

THE INFLUENCE OF LASER IRRADIATION UPON THE STRUCTURE OF BIOFILM PSEUDOMONAS AERUGINOSA

O.V. Pokas, O.I. Polishchuk, V.O. Kanevskiy, I.V. Filchakov

SI "L.V. Gromashevsky Institute of epidemiology and infectious diseases NAMS of Ukraine", Kyiv

The ability to form the biofilm *in vitro* in 18 clinical strains *P. aeruginosa* was learned. The density of the formed biofilm with the index of optical density fluctuated within the limits from 0,37 to 2,72 OD and it was the strains specific sign. The laser irradiation which was used in the experiment with the power high than 20 mW/cm² had the low-marked bactericidal effect upon the strains of bacteria *P. aeruginosa*, and it caused the violation of the structure, which was formed during 24 hours of biofilm, what was disclosed by the method of scanning electronic microscopy.

Key words: biofilm, *Pseudomonas aeruginosa*, laser irradiation.

Рецензент: д. мед. н. С.Л. Рибалко

УДК 576.858.4:616-076/078

І.В. Дзюблик¹, І.Ф. Самборська¹, І.Г. Костенко²

ПОРІВНЯННЯ РЕЗУЛЬТАТІВ ЗАСТОСУВАННЯ МЕТОДІВ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ТА ІМУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛІЗУ ДЛЯ ДІАГНОСТИКИ НОРОВІРУСНОЇ ІНФЕКЦІЇ У ДІТЕЙ З ГОСТРИМИ КИШКОВИМИ ІНФЕКЦІЯМИ В УКРАЇНІ

¹Національна медична академія післядипломної освіти імені П.Л. Шупика МОЗ України, м. Київ

²Головний військово-медичний клінічний центр МО України, м. Київ

Представлено результати дослідження фекальних проб дітей, хворих на гострі кишкові інфекції, за допомогою полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією у порівнянні з результатами імуноферментного аналізу з метою виявлення маркерів норовірусів. Виявлено циркуляцію та підтверджено етіологічну роль норовірусів 1 та 2 генотипів у виникненні захворювань у дітей в різних регіонах України. Доведено доцільність та ефективність використання методів полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією та імуноферментного аналізу у лабораторній діагностиці норовірусної інфекції в Україні.

Ключові слова: гострі кишкові інфекції, норовіруси, полімеразна ланцюгова реакція, імуноферментний аналіз.

Сьогодні достеменно відомо, що норовіруси (НВ) людини, які належать до родини *Caliciviridae*, роду *Norovirus*, є збудниками гострих кишкових інфекцій (ГКІ) у дітей та дорослих у різних країнах світу. За даними літератури, кожного року норовіруси викликають 64 тис. випадків гострих

гастроентеритів, що потребують госпіталізації; є причиною 900 тис. відвідувань клінік з приводу ГКІ у дітей в розвинених країнах і до 200 тис. летальних випадків серед дітей віком до 5 років у країнах, що розвиваються [15]. Найважливіше, що саме НВ спричинюють до 90% спалахів ГКІ — описані спалахи норовірусної інфекції (НВІ) у лікувальних закладах, санаторіях, школах, інтернатах, таборах дитячого і туристичного відпочинку та інших закладах, де діти перебувають в умовах тісного контакту [4, 5, 10, 13, 14].

У той же час роль НВ у виникненні спорадичних випадків гострого гастроентериту потребує подальшого вивчення. Дані про питому вагу НВІ в структурі спорадичної захворюваності в країнах світу різняться між собою. Так, серологічні дослідження в Амазонії, південній Африці, Мексиці, Чилі, Канаді показали, що більшість дітей перенесли хоча б одне захворювання на НВІ до 5-річного віку. В Німеччині тільки 32% випадків норовірусної інфекції у 2007 р. мали лабораторне підтвердження, решта випадків була в епідеміологічному зв'язку з лабораторно підтвердженими

© І.В. Дзюблик, І.Ф. Самборська, І.Г. Костенко

захворюваннями, 64% норовірусних захворювань були зареєстровані у межах осередків з п'ятьма і більше випадками [2].

