

44. Singh R., Ray P., Das A. et al. Role of persisters and small-colony variants in antibiotic resistance of planktonic and biofilm-associated *Staphylococcus aureus*: an in vitro study. *J. Med. Microbiol.* 2009, 58: 1067-1073.
45. Takei H., Araki A., Watanabe H. et al. Rapid killing of human neutrophils by the potent activator phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) accompanied by changes different from typical apoptosis or necrosis. *J. Leukoc Biol.* 1996, 59 (2): 229-240.
46. Tamassia N., Le Moigne V., Calzetti F. et al. The MyD88-independent pathway is not mobilized in human neutrophils stimulated via TLR4. *J. Immunol.* 2007, 178 (11): 7344-7356.
47. Tavares N., Afonso L., Suarez M. et al. Degranulating neutrophils promote leukotriene B4 production by infected macrophages To kill leishmania amazonensis parasites. *J. Immunol.* 2016, 196 (4): 1865-1873.
48. Yang H., Biermann M.H., Brauner J.M. et al. New insights into neutrophil extracellular traps: Mechanisms of formation and role in inflammation. *Front. Immunol.* 2016, 7: 302.
49. Yipp B.G., Kubes P. NETosis: how vital is it? *Blood.* 2013, 122: 2784-2794.
50. Yousefi S., Mihalache C., Kozlowski E. et al. Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ.* 2009, 16 (11): 1438-1444.

*Поступила 04.12.17*

Контактная информация: Матосова Екатерина Владимировна,  
690087, Владивосток, ул. Сельская, 1, р.т. 8 (423) 244-26-04

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018

*А.О.Семенцова<sup>1</sup>, В.Г.Дедков<sup>2,3</sup>, В.А.Терновой<sup>1</sup>, Е.В.Чуб<sup>1</sup>,  
С.А.Пьянков<sup>1</sup>, А.П.Агафонов<sup>1</sup>, Р.А.Максютов<sup>1</sup>, В.В.Малеев<sup>2</sup>, А.Ю.Попова<sup>4,5</sup>*

## **КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА. АНАЛИЗ СУЩЕСТВУЮЩИХ МЕТОДИК И ДИАГНОСТИЧЕСКИХ СРЕДСТВ**

<sup>1</sup>ГНЦ вирусологии и биотехнологии «Вектор», п. Кольцово, Новосибирская обл.; <sup>2</sup>Центральный НИИ эпидемиологии; <sup>3</sup>НИИ медицины труда; <sup>4</sup>Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; <sup>5</sup>Российская медицинская академия последиplomного образования, Москва

Лихорадка Эбола — особо опасная вирусная инфекция, протекающая в виде геморрагической лихорадки, характеризующейся острым течением и высокой летальностью, обусловленной полиорганной недостаточностью и развитием инфекционно-токсического шока. Природные очаги лихорадки Эбола расположены в лесных районах центральной и западной частей Африканского континента. Долгие годы считалось, что заболеваемость лихорадкой Эбола носит спорадический характер и бремя ее актуально исключительно для эндемичных районов. Однако беспрецедентная по своим масштабам эпидемия лихорадки Эбола в 2013 — 2016 гг., вызванной вирусом Заир, существенно изменила представления о данном заболевании и о закономерностях его распространения. Во время эпидемии были выявлены слабые места в организации противоэпидемических мероприятий, эффективность которых оказалась на начальном этапе не очень высокой, в том числе и по причине отсутствия диагностических средств. Тем не менее, в ходе ликвидации эпидемии в Западной Африке система противоэпидемических мероприятий была существенно изменена, во многом благодаря оперативно разработанным средствам лабораторной диагностики. Данный обзор посвящен анализу методов и средств лабораторной диагностики лихорадки Эбола с учетом опыта, полученного в ходе эпидемии 2013 — 2016 гг. в Западной Африке.

*Журн. микробиол., 2018, № 3, С. 105—116*

Ключевые слова: лихорадка Эбола, молекулярная диагностика, иммунохроматография, ИФА

*A.O.Sementsova<sup>1</sup>, V.G.Dedkov<sup>2,3</sup>, V.A.Ternovoy<sup>1</sup>, E.V.Chub<sup>1</sup>,  
S.A.Pyankov<sup>1</sup>, A.P.Agafonov<sup>1</sup>, R.A.Maksyutov<sup>1</sup>, V.V.Maleev<sup>2</sup>, A.Yu.Popova<sup>4,5</sup>*

## **IN VITRO DIAGNOSIS FOR EBOLA VIRUS DISEASE. A COMPARISON OF CURRENT TECHNIQUES AND DIAGNOSTIC ASSAYS**

<sup>1</sup>State Research Center of Virology and Biotechnology «Vector», Koltsovo, Novosibirsk Region; <sup>2</sup>Central Research Institute of Epidemiology; <sup>3</sup>State Institute of Occupational Health; <sup>4</sup>Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing; <sup>5</sup>Russian Medical Academy of Postgraduate Education, Moscow, Russia

Ebola virus disease is dangerous viral infection, occurring in the form of hemorrhagic fever, characterized by acute clinical symptoms and high mortality rate due to multiple organ failure. Ebola virus natural foci are located in forested areas of the central and western parts of Africa. It was believed for many years, the incidence of Ebola virus disease has been sporadic and the burden of it is true only in endemic areas. However, the unprecedented Ebola epidemic caused by Zaire virus in 2013 — 2016, has significantly changed our understanding of this disease and the patterns of its distribution. We have also identified weaknesses in the organization of anti-epidemic measures, the effectiveness of which was not very effective at the onset of the epidemic, in particular due to weak development of in vitro diagnostics (IVD). However, during the elimination of the epidemic in West Africa, anti-epidemic system has been modified substantially, largely due to quickly developed IVD kits. This review is devoted to analysis of trends in IVD for Ebola virus disease based on the experience obtained in the course of the West-African epidemic in 2013 — 2016.

