ОЦІНКА МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ВАРІАНТУ *TaqMan REAL-TIME RT-PCR* АНАЛІЗУ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ПАНДЕМІЧНОГО ВІРУСУ ГРИПУ *A(H1N1)pdm* В КЛІНІЧНИХ ЗРАЗКАХ ХВОРИХ НА ГРИП

С. В. СТЕПАНІЮК, здобувач,

В. О. ШЕВЧУК, кандидат медичних наук

ПрАТ НВК «Діапроф-Мед»

М. Я. СПІВАК, академік НАН України, доктор біологічних наук, професор

Інститут мікробіології і вірусології ім. Д. К. Заболотного НАН України

E-mail: Stepaniuk2008@yandex.ru

Анотація. *Актуальність – сучасна діагностика пандемічних штамів вірусу грипу молекулярними методами. Мета – провести оцінку мультиплексного варіанту методу TaqMan Real-Time RT-PCR аналізу для швидкої та специфічної діагностики пандемічного вірусу грипу A(H1N1)pdm в клінічних зразках хворих на грип. Методи: Полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу (Real-Time RT-PCR). Встановлено, що методика мультиплексного TaqMan Real-Time RT-PCR аналізу та розроблені праймери та TaqMan-зонди, що входять до складу вітчизняної тест-системи «DIA Influenza H1N1» здатні виявляти зі 100 % чутливістю та специфічністю РНК Каліфорнійських штамів пандемічного вірусу грипу A(H1N1)pdm серед клінічних зразків з сезонними штамми вірусу грипу. Аналітична чутливість тесту визначена на рівні 10 копій в реакції. Запропонована методика TaqMan Real-Time RT-PCR є ефективним інструментом швидкого та точного виявлення високопатогенних пандемічних штамів вірусу грипу A(H1N1)pdm 2009 року.*

Ключові слова: *пандемічний вірус грипу A(H1N1)pdm, полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу, діагностична тест-система*

Спалах грипу, що мав місце в 2009 – 2010 рр. та був викликаний вірусом грипу A(H1N1)pdm, спричинив значне занепокоєння наукової та медичної спільноти у зв'язку з можливими наслідками генетичної мінливості вірусного геному та реасортації генів з іншими штамми вірусу грипу A/H5N1 and A/H9N2, які, як правило, викликають масштабні пташині епізоотії, але особливо небезпечні для людини [1].

Пандемічний вірус грипу A(H1N1)pdm 2009 року (саме Каліфорнійські штами – вперше ідентифіковані в Каліфорнії, Мексиці та Канаді) став абсолютно новим варіантом вірусу для імунної системи людини, що спричинило його блискавичне розповсюдження на 5-ти континентах, призводячи до ускладнень хвороби та високої смертності. Генетичний аналіз нового штаму вірусу A(H1N1)pdm показав, що він є чотирикратним реасортантом і вже містить внутрішні сегменти, які належать вірусам грипу людини, птахів та двох окремих ліній грипу свиней: північноамериканської лінії та євразійської лінії [2]. В епідемічний період 2009 – 2010 рр. тільки в Україні 1128 чоловік померло від ускладнень грипу. Згідно з даними ВОЗ впродовж того ж періоду помирає від грипу понад 4879 чоловік в 53 Європейських країнах[3].

Як свідчать дослідження вітчизняних науковців [4], підчас першої хвилі пандемії грипу в Україні популяція українських ізолятів вірусу грипу мала високу генетичну спорідненість (99 %) до пандемічних штамів A(H1N1)pdm, виділених в 2009 – 2010 рр. в інших країнах.

В епідемічному сезоні 2015 – 2016 рр. в Україні пандемічні штами вірусу грипу знову нагадали про себе, спричинивши значну смертність від ускладнень інфекції. Починаючи із 40 тижня 2015 року в Україні зареєстровано 370 вірусологічно підтверджених летальних випадків від грипу, із них у 81,4 % визначено вірус грипу типу A(H1N1)pdm09 [5]. Це свідчить про тривалу і стійку циркуляцію вірусу в людській популяції населення України та на сьогоднішній день він практично витіснив сезонні українські штами вірусу грипу. Тому, точна діагностика Каліфорнійського штаму вірусу залишається актуальною і надалі, оскільки розповсюдження пандемічного штаму вірусу грипу A(H1N1)pdm досягло територій південних та східних областей України, де природно циркулюють пташині віруси грипу, в тому числі декілька років поспіль були зафіксовані спалахи пташиного штаму вірусу грипу A/H5N1 [5, 6].

