



<https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-1-40-46>  
УДК 619:578.832.1:598.2:616-076:577.2



# Разработка тест-системы для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипов H5 и H7 методом мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием внутреннего контрольного образца

А. Д. Грехнева, Н. Г. Зиняков, А. В. Андриясов, А. А. Козлов, Е. В. Овчинникова, Д. Б. Андрейчук, П. Д. Жестков, И. А. Чвала  
ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ»), мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** Высокопатогенный грипп птиц является особо опасной высококонтагиозной вирусной инфекцией домашних и диких птиц, в последние годы получившей широкое распространение на территории стран Европы, Азии, Африки и Америки. Возбудитель заболевания – вирус гриппа типа А подтипов H5 и H7. Одним из наиболее быстрых и эффективных способов идентификации и типирования вируса гриппа птиц является ОТ-ПЦР в режиме реального времени, в связи с чем представляется актуальной разработка тест-системы на основе данного метода с использованием внутреннего контрольного образца для возможности контроля основных этапов проведения реакции. При этом постановка реакции в мультиплексном формате позволяет одновременно идентифицировать несколько целевых мишеней, что уменьшает расход реагентов и время постановки реакции.

**Цель исследования.** Разработка тест-системы для выявления в пробах биологического материала РНК вируса гриппа птиц подтипов H5 и H7 методом мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени и определение ее основных характеристик.

**Материалы и методы.** Использовали изоляты вируса гриппа птиц подтипов H5, H7, H3, H4, H10, H16, вирусы ньюкаслской болезни, инфекционной бурсальной болезни, инфекционного бронхита кур, болезни Марека и аденовирус птиц. В качестве внутреннего контрольного образца служил бактериофаг MS2.

**Результаты.** Подобраны оптимальные сочетания систем праймеров и зондов, определены характеристики тест-системы: специфичность в отношении гомологичных и гетерологичных вирусов болезней птиц, аналитическая чувствительность, эффективность реакции амплификации, повторяемость и воспроизводимость.

**Заключение.** При определении валидационных характеристик разработанной тест-системы установлена ее специфичность в отношении только вируса гриппа птиц подтипов H5 и H7, аналитическая чувствительность для каждого подтипа составила  $1,5 \text{ Ig ЭИД}_{50}/\text{см}^3$ , эффективность амплификации – 92 и 97% соответственно. Проведена апробация тест-системы при исследовании поступающих в лабораторию проб биологического материала, результаты соответствовали таковым для стандартных диагностических методов, используемых в референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ».

**Ключевые слова:** высокопатогенный грипп птиц, вирус гриппа птиц подтипа H5, вирус гриппа птиц подтипа H7, ОТ-ПЦР-РВ, тест-система

**Благодарности:** Работа выполнена за счет средств ФГБУ «ВНИИЗЖ» в рамках тематики научно-исследовательских работ «Ветеринарное благополучие».

**Для цитирования:** Грехнева А. Д., Зиняков Н. Г., Андриясов А. В., Козлов А. А., Овчинникова Е. В., Андрейчук Д. Б., Жестков П. Д., Чвала И. А. Разработка тест-системы для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипов H5 и H7 методом мультиплексной ОТ-ПЦР в режиме реального времени с использованием внутреннего контрольного образца. *Ветеринария сегодня*. 2025; 14 (1): 40–46. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-1-40-46>

**Конфликт интересов:** Чвала И. А. является членом редколлегии журнала «Ветеринария сегодня», но не имеет никакого отношения к решению опубликовать эту статью. Рукопись прошла принятую в журнале процедуру рецензирования. Об иных конфликтах интересов авторы не заявляли.

**Для корреспонденции:** Грехнева Алена Дмитриевна, аспирант, ведущий специалист референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», мкр. Юрьевец, г. Владимир, 600901, Россия, [grehneva@arriah.ru](mailto:grehneva@arriah.ru)

## Development of test-system for detection of H5 and H7 avian influenza virus RNA by multiplex real-time RT-PCR assay using internal control

Alena D. Grekhneva, Nikolay G. Zinyakov, Artem V. Andriyasov, Anton A. Kozlov, Evgenia V. Ovchinnikova,  
Dmitry B. Andreychuk, Pavel D. Zhestkov, Ilya A. Chvala  
Federal Centre for Animal Health, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia

## ABSTRACT

**Introduction.** High pathogenicity avian influenza is a dangerous highly contagious viral infection of domestic and wild birds that recently has become widespread in Europe, Asia, Africa and Americas. The causative agent of the disease is type A influenza virus of subtypes H5 and H7. Real-time RT-PCR is one of the most rapid and effective techniques for avian influenza virus identification and typing, so development of the test system based on this technique with internal control to be

used for control of the reaction main stages is of current importance. At the same time, the multiplex format of RT-PCR allows for simultaneous identification of several targets that reduces the consumption of reagents and the reaction time.

**Objective.** Development of test-system for detection of H5 and H7 avian influenza virus RNA with multiplex real-time RT-PCR in biological samples and its characterization.

**Materials and methods.** H5, H7, H3, H4, H10, H16 avian influenza virus, Newcastle disease virus, infectious bursal disease virus, infectious bronchitis virus, Marek's disease virus, avian adenovirus isolates were used. MS2 bacteriophage was used as internal control.

**Results.** Optimal primer-probe combinations were selected, test-system characteristics were determined: specificity for homologous and heterologous avian disease viruses, analytical sensitivity, reaction amplification efficiency, repeatability and reproducibility.

**Conclusion.** Determination of the developed test system validation parameters has shown that it is specific only for H5 and H7 avian influenza virus, its analytical sensitivity for each subtype was 1.5 lg EID<sub>50</sub>/cm<sup>3</sup>, and the amplification efficiency was 92 and 97%, respectively. The test system was validated through its use for testing biological samples submitted to the laboratory, the test results were consistent with the results of tests with standard diagnostic methods used in the Reference Laboratory for Avian Viral Diseases of the Federal Centre for Animal Health.

