

ДОСЛІДЖЕННЯ ЕПІЗООТИЧНОЇ СИТУАЦІЇ МІНЛИВОСТІ ВІРУСУ ГРИПУ А СУБТИПІВ H1N1 ТА H7N9 НА ТЕРИТОРІЇ УКРАЇНИ

С. В. Буряченко, Б. Т. Стегній
semenb837@gmail.com

ННЦ «Інститут експериментальної та клінічної ветеринарної медицини»,
вул. Пушкінська 83, м. Харків, 61023, Україна

Розглянуто епізоотичну ситуацію щодо грипу птахів та людини в Україні, обумовлену субтипами вірусу грипу А: H1N1 та H7N9. Показано сумірний аналіз наявних засобів діагностики пташиного грипу у птахів та людини та їх придатність, визначено варіабельність генетичних маркерів пташиних штампів вірусу грипу А у птахів та людини. Представлено епізоотичну ситуацію щодо поширеності пташиного грипу у світі та Україні, проаналізовано різні засоби діагностики пташиного грипу в порівнянні, варіабельність генетичних маркерів пташиних штампів вірусу грипу А у двох субтипів. Вказано, що природним резервуаром вірусу і причиною розповсюдження епізоотії є перелітні водоплавні птахи, які завдяки своїй природній резистентності найменш сприйнятливі до інфекції і в процесі міграції можуть подолати великі відстані. Згідно з літературними даними, деякі пташині штами вірусу грипу А, зокрема субтипів H1N1 та H7N9, є небезпечними для людини та часто призводять до летального наслідку. Дані досліджень, отримані з діагностичного або біологічного матеріалу, повинні бути підтверджені специфічністю методу, а не тільки молекулярно-біологічними методами, для встановлення їх вірогідності. Виникає необхідність швидкого отримання результатів дослідження. Для успішного проведення заходів, які призведуть до скорочення смертності та зниження ризику розповсюдження інфекції, необхідно проводити регулярний моніторинг спалахів інфекції, епідемій, а також своєчасну її діагностику. Велике практичне значення для діагностики пташиного грипу та інших інфекційних захворювань на сьогодні має метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), запроваджений у багатьох лабораторіях світу. Але цей метод потребує використання дорогого обладнання і витратних матеріалів та є для багатьох лабораторій дорогим і економічно неефективним методом.

Ключові слова: ГРИП ПТИЦІ, ЛАБОРАТОРНА ДІАГНОСТИКА, ПОЛІМЕРАЗНА ЛАНЦЮГОВА РЕАКЦІЯ (ПЛР), ПДРФ-АНАЛІЗ, ГЕНЕТИЧНІ МАРКЕРИ, ГЕНОТИПОВА ВАРІАБЕЛЬНІСТЬ, ФІЛОГЕНЕТИЧНИЙ АНАЛІЗ

THE RESEARCH OF EPIZOOTIC SITUATION OF AVIAN INFLUENZA H1N1 AND H7N9 IN SUBTYPES VARIABILITY ON THE TERRITORY OF UKRAINE

S. V. Buriachenko, B. T. Stegnyy
semenb837@gmail.com

NSC Institute of Experimental and Clinical Veterinary Medicine,
83 Pushkinska str., Kharkiv 61023, Ukraine

The epizootic situation of avian influenza in birds and humans in Ukraine, caused by subtypes A H1N1 and H7N9 is being reviewed. A comparative analysis of the existing methods for diagnosing avian influenza in birds and humans and their suitability is shown, and the variability of avian influenza genetic markers in birds and humans is determined. An epizootic situation on the prevalence of avian influenza in the world and Ukraine is presented, various methods for diagnosing avian influenza virus in comparison are analyzed, the variability of genetic markers of avian influenza in the two subtypes is analyzed. It is shown that the natural reservoir of the virus and the cause of the spread of the epizootic are migratory waterfowl, which, due to their natural resistance, are the least susceptible to infection and can travel long distances during migration. According to the literature, some strains of the avian influenza virus, in particular H1N1 and H7N9, are unsafe for humans and often lead to death. Research data obtained from diagnostic or biological material must be confirmed by the specificity of the method and not only molecular — biological to establish their reliability. There is a need to quickly obtain research results. For successful measures that will lead to a reduction in mortality and reduce the risk of spreading the infection, it is necessary to conduct regular monitoring of the foci of infection, epidemics, as well as its timely diagnosis. Polymerase chain reaction

(PCR), which is accepted in many laboratories around the world, is of great practical importance for the diagnosis of avian influenza and other infectious diseases. However, this method requires the use of expensive equipment and consumables and for many laboratories it is an expensive and not a cost-effective method.

