

В ПОМОЩЬ ВИРУСОЛОГУ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2016

УДК 578.824.11.083.2

Дедков В.Г.^{1,2}, Девяткин А.А.¹⁻³, Полещук Е.М.⁴, Сафонова М.В.^{1,3}, Маркелов М.Л.², Шипулин Г.А.¹

РАЗРАБОТКА И АПРОБАЦИЯ НАБОРА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ОПРЕДЕЛЕНИЯ РНК КЛАССИЧЕСКОГО ВИРУСА БЕШЕНСТВА МЕТОДОМ ОТ-ПЦР В РЕАЛЬНОМ ВРЕМЕНИ

¹ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва;

²ФГБНУ «НИИ медицины труда», 105275, г. Москва;

³ФГБУ «Институт полиомиелита и вирусных энцефалитов им. М.П. Чумакова», 142783, г. Москва;

⁴ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, 644080, г. Омск

С целью повышения эффективности лабораторной диагностики бешенства и оптимизации надзорных мероприятий разработан набор реагентов для выявления РНК вируса бешенства методом обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции с гибридизационно-флюоресцентной детекцией. Аналитическая чувствительность разработанного набора составила $4 \cdot 10^3$ копий РНК в 1 мл. Высокая специфичность набора реагентов показана на репрезентативной выборке образцов, содержащих генетический материал родственных вирусов, и на образцах, содержащих мозговую ткань разных видов млекопитающих.

Ключевые слова: вирус бешенства; диагностика; ОТ-ПЦР в реальном времени.

Для цитирования: Дедков В.Г., Девяткин А.А., Полещук Е.М., Сафонова М.В., Маркелов М.Л., Шипулин Г.А. Разработка и апробация набора реагентов для определения РНК классического вируса бешенства методом ОТ-ПЦР в реальном времени. *Вопросы вирусологии*. 2016; 61(4): 235-240.

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-4-235-240

Dedkov V.G.^{1,2}, Deviatkin A.A.^{1,2,3}, Poleschuk E.M.⁴, Safonova M.V.^{1,3}, Markelov M.L.², Shipulin G.A.¹

DEVELOPMENT AND EVALUATION OF THE RT-PCR KIT FOR THE RABIES VIRUS DIAGNOSIS

¹Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, 111123, Russian Federation;

²Institute of Occupational Health, Moscow, 105275, Russian Federation;

³Chumakov Institute of Poliomyelitis and Viral Encephalitis, Moscow, 142783, Russian Federation;

⁴Omsk Research Institute of Natural Foci Infections, Omsk, 644080, Russian Federation

To improve the diagnosis, surveillance, and control for the rabies virus, a kit for hybridization-triggered fluorescence detection of rabies virus DNA by the RT-PCR technique was developed and evaluated. The analytical sensitivity of the kit was $4 \cdot 10^3$ GE per ml. High specificity of the kit was shown using representative sampling of viral, bacterial, and human nucleic acids.

Key words: Rabies virus; diagnosis; RT-PCR.

For citation: Dedkov V.G., Deviatkin A.A., Poleschuk E.M., Safonova M.V., Markelov M.L., Shipulin G.A. Development and evaluation of the RT-PCR kit for the rabies virus diagnosis. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2016; 61(5): 235-240. (In Russ.).

DOI: 10.18821/0507-4088-2016-61-5-235-240

For correspondence: Vladimir G. Dedkov, Scientific researcher, Branch of genetic engineering and biotechnology, Central Research Institute for Epidemiology, Moscow, Russian Federation. E-mail: vgdedkov@yandex.ru

Funding. The study had no sponsorship.

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

Received 04 November 2015

Accepted 26 January 2016

Введение

Классический вирус бешенства *Rabies virus* (RABV) — нейротропный РНК(-) содержащий вирус, принадлежит к роду *Lyssavirus* семейства *Rhabdoviridae*. Помимо классического вируса бешенства род *Lyssavirus* включает следующие виды: лиссавирус австралийских летучих мышей (ABLV), лиссавирусы европейских летучих мышей типов 1 и 2 (EBL1, 2), вирус Худжанд (KHUV), вирус

Араван (ARAV), вирус Иркут (IRKV), вирус Дувенхаре (DUVV), вирус летучих мышей Лагос (LBV), вирус Моккола (MOKV), западнокавказский вирус летучих мышей (WCBV), вирус летучих мышей Шимони (SHIBV) [1].