Zh. Mikrobiol. (Moscow), 2018, No. 3, P. 105—116

Key words: Ebola fever, molecular diagnostics, immunochromotography, ELISA

Лихорадка Эбола — особо опасное заболевание человека и животных, этиологическими агентами которого являются вирусы рода *Ebolavirus*, принадлежащего к семейству *Filoviridae*. В настоящее время род *Ebolavirus* насчитывает пять самостоятельных видов: Заир эболавирус (*Zaire ebolavirus*, ZEBOV), Судан эболавирус (*Sudan ebolavirus*, SUDV), Бундибугё эболавирус (*Bundibugyo ebolavirus*, BDBV), Таи Форест эболавирус (*Tai Forest ebolavirus*, TAFV) и Рестон эболавирус (*Reston ebolavirus*, RESTV) [25]. Вирусы ZEBOV, SUDV и BDBV при инфицировании человека вызывают острые лихорадки, которые объединены в общую нозологическую форму, получившую название лихорадка Эбола [28]. Вирус TAFV также патогенен для человека, однако вызывает лихорадочные состояния, напоминающие клинически лихорадку денге [30]. Вирус RESTV вызывает тяжелую геморрагическую лихорадку у приматов, но не патогенен для человека [15].

Лихорадка Эбола характеризуется высокой летальностью, которая при отсутствии надлежащего лечения варьируется по разным оценкам от 65 — 75% для ZEBOV до 55 — 58% для SUDV и BDBV [28, 31]. С эпидемиологической точки зрения лихорадка Эбола является природно-очаговым зоонозом с контактным механизмом передачи. При этом в качестве наиболее вероятного резервуара для ее возбудителей принято рассматривать крыланов из подотряда *Megachiroptera* рукокрылых (*Chiroptera*), включающего единственное семейство *Pteropodidae* [4]. Однако окончательно вопрос о природном резервуаре вирусов рода *Ebolavirus* к настоящему времени не разрешен.

Впервые человечество столкнулось с лихорадкой Эбола в 1976 г., когда сначала в Судане, а затем и в республике Заир (в настоящее время Демократическая республика Конго, ДРК) возникли вспышки, вызванные вирусами SUDV и ZEBOV. Наибольшее количество пострадавших было зарегистрировано в республике Заир. Оно составило 318 случаев [12, 13]. В период с 1976 по 2013 гг. ВОЗ зарегистрировала 24 спорадические

вспышки лихорадки Эбола. При этом суммарное количество заболевших составило 1716 случаев, а летальность варьировалась в диапазоне от 25% до 90% [16]. Однако вспышка 1976 г. в ДРК до недавнего времени считалась крупнейшей.

В декабре 2013 г. на территории республики Гвинея возникла вспышка лихорадки Эбола, вызванная вирусом ZEBOV, которая распространилась на пять стран, включая Гвинею, Либерию, Нигерию, Сенегал и Сьерра Леоне. Особенностью данной вспышки, переросшей в эпидемию, стало то обстоятельство, что территорией распространения инфекции стала западная Африка, где ранее циркуляция вирусов рода *Ebolavirus* не наблюдалась. По этой причине и в силу плохого оснащения лабораторной службы выявление возбудителя произошло с большой задержкой, что привело к запаздыванию соответствующих противоэпидемических мероприятий и распространению инфекции из сельской местности на городские территории с общим количеством населения около 25 миллионов человек. Суммарное количество пострадавших в результате эпидемии 2013 — 2016 гг. составило 28 652, при этом 11 325 случаев закончилось летально [22]. Фактически, будучи занесенным в городскую черту, вирус распространялся как контактный антропоноз, при этом оценочное значение показателя базовой скорости репродукции составило около 1,8 [24].

Эпидемия лихорадки Эбола 2013 — 2016 гг. продемонстрировала слабую готовность как национальных, так и международных организаций здравоохранения к оперативному реагированию на возникающие вызовы подобного типа. Понадобилось более двух лет и усилия всего мирового сообщества, чтобы взять под контроль и ликвидировать эту эпидемию. Одной из серьезных проблем оказалось и слабое развитие средств лабораторной диагностики. Однако острая необходимость диктовала свои условия, вследствие чего за короткий промежуток времени было разработано большое количество как коммерчески доступных наборов для диагностики лихорадки Эбола, так и *in house* диагностик, основанных на различных методологических подходах. Данный обзор посвящен сравнению различных методов и средств диагностики лихорадки Эбола, применявшихся в ходе ликвидации эпидемии 2013 — 2016 гг. в Западной Африке.

*Принципы клинической лабораторной диагностики лихорадки Эбола.* Лабораторная диагностика инфекционных заболеваний базируется на двух принципиально разных подходах: молекулярном, позволяющем выявлять нуклеиновые кислоты инфекционного агента в биологическом материале, и серологическом, основанном на выявлении продуктов реакции антиген-антитело — взаимодействии антигена инфекционного агента с антителами инфицированного макроорганизма. Оба подхода имеют право на существование и в клинической практике дополняют друг друга в общем случае. Однако при диагностике острых инфекций, таких как лихорадка Эбола, эффективность применения этих подходов существенно зависит от сроков проведения анализа. Это связано с запаздыванием развития иммунного ответа на внедрение возбудителя в организм.

Клинический дебют заболевания при инфицировании вирусом Эбола сопровождается лихорадкой и астенизацией больного, обусловленных виремией [34]. Наличие вируса в периферическом кровотоке, а также и в других биологических жидкостях позволяет осуществлять прямую детекцию его молекулярных маркеров либо антигенных структур на раннем этапе заболевания [10]. Анализ вспышки лихорадки Эбола в Киквите (1995, Демократическая Республика Конго) показал, что иммуноглобулины класса М обнаруживаются практически у всех больных на 10 — 29 сутки после появления симптомов заболевания, в большом проценте случаев иммуноглобулины класса М обнаруживаются с 2 до 168 дня с появления симптомов заболевания. Иммуноглобулины класса G обнаруживаются практически у всех больных, начиная с 19 суток и до 749 (срок наблюдения) суток после появления симптомов заболевания, к моменту вероятной смерти пациента [40].

Таким образом, выявление специфических антител к вирусам Эбола хотя и воз-

можно, но, согласно рекомендациям ВОЗ, используется исключительно как подтверждающий метод, метод ретроспективной диагностики либо скрининговый метод для изучения сероконверсии в популяционных эпидемиологических исследованиях [47]. Еще одним существенным ограничением на применение серологических методов диагностики лихорадки Эбола является необходимость проведения работ в помещениях с уровнем биологической безопасности BSL-4, что практически нереализуемо в странах, где данное заболевание является эндемичным [9].

Тем не менее, в настоящее время существует большое количество серологических протоколов для диагностики лихорадки Эбола, главным образом, в формате ИФА. Часть из них была разработана еще до эпидемии 2013 — 2016 гг. и предназначалась как для специфической диагностики отдельных эболавирусов [23, 27, 43], так и для скрининговых исследований на наличие антител ко всем представителям рода *Ebolavirus* [33, 35, 41]. Другая часть была разработана непосредственно в ходе последней эпидемии [21, 26]. При этом диагностическая специфичность методов на основе ИФА достигает 96%, а диагностическая чувствительность может достигать 100% при условии проведения исследований в оптимальное время [26].