Keywords: AVIAN INFLUENZA, LABORATORY DIAGNOSIS, POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR), PANALYSIS, RFLP-ANALYSIS, GENETIC MARKERS, GENOTYPE VARIABILITY, PHYLOGENETIC ANALYSIS

Пташиний грип (*Avian influenza*) — висококонтагіозне інфекційне захворювання, яке характеризується високою (до 100 %) смертністю птиці. Етіологічним фактором, що викликає це захворювання, є РНК-вмісний вірус грипу А (*Influenza A virus*) з родини *Orthomyxoviridae*. Віріони плеоморфні, найчастіше сферичної форми, діаметром 80–120 нм. Ліпопротеїнова оболонка віріона має у складі глікопротеїди — гемаглютинін (Н) та нейрамінідазу (N), які утворюють шипи на її поверхні. Встановлено 16 субтипів Н та 9 субтипів N, поєднання яких зумовлює велику кількість антигенних варіантів вірусу грипу А (близько 50). Основна маса їх циркулює у популяціях диких водоплавних птахів, які є природним резервуаром збудника інфекції. На відміну від птахів, у людській популяції до недавнього часу циркулювали штами, асоційовані лише з трьома субтипами Н (Н1, Н2, Н3) та двома субтипами N (N1, N2). Однак в останні десятиліття зафіксовано випадки зараження людини невластивими для людської популяції субтипами вірусу грипу А: Н7N7, Н7N3, Н9N2 та Н5N1. Для птиці найбільш патогенними є субтипи Н1 та Н7 [2, 6, 19]. Природним джерелом вірусу і причиною поширення епізоотії є перелітні водоплавні птахи. Вони мають природну резистентність, що робить їх найменш сприйнятливими до інфекції, і в процесі міграції можуть подолати великі відстані. До ураження пташиним грипом сприйнятливі не тільки птахи, але й інші дикі та свійські тварини.

Проблеми варіабельності генетичних маркерів пташиних штамів вірусу грипу А субтипів Н1 та Н7 розглядали у своїх дослідженнях В. І. Болотін, А. П. Герілович, В. О. Загребельний, А. О. Меженський, В. О. Постоєнко, В. А. Прискока, М. А. Сапачова, С. І. Симоненко, Б. В. Сорочинський, Б. Т. Стегній та інші. Значну увагу цьому питанню приділяють вчені інших країн: Ф. Сідоті, Ф. Ріццо, К. Коста,

С. Шивакоті, Х. Іто, Т. Мурасе, Е. Оно, Н. Такакава, Т. Ямашіро, О. Оцукі та інші.

Проаналізувавши результати досліджень багатьох лабораторій світу, однією з яких є *GD Animal Health*, дійшли висновку про проведення моніторингу всіх штамів вірусу грипу А. В Україні використовують тест-систему *Influenza A Virus Antibody Test Kit (IDEXX Influenza A)*, за допомогою якої знаходять антитіла до усіх штамів вірусу грипу А. Лабораторія серології «ЦВД» цією тест-системою користується з 2005 р., що у міжнародних порівняльних дослідженнях підтверджує вірогідність отриманих результатів [24]. Останнім часом знову постає проблема пташиного грипу в Україні. Для запобігання нищівним наслідкам інфекції за найменшої підозри варто проводити діагностичний моніторинг.

Мета статті — аналіз епізоотичної ситуації щодо грипу птиці в Україні, зумовленого субтипами Н1N1 та Н7N9, порівняльний аналіз різних методів діагностики пташиного грипу та їхню придатність, дослідження варіабельності генетичних маркерів пташиних штамів вірусу грипу А.

Завдання — визначити епізоотичну ситуацію щодо поширеності пташиного грипу в Україні та світі; проаналізувати різні методи діагностики пташиного грипу в порівнянні; аналізувати варіабельність генетичних маркерів пташиних штамів вірусу грипу А.

Згідно з дослідженнями багатьох науковців, субтипи Н1 та Н7 вірусу грипу А є найбільш патогенними і призводять до летальних випадків серед птиці та людей. Вірус грипу А є вкрай мінливим, характеризується високим рівнем мутації. Навіть низькопатогенні субтипи вірусу завдяки варіабельності спричиняють загибель птиці.

Зараження відбувається повітряно-крапельним або фекально-оральним механізмом передачі. Інфекція може проходити

безсимптомно, але може спричинити захворювання дихальної системи, а в гострій формі — летальний результат.

Завдяки своїй швидкій розповсюдженості пташиний грип нотифікується та моніториться Міжнародним епізоотичним бюро. Навіть у розвинених європейських країнах існує державна програма моніторингу всіх стад на циркуляцію вірусу грипу А, що проводиться мінімум один раз на рік.

У Гонконзі в 1997 р. було вперше зареєстровано пташиний грип у людини. Інфікування людей збіглося з епідемією високопатогенного штаму вірусу субтипу H1N1, який спричинив важке захворювання дихальних шляхів у 18 осіб, з яких 6 померло. Під час лабораторних досліджень було підтверджено, що збудником хвороби є той самий штам, що й серед популяції свійських птахів, і хворі контактували з інфікованою свійською птицею.

Провівши моніторинг країн Східної та Західної Європи, а саме Румунії, Польщі, Угорщини, Болгарії, Нідерландів, Швейцарії, Австрії, Німеччини, спостерігали спалахи пташиного грипу серед диких та перелітних птахів у 2016 р. Цього ж року в Україні випадки пташиного грипу були зареєстровані в Чернівецькій (Кіцманський р-н) та Херсонській обл. (рис. 1) [1].

В Україні діагностика грипу птиці проводиться комплексно з урахуванням епізоотологічних даних, клінічних симптомів, патологоанатомічних змін та лабораторних досліджень.

