

КЛИНИЧЕСКИЕ МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ



<https://elibrary.ru/rptiua>

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Бондарева О.С., Кайсаров И.Д., Батурин А.А., Миронова А.В.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИХОРАДКИ ЗАПАДНОГО НИЛА НА СОВРЕМЕННОМ ЭТАПЕ (обзор литературы)

ФКУЗ Волгоградский научно-исследовательский противочумный институт Роспотребнадзора, 400066, Волгоград, Россия

Вирус Западного Нила (ВЗН) - один из самых распространенных арбовирусов в мире, имеющий тенденцию к расширению ареала. Инфицирование человека в основном происходит через укусы кровососущих насекомых (трансмиссивный путь передачи). Следствием заражения могут быть бессимптомная инфекция, развитие лихорадочной (гриппоподобной) формы заболевания, в редких случаях поражение центральной нервной системы с развитием менингита, энцефалита, либо острого вялого паралича. Для подтверждения диагноза лихорадки Западного Нила (ЛЗН) применяют в основном иммунологические и молекулярно-генетические методы. Используемые серологические исследования могут давать ложноположительные результаты вследствие перекрестных реакций антител с другими ортофлавирусами. С помощью генодиагностических подходов РНК возбудителя можно выявить в острую фазу заболевания, в период серонегативного окна. Данные методы незаменимы при проведении эпидемиологического мониторинга за численностью зараженных переносчиков возбудителя инфекции, необходимого для прогноза заболеваемости ЛЗН. Цель: анализ особенностей лабораторной диагностики ЛЗН молекулярно-генетическими методами, определение тенденций в разработке способов обнаружения РНК ВЗН, сравнение предложенных подходов с учетом их преимуществ и недостатков.

Материал и методы. Поиск источников литературы осуществлён в базах данных Scopus, Web of Science, MedLine, CyberLeninka, RIIIC.

Результаты и обсуждение. В обзоре обозначены как общие проблемы диагностики ЛЗН (низкая выявляемость случаев инфицирования), так и сложности, возникающие при применении молекулярно-генетических подходов: транзитная виремия, низкая вирусная нагрузка, высокая вариабельность генома ВЗН. Рассмотрены различные варианты полимеразной цепной реакции с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР), разработанные для диагностики ЛЗН, отличающиеся по способу детекции, типу и числу выявляемых мишеней. Отдельный раздел посвящен методам выявления РНК ВЗН, основанным на изотермической амплификации, в сравнении с ОТ-ПЦР. Охарактеризованы технологии ДНК-микрочипов и секвенирования нуклеотидной последовательности вируса, определены возможные области их применения.

Ключевые слова: вирус Западного Нила (ВЗН); лихорадка Западного Нила (ЛЗН); молекулярно-генетические методы; обзор

Для цитирования: Бондарева О.С., Кайсаров И.Д., Батурин А.А., Миронова А.В. Молекулярно-генетическая диагностика лихорадки Западного Нила на современном этапе (обзор литературы). Клиническая лабораторная диагностика. 2025; 70(9): 629-635. DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-9-629-635>
EDN: RPTIUA

Для корреспонденции: Бондарева Ольга Сергеевна, канд. мед. наук, ст. науч. сотр. лаборатории генодиагностики особо опасных инфекций; e-mail: bondareva0s@mail.ru

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 03.04.2025
Принята к печати 14.07.2025
Опубликовано 25.08.2025

Bondareva O.S., Kaisarov I.D., Baturin A.A., Mironova A.V.

MOLECULAR GENETIC DIAGNOSTICS OF WEST NILE FEVER AT THE PRESENT STAGE (review of literature)

Volgograd Plague Control Research Institute, 400066, Volgograd, Russia

West Nile virus (WNV) is one of the most widespread arboviruses in the world, with a tendency to increase its endemic area. Human infection mainly occurs through the bites of blood-sucking insects (vector-borne transmission). Infection may result in asymptomatic and febrile (flu-like) forms of the disease, and, in rare cases, the central nervous system damage with the development of meningitis, encephalitis, or acute flaccid paralysis. Immunologic and molecular genetic approaches method are used to confirm the diagnosis of West Nile fever (WNF). The most commonly used serologic tests may give false-positive results due to cross-reactions of antibodies with other orthoflaviviruses. With the help of genetic approaches, RNA of the pathogen can be detected in the acute phase of the disease, during the seronegative window. In addition, these methods are indispensable for epidemiologic monitoring of the number of infected vectors, which is necessary for predicting the incidence of WNF.

The aim of the review is to analyze the peculiarities of laboratory diagnostics of WNF using molecular genetic methods, to identify trends in the development of West Nile virus RNA detection methods, and to compare the proposed approaches, taking into account their advantages and disadvantages.

Material and methods. Literature sources were searched in Scopus, Web of Science, MedLine, CyberLeninka, and RSCI databases.

Results and discussion. The review outlines both general problems of WNF diagnostics (low detection rate of infection cases) and

difficulties arising in the application of molecular genetic approaches: transient viraemia, low viral load, high variability of the WNV genome. Different variants of reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) developed for WNF diagnostics, differing in detection method, type and number of targets to be detected, are considered. A separate section is devoted to the methods of detection of WNV RNA based on isothermal amplification in comparison to RT-PCR. The paper also characterizes DNA microarray and virus genome sequencing techniques and identifies their possible applications.