Досвід боротьби із грипом, накопичений за останні роки, показав, що для розробки і проведення ефективних протиепідемічних заходів необхідне чітке функціонування системи постійного моніторингу за циркуляцією вірусу грипу, що базується на використанні лабораторних методів точної, швидкої ідентифікації та характеристики циркулюючих штамів вірусу грипу А [4, 9]. Серед методів лабораторної діагностики грипу найбільш ефективним на сьогоднішній день визнаний метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР).

Мета дослідження – оцінити можливість використання двостадійного мультиплексного методу TaqMan Real-Time RT-PCR аналізу для виявлення пандемічного вірусу грипу А(Н1N1)pdm у клінічних зразках хворих на грип.

Матеріали і методи досліджень.

Клінічні зразки носоглоткових змивів хворих на ОРВІ людей.

Під час клінічних випробувань були використані 12 клінічних зразків від хворих на сезонний грип, 2 з яких від одного хворого на пандемічний грип А(Н1N1)pdm, а також 8 зразків клінічного матеріалу здорових людей. Зразки були одержані з лабораторії грипу ДУ «Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л. В. Громашевського НАМН України».

Еталонні зразки вірусів грипу людей: В роботі були використані штами – А/FM1/47 (Н1N1) ; А/Panama/2007/99 (Н3N2); А/New Caledonia/20/99 (Н1N1); В/Hong Kong/330/01, люб’язно надані С. Л. Рибалко та WHO Collaborating Center for Influenza (CDC, USA).

Виділення РНК вірусів. Виділення та очищення вірусної РНК проводили з використанням набору реактивів NucleoSpin RNA Virus Kit (Macherey-Nagel GmbH, Germany) відповідно до протоколу виробника. Для моніторингу крос-контамінації під час виділення РНК використовували негативні контролю (проби стерильної води, не контаміновані ДНК / РНК). Для підвищення ефективності етапу виділення РНК в кожен пробу клінічного зразка додавали внутрішній контрольний зразок (IC).

Real-Time RT-PCR аналіз. Двостадійну мультиплексну Real-Time RT-PCR реакцію проводили, використовуючи набір реактивів AgPath-ID One

Step RT-PCR Kit (Ambion, США) і специфічні праймери та TaqMan-зонди для виявлення та ідентифікації генів каліфорнійських штамів вірусу грипу A(H1N1)pdm: М-ген, Н1-ген та N1-ген, що входять до складу тест-системи **«DIA Influenza H1N1»**. Реакцію Real-Time RT-PCR проводили за допомогою приладу ABI PRIZM 7000 (Applied Biosystems, USA).

Визначення параметрів специфічності та чутливості мультиплексного TaqMan Real-Time RT-PCR аналізу. Специфічність мультиплексної реакції Real-Time RT-PCR оцінювали за перехресною реакцією із РНК, виділеною із зразків, що містять інші підтипи вірусу грипу, а також використовували клінічні зразки здорових людей. Чутливість тесту визначали за допомогою позитивних клінічних зразків, підтверджених в лабораторії ВООЗ (Великобританія). Межу чутливості тесту визначали, застосовуючи внутрішньовиробничі панелі ПП-101 ВПП-01, до складу яких входили зразки біологічного матеріалу з різною концентрацією рекомбінантних плазмід, що містили синтетичні вставки генів вірусу грипу (М-ген, Н1 а N1).

Результати дослідження та їх обговорення. Висока смертність хворих на грип в епідемічному сезоні 2015 – 2016 рр., спричинена циркуляцією та домінуванням у структурі захворюваності на грип Каліфорнійських штамів пандемічного вірусу грипу A(H1N1)pdm, знову привернула увагу лікарів та епідеміологів до засобів швидкої ідентифікації особливо небезпечних вірусних патогенів. «Золотим стандартом» вірусологічних методів діагностики збудників вірусних інфекцій протягом останніх 10 років вважаються методи молекулярної діагностики і серед них найбільш швидким, достовірно чутливим та економічно привабливим для нашої країни є ПЛР в режимі реального часу (Real-Time RT- PCR аналізу) [7].