Грип птиці необхідно диференціювати від інших захворювань — таких, як інфекційний ларинготрахеїт, ньюкаслська хвороба, пастерельоз, респіраторний мікоплазмоз [3, 10]. Саме тому до методу діагностики грипу птиці висувають низку вимог за показниками специфічності, чутливості, відтворюваності та тривалості проведення аналізу [5].

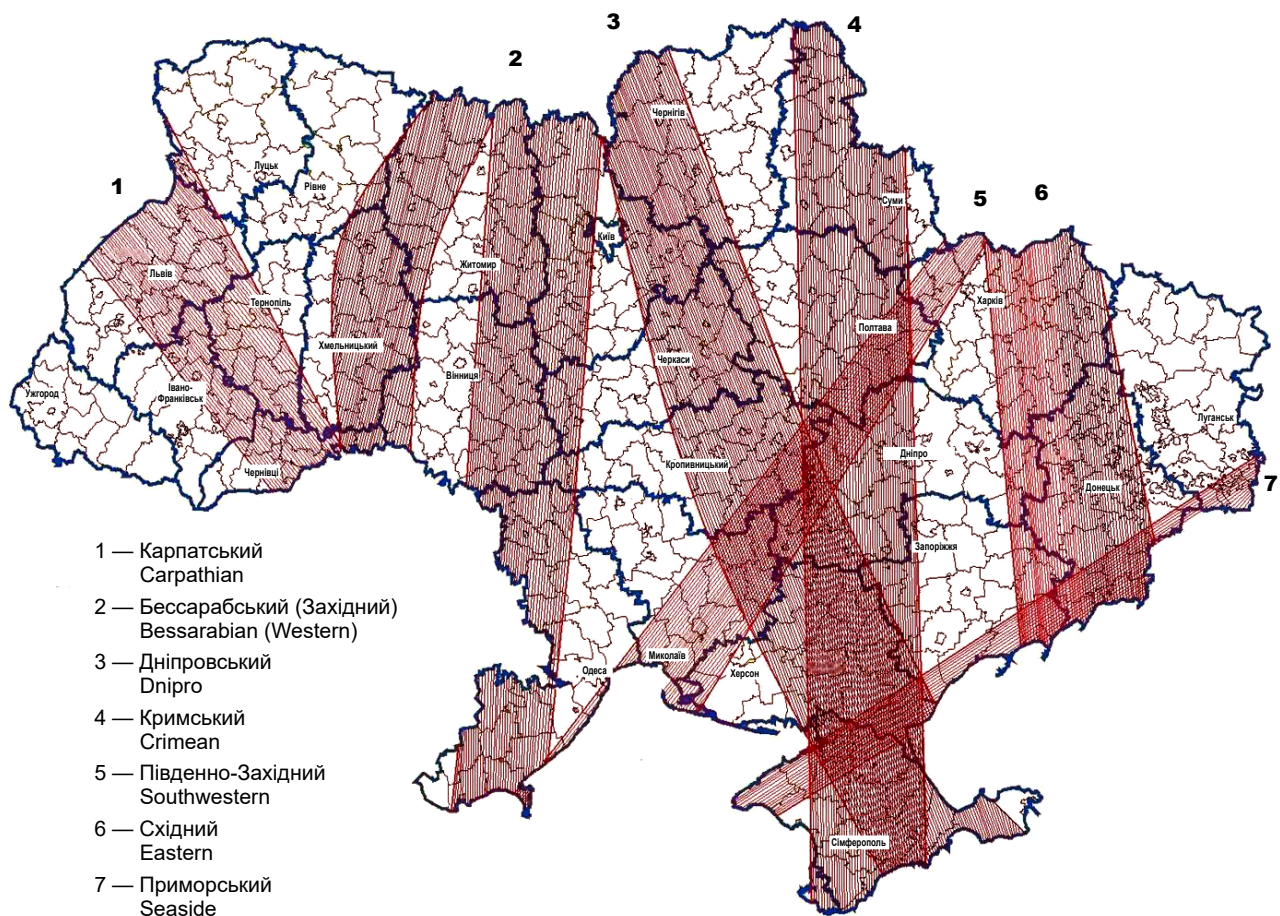


Рис. 1. Схема основних перелітних шляхів осінньої міграції птиці в Україні [23]
Fig. 1. Scheme of main migratory routes of autumn migration of poultry in Ukraine [23]

За лабораторної діагностики особливе місце займає високочутливий метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Цей метод базується на ампліфікації специфічних ділянок геному певного субтипу збудника. Висока чутливість, специфічність та короткий час проведення аналізу роблять його перспективним при діагностиці грипу птиці. Але проведення та облік результатів ПЛР аналізу вимагає використання коштовного обладнання та реактивів і тому не завжди є доступним для лабораторій, які мають ресурсні обмеження [12, 22].

Тому важливим є розробка простих і чутливих експрес-методів діагностики пташиного грипу, адаптованих до місцевих умов. Одним із таких є новий підхід, заснований на ПЛР, суміщений з аналізом поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів РНК (ПЛР-ПДРФ). Дослідниками раніше розроблено реакційну суміш та оптимізовано умови проведення реакції RT-LAMP для діагностики пташиного грипу субтипу H1N1 [14, 18, 21].