Key words: West Nile virus (WNV); West Nile fever (WNF); molecular genetic methods; review

For citation: Bondareva O.S., Kaisarov I.D., Baturin A.A., Mironova A.V. Molecular genetic diagnostics of West Nile fever at the present stage (review of literature). *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2025; 70 (9): 629-635 (in Russ.)

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2025-70-9-629-635>

EDN: RPTIUA

For correspondence: Bondareva Olga Sergeevna, Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of Gene Diagnostics of Particularly Dangerous Infections; e-mail: bondareva0s@mail.ru

Information about authors:

Bondareva O.S., <https://orcid.org/0000-0001-5690-6686>;

Kaisarov I.D., <https://orcid.org/0000-0002-5578-3343>;

Baturin A.A., <https://orcid.org/0000-0001-9510-7246>;

Mironova A.V., <https://orcid.org/0000-0002-6958-7861>.

Funding. The study had no sponsor support.

Conflict of interest. The authors declare absence of conflict of interests.

Received 03.04.2025

Accepted 14.07.2025

Published 25.08.2025

Введение. Вирус Западного Нила (ВЗН) относят к виду *Orthoflavivirus nilense* семейства *Flaviviridae* (<https://ictv.global>, Release 2024). Геном вируса представлен одноцепочечной позитивной РНК длиной около 11 тыс. нуклеотидов. ВЗН в природе существует в рамках энзоотического цикла: комар-птица-комар. Передача происходит посредством трансмиссии от зараженных орнитофильных членистоногих к птицам. Восприимчивы к вирусу человек, некоторые млекопитающие и земноводные. Заражение человека ВЗН может протекать без клинических проявлений инфекции, в виде гриппоподобной формы лихорадки Западного Нила (ЛЗН) (до 20%) и в редких случаях в тяжелой форме с поражением ЦНС (около 1%) [1, 2].

ВЗН - один из самых распространенных арбовирусов в мире, выявлен на всех континентах за исключением Антарктиды [1, 3]. Первые, лабораторно подтвержденные случаи заболевания людей ЛЗН в России зарегистрированы в 1967 году в Астраханской области, выраженные пики заболеваемости населения в Российской Федерации зарегистрированы: в 1999 году - 475 случаев, в 2010 году - 521 случай, в 2012 году - 455 случаев, в 2019 году - 352 случая. В последние годы установлено существенное расширение числа регионов Российской Федерации, где подтверждены случаи заболевания. В 2024 году выявлено 440 случаев заболевания ЛЗН в 38 субъектах России [4].

Основными методами клинической лабораторной диагностики ЛЗН являются иммуноферментный анализ (ИФА) и полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией (ОТ-ПЦР). При необходимости углубленного изучения вируса, при возникновении случаев заболевания с атипичной клинической картиной проводят вирусологические исследования, секвенирование и анализ полногеномной последовательности изолята вируса¹.

РНК ВЗН выявляют в клиническом и секционном материале с целью установления и подтверждения диагноза ЛЗН, в крови здоровых доноров для исключения возможности передачи вируса от бессимптомных носителей, в полевом материале (комары, клещи, птицы, мелкие млекопитающие) для изучения циркуляции ВЗН в природных очагах.

Цель обзора: анализ особенностей лабораторной диагностики ЛЗН молекулярно-генетическими методами, определение тенденций в разработке способов обнаружения РНК вируса Западного Нила, сравнение предложенных подходов с учетом их преимуществ и недостатков.

Проблемы лабораторной диагностики ЛЗН. Высокий процент населения, имеющих антитела класса IgG к ВЗН, в регионах, где зафиксированы вспышки ЛЗН, доказывает, что в большинстве случаев инфицирование протекает бессимптомно [3, 4]. Диагностику ЛЗН затрудняет частое отсутствие специфических симптомов заболевания. При развитии лихорадочной формы болезни преобладают гриппоподобный синдром, симптомы поражения ЖКТ и дыхательной системы, что в совокупности с низкой осведомленностью населения и специалистов лечебных учреждений не позволяет предположить факт заражения ВЗН. Только появление сыпи, неврологической симптоматики, тяжелой формы инфекции ведут к подозрению на наличие ЛЗН и назначению комплекса исследований [1, 3].

Значимой проблемой диагностики ЛЗН иммунологическими методами является наличие перекрестной реактивности антител к ортофлавивирусам, антигены которых имеют строение, сходное с ВЗН [1]. Особенно остро этот вопрос в России стоит в регионах, эндемичных по клещевому энцефалиту. Определение титра антител к другим ортофлавивирусам, либо применение молекулярно-генетических методов позволяет исключить ложноположительные результаты исследования.

Сложность лабораторной диагностики ЛЗН методом ОТ-ПЦР обусловлена транзитной вiremией. В

¹ СанПиН 3.3686-21. «Санитарно-эпидемиологические требования по профилактике инфекционных болезней».

