalensis*, использованные для оценки диагностической чувствительности

Biological samples from *M. natalensis*, used for evaluation of diagnostic sensitivity

ID	Источник	Регион	Тип образца	Ct	Результаты предыдущих исследований
21	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	39,1	положительный
38	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	35,6	положительный
39	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	33,4	положительный
40	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	38,9	положительный
44	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	36,4	положительный
50	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	29,7	положительный
81	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	33,3	положительный
110	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	32,9	положительный
Pool2	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	35,9	положительный
103	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	отрицательный	положительный
104	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	отрицательный	отрицательный
105	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	отрицательный	отрицательный
161	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	32,4	положительный
163	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	отрицательный	отрицательный
173	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	отрицательный	отрицательный
174	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	38,0	положительный
175	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	отрицательный	отрицательный
104dl	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	отрицательный	отрицательный
195	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	отрицательный	отрицательный
106	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	34,8	положительный
108	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	отрицательный	отрицательный
109	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	отрицательный	положительный
111	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	отрицательный	отрицательный
107	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	37,2	положительный
99	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	25,4	положительный
63	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	28,0	положительный
65	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	37,2	положительный
94	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Цельная кровь	33,0	положительный
11276	<i>M. natalensis</i>	Mamou	Суспензия органов	22,6	положительный
11102	<i>M. natalensis</i>	Mamou	Суспензия органов	25,2	положительный
11309	<i>M. natalensis</i>	Mamou	Суспензия органов	24,6	положительный
11092	<i>M. natalensis</i>	Mamou	Суспензия органов	21,8	положительный
11095	<i>M. natalensis</i>	Mamou	Суспензия органов	24,7	положительный
11087	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Суспензия органов	24,2	положительный
11269	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Суспензия органов	27,4	положительный
11098	<i>M. natalensis</i>	Faranah	Суспензия органов	22,7	положительный
12356	<i>M. natalensis</i>	Macenta	Суспензия органов	24,9	положительный
13251	<i>M. natalensis</i>	Macenta	Суспензия органов	отрицательный	отрицательный
13252	<i>M. natalensis</i>	Macenta	Суспензия органов	25,0	положительный
13253	<i>M. natalensis</i>	Macenta	Суспензия органов	26,3	положительный
13254	<i>M. natalensis</i>	Macenta	Суспензия органов	отрицательный	отрицательный
13255	<i>M. natalensis</i>	Macenta	Суспензия органов	23,5	положительный
13256	<i>M. natalensis</i>	Macenta	Суспензия органов	21,9	положительный
13257	<i>M. natalensis</i>	Macenta	Суспензия органов	отрицательный	отрицательный
13258	<i>M. natalensis</i>	Macenta	Суспензия органов	25,1	положительный
13259	<i>M. natalensis</i>	Macenta	Суспензия органов	отрицательный	отрицательный
13260	<i>M. natalensis</i>	Macenta	Суспензия органов	25,7	положительный
13261	<i>M. natalensis</i>	Nzerekore	Суспензия органов	25,2	положительный
13262	<i>M. natalensis</i>	Nzerekore	Суспензия органов	отрицательный	отрицательный
13263	<i>M. natalensis</i>	Nzerekore	Суспензия органов	отрицательный	отрицательный
13283	<i>M. natalensis</i>	Nzerekore	Суспензия органов	отрицательный	отрицательный
13284	<i>M. natalensis</i>	Nzerekore	Суспензия органов	отрицательный	отрицательный
13285	<i>M. natalensis</i>	Nzerekore	Суспензия органов	отрицательный	отрицательный
13280	<i>M. natalensis</i>	Nzerekore	Суспензия органов	26,5	положительный
13286	<i>M. natalensis</i>	Nzerekore	Суспензия органов	24,7	положительный

Таблица 5/Table 5

Образцы сывороток крови людей, использованные для оценки аналитической чувствительности метода
Human blood sera samples used for evaluation of analytical sensitivity of the method