При визначенні антитіл до пташиних штамів вірусу грипу А за спалаху ендемії 1997 р. стандартний аналіз інгібування гем-аглютинації для серологічного виявлення інфекції грипу у людини показав низьку чутливість.

Тому був запропонований чутливіший метод мікронеутралізації та H1-специфічний непрямий метод ELISA (імуноферментний аналіз) для визначення антитіл до пташиних штамів вірусу грипу А в людини. Чутливість і специфічність значно зростали при поєднанні цих методів із Вестерн-блотингом. За визначення антитіл до H1 у дорослих у віці від 18 до 59 років максимальну чутливість (80 %) і специфічність (96 %) досягали при застосуванні мікронеутралізації в поєднанні з Вестерн-блотингом. Максимальну чутливість (100 %) і специфічність (100 %) досягали при застосуванні непрямого методу ELISA в поєднанні з Вестерн-блотингом за визначення антитіл до H1 у сироватці дітей віком до 15 років. Алгоритм такого поєднання можна використовувати при проведенні сероепідеміологічних досліджень спалахів грипу, зумовлених субтипом H1N1 [11]. Було також показано, що високопатогенні нейротропні варіанти пташиних

штамів вірусу грипу А субтипу H1N1 можуть бути швидко виділені на мишах [4].

Крім того, ще в 1995 р. для швидкого визначення послідовності сайту розщеплення Н, маркера потенціалу вірулентності пташиних штамів вірусу грипу А, була використана RT-PCR (полімеразна ланцюгова реакція у реальному часі). Ця методика у поєднанні з секвенуванням сайту розщеплення Н може слугувати швидким та чутливим методом оцінки потенційної вірулентності пташиних штамів вірусу грипу А. Хоча проведення RT-PCR потребує дорожчого обладнання та реактивів, ніж ПЛР, облік результатів RT-PCR не потребує додаткового обладнання та реактивів, що робить використання RT-PCR фінансово вигіднішим, ніж ПЛР. Раннє виявлення пов'язаних з вірулентністю послідовностей на сайті розщеплення Н у польових ізолятах вірусу допоможе краще контролювати грип серед величезної популяції свійської птиці [20].

Перспективним є використання поліморфізму довжин рестрикційних фрагментів для ідентифікації штамів вірусу грипу А, проте ця методика, як і ПЛР, потребує електрофоретичного розподілу продуктів реакцій і тому є економічно затратною.

З часом науковці розробили простий молекулярний метод швидкого генотипування для моніторингу внутрішніх генів циркулюючого вірусу грипу А. Стратегію субтипуювання вірусу було протестовано наосліп на 10 контрольних вірусах кожного субтипу H1N1, H3N2 і H5N1 (всього на 30 зразках) і виявлено високу її ефективність. Надалі було розроблено стандартизований метод генотипування, який використовувався для ідентифікації джерела внутрішніх генів 51 вірусу грипу А, виділеного від людей у Гонконзі в ході спалахів 1997–1998 рр. і одразу після них. Також цю методику використовували для характеристики внутрішніх генів двох ізолятів вірусу субтипу H9N2, отриманих у Гонконзі в 1999 р. [13].

Пізніше для швидкого визначення вірусу грипу А субтипів H1 і H7 було розроблено метод зворотної ПЛР у реальному часі (RRT-PCR). Суть цього методу полягає в використанні одностадійного способу визначення

флуоресцентних зондів. Межа визначення — близько 1000 копій мішені-РНК. За допомогою цього методу можна визначити 0,1 % від 50 % інфекційну дозу для курячих ембріонів. Для аналізу субтипів вірусу грипу А межа визначення — 103–104 копії мішені-РНК. Чутливість і специфічність цього методу безпосередньо порівнювалася зі стандартними методиками для визначення вірусу грипу А: виділення вірусу на курячих ембріонах і субтипуювання Н у реакції інгібування гемаглютинації. Порівняння проводились на 1550 зразках трахеї та клоачних мазках від різних видів птахів і мазках, узятих з навколишнього середовища на ринках живої птиці в Нью-Йорку і Нью-Джерсі (США). Результати RRT-PCR корелювали з результатами виділення вірусу грипу А на курячих ембріонах у 89 % зразків. Інші зразки були позитивними при визначенні тільки одним із методів. Загалом чутливість та специфічність Н7- і Н1-специфічних аналізів була схожа з методом виділення вірусу на курячих ембріонах і реакції інгібування гемаглютинації [15].

Загальними недоліками розглянутих вище методів є значна тривалість проведення досліджень, неможливість диференціації вірусу від інших близькоспоріднених видів та використання великої кількості патологічного матеріалу.

Результати досліджень діагностичного матеріалу за допомогою жодної молекулярно-генетичної методики чи протоколу детекції збудника того чи іншого захворювання не можна вважати вірогідними, якщо немає прямих доказів специфічності реакції. Критерієм її у кожній окремо взятій постановці слугують контролі реакції. Негативний контроль доводить дослідникові факт специфічності отриманих результатів та відсутності контамінації застосованих компонентів реакційної суміші. Позитивний контроль реакції забезпечує доказову базу щодо активності компонентів реакційної суміші [8].