**Keywords:** high pathogenicity avian influenza, H5 avian influenza virus, H7 avian influenza virus, real-time RT-PCR, test-system

**Acknowledgements:** The study was funded by the Federal Centre for Animal Health within the research topic "Veterinary Welfare".

**For citation:** Grekhneva A. D., Zinyakov N. G., Andriyasov A. V., Kozlov A. A., Ovchinnikova E. V., Andreychuk D. B., Zhestkov P. D., Chvala I. A. Development of test-system for detection of H5 and H7 avian influenza virus RNA by multiplex real-time RT-PCR assay using internal control. *Veterinary Science Today*. 2025; 14 (1): 40–46. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2025-14-1-40-46>

**Conflict of interests:** Chvala I. A. is a member of the editorial board of the "Veterinary Science Today" journal, but was not involved into the decision making process related to this article publication. The manuscript has passed the review procedure accepted in the journal. The authors did not declare any other conflicts of interests.

**For correspondence:** Alena D. Grekhneva, Postgraduate Student, Leading Specialist, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, Federal Centre for Animal Health, Yur'evets, Vladimir 600901, Russia, [grekhneva@arriah.ru](mailto:grekhneva@arriah.ru)

## ВВЕДЕНИЕ

Грипп птиц – одно из наиболее опасных вирусных заболеваний домашних и диких птиц, характеризующееся в первую очередь поражением органов дыхательной и пищеварительной систем. Возбудителем заболевания является вирус из рода *Alphainfluenzavirus* семейства *Orthomyxoviridae*. Геном вируса представляет собой линейную одноцепочечную (–)РНК и содержит 8 сегментов, что обуславливает высокую скорость эволюции вируса за счет реассортации [1]. На основании антигенных различий поверхностных белков вирус гриппа птиц (ВГП) подразделяется на 16 подтипов по гемагглютинуину (НА) и на 9 подтипов по нейраминидазе (НА) [2].

Естественный резервуар вируса гриппа птиц – дикие водоплавающие птицы, инфекция у которых протекает бессимптомно или в легкой форме. Распространение возбудителя в природе происходит по путям миграции диких перелетных птиц, при этом вирус передается и домашней птице [3, 4]. Наиболее опасным для птицеводства является вирус высокопатогенного гриппа птиц, способный вызывать тяжелое быстроразвивающееся заболевание с летальностью до 100%. Считается, что высокопатогенные ВГП возникают из низкопатогенных вирусов подтипов H5 и H7 в естественных условиях за счет точечных мутаций в гене НА, вызывающих накопление нескольких основных аминокислот в сайте расщепления гемагглютинаина [4, 5, 6, 7, 8]. Высокопатогенный грипп птиц относится к заболеваниям, подлежащим обязательному уведомлению Всемирной организации здравоохранения животных независимо от подтипа вируса-возбудителя.

На территории Российской Федерации с 2021 до начала 2024 г. регулярно регистрировали вспышки заболевания среди домашних и диких птиц, вы-

званные вирусами высокопатогенного гриппа птиц подтипа H5 (выделяли изоляты подтипов H5N1, H5N5 и H5N8) [9]. В 2024 г. вспышка высокопатогенного гриппа птиц, вызванная ВГП подтипа H7N3, была зафиксирована в Австралии у птиц на птицефабрике [10]. До этого года регистрировались случаи заболевания, в том числе у людей, вызванные ВГП подтипа H7 в странах Северной и Южной Америки, Европы, Африки и Азии [11, 12].

Текущая эпизоотическая ситуация по высокопатогенному гриппу птиц в Российской Федерации требует постоянного мониторинга. Наиболее быстрым и точным методом выявления РНК возбудителя гриппа птиц в биологическом материале от различных видов домашних и диких птиц с возможностью одновременного типирования вируса является полимеразная цепная реакция с обратной транскрипцией в режиме реального времени (ОТ-ПЦР-РВ). Данный метод характеризуется высокой чувствительностью, специфичностью, относительной быстротой постановки реакции и получения результата.

В этой статье предложена высокоэффективная тест-система для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипов H5 и H7 методом ОТ-ПЦР-РВ. В разработанной тест-системе используется внутренний контрольный образец (ВКО) экзогенного типа, что позволяет контролировать основные этапы проведения исследования (выделение нуклеиновых кислот, обратную транскрипцию и ПЦР) и исключить ложноотрицательные результаты.

Целью исследования являлась разработка тест-системы на основе ОТ-ПЦР-РВ, способной одновременно выявлять РНК ВГП подтипов H5 и H7 в биологическом материале и контролировать проведение исследования на всех этапах, начиная с выделения нуклеиновых кислот.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Вирусы.** В исследовании использовали изоляты вирусов гриппа птиц различных подтипов, ньюкаслской болезни, инфекционной бурсальной болезни, инфекционного бронхита кур, болезни Марека и аденовирус птиц, полученные из рабочей коллекции референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») (табл. 1). В качестве ВКО служил бактериофаг MS2 с титром инфекционной активности  $10^6$  БОЕ/см<sup>3</sup> [13].

**Выделение РНК** проводили с помощью комплекта реагентов для выделения РНК/ДНК из клинического материала «РИБО-преп» (ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора) согласно инструкции производителя. На этапе выделения в каждую пробу (включая отрицательный контроль выделения) добавляли 0,01 мл ВКО.

**Праймеры и зонды.** В результате анализа публикаций по разработке тест-систем и методов обнаружения возбудителя гриппа птиц подтипов H5/H7 в пробах биологического материала методом ОТ-ПЦР-РВ [14, 15, 16, 17] были выбраны и протестированы несколько систем праймеров и зондов для амплификации фрагментов гена HA вируса гриппа птиц подтипов H5 и H7.