ID	Пол	Возраст	Регион	День от начала заболевания	Ct	Подтверждение
2136	F	40	Kankan	4	28,3	положительный
2137	M	60	Kankan	3	35,4	положительный
2140	M	60	Kankan	5	31,8	положительный
2143	F	42	Kankan	5	25,6	положительный
2144	F	61	Kankan	4	33,0	положительный
3334	M	56	Nzerekore	6	отрицательный	отрицательный
3335	M	36	Nzerekore	7	отрицательный	отрицательный
3336	M	36	Nzerekore	10	39,2	положительный
3337	F	61	Nzerekore	4	34,2	положительный
3338	M	40	Nzerekore	6	отрицательный	отрицательный
3339	M	55	Nzerekore	2	36,9	положительный
3340	M	28	Nzerekore	5	отрицательный	отрицательный
3341	M	28	Nzerekore	6	отрицательный	отрицательный
3342	F	7	Mamou	4	28,3	положительный
3343	M	60	Mamou	3	30,8	положительный
3344	M	7	Mamou	5	27,6	положительный
3345	F	7	Mamou	6	24,3	положительный
3346	M	11	Mamou	7	отрицательный	отрицательный
3347	M	39	Kindia	8	отрицательный	отрицательный
3348	M	32	Kindia	4	отрицательный	отрицательный
3349	M	39	Kindia	3	отрицательный	отрицательный
3350	F	36	Mamou	7	отрицательный	отрицательный
3351	F	25	Kankan	10	38,9	положительный
3352	F	n/a	Kankan	3	отрицательный	отрицательный
3358	M	18	Faranah	5	25,9	положительный
3367	M	23	Faranah	4	36,4	положительный
3369	M	43	Faranah	3	28,6	положительный
3372	M	24	Faranah	5	отрицательный	отрицательный
3373	M	15	Faranah	3	отрицательный	отрицательный
3375	M	23	Faranah	5	27,9	положительный
3378	F	n/a	Faranah	6	26,2	положительный
3391	M	n/a	Faranah	8	отрицательный	отрицательный
3392	M	n/a	Mamou	6	отрицательный	отрицательный
3394	F	26	Mamou	9	отрицательный	отрицательный
3396	F	35	Mamou	11	отрицательный	отрицательный
3398	M	37	Mamou	4	отрицательный	отрицательный
3400	M	41	Mamou	5	отрицательный	отрицательный

и вирусных инфекций в Гвинейской Республике (2018–2020 гг.).

Благодарности. Авторский коллектив выражает свою благодарность Е. Фишет-Кальвет (Институт тропической медицины им. Бернхарда Нохта, Гамбург, Германия) за предоставление данных и образцов, вошедших в исследование.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта финансовых/нефинансовых интересов, связанных с написанием статьи.

Список литературы / References

1. Virus taxonomy: the classification and nomenclature of viruses: the online (10th) report of the ICTV. [Internet]. (cited 03 Oct 2018). Available from: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/.
2. Ogbu O., Ajuluchukwu E., Uneke C.J. Lassa fever in West African sub-region: an overview. *J. Vector Borne Dis.* 2007; 44(1):1–11. PMID: 17378212.
3. Safronetz D., Lopez J.E., Sogoba N., Traore S.F., Raffel S.J., Fischer E.R., Ebihara H., Branco L., Garry R.F., Schwan T.G., Feldmann H. Detection of Lassa virus, Mali. *Emerg. Infect. Dis.* 2010; 16(7):1123–6. DOI: 10.3201/eid1607.100146.
4. Ajayi N.A., Nwigwe C.G., Azuogu B.N., Onyire B.N., Nwonwu E.U., Ogbonnaya L.U., Onwe F.I., Ekaete T., Günther