Відомості про поширення представників каліцивірусів на території Російської Федерації носять обмежений характер і представлені переважно матеріалами, що отримані в окремих містах країни. Так, питома вага спорадичних випадків каліцивірусної, у тому числі НВІ, в структурі ГКІ у дітей в різні місяці 2005–2008 рр. в Росії складала 10% в стаціонарах Нижнього Новгороду; 6,4–16,8% у Москві; 12,6–44% у Санкт-Петербурзі [4–8]. Таким чином, дослідження останніх років доводять, що значення НВІ в патології кишечника дітей, особливо перших років життя, у різних країнах світу раніше було недооцінено.

В Україні перші дослідження щодо виявлення та вивчення НВ як етіологічних чинників ГКІ за допомогою методу імуноферментного аналізу були розпочаті на кафедрі вірусології НМАПО імені П.Л. Шупика. Було встановлено, що 19,8% аналізованих зразків фекалій дітей з клінічним діагнозом ГКІ містили антиген збудника НВІ [3]. Разом з тим, до цього часу в Україні не розроблені підходи та не визначені алгоритми лабораторної діагностики НВІ, а відтак відсутня система епідеміологічного нагляду за поширенням НВ.

Для лабораторної діагностики НВІ у світі на сьогодні переважно застосовують метод полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), який характеризується високими чутливістю та специфічністю, експресністю, дозволяє працювати з будь-яким клінічним матеріалом, у тому числі з пробами фекалій.

Мета роботи: визначити можливість, доцільність та ефективність застосування методу ПЛР для лабораторної діагностики НВІ у дітей, хворих на ГКІ, в Україні, та порівняти отримані результати з даними нашого попереднього дослідження з застосуванням методу ІФА.

Матеріали і методи дослідження

Для виконання роботи було досліджено 560 проб фекалій дітей віком від народження до 15 років з клінічним діагнозом ГКІ. Всі діти перебували на лікуванні у ЛПЗ мм. Києва, Львова, Одеси, Сум, Умані, Харкова з листопаду 2006 р. до лютого 2007 р.

Проби фекалій відбирали в одноразові пластикові контейнери у перші години перебування хворих у стаціонарі до початку лікування. Доставляли в лабораторію кафедри вірусології НМАПО

імені П.Л. Шупика з дотриманням холодового ланцюга, де зберігали при температурі — 40°C. Безпосередньо перед дослідженням матеріал розморожували та готували 10% суспензії фекальних проб із застосуванням буферного розчину для виділення РНК НВ.

Дослідження здійснювали за допомогою методу полімеразної ланцюгової реакції зі зворотною транскрипцією (ЗТ-ПЛР). Використовували тест-систему “АмплиСенс® Noro virus 1, 2 genotypes” (Росія), яка дає можливість одночасно виявляти фрагменти РНК НВ I та II генотипів у фекальних суспензіях. До складу тест-системи входять чотири комплекти реагентів: комплект № 1 — для виділення РНК з клінічного матеріалу; комплект № 2 — для отримання кДНК на матриці РНК; комплект № 3 — для ампліфікації ділянки кДНК; комплект № 4 — для електрофоретичного аналізу ампліфікованої кДНК. В ПЛР використовували тест-систему з електрофоретичною детекцією, Аналітична чутливість тест-системи — 10^3 ГЕ/мл, специфічність — 100%.

Ампліфікацію проводили на термоциклері MyCycler (BioRad, США). Детекцію здійснювали методом горизонтального електрофорезу в 2% агарозному гелі з наступним відеогельдокументуванням на обладнанні BioRad (США).

Результати та їх обговорення

Серед методів лабораторної діагностики НВІ, які на сьогодні застосовуються у світі, провідне місце займають молекулярно-генетичні методи дослідження [9]. Вивчення послідовності геному вірусу Norwalk (перша назва норовірусів) стимулювало розвиток методів детекції вірусної нуклеїнової кислоти. Були сконструйовані праймери, які відповідали найбільш консервативній області геному, що дало змогу ампліфікувати, а потім секвенувати нуклеотидні послідовності інших норовірусів. Перший ЗТ-ПЛР аналіз для каліцивірусів був описаний через два роки після клонування геному вірусу Norwalk в 1992 р. [11, 12]. З того часу саме цей метод є одним з основних у лабораторній діагностиці каліцивірусних інфекцій людини.

