

ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ТА ГЕНОТИПУВАННЯ ВИСОКОПАТОГЕННОГО ВІРУСУ ПТАШИНОГО ГРИПУ А Н5N1 МЕТОДОМ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ У РЕЖИМІ РЕАЛЬНОГО ЧАСУ

С. В. Степанюк¹

В. Г. Найденов²
М. Я. Співак³

¹Приватне акціонерне товариство

«Науково-виробнича компанія Діапроф-Мед», Київ, Україна

²Інститут фізіології ім. О. О. Богомольця НАН України, Київ

³Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного
НАН України, Київ

E-mail: stepaniuk2008@yandex.ru

Отримано 07.02.2014

Результати щорічного епізоотичного моніторингу засвідчують, що високопатогенний вірус грипу птахів НРАІ/Н5N1 активно циркулює на території Євразійських держав. За період 2010–2013 рр. зафіксовано понад 165 випадків спалахів інфекції в 14 країнах світу. Україна стала однією з перших держав Європи, де в жовтні 2005 р. на території Автономної Республіки Крим уперше було зафіксовано спалах епізоотії з НРАІ/Н5N1 і до лютого 2008 р. знищено понад 236 тис. голів сільськогосподарської птиці. Відтоді питання моніторингу за інфікованою як перелітною, так і домашньою птицею в місцях перехресного контакту в Україні є актуальним. Розроблено тест-систему для виявлення та ідентифікації вірусу грипу А Н5N1 за трьома генами (М, Н5 і N1) РНК НРАІ/Н5N1 у полімеразній ланцюговій реакції в режимі реального часу. Здатність тест-системи виявляти вірус пташиного грипу НРАІ/Н5N1 та диференціювати його від зразків інших збудників вірусних інфекцій птахів і тварин вивчали за допомогою тестування зразків вірусу НРАІ/Н5N1, виділених у період масового спалаху інфекції в Криму в 2005 р., та культуральних зразків інших вірусних патогенів. Встановлено, що тест-система DIA-Real Avian Influenza здатна виявляти РНК вірусу грипу А високопатогенних штамів Н5N1 з високими показниками чутливості (100% під час дослідження РНК вірусу НРАІ/Н5N1 кримських ізолятів) і специфічності (100% — дослідження РНК вірусів хвороби Ньюкасла птахів, віспи птахів, синдрому зниження яйценосності та грипу коней).

Ключові слова: високопатогенний вірус пташиного грипу А Н5N1, діагностична тест-система DIA-Real Avian Influenza.

Віруси пташиного грипу завжди були джерелом пандемій грипозних інфекцій серед людей. Вірусні штами, що стали причиною наймасштабніших пандемій грипу в ХХ ст. (1918, 1957, 1968, 2009 рр.), мали пряме походження від вірусів грипу птахів [1–4].

За даними експертів ВООЗ, високопатогенний вірус грипу птахів НРАІ/Н5N1 залишається одним із вірусів, які мають пандемічний потенціал для людства, оскільки почастишали випадки інфікування людини від зараженої птиці [5–9]. У зв'язку з цим науковці та експерти ВООЗ пильно відстежують перебіг епізоотій високопатогенного вірусу грипу птахів НРАІ/Н5N1 та можливі процеси мутацій за одночасної його циркуляції із сезонними штамми вірусу грипу людей [10, 11].

Моніторинг за розповсюдженістю вірусу пташиного грипу А НРАІ/Н5N1 свідчить, що він є ендемічним для шести націй і завдає істотних збитків економіці цих держав. Починаючи з 2003 р. епізоотії, пов'язані з НРАІ/Н5N1, знищили понад 400 млн. домашньої та дикої водоплавної птиці. За підрахунками міжнародних експертів у 2006 р. було витрачено понад 20 блн. дол. США для подолання спалахів епізоотій НРАІ/Н5N1 у 63 країнах світу [12, 13].

Окрім того, штами вірусу пташиного грипу А НРАІ/Н5N1 після 2003 р. мають високопатогенні властивості для людини, але поки що не набули здатності передаватися від людини до людини. На сьогодні зафіксовано близько 637 випадків зараження людей, 378

із яких мали летальні наслідки, тобто смертність серед людей становить понад 60% [8, 9].

Результати щорічного епізоотичного моніторингу показують, що НРАІ/Н5N1 активно циркулює на території Євразійських держав, і за період 2010–2013 рр. вже зафіксовано понад 165 нових випадків спалахів інфекції в 14 країнах світу: Єгипті, Ізраїлі, Ірані, Непалі, Росії, Болгарії, Румунії та ін. [13]. Україна стала однією з перших країн Європи, де з жовтня 2005 до лютого 2008 р. на території Автономної Республіки Крим було знищено більш ніж 236 тис. голів сільськогосподарської птиці [15–17].