некоторых источниках описано, что РНК ВЗН можно выявить в сыворотке крови в относительно короткий период (за несколько дней до появления симптомов и в среднем 5-7 дней после) [5]. Установлена способность ВЗН к адсорбции на эритроцитах [6]. Учитывая возможность поглощения вируса лейкоцитами после выработки антител, очевидно, что исследование цельной крови обладает большим диагностическим потенциалом, чем анализ сыворотки. Согласно публикациям последних лет РНК ВЗН в крови обнаруживается до 19 дня, по некоторым данным до 40 дня от начала заболевания [7 - 9]. Вторым по значимости анализом для исследования является моча, поскольку ВЗН обладает тропностью к почечной ткани, и способен выделяться с мочой в течение длительного времени (до месяца) [9]. Показано, что при нейроинвазивной форме ЛЗН РНК в моче выявляли дольше и в большей концентрации, чем при исследовании ликвора [10]. Имеются данные об обнаружении РНК ВЗН исключительно в ликворе [11].

Поскольку в большинстве положительных клинических образцов РНК ВЗН обнаруживают в низкой концентрации, значимым фактором, влияющим на вероятность выявления РНК ВЗН, является способ выделения РНК, чувствительность используемого для диагностики набора реагентов [4]. Применение сорбционных методов экстракции сопровождается значительными потерями РНК, что может привести к ложноотрицательному результату исследования.

Проблемы выявления ВЗН молекулярно-генетическими методами могут быть вызваны высокой генетической вариабельностью, характерной для большинства РНК-геномных вирусов. На основе сравнительного филогенетического анализа выделяют до 9 генотипов ВЗН [12, 13]. В конце XX века идентифицированы два генотипа: генотип 1, включающий большинство американских, европейских, некоторые африканские штаммы; генотип 2, к которому относятся в основном изоляты из Африки. После 2004 года ВЗН генотипа 2 распространился по странам Европы. В России в последние годы обнаруживают в основном 2 генотип ВЗН, внутри которого наблюдается значительная генетическая гетерогенность [14]. В начале 2000-х годов описаны генотипы ВЗН 3, 4 и 5, выявленные на территории Чехии, Кавказа, Индии, соответственно [15]. В отдельные генотипы классифицированы изоляты, полученные в Африке, Испании, Малайзии [16].

Отсутствие патогномичных клинических симптомов, транзиторная виремия, низкая концентрация ВЗН в большинстве проб и вариабельность генома ВЗН являются основными барьерами для диагностики ЛЗН молекулярно-генетическими методами. К важным направлениям на пути решения существующих проблем можно отнести повышение грамотности и настороженности врачей в отношении ЛЗН, исследование нескольких типов клинического материала (цельной крови, мочи, при необходимости ликвора), разработку высокочувствительных молекулярно-генетических подходов, проверку стабильности используемых генодиагностических мишеней путем анализа *in silico* нуклеотидных последовательностей циркулирующих генетических линий ВЗН.

ПЦР-диагностика ЛЗН. Одним из основных молекулярно-генетических методов, применяемых для диа-

гностики ЛЗН, является ПЦР. Поскольку генетический материал ВЗН представлен РНК, первым этапом обнаружения ВЗН является реакция обратной транскрипции.

Эволюция методов выявления РНК ВЗН согласуется с развитием технологии ПЦР. Для выявления РНК ВЗН предложены ПЦР с электрофоретической детекцией [17], с применением интеркалирующих красителей [18], с гибридационно-флуоресцентной детекцией [19 - 22], «гнездовая», цифровая ПЦР [23]. Повсеместное распространение амплификаторов с флуоресцентной детекцией, наряду с риском контаминации, вытеснило электрофорез и «гнездовую» ПЦР из арсенала методов лабораторной диагностики. Сложность цифровой ПЦР в совокупности с необходимостью использования специального оборудования, несмотря на высокую чувствительность, препятствовали ее внедрению в рутинную лабораторную практику [23]. Такие преимущества гибридационно-флуоресцентной детекции, как высокая чувствительность, возможность мультиплексирования и количественной оценки концентрации ВЗН, сделали данный подход незаменимым инструментом при детекции РНК ВЗН.

Мультиплексное выявление патогенов с помощью ПЦР позволяет снизить экономические и временные траты и обычно применяется в отношении инфекций с общими путями передачи и сходной клинической симптоматикой. Наиболее часто одновременно с ЛЗН детектируют такие сложно дифференцируемые по клиническим симптомам вирусные инфекции, как лихорадки денге, Зика, чикунгунья [24 - 27]. Разработана экспериментальная мультиплексная тест-система для детекции 17 возбудителей арбовирусных инфекций, 8 из которых выявлены с ее помощью на территории Астраханской области [28].

От выбора мишени для амплификации зависит специфичность ПЦР. В качестве последовательности для отжига праймеров, как правило, используют наиболее консервативные участки генома ВЗН: 5'-нетранслируемую область [20], локусы, кодирующие белки С [22], NS5 [8, 18], хотя некоторые разработанные для детекции ВЗН праймеры нацелены на достаточно вариабельные области, например, локус, кодирующий белок Е [19], 3'-нетранслируемый участок [24, 29].

Учитывая значительную внутривидовую вариабельность ВЗН, подбор праймеров, комплементарных геномам всех геновариантов, - сложная задача. Набор описанных олигонуклеотидов позволяет выявлять РНК ВЗН 1а, 2, 4, 5 и теоретически 3 генотипов [20]. В 2016 году с использованием вырожденных олигонуклеотидов разработана ОТ-ПЦР для амплификации 1а, 2, 3, 4, 5, 6, 7 и 8 генотипов ВЗН с чувствительностью от 1,5 до 15 копий РНК на реакцию [30].

