

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредитель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

Издатель

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии

www.iacmac.ru

Журнал зарегистрирован Комитетом РФ по печати 30.09.1999 г. (№019273) Тираж 3000 экз.

Подписка на сайте издателя
<https://service.iacmac.ru>

Адрес для корреспонденции
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: (4812)45 06 02

Электронная почта:
info@cmac-journal.ru

Электронная версия журнала:
<https://cmac-journal.ru>

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование. Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несет рекламодатель

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2023.

Содержание

Болезни и возбудители

- Носова А.О., Богословская Е.В., Шипулин Г.А.
4 Современные подходы и перспективы развития лабораторной диагностики кори
- Каюмов К.А., Лямин А.В., Жестков А.В., Бажутова И.В.
13 *Fusobacterium nucleatum*: от классического пародонтопатогена до полноценного участника канцерогенеза

Антимикробные препараты

- Попов Д.А., Зубарева Н.А., Паршаков А.А.
19 Азтреонам: клиничко-фармакологическая характеристика на современном этапе
- Мишинова С.А., Сыраева Г.И., Колбин А.С., Полушин Ю.С., Вербицкая Е.В.
26 Отчет данных российской базы по нежелательным явлениям лекарственных средств, применяемых при новой коронавирусной инфекции (COVID-19), с акцентом на фавипиравир
- Скрябина А.А., Никифоров В.В., Шахмарданов М.З., Застрожин М.С., Скрябин В.Ю., Сычев Д.А.
34 Нежелательные реакции, возникающие на фоне терапии макролидами: анализ спонтанных сообщений по данным подсистемы «Фармаконадзор»
- Стецюк О.У., Коваленко Т.Н., Андреева И.В., Белькова Ю.А.
41 Неизвестное об известном: комбинации цефалоспоринов III–IV поколения с сульбактамом
- Мустафин Р.Н.
56 Перспективы применения статинов в противовирусной терапии

Антибиотикорезистентность

- Виноградова А.Г., Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Эйдельштейн М.В., Сухорукова М.В., Старостенков А.А.
68 AMRexpert – онлайн-платформа для интерпретации, верификации и валидации результатов определения чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам

Опыт работы

- Гордина Е.М., Божкова С.А., Лабутин Д.В., Гончарук Д.А., Ткач Е.Н.
77 Антистафилококковая активность и цитосовместимость лизостафина
- Куркова А.А., Рачина С.А., Козлов Р.С., Портнягина У.С., Палютин Ш.Х., Решетько О.В., Журавлева М.В., Карпова О.Ю., Мягкова О.Г., Кузнецова Е.В., Каменева Т.Р.
84 Исследование отпуска антимикробных препаратов аптечными организациями Российской Федерации во время пандемии COVID-19
- Сафонова К.А., Дехнич Н.Н., Елистратов Н.Д., Ржевцева Е.Д., Филина П.Г., Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Пунин А.А.
93 Факторы риска летального исхода COVID-19 у госпитализированных пациентов: результаты ретроспективного исследования
- Жилинский М.Ю., Мухина Н.В., Комарова И.С., Рачина С.А., Черкасова Н.А., Борисов А.Б., Федина Л.В., Насрулова С.М.
100 Клинический случай инфекционного эндокардита, вызванного *Klebsiella pneumoniae*, у пациента с острым инфарктом миокарда без подъема сегмента ST
- Овсянников Н.В., Билевич О.А., Бережной В.Г., Романовская Е.В., Зятьков И.Н., Минькович О.П., Ештокин Д.И.
106 Аспергиллома легкого после перенесенного COVID-19: клинический случай и обзор литературы

Современные подходы и перспективы развития лабораторной диагностики кори

Носова А.О., Богословская Е.В., Шипулин Г.А.

ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, Москва, Россия

Контактный адрес:

Анастасия Олеговна Носова
Эл. почта: ANosova@cspfmba.ru

Ключевые слова: корь, *Measles morbillivirus*, диагностика, ОТ-ПЦР в реальном времени, иммуноферментный анализ (ИФА).

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Вирус кори вызывает острое инфекционное заболевание, обладающее высокой контагиозностью. Ограничение распространения вируса кори возможно только при достаточно широком охвате населения вакцинацией. Несмотря на успехи, достигнутые при проведении программ по элиминации кори, во многих странах в последние годы наблюдается рост заболеваемости, в связи с чем растет актуальность ранней диагностики. Важность проведения лабораторной диагностики связана со сложностями клинической дифференциальной диагностики кори на ранних этапах заболевания. Настоящий обзор посвящен анализу существующих методов диагностики кори. Продемонстрированы ограничения при применении наиболее часто используемого метода – иммуноферментного анализа, а также необходимость разработки и внедрения альтернативных методов диагностики этого заболевания.

Особое внимание в обзоре уделено молекулярно-генетическим методам диагностики, чувствительность которых рассматривается на примере изучения различных видов биологического материала, отобранных на разных стадиях заболевания. Описаны особенности вируса кори, имеющие ключевое значение при разработке ПЦР тестов. Приведены исследования, оценивающие значимость внедрения ПЦР в рутинную диагностику кори.

Основными преимуществами молекулярных методов являются возможность раннего выявления вируса и возможность одновременного обнаружения нескольких патогенов, что позволяет провести дифференциальную диагностику заболеваний со схожей клинической картиной. Разработка и внедрение в практическое звено здравоохранения быстрых и точных подходов на основе методов молекулярной диагностики является насущной задачей в рамках осуществления мировых и отечественной программ по элиминации кори.

Review

Current approaches and prospects for the development of laboratory diagnosis of measles

Nosova A.O., Bogoslovskaya E.V., Shipulin G.A.

Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia

Contacts:

Anastasiia O. Nosova
E-mail: ANosova@cspfmba.ru

Key words: measles, *Measles morbillivirus*, diagnosis, real-time polymerase chain reaction, enzyme-linked immunosorbent assay.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

Measles virus causes an acute infectious disease with high contagiousness. It is possible to limit the spread of measles virus only with a sufficiently wide coverage of the population by vaccination. Despite the success of measles elimination programs, many countries have seen an increase in the incidence of measles in recent years, making early diagnosis increasingly important. The importance of laboratory diagnosis is related to the difficulties of clinical differential diagnosis of measles in the early stages of the disease.

This review is devoted to an analysis of existing methods for diagnosing measles. It demonstrates the limitations of the most commonly used method, the enzyme immunoassay, and the need to develop and implement alternative diagnostic methods. Particular attention in the review is paid to molecular diagnostic methods, the sensitivity of which is reviewed for different types of biological sampled at different stages of the disease. Characteristics of the measles virus that are of key importance in the development of PCR tests are described. Studies evaluating the significance of introducing PCR in the routine diagnosis of measles are presented.