Перші спалахи масової загибелі домашньої та водоплавної птиці було зафіксовано восени 2005 р. в Криму, коли через мігруючих перелітних птахів штами високопатогенного пташиного вірусу грипу досягли території нашої країни. Відтоді питання моніторингу за інфікованою як перелітною, так і домашньою птицею в місцях перехресного контакту в Україні є актуальним.

Метою роботи було дослідити діагностичні характеристики розробленої ПрАТ НВК «Діапроф-Мед» тест-системи DIA-Real Avian Influenza з використанням зразків НРАІ/Н5N1, виділених під час масового спалаху інфекції в Криму в 2005 р., та зразків інших збудників вірусних інфекцій птахів і тварин.

Матеріали і методи

У процесі вивчення тест-системи DIA-Real Avian Influenza у березні 2006 р. досліджували 15 зразків: культуральні зразки вірусів грипу птахів та тварин, у тому числі й зразки високопатогенного вірусу грипу птахів А Н5N1, Кримський ізолят LA-NK-21205 (Avian influenza virus A H5N1 strain LA-NK-21205) в різних концентраціях вірусомісної рідини, зразок суспензії органів птиці, що загинула від пташиного грипу під час масового спалаху інфекції.

Віруси грипу коней: вірус грипу коней штаму Кембридж (Equine influenza virus strain A/Equine/Cambridge/1/63 — H7N7) і штаму Майами (Equine influenza virus strain A/Eq/Miami/63 — H3N8).

Віруси птахів: Кримський ізолят (LA-NK-21205) вірусу пташиного грипу типу А Н5N1, виділений під час спалаху інфекції восени 2005 р.; вірус ринотрахеїту курей штаму ВНИ-БП (Turkey Rhinotracheitis — TRT virus, strain VNI-BP); віруси хвороби Ньюкасла штами Лясота (Newcastle Disease Virus — NDV, strain LaSota/B1) і Вітапег (Newcastle Disease Virus — NDV, strain Vitapeg); вірус віспи птахів, штаму Кучинський (Variola avium virus); вірус синдрому зниження яй-

ценоності EDS-76 штаму ЭГ-96N3 (Chickens Egg Drop Syndrome'76 strain EG-96N3). Було досліджено також 2 зразки хоріоналантоїсної рідини 2 неінфікованих курячих ембріонів.

Алантоїсні культури штаму було одержано з музею вірусів Національного центру штаму мікроорганізмів — ДНКІВШМ, Київ, Україна.

Виділення РНК вірусів. Виділення та очищення вірусної РНК проводили з використанням набору реактивів, що входить до складу тест-системи DIA-Real Avian Influenza: QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen GmbH, Німеччина) відповідно до протоколу виробника. Для моніторингу крос-контамінації під час виділення РНК використовували негативні контролю (проби стерильної води, неконтаміновані ДНК/РНК). З метою контролю етапу виділення РНК в кожну пробу зразка додавали внутрішній контрольний зразок (ІС). Виділення РНК патогенів здійснювали на базі Національного центру штаму мікроорганізмів.

Аналіз методом полімеразної ланцюгової реакції у режимі реального часу (Real-Time PCR). Двоетапну мультиплексну реакцію Real-Time RT-PCR проводили, застосовуючи компоненти тест-системи DIA-Real Avian Influenza (відповідно до інструкції виробника) та за допомогою приладу ABI PRIZM 7000 (Applied Biosystems, США) у відділі стандартизації біопродуктів ПрАТ НВК «Діапроф-Мед».

Визначення специфічності та чутливості тест-системи Real-Time PCR. Специфічність мультиплексної реакції Real-Time RT-PCR оцінювали, використовуючи зразки неінфікованої алантоїсної рідини курячих ембріонів. Чутливість тесту визначали за допомогою серійних розведень зразків алантоїсної культури кримського ізоляту А НРАІ/Н5N1.

Результати та обговорення

Розроблена ПрАТ НВК «Діапроф-Мед» тест-система DIA-Real Avian Influenza призначена для виявлення зразків, що містять РНК високопатогенного грипу птахів НРАІ/Н5N1, з наступною ідентифікацією генів гемаглютиніну Н5 і нейрамінідази N1 у форматі двоетапного мультиплексного аналізу Real-Time RT-PCR.

На базі Національного центру штаму мікроорганізмів та відділу стандартизації біопродуктів ПрАТ НВК «Діапроф-Мед» було здійснено випробування тест-системи в ході державної реєстрації в МІН АПК України.