Поскольку реакция ОТ-ПЦР-РВ в данном случае проходит в мультиплексном формате, красители, входящие в состав TaqMan-зондов, подбирались таким образом, чтобы давать стабильный флуоресцентный сигнал и не искажать сигналы по другим каналам детекции (каналы Green/H5, Orange/H7, Crimson/ВКО). Выбранные праймеры и зонды синтезированы НПК «Синтол» (Россия), специфичные праймеры и зонд для ВКО [13] – компанией «Алкор Био» (Россия).

**ОТ-ПЦР-РВ** проводили в один этап с помощью реагентов для амплификации производства НПК «Синтол» (Россия) в программируемом амплификаторе Rotor-Gene 6000 (Corbett Research Pty Ltd, Австралия). Реакционная смесь (20 мкл на одну пробу) включала: воду деионизированную (бидистиллированную) – 5,35 мкл; 10× ПЦР-буфер – 2,5 мкл; раствор MgCl<sub>2</sub> 25 мМ – 4 мкл; раствор дезоксирибонуклеозидтрифосфата (дНТФ) 25 мМ – 0,4 мкл; растворы прямого и обратного праймеров для ВГП/H5 10 пмоль/мкл – по 1 мкл каждый; флуоресцентный зонд для ВГП/H5 10 пмоль/мкл – 0,75 мкл; растворы прямого и обратного праймеров для ВГП/H7 10 пмоль/мкл – по 1 мкл каждый; флуоресцентный зонд для ВГП/H7 10 пмоль/мкл – 0,75 мкл; растворы прямого и обратного праймеров, раствор флуоресцентного зонда для MS2 10 пмоль/мкл – по 0,5 мкл каждый; SypTaq ДНК-полимеразу – 0,25 мкл; MMLV-ревертазу – 0,5 мкл. Реакция проводилась согласно протоколу: обратная транскрипция – 20 мин при 40 °С; активация полимеразы – 8 мин при 95 °С; 40 циклов ПЦР – 10 с при 95 °С; 35 с при 55 °С; 15 с при 72 °С. Сигнал флуоресценции детектировался на этапе отжига праймеров по каналам Green/H5, Orange/H7 и Crimson/ВКО.

Оценку *специфичности* тест-системы проводили при постановке ОТ-ПЦР-РВ с выделенной РНК гомологичных и гетерологичных вирусов (табл. 1).

**Аналитическую чувствительность** тест-системы определяли при постановке ОТ-ПЦР-РВ с выделенной РНК серии последовательных десятикратных разведений ( $10^{-8}$ – $10^{-3}$ ) вирусосодержащей суспензии (штаммы ВГП A/duck/KChR/1590-20/2020 H5N8 и A/turkey/Italy/9289/02 H7N3, исходный титр инфекционной активности – 8,5 Ig ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>) с ВКО в трех повторностях для каждого разведения. Чувствительность реакции для каждого образца оценивали как количество вируса (в единицах измерения Ig ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup>), соответствующее последнему разведению, при котором получали не менее 95% положительных результатов (в 20-кратной повторности) [18].

Для оценки *повторяемости* положительные образцы тестировали 3 раза в 5-кратной повторности на протяжении трех дней. Определяли среднее значение порогового цикла (Ct), значение стандартного отклонения и коэффициент вариации для полученных результатов в пределах одной постановки ОТ-ПЦР-РВ и между постановками.

Для определения *эффективности реакции (E)* использовали результаты, полученные при постановке реакций для определения аналитической чувствительности. Расчет значения эффективности реакции производился после построения графика линейной регрессии (в координатах «разведение вируса» / «пороговый цикл амплификации Ct») по формуле:

$$E = (10^{(-1/m)} - 1) \times 100\%,$$

где *m* – коэффициент наклона прямой [19, 20, 21].

**Таблица 1**  
Изоляты вирусов болезней птиц, использованные в исследовании

**Table 1**  
Avian virus isolates used for the study

Вирус	Штамм/изолят
Вирус гриппа птиц подтипа H5N2	A/duck/Italy/5952/2015
Вирус гриппа птиц подтипа H5N2	A/avian/Italy/6558/2015
Вирус гриппа птиц подтипа H5N2	A/duck/Italy/6926/2017
Вирус гриппа птиц подтипа H5N1	A/duck/Altai/469/2014
Вирус гриппа птиц подтипа H5N1	A/dalmatian pelican/Astrakhan/485-1/2022
Вирус гриппа птиц подтипа H5N5	A/shelduck/Kalmykia/1814-1/2021
Вирус гриппа птиц подтипа H5N8	A/duck/KChR/1590-20/2020
Вирус гриппа птиц подтипа H7N2	A/chicken/Italy/1670/2015
Вирус гриппа птиц подтипа H7N3	A/turkey/Italy/9289/02
Вирус гриппа птиц подтипа H7N7	A/duck/Italy/4932/2018
Вирус гриппа птиц подтипа H3N8	A/wild duck/Primorsky/1872-13/21
Вирус гриппа птиц подтипа H4N6	A/wild duck/Primorsky/1872-11/21
Вирус гриппа птиц подтипа H9N2	A/chicken/Udmurtya/2008-1/21
Вирус гриппа птиц подтипа H9N2	A/gull/Tyva/767-113/21
Вирус гриппа птиц подтипа H10N7	A/wild duck/Primorsky/1872-13/21
Вирус гриппа птиц подтипа H16N3	A/mallard/Khabarovsk/12/14
Вирус инфекционного бронхита кур	H-120
Вирус инфекционной бурсальной болезни	Винтерфилд 2512
Вирус ньюкаслской болезни	LaSota (генотип II)
Аденовирус птиц	KR95 (вид С)
Вирус болезни Марека	3004

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

По результатам тестирования комбинаций систем праймеров и зондов для амплификации фрагментов гена HA вируса гриппа птиц подтипов H5 и H7 были определены оптимальные сочетания праймеров и зондов, нуклеотидные последовательности представлены в таблице 2.