The main advantages of molecular methods are the possibility of early detection of the virus and the possibility of simultaneous detection of several pathogens, which allows differential diagnosis of diseases with a similar clinical presentation. The development and implementation of rapid and accurate approaches based on molecular diagnostic methods into the health care system is an urgent need in the implementation of global and local programs for the elimination of measles.

Введение

Корь – острое инфекционное заболевание, вызываемое вирусом *Measles morbillivirus*, которое характеризуется чрезвычайно высокой контагиозностью [1].

До введения в 1963 г. массовой вакцинации против кори ежегодно во всем мире погибало более 2 млн человек из 30 млн инфицированных лиц [2].

В СССР массовая вакцинопрофилактика кори среди детского населения живой коревой вакциной (ЖКВ), полученной из штамма Ленинград-16, началась с 1967 г. [3]. После 1987 г. схема иммунизации ЖКВ приобрела двухэтапный формат: вакцинация в 12 месяцев и ревакцинация в 6 лет [4].

Проводимые по всему миру мероприятия по профилактике и усиленному контролю за заболеваемостью позволили значительно снизить общее количество случаев кори, что привело к 73% уменьшению смертности в период с 2000 по 2018 г. [5]. Например, показатель заболеваемости в России с 2007 по 2010 г. был менее 1,0 случая на 1 млн населения [4].

Однако, начиная с 2017 г., наблюдался рост заболеваемости корью, по-видимому связанный со снижением уровня охвата вакцинацией. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире в 2017 г. зарегистрировано 173457 случаев кори, в 2018 г. уже 360296 и в 2019 г. число заболевших достигло 539061 [6]. В России, согласно государственному докладу «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году», отмечался рост заболеваемости корью в 1,8 раз по сравнению с 2018 г., а число зарегистрированных случаев составило 4491 [7]. В 2020 г. по данным национального научно-методического центра по надзору за корью и краснухой (ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора) было выявлено всего 1212 случаев кори [8]. Снижение заболеваемости объясняется начавшейся пандемией COVID-19 и связанными с ней ограничениями. В то же время в связи с приостановкой в ряде стран мира плановой вакцинации детей от кори из-за пандемии SARS-CoV-2 возросло число уязвимого населения, а соответственно увеличился риск возникновения вспышек кори [9].

Стоит отметить, что для России большую угрозу могут представлять потоки мигрантов и беженцев, в частности, по данным ООН по состоянию на 19.07.2022 из Украины в Россию прибыло порядка 1,8 млн беженцев [10]. При этом в Европейском регионе по данным ВОЗ именно на Украине была зарегистрирована самая неблагоприятная ситуация по кори, связанная с низким охватом вакцинацией в последние годы (в 2019 г. было зарегистрировано более 57000 случаев кори) [6]. Такая ситуация может в ближайшее время привести к значительному росту заболеваемости корью в России.

Поскольку корь высококонтагиозное заболевание, для элиминации кори требуется высокий уровень популяционного иммунитета. Расчетный уровень популяцион-

ного иммунитета от 89% до 94% является достаточным для ограничения распространения вируса кори, а охват вакцинацией второй дозой вакцины рекомендуется поддерживать на уровне не менее 95% населения [2].

На основании анализа опубликованных данных за период 2011–2020 гг. был подсчитан средний уровень популяционного иммунитета к кори в России, который составил 75,4% у взрослых и 61,7% у детей до 17 лет [11]. Доля серопозитивных лиц среди медицинских работников оказалась выше, чем в целом в популяции взрослого населения и составила в среднем 84,5%. Указанные данные свидетельствуют о значительной доли серонегативных лиц среди населения России, особенно среди детей.

Для элиминации кори, на сегодняшний момент, помимо увеличения количества вакцинированного населения, необходимо также предпринимать меры для предотвращения передачи вируса кори. Инфицированные лица могут быть источником заболевания в период от 4 дней до и 4 дней после появления сыпи [2]. В связи с этим крайне важна ранняя диагностика кори и изоляция пациента для снижения контактов с восприимчивым населением.

В настоящем обзоре рассмотрены различные методы лабораторной диагностики кори, их особенности, преимущества и недостатки.

Вирус кори

Вирус кори имеет липидную оболочку и одноцепочечную линейную РНК с негативной полярностью. Геном имеет шесть структурных белков: нуклеопротеин (N), матричный белок (M), белок слияния (F), гемагглютинин (H), большой белок (L) и фосфопротеин (P), ген которого также кодирует неструктурные белки V и С [2]. Разделение штаммов вируса кори на 8 клад, объединяющих 24 генотипа, основано на различиях в последовательностях генов гемагглютинина и нуклеопротеина [12]. По данным глобальных отчетов ВОЗ о кори и краснухе [13] в мире с апреля 2018 по март 2019 г. из 24 известных генотипов циркулировали генотипы В3, D4, D8, H1. В период с апреля 2021 по март 2022 г. детектировали только штаммы вируса кори генотипов В3 и D8. В России в период с 2016 по 2020 г. по данным национального научно-методического центра по надзору за корью и краснухой были зарегистрированы генотипы D8, В3, H1, но преобладал D8 [4, 8].

Однако клиническое течение заболевания не зависит от генотипа вируса. Более того, все вакцинные штаммы получены на основе генотипа А, который в популяции больше не циркулирует, при этом антитела, образующиеся после вакцинации, эффективны в отношении всех генотипов вируса. Объясняется это отчасти тем, что часть антител направлена на консервативные области белка гемагглютинина с ограниченными возможностями для изменчивости [2].

Патогенез

Изучение патогенеза кори, механизмов и динамики иммунного ответа, процесса выведения вируса из организма основано на исследованиях клинических образцов людей, инфицированных вирусом естественным путем, а также на данных, полученных в процессе экспериментального заражения макак-резусов и яванских макак, у которых развитие инфекции, вызванной вирусом кори, схоже с патогенезом в организме человека [14].

Наиболее распространенный путь передачи коревой инфекции – воздушно-капельный [1]. Попадая в организм, вирус связывается гемагглютинином с рецепторами клеток. Данное взаимодействие запускает конформационные изменения в трансмембранном белке F, что способствует слиянию вирусной оболочки с плазматической мембраной и высвобождению рибонуклеиновых комплексов в цитоплазму клетки [2].

Для проникновения в клетки вирус кори использует сигнальную молекулу активации лимфоцитов (SLAM), которую экспрессируют макрофаги, зрелые дендритные клетки, тимоциты, лимфоциты, тромбоциты и клетки Лангерганса; мембранный кофакторный белок (CD46), экспрессируемый всеми клетками, имеющими ядро, и нектин-4, присутствующий на эпителиальных клетках. Также возможно используются другие дополнительные рецепторы для инфицирования эндотелиальных клеток и клеток центральной нервной системы [15].