На основе ПЦР конструируют тест-системы, предназначенные для определения генотипа ВЗН. Предложен способ индикации и дифференциации ВЗН генотипов 1, 2, 7, 8, циркулирующих на Африканском континенте [29]. На территории европейской части России в разные периоды времени установлена циркуляция 1а, 2, 4 генотипов ВЗН, для их детекции и дифференциации разработан отечественный набор реагентов [31].

Анализ публикаций последних лет показывает, что метод ПЦР не утратил актуальности. К наиболее активно представленным направлениям можно отнести разработку олигонуклеотидов, подобранных с учетом геноти-

пов вируса [29 - 31], и сконструированных с целью мультиплексного обнаружения группы патогенов [24-28].

Методы изотермической амплификации. В начале XXI века предложен ряд изотермических методов амплификации нуклеиновых кислот, на основе некоторых из них разработаны подходы для детекции РНК ВЗН (см. таблицу). Постоянная температура реакции обеспечивает сокращение времени проведения анализа и мобильность процесса диагностики (без использования термоциклера). Наибольшее число публикаций посвящено детекции РНК ВЗН методом петлевой изотермической амплификации с обратной транскрипцией (RT-LAMP). При чувствительности и специфичности, сопоставимой с ПЦР, время постановки RT-LAMP занимает около 30-40 минут. Предложено несколько способов учета результатов данной технологии: флуоресцентная детекция с использованием интеркалирующих красителей [32], гибридизационных зондов [33], либо на основе анализа кривых плавления [34]; колориметрическая детекция, например, с гидроксинафтоловым синим [35]; иммунохроматографический анализ на тест-полосках LAMP-LFD (Lateral Flow Dipstick) [36]. Имеется коммерческий набор реагентов для выявления ВЗН на основе петлевой амплификации [37].

Методы NASBA (Nucleic acid sequence-based amplification) и транскрипционно-опосредованной амплификации (ТМА) отличаются от аналогов тем, что этап обратной транскрипции является частью цикла амплификации, а продуктом реакции служит РНК. Данная особенность повышает чувствительность метода при выявлении РНК-геномных вирусов [38]. Зарегистрированная в США тест-система, основанная на методе (ТМА), характеризуется чувствительностью, превышающей ОТ-ПЦР, и рекомендована для скрининга донорской крови в индивидуальном формате и при пулировании образцов [39]. Перспективным для диагностики ЛЗН можно считать метод рекомбиназной полимеразной амплификации с обратной транскрипцией (ОТ-РПА), отличающийся наименьшим временем протекания реакции из всех молекулярно-генетических технологий (5-20 минут) [40]. Показана возможность сочетания РПА с детекцией на основе системы CRISPR-Cas [41].

ДНК-микрочипы. Технология ДНК-микрочипов предполагает нанесение на твердую или жидкую подложку большого количества специфичных ДНК-зондов, что используется для одновременной диагностики широкого спектра инфекционных заболеваний, либо подробной характеристики возбудителя (определение генотипов и геновариантов).

Для диагностики арбовирусных инфекций предложено несколько вариантов микрочипов, содержащих специфичные зонды к геномам вирусов ВЗН, денге 1-4 типов [42, 43], желтой лихорадки, японского энцефалита [42], чикунгунья [43]. Применение микрочипов позволяет значительно увеличить число параллельно выявляемых возбудителей. Подобраны 1769 олигонуклеотидных зондов для анализа на микрочипе 16 возбудителей вирусных инфекций: Т-лимфотропного вируса человека, вирусов гепатитов А, В, С, Е, ВИЧ, денге, Зика, чикунгунья, ВЗН. Чувствительность для различных мишеней колебалась от 10^2 до 10^5 копий РНК/ДНК в мл [44]. Себестоимость данной технологии значительно выше, чем у ПЦР, что ограничивает область ее применения.

Секвенирование. Одним из важнейших молекулярно-генетических инструментов является технология секвенирования. Предварительное культивирование ВЗН на культуре клеток и последующая амплификация со случайными праймерами, либо технология нанопорового секвенирования дают возможность определить возбудителя инфекции [45]. Известны случаи уточнения диагноза ЛЗН путем секвенирования проб от пациентов с менингоэнцефалитом и лихорадкой неясного генеза [46, 47]. Одной из последних тенденций высокопроизводительного секвенирования является разработка и применение мультипраймерных панелей для предварительной амплификации генома ВЗН, позволяющих в короткий срок, исключая этап культивирования ВЗН, получать данные о структуре генома даже при низкой концентрации РНК в пробе [48]. В большинстве случаев секвенирование проводится уже после индикации ВЗН с целью определения геноварианта, отслеживания эволюционных событий, паспортизации новых штаммов, определения потенциальных путей завоза ВЗН на ранее не эндемичные территории [49].

Закключение. Повышение информированности населения и врачей в отношении ЛЗН, исследование не менее двух видов клинического материала, разработка новых высокочувствительных и специфичных подходов, контроль над эффективностью применяемых тест-систем будут способствовать повышению качества диагностики данной инфекции.