Для діагностики пандемічного вірусу грипу A(H1N1)pdm нами була розроблена вітчизняна діагностична тест-система «DIA Influenza H1N1». Особливістю даного тесту є розроблені унікальні праймери та TaqMan-зонди, які здатні виявляти РНК тільки пандемічних вірусів грипу A(H1N1)pdm

(Каліфорнійські штами 2009 року) з наступною ідентифікацією генів гемаглютиніну H1 і нейрамінідази N1 у клінічних зразках хворих на грип людей.

Оцінку двостадійного мультиплексного Real-Time RT- PCR аналізу, який складає основу вказаної тест-системи, проводили у відповідності до вимог інструкції із застосування. РНК вірусу грипу виділяли із 150 мкл клінічного зразку, до якого додавали 5 мкл внутрішнього контролю (IC) на етапі лізису зразка.

На 1-й стадії Real-Time RT- PCR аналізу, використовуючи **Master Mix I** тест-системи «*DIA Influenza H1N1*», що містить праймери і TaqMan-зонд, специфічні до високонсервативної ділянки геному вірусу грипу типу А, проводили скринінговий відбір клінічних зразків, які містять лише РНК вірусу грипу А. До складу Master Mix I також входять праймери та TaqMan-зонд внутрішнього контролю (IC), за результатами ампліфікації якого оцінювали ефективність процесу виділення РНК із клінічного зразку та самої RT-PCR реакції. Введення внутрішнього контролю на етапі виділення РНК дозволяє виявити зразки з хибно негативними результатами [8].

Після першого етапу аналізували лише ті зразки, в яких виявлено чіткий сигнал по внутрішньому контролю (канал JOE). Якщо в зразку не було виявлено позитивного сигналу по каналу JOE, його бракували і проводили повторне виділення РНК із клінічного матеріалу. Ті зразки, в яких були зафіксовані позитивні сигнали по двом каналам FAM (вірус грипу А) та по каналу JOE (внутрішній контроль) визначали позитивними (що містять РНК вірусу грипу А) і далі тестували на 2-й стадії: генотипування за генами гемаглютиніну H1 та нейрамінідази N1. Ті зразки, в яких був позитивний сигнал по внутрішньому контролю (канал JOE), але негативний результат по каналу FAM (вірус грипу А) визначали як негативні (що не містять РНК вірусу грипу А). Серед 20 проаналізованих клінічних зразків виявлено 12 позитивних (зафіксовано флуоресцентний сигнал по каналу FAM) та 8 негативних зразків (в яких не було зафіксовано флуоресцентного сигналу по

каналу FAM). В усіх 20 клінічних зразках не було виявлено жодного хибно негативного результату, тобто в кожному зразку був наявний сигнал внутрішнього контролю (IC).

Отже, серед 12 позитивних зразків, в тому числі і зразків від хворого на пандемічний штам вірусу, на першій стадії виявлення грипу А позитивні результати спостерігали в усіх 12 зразках (див. рис.).

На 2-й стадії Real-Time RT- PCR аналізу використовуючи **Master Mix II** (тест-системи «*DIA Influenza H1N1*»), що містить дві пари праймерів і два ДНК-зонди специфічні до обраних послідовностей генів H1 та N1 пандемічних вірусів грипу А(H1N1)pdm (Каліфорнійські штами 2009 року), проводили генотипування за вказаними генами в мультиплексному форматі.

За результатами ампліфікації даного етапу реакції позитивними вважаються ті зразки, в яких виявлено чіткий сигнал за обома каналами: FAM (гемаглютиніни H1) та JOE (нейрамінідаза N1). Всі інші позитивні результати хоча б за одним геном не вважаються позитивними на пандемічний грип, тобто не містять РНК пандемічного вірусу грипу А(H1N1)pdm (Каліфорнійські штами).

Аналіз 12 позитивних клінічних зразків, які були відібрані нами для 2-ї стадії показав, що на другій стадії: генотипування за генами H1 та N1 пандемічних вірусів грипу А(H1N1)pdm позитивний результат був зафіксований у двох зразках від хворого, в якого фахівці Інституту за співпраці з ВООЗ діагностували пандемічний грип А(H1N1)pdm у травні 2009 року (див. рис.).