Однако не одна из данных методик не была доведена до состояния коммерчески доступной тест-системы и ни одна не была рекомендована ВОЗ для использования в качестве диагностического теста. Тем не менее, на рынке диагностических препаратов стали появляться коммерчески доступные тесты в формате ИФА, например набор на основе рекомбинантного антигена нуклеопротеина (NP) — Human Anti-Zaire Ebola virus Nucleoprotein (NP) IgG ELISA Kit (AE-320520-1, Alpha Diagnostics International, USA), либо набор Human Ebola Virus IgG (EV-IgG) ELISA Kit (MBS9391225, My Bio Source, USA) «Human Anti-ZEBOV GP IgG» (AE-320620-1, Alpha Diagnostic Intl. Inc., USA). Следует отметить, что их диагностические характеристики не определены и данные наборы могут быть использованы исключительно в научных целях.

В Российской Федерации сотрудниками ГНЦ ВБ «Вектор» разработана и зарегистрирована в 2015 году в качестве изделия медицинского назначения диагностическая система в формате ИФА на основе очищенного природного антигена вируса Эбола «Набор реагентов для иммуноферментного выявления антител классов G и M к вирусу Эбола «Вектор ИФА Эбола-АТ скрин». Данная система успешно применялась в ходе диагностических исследований, проведенных специализированной противоэпидемической бригадой Роспотребнадзора (СПЭБ) в Гвинейской Республике в 2014 — 2016 годах. При этом диагностическая специфичность системы достигала 99%, а чувствительность 98%, при доверительных вероятностях 90% [1].

*Иммунохроматографические экспресс-тесты.* «Быстрые» диагностические тесты (Rapid diagnostic tests, RDT) получили распространение в странах третьего мира, в том числе и африканских, в силу ряда неоспоримых преимуществ, а именно простоты использования, отсутствия необходимости в квалифицированном персонале и специализированном оборудовании, небольшого времени, необходимого для проведения исследования.

Принцип работы подобных тестов основан на выявлении антигенных детерминант возбудителя, связывающегося со специфическими антителами, в результате чего происходит образование иммунных комплексов. Далее иммунный комплекс вторично связывается с мечеными антивидовыми антителами против специфических антител к возбудителю. В результате реакции образуются окрашенные иммунные комплексы типа «сэндвич». Как правило, реализация работы данных тестов осуществляется в формате латеральной проточной ячейки, представляющей собой полосу фильтровальной бумаги, на которой в виде отдельных полос последовательно нанесены специфические и антивидовые антитела. Для анализа могут быть использованы любые биологические жидкости, содержащие вирус, но, как правило, используется кровь либо моча.

В ходе текущей эпидемии немецкая компания Senova GmbH активно продвигала свой быстрый хроматографический тест Dediatest — Ebola kit, выявляющий антиген VP40 вируса ZEBOV. Однако тест показал себя не с лучшей стороны и не получил одобрения ВОЗ по причине низкой чувствительности и специфичности. Другой бы-

стрый хроматографический тест ReEBOV Antigen rapid Test kit от компании Corgenix Inc., USA все же получил одобрение ВОЗ и Управления по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, USFDA) на применение данного теста при проведении диагностики в полевых условиях. Также, категорически не рекомендовано применение данного теста в аэропортах, на железнодорожных вокзалах и прочих местах массового скопления людей для экспресс-диагностики лихорадки Эбола [47]. Это связано с достаточно низкими диагностическими характеристиками разработанного теста. Хотя разработчики утверждают, что диагностическая чувствительность составляет 100% при диагностической специфичности 92,2% [5]. Это, в общем-то, является приемлемым результатом, однако следует учитывать, что при проведении испытаний тестировались положительные образцы от пациентов в разгаре заболевания, т.е. имевших высокий титр вируса в крови. В то же время, при проведении независимых испытаний в процессе аккредитации были получены следующие диагностические показатели: диагностическая чувствительность 91,8%, диагностическая специфичность 84,6%. Значение аналитической чувствительности при этом составило всего  $2,1 \times 10^8$  копий/мл [48], что в десятки тысяч раз ниже чувствительности самых худших систем молекулярной диагностики вируса Эбола.

Уже после завершения эпидемии в Западной Африке еще два хроматографических теста — OraSure Ebola Rapid Antigen test (OraSure Technologies, USA) и SD Q Line Ebola Zaire Ag (SD Biosensor, South Korea) получили одобрение ВОЗ, однако результаты тестирования «быстрыми» тестами должны обязательно быть подтверждены молекулярными методами.

*Методы диагностики на основе ОТ-ПЦР.* Применение молекулярных методов для диагностики лихорадки Эбола имеет довольно длинную историю. Еще в 1995 году во время вспышки лихорадки Эбола в Киквите (ДРК) сотрудниками CDC (Center for Disease Control and Prevention, USA) была применена ОТ-ПЦР методика с электрофоретической детекцией ПЦР-продукта, основанная на амплификации фрагментов L, GP и NP генов определенной длины [42]. Методика продемонстрировала более высокие диагностические характеристики в сравнении с методом ИФА и методами, выявляющими антиген. В 1999 году CDC рекомендовал метод ОТ-ПЦР для диагностики острых случаев лихорадки Эбола. С тех пор данная методика прочно вошла в арсенал средств диагностики лихорадки Эбола и успешно применяется до сих пор, преимущественно в формате ОТ-ПЦР в реальном времени [6].