Питання створення та застосування позитивного контролю реакції при дослідженні матеріалів на інфекції, зумовлені РНК-вмісними вірусами, постає гостро, оскільки РНК-матриці є доволі нестабільними струк-

турами. Вони зазнають швидкого руйнування при заморожуванні та під впливом ендогенних ферментів. Для забезпечення стабільності контрольних позитивних зразків вчені всього світу вже давно користуються клонованими ДНК-копіями РНК-матриць [8, 9].

Якщо проаналізувати випадки захворювання свійської птиці на грип, які спостерігались на території України впродовж останніх років, то можна зазначити, що на частку субтипу Н7 припадає 2 % від усіх зареєстрованих спалахів. Було зареєстровано випадки виявлення РНК збудника високопатогенного грипу птиці субтипу Н7. Зразки були виділені з клінічного матеріалу від гусей одного з птахогосподарств Сумської обл. Збудник був ідентифікований як вірус грипу А штаму *Influenza A virus/goose/Ukraine/2006/H7N7* [9].

На цьому етапі роботи дослідниками був проведений генетичний аналіз вірусу грипу А субтипу Н7 з колекції ННЦ «ІЕКВМ». Причиною для проведення цієї роботи стала розрізненість інформаційних ресурсів щодо дослідження філогенетичних профілів вірусу грипу А субтипу Н7 у світі.

Було проведено множинне вирівнювання 307 послідовностей фрагментів гена Н вірусу грипу А субтипу Н7, ізолюваного від птиці у країнах Американського та Євразійського континентів, яке показало наявність двох ендемічних гілок вірусів, що мали дивергенцію до 22 % між собою.

Гілка 1 була представлена американськими штамами вірусу грипу А переважно субтипу Н7N2 та деякими субтипами Н7N3. Дивергенція всередині кладу складала до 4 %. Американська геногрупа була представлена шістьма підгрупами (1a–1e) з різницею нуклеотидних послідовностей від 0,1 до 2,5 % та зовнішньою дивергенцією від 1 до 4 %.

Клад вірусу грипу А європейського генотипу був представлений п'ятьма генетичними підгрупами (2a–2d), кожна з яких вміщувала від 4 до 50 ізолятів. Більшість європейських ізолятів були виділені від дикої водоплавної птиці та диких індичок. Дивергенція між групами кладу становила до 6 %, а дивергенція всередині груп — до 5 %. Найбільшу нуклеотидну поліморфність продемонструвала група