Выбранные системы тестировали в ОТ-ПЦР-РВ со штаммами вируса гриппа птиц подтипов H5N2, H5N1, H5N5, H5N8, H7N2, H7N3 и H7N7 с ВКО в формате моно- и мультиплексной реакции. Значение порогового цикла, выше которого результаты реакции следует считать отрицательными, установили на уровне 36,00 для каналов Green/H5 и Orange/H7. Во всех случаях наличие РНК вируса гриппа птиц подтипов H5 или H7 подтверждалось только в пробах, содержащих соответствующий подтип вируса.

**Таблица 2**  
Праймеры и зонды для амплификации фрагментов гена HA вируса гриппа птиц подтипов H5 и H7

**Table 2**  
Primers and probes used for amplification of H5 and H7 avian influenza virus HA gene fragments

Название	Структура олигонуклеотида
H5LH1	ACATATGACTACCCACARTATTTCAG
H5RH1	AGACCAGCTAYCATGATTGC
H5Zond	(FAM)TCWACAGTGGCGAGTTCCTAGCA(RTQ1)
LH6H7	GGCCAGTATTAGAAACAACACCTATGA
RH4H7	GCCCCGAAGCTAAACCAAAGTAT
H7Zond	(ROX)CCGCTGCTAGTTTGACTGGGTCAATCT(BHQ2)

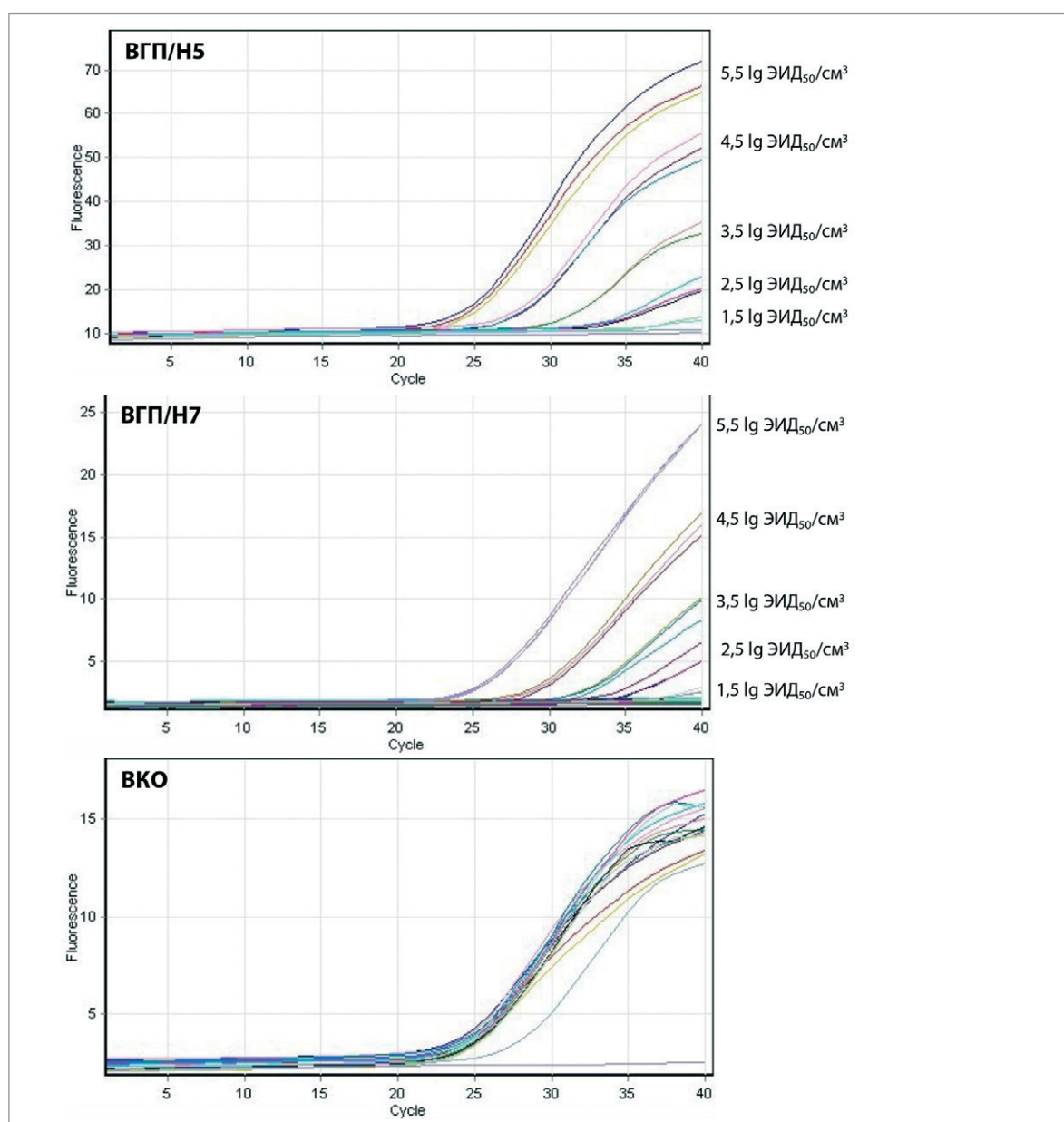


Рис. 1. Графики нарастания флуоресцентного сигнала в ОТ-ПЦР-РВ по каналам Green (10-кратные разведения ВГП H5), Orange (10-кратные разведения ВГП H7) и Crimson (ВКО)