К началу эпидемии 2013 — 2016 гг. было разработано и апробировано большое количество протоколов на основе ОТ-ПЦР как в реальном времени, так и с электрофоретической детекцией, предназначенных для диагностики как отдельных представителей рода *Ebolavirus*, так и всей совокупности известных филовирусов. При этом в качестве мишени использовались фрагменты генов полимеразы (L-ген) [37, 42], гликопротеина (GP) [14], нуклеопротеина (NP) [20] и белка VP40 [11]. В виду небольшой востребованности из коммерчески доступных наборов на рынке существовала лишь одна тест-система RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 производства компании Altona GmbH, Germany, предназначенная для видовой идентификации всех представителей семейства Filoviridae. Данная тест-система явилась результатом коммерциализации методики, разработанной институтом тропической медицины им. Бернхарда Нохта в Гамбурге и была признана «золотым стандартом» диагностики филовиральных геморрагических лихорадок [37]. Однако в ходе проведения диагностических исследований оказалось, что существующие методики требуют корректировки в виду генетических различий ранее известных штаммов ZEBOV и штамма Маккона, вызвавшего эпидемию 2013 — 2016 гг. Наличие данной проблемы было теоретически продемонстрировано в работе Gire S.K. et al. [17]. Однако авторы затруднились оценить влияние этих генетических различий на диагностические характеристики существующих методик молекулярной диагностики. Проблема варибельности в целевой области коснулась и набора компании Altona, однако данная проблема была оперативно решена производителем, и к концу 2014 года появилась обновленная версия набора RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit, а также

и набор для определения только вируса ZEBOV — RealStar® Zaire Ebola virus RT-PCR Kit.

Отсутствие надежных средств молекулярной диагностики, а также драматическое увеличение количества пострадавших в ходе эпидемии послужило стимулирующим фактором развития молекулярных методик и коммерческих наборов на их основе для диагностики лихорадки Эбола. К сожалению, из-за большого количества исследовательских групп, принимавших участие в лабораторном обеспечении мероприятий по ликвидации эпидемии на разных ее этапах, а также в силу различной национальной принадлежности и подчиненности, использовались различные протоколы диагностики, сравнительную эффективность которых оценить затруднительно. Тем не менее, *post factum* стали появляться исследования, посвященные сравнению эффективности различных протоколов диагностики лихорадки Эбола, вызванной штаммом ZEBOV Маккона. Наиболее полным исследованием подобного рода является работа швейцарских специалистов, которые провели сравнительное тестирование 11 различных методик ОТ-ПЦР детекции вируса ZEBOV [7]. Шесть методик были представлены коммерчески доступными наборами: RealStar® Filovirus Screen RT-PCR Kit 1.0 (кат № 441013, Altona, Hamburg, Germany), RealStar® Zaire Ebola virus RT-PCR Kit 1.0 (кат № 451003, Altona, Hamburg, Germany), Roche LightMix® Modular Ebola Virus Zaire (кат № 40-0666-96, Roche, Rotkreuz, Switzerland), FTD® Ebola (кат № FTD-71-64, Fast-track Diagnostics (FTD), Sliema, Malta), Lifetech Ebola Virus (Zaire 2014) и Lifetech Lyophilized Ebola Virus (Zaire2014) (кат № 4489990, Life Technologies, Waltham, USA).

В ходе испытаний было выявлено, что коммерческие наборы, принимавшие участие в исследовании, обладают лучшими характеристиками, чем *in house* методики. Наилучшие результаты показал набор Lifetech Lyophilized Ebola Virus (Zaire 2014). Его чувствительность (предел детекции) составила 62,5 копии транскрибируемого положительного РНК-контроля и 1:243 разведения сыворотки больного лихорадкой Эбола, в то время как остальные наборы имели предел детекции транскрибируемого положительного РНК-контроля от 625 до 1250 копий в мл и детектировали разведения сыворотки больного в диапазоне от 1:27 до 1:81 [7].

В Российской Федерации к началу эпидемии 2013 — 2016 гг. существовал единственный набор для диагностики лихорадки Эбола «Вектор-ПЦР<sub>РВ</sub>-Эбола-RG» [2], разработанный в ГНЦ ВБ «Вектор». Были получены данные по использованию набора для исследования лиофильно высушенного супернатанта клеток, зараженных вирусом Эбола штамм Заир, инактивированный прогреванием и  $\gamma$ -излучением. Образец (Ebola virus standard preparation for diagnostic purposes) был приготовлен институтом им. Р.Коха (Berlin, Germany) и предоставлен Европейской диагностической сетью завозных вирусных болезней (ENIVD). Специфическая активность образца подтверждена институтами Robert Koch-Institut и Bernhard-Nocht Institute, а также университетом г. Марбург (ФРГ) в реакции ПЦР. Согласно документу препарат содержит  $2 \times 10^7$  геном-эквивалентов (ГЭ) на мл вируса Эбола. Методом ПЦР РНК в нативном препарате детектируется примерно на 21 — 22 цикле (по Ct) и на 24 — 25 цикле — в разведении 1:10.

В 2014 году в связи с необходимостью лабораторно-диагностического обеспечения работы СПЭБ Роспотребнадзора в очаге лихорадки Эбола в республике Гвинея Центральным НИИ эпидемиологии была разработана и зарегистрирована диагностическая система в формате ОТ-ПЦР в реальном времени «Амплисенс EBOV(Zaire)-Fl», обладающая высокой аналитической чувствительностью (500 копий в мл), продемонстрировавшая в ходе полевых испытаний высокую диагностическую чувствительность и специфичность [8]. Кроме того, в 2016 г. в России была зарегистрирована тест-система ОМ-Скрин-Эбола Заир/Эбола Судан/Марбург-РВ, производства ЗАО «Синтол».

Помимо наборов и методик с традиционной архитектурой были разработаны также коммерческие системы, позволяющие проводить реакцию ОТ-ПЦР в автоматическом режиме — так называемые системы Lab-on-Chip. Данные системы содержат расходную часть, представляющую закрытые картриджи, содержащие в себе как реагенты для экстракции нуклеиновых кислот, так и реагенты для проведения ОТ-ПЦР

в реальном времени. Помимо картриджа для исследований также необходим специализированный прибор. В картридж посредством прокола вносится исследуемый материал, картридж помещается в прибор, после чего все стадии анализа происходят автоматически без участия оператора.

