

© Колектив авторів, 2012  
УДК 616-036.21.921.5.083.2

**С.В. Степанюк, А.П. Мироненко, М.Г. Люльчук, С.І. Доан, М.Я. Співак**  
**РЕЗУЛЬТАТИ КЛІНІЧНИХ ВИПРОБУВАНЬ ТЕСТ-СИСТЕМИ**  
**«DIA INFLUENZA H1N1» ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ПАНДЕМІЧНОГО**  
**ВІРУСУ ГРИПУ А/H1N1/2009 НА ОСНОВІ МЕТОДУ REAL-TIME**  
**RT-PCR**

ПрАТ НВК «Діапроф-Мед», Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України, Інститут мікробіології і вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України

*Представлені дані з розробки діагностичної тест-системи у форматі двостадійного мультиплексного RT-PCR аналізу в режимі реального часу (Real-Time) для виявлення та генотипування пандемічного вірусу грипу А/H1N1/2009. Наведено результати клінічних досліджень тест-системи «DIA Influenza H1N1» для виявлення РНК пандемічного вірусу грипу А/H1N1/2009 (Каліфорнійські штами) в ДУ «Інститут епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України». За результатами випробувань встановлено, що тест-система є ефективною та специфічною для виявлення каліфорнійських штамів пандемічного вірусу грипу А/H1N1/2009 і може бути використана для діагностики захворювання, що зумовлене цим штамом вірусу. Проведені клінічні випробування в ході державної реєстрації в МОЗ України показали чутливість та специфічність тест-системи «DIA Influenza H1N1» на рівні 100 %. Отримано реєстраційне свідоцтво МОЗ України № 9533/2010 від 01.07.2011.*

**Ключові слова:** пандемічний вірус грипу А/H1N1/, полімеразна ланцюгова реакція в режимі реального часу (Real-Time ПЛР), діагностична тест-система.

Віруси грипу А займають важливе місце в структурі захворюваності людей на гострі респіраторні вірусні інфекції (ГРВІ), що складають до 90 % від усіх інших інфекційних хвороб [1, 2]. За даними ВООЗ, тільки тяжкими формами грипу в світі щорічно хворіють 3-5 млн осіб, з них 45-60 % – діти. Економічні збитки від сезонного епідемічного грипу становлять, в середньому, близько 85 % економічних втрат від інфекційних хвороб у цілому [3].

За даними епідеміологічного моніторингу МОЗ України, в епідемічному сезоні 2010-2011 рр. загальна захворюваність на грип була меншою по-

рівняно з минулими роками, але в структурі вірусів грипу цього сезону пандемічний грип А/H1N1/2009 продовжує домінувати [4-7]. За оцінками експертів ВООЗ, на кінець 2011 р. грип А/H1N1/2009 з моменту його виявлення в Мексиці та Каліфорнії в 2009 р. вже забрав життя понад 18 400 чоловік в усьому світі. Не зважаючи на те, що в 2010 р. було оголошено кінець пандемії, ВООЗ застерігає, що «локальні спалахи різних величин», швидше за все, продовжаться [3]. Цей штам вірусу продовжує циркулювати в людській популяції та на сьогодні практично витіснив сезонні штами А/H1N1/, тому точна діагностика Каліфорнійського штаму вірусу залишається актуальною проблемою.

Досвід боротьби з грипом, накопичений за останні роки, показав, що для розробки та проведення ефективних протиепідемічних заходів необхідне чітке функціонування системи постійного моніторингу за циркуляцією вірусу грипу, що базується на використанні лабораторних методів точної і швидкої ідентифікації та характеристиці циркулюючих штамів вірусу грипу А [8, 9]. Серед методів лабораторної діагностики грипу найбільш ефективним на сьогодні визнаний метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Порівняно з методами культурального підходу, ПЛР має більш високу чутливість, швидкість отримання результатів та є безпечним для персоналу [10]. Істотно виграє метод ПЛР і в порівнянні з серологічними методами, оскільки дозволяє виявляти віруси грипу на самих ранніх стадіях інфекції, задовго до появи антитіл, що дає можливість лікарям-клініцистам і лікарям-епідеміологам розпочати етіотропне лікування та проведення протиепідемічних заходів [11, 12].