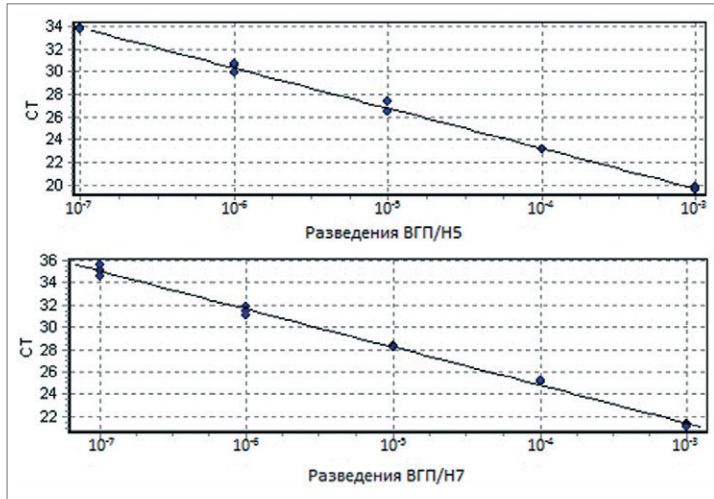
Fig. 1. Graphs of fluorescence intensity increase during real-time RT-PCR on Green (10-fold H5 avian influenza virus dilutions), Orange (10-fold H7 avian influenza virus dilutions) and Crimson (internal control) channels

**Таблица 3**  
Значения порогового цикла для 10-кратных разведений ВГП/Н5 и ВГП/Н7 в ОТ-ПЦР-РВ

**Table 3**  
Real-time RT-PCR Ct values for 10-fold avian influenza virus H5 and avian influenza virus H7 dilutions

Канал детекции / подтип ВГП (титр вируса в исходной суспензии 8,5 lg ЭИД <sub>50</sub> /см <sup>3</sup> )	Среднее значение Ct для разведения, n = 3					
	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-8</sup>
Green/H5	19,74 ± 0,13	23,13 ± 0,02	26,76 ± 0,53	30,37 ± 0,44	33,80 ± 0,07	–
Orange/H7	21,20 ± 0,11	25,17 ± 0,08	28,23 ± 0,03	31,39 ± 0,39	35,08 ± 0,52	–

«–» – отрицательный результат (negative result).



**Рис. 2.** Графики стандартных прямых по результатам ОТ-ПЦР-РВ с 10-кратными разведениями ВГП подтипов Н5 и Н7

**Fig. 2.** Graphs of standard straight lines based on real-time RT-PCR results when 10-fold H5 and H7 avian influenza virus dilutions were used

**Таблица 4**  
Значения параметров эффективности реакции для ВГП/Н5 и ВГП/Н7

**Table 4**  
Reaction efficiency parameters for avian influenza virus H5 and avian influenza virus H7

Канал детекции / подтип ВГП	Коэффициент корреляции (R <sup>2</sup> )	Наклон прямой (m)	Эффективность реакции (E), %
Green/H5	0,997	–3,537	91,74
Orange/H7	0,996	–3,398	96,92

Оптимальную концентрацию ВКО определяли при постановке ОТ-ПЦР-РВ с несколькими 10-кратными разведениями вирусосодержащей суспензии MS2 (10<sup>5</sup>–10<sup>7</sup> БОЕ/см<sup>3</sup>) и одновременной идентификации одной или двух целевых мишеней тест-системы (ВГП/Н5 и ВГП/Н7). По результатам проверки была выбрана концентрация 10<sup>6</sup> БОЕ/см<sup>3</sup>, обеспечивающая стабильное возрастание флуоресцентного сигнала по каналу детекции для ВКО без ингибирования сигнала по другим каналам для ВГП/Н5 и ВГП/Н7 (рис. 1) и не выходящая за пределы чувствительности системы праймеров и зонда для ВКО при одновременной идентификации ВГП/Н5 и ВГП/Н7 в высоких концентрациях. При значении Ct > 35 по каналу детекции Crimson/ВКО результаты всего исследования признаются недостоверными, то есть на этапе выделения нуклеиновых кислот, постановки обратной транскрипции или ПЦР

допущены ошибки либо в исследуемом образце содержится примеси, способные ингибировать реакцию.

Проверка специфичности тест-системы при постановке ОТ-ПЦР-РВ с выделенной РНК вируса гриппа птиц подтипов Н3, Н4, Н9, Н10, Н16 и других РНК- и ДНК-содержащих вирусов (возбудители ньюкаслской болезни, инфекционной бурсальной болезни, инфекционного бронхита кур, болезни Марека, аденовирус) показала отсутствие перекрестных реакций с перечисленными патогенами.

Аналитическая чувствительность реакции при титровании 10-кратных разведений вируса с инфекционным титром 8,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> (рис. 1, табл. 3) для ВГП/Н5 соответствовала разведению вируса 10<sup>-7</sup> (при 20-кратной повторности положительный результат получен в 95% случаев) со средним значением Ct = 34,16 ± 0,54 и коэффициентом вариации 1,59%; для ВГП/Н7 предел чувствительности соответствовал разведению вируса 10<sup>-7</sup> (при 20-кратной повторности положительный результат получен в 100% случаев) со средним значением Ct = 35,17 ± 0,65 и коэффициентом вариации 1,84%.

Соответственно, минимальное количество вируса, которое способна обнаружить разработанная тест-система, составляет 1,5 lg ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> для ВГП/Н5 и ВГП/Н7.

Для определения параметров эффективности построили графики линейной регрессии для реакций с ВГП/Н5 и ВГП/Н7 (рис. 2). При оценке эффективности реакции необходимо учитывать такие параметры, как коэффициент наклона прямой (m) и коэффициент корреляции (R<sup>2</sup>). В идеальном случае (при эффективности 100%) значение m равняется –3,32, но оптимальными считаются значения в пределах от –3,2 до –3,5. Оптимальными для R<sup>2</sup> являются значения более 0,98 [20, 22]. Результаты определения параметров эффективности реакции для разработанной тест-системы представлены в таблице 4.

Эффективность реакции для ВГП/Н5 (канал Green) составила 91,74%, для ВГП/Н7 (канал Orange) – 96,92%. Такие параметры, как коэффициент наклона прямой и коэффициент детерминации, для обоих подтипов ВГП соотносятся с оптимальными значениями [20, 22].