Молекулярно-генетическая диагностика ЛЗН в Российской Федерации осуществляется с использованием ОТ-ПЦР, на основе которой разработаны все применяемые для детекции РНК ВЗН зарегистрированные наборы реагентов. Анализ публикаций последних лет показал активную разработку мультиплексных ПЦР тест-систем, направленных на выявление РНК ВЗН одновременно с маркерами других, чаще всего арбовирусных инфекций.

Актуальным направлением развития средств диагностики ЛЗН является использование технологий изотермической амплификации. В условиях ограниченных ресурсов данные методы могут стать конкурентной альтернативой ОТ-ПЦР. За рубежом уже применяются коммерческие тест-системы, основанные на ТМА и RT-LAMP. Наиболее перспективным можно назвать подход RT-LAMP, сопоставимый с ОТ-ПЦР по показателям чувствительности и специфичности, но характеризующийся большей скоростью выполнения исследования. Учитывая бурное развитие изотермических технологий, в скором будущем возможно появление экспресс-тестов, позволяющих проводить генодиагностику ЛЗН у постели больного.

Применение технологии ДНК-микрочипов ограничено необходимостью использования специального оборудования, высокой себестоимостью и целесообразно, например, при обследовании доноров крови. Секвенирование является ключевым этапом углубленного исследования ВЗН в лабораториях федерального уровня. Секвенирование как молекулярно-генетический метод исследования ВЗН имеет ценность при отслеживании мутаций в геноме, определении генотипа и геноварианта ВЗН, паспортизации выделенных штаммов, проведении эпидемиологических расследований, изучении эволюции и распространения возбудителя ЛЗН.

Сравнение изотермических молекулярно-генетических технологий, разработанных для детекции РНК ВЗН

Название метода	Особенности состава реакционной смеси, принцип метода	Преимущества («+») и недостатки («-») и	Применение для выявления РНК ВЗН
Петлевая изотермическая амплификация (LAMP, loop-mediated isothermal amplification)	2 длинных внутренних праймера (части комплементарны разным цепям, образуют шпильки (петли) по краям ампликона, которые распознает Bst-полимераза), 2 внешних праймера (вытесняют синтезированные продукты амплификации), 1-2 петлевых праймера (образуют новые точки инициации амплификации). В результате реакции образуется смесь разноразмерных продуктов амплификации	«+»: высокая скорость амплификации, высокая специфичность и чувствительность (иногда уступает ПЦР), различные способы детекции; «-»: ограниченная возможность мультиплексирования, сложность подбора праймеров	Чувствительность сопоставима с ПЦР (0,1 БОЕ) [32]; 79% проб, положительных в ОТ-ПЦР, подтверждены методом RT-LAMP (все образцы с Ct меньше 31) [37]
Транскрипционно-опосредованная амплификация (ТМА) Nucleic acid sequence-based amplification (NASBA)	NASBA - 2 праймера, 3 фермента: обратная транскриптаза, РНКазы H и РНК-полимераза. На основе РНК синтезируется ДНК, с которой транскрибируется РНК. РНК - продукт амплификации. ТМА - принцип тот же, но используется обратная транскриптаза с активностью РНКазы H (2 фермента)	«+»: очень высокая чувствительность; «-»: себестоимость выше, чем у ПЦР, сложность подбора праймеров	Чувствительность - 0,01 БОЕ, в 10 раз выше, чем у ОТ-ПЦР [38, 39]
Рекомбиназная полимеразная амплификация (РПА)	2 праймера длиной около 30 п.н.; 2 фермента: рекомбиназа, Vsu-полимераза; АТФ, SSB-белки, ацетат магния. Принцип метода заключается в имитировании процесса гомологичной рекомбинации у бактерий	«+»: время амплификации от 5 минут, температура реакции (37-42 °C); «-»: много компонентов реакции, высокая себестоимость, сложность подбора праймеров	Чувствительность как у ОТ-ПЦР – 10 копий РНК на реакцию, клиническая чувствительность - 96,15% [40]

ЛИТЕРАТУРА (п.п. 2, 3, 5-16, 18, 19, 21, 23-30, 32-49 см. REFERENCES)

- Городин В.Н., Нежурин А.В., Жукова Л.И. Современные аспекты лихорадки Западного Нила. *Инфекционные болезни*. 2023; 21(1): 140-7. DOI: 10.20953/1729-9225-2023-1-140-147.
- Путинцева Е.В., Удовиченко С.К., Никитин Д.Н., Бородай Н.В., Колоскова А.Ю., Антонов А.С. и др. Лихорадка Западного Нила в Российской Федерации в 2024 г., прогноз на 2025 г. *Проблемы особо опасных инфекций*. 2025; (1): 84-95. DOI: 10.21055/0370-1069-2025-1-84-95.
- Красовская Т.Ю., Шарова И.Н., Щербакова С.А., Яшечкин Ю.И., Хуторецкая Н.В., Ларичев В.Ф. и др. Разработка и внедрение тест-системы для лабораторной диагностики лихорадки Западного Нила методом ПЦР. *Здоровье населения и среда обитания*. 2007; 6(171): 42-5. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-3(109)-13-17.
- Платонов А.Е., Карань Л.С., Шопенская Т.А. 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; 2: 29-37.
- Батурин А.А., Ткаченко Г.А., Леденева М.Л., Лемасова Л.В., Бондарева О.С., Кайсаров 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. DOI: 10.36233/0372-9311-85.
- Прохватилова 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 гибридизационно-флуоресцентной детекцией. *БИОпрепараты. Профилактика, диагностика, лечение*. 2023; 23(1): 90-101. DOI: 10.30895/2221-996X-2023-23-1-90-101.