Распространение вируса по организму человека начинается с захвата вируса незрелыми легочными дендритными клетками или альвеолярными макрофагами в дыхательных путях и дальнейшей транспортировки вируса в регионарные лимфатические узлы. Иммунные клетки, имеющие рецепторы SLAM в лимфоидной ткани, являются основными местами размножения вируса. На 5–7 день после заражения инфицированные иммунные клетки, такие как В-клетки, CD4+ и CD8+ Т-клетки памяти, моноциты попадают в кровоток и распространяют вирус в лимфоидные органы, (селезенку, тимус, лимфатические узлы) и нелимфоидные, такие как кожу, конъюнктивы, почки, легкие, печень [1, 16]. Репликация вируса в респираторном тракте приводит к появлению кашля и насморка [1]. Сыпь появляется через 3–4 дня после начала лихорадки [1, 17] (Рисунок 1). После появления лихорадки и сыпи в организме начинается процесс элиминации вируса. И уже через несколько дней после исчезновения сыпи вирус из крови и респираторного тракта не может быть выделен в культуре клеток, однако РНК вируса кори может детектироваться в монулеарных клетках периферической крови, в моче и носоглоточных мазках в течение 2–4 месяца после появления сыпи [14, 18], что может свидетельствовать о длительной персистенции вируса.

Динамику снижения концентрации РНК вируса кори в крови изучали на модели макак-резусов [19]. В период с 10 по 14 день после инфицирования наблюдалось резкое падение концентрации РНК, связанное с выведением вируса из организма. В дальнейшем происходило

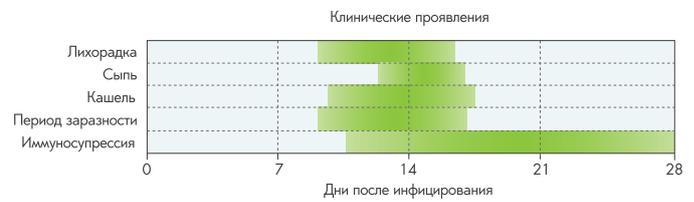


Рисунок 1. Патогенез кори

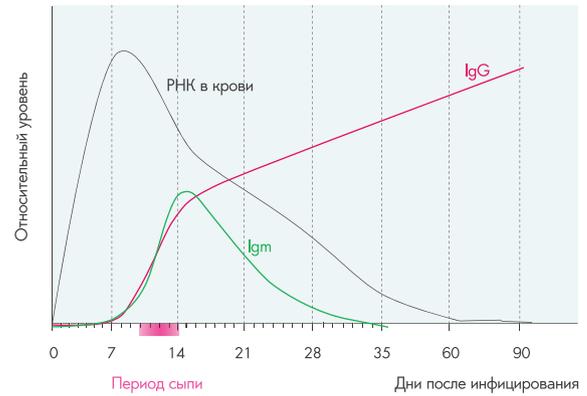


Рисунок 2. Гуморальный ответ и динамика концентрации РНК вируса кори в крови инфицированных макак-резусов

плавное снижение концентрации РНК до недетектируемого уровня вплоть до 50 дня заболевания (Рисунок 2). В лимфоидных органах РНК вируса кори обнаруживалась через 71 день заболевания. Исследователи предполагают, что пожизненный иммунитет после инфекции вирусом кори может быть следствием длительной антигенной стимуляции.

Одной из важнейших особенностей патогенеза кори является развитие иммунодефицита. В работе Mina M. и соавт. [20] было показано, что репликация вируса кори в организме приводит к сокращению разнообразия репертуара антител в результате уменьшения количества клеток, продуцирующих соответствующие антитела, что в свою очередь вызывает длительную иммуносупрессию. Через 2 месяца после заражения вирусом кори разнообразие антител уменьшалось на 40% от их общего исходного репертуара. Этим может объясняться факт частых инфекционных осложнений в период выздоровления. Возвращение иммунного репертуара к исходному уровню может длиться месяцы или даже годы.

Большая часть инфицированных пациентов выздоравливает без осложнений примерно в течение 1 недели [1]. Приблизительно 30% зарегистрированных случаев кори связаны с одним или несколькими осложнениями. В развитых странах наиболее распространенные осложнения – средний отит (7–9%), пневмония (1–6%), диарея (6%). Риск серьезных осложнений кори выше у детей до года и взрослых пациентов [21]. У взрослых корь протекает с более высокой температурой и явно выраженным синдромом интоксикации по сравнению с детьми.

В то же время риск более серьезных осложнений, в числе которых острый диссеминированный энцефа-

ломиелит (acute disseminated encephalomyelitis, ADEM), подострый склерозирующий панэнцефалит (subacute sclerosing panencephalitis, SSPE) и подострый прогрессирующий энцефалит с клеточными включениями (measles inclusion body encephalitis, MIBE), связан с поражением вирусом кори центральной нервной системы [22]. У взрослых данные осложнения встречаются редко [3].

ADEM возникает через 5–6 дней после первоначальной сыпи примерно у 1 из 1000 инфицированных детей. Реже встречается у вакцинированных и детей до 2 лет. Симптомы возникают после исчезновения первоначальной сыпи и состоят из внезапного рецидива лихорадки, спутанности сознания, судорог и многоочаговых неврологических симптомов.

SSPE и MIBE являются редкими поздними осложнениями кори (отмечается примерно у 1 из 10000 пациентов) и могут возникать через месяцы или даже годы после острой инфекции и часто приводят к летальному исходу. В основе обоих заболеваний лежит персистирующая инфекция вируса кори в клетках головного мозга, где могут быть инфицированы нейроны, глиальные клетки и эндотелиальные клетки [22, 23].

Диагностика

До появления вакцины, когда заболеваемость корью была крайне высокой, постановка диагноза основывалась на характерных клинических проявлениях данного заболевания. Классические симптомы кори включают в себя четырехдневную лихорадку (температура нередко достигает 40°C), кашель, насморк и конъюнктивит, а также пятнисто-папулезная сыпь. Патогномичным симптомом кори считаются так называемые пятна Бельского – Филатова – Коплика. Регистрируются также и атипичные формы кори, при которых симптомы могут быть слабо выражены или отсутствовать вовсе [3]. На сегодняшний момент, когда реализуемые программы по элиминации кори привели к значительному снижению уровня заболеваемости, диагностика кори по клинической картине, особенно в первые дни заболевания, мало информативна, так как ранние симптомы часто напоминают острые респираторные заболевания [2]. Клинические проявления схожи с симптомами инфекционных заболеваний, вызываемых вирусами краснухи, денге; энтеровирусами (в том числе эховирусами и Коксаки), аденовирусами, парвовирусом B19, эховирусами, Коксаки, вирусом герпеса б типа и некоторыми бактериальными, риккетсиозными инфекциями [1]. В этой связи для ранней диагностики кори на первый план выходят различные лабораторные методы.