Воспроизводимость тест-системы оценивали по величине стандартного отклонения (SD) для каждой серии 10-кратных разведений (10<sup>-7</sup>–10<sup>-3</sup>, n = 3). Для ВГП/Н5 значения SD варьировали от 0,02 до 0,53; для ВГП/Н7 – от 0,03 до 0,52.

Для оценки повторяемости использовали те же вирусы в разведении 10<sup>-4</sup>, каждую пробу тестировали в 5 повторностях. Среднее значение Ct внутри постановок для ВГП/Н5 варьировало от 22,89 до 23,36;

значение SD составляло 0,22–0,33; коэффициент вариации – от 0,92 до 1,17%. Для ВГП/Н7 среднее значение Ct находилось в пределах от 24,53 до 25,06; значение SD – в диапазоне 0,18–0,23, коэффициент вариации был от 0,71 до 0,94%. Значения повторяемости между постановками для ВГП/Н5: среднее Ct – 23,09 ± 0,32, коэффициент вариации – 1,41%; для ВГП/Н7: среднее Ct – 24,53 ± 0,31, коэффициент вариации – 1,25%.

С помощью разработанной тест-системы были исследованы 434 пробы биологического материала на наличие РНК ВГП подтипов Н5 и Н7, из них РНК ВГП/Н5 выявили в 268 случаях. РНК ВГП/Н7 не была обнаружена в исследуемых пробах. Результаты, полученные с помощью данной тест-системы, соответствуют таковым, полученным при исследовании этих же проб стандартными методами молекулярной диагностики, используемыми в референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ» [23].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы была разработана тест-система для выявления РНК вируса гриппа птиц подтипов Н5 и Н7 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени. Определены параметры предложенной тест-системы: специфичность составила 100% (ВГП/Н5 и ВГП/Н7), предел аналитической чувствительности – 1,5 Ig ЭИД<sub>50</sub>/см<sup>3</sup> (ВГП/Н5 и ВГП/Н7), эффективность реакции – 92% (ВГП/Н5) и 97% (ВГП/Н7). Данная тест-система может быть использована для качественного анализа наличия РНК вируса гриппа птиц подтипов Н5 и Н7 в пробах биологического материала от птиц и других животных.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lycett S. J., Duchatel F., Digard P. A brief history of bird flu. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2019; 374 (1775):20180257. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0257>
- Alexander D. J. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*. 2000; 74 (1–2): 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00160-7)
- Olsen B., Munster V. J., Wallensten A., Waldenström J., Osterhaus A. D. M. E., Fouchier R. A. M. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*. 2006; 312 (5772): 384–388. <https://doi.org/10.1126/science.1122438>
- Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*. 1992; 56 (1): 152–179. <https://doi.org/10.1128/mr.56.1.152-179.1992>
- Kida Y., Okuya K., Saito T., Yamagishi J., Ohnuma A., Hattori T., et al. Structural requirements in the hemagglutinin cleavage site-coding RNA region for the generation of highly pathogenic avian influenza virus. *Pathogens*. 2021; 10 (12):1597. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121597>
- Spackman E. A brief introduction to avian influenza virus. *Methods in Molecular Biology*. 2020; 2123: 83–92. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8_7)
- Pasick J., Handel K., Robinson J., Copps J., Ridd D., Hills K., et al. Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *Journal of General Virology*. 2005; 86 (3): 727–731. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80478-0>
- Suarez D. L., Senne D. A., Banks J., Brown I. H., Essen S. C., Lee C., et al. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emerging Infectious Diseases*. 2004; 10 (4): 693–699. <https://doi.org/10.3201/eid1004.030396>
- Ирза В. Н., Волков М. С., Варкентин А. В. О текущей панзоотии высокопатогенного гриппа птиц. *Эффективное животноводство*. 2022; (5): 85–86. <https://elibrary.ru/rcsilt>
- Liu W. J., Xiao H., Dai L., Liu D., Chen J., Qi X., et al. Avian influenza A (H7N9) virus: from low pathogenic to highly pathogenic. *Frontiers of Medicine*. 2021; 15 (4): 507–527. <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0814-5>
- World Organisation for Animal Health. WAHIS. Disease situation. <https://wahis.woah.org/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>
- Sutton T. C. The pandemic threat of emerging H5 and H7 avian influenza viruses. *Viruses*. 2018; 10 (9):461. <https://doi.org/10.3390/v10090461>

- O'Connell K. P., Bucher J. R., Anderson P. E., Cao C. J., Khan A. S., Gostomski M. V., Valdes J. J. Real-time fluorogenic reverse transcription-PCR assays for detection of bacteriophage MS2. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72 (1): 478–483. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.478-483.2006>
- Kalthoff D., Bogs J., Harder T., Grund C., Pohlmann A., Beer M., Hoffmann B. Nucleic acid-based detection of influenza A virus subtypes H7 and N9 with a special emphasis on the avian H7N9 virus. *Eurosurveillance*. 2014; 19 (10):20731. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.10.20731>
- Liu J., Yao L., Zhai F., Chen Y., Lei J., Bi Z., et al. Development and application of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of avian influenza virus subtype H5, H7 and H9. *Journal of Virological Methods*. 2018; 252: 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.11.005>
- Liu L., Fang B., Yu X., Li X., Lei Y., Chen D. Strengthened monitoring of H5 avian influenza viruses in external environment in Hubei, 2018. *Current Medical Science*. 2020; 40 (1): 63–68. <https://doi.org/10.1007/s11596-020-2147-7>
- Spackman E., Senne D. A., Myer T. J., Bulaga L. L., Garber L. P., Perdue M. L., et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40 (9): 3256–3260. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3256-3260.2002>
- Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 2009; 55 (4): 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
- Ребриков Д. В., Саматов Г. А., Трофимов Д. Ю., Семенов П. А. ПЦР в реальном времени: учебное пособие. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний; 2011. 225 с. <https://elibrary.ru/raympl>
- Green M. R., Sambrook J. Constructing a standard curve for real-time polymerase chain reaction (PCR) experiments. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018; 2018 (10). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095026>
- Доронин М. И., Михалишин Д. В., Спрыгин А. В., Мазлум А., Жбанова Т. В., Груздев К. Н., Чернышова Е. В. Современные подходы к разработке тест-систем на основе количественной ПЦР в режиме реального времени. *Ветеринария сегодня*. 2023; 12 (3): 197–207. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2023-12-3-197-207>
- Green M. R., Sambrook J. Analysis and normalization of real-time polymerase chain reaction (PCR) experimental data. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018; 2018 (10). <https://doi.org/10.1101/pdb.top095000>
- Андрейчук Д. Б., Андриясов А. В., Чвала И. А. Методические рекомендации по выявлению РНК вируса гриппа птиц подтипов Н5 и Н7 методом ОТ-ПЦР в режиме реального времени: № 46-16. Владимир: ФГБУ «ВНИИЗЖ»; 2016. 12 с.