Среди разработок подобного рода наибольшую известность и распространенность получила система GeneExpert Ebola assay от компании Cepheid, USA [8], а также наборы FilmArray NGDS BT-E и FilmArray Biothreat-E test компании BioFire Defense, USA [39, 44]. Данные системы были испытаны в полевых условиях в Западной Африке и получили одобрение ВОЗ и FDA в качестве изделий медицинского назначения. Этому способствовал ряд неоспоримых преимуществ подобных изделий, а именно: простота проведения анализа, простота интерпретации результата, низкий риск кросс-контаминации, небольшое время проведения анализа (60 — 90 минут, включая этап выделения нуклеиновых кислот, против 4 часов для стандартной процедуры экстракции и ОТ-ПЦР). Последняя особенность оказалась чрезвычайно важной постольку, поскольку на Африканском континенте слабо развита электрическая сеть и нестабильная подача электричества вынуждают пользоваться портативными генераторными установками либо батареями ограниченной емкости. В этой связи, время проведения анализа становится драматически важным параметром успешного применения диагностической системы. Помимо очевидных плюсов подобные системы имеют и существенные недостатки, а именно: более низкую чувствительность по сравнению с традиционными ОТ-ПЦР системами, необходимость покупки специализированного оборудования при ограниченном выборе разработанных производителем картриджей для детекции прочих патогенных микроорганизмов, а также высокая стоимость одного исследования. Так, например, стоимость одной реакции Gene Expert Ebola assay в настоящее время составляет около 50 долларов США. Тем не менее, подобные методики могут быть использованы в полевых условиях, например, в рамках деятельности мобильных лабораторий, действующих непосредственно в эпидемиологическом очаге. Однако их применение в референсных лабораториях не обосновано в силу низкой чувствительности и высокой стоимости анализа. Скорее всего, данные методики следует рассматривать в качестве альтернативы хроматографическим тестам.

*Методы диагностики на основе альтернативных принципов амплификации.* Помимо традиционных методик на основе ПЦР/ОТ-ПЦР в последние годы активно развиваются молекулярно-диагностические методики на основе петлевой изотермической амплификации, так называемой LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) осуществляемой с помощью фермента Bst ДНК-полимеразы, представляющей собой *in silico* гомолог большой субъединицы ДНК-полимеразы I *Vacillus stearrowthermophilus*. Фермент обладает 5'-3' ДНК-полимеразной активностью и высокой вытесняющей способностью, но не проявляет 5'-3' экзонуклеазной активности. Для Bst ДНК-полимеразы характерны высокая скорость амплификации, высокая производительность, повышенная толерантность к содержанию солей и температурный оптимум активности в пределах 60 — 65°C [32]. Сочетание данных свойств позволяет осуществлять амплификацию без создания ступенчатого режима, характерного для ПЦР и, следовательно, не требует наличия такого сложного дорогостоящего оборудования, как амплификатор. Для постановки LAMP можно использовать стандартные термостатирующие приборы или даже водяную баню.

LAMP является относительно новым методом амплификации нуклеиновых кислот, который был разработан Notomi T. et al. в 2000 г. [36]. Сущность данного метода заключается в удвоении участка ДНК с высокой специфичностью, эффективностью и скоростью за счет вытесняющей активности Bst ДНК-полимеразы и образования петлевых структур в условиях постоянной температуры. К преимуществам LAMP относятся простота, скорость, высокая специфичность и чувствительность (количество ПЦР-продукта в течение 15 — 60 мин достигает  $10^9$  —  $10^{10}$  копий ДНК мишени), экономическая эффективность. В отличие от классической ПЦР в методе LAMP используется четыре либо шесть праймеров, что обеспечивает высокий уровень специфичности.

Учет результатов LAMP осуществляется по свечению интеркалирующего красителя, например SYBR Green I, добавляемого в реакционную смесь, что дает возможность визуализировать продукты реакции в ультрафиолетовом свете [45]. Данный способ пригоден для полевых исследований. Другой способ основан на колориметрической детекции (турбидиметрии) побочных продуктов реакции LAMP, в частности, ионов пирофосфата, образованием которых сопровождается синтез специфического продукта амплификации, что приводит к возрастанию оптической плотности в реакционной смеси [18]. Оба варианта детекции могут быть осуществлены как по конечной точке, так и в реальном времени с помощью специализированных приборов, например, прибора для автоматической детекции флуоресцентного сигнала Genie III (OptiGene, West Sussex, UK) при использовании интеркалирующего красителя либо турбидиметра LA-200 (Eiken Chemical Co. Ltd, Tokyo, Japan) в случае детекции ионов пирофосфата.

Возможность успешного использования LAMP либо RT-LAMP для диагностики различных патогенов человека и животных было продемонстрировано в [38].

В последующие годы было разработано большое количество коммерческих тест-систем для диагностики широкого спектра патогенов бактериальной и вирусной этиологии. В качестве основной точки приложения подобных тест-систем является так называемая диагностика point-of-care (у постели больного).

В 2007 году Kurosaki et al. разработали первую методику на основе метода RT-LAMP для диагностики ZEBOV. В качестве мишени для амплификации был выбран фрагмент гена нуклеопротеина (NP). По данным авторов аналитическая чувствительность (предел детекции, Limit of Detection, LOD) составила 20 копий в реакцию, что сравнимо с лучшими методиками на основе ОТ-ПЦР в реальном времени. Таким образом, был продемонстрирован высокий диагностический потенциал наборов с подобной архитектурой в случае детекции молекулярных маркеров ZEBOV.

Во время эпидемии 2013 — 2016 гг. методика LAMP, разработанная Kurosaki et al. также применялась в Гвинее, причем в модифицированном варианте, использующем детекцию по двум мишеням. В качестве первой мишени использовался фрагмент гена нуклеопротеина (NP), выбранный ранее, а в качестве второй — фрагмент 5'-UTR нетранслируемой области. Регистрация результата осуществлялась прибором для автоматической детекции флуоресцентного сигнала Genie III (OptiGene, West Sussex, UK) по свечению интеркалятора [29]. Методика была проверена на 100 клинических образцах (44 сыворотки и 56 буккальных соскобов) от больных с подозрением на лихорадку Эбола в Гвинее. Диагностическая специфичность данной методики для обеих мишеней составила 100%, в то время как чувствительность для фрагмента NP составила 97,9%, а для фрагмента 5'-UTR не транслируемой области — 100%. При этом время проведения реакции составляло 60 минут.

Другая методика на основе LAMP, применявшаяся в Гвинее и Сьерра-Леоне, была разработана Huan L. et al. [19]. В качестве мишени разработчики использовали фрагмент гена нуклеопротеина (NP). Детекция результатов реакции осуществлялась с помощью автоматического турбидиметра LA-200 (Eiken Chemical Co. Ltd., Tokyo, Japan) по образованию ионов пирофосфата. Реакция занимала 60 минут. Аналитическая чувствительность методики составила  $4,56 \times 10^3$  копий контрольной РНК в мл, что также сравнимо с чувствительностью методик на основе ОТ-ПЦР в реальном времени. Было показано отсутствие перекрестных реакций с другими возбудителями геморрагических лихорадок и арбовирусных инфекций.