Все лиссавирусы являются нейротропными инфекционными агентами, вызывающими необратимые поражения головного мозга человека и теплокровных животных — бешенство. Однако наибольшее эпиде-

Для корреспонденции: Дедков Владимир Георгиевич, науч. сотр. группы генной инженерии и биотехнологии ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва. E-mail: vgdedkov@yandex.ru

миологическое и эпизоотологическое значение имеет классический вирус RABV, поскольку является этиологическим агентом подавляющего большинства случаев бешенства, зарегистрированных у животных и человека. Прочие лиссавирусы имеют ограниченные ареалы распространения и ограниченный круг хозяев, в большинстве случаев это летучие мыши. Поэтому инфицирование человека происходит очень редко.

Бешенство относится к зоонозным заболеваниям с контактным механизмом передачи возбудителя. Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в сфере эпидемиологического надзора и профилактики [2], случаи заболевания бешенством ежегодно регистрируются на всех континентах за исключением Антарктиды [3]. Так, на территории Российской Федерации в период 2007—2011 гг. зарегистрировали 22 264 случая бешенства животных и 67 случаев бешенства людей [4, 5].

В настоящее время в РФ при лабораторной диагностике бешенства исследуют аутопсийный материал, преимущественно методом флуоресцирующих антител (МФА). В случае отрицательного или сомнительного результата МФА используют вспомогательные способы диагностики заболевания: метод выделения вируса бешенства на животных (белые мыши) или в культуре клеток, иммуноферментный анализ (ИФА), реакцию диффузионной преципитации [6, 7]. Прижизненная диагностика бешенства не практикуется. Данный подход находится в полном соответствии с существующими рекомендациями ВОЗ по лабораторной диагностике бешенства [8]. В рамках данных рекомендаций молекулярные методы диагностики играют вспомогательную роль. Однако использование этих методов, на наш взгляд, имеет большие перспективы, что обусловлено их высокой чувствительностью и специфичностью, а также простотой выполнения и интерпретации результатов в сравнении с большинством применяемых в настоящее время методов. Основанием для такого утверждения является и наш собственный опыт ретроспективной диагностики двух случаев бешенства у пациентов из Астраханской области, погибших в 2003 г. от энцефалита неясной этиологии [9].

Цель работы — создание набора реагентов для выявления РНК RABV методом обратнотранскриптазной полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР) в реальном времени.

Материал и методы

Биологический материал. В работе использован материал 31 штамма RABV, 8 из них были охарактеризованы количественно. Штаммы изолированы из источников, собранных в период 2008—2012 гг., в том числе от диких ($n = 17$), домашних ($n = 4$) и сельскохозяйственных ($n = 10$) животных на территориях Ненецкого автономного округа ($n = 3$), Республики Дагестан ($n = 4$), Республики Тыва ($n = 4$), Республики Хакасия ($n = 2$), Воронежской ($n = 1$), Тверской ($n = 2$), Омской ($n = 6$), Новосибирской ($n = 3$), Липецкой ($n = 2$) областей, Алтайского края ($n = 2$), Красноярского края ($n = 2$). Также использованы 25 образцов первичного положительного по бешенству материала, 23 образца первичного отрицательного по бешенству материала, а также нуклеиновые кислоты следующих вирусов и млекопитающих: семейства *Rhabdoviridae* (вирус Араван, вирус Худжанд), семейства *Bunyaviridae* (вирус Тягиня, вирус Багаи, вирус Дхори, вирус крымской геморрагической лихорадки, вирус Инкоо), семейства *Reoviridae* (вирус Кемерово,