REFERENCES

- Gorodin V.N., Nezherin A.V., Zhukova L.I. Current aspects of West Nile fever. *Infectious Diseases*. 2023; 21(1): 140-7. DOI: 10.20953/1729-9225-2023-1-140-147. (in Russian)
- Singh P., Khatib M.N., Ballal S. Kaur M., Nathiya D., Sharma S. et al. West Nile Virus in a Changing Climate: epidemiology, pathology, advances in diagnosis and treatment, vaccine designing and control strategies, emerging public health challenges - a

- comprehensive review. *Emerg. Microbes Infect.* 2024; 2437244. DOI: 10.1080/22221751.2024.2437244.
- Habarugira G., Suen W.W., Hobson-Peters J. Hall R.A., Bielefeldt-Ohmann H. West Nile virus: an update on pathobiology, epidemiology, diagnostics, control and «one health» implications. *Pathogens*. 2020; 9(7): 589. DOI: 10.3390/pathogens9070589.
- Putintseva E.V., Udovichenko S.K., Nikitin D.N., Boroday N.V., Koloskova A.Yu., Antonov A.S. et al. West Nile Fever in the Russian Federation in 2024, Forecast for 2025. *Problemy osobo opasnykh infektsiy*. 2025; (1): 84-95. DOI: 10.21055/0370-1069-2025-1-84-95. (in Russian)
- Ronca S.E., Ruff J.C., Murray K.O. A 20-year historical review of West Nile virus since its initial emergence in North America: Has West Nile virus become a neglected tropical disease? Vasconcelos PFC, editor. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2021; 15(5): e0009190. DOI: 10.1371/journal.pntd.0009190.
- Rios M., Daniel S., Chancey C., Hewlett I.K., Stramer S.L. West Nile virus adheres to human red blood cells in whole blood. *Clin. Infect. Dis.* 2007; 45: 181-6. DOI: 10.1086/518850.
- Busch M.P., Kleinman S.H., Tobler L.H., Kamel H.T., Norris P.J., Walsh I. et al. Virus and antibody dynamics in acute west nile virus infection. *J. Infect. Dis.* 2008; 198(7): 984-93. DOI: 10.1086/591467.
- Kasule S., Fernholz E., Grant L., Kole A., Grys T.E., Kaleta E. et al. Whole-Blood PCR Preferred for Timely Diagnosis of Neuroinvasive West Nile Virus Infections: Lessons From the 2021 Arizona Outbreak. *Open Forum Infect. Dis.* 2024; 11(5): 188. DOI: 10.1093/ofid/ofae188.
- Lustig Y., Sofer D., Bucris E.D., Mendelson E. Surveillance and Diagnosis of West Nile Virus in the Face of Flavivirus Cross-Reactivity. *Front. Microbiol.* 2018; 9: 2421. DOI: 10.3389/fmicb.2018.02421.
- Gdoura M., Fares W., Bougates S., Inoubli A., Touzi H., Hogga N. et al. The value of West Nile virus RNA detection by real-time RT-PCR in urine samples from patients with neuroinvasive forms. *Arch Microbiol.* 2022; 204(5): 238. DOI: 10.1007/s00203-022-02829-6.
- Cvetković I.H., Radovanov J., Kovačević G., Turkulov V., Patić A. Diagnostic value of urine qRT-PCR for the diagnosis of West Nile virus neuroinvasive disease. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2023; 107(1): 115920. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2023.115920.
- Lanciotti R.S., Ebel G.D., Deubel V., Kerst AJ, Murri S, Meyer R. et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of West Nile virus strains isolated from the United States, Europe, and the Middle East. *Virology*. 2002; 298(1): 96-105. DOI: 10.1006/viro.2002.1449.
- Pachler K., Lebl K., Berer D., Rudolf I., Hubalek Z., Nowotny N. Putative new West Nile virus lineage in *Uranotaenia unguiculata* mosquitoes, Austria, 2013. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 12: 2119-22. DOI: 10.3201/eid2012.140921.