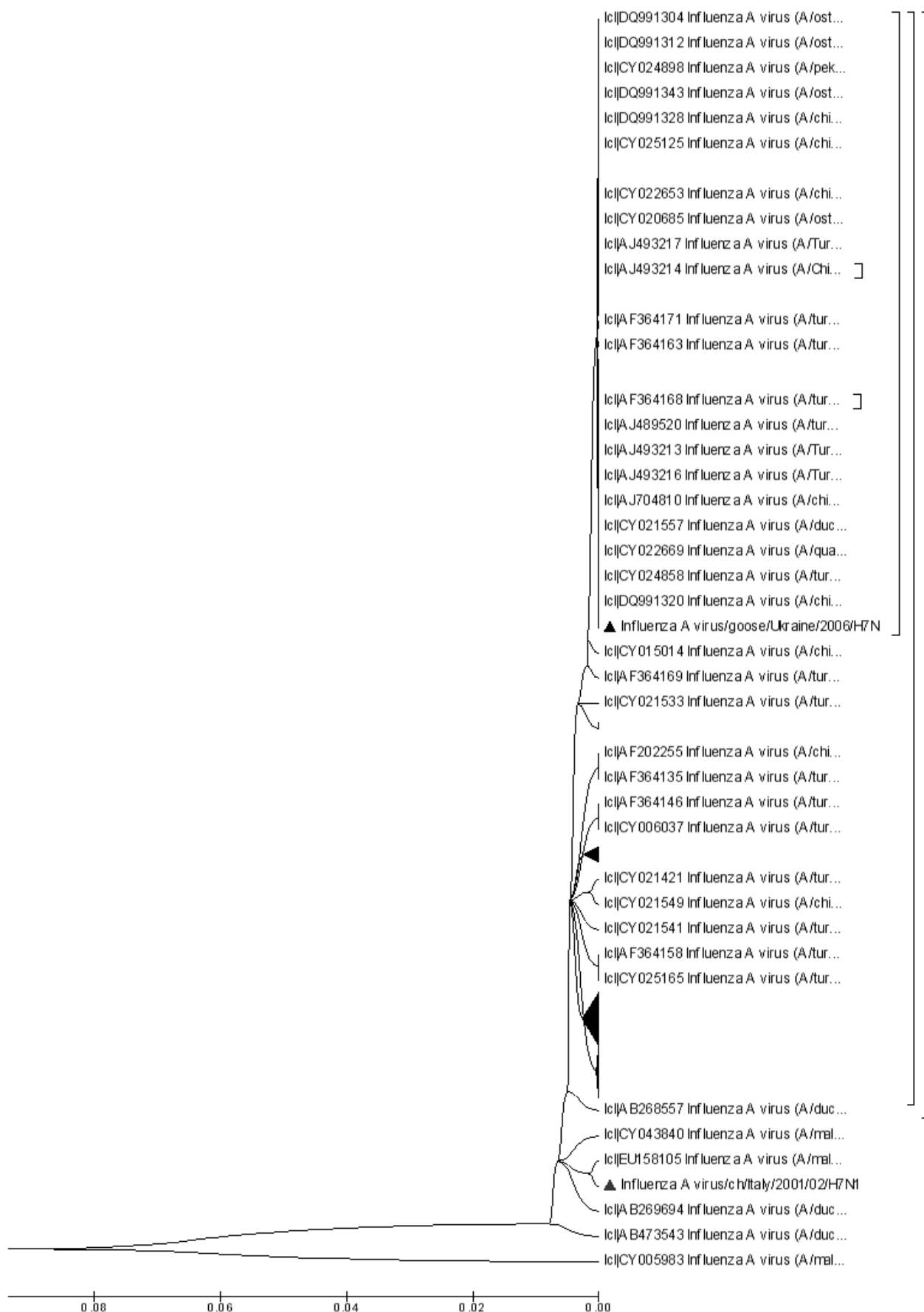


Рис. 2. Філогенетичні зв'язки між вірусами європейського генотипу (▲ — українські ізоляти) [9, 12]
 Fig. 2. Phylogenetic connections between viruses of the European genotype (▲ — Ukrainian isolates) [9, 12]

вірусів, позначена як 2в. Вона була представлена чотирма високопатогенними штамми, ізольованими від різних видів птиці (качка, лебідь, індичка та курка) в Європі та Америці. Цю групу можна розцінювати як переміжну ланку в еволюції відокремлених ендемічних популяцій вірусу. Дивергенція у ній склала понад 5 %, що свідчить про високий мутаційний фон в аналізованого кластера вірусів [7].

Після визначення топографічних особливостей дендрограми, яка відображала зв'язки вірусу грипу А субтипу Н7, було встановлено, що збудник американського генотипу не змішувався з популяцією європейських вірусів філогенетично. Тому при аналізі секвенованих послідовностей ізолятів *Influenza A virus/ch/Italy/2001/02/H7N1* (IZPVe) та *Influenza A virus/goose/Ukraine/2006/H7N7* вчені досліджували їх лише порівняно з кДНК вірусів європейського генотипу [13].

Проведене клонування та секвенування фрагментів гена Н українських ізолятів показало, що вірус українського походження найбільш подібний до італійського вірусу, виділеного від страусів у 2001 р. (рис. 2). Дивергенція між ізолятами становила 0,5 %.

У кладу вірусів з послідовностями плазмідного контрольного зразка pBlunt_AIVN7 були присутні віруси італійського та китайського походження з дивергенцією не більше 2 %, всі ізоляти характеризувались хазяїноспецифічністю щодо диких водоплавних.

Отримані на підставі аналізу консервативних ділянок дані дозволили розрахувати праймери AivN7 (Am) до американського генотипу та AivN7 (Eu) до європейського генотипу вірусу грипу А субтипу Н7, які мають температуру плавлення 57 °С та 54 °С відповідно. Фланковані ними фрагменти олігонуклеотидів мають довжину 284 п.н. та 641 п.н. і демонструють високу внутрішньовидову специфічність щодо перехресних генотипів вірусу грипу А інших субтипів, до інших вірусів птиці та геномної ДНК курки й інших видів птиці.

Використання праймерів Aiv N7 (Eu) до вірусу європейського генотипу і Aiv N7 (Am) — американського генотипу за оптимізованих параметрів реакції забезпечує утворення специфічних ампліконів завдовжки

641 п.н. (європейський генотип) та 284 п.н. (американський генотип) та детекцію вірусу в пробах з активністю до 0,2–0,4 Іг/см³ за РГА, що задовольняє діагностичні потреби.

Створена на підставі теоретичного аналізу гена Н вірусу грипу А субтипу Н7 модель рекомбінантної плазмиди, що складається з pCR-Blunt відкритого вектора, вставки ділянки гена Н європейського генотипу, завдовжки 641 п.н., може застосовуватися як позитивний контрольний зразок при діагностиці грипу птиці (субтипу Н7). Отриманий за допомогою трансформації вектором pCR-Blunt стабільний клон № 3 інтродукує фрагмент гена Н вірусу грипу субтипу Н7 європейського генотипу [15, 21].

Швидкість еволюції пташиних штамів вірусу грипу А в природних хазяїв (водоплавні птахи, сивки і чайки) та абераційних хазяїв (кури, індички, поросята, коні і люди) різна. Швидкість еволюції, визначена для всіх трьох спалахів, була подібною до швидкості, яка спостерігається у ссавців, що є вагомим доказом адаптації пташиних штамів вірусу грипу А до нових видів хазяїв [17].