Для лабораторного подтверждения случаев кори ВОЗ [24] рекомендует использовать иммуноферментный анализ (ИФА) для выявления специфических иммуноглобулинов класса M (IgM) к вирусу кори или исследования парных образцов сывороток на наличие диагностически значимого повышения титра иммуноглобулинов класса G (IgG), выявление РНК вируса кори методом полимеразной цепной реакции (ПЦР), а также обнаружение антигена методом иммунофлуоресценции.

Для исследования парных образцов сывороток на наличие диагностически значимого повышения титра IgG-антител отбор клинического материала проводится в течение 4–7 дня после появления сыпи и через 14–21 дней после получения первого образца [25]. Необходимость нескольких этапов отбора проб, а также получение результата исследования уже после выздоровления пациента ограничивает использование данного подхода только в рамках эпидемиологического надзора, в то время как для диагностики кори его применение не представляется возможным.

Наиболее широко используемым методом лабораторной диагностики кори как в мире, так и в России является ИФА, направленный на выявление IgM [25]. Наиболее распространенные форматы коммерческих наборов ИФА для выявления антител к вирусу кори используют метод двойного сэндвича (capture) и непрямой метод (indirect). Метод двойного сэндвича использует иммобилизованные антитела (чаще всего кроличьи или козы), специфичные к IgM человека. В процессе реакции данные антитела специфически связывают человеческие IgM из исследуемого образца сыворотки, которые в свою очередь захватывают вносимый рекомбинантный антиген кори. Связавшийся антиген детектируется за счет связывания биотинилированного моноклонального антитела против кори и стрептавидина меченного пероксидазой хрена. Кроме того, разработан вариант метода двойного сэндвича с выявлением человеческих IgM против кори с помощью антигена, напрямую связанного с ферментом.

В непрямом методе на подложку иммобилизуют рекомбинантный антиген, с которым связываются специфические к кори IgM из сыворотки, после чего добавляют меченные ферментом анти-иммуноглобулины [26].

Ранее было проведено несколько исследований по сравнению наборов реагентов разного формата как в России, так и за рубежом, которые продемонстрировали наличие значительных отличий в их диагностических показателях [27, 28].

В рамках оценки наборов, используемых российской лабораторной сетью по надзору за корью и краснухой [27], были протестированы наборы непрямого метода ИФА следующих производителей: Siemens (Enzygnost® Anti-Measles Virus/IgM), Euroimmun (Anti-Measles Viruses ELISA/IgM) и Virion-Serion GmbH (Virion-Serion IgM). В испытании также участвовали наборы, основанные на методе двойного сэндвича производства Вектор-Бест (ВектоКорь-IgM) и Microimmune (Measles IgM EIA). Было протестировано 72 сыворотки от пациентов со средне-тяжелой формой кори. Образцы крови для анализа отобраны на 5-е и 6-е сутки после появления сыпи.

По результатам исследования наиболее высокую чувствительность показали наборы, основанные на методе двойного сэндвича. При использовании набора ВектоКорь-IgM IgM-антитела против кори были выявлены во всех 72 исследуемых образцах и в 70 (97,2%) сыворотках набором реагентов производства Microimmune. Тесты непрямого формата определяли по-

ложительные образцы в среднем в 68%. Самую низкую чувствительность (63,9%) показал набор Euroimmun, в то время как наибольшее количество положительных результатов среди тестов непрямого формата детектировал тест производства Virion-Serion [27].

Группой исследователей из Канады также было проведено сравнение наборов для выявления IgM-антител против кори [28]. В исследование были включены 2 набора, использующие метод двойного сэндвича: (IBL (IBL International GmbH), Microimmune (Clin-Tech Ltd.)) и 5 наборов, основанных на непрямом методе ИФА: Enzygnost (Siemens Healthcare Diagnostics Products GmbH), Euroimmun и Euroimmun Nucleoprotein (Euroimmun Medizinische Labordiagnostika AG), Novalisa (NovaTec Immunodiagnostica GmbH), Serion Classic (Institut Virion/Serion GmbH). Оценка чувствительности наборов проводилась на панели из 52 образцов сывороток с подтвержденными случаями кори. Чувствительность наборов колебалась в диапазоне 75–98%. Причем, самую высокую чувствительность демонстрировал набор Serion Classic и самую низкую – Euroimmun Nucleoprotein. Однако при оценке специфичности наборов худшие результаты были получены для наборов Serion Classic (86,6–89,3%) и Novalisa (88,8%), основанных на непрямом методе ИФА. Наиболее часто ложноположительные результаты регистрировались при исследовании образцов, содержащих антитела к парвовирусу В19. Специфичность наборов Serion Classic и Novalisa для этой группы образцов была крайне низкой (51–57%). Если же посмотреть на показатель диагностической точности (доля всех истинно положительных и истинно отрицательных результатов), то самые высокие показатели демонстрировали наборы, основанные на методе двойного сэндвича: IBL, Microimmune. Таким образом, в двух независимых исследованиях было показано, что наборы, основанные на методе двойного сэндвича, имеют преимущество перед наборами, в основе которых лежит непрямой метод.

Несмотря на высокие показатели диагностической чувствительности и специфичности ИФА-наборов, у иммуноферментного анализа есть и недостатки.

Так, известно, что при исследовании образцов на наличие IgM методом ИФА возможно получение ложноположительных результатов за счет неспецифического связывания антител, продуцируемых при заболеваниях вирусом Эпштейна-Барр, парвовирусом человека В19 [24]. Еще одной причиной ложноположительных результатов может быть наличие ревматоидного фактора. Присутствие таких антител обнаружено у 70% пациентов с ревматоидным артритом, в то же время они могут образовываться при таких инфекциях, как проказа, туберкулез, цитомегаловирус, гепатит А, грипп А [29]. Чаще всего присутствие ревматоидного фактора влияет на результаты тестов непрямого формата.

Другая проблема диагностики методом ИФА – это ложноотрицательные результаты в первые 3 дня с момента появления сыпи. В силу того, что титр IgM-антител против кори нарастает постепенно в течение первых нескольких дней после появления сыпи, до 30% случаев

кори может быть не выявлено в этот период [1, 30, 31]. Предельных же значений титр IgM достигает через 7–10 дней [24], когда в большинстве случаев наступает выздоровление пациента. В то время как наиболее разный период начинается за 4 дня до появления сыпи и продолжается еще не менее 4 дней после ее начала.

Кроме того, в случае использования наборов, основанных на непрямом методе ИФА, возможно получение ложноотрицательных результатов при тестировании образцов от пациентов, имеющих иммунитет к кори, например, после вакцинации [27]. При вторичном заболевании уровень IgG-антител достигает высоких значений уже в первые дни после появления сыпи и конкурирует с IgM за иммобилизованный вирусный антиген, препятствуя его корректному обнаружению наборами непрямого формата [26, 32]. В этом случае для уточнения диагноза можно использовать методы для определения avidности IgG-антител [24]. Наличие в сыворотке пациента высокоавидных IgG-антител в первые дни после появления сыпи может указывать на реинфекцию кори [33, 34]. Однако несмотря на наличие коммерческого набора для определения avidности IgG-антител (Anti-Measles Viruses ELISA IgG (Euroimmun, Германия) четких рекомендаций по интерпретации результатов теста нет, поэтому часто требуются другие методы подтверждения диагноза [34].