14. Antonov A.S., Shpak I.M., Ustinov D.V., Izhberdeeva M.P., Guseva A.N., Galkina A.Y. et al. Phylogenetic analysis and molecular genetic characteristics of West Nile virus lineage 2 isolates circulating in the Russian Federation. *Virus Genes*. 2024; 60(4): 370-6. DOI: 10.1007/s11262-024-02079-2.
15. Shah-Hosseini N., Chinikar S., Ataei B., Fooks A.R., Groschup M.H. Phylogenetic analysis of West Nile virus genome, Iran. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(8): 1419-21. DOI: <https://doi.org/10.1099/vir.0.046888-0>.
16. McMullen A.R., Albayrak H., May F.J., Davis C.T., Beasley D.W.C., Barrett A.D.T. Molecular evolution of lineage 2 West Nile virus. *J. Gen. Virol.* 2013; 94(Pt 2): 318-25. DOI: 10.1099/vir.0.046888-0.
17. Krasovskaya T.Y., Sharova I.N., Shcherbakova S.A. et al. Development and implementation of a test system for laboratory diagnosis of West Nile fever by PCR. *Zdorov'e naseleniya I sreda obitaniya*. 2007; 6(171): 42-5. DOI: 10.21055/0370-1069-2011-3 (109)-13-17. (in Russian)
18. Johnson N., Wakeley P.R., Mansfield K.L., McCracken F., Haxton B., Phipps L.P. et al. Assessment of a novel real-time pan-flavivirus RT-polymerase chain reaction. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2010; 10: 665-71. DOI: 1089/vbz.2009.0210.
19. Lanciotti R.S., Kerst A.J., Nasci R.S., Godsey M.S., Mitchell C.J., Savage H.M. et al. Rapid detection of West Nile virus from human clinical specimens, field-collected mosquitoes, and avian samples by a TaqMan Reverse Transcriptase-PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology*. 2000; 38(11): 4066-71. DOI: 10.1128/jcm.38.11.4066-4071.2000.
20. Platonov A.E., Karan' L.S., Shopenskaia T.A. et al. Genotyping of West Nile fever virus strains circulating in southern Russia as an epidemiological investigation method: principles and results. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2011; 2: 29-37. (in Russian)
21. Lee D.H., Mathew J., Pfahler W., Ma D., Valinsky J., Prince A.M. et al. Individual donor nucleic acid amplification testing for detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 2005; 43(10): 5111-6. DOI: 10.1128/JCM.43.10.5111-5116.2005.
22. Baturin A.A., Tkachenko G.A., Ledeneva M.L., Lemasova L.V., Bondareva O.S., Kaysarov I.D. et al. Molecular genetic analysis of West Nile virus variants circulating in European Russia between 2010 and 2019. *Zhurnal mikrobiologii, epidemiologii i immunobiologii*. 2021; 98(3): 308-18. DOI: 10.36233/0372-9311-85. (in Russian)
23. De Filette M., Ulbert S., Diamond M.S., Sanders N.N. Recent progress in West Nile virus diagnosis and vaccination. *Vet. Res.* 2012; 43(16). DOI: 10.1186/1297-9716-43-16.
24. Warang A., Zhang M., Zhang S., Shen Z. A panel of real-time PCR assays for the detection of Bourbon virus, Heartland virus, West Nile virus, and Trypanosoma cruzi in major disease-transmitting vectors. *J. Vet. Diagn. Invest.* 2021; 33(6): 1115-22. DOI: 10.1177/10406387211039549.
25. Xu Z., Peng Y., Yang M., Li X., Wang J., Zou R. Simultaneous detection of Zika, chikungunya, dengue, yellow fever, West Nile, and Japanese encephalitis viruses by a two-tube multiplex real-time RT-PCR assay. *J. Med. Virol.* 2022; 94(6): 2528-36. DOI: 10.1002/jmv.27658.
26. Mishra N., Ng J., Rakeman J.L., Perry M.J., Centurioni D.A., Dean A.B., Price A. et al. One-step pentaplex real-time polymerase chain reaction assay for detection of Zika, dengue, chikungunya, West Nile viruses and a human housekeeping gene. *J. Clin. Virol.* 2019; 120: 44-50. DOI: 10.1016/j.jcv.2019.08.011.
27. Boga J.A., Alvarez-Arguelles M.E., Rojo-Alba S., Rodríguez M., de Oña M., Melón S. Simultaneous detection of Dengue virus, Chikungunya virus, Zika virus, Yellow fever virus and West Nile virus. *J. Virol. Methods*. 2019; 268: 53-5. DOI: 10.1016/j.jviromet.2019.03.014.
28. Nikiforova M.A., Kuznetsova N.A., Shchetinin A.M., Butenko A.M., Kozlova A.A., Larichev V.P. Arboviruses in the Astrakhan region of Russia for 2018 season: The development of multiplex PCR assays and analysis of mosquitoes, ticks, and human blood sera. *Infect. Genet. Evol.* 2021; 88: 104711. DOI: 10.1016/j.meegid.2021.104711.
29. Fall G., Faye M., Weidmann M., Kaiser M., Dupressoir A., Ndiaye E.H. et al. Real-Time RT-PCR assays for detection and genotyping of West Nile Virus lineages circulating in Africa. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 2016; 16(12): 781-9. DOI: 10.1089/vbz.2016.1967.
30. Vázquez A., Herrero L., Negro A., Hernández L., Sánchez-Seco M.P., Tenorio A. et al. Real time PCR assay for detection of all known lineages of West Nile virus. *J. Virol. Methods*. 2016; 236: 266-70. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.07.026.
31. Prokhvatilova E.V., Tkachenko G.A., Baturin A.A., Belickaya 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. *BIOpreparaty. Profilaktika, diagnostika, lechenie*. 2023; 23(1): 90-101. DOI: 10.30895/2221-996X-2023-23-1-90-101. (in Russian)