Таким образом, методики на основе LAMP являются перспективным инструментом диагностики лихорадок, вызванных представителями семейства Ebolavirus, особенно в лабораториях со слабо развитой инфраструктурой и плохой оснащенностью, в качестве альтернативы методам на основе ОТ-ПЦР в реальном времени. Однако существует ряд опасений, ограничивающих применение данных методов. А именно, пока остается неясным влияние замен в области посадки праймеров на диагностические свойства наборов на основе LAMP. Из соображений общего характера ясно, что вероятность возникновения замен под четырьмя (шестью) праймерами, используе-

**Сравнительная характеристика коммерческих тест-систем для молекулярной диагностики лихорадки Эбола, получивших одобрение в качестве изделий медицинского назначения**

Набор	Производитель	Формат	Плексность	Мишень	Контроль	Время	Предел детекции	Одобрено
RealStar® Filovirus RT-PCR Kit 1.0 (CE-IVD)	Altona Diagnostics GmbH (Qiagen)	ОТ-ПЦР PB	Все фило-вирусы	L	†K+, ††ПКО (IVTC)*, †††ВКО (глобин)	4—6 (2)***	3,4 x10 <sup>3</sup> к/мл	ВОЗ
RealStar® Ebolavirus RT-PCR Kit 1.0 (FDA EUA)*	Altona Diagnostics GmbH (Qiagen)	ОТ-ПЦР PB	Все эбола-вирусы	L	K+, ПКО (IVTC), ВКО (глобин)	4—6 (2)	3,4 x10 <sup>3</sup> к/мл	ВОЗ
Liferiver™ Ebola virus (EBOV) real time RT-PCR kit	Shanghai ZJ Bio-Tech Co., Ltd	ОТ-ПЦР PB	Все эбола-вирусы. без дифференцировки	NP	K+, ВКО (глобин)	4—6 (2)	4,23 x10 <sup>4</sup> к/мл	ВОЗ
Xpert® Ebola Assay (Also FDA EUA)**	Cepheid	Lab-on-chip ОТ-ПЦР PB	ZEBOV	NP, GP	K+, ПКО (IVTC), ВКО (глобин)	1,5	(1,34—4,23) x10 <sup>4</sup> к/мл	ВОЗ
FilmArray Biothreat-E test	BioFire, Biomerieux	Lab-on-chip ОТ-ПЦР PB	ZEBOV	L	—	1,25	6 x10 <sup>4</sup> ФОЕ/мл = 2x10 <sup>5</sup> к/мл	USFDA
FilmArray NGDS BT-E Assay	BioFire Defense, LLC for US Dept. of Defense	Lab-on-chip ОТ-ПЦР PB	ZEBOV	NP	—	1,25	10 <sup>4</sup> ФОЕ/мл = 3,4x10 <sup>4</sup> к/мл	USFDA
LightMix® Ebola Zaire rRT-PCR test	Roche	ОТ-ПЦР PB	ZEBOV	L	K+, ПКО (IVTC), ВКО (глобин)	4—6 (1,5)	4,78 ФОЕ/мл = 2x10 <sup>4</sup> к/мл	USFDA
Вектор-ПЦР <sub>PB</sub> -Эбола-RG	ГНЦ ВБ «Вектор»	ПЦР PB	ZEBOV, SUDV	L	K+	4—6 (1,5)	2x10 <sup>3</sup> к/мл	Росздавнадзор
Ампли-сенс® EBOV (Zaire)-FL	ЦНИИЭ	ОТ-ПЦР PB	ZEBOV	L	K+, ПКО (ARPC)**, ВКО STI	4—6 (1,5)	5x10 <sup>2</sup> к/мл	Росздавнадзор
ОМ-Скрин-Эбола Заир/Эбола Судан/Марбург-PB	ЗАО «Синтол»	ОТ-ПЦР PB	ZEBOV, SUDV, MARV	—	K+, ПКО (IVTC), ВКО (глобин)	4—6 (1,5)	10 <sup>3</sup> к/мл	Росздавнадзор

Примечание. \*IVTC (полож. РНК-контроль), \*\*ARPC (полож. защищенный РНК-контроль), \*\*\*В скобках время проведения этапа ОТ-ПЦР без учета процедуры пробоподготовки, †K+ полож. контроль этапа ПЦР, ††ПКО полож. контроль ОТ-ПЦР, †††ВКО внутр. контр. образец; к/мл — копий/мл.

мыми для проведения LAMP, существенно выше, чем таковая для двух праймеров и зонда, используемых для проведения ОТ-ПЦР в реальном времени. Подобными опасениями, вероятно, обусловлено стремление Kurosaki et al. в модифицированном варианте методики использовать двухмишенную схему LAMP для повышения надежности. Однако пока отсутствуют коммерчески доступные LAMP наборы для диагностики лихорадки Эбола.

Подводя итог выше сказанному, следует отметить, что в настоящее время клиническая лабораторная диагностика лихорадки Эбола может быть осуществлена с помощью наборов на основе метода ОТ-ПЦР в реальном времени либо с помощью «быстрых» хроматографических тестов. При этом результаты иммунохроматографии

должны быть обязательно подтверждены методом ОТ-ПЦР. В качестве «золотого стандарта» ОТ-ПЦР диагностики принято рассматривать наборы производства компании Altona Diagnostics GmbH, Germany. На момент написания данного обзора ВОЗ одобрила применение пяти наборов на основе метода ОТ-ПЦР в реальном времени и три иммунохроматографических теста, USFDA одобрила применение шести наборов на основе метода ОТ-ПЦР и два иммунохроматографических теста. В Российской Федерации зарегистрированы три набора на основе ПЦР/ОТ-ПЦР в реальном времени.

Сравнительные характеристики тест-систем для молекулярной диагностики лихорадки Эбола, получивших одобрение тех или иных разрешающих инстанций, в качестве изделий медицинского назначения представлены в табл. Аккредитованные наборы имеют достаточно широкий диапазон чувствительности, от 500 копий в мл до  $4,2 \times 10^4$  копий в мл. Тем не менее, даже наименее чувствительные из них вполне пригодны для диагностических целей, так как уже на ранних этапах заболевания содержание вирусных частиц в периферическом кровотоке больных достигает значений  $10^7$  копий/мл и выше [46]. В качестве мишеней для амплификации разработчики использовали различные фрагменты генома вируса Эбола, большей частью фрагменты L-гена, кодирующего РНК-зависимую РНК-полимеразу. Это связано с высокой консервативностью данного гена. Однако диагностикумы, основанные на использовании в качестве мишени фрагментов генов GP (гликопротеина) и NP (нуклеопротеина) также разработаны и имеют право на существование, поскольку сравнительным анализом изолятов ZEBOV показано чередование участков высокой и низкой гомологии на всем протяжении генома [17]. Поэтому не существует особых ограничений при выборе областей генома, которые могут быть использованы в качестве мишеней для ПЦР. Тем не менее, ряд разработчиков в своих тест-системах для большей надежности используют сразу две мишени [7], а некоторые диагностические лаборатории в ходе работы применяют одновременно две и более диагностические системы или методики.