Из-за низкой чувствительности ИФА на ранних сроках заболевания, когда пациент наиболее заразен, возникает необходимость в использовании прямых методов выявления вируса. К ним можно отнести метод иммунофлуоресценции для обнаружения антигена кори. Однако по сравнению с другими методами диагностики антигенный тест имеет крайне низкую чувствительность (46,2–54,5%), а также требует специфического оборудования для детекции результатов (например, проточный цитометр или флуоресцентный микроскоп) [35].

На сегодняшний день наиболее перспективным из прямых методов диагностики кори является ПЦР благодаря своей высокой чувствительности и специфичности.

Еще в 2003 г. была продемонстрирована возможность выявления РНК вируса кори в слюне, мазках из ротоглотки и моче за 5 дней до появления сыпи [36]. В работе авторы использовали метод гнездовой ПЦР (nested-PCR).

В руководстве ВОЗ для лабораторного исследования методом ПЦР рекомендуют использовать образцы носоглоточного секрета, слюны, мочи, сыворотку и цельную кровь [24]. Однако стоит учитывать, что концентрация вируса в разных видах клинического материала сильно различается в течение процесса развития заболевания.

Проведенное в 2010 г. исследование с использованием метода гнездовой ПЦР по сравнению разных видов клинического материала показало, что наибольшая чувствительность ПЦР при заборе образцов в течение 3 дней после появления сыпи была достигнута при тестировании мазков из рото-/носоглотки и составляла 82,2–99,6%. Использование в качестве материала для исследования образцов носоглоточного аспирата и мочи привело к снижению чувствительности методики

до 77,2–98,9% и 69,2–99,7% соответственно. Через 4–16 дней после появления сыпи чувствительность ПЦР достигала 100% для всех изученных видов материала. В то же время чувствительность выявления РНК вируса кори из сыворотки крови составляла 70,6–88,4% в ранний период заболевания, 64,1–87,5% на 4–7 день после появления сыпи и снижалась до 26,8–73,2% после 7 дня заболевания [36].

Оценка вирусной нагрузки вируса кори, проведенная исследовательской группой из Франции, подтверждает полученные данные по диагностической чувствительности ПЦР для слюны и сыворотки крови. Концентрация РНК вируса в образцах слюны в первые три дня после появления сыпи составляла в среднем около 10^8 копий/мл, в сыворотке крови – около 10^5 копий/мл [37].

При создании методики для выявления РНК вируса кори методом ОТ-ПЦР большое значение имеет консервативность той области генома патогена, на которую направлены диагностические олигонуклеотиды. Стоит отметить, что в целом вирус кори обладает высокой генетической стабильностью [38]. В течение длительного времени нуклеотидная последовательность изменяется незначительно, как в лабораторных, так и естественных условиях. Скорость накопления нуклеотидных мутаций для вируса кори составляет $3,4–9,02 \times 10^{-4}$ замен на основание в год, что значительно меньше, чем у других РНК-содержащих вирусов. Например, у вируса иммунодефицита человека 1 типа скорость накопления мутаций варьирует в диапазоне $25–130,8 \times 10^{-4}$ [38]. Согласно анализу 22 полногеномных последовательностей вируса кори наиболее вариабельной областью является участок MF-HVR между генами матричного белка (M) и белка слияния (F), где вариабельность достигает 12,9% [38]. Наиболее консервативным участком генома вируса кори являются ген белка L, который является одной из субъединиц РНК-зависимой РНК-полимеразы [39]. Кроме того, вариабельность гена белка L среди различных членов семейства *Paramyxoviridae* является самой низкой из-за его роли в размножении вируса [38]. В то же время каждый ген имеет как консервативные области, где вариабельность в среднем не превышает 5%, так и более вариабельные [40]. Например, в достаточно консервативном гене внутреннего структурного белка нуклеопротеина встречаются участки на N-конце с вариабельностью 10% [40].

Также при разработке диагностических тестов стоит учитывать разный уровень транскрипции генов вируса кори. После проникновения вируса кори в клетку с вирусной РНК начинает транскрибироваться матричная РНК всех генов. Количество транскрибируемой РНК уменьшается по мере удаления гена от 3'-конца генома [39]. В исследовании, проведенном на клетках Vero, было показано, что максимальное количество мРНК наблюдалось для гена N, мРНК остальных генов нарабатываются в значительно меньшем количестве [41]. Наиболее консервативный ген белка L отличается самым низким уровнем транскрипции [42], поэтому использование этой матрицы для подбора праймеров ПЦР может привести к более низкой аналитической чувствительности тестов.

В работе Hummel K. и соавт. провели сравнение наборов олигонуклеотидов, направленных на участки генов N, F и H как на искусственно синтезированном контроле, так и на разных типах клинического материала (моча, мазок из носоглотки, носоглоточный аспират). Чувствительность обнаружения синтетической РНК была схожей для всех вариантов праймеров и зондов. В то же время при тестировании этих вариантов праймеров и зондов на клиническом материале наиболее чувствительной оказалась методика, основанная на выявлении гена N [43].

На сегодняшний момент разработано несколько методик ПЦР, использующих в качестве мишени консервативные участки генов N, H и L [43–46]. Некоторые из них легли в основу коммерческих тестов. Однако выбор диагностических олигонуклеотидов в ряде случаев был неоптимальным, по-видимому, из-за небольшого числа нуклеотидных последовательностей в базах данных на момент разработки, что в дальнейшем приводило к ложноотрицательным результатам [47, 48]. Разработаны также мультиплексные форматы ПЦР позволяющие одновременно выявлять вирус кори и краснухи [45, 49]. Более того, Cui A. и соавт. описали методику ПЦР, позволяющую одновременно выявлять вирус кори, вирус краснухи, энтеровирус человека, вирус ветряной оспы, вирус денге, парвовирус человека В19, вирус Эпштейна-Барр и вирус герпеса человека 6 типа [50].

Особый интерес может представлять применение молекулярных методов для дифференциации вируса дикого типа и вакцинных штаммов кори в связи с такими поствакцинальными реакциями, которые могут напоминать классическую картину кори. В частности, примерно у 5% реципиентов может возникать лихорадка (не менее 39°C), а в 2% сопровождаться сыпью [51]. На сегодняшний момент разработаны методики для дифференциации вируса дикого типа и вакцинных штаммов кори, как на основе метода ПЦР [46, 52], так и метода изотермической амплификации [53], однако зарегистрированных коммерческих тестов пока нет.