Під час державних випробувань тест-системи DIA-Real Avian Influenza в березні 2006 року досліджували 15 зразків матеріалу, зокрема зразки високопатогенного віру-

су грипу птахів А Н5Н1 Кримський ізолят LA-NK-21205 у різних концентраціях вірусомісної рідини (перелічені в розділі «Матеріали і методи»), а також зразки різних вірусних патогенів птахів. Усі зразки було закодовано під номерами №1–№15 і їх розкодування проводили після закінчення експерименту.

Відповідно до методики, що її описано в інструкції до тест-системи, РНК вірусу грипу виділяли зі 140 мкл клінічного зразка, до якого додавали 5 мкл внутрішнього контролю (ІС) на етапі лізису зразка.

На 1-му етапі аналізу Real-Time RT-PCR, використовуючи Master Mix I тест-системи DIA-Real Avian Influenza, що містить праймери і ДНК-зонд, специфічні до висококонсервативної ділянки геному вірусу грипу типу А, проводили скринінговий відбір зразків, які містять лише РНК вірусу грипу А (рис. 1, А).

До складу Master Mix I також входять праймери та ДНК-зонд внутрішнього контролю, за результатами ампліфікації якого оцінювали ефективність процесу виділення РНК зі зразка, наявність можливих інгібіторів наступної реакції зворотної транскрипції та ампліфікації. Упровадження внутрішнього контролю на етапі виділення РНК дає змогу виявити зразки з хибнонегативними результатами [14].

Аналіз результатів 1-го етапу досліджень. Після першого етапу аналізували лише ті зразки, в яких виявлено чіткий сигнал за внутрішнім контролем (канал JOE). Якщо в зразку не було виявлено позитивного сигналу за каналом JOE, його відбракували і проводили повторне виділення РНК з клінічного матеріалу.

Ті зразки, в яких було зафіксовано позитивні сигнали за двома каналами FAM (вірус грипу А) та за каналом JOE (внутрішній контроль), визначали як позитивні (що містять РНК вірусу грипу А) і далі тестували на 2-му етапі: генотипування за генами гемаглютиніну Н5 та нейрамінідази N1. Зразки з позитивним сигналом за внутрішнім контролем (канал JOE), але з негативним результатом за каналом FAM (вірус грипу А) вважали негативними (що не містять РНК вірусу грипу А).

Серед 15 проаналізованих зразків виявлено 8 позитивних (зафіксовано флуоресцентний сигнал за каналом FAM) та 7 негативних, в яких не було зафіксовано флуоресцентного сигналу за каналом FAM (таблиця). В усіх 15 зразках не встановлено жодного хибнонегативного результату, тобто в кожному був наявний сигнал внутрішнього контролю (рис. 2, А).

Отже, серед 15 зашифрованих зразків, у тому числі й у суспензії органів від загиблого