Зважаючи на високу чутливість, специфічність та можливість диференційної штамової діагностики збудника, метод ЗТ-ПЛР в лабораторній діагностиці НВІ може мати значну перспективу для впровадження в Україні. Перевагами методу, крім зазначених, є відтворюваність, експресність, широкий спектр і малий об'єм досліджуваного матеріалу, автоматизація етапів проведення реакції та обліку

результатів, можливість їх відеодокументування, наявність і доступність тест-систем тощо.

Беручи до уваги все зазначене вище, з метою визначення доцільності та ефективності застосування методу ЗТ-ПЛР для діагностики НВІ в Україні, ми провели дослідження вказаним методом фекальних пробах дітей, хворих на ГКІ, та порівняли отримані результати з даними попереднього дослідження щодо визначення антигенів НВ методом ІФА [3].

Встановлено, що з 560 зразків, досліджених методом ЗТ-ПЛР, у 120 (21,4%) були визначені нуклеотидні послідовності, гомологічні послідовностям геному НВ. У попередніх дослідженнях методом ІФА було виявлено 112 зразків (19,8%), позитивних щодо наявності антигенів НВ.

За результатами ПЛР-досліджень, питома вага НВІ у структурі спорадичних захворювань на ГКІ у дітей з різних регіонів України протягом осінньо-зимового періоду 2006–2007 рр. коливалася від 3,0–8,6% у центральній частині України (Київ — Умань) до 48,4% на заході (Львів) і 28,0% на півночі (Суми). На півдні (Одеса) та сході (Харків) відсоток проб, в яких були виявлені фрагменти геному НВ, склав 12,9% і 25,0% відповідно. За результатами ІФА відсоток випадків НВІ у структурі спорадичних захворювань на ГКІ серед того ж контингенту коливався від 3,0% у центральній частині України (Умань і Київ) до 33,0% на заході (Львів) і 39,0% на півночі (Суми). На півдні (Одеса) та сході (Харків) відсоток позитивних на антиген НВ проб склав 25,7% і 18,0% відповідно (табл. 1).

Таким чином, загалом методом ЗТ-ПЛР було виявлено на 1,6% більше, ніж методом ІФА (21,4% проти 19,8%). Спостерігаються також певні розбіжності у кількості позитивних результатів, отриманих зі зразками з різних регіонів, при до-

слідженні обома методами. Так, у зразках з мм. Львова, Умані, Харкова кількість ПЛР-позитивних результатів більша порівняно з ІФА, що можна пояснити більш високою чутливістю молекулярно-генетичного методу. В той же час, у зразках з мм. Одеси та Сум відсоток позитивних проб, отриманих методом ІФА, вище, ніж методом ПЛР. На нашу думку, цей факт можна пояснити більшою стійкістю антигену НВ, який є протеїном, у порівнянні з РНК збудника, яка є нестабільною структурою та може руйнуватися під дією нуклеаз. Загалом отримані нами дані співпадають з результатами досліджень російських науковців [5–8].

За даними обох застосованих нами методів, сезонне підвищення захворюваності серед дітей з шести регіонів України спостерігалось у грудні-січні: 67,8% від загальної кількості позитивних проб виявлено з другої декади грудня до кінця січня. Осінньо-зимову сезонність НВІ спостерігають також на території Росії та ряду країн Європи [6–8, 10, 15].

Таким чином, проведені дослідження дали змогу встановити, що метод ЗТ-ПЛР є ефективним інструментом лабораторної діагностики ГКІ, застосування якого дає змогу визначити етіологічний чинник захворювання та його штамову приналежність. Ми розуміємо, що широке впровадження цього методу потребує залучення кваліфікованих фахівців, сучасного устаткування та правильної організації ПЛР-лабораторії. Разом з тим, наявність ПЛР-лабораторій в більшості обласних та багатьох міських ЛПЗ нашої держави, постійне зростання кількості відповідних спеціалістів, у тому числі тих, які отримали підготовку на кафедрі вірусології НМАПО імені П.Л. Шупика, вже сьогодні робить можливим використання ПЛР для рутинної діагностики ГКІ в Україні.