ротавирус), семейства *Togaviridae* (вирус Чикунгунья, вирус Синдбис, вирус краснухи), семейства *Flaviviridae* (вирус желтой лихорадки, вирус лихорадки Западного Нила, вирус клещевого энцефалита), семейства *Picornaviridae* (энтеровирус ЕСНО-71), семейства *Retroviridae* (вирус иммунодефицита человека), ДНК из тканей головного мозга мыши, собаки, кошки, человека. Штаммы RABV, РНК вирусов семейства *Rhabdoviridae* и первичный материал являются частью рабочей коллекции лиссавирусов ФБУН «Омский НИИ природно-очаговых инфекций» Роспотребнадзора, прочие образцы вирусной РНК, а также образцы мозговой ткани различных животных — частью коллекции ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора.

Дизайн олигонуклеотидов. Геном RABV составляет около 12 000 нуклеотидных оснований (н. о.) и включает 5 последовательно расположенных генов 3'-N-P-M-G-L-5' (N — нуклеопротеин, G — гликопротеин, P — фосфопротеин, M — матриксный белок, L — РНК-зависимая РНК-полимераза), кодирующих соответственно 5 белков и лидерную РНК длиной 50 н. о. Гены разделены некодирующими областями [1]. При этом ген N является наиболее консервативной частью генома RABV [10]. В связи с этим обстоятельством выбор таргетной области для амплификации и детекции RABV осуществляли в пределах последовательности N-гена.

Дизайн праймеров и зонда осуществляли с учетом общих требований, предъявляемых к олигонуклеотидным праймерам и зондам типа TaqMan при проектировании тест-систем в формате ПЦР в реальном времени [11—13]. Оценку температуры плавления праймеров рассчитывали при помощи программы *Oligonucleotide Properties Calculator* [14]. Термодинамические характеристики зонда и возможность образования вторичных структур оценивали с помощью программ *Oligonucleotide Properties Calculator* и *MFOLD* [16].

Выделение РНК и обратная транскрипция. Вирусную РНК выделяли с использованием набора РИБО-золь С (ЦНИИЭ, Москва) в соответствии с рекомендациями производителя.

Реакцию обратной транскрипции проводили при помощи набора реагентов для обратной транскрипции Реверта-Л (ЦНИИЭ, Москва) в соответствии с рекомендациями производителя.

Определение нуклеотидных последовательностей N-гена. Для определения первичных нуклеотидных последовательностей N-гена амплифицировали по 2 перекрывающихся фрагмента (область перекрытия 76 пар оснований (п. о.)), полученных с помощью двух пар праймеров (табл. 1), в 25 мкл реакционной смеси, содержащей 10 мкл ПЦР-смеси-2-blue (ЦНИИЭ, Москва), по 0,4 мкМ прямого и обратного праймеров, 2,5 мкл дНТФ (1,76 мМ; ЦНИИЭ, Москва), 2 мкл кДНК RABV.

ПЦР выполняли с использованием «горячего старта» на приборе Терцик («ДНК-технология», Россия) в следующем режиме: 95 °С — 2 мин, 95 °С — 15 с, 57 °С — 25 с, 72 °С — 10 с — 40 циклов; 72 °С — 3 мин.

Наличие ПЦР-продукта необходимой длины контролировали электрофоретическим методом в 1,5% агарозном геле с добавлением бромистого этидия. Очистку ампликонов проводили с помощью набора реагентов QIAquick PCR Purification Kit («Qiagen», Германия). Очищенный ПЦР-продукт секвенировали на приборе для автоматического капиллярного секвенирования ABI PRISM 3500 («Applied Biosystems», США).

Таблица 1

Олигонуклеотиды, использованные для амплификации и последующего секвенирования фрагментов генома RABV

Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Позиция референсного сиквенса, н. т. JQ944704 (GeneBank NCBI)	Длина ампликона, п. о.
Rab1f	ACGCTTAACAACAAAATCATAGAAG	1—25	709
Rab1r	AACATGTCGTAGGTTCCGGC	689—708	
Rab2f	ATGACAACCTCACAAAATGTGYGC	632—653	905
Rab2r	GGATTGACGAAGATCTTGCTCAT	1514—1536	

Построения выравнивания первичных нуклеотидных последовательностей N-гена 23 штаммов RABV осуществляли с помощью пакета программ CLC Main Workbench 5 («Qiagen», Германия).