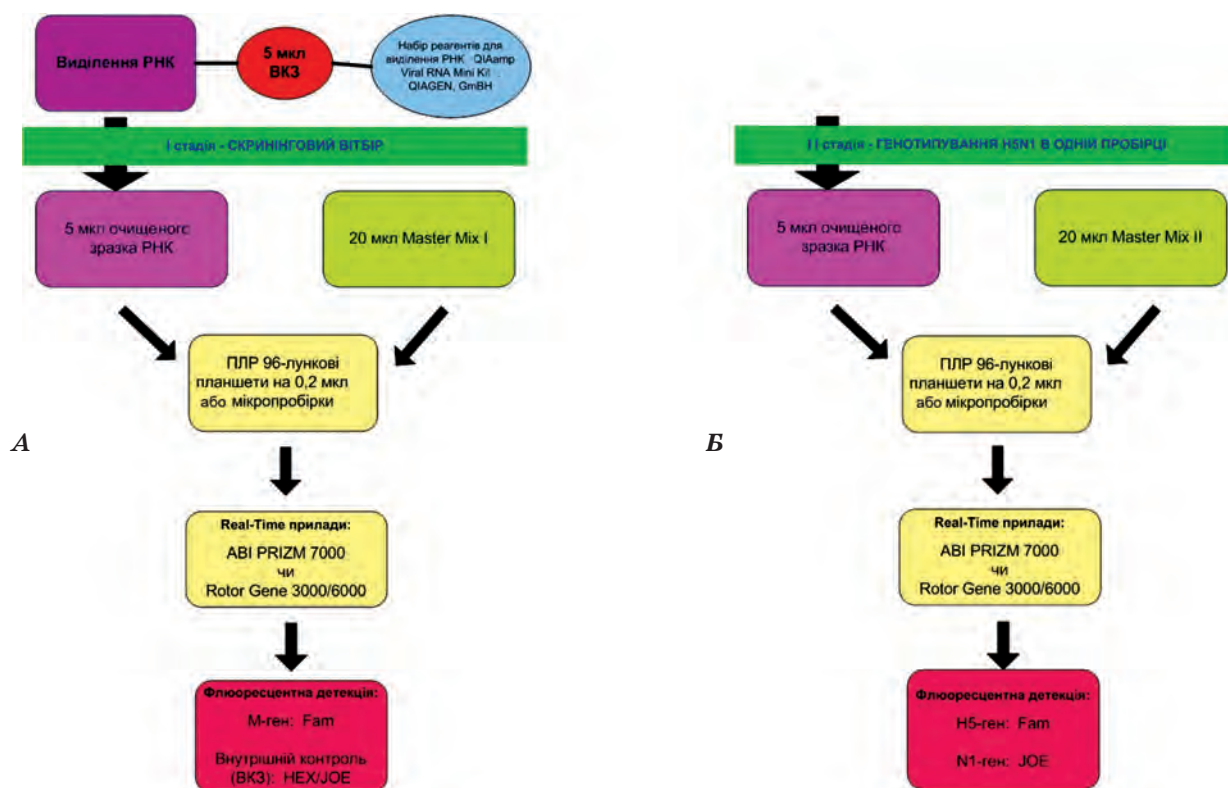


Рис. 1. Метод двоетапної мультиплексованої реакції ПЛР в режимі реального часу:

А — 1-й етап аналізу: скринінговий відбір зразків, що містять РНК вірусу грипу А;

Б — 2-й етап аналізу: ідентифікація генів вірусу грипу Н5 та N1 в одній пробірці

птаха, на 1-му етапі виявлення грипу А позитивні результати спостерігали у 8 (6–11, 14, 15). Негативними, чи такими, що не містили РНК вірусу грипу птахів, було визначено такі: 1 — зразок вірусу ринотрахеїту птахів; 2 і 3 — зразки вірусу хвороби птахів Ньюкасла; 4 — вірусу віспи птахів; 5 — вірусу синдрому зниження яйценосності; 12, 13 — зразки неінфікованої алантоїсної рідини курячих ембріонів.

На 2-му етапі аналізу Real-Time RT-PCR, використовуючи Master Mix II тест-системи DIA-Real Avian Influenza, що містить дві пари праймерів і два ДНК-зонди, специфічних до обраних послідовностей генів Н5 та N1 високопатогенного НРАІ/Н5N1, проводили генотипування за вказаними генами в мультиплексному форматі (рис. 1, Б). За результатами 1-го етапу аналізу для проведення реакції генотипування було відібрано зразки 6–11, 14 і 15.

Аналіз результатів 2-го етапу. За результатами ампліфікації цього етапу реакції позитивними вважають ті зразки, в яких виявлено чіткий сигнал за обома каналами: FАM (гемаглютиніни Н5) та JOE (нейрамінідаза N1), згідно з рекомендаціями ВООЗ

[18,19]. Тобто, зразки, в яких зафіксовано позитивні сигнали флуоресценції за одним геном N1 у разі відсутності позитивного сигналу за Н5, не вважають позитивними на високопатогенний вірус грипу НРАІ/Н5N1.

Досліджуючи 8 позитивних зразків, які було відібрано на 1-му етапі аналізу, виявили позитивний результат на 2-му етапі за генами Н5 та N1 одночасно лише в 6 зразках: 6 — зразок суспензії органів загиблого від НРАІ/Н5N1 птаха та 7–11 — розведення від 1:10 до 1:5 000 вірусомісної культуральної рідини кримського ізоляту НРАІ/Н5N1(LA-NK-21205), виділеного в 2005 р. (рис. 2, Б).

У двох інших зразках — 14 та 15 — на 2-му етапі генотипування зафіксували негативний результат за обома генами — Н5 та N1, що свідчить про відсутність в них високопатогенного грипу птахів НРАІ/Н5N1 (таблиця). Після розшифрування закодованих зразків було встановлено, що вони містили вірус грипу коней, штами Кембридж (А/Equine/Cambridge/1/63 — Н7N7) та Маямі (Equine influenza virus strain А/Еq/Miami/63 — Н3N8).