Метою нашої роботи було дослідити діагностичні характеристики розробленої науковцями

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

ПрАТ НВК «Діапроф-Мед» тест-системи «DIA Influenza H1N1», використовуючи клінічні зразки хворих на грип, у тому числі від хворого на пандемічний грип А/Н1N1/2009, які пройшли підтвердження в лабораторії ВООЗ (Великобританія), а також клінічні зразки здорових людей.

### Матеріали і методи

*Клінічні зразки носоглоткових змивів хворих на ОГРВІ людей.* Під час клінічних випробувань були використані 12 клінічних зразків від хворих на сезонний грип, 2 із яких від одного хворого на пандемічний грип А/Н1N1/2009, 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».

*Виділення РНК вірусів.* Виділення та очищення вірусної РНК проводили з використанням набору реактивів, що входить до складу тест-системи «DIA Influenza H1N1»: 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 кожну пробу клінічного зразка додавали внутрішній контрольний зразок (IC).

*Real-Time ПЛР аналіз.* Двостадійну мультиплексну Real-Time RT-PCR проводили, використовуючи компоненти тест-системи «DIA Influenza H1N1» (відповідно до інструкції виробника) та за допомогою приладу ABI PRIZM 7500 (Applied Biosystems, USA) в лабораторії грипу Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН України.

*Визначення специфічності та чутливості ПЛР тест-системи.* Специфічність мультиплексної Real-Time RT-PCR оцінювали, використовуючи клінічні зразки здорових людей. Чутливість тесту визначали за допомогою позитивних клінічних зразків, підтверджених в лабораторії ВООЗ (Великобританія).

### Результати досліджень та їх обговорення

Розроблена ПрАТ НВК «Діапроф-Мед» тест-система «DIA Influenza H1N1» призначена для виявлення клінічних зразків, що містять РНК тільки пандемічних вірусів грипу А/Н1N1/2009 (Каліфорнійські штами) з наступною ідентифікацією генів гемаглютиніну Н1 і нейрамінідази N1 у форматі двостадійного мультиплексного Real-Time RT-PCR аналізу.

На базі ДУ «Інституту епідеміології та інфекційних хвороб ім. Л.В. Громашевського НАМН Украї-

ни» були проведені випробування тест-системи в ході державної реєстрації в МОЗ України.

Під час випробувань були використані клінічні зразки хворих на сезонний або пандемічний грип А/Н1N1/2009, а також зразки клінічного матеріалу здорових людей. Відповідно до методики, що описана в інструкції до тест-системи, РНК вірусу грипу виділяли з 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 ДНК-зонд, специфічні до висококонсервативної 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 ДНК-зонд внутрішнього контролю (IC), за результатами ампліфікації якого оцінювали ефективність процесу виділення РНК із клінічного зразку та самої RT-PCR. Введення внутрішнього контролю на етапі виділення РНК дозволяє виявити зразки з хибно негативними результатами [12].

**Аналіз результатів 1-ї стадії.** Після першого етапу аналізували лише ті зразки, в яких виявлено чіткий сигнал внутрішнього контролю (канал JOE). Якщо в зразку не було виявлено позитивного сигналу по каналу JOE, його бракували і проводили повторне виділення РНК з 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 Н1 та нейрамінідази N1. Ті зразки, в яких був позитивний сигнал внутрішнього 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, у тому числі і зразків від хворого на пандемічний грип, на першій стадії виявлення вірусу грипу А позитивні результати спостерігали в усіх 12 зразках (табл. 1).