Положительные контрольные образцы. В качестве положительного контрольного образца (ПКО) ПЦР (К+) использовали участок кДНК N-гена RABV (штамм 8202л_Омская_2013) (905 п. о.), включающий фрагмент, являющийся мишенью для праймеров и зонда. Для этого соответствующий ПЦР-продукт очищали с помощью набора MiniElute Gel Extraction Kit («Qiagen», Германия), лигировали в плазмидный вектор pGEM-T («Promega», США) под контролем промотора T7 РНК-полимеразы и трансформировали им *Escherichia coli* (штамм XL1 blue) [15]. Рекombinantные плазмиды из индивидуальных клонов очищали с помощью набора Plasmid Miniprep Kit («Ахуген») и проверяли их на наличие и отсутствие мутаций в области посадки праймеров и зонда. Проверку осуществляли методом Сэнгера с помощью прибора автоматического капиллярного секвенирования ABI-Prism 3500 XL («Applied Biosystems», США).

Плазмиды после измерения концентрации и разведения использовали в качестве ПКО ПЦР (К+), а также

для получения рекомбинантной РНК на основе MS2-фага в защитной белковой оболочке [16, 17]. Полученный продукт обрабатывали ДНКазой-I («Fermentas», Латвия) для удаления остатков ДНК, измеряли концентрацию, разбавляли в стабилизирующем растворе RNA Later («Life Technologies», США) и использовали далее в качестве положительного защищенного РНК-контроля (ПКО). Отсутствие в препарате ПКО остаточной ДНК после обработки контролировали с помощью специфических праймеров и зонда в ходе проведения ПЦР в реальном времени (без стадии обратной транскрипции). Концентрацию положительного контроля ПЦР (К+) и рекомбинантного контроля (ПКО) измеряли на приборе QX100 system («Bio-Rad») с помощью наборов PCR Supermix for Probes Kit («Bio-Rad»), One-step ddPCR Supermix for Probes Kit («Bio-Rad») и специфических праймеров и зонда (табл. 2).

Внутренний контрольный образец. Для оценки эффективности выделения РНК из биологического материала в состав набора реагентов включили экзогенный внутренний контрольный образец (ВКО) STI-87гес (ЦНИИЭ, Москва), представляющий собой искусственную последовательность РНК в защитной белковой оболочке на основе MS2-фага длиной 150 н. т. с GC-составом около 50%.

Состав реакционной смеси и режим амплификации. ОТ-ПЦР в реальном времени проводили в объеме 25 мкл. Реакционная смесь содержала следующие компоненты: 10 мкл РНК-пробы, по 0,2 мМ праймеров и зонда Rt_Rab-2f_Neuer, Rt_Rab-2r_Neu, Rt_Rab-z2_neu, по 0,2 мМ праймеров и зонда для детекции STI-87гес, 2,5 мкл дНТФ (1,76 мМ; ЦНИИЭ, Москва), 5 мкл смеси RT-PCR mix2 FER/FRT (ЦНИИЭ, Москва), 0,25 мкл MMLV-ревертазы (ЦНИИЭ, Москва), 0,25 мкл RTG-mix2 (ЦНИИЭ, Москва) и 0,5 мкл TaqF-полимеразы (ЦНИИЭ, Москва). Реакцию выполняли в приборе для ПЦР в реальном вре-

Таблица 2

Структура и основные характеристики праймеров и зонда, используемых в наборе реагентов для диагностики бешенства

Название праймера	Нуклеотидная последовательность, 5'-3'	Позиция референсного сиквенса, н. т. JQ944704 (GeneBank NCBI)	Длина ампликона, п. о.
Rt_Rab-2f_Neuer	AAGAACTTTGAGGAAGAGATAAGAAG	857—882	140
Rt_Rab-z2_neu	R6G-AGGAGACAGCTGTTCTCACTCCTAT-BHQ1	900—925	
Rt_Rab-2r_Neu	AACACATGACCAACRCGATTCGAT	973—997	