- S., Ukwaja K.N. Containing a Lassa fever epidemic in a resource-limited setting: outbreak description and lessons learned from Abakaliki, Nigeria (January–March 2012). *Int. J. Infect. Dis.* 2013; 17(11):e1011–6. DOI: 10.1016/j.ijid.2013.05.015.
5. Keenlyside R.A., McCormick J.B., Webb P.A., Smith E., Elliott L., Johnson K.M. Case-control study of *Mastomys natalensis* and humans in Lassa virus-infected households in Sierra Leone. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1983; 32: 829–37.
6. Monath T.P., Newhouse V.F., Kemp G.E., Setzer H.W., Cacciapuoti A. Lassa virus isolation from *Mastomys natalensis* rodents during an epidemic in Sierra Leone. *Science*. 1974; 185:263–5. PMID: 4833828.
7. Safronetz D., Sogoba N., Lopez J.E., Maiga O., Dahlstrom E., Zivcec M., Feldmann F., Haddock E., Fischer R.J., Anderson J.M., Munster V.J., Branco L., Garry R., Porcella S.F., Schwan T.G., Feldmann H. Geographic distribution and genetic characterization of Lassa virus in sub-Saharan Mali. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2013; 7(12):e2582. DOI: 10.1371/journal.pntd.0002582.
8. Richmond J.K., Baglote D.J. Lassa fever: epidemiology, clinical features, and social consequences. *BMJ*. 2003; 327(7426):1271–5. DOI: 10.1136/bmj.327.7426.1271.
9. Monath T.P., Mertens P.E., Patton R., Moser C.R., Baum J.J., Pinneo L., Gary G.W., Kissling R.E. A hospital epidemic of Lassa fever in Zorzor, Liberia, March–April 1972. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1973; 22(6):773–9. DOI: 10.4269/ajtmh.1973.22.773.
10. Macher A.M., Wolfe M.S. Historical Lassa fever reports and 30-year clinical update. *Emerg. Infect. Dis.* 2006; 12:835–7. DOI: 10.3201/eid1205.050052.
11. Asogun D.A., Adomeh D.I., Ehimuan J., Odiya I., Hass M., Gabriel M., Olschlager S., Becker-Ziaja B., Folarin O., Phelan E., Ehiane P.E., Ifeh V.E., Uyiye E.A., Oladapo Y.T., Mueobonam E.B., Osunde O., Dongo A., Okokhere P.O., Okogbenin S.A., Momoh M., Alikah S.O., Akhuemokhan O.C., Imomoh P., Odike M.A., Gire S., Andersen K., Sabeti P.C., Hapji C.T., Akpede G.O., Günther S. Molecular diagnostics for Lassa fever at Irrua specialist teaching hospital, Nigeria: lessons learnt from two years of laboratory operation. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2012; 6(9):e1839. DOI: 10.1371/journal.pntd.0001839.
12. Olschlager S., Lelke M., Emmerich P., Panning M., Drosten C., Hass M., Asogun D., Ehichioya D., Omilabu S., Günther S. Improved Detection of Lassa Virus by Reverse Transcription-PCR Targeting the 5' Region of S RNA. *J. Clin. Microbiol.* 2010; 48(6):2009–13. DOI: 10.1128/JCM.02351-09.
13. Tyagi S., Kramer F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat Biotechnol.* 1996; 14:303–8. DOI: 10.1038/nbt0396-303.
14. Van Pelt-Verkuil E., van Belkum A., Hays J.P. Principles and technical aspects of PCR amplification. NY: Springer Science; 2008. 332 p. DOI: 10.1007/978-1-4020-6241-4.
15. Kibbe WA. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic Acids Res.* 2007; 35(Suppl. 2):W43–46. DOI: 10.1093/nar/gkm234.
16. Dedkov V.G., Magassouba N.F., Safonova M.V., et al. 2016. Development and evaluation of a real-time RT-PCR assay for the detection of Ebola virus (Zaire) during an Ebola outbreak in Guinea in 2014–2015. *J. Virol. Methods.* 2016; 228:26–30. DOI:10.1016/j.jviromet.2015.11.007.
17. Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular cloning, a laboratory manual. Cold Spring Harbor laboratory. 2-ed. Cold Spring Harbor Lab. Press; 1989. 1885 p.
18. Cheng Y., Niu J., Zhang Y., Huang J., Li Q. Preparation of his-tagged armored RNA phage particles as a control for real-time reverse transcription-PCR detection of severe acute respiratory syndrome coronavirus. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44(10):3557–61. DOI: 10.1128/JCM.00713-06.
19. Pasloske B.L., Walkerpeach C.R., Obermoeller R.D., Winkler M., Du Bois D.B. Armored RNA technology for production of ribonuclease-resistant viral RNA controls and standards. *J. Clin. Microbiol.* 1998; 36(12):3590–4. PMID: 9817878.
20. Cherpillod P., Schibler M., Vieille G., Cordey S., Mamin A., Vetter P., Kaiser L. Ebola virus disease diagnosis by real-time RT-PCR: a comparative study of 11 different procedures. *J. Clin. Virol.* 2016; (77):9–14. DOI: 10.1016/j.jcv.2016.01.017.
21. Newcombe R.G. Two-Sided Confidence Intervals for the Single Proportion: Comparison of Seven Methods. *Statistics in Medicine.* 1998; 17:857–72.
22. Wilson E.B. Probable Inference, the Law of Succession, and Statistical Inference. *Journal of the American Statistical Association.* 1927; 22:209–12. DOI: 10.1080/01621459.1927.10502953.
23. Bausch D.G., Rollin P.E., Demby A.H., Coulbaly M., Kanu J., Conteh A.S., Wagoner K.D., McMullan L.K., Bowen M.D., Peters C.J., Ksiazek T.G. Diagnosis and clinical virology of Lassa fever as evaluated by enzyme-linked immunosorbent assay, indirect fluorescent-antibody test, and virus isolation. *J. Clin. Microbiol.* 2000; 38(7):2670–77.
24. Niklasson B.S., Jahrling P.B., Peters C.J. Detection of Lassa virus antigens and Lassa-virus-specific immunoglobulins G and M by enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 1984; 20(2):239–44. PMID: 6386846.
25. Jahrling P.B., Niklasson B.S., McCormick J.B. Early diagnosis of human Lassa fever by ELISA detection of antigen and antibody. *Lancet.* 1985; 1(8423):250–2. PMID: 2857321.
26. Günther S., Lenz O. Lassa Virus. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2004; 41(4):339–90. DOI: 10.1080/10408360490497456.
27. Drosten C., Götting S., Schilling S., Asper M., Panning M., Schmitz H., Günther S. Rapid detection and quantification of RNA of Ebola and Marburg viruses, Lassa virus, Crimean–Congo hemorrhagic fever virus, Rift valley fever virus, dengue virus, and yellow fever virus by real-time reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2002; 40:2323–30. DOI: 10.1128/JCM.40.7.2323-2330.2002.
28. Trappier S.G., Conaty A.L., Farrar B.B., Auperin D.D., McCormick J.B., Fisher-Hoch S.P. Evaluation of the polymerase chain reaction for diagnosis of Lassa virus infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 1993; 49(2):214–21. PMID: 8357084.
29. Demby A.H., Chamberlain J., Brown D.W., Clegg C.S. Early diagnosis of Lassa fever by reverse transcription-PCR. *J. Clin. Microbiol.* 1994; 32:2898–903. PMID: 7883875.
30. Trombley A.R., Wachter L., Garrison J., Buckley-Beason V.A., Jahrling J., Hensley L.E., Schoep R.J., Norwood D.A., Goba A., Fair J.N., Kulesh D.A. Comprehensive Panel of Real-Time TaqMan™ Polymerase Chain Reaction Assays for Detection and Absolute Quantification of Filoviruses, Arenaviruses, and New World Hantaviruses. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2010; 82(5):954–60. DOI: 10.4269/ajtmh.2010.09-0636.
31. Bowen M.D., Rollin P.E., Ksiazek T.G., Hustad H.L., Bausch D.G., Demby A.H., Bajani M.D., Peters C.J., Nichol S.T. Genetic Diversity among Lassa Virus Strains. *J. Virol.* 2000; 74(15):6992–7004. PMID: 10888638.
32. Poch O., Blumberg B.M., Bougueleret L., Tordo N. Sequence comparison of five polymerases (L proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: Theoretical assignment of functional domains. *J. Gen. Virol.* 1990; 71:1153–62. DOI: 10.1099/0022-1317-71-5-1153.
33. Poch O., Sauvaget I., Delarue M., Tordo N. Identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* 1989; 8:3867–74.