Диагностическую ценность молекулярных методов выявления вируса кори удалось показать китайским ученым в нескольких крупных исследованиях [30, 54]. В Китае в национальном руководстве по эпидемиологическому надзору за корью с 2014 г. рекомендуется использовать ПЦР в дополнение к рутинному лабораторному анализу, основанному на иммуноферментном выявлении IgM.

Исследовательской группой Cui A. [30] были собраны 338644 образца от пациентов с подозрением на корь, из них 46363 случаев с сыпью и 95 случаев без сыпи были подтверждены методом ПЦР или ИФА на IgM. В целом среди случаев с сыпью положительный результат был получен одновременно двумя методами (ПЦР и ИФА) в 68,8% случаев, в то время как для случаев без сыпи – в 40%. Число случаев IgM-отрицательных при ПЦР-положительном результате анализа было больше при исследовании образцов от пациентов без сыпи (29,5%), чем с сыпью (12,3%). Причем

в первые 3 дня заболевания доля ложноотрицательных результатов ИФА была значительна и составляла 40% для пациентов без сыпи и 14,4% для пациентов с сыпью.

Во второе исследование, проведенное Центром по контролю и профилактике заболеваний Китая в Пекине, вошло 4600 подтвержденных случаев кори, которые были разделены на группы по срокам заболевания. Лабораторную диагностику осуществляли методом ПЦР (Jiangsu BioPerfectus Technologies Co., Ltd., Jiangsu, Китай) и ИФА на IgM-антитела с использованием набора Virion/Serion GmbH (Würzburg, Германия). При исследовании образцов, отобранных в течение первых трех дней заболевания, диагностическая чувствительность ПЦР и ИФА (IgM) составляла 94,39% и 56,53%. В период с 4-го по 28-й день процент положительных результатов IgM увеличился до 82,06%, тогда как чувствительность ПЦР снижалась после 8–10 дня заболевания и составляла 73,02% [54].

Представленные данные, очевидно, указывают на необходимость внедрения метода ПЦР в рутинную диагностику кори, поскольку позволяют в максимально ранние сроки выявить возбудителя кори.

Однако согласно санитарно-эпидемиологическим правилам СП 3.1.2952-11 в России не рекомендуют использовать молекулярно-генетические методы для постановки или верификации диагноза [55]. Отчасти это объясняется тем, что в России до недавнего времени не было ни одного зарегистрированного набора реагентов для выявления РНК вируса кори.

Несмотря на то, что для молекулярно-генетической диагностики вируса кори за рубежом разработано несколько коммерческих наборов (Measles Virus Real Time RT-PCR Kit от Liferiver; Human Measles Virus genesig Standard Kit от Primerdesign Ltd.; Measles Virus Real Time RT-PCR Kit от Creative Biogene; HumqPCR-realtime™ Measles Virus от BioinGentech; FTD Measles), в России они не зарегистрированы и поэтому для проведения диагностики они недоступны.

Ситуация изменилась в конце 2021 г., когда был зарегистрирован первый отечественный набор «АмплиТест Корь» производства ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, кото-

рый позволяет выявлять фрагмент гена нуклеопротеина вируса кори методом ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени». Подбор праймеров и зонда проводился на выборке из 133 уникальных последовательностей гена N из базы данных NCBI, что позволило выбрать наиболее консервативную область. Методика предполагает исследование мазка из ротоглотки. Дальнейшее внедрение этого набора в клиническую практику позволит значительно усовершенствовать диагностику кори в стране, позволяя с высокой чувствительностью выявлять вирус на ранних сроках заболевания.

Заключение

В настоящем обзоре мы кратко обрисовали современную ситуацию в области лабораторной диагностики кори, продемонстрировав недостатки широко используемого метода ИФА и перспективы ПЦР-диагностики. В то же время стоит отметить, что ПЦР не может полностью заменить ИФА в диагностике и тем более мониторинге кори, ПЦР должен использоваться в комплексе с ИФА, как это уже делается в Китае.

Основными преимуществами молекулярно-генетических методов при выявлении вируса кори являются сокращение времени анализа, возможность ранней диагностики кори как до появления сыпи, так и в первые 3 дня после появления сыпи и доступность мультиплексного формата ПЦР, позволяющего проводить одновременное выявление нескольких патогенов и тем самым ускорять процесс дифференциальной диагностики заболеваний со сходной клинической картиной.

Таким образом, разработка молекулярно-генетических методов диагностики кори имеет огромный потенциал, и внедрение их в практическое звено здравоохранения является важной задачей в рамках осуществления мировых и отечественной программ по элиминации кори.

Работа выполнена в рамках государственного задания ФГБУ «ЦСП» ФМБА России № 388-00154-21-00 на проведение экспериментальной научной разработки (номер государственного учета АААА-А20-120111090094-8).

Литература

1. The World Health Organization. Manual for the laboratory diagnosis of measles and rubella virus infection. 2nd ed. No. WHO/IVB/07.01.; 2007. 109 p.
2. Rota P.A., Moss W.J., Takeda M., de Swart R.L., Thompson K.M., Goodson J.L. Measles. Nat Rev Dis Primers. 2016;2:16049-16049. DOI: 10.1038/nrdp.2016.49
3. Semenenko T.A., Smetanina, S.V., Kolobukhina, L.V., Karetkina G.N., Nozdracheva A.V., Kruzhkova I.S., et al. Measles: epidemiological features during the elimination period, modern possibilities for prevention, diagnosis and treatment. Significance of serological study of population immunity of the population. Guidelines No.74. M.: 2020. 38 p. Russian. (Семененко Т.А., Сметанина, С.В., Колобухина, Л.В., Кареткина Г.Н., Ноздрачева А.В., Кружкова И.С. и соавт. Корь: эпидемиологические особен-
- ности в период элиминации, современные возможности профилактики, диагностики и лечения. Значение серологического исследования популяционного иммунитета населения. Методические рекомендации №74. М.: 2020. 38 с.)
4. Tsvirkun O.V., Tikhonova N.T., Turaeva N.V., Yezhlova E.B., Melnikova A.A., Gerasimova A.G. Characteristics of population immunity to measles in the Russian Federation. Epidemiology and vaccination. 2020;19(4):6-13. Russian. (Цвиркун О.В., Тихонова Н.Т., Тураева Н.В., Ежлова Е.Б., Мельникова А.А., Герасимова А.Г. Характеристика популяционного иммунитета к кори в Российской Федерации. Эпидемиология и вакцинопрофилактика. 2020;19(4):6-13.) DOI: 10.31631/2073-3046-2020-19-4-6-13