## REFERENCES

- Lycett S. J., Duchatel F., Digard P. A brief history of bird flu. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2019; 374 (1775):20180257. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0257>
- Alexander D. J. A review of avian influenza in different bird species. *Veterinary Microbiology*. 2000; 74 (1–2): 3–13. [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(00\)00160-7](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(00)00160-7)
- Olsen B., Munster V. J., Wallensten A., Waldenström J., Osterhaus A. D. M. E., Fouchier R. A. M. Global patterns of influenza A virus in wild birds. *Science*. 2006; 312 (5772): 384–388. <https://doi.org/10.1126/science.1122438>
- Webster R. G., Bean W. J., Gorman O. T., Chambers T. M., Kawaoka Y. Evolution and ecology of influenza A viruses. *Microbiological Reviews*. 1992; 56 (1): 152–179. <https://doi.org/10.1128/mr.56.1.152-179.1992>
- Kida Y., Okuya K., Saito T., Yamagishi J., Ohnuma A., Hattori T., et al. Structural requirements in the hemagglutinin cleavage site-coding RNA region for the generation of highly pathogenic avian influenza virus. *Pathogens*. 2021; 10 (12):1597. <https://doi.org/10.3390/pathogens10121597>
- Spackman E. A Brief introduction to avian influenza virus. *Methods in Molecular Biology*. 2020; 2123: 83–92. [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0346-8_7)
- Pasick J., Handel K., Robinson J., Copps J., Ridd D., Hills K., et al. Intersegmental recombination between the haemagglutinin and matrix genes was responsible for the emergence of a highly pathogenic H7N3 avian influenza virus in British Columbia. *Journal of General Virology*. 2005; 86 (3): 727–731. <https://doi.org/10.1099/vir.0.80478-0>
- Suarez D. L., Senne D. A., Banks J., Brown I. H., Essen S. C., Lee C., et al. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. *Emerging Infectious Diseases*. 2004; 10 (4): 693–699. <https://doi.org/10.3201/eid1004.030396>
- Ирза В. Н., Волков М. С., Варкентин А. В. О текучей панзоотии высокопатогенного гриппа птиц = About ongoing high pathogenicity avian influenza panzootic. *Effectivnoe zhivotnovodstvo*. 2022; (5): 85–86. <https://elibrary.ru/rcsilt> (in Russ.)
- Liu W. J., Xiao H., Dai L., Liu D., Chen J., Qi X., et al. Avian influenza A (H7N9) virus: from low pathogenic to highly pathogenic. *Frontiers of Medicine*. 2021; 15 (4): 507–527. <https://doi.org/10.1007/s11684-020-0814-5>

11. World Organisation for Animal Health. WAHIS. Disease situation. <https://wahis.waoh.org/#/dashboards/country-or-disease-dashboard>
12. Sutton T. C. The pandemic threat of emerging H5 and H7 avian influenza viruses. *Viruses*. 2018; 10 (9):461. <https://doi.org/10.3390/v10090461>
13. O'Connell K. P., Bucher J. R., Anderson P. E., Cao C. J., Khan A. S., Gostomski M. V., Valdes J. J. Real-time fluorogenic reverse transcription-PCR assays for detection of bacteriophage MS2. *Applied and Environmental Microbiology*. 2006; 72 (1): 478–483. <https://doi.org/10.1128/AEM.72.1.478-483.2006>
14. Kalthoff D., Bogs J., Harder T., Grund C., Pohlmann A., Beer M., Hoffmann B. Nucleic acid-based detection of influenza A virus subtypes H7 and N9 with a special emphasis on the avian H7N9 virus. *Eurosurveillance*. 2014; 19 (10):20731. <https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.10.20731>
15. Liu J., Yao L., Zhai F., Chen Y., Lei J., Bi Z., et al. Development and application of a triplex real-time PCR assay for the simultaneous detection of avian influenza virus subtype H5, H7 and H9. *Journal of Virological Methods*. 2018; 252: 49–56. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2017.11.005>
16. Liu L., Fang B., Yu X., Li X., Lei Y. K., Chen D. Strengthened monitoring of H5 avian influenza viruses in external environment in Hubei, 2018. *Current Medical Science*. 2020; 40 (1): 63–68. <https://doi.org/10.1007/s11596-020-2147-7>
17. Spackman E., Senne D. A., Myer T. J., Bulaga L. L., Garber L. P., Perdue M. L., et al. Development of a real-time reverse transcriptase PCR assay for type A influenza virus and the avian H5 and H7 hemagglutinin subtypes. *Journal of Clinical Microbiology*. 2002; 40 (9): 3256–3260. <https://doi.org/10.1128/jcm.40.9.3256-3260.2002>
18. Bustin S. A., Benes V., Garson J. A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*. 2009; 55 (4): 611–622. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>
19. Rebrikov D. V., Samatov G. A., Trofimov D. Yu., Semenov P. A. Real-time PCR: study guide. Moscow: BINOM. Laboratoriya znaniy; 2011. 225 p. <https://elibrary.ru/raympl> (in Russ.)
20. Green M. R., Sambrook J. Constructing a standard curve for real-time polymerase chain reaction (PCR) experiments. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018; 2018 (10). <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095026>
21. Doronin M. I., Mikhailishin D. V., Sprygin A. V., Mazloum A., Zhibanova T. V., Gruzdev K. N., Chernyshova E. V. Current approaches to development of real-time qPCR test-kits. *Veterinary Science Today*. 2023; 12 (3): 197–207. <https://doi.org/10.29326/2304-196X-2023-12-3-197-207>
22. Green M. R., Sambrook J. Analysis and normalization of real-time polymerase chain reaction (PCR) experimental data. *Cold Spring Harbor Protocols*. 2018; 2018(10). <https://doi.org/10.1101/pdb.top095000>
23. Andreychuk D. B., Andriyasov A. V., Chvala I. A. Methodical guidelines for detection of H5 and H7 avian influenza virus RNA with real-time RT-PCR: No. 46-16. Vladimir: Federal Centre for Animal Health; 2016. 12 p. (in Russ.)