На сьогодні пташині штами вірусу грипу А не передаються від людини до людини, проте через епідемію серед свійської птиці така передача стає дедалі вірогіднішою. Необхідна лише правильна рекомбінація між пташиними штамми субтипу Н1N1 або Н7N9 та наявними людськими штамми вірусу грипу А. Це може трапитися за умови, якщо тварина чи людина заразиться одночасно специфічним своєму виду штамом вірусу грипу А і пташиним штамом, що дозволить вірусам обмінятися генами та утворити новий штам, який зможе легко передаватися від біологічного об'єкта певного виду до іншого об'єкта його виду. Досі немає доказів, що це відбулося, оскільки у всіх відомих випадках хвороби інфікування відбувалося при прямому контакті з курми [16].

Висновки

Згідно з літературними даними, деякі пташині штами вірусу грипу А, зокрема субтипів Н1N1 та Н7N9, є небезпечними для людини і часто приводять до летального наслід-

ку. В Україні на частку субтипу H7 припадає 2 % від усіх зареєстрованих спалахів. Штами вірусу грипу А, виділені на території України, найбільш подібні до італійських штамів. Показано поліморфізм та генетичну відстань між штамми вірусу грипу А, виділеними у різних регіонах світу, зокрема в Україні. Для успішного проведення заходів, що призведуть до скорочення смертності та зниження ризику розповсюдження інфекції, необхідний регулярний моніторинг спалахів інфекції, епідемії, а також своєчасна її діагностика. Важливе місце в діагностиці пташиного грипу займає експрес-діагностика. Останнім часом поширений метод ПЛР, зокрема ПЛР у реальному часі, який дозволяє не тільки виявити штам патогену, а й також його кількість у досліджуваному матеріалі без застосування електрофоретичного розділення фрагментів РНК (ДНК). Але недоліком цього методу є дороге обладнання та реактиви, що не є економічно досяжним для більшості вітчизняних лабораторій. Таким чином, перспективною є розробка недорогих та чутливих експрес-методів діагностики пташиного грипу, адаптованих до місцевих умов.

Перспективи подальших досліджень.

Перспективними є удосконалення, розробка та впровадження у виробництво України експрес-методу діагностики пташиного грипу, заснованого на методі ПЛР аналізу, суміщеного з поліморфізмом рестрикційних фрагментів (ПДРФ-метод) нуклеїнових кислот, а також метод мікронеїтралізації та Н1-специфічний непрямий метод ELISA (імуноферментний аналіз) для визначення антитіл до пташиних штамів вірусу грипу А в людини. Чутливість і специфічність цих методів значно збільшується при поєднанні з методом Вестерн-блотинг. Отже, оптимізація та раціональне поєднання цих методів є найбільш перспективним шляхом для швидкої та відносно недорогої ідентифікації вірусу грипу А, зокрема найбільш небезпечних для людини субтипів H1N1 та H7N9.

1. Akanina D. A. Development of diagnostic tools for high virulent strain of influenza A subtype H5N1. Diss. cand. biol. sci., Moscow, 2014, 161 p. Available at: [http://docplayer.ru/55287268-Peoples-Friendship-University-of-Russia-Akanina-Daria-](http://docplayer.ru/55287268-Peoples-Friendship-University-of-Russia-Akanina-Daria-Sergeevna-development-of-diagnostics-highly-virulent-strain-virus-influenza-a-subtype-n5n1.html)

- [Sergeevna-development-of-diagnostics-highly-virulent-strain-virus-influenza-a-subtype-n5n1.html](http://docplayer.ru/55287268-Peoples-Friendship-University-of-Russia-Akanina-Daria-Sergeevna-development-of-diagnostics-highly-virulent-strain-virus-influenza-a-subtype-n5n1.html).
2. Bakulov I. A., Kotljarov V. M., Donchenko A. S., Huhorov I. Ju., Ternovaja S. F., Knize A. V. *Particularly dangerous animal diseases*. A reference guide. Novosibirsk, Pokrov, 2002, 184 p.
3. Belousova R. V., Trocenko N. I., Preobrazhenskaya Je. A. *Workshop on Veterinary Virology*. Moscow, Kolos, 2006, 248 p. (in Russian)
4. Brownlee G. G., Fodor E. The predicted antigenicity of the haemagglutinin of the 1918 Spanish influenza pandemic suggests an avian origin. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological sciences*, 2001, vol. 356, issue 1416, pp. 1871–1876. DOI: 10.1098/rstb.2001.1001.
5. Capua I., Marangon S. Control and prevention of Avian influenza in an evolving scenario. *Vaccine*, 2007, vol. 25, issue 30, pp. 5645–5652. DOI: 10.1016/j.vaccine.2006.10.053.
6. Capua I., Marangon S., dalla Pozza M., Terregino C., Cattoli G. Avian Influenza in Italy 1997–2001. *Avian Diseases*, 2003, vol. 47, issue 3, pp. 839–843. DOI: 10.1637/0005-2086-47.s3.839.
7. Gerilovich A. P., Simonenko S. I., Bolotin V. I., Solodyankin O. S. Development of a positive control sample of the hemagglutinin gene of avian influenza viruses subtype N7 of the European genotype based on recombinant DNA. *Veterinary medicine: an interdepartmental thematic scientific collection H.*, 2009, vol. 92, pp. 113–119. (in Ukrainian)
8. Gerilovich A. P., Stegnyy B. T., Simonenko S. I. Creation of indicators for highly pathogenic influenza and Newcastle disease, as well as identification of isolates of N1-, N5- and N7-subtypes. Materials of V International veterinary congress on poultry farming, 2007, pp. 91–95.
9. Gerilovich A. P., Stegnyy B. T., Symonenko S. I. Development of avian influenza virus detection protocol for RNA European of type H7. XVI World Veterinary Poultry Association Congress: Book of abstracts, Marrakesh (Morocco), 2009, P1–A1.
10. Golovko A. N. (ed.), Ushkalov V. A., Skrypnik V. G., Stegnyy B. T. *Microbiological and virological research methods in veterinary medicine*. A reference guide. Kharkiv, NTMT, 2007, 512 p. (in Russian)
11. Govorkova E. A., Leneva I. A., Goloubeva O. G., Bush K., Webster R. G. Comparison of efficacies of RWJ-270201, Zanamivir, and Oseltamivir against H5N1, H9N2, and other avian influenza viruses. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2001, vol. 45, issue 10, pp. 2723–2732. DOI: 10.1128/AAC.45.10.2723-2732.2001.
12. Highly pathogenic avian influenza. In: *Manual of Standards for Diagnostic Tests and Vaccines*. 2009.
13. Ito T., Couceiro J. N., Kelm S., Baum L. G., Krauss S., Castrucci M. R., Donatelli I., Kida H., Paulson J. C., Webster R. G., Kawaoka Y. Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with