5. The World Health Organization. Measles. Available at: www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/measles. Accessed March 2023.
6. The World Health Organization. Measles – number of reported cases. Available at: www.who.int/data/gho/data/indicators/indicator-details/GHO/measles---number-of-reported-cases. Accessed March 2023.
7. On the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2019: State report. M.: Federal Service for Supervision of Consumer Rights Protection and Human Welfare, 2020. 299 p. Russian. (О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2019 году – М.: Государственный доклад. Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека; 2020. 299 с.)
8. The incidence of measles and rubella in Russia in 2019: Newsletter No. 31. G.N. Gabrichevsky research institute for epidemiology and microbiology of Rospotrebnadzor. M.: 2020. 35 p. Russian. (Заболееваемость корью и краснухой в России за 2019 год: Информационный бюллетень №31. ФГУН МНИИЭМ им. Г.Н. Габричевского Роспотребнадзора. М.: 2020. 35 с.)
9. Dixon M.G., Ferrari M., Antoni S., Li X., Portnoy A., Lambert B., et al. Progress toward regional measles elimination – worldwide, 2000–2020. *Morb Mortal Wkly Rep.* 2021;70(45):1563. DOI: 10.15585/mmwr.mm7045a1
10. Refugees from Ukraine recorded by country. Available at: <https://data.unhcr.org/en/situations/ukraine>. Accessed Mar 2023.
11. Nozdracheva A.V., Semenenko T.A. The state of population immunity to measles in Russia: a systematic review and meta-analysis of epidemiological studies. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2020;5:445–457. Russian. (Ноздрачева А.В., Семенов Т.А. Состояние популяционного иммунитета к кори в России: систематический обзор и метаанализ эпидемиологических исследований. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2020;5:445–457.) DOI: 10.36233/0372-9311-2020-97-5-7
12. Rota P.A., Bellini W.J. Update on the global distribution of genotypes of wild type measles viruses. *J Infect Dis.* 2003;187(1):S270–S276. DOI: 10.1086/368042
13. Global measles and rubella monthly update. Available at: <http://who-wiise-frontend-prod-cdn.azureedge.net/listing.html?topic=measles-rubella&location=>. Accessed March 2023.
14. Griffin D.E. Measles virus persistence and its consequences. *Curr Opin Virol.* 2020;41:46–51. DOI: 10.1016/j.coviro.2020.03.003
15. Griffin D.E. Measles vaccine. *Viral immunology.* 2018;31(2):86–95. DOI: 10.1089/vim.2017.0143
16. Griffin D.E. The immune response in measles: virus control, clearance and protective immunity. *Viruses.* 2016;8(10):282. DOI: 10.3390/v8100282
17. Moss W.J. Measles. *Lancet.* 2017;390:2490–2502. DOI:10.1016/S0140-6736(17)31463-0
18. Riddell M.A., Moss W.J., Hauer D., Monze M., Griffin D.E. Slow clearance of measles virus RNA after acute infection. *J Clin Virol.* 2007;39(4):312–317. DOI: 10.1016/j.jcv.2007.05.006
19. Lin W.H.W., Kouyos R.D., Adams R.J., Grenfell B.T., Griffin D.E. Prolonged persistence of measles virus RNA is characteristic of primary infection dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2012;109(37):14989–14994. DOI: 10.1073/pnas.1211138109
20. Mina M.J., Kula T., Leng Y., Li M., Vries R., Knip M., et al. Measles virus infection diminishes preexisting antibodies that offer protection from other pathogens. *Science.* 2019;366(6465):599–606. DOI: 10.1126/science.aay6485
21. Abad C.L., Safdar N. The reemergence of measles. *Curr Infect Dis Rep.* 2015;17(12):1–8. DOI: 10.1007/s11908-015-0506-5
22. Yu X., Ghildyal R. Measles virus infection: mechanisms of immune suppression. In: *Immunosuppression: role in health and diseases*; 2012. Chapter 12. DOI: 10.5772/29662
23. Paules C.I., Marston H.D., Fauci A.S. Measles in 2019 – going backward. *N Engl J Med.* 2019;380(23):2185–2187. DOI: 10.1056/NEJMp1905099
24. The World Health Organization. Surveillance guidelines for measles, rubella and congenital rubella syndrome in the WHO European Region: update December 2012. No. WHO/EURO:2012-4544-44307-62588; 2012. 64 p.
25. Mamaeva T.A., Zheleznova N.V., Naumova M.A., Govorukhina M.V., Kalashnikova N.A., Bichurina M.A., et al. Algorithm for laboratory confirmation and differential diagnosis of measles infection during measles elimination In Russian Federation. *Infection and immunity.* 2015;5(1):55–62. Russian. (Мамаева Т.А., Железнова Н.В., Наумова М.А., Говорухина М.В., Калашникова Н.А., Бичурина М.А. и соавт. Алгоритм лабораторного подтверждения и дифференциальной диагностики коревой инфекции в период элиминации кори в Российской Федерации. *Инфекция и иммунитет.* 2015;5(1):55–62.) DOI: 10.15789/2220-7619-2015-1-55-62
26. Bellini W.J., Helfand R.F. The challenges and strategies for laboratory diagnosis of measles in an international setting. *J Infect Dis.* 2003;187(1):S283–S290. DOI: 10.1086/368040
27. Mamaeva T.A., Naumova M.A., Zheleznova N.V., Lipskaya G.Y. Evaluation of commercial ELISA test systems of various formats for determining the level of specific IgM and IgG in the sera of patients with measles. *Questions of virology.* 2013;58(5):43–48. Russian. (Мамаева Т.А., Наумова М.А., Железнова Н.В., Липская Г.Ю. Оценка коммерческих тест-систем ИФА разного формата для определения уровня специфических IgM и IgG в сыворотках больных корью. *Вопросы вирусологии.* 2013;58(5):43–48.)
28. Hiebert J., Zubach V., Charlton C., Fenton J., Tipples G., Fonseca K., et al. Evaluation of diagnostic accuracy of eight commercial assays for the detection of measles virus-specific IgM antibodies. *J Clin Microbiol.* 2021;59(6):e03161–20. DOI: 10.1128/JCM.03161-20
29. Woods C.R. False-positive results for immunoglobulin M serologic results: explanations and examples. *J Pediatric Infect Dis Society.* 2013;2(1):87–90. DOI: 10.1093/jpids/pis133
30. Cui A., Mao N., Wang H., Xu S., Zhi Z., Ji Y., et al. Importance of real-time RT-PCR to supplement the laboratory diagnosis in the measles elimination program in China. *PloS One.* 2018;13(11):e0208161. DOI: 10.1371/journal.pone.0208161
31. Benamar T., Tajounte L., Alla A., Khebbba F., Ahmed H.,