Таблица 3

Характеристика штаммов RABV, использованных для определения аналитической чувствительности

Штамм	Год изоляции	Регион изоляции	Источник	Количество частиц в 1 LD ₅₀ /мл	Аналитическая чувствительность, LD ₅₀ /мл	Аналитическая чувствительность, копии ПКО в 1 мл
8202л_Омская_2013	2013	Омская область	Лисица	43 165	0,1	4317
8247ен.соб._Омская_2013	2013	То же	Енотовидная собака	2760	1,0	2760
8300ен.соб._Омская_2013	2013	" "	То же	32150	0,1	3215
8313л_Омская_2013	2013	" "	Лисица	11515	0,1	1152
8315крс_Новосибирская_2013	2013	Новосибирская область	Крупный рогатый скот	5960	0,1	596
8317л_Новосибирская_2013	2013	То же	Лисица	2970	1,0	2970
8318л_Новосибирская_2013	2013	" "	" "	58945	0,1	5895
1п8202л_Омская_2013	2013	Омская область	" "	41595	0,1	4160

Таблица 4

Образцы биологического материала, содержащего RABV

Изолят	Год изоляции	Регион изоляции	Источник изоляции	Пороговый уровень, Ct
7985	2011	Республика Якутия	Северный олень	22,0
8202	2013	Омская область	Лисица	23,5
7496	2008	НАО	Северный олень	22,6
7511	2008	Воронежская область	Лисица	17,8
7551	2008	Белгородская область	" "	15,4
7555	2008	Тюменская область	Северный олень	18,7
7557	2008	То же	Песец	19,1
7558	2008	Республика Дагестан	КРС	16,5
7559	2008	То же	Собака	17,5
7560	2008	" "	Кошка	12,2
7561	2008	" "	Собака	17,7
7576	2008	Тверская область	Енотовидная собака	17,8
7941	2008	Красноярский край	Лисица	15,3
7990	2011	Республика Якутия	Песец	28,3
8093	2011	Республика Тыва	Верблюд	15,8
8300	2013	Омская область	Енотовидная собака	26,6
828 Л 816	1989	Воронежская область	Лисица	22,4
8247	2013	Омская область	Енотовидная собака	14,0
8313	2013	То же	Лисица	16,6
8315	2013	Новосибирская область	КРС	23,4
8317	2013	То же	Лисица	22,3
8318	2013	" "	" "	21,2
1п8202	2013	Омская область	" "	13,3
8229Н	2003	Астраханская область	Человек	33,9
8330Н	2003	То же	" "	29,4

Примечание. НАО — Ненецкий автономный округ; КРС — крупный рогатый скот.

мени Rotor Gene 6000 («Qiagen», Germany) в следующем режиме: 50°C — 15 мин; 95°C — 15 мин; 95°C — 10 с, 57°C — 25 с, 72°C — 10 с; n = 45. Детекцию проводили при 57°C на канале Yellow (для специфического сигнала) и Green (для сигнала внутреннего контроля). Пороговую линию флуоресценции устанавливали в середине линейного участка прироста значения флуоресценции положительного контроля, выраженного в логарифмических единицах. Результаты амплификации интерпретировали как положительные, если наблюдали пересечение кривой флуоресценции с установленной на соответствующем уровне пороговой линией.

Аналитическая чувствительность и специфичность. Для оценки аналитической чувствительности готовили с 10-кратным шагом разведения ПКО известной концентрации на плазме от здоровых людей, выделяли и исследовали с помощью разработанной диагностической системы для выявления минимального порогового разведения, при котором образец детектируется как положительный. Порог чувствительности устанавливали по минимальному разведению, детектированному в трех повторах.

Аналитическую чувствительность оценивали с помощью 8 штаммов RABV с известной концентрацией, рассчитанной по методу Рида и Менча в единицах LD₅₀/мл [18]. Порог чувствительности устанавливали по минимальному разведению, детектированному в трех повторах. Соответствие LD₅₀/мл количеству копий защищенного контроля устанавливали в количественной ОТ-ПЦР (табл. 3). В качестве калибраторов использовали разведения препарата ПКО известной концентрации.