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

Таблиця 1

Результати тестування позитивних клінічних зразків у тест-системі «*DIA Influenza H1N1*» (pandemic),  
Діапроф-Мед, Україна

№ п/п	№ зразка	Тест-система « <i>DIA Influenza H1N1</i> » (pandemic), Діапроф-Мед, Україна			
		ІС (внутр. контроль)	Грип А загальний	H1-2009 (pandem)	N1-2009 (pandem)
1	1	+	+	-	-
2	2	+	+	-	-
3	3	+	+	-	-
4	4	+	+	-	-
5	5	+	+	-	-
6	6	+	+	-	-
7	7	+	+	-	-
8	8	+	+	-	-
9	9	+	+	-	-
10	10	+	+	-	-
11	11	+	+	+	+
12	12	+	+	+	+

Позначення: «+» – зафіксовано позитивний флуоресцентний сигнал; «-» – відсутній флуоресцентний сигнал.

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 A/H1N1/2009 (Каліфорнійські штами), проводили генотипування за вказаними генами в мультиплексу форматі.

**Аналіз результатів 2-ї стадії.** За результатами ампліфікації даного етапу реакції позитивними вважаються ті зразки, в яких виявлено чіткий сигнал по обом каналам: 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 A/H1N1/2009 (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 A/H1N1/2009 позитивний результат був зафіксований в двох зразках від хворого, у якого фахівці Інституту при співпраці з ВООЗ діагностували пандемічний грип A/H1N1/2009 у травні 2009 р. В 10 інших зразках на стадії генотипування зафіксували негативний результат, що свідчить про відсутність в них досліджуваних генів пандемічних вірусів грипу A/H1N1/2009 (Каліфорнійські штами) (табл. 1). Ймовірно, вони містили віруси сезонного грипу з різною комбінацією гемаглютиніну та нейрамінідази.

### Висновки

1. Хибно-негативних, хибно-позитивних чи сумнівних результатів не виявлено.

2. Чутливість і специфічність тест-системи «*DIA Influenza H1N1*» склала 100 %.

3. У 2-х зразках, які пройшли підтвердження в лабораторії ВООЗ (Великобританія) в травні 2009 р., за допомогою тест-системи «*DIA Influenza H1N1*» також виявлено Каліфорнійський штам грипу A/H1N1/2009.

4. За результатами державних випробувань отримано реєстраційне свідоцтво МОЗ України № 9533/2010 від 01.07.2011.

### Література

- Гендон Ю.З. Пандемия гриппа: можно ли с ней бороться? / Ю.З. Гендон // Вопросы вирусологии. – 1998. – № 1. – С. 43-46.
- Киселев О.И. Грипп и другие респираторные вирусные инфекции: эпидемиология, профилактика, диагностика и терапия / О.И. Киселев, И.Г. Маринич, А.А. Соминина. – СПб, 2003. – 244 с.
- <http://www.who.int/mediacentre>
- [www.moz.gov.ua](http://www.moz.gov.ua)
- Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans / [F.S. Dawood, S. Jain, L. Finelli et al.] // N. Engl. J. Med. – 2009. – Vol. 360. – P. 2605-2615.
- Amino acid sequence analysis and identification of mutations under positive selection in hemagglutinin of 2009 influenza A (H1N1) isolates / [X. Ding, L. Jiang, C. Ke et al.] // Virus Genes. – 2010. – Vol. 41. – P. 329-340.
- Pandemic potential of a strain of influenza A (H1N1): early findings / [C. Fraser, C.A. Donnelly, S. Cauchemez et al.] // Science. – 2009. – Vol. 324. – P. 1557-1561.
- Дзюблик І.В. Грип та його профілактика / І.В. Дзюблик, В.П. Ширококов. – Київ, 2005. – 194 с.
- Пандемический грипп 2009 г. в России. Особенности выделения и биологические свойства вирусов / [Д.М. Даниленко, Н.И. Коновалова, М.Ю. Еропкин и др.] // Вопросы вирусологии. – 2011. – № 2. – С. 34-36.