Рис. 1. Результати тестування позитивних клінічних зразків хворих на грип у тест-системі «DIA Influenza H1N1», Діапроф-Мед, Україна

В 10 інших зразках на стадії генотипування зафіксували негативний результат, що свідчить про відсутність в них досліджуваних генів пандемічних вірусів грипу А(H1N1)pdm (Каліфорнійські штами). За результатами даного тестування було встановлено, що вони містили сезонний грип із різною комбінацією генів гемаглютиніну та нейрамінідази.

Дослідження трьох референтних зразків, що містили штами сезонного грипу A/FM1/47(H1N1), A/New Caledonia/20/99(H1N1) та A/Panama/2007/99(H3N2) за допомогою досліджуваної нами методики двостадійного мультиплексного Real-Time RT-PCR аналізу (тест-система «DIA Influenza H1N1») показали лише позитивний результат на 1-й стадії скринінгу за М-геном, що підтвердив присутність у зразках вірусу грипу А. Водночас, за генами Н1 та N1 у зразку A/Panama/2007/99(H3N2) було отримано негативні результати за обома генами, у зразку A/FM1/47(H1N1) та зразку A/New Caledonia/20/99(H1N1) – негативний результат лише за геном Н1. Отримані позитивні результати лише за геном N1 ($Ct = 39,6$ та $Ct = 35,3$) відповідно до рекомендацій ВООЗ [9] та інструкції до тест-системи «DIA Influenza H1N1» не можуть трактуватись як виявлення пандемічного вірусу грипу А(H1N1)pdm у цих зразках. Таким чином, можна констатувати відсутність перехресної реакції із сезонними штамами.

Специфічність тесту оцінювали, досліджуючи референтний препарат вірусу грипу В(В/HongKong/330/01). Перехресної реакції не спостерігалось (табл. 1).

1. Дослідження еталонних зразків вірусу грипу (CDC, США) за допомогою методу двостадійного мультиплексного Real-Time RT-PCR аналізу (тест-система «DIA Influenza H1N1»)

Еталонні зразки вірусу грипу (CDC, США)	Результати тестування за допомогою методу двостадійного мультиплексного Real-Time RT-PCR аналізу (тест-система «DIA Influenza H1N1»)			
	1-а стадія аналізу		2-а стадія аналізу	
	ІС (внутр. контроль) (Ct)	Вірус грипу А (М-ген) (Ct)	Гемаглютинін Н1 (Ct)	Нейрамінідаза N1 (Ct)
Influenza B virus: B/HongKong/330/01	+ (19,33)	-	-	-
Influenza virus A(H1N1) : A/FM1/47	+ (18,9)	+ (20,6)	-	+ (39,6)
Influenza virus A (H1N1): A/New Caledonia/20/99	+ (17,59)	+ (22,56)	-	+ (35,3)
Influenza virus A(H3N2): A/Panama/2007/99	+ (20,16)	+ (21,69)	-	-

Примітка: + - позитивний результат, що свідчить про наявність флуоресцентного сигналу в зразку; -- негативний результат, що свідчить про відсутність флуоресцентного сигналу в зразку; (Ct) – значення циклу Real-Time RT-PCR аналізу при якому зафіксований позитивний сигнал

Межу чутливості тесту визначали, застосовуючи внутрішньовиробничу панель ПП-101 ВПП-01(Діапроф-мед, Україна), до складу якої входили зразки біологічного матеріалу з різною концентрацією рекомбінантних плазмід, що містили синтетичні вставки генів вірусу грипу (М-ген, Н1 а N1). Результати досліджень встановили наступні показники аналітичної чутливості: за М-геном, Н1 та N1-генами в межах 10 копій в реакції (табл. 2).

2. Визначення межі чутливості двостадійного мультиплексного Real-Time RT-PCR аналізу (тест-система «DIA Influenza H1N1»)

Рекомбінантні плазмиди (мішені)	Загальна кількість позитивних зразків / Кількість виявлених зразків / 25 µl реакційної суміші								Аналітична чутливість (кількість копій) / на 25 µl реакційної суміші
10-кратні розведення	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁵	10 ⁴	10 ³	10 ²	10	1	
pINC-21(H1-ген)	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	10
pINC-20(N1-ген)	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	10
pIMC-13(MA-ген)	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	1/3	10

Отримані результати свідчать про досить високу аналітичну чутливість розробленої методики двостадійного мультиплексного Real-Time RT-PCR аналізу тест-системи «DIA Influenza H1N1», яка не поступається діагностичним показникам сучасних тестів на основі ПЛР-аналізу.