Аналитическую специфичность диагностической системы оценивали с помощью РНК 23 штаммов RABV, РНК из высокотитражных культур 17 видов других вирусов, а также ДНК из мозговой ткани животных и человека.

Диагностическая чувствительность и специфичность. Диагностическую чувствительность и специфичность оценивали на выборке первичного материала (мозговые суспензии) от инфицированных вирусом

Таблица 5

Образцы биологического материала, отрицательного по RABV

Образец	Год получения материала	Регион изоляции	Источник выделения
8215	2013	Омская область	Норка
8217	2013	То же	" "
8218	2013	" "	" "
8220	2013	" "	" "
8221	2013	" "	" "
8222	2013	" "	" "
8224	2013	" "	Енотовидная собака
8225	2013	" "	Лисица
8226	2013	" "	" "
8229	2013	" "	Енотовидная собака
8230	2013	" "	" "
8233	2013	" "	Лисица
8234	2013	" "	" "
8235	2013	" "	" "
8236	2013	" "	" "
8237	2013	" "	" "
8238	2013	" "	" "
8239	2013	" "	" "
8241	2013	" "	" "
8270	2013	" "	Соболь
8271	2013	" "	Куница
8316	2013	Новосибирск	Собака

Таблица 6

Определение аналитической чувствительности с помощью штаммов известной концентрации

Штамм	10 LD ₅₀ /1 мл			1 LD ₅₀ /1 мл			0,1 LD ₅₀ /мл		
8202л_Омская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8247ен.соб._Омская_2013	+	+	+	+	+	+	+	-	-
8300ен.соб._Омская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8313л_Омская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8315крс_Новосибирская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8317л_Новосибирская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	-
8318л_Новосибирская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1п8202л_Омская_2013	+	+	+	+	+	+	+	+	+

бешенства животных и человека ($n = 25$; табл. 4) и от животных, у которых вирус бешенства не был обнаружен ($n = 22$; табл. 5). Все образцы предварительно были исследованы при помощи МФА.

Результаты

В результате секвенирования получены первичные нуклеотидные последовательности N-гена 23 штаммов RABV, выделенных на различных территориях РФ. На основании полученных сиквенсов, а также данных о последовательностях N-гена, представленных в GeneBank ранее, построено выравнивание, для которого определены участки наибольшей консервативности, и осуществлен дизайн олигонуклеотидных праймеров и зонда для выявления РНК RABV (см. табл. 2). Аналитическая чувствительность, оцененная при помощи разведений ПКО, составила $4 \cdot 10^3$ копий ПКО в 1 мл. Чувствительность, измеренная с помощью 8 охарактеризованных штаммов, представлена в табл. 3, 6.

При исследовании аналитической специфичности ложноположительных и ложноотрицательных результатов зафиксировано не было.

Обсуждение

Как упоминалось выше, общепринятым методом диагностики бешенства является МФА. Однако данный метод имеет ряд недостатков, основной из которых — зависимость его чувствительности от времени, прошедшего между забором материала и проведением анализа. Кроме того, на результаты МФА влияют профессиональные навыки исследователя, качество конъюгата и люминесцентного микроскопа. По данным сравнительного анализа диагностическая чувствительность МФА и ОТ-ПЦР в реальном времени сравнимы только в случае проведения анализа *ex tempore*. В противном случае диагностическая чувствительность ОТ-ПЦР в реальном времени существенно выше и составляет от 10^2 до 10^4 копий в 1 мл для разных штаммов [19]. Исследования зарубежных ученых, направленные на оценку молекулярных методов для диагностики бешенства, неоднократно демонстрировали их перспективность, особенно в формате ОТ-ПЦР в реальном времени. В частности, продемонстрирована способность выявлять РНК 67 изолятов RABV, циркулировавших на территории Северной Америки. При этом среднее пороговое значение флуоресценции Ct для тестируемых образцов составило 16,4 [19].