- pandemic potential. *Journal of Virology*, 1998, vol. 72, issue 9, pp. 7367–7373.
14. Ji J., Xie Q. M., Chen C. Y., Bai S. W., Zou L. S., Zuo K. J., Cao Y. C., Xue C. Y., Ma J. Y., Bi Y. Z. Molecular detection of Muscovy duck parvovirus by loop-mediated isothermal amplification assay. *Poultry Science*, 2010, vol. 89, issue 3, pp. 477–483. DOI: 10.3382/ps.2009-00527.
15. Li K. S., K Xu. M., Peiris J. S. M., Poon L. L. M., Yu K. Z., Yuen K. Y., Shortridge K. F., Webster R. G., Guan Y. Characterization of H9 subtype influenza viruses from the ducks of Southern China: a candidate for the next influenza pandemic in humans? *Journal of Virology*, 2003, vol. 77, issue 12, pp. 6988–6994. DOI: 10.1128/JVI.77.12.6988-6994.2003.
16. Matrosovich M., Zhou N., Kawaoka Y., Webster R. The surface glycoproteins of H5 influenza viruses isolated from humans, chickens, and wild aquatic birds have distinguishable properties. *Journal of Virology*, 1999, vol. 73, issue 2, pp. 1146–1155.
17. Perdue M. L., Suarez D. L. Structural features of the avian influenza virus hemagglutinin that influence virulence. *Veterinary Microbiology*, 2000, vol. 74, issue 1–2, pp. 77–86. DOI: 10.1016/S0378-1135(00)00168-1.
18. Postoienko V. O., Sorochinsky B. V., Sapachova M. A., Karpulenko M. S., Katsimon V. V., Gerilovich A. P. Optimization of conduct isothermal amplification of nucleic acids of avian influenza virus H5N1. *Scientific and Technical Bulletin*, Lviv, 2013, vol. 14, issue 3–4, pp. 325–330. Available at: http://www.scivp.lviv.ua/images/files/Naukovo_tekhnichnyy_byuleten/NTB_2013_14_3_4/61.pdf (in Ukrainian)
19. Pryskoka V. A., Zagrebelny V. O., Mezhenyky A. O., Nevolko O. M., Harkavenko T. O., Kyivska H. V. *Diagnosis of animal infectious diseases: theory and practice*. A monograph. Kyiv, DNDILDVSE, 2014, 454 p. (in Ukrainian)
20. Ryan-Poirier K. A., Kawaoka Y. Distinct glycoprotein inhibitors of influenza A virus in different animal sera. *Journal of Virology*, 1991, vol. 65, issue 1, pp. 389–395.
21. Shivakoti S., Ito H., Murase T., Ono E., Takakuwa N., Yamashiro T., Otsuki O., Ito T. Development of reverse transcription-loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for detection of avian influenza viruses in field specimens. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2010, vol. 72, issue 4, pp. 519–523. DOI: 10.1292/jvms.09-0473.
22. Sidoti F., Rizzo F., Costa C., Astegiano S., Curtioni A., Mandola M. L., Cavallo R., Bergallo M. Development of real time RT-PCR assays for detection of type A influenza virus and for subtyping of avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Molecular Biotechnology*, 2010, vol. 44, issue 1, pp. 41–50. DOI: 10.1007/s12033-009-9211-7.
23. Simonenko S. I., Stegnyy B. T., Gerilovich A. P. Development of a method for detecting RNA of highly pathogenic avian influenza subtype N7 of the American genotype using polymerase chain reaction and study of intraspecific features. Scientific principles of the production of veterinary biological preparations: materials of a scientific-practical conference, Shhelkovo, 2009, pp. 319–323. (in Russian)
24. Timin A. S. Comparison of influenza A virus inhibition *in vitro*. Available at: https://www.researchgate.net/publication/321431202_Comparison_of_influenza_A_virus_inhibition_in_vitro.