В Российской Федерации также продолжают работы по совершенствованию диагностических систем на основе молекулярных методик для детекции возбудителей филовиральных лихорадок. В частности в Центральном НИИ эпидемиологии разработаны и готовятся к проведению клинических испытаний наборы в формате мультипрайм ОТ-ПЦР в реальном времени для дифференциальной диагностики вирусов ZEBOV, SUDV и MARV — «Амплисенс® Filoscreen A-Fl» и вирусов BDBV, TAFV и RESTV — «Амплисенс® Filoscreen B-Fl» [48]. В ГНЦ ВБ «Вектор» ведутся разработки диагностических систем для обнаружения вируса Эбола на основе методики LAMP и xMAP технологий [3].

Таким образом, Российская Федерация располагает необходимым набором диагностических средств собственного производства, по своим характеристикам не уступающих лучшим мировым аналогам, что позволяет с большим запасом прочности осуществлять надзорные мероприятия по недопущению завоза на территорию нашей страны особо опасных филовиральных лихорадок, а также оказывать помощь в проведении подобных мероприятий другим странам в рамках существующих международных соглашений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пьянков С.А., Пьянков О.В., Найденова Е.В., Агафонов А.П., Воиро М.У., Солодкий В.В., Зайковская А.В., Максимов Н.Л., Маренникова С.С., Бочаров Е.Ф., Офицеров В.И., Лопатин А.А., Щербакова С.А., Кутырев В.В., Михеев В.Н., Демина Ю.В. Опыт использования метода ИФА для выявления антител к вирусу Эбола при работе бригады СПЭБ в республике Гвинея. Проблемы особо опасных вирусных инфекций. 2016, 3: 71-75.
2. РУ № РЗН 2013/1322 на медицинское изделие «Набор реагентов для амплификации кДНК вируса Эбола (Заир, Судан) с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени (для приборов Rotor Gene 6000) «Вектор ПЦР РВ-Эбола-RG» по ТУ 9398-017-05664012-2011.

3. Терновой В.А., Семенцова А.О., Чуб Е.В., Пьянков О.В., Локтев В.Б., Агафонов А.П. Высокоэффективное xMAP-мультиплексирование для обнаружения и идентификации геморрагических лихорадок, включая Эбола. Проблемы особоопасных инфекций. 2015, 3: 94-97.
4. Щелканов М.Ю., Магассуба Н.Ф., Дедков В.Г., Шипулин Г.А., Галкина И.В., Попова А.Ю., Малеев В.В. Природный резервуар филовирюсов и типы связанных с ними эпидемических вспышек на территории Африки. Вестник РАМН. 2017, 72 (2): 112-119. doi: 10.15690/vramn803.
5. Boisen M.L., Cross R.W., Hartnett J.N. et al. Field validation of the ReEBOV Antigen Rapid Test for Point-of-Care Diagnosis of Ebola Virus Infection. *J. Infect. Dis.* 2016, 214 (Suppl. 3): S203-S209.
6. Broadhurst M.J., Brooks T.J., Pollock N.R. Diagnosis of Ebola Virus Disease: Past, Present, and Future. *Clin. Microbiol. Rev.* 2016, 29 (4): 773-793. doi: 10.1128/CMR.00003-16.
7. Cherpillod P., Schibler M., Vieille G. et al. Ebola virus disease diagnosis by real-time RT-PCR: A comparative study of 11 different procedures. *J. Clin. Virol.* 2016, 77: 9-14.
8. Dedkov V.G., Magassouba N.F., Safonova M.V. et al. 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.
9. de La Vega M.-A., Bello A., Chaillet P. et al. Diagnosis and management of Ebola samples in the laboratory. *Expert Review of Anti-infective Therapy.* 2016, doi: 10.1080/14787210.2016.1176912.
10. El Sayed S.M., Abdelrahman A.A., Ozbak H.A. et al. Updates in diagnosis and management of Ebola hemorrhagic fever. *J. Res. Med. Sci.* 2016, 21: 84. doi: 10.4103/1735-1995.192500. eCollection 2016.
11. Erickson B.R., Sealy T.K., Flietstra T. et al. Ebola virus disease diagnostics, Sierra Leone: Analysis of Real-time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction Values for Clinical Blood and Oral Swab Specimens. *J. Infect. Dis.* 2016, 214, Suppl. 3: S258-S262.
12. Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. Report of an International Commission. *Bull World Health Organ.* 1978, 56 (2): 271-293.
13. Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of a WHO / International study team. *Bull World Health Organ.* 1978, 56 (2): 247-270.
14. Gibb T.R., Norwood D.A., Jr., Woollen N. et al. Development and evaluation of a fluorogenic 5' nuclease assay to detect and differentiate between Ebola virus subtypes Zaire and Sudan. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39: 4125-4130.
15. Geisbert T.W., Jahrling P.B. Use of immunoelectron microscopy to show Ebola virus during the 1989 United States epizootic. *J. Clin. Pathol.* 1990, 43 (10): 813-816. doi: 10.1136/jcp.43.10.813.
16. Gilbert S.C., Warimwe G.M. Rapid development of vaccines against emerging pathogens: The replication-deficient simian adenovirus platform technology. *Vaccine.* 2017, 35: 4461-4464. doi: 10.1016/j.vaccine.2017.04.085.
17. Gire S.K., Goba A., Andersen K.G. et al. Genomic surveillance elucidates Ebola virus origin and transmission during the 2014 outbreak. *Science.* 2014, 345 (6202): 1369-1372. doi:10.1126/science.1259657.
18. Goto M., Honda E., Ogura A. et al. Colorimetric detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by using hydroxynaphthol blue. *Biotechniques.* 2009, 46: 167-172.
19. Huan L., Wang H., Wei L. et al. Survey and visual detection of Zaire ebolavirus in clinical samples targeting the nucleoprotein gene in Sierra Leone. *Frontiers in Microbiology.* 2015, 6: 1332-1339.
20. Huang Y., Wei H., Wang Y. et al. Rapid detection of filoviruses by real-time TaqMan polymerase chain reaction assays. *Virol. Sin.* 2012, 27: 273-277.
21. Huang Y., Zhu Y., Yang M. et al. Nucleoprotein-based indirect enzyme-linked immunosorbent assay (indirect ELISA) for detecting antibodies specific to Ebola virus and Marburg virus. *Virol. Sin.* 2014, 29: 372-380 14.
22. <https://www.cdc.gov/vhf/ebola/outbreaks/history/chronology>.
23. Ikegami T., Saijo M., Niikura M. et al. Immunoglobulin G enzyme-linked immunosorbent assay using truncated nucleoproteins of Reston Ebola virus. *Epidemiol. Infect.* 2003, 130: 533-539.
24. Jiang S., Wang K., Li C. et al. Mathematical models for devising the optimal Ebola virus disease eradication. *J. Transl. Med.* 2017, 15 (1): 124-134. doi: 10.1186/s12967-017-1224-6.
25. King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B. et al. Virus taxonomy, classification and nomenclature of viruses. Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, 2012.
26. Kraehling V., Becker D., Rohde C. et al. Development of an antibody capture ELISA using inactivated Ebola Zaire Makona virus. *Med. Microbiol. Immunol.* 2015, 205 (2): 173-183. doi: 10.1007/s00430-015-0438-6.