Совпадение данных, получаемых при помощи МФА, и данных ОТ-ПЦР в реальном времени показано на примере исследования 5 образцов от больных бешенством животных в Бразилии [20]. В то же время в сравнительных испытаниях 14 тест-систем для выявления РНК RABV и других лиссавирусов, проведенных в 16 европейских лабораториях на панели образцов, разработанной в институте Фридриха Лефлера (Германия), показано, что ни одна тест-система не способна выявлять все генетические варианты RABV, представленные в панели [21].

Таким образом, внедрению метода ОТ-ПЦР в реальном времени в качестве основного мешает как отсутствие зарегистрированных наборов реагентов, так и нерешенные вопросы диагностической чувствительности при использовании такого подхода. В частности, отсутствуют данные о диагностических характеристиках тестов при выявлении различных штаммов RABV. В последние годы на отечественном рынке появился ряд наборов в формате ОТ-ПЦР в реальном времени, позволяющих выявлять РНК RABV. Однако данные системы не имеют удостоверений о государственной регистрации, и их диагностическая ценность не определена.

В результате проделанной работы была создана диагностическая система в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления классического RABV, предназначенная для выявления штаммов, циркулирующих на территории РФ. При оценке аналитической чувствительности на выборке из 8 штаммов известной концентрации установлено, что ее значение составляет от $6 \cdot 10^3$ до $6 \cdot 10^2$ копий в 1 мл для различных штаммов. Таким образом, аналитическая чувствительность для различных штаммов различается в 10 раз. Однако данное обстоятельство, по нашему мнению, не является существенным, так как концентрация вирусных частиц в мозговой ткани, используемой в качестве исследуемого материала, существенно выше пороговых значений для любого из исследованных штаммов (см. табл. 4).

Таким образом, в рамках данного исследования система продемонстрировала высокие показатели аналитической и диагностической чувствительности, что делает перспективным ее использование в качестве скринингового теста при исследовании животных в рамках эпизоотологического надзора, а также с целью лабораторной диагностики бешенства у людей. Однако окончательное подтверждение диагноза бешенства должно осуществляться на основании МФА или метода биологической пробы до тех пор, пока не будут накоплены данные о диагностической ценности молекулярных методов при выявлении RABV.

Выводы

1. Разработана диагностическая система в формате ОТ-ПЦР в реальном времени для выявления РНК штаммов классического RABV.
2. Аналитические характеристики разработанной системы позволяют успешно проводить выявление РНК штаммов RABV, циркулирующих на территории РФ, что было показано на широкой выборке первичного материала от инфицированных бешенством животных и людей, полученного в различных регионах.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 1, 2, 8, 10—21 см. REFERENCES)

3. Информационный бюллетень ВОЗ № 99, сентябрь 2015 года. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/ru/>.
4. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Березина Е.С. *Бешенство в Российской Федерации. Информационно-аналитический бюллетень*. Омск: полиграфический центр Кан; 2013.
5. Полещук Е.М., Сидоров Г.Н., Березина Е.С. Бешенство животных в России в 2007—2011 гг. *Российский ветеринарный журнал. Мелкие домашние и дикие животные*. 2012; (6): 8—12.
6. ГОСТ 26075—2013. Животные. Методы лабораторной диагностики бешенства. М.: Стандартинформ; 2013.
7. Хисматуллина Н.А. Методические указания по лабораторной диагностике бешенства животных. Утверждены Департаментом Ветеринарии Министерства сельского хозяйства и продовольствия Российской Федерации 14 мая 1997 г. М.; 1997.
9. Дедков В.Г., Бекова М.В., Девяткин А.А., Кулешов К.В., Полещук Е.М., Маркелов М.Л. и др. Ретроспективная диагностика двух случаев бешенства у пациентов из Астраханской области. В кн.: *Материалы VIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Молекулярная диагностика — 2014»*. М.; 2014: 453—4.