## ОРИГІНАЛЬНІ ДОСЛІДЖЕННЯ

10. ПЛР для виявлення збудників патологічних процесів: Методичні вказівки 9.9.5.-2003. – Київ, 2003.

11. Wood J. The 2009 influenza pandemic begins / J. Wood // Influenza and other respiratory viruses. – 2009. – Vol. 5. – P. 197-198.

12. Fraga D. Real-Time PCR / D. Fraga, T. Meulia, S. Fenster // Current Protocols Essential Laboratory Techniques 10.3.1-10.3.34

### RESULTS OF CLINICAL TRIALS OF TEST-SYSTEM «DIA INFLUENZA H1N1» FOR DETECTION OF PANDEMIC INFLUENZA VIRUS A/H1N1/2009 ON THE BASIS OF THE METHOD REAL-TIME RT-PCR

S.V. Stepaniuk, A.P. Myronenko, M.H. Liulchuk, S.I. Doan, M.Ya. Spivak

*SUMMARY. This paper presents data on the development of diagnostic test system in the format of two-stage multiplex RT-PCR analysis in real time (Real-Time) for detection and genotyping of pandemic influenza virus A/H1N1/2009. In this report we represent a test system, which has successfully passed clinical trials at the L.V. Hromashevskiy Institute of Epidemiology and Infectious Diseases. According to the results of tests established sensitivity and specificity at the level of 100 %. The registration certificate of Ministry of Public Health of Ukraine № 9533/2010 of 01.07.2011 was received.*

**Key words:** pandemic influenza virus A (H1N1), polymerase chain reaction in real time (Real-Time PCR), diagnostic test system.

Отримано 23.04.2012 р.

© Андрейчин Ю.М., 2012  
УДК 616.216.1-002-089.844]-071.3

**Ю.М. Андрейчин**

## ГІСТОЛОГІЧНІ ТА МОРФОМЕТРИЧНІ ПАРАМЕТРИ КІСТКОВОЇ СТІНКИ ВЕРХНЬОЩЕЛЕПНОЇ ПАЗУХИ ПРИ ХРОНІЧНОМУ СИНУСІТІ

Тернопільський державний медичний університет ім. І.Я. Горбачевського

*Досліджено біоптати стінки верхньощелепного синусу у 28 хворих на хронічний верхньощелепний синусит (основна група) і 10 пацієнтів з переломом верхньої щелепи й виличної кістки (група порівняння). Встановлено, що при хронічному синуситі відбувається ремоделювання кісткової тканини стінки пазухи, що відповідає змішаній формі остеодистрофії з розвитком остеопорозу.*

**Ключові слова:** поліпозний верхньощелепний синусит, папілярна гіперплазія, остеодистрофія, остеопороз, морфометрія.

Хронічний синусит – інфекційно-запальне захворювання, під час якого втягуються в патологічний процес біляносові пазухи, що триває не менше 12 тижнів.

Хронічний синусит (риносинусит) є одним з найбільш поширених хронічних захворювань. У

США захворюваність ним становить 146 випадків на 1 тис. населення, або близько 30 млн випадків серед дорослого населення щорічно; Кількість звернень за медичною допомогою з приводу цієї патології в США становить близько 18-22 млн випадків щорічно, а прямі витрати на лікування – 3,4-5 млрд доларів у рік [1]. В Україні більше 15 % населення хворіють на гострий та хронічний синусит, а в 30 % випадків ця патологія вчасно не діагностується [2].

У зв'язку з широким розповсюдженням хронічних синуситів, їх патогенез потребує детальнішого дослідження, особливої уваги заслуговують морфологічні зміни. Гістологічні дослідження слизової оболонки верхньощелепного синусу хворих засвідчили інтенсивну проліферацію епітеліоцитів з наступним формуванням несправжніх ворсинок у вигляді поліпів. Зазначені зміни свідчать про