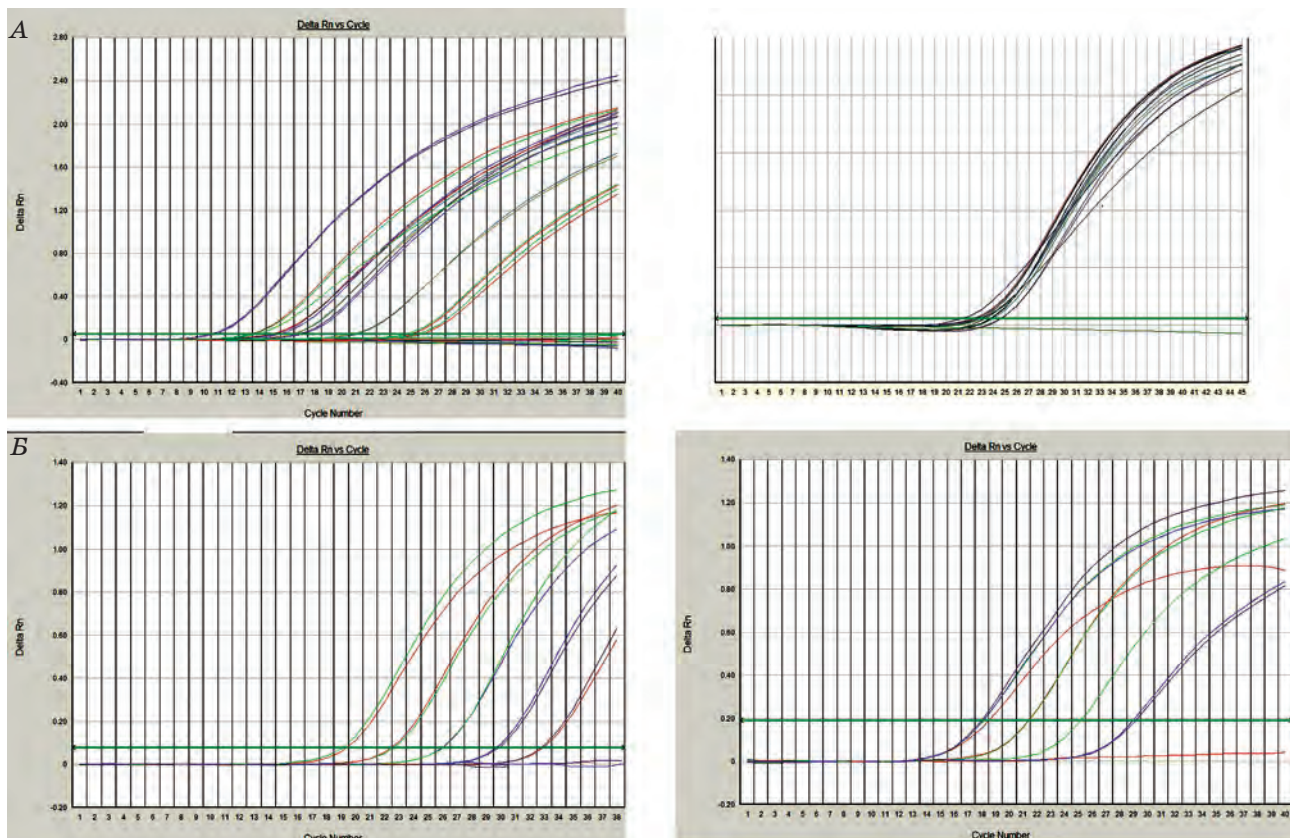


Рис. 2. Результати виявлення вірусу грипу А Н5N1 за допомогою тест-системи DIA-Real Avian Influenza в зразках, використуваних під час випробувань на базі Національного центру штамів мікроорганізмів (ДНКІВШМ, Київ, Україна):

А — виявлення вірусу грипу А (ген М — детекція за каналом FАM) та внутрішнього контрольного зразка (ІС-детекція за каналом JOE);

Б — ідентифікація гена Н5 (детекція за каналом FАM) та гена N1 (за каналом JOE)