32. Parida M., Posadas G., Inoue S., Hasebe F., Morita K. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *Journal of Clinical Microbiology*. 2004; 42(1): 257-63. DOI: 10.1128/jcm.42.1.257-263.2004.
33. Kim D., DeBriere T.J., Eastmond B.H., Alomar A.A., Yaren O., McCarter J. et al. Rapid detection of West Nile and Dengue viruses from mosquito saliva by loop-mediated isothermal amplification and displaced probes. *PLoS One*. 2024; 19(2): e0298805. DOI: 10.1371/journal.pone.0298805.
34. Wheeler S.S., Ball C.S., Langevin S.A., Fang Y., Coffey L.L., Meagher R.J. Surveillance for Western Equine Encephalitis, St. Louis Encephalitis, and West Nile viruses using reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *PLoS One*. 2016; 11(1): e0147962. DOI: 10.1371/journal.pone.0147962.
35. Khedhiri M., Chaouch M., Ayouni K., Chouikha A., Gdoura M., Touzi H. et al. Development and evaluation of an easy to use real-time reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification assay for clinical diagnosis of West Nile virus. *J. Clin. Virol.* 2024; 170: 105633. DOI: 10.1016/j.jcv.2023.105633.
36. Tomar P.S., Patel S., Dash P.K., Kumar J.S. Simple and field amenable loop-mediated isothermal amplification-lateral flow dipstick assay for detection of west Nile virus in human clinical samples. *J. Appl. Microbiol.* 2022; 133(6): 3512-22. DOI: 10.1111/jam.15783.
37. Burkhalter K. L., O'Keefe M., Holbert-Watson Z., Green T., Savage H.M., Markowski D.M. Laboratory and field evaluations of a commercially available real-time Loop-Mediated Isothermal Amplification assay for the detection of West Nile Virus in mosquito pools. *J. Am. Mosq. Control Assoc.* 2021; 37(4): 256-62. DOI: 10.2987/21-7033.
38. Lanciotti R.S., Kerst A.J. Nucleic acid sequence-based amplification assays for rapid detection of West Nile and St. Louis encephalitis viruses. *Journal of clinical microbiology*. 2001; 39(12): 4506-13. DOI: 10.1128/JCM.39.12.4506-4513.2001.
39. Ziermann R., Sánchez-Guerrero S.A. PROCLEIX® West Nile virus assay based on transcription-mediated amplification. *Expert Review of Molecular Diagnostics*. 2008; 8(3): 239-45. DOI: 10.1586/14737159.8.3.239.
40. Tomar P.S., Kumar S., Patel S., Kumar J.S. Development and Evaluation of Real-Time Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid and Sensitive Detection of West Nile Virus in Human Clinical Samples. *Front Cell Infect. Microbiol.* 2021; 10: 619071. DOI: 10.3389/fcimb.2020.619071.
41. Myhrvold C., Freije C.A., Gootenberg J.S., Abudayyeh O.O., Metsky H.C., Durbin A.F. et al. Field-deployable viral diagnostics using CRISPR-Cas13. *Science*. 2018; 360 (6387): 444-8. DOI: 10.1126/science.aas8836.
42. Nordström H., Falk K.I., Lindegren G., Mouzavi-Jazi M., Waldén A., Elgh F. et al. DNA microarray technique for detection and identification of seven flaviviruses pathogenic for man. *J. Med. Virol.* 2005; 77(4): 528-40. DOI: 10.1002/jmv.20489.
43. Berthet N., Paulous S., Coffey L.L., Frenkiel M.P., Moltini I., Tran C. et al. Resequencing microarray method for molecular diagnosis of human arboviral diseases. *J. Clin. Virol.* 2013; 56(3): 238-43. DOI: 10.1016/j.jcv.2012.10.022.
44. De Giorgi V., Zhou H., Alter H.J., Allison R.D. A microarray-based pathogen chip for simultaneous molecular detection of transfusion-transmitted infectious agents. *J. Transl. Med.* 2019; 17(1): 156. DOI: 10.1186/s12967-019-1905-4.
45. Wollants E., Smolders D., Naesens R., Bruynseels P., Lagrou K., Matthijns J. et al. Use of next-generation sequencing for diagnosis of West Nile virus infection in patient returning to Belgium from Hungary. *Emerg. Infect. Dis.* 2018; 24(12): 2380-2. DOI: 10.3201/eid2412.180494.
46. Wilson M. R., Zimmermann L. L., Crawford E. D., Sample H.A., Soni P.R., Baker A.N. et al. Acute west Nile virus meningoencephalitis diagnosed via metagenomic deep sequencing of cerebrospinal fluid in

- a renal transplant patient. *Am. J. Transplant.* 2017; 17: 803-8. DOI: 10.1111/ajt.14058.
47. Williams S.H., Cordey S., Bhuva N., Laubscher F., Hartley M.A., Boillat-Blanco N. et al. Investigation of the Plasma Virome from Cases of Unexplained Febrile Illness in Tanzania from 2013 to 2014: a Comparative Analysis between Unbiased and VirCapSeq-VERT High-Throughput Sequencing Approaches. *mSphere*. 2018; 3(4): e00311-18. DOI: 10.1128/mSphere.00311-18.
48. Tešović B., Nišavić J., Banović Đeri B., Petrović T., Radalj A., Šekler M. et al. Development of multiplex PCR based NGS protocol for whole genome sequencing of West Nile virus lineage 2 directly from biological samples using Oxford Nanopore platform. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2023; 105(2): 115852. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2022.115852.
49. Hyeon J.Y., Helal Z.H., Appel A., Tocco N., Hunt A., Lee D.H. et al. Whole genome sequencing and phylogenetic analysis of West Nile viruses from animals in New England, United States, 2021. *Front. Vet. Sci.* 2023; 10: 1085554. DOI: 10.3389/fvets.2023.1085554.