Висновки та перспективи подальших досліджень

1. Встановлена чутливість та специфічність на рівні 100 % за використання методу двостадійного мультиплексного Real-Time RT-PCR аналізу, що складає основу тест-системи «DIA Influenza H1N1» (Діапроф-мед, Україна) для діагностики пандемічного вірусу грипу A(H1N1)pdm в клінічних зразках хворих на грип.

2. Аналітична чутливість досліджуваного методу склала за трьома генами вірусу грипу A(H1N1)pdm (М-гену, Н1 та N1-генам) 10 копій в реакції. Хибно-негативних, хибно-позитивних або сумнівних результатів не виявлено.

3. Вітчизняна тест-системи «DIA Influenza H1N1» зареєстрована в Україні (реєстраційне свідоцтво МОЗ України № 9533/2010 від 01.07.2011) та може бути використана як ефективний інструмент для точної і швидкої діагностики пандемічних штамів вірусу грипу A(H1N1)pdm.

Список літератури

1. Европейский центр профилактики и контроля заболеваний, Европейское региональное бюро ВОЗ. Последние новости о гриппе в Европе, еженедельный электронный бюллетень ECDC–ВОЗ [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://www.flunewseurope.org/Archives> – Назва з екрана.
2. Strategic advisory group of experts on immunization – report of the extraordinary meeting on the influenza A (H1N1) 2009 pandemic (7 July 2009); Human infection with pandemic A (H1N1) 2009 influenza virus: clinical observations in hospitalized patients, Americas (July 2009 – update) // Weekly Epidemiological Record (WHO).–2009.–84, N 30.–P. 301–308.
3. Mironenko A. P. Pandemia of influenza in Ukraine in 2009–2010 winter season: lessons learned for future / Mironenko A. P., Onishchenko O. V., Golubka O. S., Kurinko N. A., Leibenko L. V. // *Liky Ukrainy*. – 2010.– N 10 (146). – P. 86–90.
4. Leibenko L. V. Phylogenetic analysis of nfluenza A(H1N1) pdm viruses isolated in Ukraine during the 2009–2010 pandemic season / Leibenko L. V., Polischuk V. P., Mironenko A. P. // *Biopolymers and Cell*. – 2013. – Vol. 29, N 2. – P. 143–149.
5. Грип та ГРВІ в Україні: Інформаційний бюллетень. – Київ, 2016. –19 с.
6. Аналіз розповсюдження пташиного грипу H5N1 у світі та Україні у 2005: Інформаційно-аналітичне повідомлення. – 2010 рр. – Сімферополь, 2011.
7. World Health Organization. WHO information for laboratory diagnosis of new influenza A (H1N1) virus in humans. Diagnostic Recommendations H1N1.200090521. [Електронний ресурс] / Режим доступа: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO> – Назва з екрана.
8. Dreier J. Use of Bacteriophage MS2 as an Internal Control in Viral Reverse transcription-PCR Assays. / Dreier, J., Stormer, M., Kleesiek, // *J Clin Microbiol.*, K. 2005., 43(9), 4551-4557.
9. WHO Recommendations: CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza A(H1N1), revision 2 (6 October 2009). [Електронний ресурс] / Режим доступа: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimertpcr> – Назва з екрана.

References

1. European Centre for Disease Prevention and Control/WHO Regional Office for Europe. Flu News Europe, Joint ECDC–WHO. Available at: <http://www.flunewseurope.org/Archives>
2. Strategic advisory group of experts on immunization – report of the extraordinary meeting on the influenza A (H1N1) 2009 pandemic (7 July 2009); Human infection with pandemic A (H1N1) 2009 influenza virus: clinical observations in hospitalized patients, Americas (July 2009 – update) // Weekly Epidemiological Record (WHO).–2009.–84, N 30.–P. 301–308.