- Mulders M.N., et al. Real-time PCR for measles virus detection on clinical specimens with negative IgM result in Morocco. *PLoS One*. 2016;11(1):e0147154. DOI: 10.1371/journal.pone.0147154
32. Hübschen J.M., Bork S.M., Brown K.E., Mankertz A., Santibanez S., Mamou M.B., et al. Challenges of measles and rubella laboratory diagnostic in the era of elimination. *Clin Microbiol Infect*. 2017;23(8):511-515. DOI: 10.1016/j.cmi.2017.04.009
 33. Hickman C.J., Hyde T.B., Sowers S.B., Mercader S., McGrew M., Williams N.J., et al. Laboratory characterization of measles virus infection in previously vaccinated and unvaccinated individuals. *J Infect Dis*. 2011;204(1):S549-S558. DOI: 10.1093/infdis/jir106
 34. Sowers S.B., Rota J.S., Hickman C.J., Mercader S., Redd S., McNall R.J., et al. High concentrations of measles neutralizing antibodies and high-avidity measles IgG accurately identify measles reinfection cases. *Clin Vaccine Immunol*. 2016;23(8):707-716. DOI: 10.1128/CVI.00268-16
 35. Chua K.Y.L., Thapa K., Yapa C.M., Somerville L.K., Chen S.C.A., Dwyer D.E., et al. What assay is optimal for the diagnosis of measles virus infection? An evaluation of the performance of a measles virus real-time reverse transcriptase PCR using the Cepheid SmartCycler® and antigen detection by immunofluorescence. *J Clin Virol*. 2015;70:46-52. DOI: 10.1016/j.jcv.2015.07.004
 36. Woo G.K., Wong A.H., Lee W.Y., Lau C.S., Cheng P.K., Leung P.C., et al. Comparison of laboratory diagnostic methods for measles infection and identification of measles virus genotypes in Hong Kong. *J Med Virol*. 2010;82(10):1773-1781. DOI: 10.1002/jmv.21888
 37. Michel Y., Saloum K., Tournier C., Quinet B., Lassel L., Pérignon A., et al. Rapid molecular diagnosis of measles virus infection in an epidemic setting. *J Med Virol*. 2013;85(4):723-730. DOI: 10.1002/jmv.23515
 38. Beaty S.M., Lee B. Constraints on the genetic and antigenic variability of measles virus. *Viruses*. 2016;8(4):109. DOI: 10.3390/v8040109
 39. Horikami S.M., Moyer S.A. Structure, transcription, and replication of measles virus. In: *Measles virus*; 1995. 35-50 p.
 40. Harvala H., Wiman Å., Wallensten A., Zakikhany K., Englund H., Brytting M. Role of sequencing the measles virus hemagglutinin gene and hypervariable region in the measles outbreak investigations in Sweden during 2013-2014. *J Infect Dis*. 2016;213(4):592-599. DOI: 10.1093/infdis/jiv434
 41. Schneider-Schaulies S., Liebert U.G., Baczek K., Cattaneo R., Billeter M., Ter Meulen V. Restriction of measles virus gene expression in acute and subacute encephalitis of Lewis rats. *Virology*. 1989;171(2):525-534. DOI: 10.1016/0042-6822(89)90622-3
 42. Cattaneo R., Rebmann G., Baczek K., ter Meulen V., Billeter M.A. Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains. *Virology*. 1987;160(2):523-526. DOI: 10.1016/0042-6822(87)90031-6
 43. Hummel K.B., Lowe L., Bellini W., Rota P. Development of quantitative gene-specific real-time RT-PCR assays for the detection of measles virus in clinical specimens. *J Virol Methods*. 2006;132(1-2):166-173. DOI: 10.1016/j.jviromet.2005.10.006
 44. Zubach V., Severini A., Hiebert J. Development of a rapid, internally controlled, two target, real-time RT-PCR for detection of measles virus. *J Virol Methods*. 2022;299:114349. DOI: 10.1016/j.jviromet.2021.114349
 45. Yoshioka N., Hagiya H., Deguchi M., Hamaguchi S., Kagita M., Tomono K. Simultaneous and rapid detection method for measles and rubella using single-tube multiplex real-time quantitative RT-PCR. *J Infect Chemother*. 2019;25(10):829-831. DOI: 10.1016/j.jiac.2019.05.005
 46. Pabbaraju K., Gill K., Wong A.A., Tipples G.A., Hiebert J., Severini A., et al. Simultaneous detection and differentiation between wild-type and vaccine measles viruses by a multiplex real-time reverse transcription-PCR assay. *J Clin Microbiol*. 2019;57(4):e01828-18. DOI: 10.1128/JCM.01828-18
 47. Dina J., Omnes J., Vauloup-Fellous C., Collet L., Hamel J., Antona D., et al. True measles cases undetected by Reverse Transcription-PCR (RT-PCR): effect of genetic variability on assay sensitivity needs to be regularly surveyed. *J Clin Microbiol*. 2019;57(8):e00341-19. DOI: 10.1128/JCM.00341-19
 48. Binkhamis K., Gillis H., Lafreniere J.D., Hiebert J., Mendoza L., Pettipas J., et al. Comparison of monoplex and duplex RT-PCR assays for the detection of measles virus. *J Virol Methods*. 2017;239:58-60. DOI: 10.1016/j.jviromet.2016.11.003
 49. Hübschen J.M., Kremer J.R., De Landtsheer S., Muller C.P. A multiplex TaqMan PCR assay for the detection of measles and rubella virus. *J Virol Methods*. 2008;149(2):246-250. DOI: 10.1016/j.jviromet.2008.01.032
 50. Cui A., Wang S., Zhang Q., Wang H., Zhu Z., Li A., et al. Development of a multiplex one-step real-time RT-PCR assay for the simultaneous detection of eight viruses associated with febrile rash illnesses. *Biosafety Health*. 2020;2(2):89-94. DOI: 10.1016/j.bsheat.2020.04.003
 51. The World Health Organization. *Weekly Epidemiological Record*. 2017;92(17):205-228.
 52. Stanoeva K.R., Kohl R.H.G., Bodewes R. Co-detection of the measles vaccine and wild-type virus by real-time PCR: public health laboratory protocol. *Access Microbiol*. 2021;3(11). DOI: 10.1099/acmi.0.000283
 53. Nakayama T., Sawada A., Kubo H., Kaida A., Tanaka T., Shigemoto N., et al. Simple method for differentiating measles vaccine from wild-type strains using loop-mediated isothermal amplification. *Microbiol Immunol*. 2013;57(3):246-251. DOI: 10.1111/1348-0421.12029
 54. Ma R., Lu L., Suo L., Zhangzhu J., Chen M., Pang X. Evaluation of the adequacy of measles laboratory diagnostic tests in the era of accelerating measles elimination in Beijing, China. *Vaccine*. 2019;37(29):3804-3809. DOI: 10.1016/j.vaccine.2019.05.058
 55. Prevention of measles, rubella and epidemiological parotitis: Sanitary rules. M.: Federal Center for Hygiene and Epidemiology of Rospotrebnadzor, 2012. 23 p. Russian. (Профилактика кори, краснухи и эпидемиологического паротита: Санитарные правила. М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора; 2012. 23 с.)