Authors:

Dedkov V.G. Saint-Petersburg Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology. 14, Mira St., Saint-Petersburg, 197101, Russian Federation.
 Safonova M.V. Plague Control Center. 4, Musorgskogo St., Moscow, 127490, Russian Federation. E-mail: protivochym@nlm.ru.
 Naidenova E.V., Kritsky A.A. Russian Research Anti-Plague Institute “Microbe”. 46, Universitetskaya St., Saratov, 410005, Russian Federation. E-mail: rusrapi@microbe.ru.
 Magassouba N.F., Soropogui B., Kourouma F., Camara A.B., Camara J. Gamal Abdel Nasser University. Conakry, Republic of Guinea.
 Ayginin A.A., Maleev V.V. Central Research Institute of Epidemiology. 3a, Novogireevskaya St., Moscow, 111123, Russian Federation. E-mail: cri@pcr.ru.
 Shchelkanov M.Yu. Far East Federal University. Vladivostok, Russian Federation.

Об авторах:

Дедков В.Г. Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Российская Федерация, 197101, Санкт-Петербург, ул. Мира, д. 14. E-mail: vgdedkov@yandex.ru
 Сафонова М.В. Противочумный центр. Российская Федерация, 127490, Москва, ул. Мусоргского, 4. E-mail: protivochym@nlm.ru.
 Найденова Е.В., Крицкий А.А. Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб». Российская Федерация, 410005, Саратов, ул. Университетская, 46. E-mail: rusrapi@microbe.ru.
 Magassouba N.F., Soropogui B., Kourouma F., Camara A.B., Camara J. Университет им. Гамаль Абдель Насера. Гвинейская Республика, Конакри.
 Айгинин А.А., Малеев В.В. Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии. Российская Федерация, 111123, Москва, ул. Новогиреевская, 3а. E-mail: cri@pcr.ru.
 Шелканов М.Ю. Дальневосточный Федеральный университет. Российская Федерация, Владивосток.

Поступила 02.12.18.

Принята к публ. 10.12.18.