27. Ksiazek T.G., West C.P., Rollin P.E. et al. ELISA for the detection of antibodies to Ebola viruses. *J. Infect. Dis.* 1999, 179 (Suppl. 1): S192-S198.
28. Kuhn H.J., Dodd E.L., Wahl-Jensen V. et al. Evaluation of perceived threat differences posed by filovirus variants. *Biosec. Bioterr.* 2011, 9 (4): 361-371.
29. Kurosaki Y., Magassouba N., Oloniniyi O.K. et al. Development and evaluation of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay coupled with a portable device for rapid diagnosis of Ebola virus diseases in Guinea. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2016, 10:e004472. DOI:10.1371/journal.pntd.0004472.
30. Le Guenno B., Formenty P., Wyers M. et al. Isolation and partial characterisation of a new strain of Ebola virus. *Lancet.* 1995, 345 (8960): 1271-1274. doi: 10.1016/s0140-6736(95)90925-7.
31. Lefebvre A., Fiet C., Belpois-Duchamp C. et al. Case fatality rates of Ebola virus diseases: A meta-analysis of World Health Organization data. *Med. Mal. Infect.* 2014, 44 (9): 412-416.
32. Ma Y., Zhang B., Wang M. et al. Enhancement of polymerase activity of the large fragment in DNA polymerase I from *Geobacillus stearothermophilus* by Site-Directed Mutagenesis at the active site. *Biomed Res. Int.* 2016, 2016: 2906484.
33. Macneil A., Reed Z., Rollin P.E. Serologic cross-reactivity of human IgM and IgG antibodies to five species of Ebola virus. *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2011, 5: e1175 17.
34. Marie-Astrid Vernet M., Reynard S., Fizet A. et al. Clinical, virological, and biological parameters associated with outcomes of Ebola virus infection in Macenta, Guinea. *JCI Insight.* 2017, 2 (6): e88864. doi: 10.1172/jci.insight.88864.
35. Nakayama E., Yokoyama A., Miyamoto H. et al. Enzyme linked immunosorbent assay for detection of filovirus species specific antibodies. *Clin. Vaccine Immunol.* 2010, 17: 1723-1728.
36. Notomi T., Okayama H., Masubuchi H. et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic Acids Res.* 2000, 28: E63.
37. Panning M., Laue T., Olschlager S. et al. Diagnostic reverse-transcription polymerase chain reaction kit for filoviruses based on the strain collections of all European biosafety level 4 laboratories. *J. Infect. Dis.* 2007; 196 (Suppl. 2): S199-S204.
38. Parida M., Posadas G., Inoue S. et al. Real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of West Nile virus. *J. Clin. Microbiol.* 2004, 42: 257-263.
39. Pinsky B.A., Sahoo M.K., Sandlund J. et al. Analytical performance characteristics of the Cepheid GeneXpert Ebola Assay for the detection of Ebola virus. *PLoS One.* 2015, 10 (11): e0142216.
40. Rowe A.K., Bertolli J., Khan A.S. et al. Clinical, virologic, and immunologic follow-up of convalescent Ebola hemorrhagic fever patients and their household contacts, Kikwit, Democratic Republic of the Congo. *Commission de Lutte contre les Epidemies à Kikwit. J. Infect. Dis.* 1999, 179 (Suppl. 1): S28-35.
41. Saijo M., Niikura M., Morikawa S. et al. Enzyme-linked immunosorbent assays for detection of antibodies to Ebola and Marburg viruses using recombinant nucleoproteins. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39 (1): 1-7.
42. Sanchez A., Ksiazek T.G., Rollin P.E. et al. Detection and molecular characterization of Ebola viruses causing disease in human and nonhuman primates. *J. Infect. Dis.* 1999, 179 (Suppl 1): S164-169.
43. Sobarzo A., Perelman E., Groseth A. et al. Profiling the native specific human humoral immune response to Sudan Ebola virus strain Gulu by chemiluminescence enzyme-linked immunosorbent assay. *Clin. Vaccine Immunol.* 2012, 19: 1844-1852.
44. Southern T.R., Racsá L.D., Albari o C.G. et al. Comparison of FilmArray and quantitative real-time reverse transcriptase PCR for detection of Zaire Ebola virus from contrived and clinical specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2015, 53 (9): 2956-2960.
45. Tomita N., Mori Y., Kanda H., Notomi T. Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products. *Nat Protoc.* 2008, 3: 877-882.
46. Towner J.S., Rollin P.E., Bausch D.G. et al. Rapid diagnosis of Ebola hemorrhagic fever by reverse transcription-PCR in an outbreak setting and assessment of patient viral load as a predictor of outcome. *J. Virol.* 2004, 78: 4330-4341.
47. World Health Organization, 2015a. Selection and use of Ebola in vitro diagnostic assays. Emergency guidance. <http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/ivd-assays/en/> (29.06.2016).
48. World Health Organization (2015b). Annex. 2. Considerations for the selection of PCRs for the diagnosis of Ebola disease. <http://www.who.int/csr/resources/publications/ebola/ivd-assays/en/> (29.06.2016).

*Поступила 30.10.17*

Контактная информация: Семенцова Александра Олеговна,  
630559, Кольцово, Новосибирская обл.