REFERENCES

1. King M.Q., Michael A.J., Carstens B.E., Lefkowitz J.E. Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. In: *Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Amsterdam: Elsevier, Academic Press; 2012: 95—111.
2. Dietzschold B., Faber M., Schnell M.J. New approaches to the prevention and eradication of rabies. *Expert. Rev. Vaccines*. 2003; 2(3): 399—406.
3. WHO Fact Sheet № 99 Updated September 2015. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs099/ru/>. (in Russian)
4. Poleshchuk E.M., Sidorov G.N., Berezina E.S. *Rabies in the Russian Federation. Information-analytical Bulletin [Beshenstvo v Rossiyskoy Federatsii. Informatsionno-analiticheskiy byulleten']*. Omsk: poligraficheskiy tsentr Kan; 2013. (in Russian)
5. Poleshchuk E.M., Sidorov G.N., Berezina E.S. Rabies of animals in the Russian Federation in 2007—2011. *Rossiyskiy veterinarnyy zhurnal. Melkie domashnie i dikiye zhivotnye*. 2012; (6): 8—12. (in Russian)
6. GOST 26075—2013. Animals. Methods of laboratory diagnostics of rabies. Moscow: Standartinform; 2013. (in Russian)
7. Khismatullina N.A. Methodological guideline for laboratory diag-

- agnostics of rabies in animals. Approved by the Veterinary Department of the Ministry of Agriculture and Food of the Russian Federation May 14, 1997. Moscow; 1997. (in Russian)
8. WHO. Expert Consultation on Rabies. Second report. WHO Technical Report Series 982. Geneva: WHO Press; 2013.
9. Dedkov V.G., Bekova M.V., Devyatkin A.A., Kuleshov K.V., Poleshchuk E.M., Markelov M.L. et al. Retrospective diagnosis of two cases of rabies in patients from the Astrakhan region. In: *Proceedings of VIII All-Russian Scientific-Practical Conference with International Participation «Molecular Diagnostics — 2014» [Materialy VIII Vserossiyskoy nauchno-prakticheskoy konferentsii s mezhdunarodnym uchastiem «Molekulyarnaya diagnostika — 2014»]*. Moscow; 2014: 453—4. (in Russian)
10. Delmas O., Holmes E.C., Talbi C., Larrous F., Dacheux L., Bouchier C. et al. Genomic diversity and evolution of the lyssaviruses. *PLoS One*. 2008; 3(4): e2057.
11. Tyagi S., Kramer F.R. Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization. *Nat. Biotechnol.* 1996; 14(3): 303—8.
12. Van Pelt-Verkuil E., van Belkum A., Hays J.P. *Principles and Technical Aspects of PCR Amplification*. NY: Springer; 2008.
13. Yuryev A., ed. *Methods in Molecular Biology. Vol. 402: PCR Primer Design*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 2007.
14. Kibbe W.A. OligoCalc: an online oligonucleotide properties calculator. *Nucleic. Acids Res.* 2007; 35(Web Server issue): W43-6.
15. Maniatis T., Fritsch E.E., Sambrook J. *Molecular Cloning. A laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory; 2003.
16. 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.
17. 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—62.
18. Reed L.J., Muench H. A simple method of estimation of fifty percent endpoints. *Am. J. Hyg.* 1938; 27: 493—7.
19. Dupuis M., Brunt S., Appler K., Davis A., Rudd R. Comparison of Automated qRT-PCR and Direct Fluorescent Antibody Detection for Routine Rabies Diagnosis in the United States. *J. Clin. Microbiol.* 2015; 53(9): 2983—9.
20. Appolinário C., Allendorf S.D., Vicente A.F., Ribeiro B.D., Fonseca C.R., Antunes J.M. et al. Fluorescent antibody test, quantitative PCR pattern and clinical aspects of rabies virus strains isolated from main reservoirs in Brazil. *Braz. J. Infect. Dis.* 2015; 19(5): 479—85.
21. Fischer M., Wernike K., Freuling C.M., Müller T., Aylan O., Brochier B. et al. A step forward in molecular diagnostics of lyssaviruses—results of a ring trial among European laboratories. *PLoS One*. 2013; 8(3): e58372.

Поступила 04.11.15
Принята в печать 26.01.16