3. Mironenko A. P. Pandemia of influenza in Ukraine in 2009–2010 winter season: lessons learned for future / Mironenko A. P., Onishchenko O. V., Golubka O. S., Kurinko N. A., Leibenko L. V. // *Liky Ukrainy*. – 2010. – N 10 (146). – P. 86–90.
4. Leibenko L. V. Phylogenetic analysis of influenza A(H1N1) pdm viruses isolated in Ukraine during the 2009–2010 pandemic season / Leibenko L. V., Polischuk V. P., Mironenko A. P. // *Biopolymers and Cell*. – 2013. – Vol. 29, N 2. – P. 143–149.
5. *Hryp ta HRVI v Ukraini*. Informatsiinyi biulleten. – Kyiv, 2016. – 19 s.
6. Analiz rozpovsiudzhennia ptashynoho hrypu H5N1 u sviti ta Ukraini u 2005. Informatsiino-analitychne povidomlennia. – 2010 rr. – Simferopol, 2011.
7. World Health Organization. WHO information for laboratory diagnosis of new influenza A (H1N1) virus in humans. Diagnostic Recommendations H1N1.20090521. Available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/WHO>
8. Dreier J. Use of Bacteriophage MS2 as an Internal Control in Viral Reverse transcription-PCR Assays. / Dreier, J., Stormer, M., Kleesiek, // *J Clin Microbiol.*, K. 2005., 43(9), 4551-4557.
9. WHO Recommendations: CDC protocol of real-time RT-PCR for influenza A(H1N1), revision 2 (6 October 2009). Available at: <http://www.who.int/csr/resources/publications/swineflu/realtimeptpcr>

ОЦЕНКА МУЛЬТИПЛЕКСНОГО ВАРИАНТА *TaqMan REAL-TIME RT-PCR* АНАЛИЗА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ПАНДЕМИЧЕСКОГО ВИРУСА ГРИППА A(H1N1)PDM В КЛИНИЧЕСКИХ ОБРАЗЦАХ БОЛЬНЫХ ГРИППОМ

С. В. Степанюк, В. А. Шевчук, Н. Я. Спивак

Аннотация. Актуальность – современная диагностика пандемических штаммов вируса гриппа молекулярными методами. Цель – осуществить оценку мультиплексного варианта метода *TaqMan Real-Time RT-PCR* анализа для быстрой и специфической диагностики пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm в клинических образцах больных гриппом. Методы: полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (*Real-Time RT-PCR*). Установлено, что методика мультиплексного *TaqMan Real-Time RT-PCR* анализа и разработанные праймеры и *TaqMan*-зонды, входящие в состав отечественной тест-системы «*DIA Influenza H1N1*» выявляют со 100 % чувствительностью и специфичностью РНК Калифорнийских штаммов пандемического вируса гриппа A(H1N1)pdm в клинических образцах больных гриппом. Аналитическая чувствительность теста определена на уровне 10 копий в реакции. Предложенная методика *TaqMan Real-Time RT-PCR* является эффективным инструментом быстрого и точного выявления высокопатогенных пандемических штаммов вируса гриппа A(H1N1)pdm 2009 года.

Ключевые слова: пандемический вирус гриппа A(H1N1), полимеразная цепная реакция в режиме реального времени, диагностическая тест-система

**EVALUATION OF A MULTIPLEX *TaqMan* REAL-TIME REVERSE
TRANSCRIPTION-PCR ASSAYS FOR THE DETECTION OF A(H1N1)
PDM INFLUENZA VIRUSES IN CLINICAL
SPECIMENS**

S. V. Stepaniuk, V. A. Shevchuk, M. Y. Spivak

Abstract. *Actuality – modern diagnostics of pandemic influenza virus strains by molecular methods. Objective: to evaluate a Multiplex TaqMan Real-Time RT-PCR for the rapid and specific diagnosis of pandemic influenza virus A (H1N1) pdm in clinical samples of patients with influenza. Methods: the polymerase chain reaction in real time (Real-Time RT-PCR). Results: it was found that the Multiplex TaqMan Real-Time RT-PCR assay and designed primers and the TaqMan-probes(test kit «DIA Influenza H1N1») identified the RNA of influenza pandemic California strains of A (H1N1) pdm in clinical samples with 100% sensitivity and specificity. Analytical sensitivity of test is at 10 copies per reaction. The proposed TaqMan Real-Time RT-PCR assay is an effective tool to quickly and efficiently find the pandemic strains of influenza virus A (H1N1) pdm 2009.*

Key words: *pandemic influenza virus A (H1N1), polymerase chain reaction in real time, diagnostic test kit*