Результати вивчення тест-системи DIA-Real Avian Influenza

Код зразка	Зразки, що містять різну концентрацію вірусу	Тест-система DIA-Real Avian Influenza			
		1-й етап		2-й етап	
		ІС (внутр. контроль) (Ct)	Вірус грипу А (Ct)	Гемаглютинін HA5 (Ct)	Нейрамінідаза NA1 (Ct)
1	Вірус ринотрахеїту птахів штаму ВНІ-БП (Turkey Rhinotracheitis (TRT virus) strain VNI-BP)	+ (24,29)	-	-	-
2	Вірус хвороби птахів Ньюкасла штаму Лясота (Newcastle Disease Virus (NDV) strain LaSota/B1)	+ (24,9)	-	-	-
3	Вірус хвороби птахів Ньюкасла штаму Вітапег (Newcastle Disease Virus (NDV) strain Vitapeg)	+ (25,69)	-	-	-
4	Вірус віспи птахів штаму Кучинський (Variola avium virus)	+ (23,6)	-	-	-
5	Вірус синдрому зниження яйценосності EDS-76 штаму ЭГ-96N3 (Chickens Egg Drop Syndrome '76 strain EG-96N3)	+ (20,19)	-	-	-
6	Вірус пташиного грипу А H5N1 (суспензія органів) (Avian influenza virus A H5N1)	+ (20,37)	+ (16,62)	+ (19,38)	+ (19,51)
7	Вірус пташиного грипу А H5N1 Кримський ізолят LA-NK-21205 (не розведений) (Avian influenza virus A H5N1 strain LA-NK-21205)	+ (25,39)	+ (13,43)	+ (20,11)	+ (19,3)
8	Вірус пташиного грипу А H5N1 Кримський ізолят LA-NK-21205 (розведення 1:10) (Avian influenza virus A H5N1 strain LA-NK-21205)	+ (24,94)	+ (16,96)	+ (22,61)	+ (22,81)
9	Вірус пташиного грипу А H5N1 Кримський ізолят LA-NK-21205 (розведення 1:100) (Avian influenza virus A H5N1 strain LA-NK-21205)	+ (26,21)	+ (20,6)	+ (26,39)	+ (26,27)
10	Вірус пташиного грипу А H5N1 Кримський ізолят LA-NK-21205 (розведення 1:1000) (Avian influenza virus A H5N1 strain LA-NK-21205)	+ (28,5)	+ (24,56)	+ (29,87)	+ (29,63)
11	Вірус пташиного грипу А H5N1 Кримський ізолят LA-NK-21205 (розведення 1:5000) (Avian influenza virus A H5N1 strain LA-NK-21205)	+ (24,08)	+ (25,69)	+ (32,93)	+ (30,76)
12	Неінфікована алантоїсна рідина курячих ембріонів	+ (28,69)	-	-	-
13	Неінфікована алантоїсна рідина курячих ембріонів	+ (26,69)	-	-	-
14	Вірус грипу коней штаму Кембридж (Equine influenza virus strain A/Equine/Cambridge/1/63 H7N7)	+ (26,49)	+ (15,47)	-	-
15	Вірус грипу коней штаму Маямі (Equine influenza virus strain A/Eq/Miami/63 H3N8)	+ (28,54)	+ (14,83)	-	-

Примітка: + — позитивний результат або наявність сигналу в досліджуваному зразку;
 - — негативний результат або відсутність сигналу в досліджуваному зразку;
 (Ct) — значення циклу ампліфікації, за якого зафіксовано позитивний сигнал.

Отже, встановлено, що чутливість та специфічність розробленої тест-системи DIA-Real Avian Influenza становить 100%. За результатами наших попередніх досліджень чутливість тест-системи дорівнює 1 000 копій/мл [20, 21].

Таким чином, розроблено тест-систему DIA-Real Avian Influenza, що здатна виявляти зразки високопатогенного вірусу грипу птахів HPAI/H5N1 з високими показниками чутливості та специфічності; хибнонегативних, хибнопозитивних чи сумнівних результатів не виявлено; чутливість тест-системи встановлено на рівні 1 000 копій/мл за результа-

тами попередніх досліджень та на рівні розведення 1:5 000 вірусомісної культуральної рідини кримського ізоляту HPAI/H5N1(LA-NK-21205) за результатами цих досліджень. Отримано реєстраційне свідоцтво Департаменту ветеринарної медицини Міністерства АПК України № 2148-14-0248-06 від 20.10.2006.

Ми вдячні за допомогу під час проведення досліджень канд. вет. наук, ст. н. с. ДУ «Інститут ветеринарної медицини» НАНУ А. А. Кучерявенко та д-ру вет. наук, професору Державного науково-контрольного інституту біотехнології і штамів мікроорганізмів В. В. Герману.