Поступила в редакцию / Received 05.11.2024

Поступила после рецензирования / Revised 16.12.2024

Принята к публикации / Accepted 12.02.2025

## ИНФОРМАЦИЯ ОБ АВТОРАХ / INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

**Грехнева Алена Дмитриевна**, аспирант, ведущий специалист референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0009-0001-6119-0202>, [grehneva@arriah.ru](mailto:grehneva@arriah.ru)

**Зиняков Николай Геннадьевич**, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>, [zinyakov@arriah.ru](mailto:zinyakov@arriah.ru)

**Андриясов Артем Валерьевич**, канд. биол. наук, ведущий научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-6314-2119>, [andriyasov\\_av@arriah.ru](mailto:andriyasov_av@arriah.ru)

**Козлов Антон Александрович**, канд. биол. наук, научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1466-7602>, [kozlov\\_aa@arriah.ru](mailto:kozlov_aa@arriah.ru)

**Овчинникова Евгения Валерьевна**, канд. биол. наук, старший научный сотрудник референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-5501-4432>, [ovchinnikova@arriah.ru](mailto:ovchinnikova@arriah.ru)

**Андрейчук Дмитрий Борисович**, канд. биол. наук, заведующий референтной лабораторией вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>, [andreychuk@arriah.ru](mailto:andreychuk@arriah.ru)

**Жестков Павел Дмитриевич**, ведущий специалист референтной лаборатории вирусных болезней птиц ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0001-8204-280X>, [zhestkov@arriah.ru](mailto:zhestkov@arriah.ru)

**Чвала Илья Александрович**, канд. вет. наук, заместитель директора по НИР ФГБУ «ВНИИЗЖ», г. Владимир, Россия; <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, [chvala@arriah.ru](mailto:chvala@arriah.ru)

**Alena D. Grekhneva**, Postgraduate Student, Leading Specialist, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0009-0001-6119-0202> [grehneva@arriah.ru](mailto:grehneva@arriah.ru)

**Nikolay G. Zinyakov**, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-3015-5594>, [zinyakov@arriah.ru](mailto:zinyakov@arriah.ru)

**Artem V. Andriyasov**, Cand. Sci. (Biology), Leading Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-6314-2119>, [andriyasov\\_av@arriah.ru](mailto:andriyasov_av@arriah.ru)

**Anton A. Kozlov**, Cand. Sci. (Biology), Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1466-7602>, [kozlov\\_aa@arriah.ru](mailto:kozlov_aa@arriah.ru)

**Evgenia V. Ovchinnikova**, Cand. Sci. (Biology), Senior Researcher, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-5501-4432>, [ovchinnikova@arriah.ru](mailto:ovchinnikova@arriah.ru)

**Dmitry B. Andreychuk**, Cand. Sci. (Biology), Head of Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1681-5795>, [andreychuk@arriah.ru](mailto:andreychuk@arriah.ru)

**Pavel D. Zhestkov**, Leading Specialist, Reference Laboratory for Avian Viral Diseases, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0001-8204-280X>, [zhestkov@arriah.ru](mailto:zhestkov@arriah.ru)

**Ilya A. Chvala**, Cand. Sci. (Veterinary Medicine), Deputy Director for Research, Federal Centre for Animal Health, Vladimir, Russia; <https://orcid.org/0000-0002-1659-3256>, [chvala@arriah.ru](mailto:chvala@arriah.ru)

**Вклад авторов:** Грехнева А. Д. – разработка тест-системы и определение ее валидационных характеристик, подготовка текста статьи; Зиняков Н. Г. – дизайн исследования, редактирование текста статьи; Андриясов А. В. – научное консультирование, редактирование текста статьи; Козлов А. А. – разработка ВКО, участие в валидации тест-системы; Овчинникова Е. В. – участие в валидации тест-системы; Андрейчук Д. Б. – составление плана исследования, редактирование текста статьи; Жестков П. Д. – наработка вирусного материала для исследования; Чвала И. А. – организация отбора и доставки материала для исследования.

**Contribution of the authors:** Grekhneva A. D. – development of the test-system and determination of its validation parameters, preparation of the paper text; Zinyakov N. G. – study design, paper editing; Andriyasov A. V. – scientific support, paper editing; Kozlov A. A. – development of internal control, participation in the test-system validation; Ovchinnikova E. V. – participation in the test-system validation; Andreychuk D. B. – study concept, paper editing; Zhestkov P. D. – virus-containing material scaling up for the study; Chvala I. A. – organization of the material sampling and transportation for testing.