REFERENCES

1. Alexander D. J. An overview of the epidemiology of avian influenza. *Vaccine*. 2007, V. 11, P. 5637–5644. doi: 10.1016/j.vaccine.2006.10.051.
2. Li K. S., Guan Y., Wang J., Smith G. J., Xu K. M., Duan L., Rahardjo A. P., Puthavathana P., Buranathai C., Nguyen T. D., Estoepangestie A. T., Chaisingh A., Auewarakul P., Long H. T., Hanh N. T., Webby R. J., Poon L. L., Chen H., Shortridge K. F., Yuen K. Y., Webster R. G., Peiris J. S. Genesis of a highly pathogenic and potentially pandemic H5N1 influenza virus in eastern Asia. *Nature*. 2004, V. 430, P. 209–213.
3. Puthavathana P., Auewarakul P., Charoenying P. C., Sangsiriwut K., Pooruk P., Boonnak K., Khanyok R., Thawachsupha P., Kijphati R., Sawanpanyalert P. Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. *J. Gen. Virol.* 2005, V. 86, P. 423–433.
4. Guan Y., Poon L. L. M., Cheung C. Y., Ellis T. M., Lim W., Lipatov A. S., Chan K. H., Sturm-Ramirez K. M., Cheung C. L., Leung Y. H. C., Yuen K. Y., Webster R. G., Peiris J. S. M. H5N1 influenza: A protean pandemic threat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004, V. 101, P. 8156–8161.
5. Lipatov A. S., Govorkova E. A., Webby A. J. Influenza: Emergence and control. *J. Virol.* 2004, V. 78, P. 8951–8959.
6. Kiselyov O. I., Marinich I. G., Sominin A. A. Influenza and other respiratory viral infections: epidemiology, prevention, diagnosis and therapy. *SPb., RAMN, CZO, NII Grippa*. 2003, 244 p. (In Russian).
7. WHO Global Epidemiological Surveillance Standards for Influenza in 2014 Available at: http://www.who.int/influenza/surveillance_monitoring
8. Joint WHO-FAO-OIE assessment of community-level risk of zoonotic avian influenza H5N1 infections. *WHO, October 2012*. Available at http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Joint_WHO_FAO_OIE_project_report_Oct12.pdf.
9. Influenza at the human-animal interface. WHO Summary and assessment as of 29 August 2013. Available at http://www.who.int/influenza/human_animal_interface/Influenza_Summary_IRA_HA_interface_29Aug13.pdf.
10. Wu W. L., Chen Y., Wang P., Song W., Lau S. Y., Rayner J. M., Smith G. J., Webster R. G., Peiris J. S., Lin T. Antigenic profile of avian H5N1 viruses in Asia from 2002 to 2007. *J. Virol.* 2008, V. 82, P. 1798–1807.
11. Lvov D. K., Shchelkanov M. Yu., Prilipov A. G., Vlasov N. A., Fedyakina I. T., Deryabin P. G., Alkhovsky S. V., Grebennikova T. V., Zaberezhny A. D., Suarez D. L. Evolution of Highly Pathogenic Avian Influenza H5N1 Virus in Natural Ecosystems of Northern Eurasia (2005–08). *Avian Diseases Digest*. 2010, V. 54, P. 483–495.
12. Ed YONG. Mutant-flu paper published. *Nature*. 2012, V. 484, P. 13–14.
13. H5N1 HPAI Global overview: January–March 2012. *WHO-FAO-EMPRES/GLEWS*. 2012, N31. <http://www.fao.org/docrep/015/an388e/an388e.pdf>.
14. Jens Dreier, Melanie Stormer, Knut Kleesiek. Use of Bacteriophage MS2 as an Internal Control in Viral Reverse Transcription-PCR Assays. *J. Clin Microbiol.* 2005, 43(9), P. 4551–4557.
15. Chirny V. I., Ilchev Yu. A., Haytovich A. B. High-pathogenic bird flu and its epizooty among big cormorants in Ukraine during the spring period 2006 год. *Sbornik trudov Azovochernomorskoj ornitologicheskoe stantsii*. Vipusk 11, 2008, P. 223–230 (In Russian).
16. Onishchenko G. G., Berezhnov S. P., Shestopalof A. M. The molecular and biological analysis of isolates of a virus of the flu, caused an epizooty in the south of Western Siberia and in the Autonomous Republic of Crimea. *Veterinarna medicina. Mizhvidomchiy tematichnii nauk. sbirnyk №87*. Mizhnarodna naukova-practichna konferencia: Highly pathogenic flu of a bird: actual aspects of an epizootologiya, epidemiology, diagnostics and prevention (27–31 august 2006, Noviy Svit, ARE Crimea). 2006. Kharkiv, 2006, P. 143–150. (In Ukrainian).
17. Shipulin G. A., Yatsyshina S. B., Astakhova T. S. The molecular and epidemiological analysis of isolates of a virus of an avian flu of an epizooty 2005–2006 in the territory of Russia and CIS countries. *Veterinarna medicina. Mizhvidomchiy tematichnii nauk. sbirnik N 87*. Mizhnarodna naukova-practichna konferencia: Highly pathogenic flu of a bird: actual aspects of an epizootologiya, epidemiology, diagnostics and prevention (27–31 august 2006, Noviy Svit, ARE Crimea). 2006. Kharkiv, 2006, P. 301–307. (In Ukrainian).
18. World Health Organization. Recommended laboratory tests to identify avian influenza A virus in specimens from humans. WHO Geneva: June 2005. Available at <http://proj1.sinica.edu.tw>
19. World Health Organization. Recommendations for laboratory procedures to detect avian influenza A H5N1 virus in specimens from suspected human cases. WHO Geneva: August 2007. Available at <http://www.who.int/influenza/resources/documents/RecAllabtestsAug07.pdf>.
20. Stepaniuk S., Naidenov V., Vudmaska M., Pilipenko V., German V., Spivak N. Development of diagnostic test to detect avian influenza A H5N1 virus using multiplex Real-Time RT-PCR. *Biological system*. 2010, V. 2., P. 6–11. (In Ukrainian).
21. Stepaniuk S., Naidenov V., Vudmaska M., Pilipenko V., Gorlov Yu., Shevchuk A., Spivak N. Diagnostic test «DIA-Real Avian Influenza» to detect avian influenza A H5N1 virus using multiplex Real-Time RT-PCR. *Ukrainian patent 18814*, November 15, 2006. (In Ukrainian).

**ТЕСТ-СИСТЕМА ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ
И ГЕНОТИПИРОВАНИЯ
ВЫСОКОПАТОГЕННОГО ВИРУСА
ГРИППА ПТИЦ А H5N1 МЕТОДОМ
ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ
В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ**

*С. В. Степанюк¹
В. Г. Найденов²
Н. Я. Спивак³*

¹Частное акционерное общество
«Научно-производственная компания
Диапроф-Мед», Киев, Украина

²Институт физиологии им. А. А. Богомольца
НАН Украины, Киев

³Институт микробиологии и вирусологии
им. Д. К. Заболотного НАН Украины, Киев

E-mail: stepaniuk2008@yandex.ru

Результаты ежегодного эпизоотического мониторинга свидетельствуют, что высокопатогенный вирус гриппа птиц HPAI / H5N1 активно циркулирует на территории Евразийских государств. За период 2010–2013 гг. зафиксировано свыше 165 случаев вспышек инфекции в 14 странах мира. Украина стала одним из первых государств Европы, где в октябре 2005 г. на территории Автономной Республики Крым впервые была зафиксирована вспышка эпизоотии с HPAI/H5N1 и по февраль 2008 г. уничтожено более 236 тыс. голов птицы. С тех пор вопрос мониторинга инфицированной как перелетной, так и домашней птицы в местах перекрестного контакта в Украине остается актуальным. Разработана тест-система для выявления и идентификации вируса гриппа А H5N1 по трем генам (М, H5 и N1) РНК HPAI/H5N1 в полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Способность тест-системы выявлять вирус птичьего гриппа HPAI/H5N1 и дифференцировать его от образцов других возбудителей вирусных инфекций птиц и животных изучали с помощью тестирования образцов вируса HPAI/H5N1, выделенных во время массовой вспышки инфекции в Крыму в 2005 г., и культуральных образцов других вирусных патогенов. Установлено, что тест-система DIA-Real Avian Influenza способна обнаруживать РНК вируса гриппа А высокопатогенных штаммов H5N1 с высокими показателями чувствительности (100% при исследовании РНК вируса HPAI/H5N1 крымских изолятов) и специфичности (100% при исследовании РНК вирусов болезни Ньюкасла птиц, оспы птиц, синдрома снижения яйценоскости и гриппа лошадей).

Ключевые слова: высокопатогенный вирус гриппа птиц А H5N1, диагностическая тест-система DIA-Real Avian Influenza.

**TEST KIT FOR THE DETECTION
AND GENOTYPING OF HIGHLY PATHOGENIC
AVIAN INFLUENZA VIRUS A H5N1
BY REAL-TIME POLYMERASE
CHAIN REACTION**

*S. V. Stepaniuk¹
V. G. Naidenov²
M. Y. Spivak³*

¹Private Joint Stock Company
«Scientific and Production Company Diaphroph-Med»,
Kyiv, Ukraine

²Bogomoletz Institute of Physiology of the
National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
Ukraine

³Zabolotny Institute of Microbiology and
virology of the National Academy of Sciences
of Ukraine, Kyiv

E-mail: stepaniuk2008@yandex.ru

Results of the annual monitoring of epizooties indicate that highly pathogenic HPAI/H5N1 avian influenza widely circulated in Eurasian region. Over a period of 2010–2013 years more than 165 cases of outbreaks in 14 countries were found out. Ukraine became one of the first countries in Europe where in Autonomous Republic of Crimea in October 2005 outbreak of avian epizootic with HPAI/H5N1 was documented and until February 2008 more than 236,000 poultry were killed. Since then the question of monitoring of infected both migrating birds and poultry in places of cross contact in Ukraine remains of high priority. The test system is developed for identification and genotyping A H5N1 on three genes (M, H5 and N1) HPAI/H5N1 by real-time polymerase chain reaction. Test kit capacity to detect HPAI/H5N1 avian influenza virus and differentiate it from the other viral infection agents of birds and animals were studied by testing of HPAI/H5N1 virus isolated during mass infection outbreak in Crimea in 2005 and cultural specimens of other viral pathogens.

It was established that the «DIA Real Avian Influenza» test kit was capable to detect RNA influenza A virus of high pathogenic H5N1 strains having high sensitivity (100% while RNA of the Crimean HPAI/H5N1 isolate studying) and specificity (100% while RNA viruses of Newcastle birds disease, fowl powershift, syndrome of drop in egg production and horse influenza studying).

Key words: highly pathogenic avian influenza A virus H5N1, a diagnostic test system DIA-Real Avian Influenza.