Таблиця 1. Розподіл зразків, що містять маркери норовірусів, за регіонами України

Регіон	Загальна кількість зразків	Виявлені маркери			
		Методом ІФА		Методом ЗТ-ПЛР	
		Абс.	Р±mp (%)	Абс.	Р±mp (%)
Київ	100	3	3,0±1,7	3	3,0±1,7
Львів	97	32	33,0±4,7	47	48,5±5,1
Одеса	70	18	25,7±5,2	9	12,9±4,0
Суми	100	39	39,0±4,9	28	28,0±4,5
Умань	93	2	2,0±1,5	8	8,6±2,9
Харків	100	18	18,0±3,8	25	25,0±4,3
Всього	560	112	19,8±1,7	120	21,4±1,7

Висновки

Доведена доцільність та ефективність використання методів ЗТ-ПЛР та ІФА для лабораторної діагностики НВІ в Україні. За допомогою методу ЗТ-ПЛР виявлена циркуляція НВ 1 та 2 генотипів та підтверджена етіологічна роль зазначених збудників у виникненні ГКІ у дітей в шести регіонах Украї-

ни (мм. Київ, Одеса, Харків, Львів, Умань, Суми) в осінньо-зимовий період 2006–2007 рр.

Перспективи подальших досліджень полягають у вивченні ролі різних генотипів норовірусів у спричиненні спалахів та спорадичних випадків НВІ на території нашої країни, розробка методичних рекомендацій з лабораторної діагностики НВІ в Україні.

ЛІТЕРАТУРА

1. Вірусні захворювання кишечника у дітей / О.Б. Надрага, Г.О. Литвин, І.В. Дзюблик [та ін.] // Перинатология и педиатрия. — 2008. — № 2. — С. 107–111.
2. Деміховська О.В. Вірусні гастроентерити в Європі / О.В. Деміховська // Інфекційні хвороби. — 2009. — № 2. — С. 67–73.
3. Дзюблик І.В. Перший досвід застосування методу імуноферментного аналізу для діагностики норо вірусної інфекції в Україні / І.В. Дзюблик, І.Ф. Самборська, О.В. Ковалюк // Профілактична медицина. — 2009. — № 3 (7). — С. 38–42.
4. Необходимость разработки универсальной системы для изучения циркуляции калицивирусов человека и диагностики калицивирусных гастроэнтеритов / Л.Б. Луковникова, Н.В. Епифанова, Д.В. Новиков [и др.] // Генодиагностика инфекционных болезней: сб. трудов. колл. авт. / под ред. В.И. Покровского. — М., 2007. — Т. 3. — С. 273–274.
5. Норовирусы как этиологический фактор острых кишечных инфекций у детей раннего возраста в Новосибирске / С.А. Боднев, В.В. Малеев, Е.В. Жираковская [и др.] // Эпидемиология и инфекционные болезни. — 2010. — № 1. — С. 40–44.
6. Роль норовирусов в кишечной патологии у детей // А.К. Сироткин, А.Н. Радчикова, И.А. Дубровина [и др.] // Материалы I Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням. — М., 2009. — 416 с.
7. Сезонность и возрастная структура заболеваемости острыми кишечными инфекциями на территории РФ / А.Т. Подколзин, Е.Б. Фенске, Н.Ю. Абрамычева [и др.] // Генодиагностика инфекционных болезней: сб. трудов. колл. авт. / под ред. В.И. Покровского. — М., 2007. — Т. 3. — С. 275–278.
8. Этиологическая структура острых кишечных инфекций у детей, госпитализированных в крупный стационар Москвы / Э.П. Каджаева, А.В. Горелов, Д.В. Усенко [и др.] // Инфекционные болезни. — 2006. — Т. 4, № 2. — С. 34–36.
9. Atmar R. Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses / R. Atmar, M. Ester // Clin Microbiol. Rev. — 2001. — Vol. 14, № 1. — P. 15–37.
10. Carter M. Enterically infection viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection / M. Carter // J. Appl. Microbiol. — 2005. — Vol. 98, № 2. — P. 1354–1380.
11. Detection of Norwalk virus in stool specimens by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and nonradioactive oligoprobes / R. De Leon, S.M. Matsui, R.S. Baric [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1992. — Vol. 30. — P. 3151–3157.
12. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction / X. Jiang, J. Wang, D.Y. Graham [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 1992. — Vol. 30. — P. 2529–2534.
13. Emergence of a New Norovirus Genotype II.4 Variant Associated with Global Outbreaks of Gastroenteritis / R. Bull, E. Tu, C. McIver. [et al.] // J. Clin. Microbiol. — 2006. — Vol. 44. — P. 327–333.
14. Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like Viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States / R.L. Fankhauser, S.S. Monroe, J. Noel [et al.] // J. Infect. Dis. — 2002. — Vol. 186. — P. 1–7.
15. Systematic literature review of role of human noroviruses in sporadic gastroenteritis / M.M. Patel, M.A. Widdowson, R.I. Glass [et al.] // Emerg. Infect. Dis. — 2008. — Vol. 14, № 8. — P. 1224–1231.

СРАВНЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДОВ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ И ИММУНОФЕРМЕНТНОГО АНАЛИЗА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ НОРОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИИ У ДЕТЕЙ С ОСТРЫМИ КИШЕЧНЫМИ ИНФЕКЦИЯМИ В УКРАИНЕ

И.В. Дзюблик¹, И.Ф. Самборская¹, И.Г. Костенко²

¹Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л. Шупика МЗ Украины, г. Киев

²Главный военно-медицинский клинический центр МО Украины, г. Киев

Представлены результаты исследования фекальных проб детей с острыми кишечными инфекциями методами полимеразной цепной реакции и иммуноферментного анализа с целью выявления маркеров норовирусов. Установлена циркуляция норовирусов среди детей с острой кишечной инфекцией (ОКИ). Подтверждена этиологическая роль норовирусов 1 и 2 генотипов в возникновении ОКИ у детей. Обоснована целесообразность и эффективность использования метода ОТ-ПЦР наряду с ИФА для лабораторной диагностики норовирусной инфекции в Украине.

Ключевые слова: острые кишечные инфекции, норовирусы, полимеразная цепная реакция, иммуноферментный анализ.

COMPARISON THE RESULTS OF APPLYING THE METHODS OF POLYMERASE CHAIN REACTION AND ENZYME IMMUNOASSAY FOR DIAGNOSTICS OF NOROVIRUS INFECTION IN CHILDREN WITH THE ACUTE INTESTINAL INFECTIONS IN THE UKRAINE

I. Dziublyk¹, I. Samborska¹, I. Kostenko²

¹P.L. Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education Ministry of Health of Ukraine, Kyiv

²Main Military Clinical Medical Center of Ukraine, Kyiv.

The paper represents the results of investigation of fecal samples in children with intestinal infections using methods of enzyme immunoassay (ELISA) and polymerase chain reaction (PCR) for detecting markers of noroviruses. Circulation of noroviruses in children with acute intestinal infections has been detected. Etiological role of noroviruses of groups 1 and 2 in appearing acute intestinal infection in children has been confirmed. The use of RT-PCR and ELISA methods has been proved to be advisable and effective for diagnosing noroviral infection in Ukraine.

Key words: acute intestinal infections, noroviruses, polymerase chain reaction, enzyme immunoassay.

Рецензент: к. б. н. О.В. Максименко

УДК 613.32:614.445(477.74)

А.В. Мокиенко¹, Н.Ф. Петренко¹, Л.И. Засыпка², Л.С. Котлик², Е.Ф. Тарасюк²

ГИГИЕНИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ЗАГРЯЗНЕНИЯ ВИРУСАМИ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ И ПИТЬЕВОЙ ВОДЫ В ОДЕССКОЙ ОБЛАСТИ. СООБЩЕНИЕ ПЯТОЕ: АДЕНОВИРУСЫ

¹Государственное предприятие “Украинский научно-исследовательский институт медицины транспорта” МЗ Украины, г. Одесса

²Одесская областная санитарно-эпидемиологическая служба

Работа посвящена гигиенической оценке контаминации водных объектов и питьевой воды аденовирусами (АдВ). Показано, что существующие системы очистки сточных вод и питьевой воды неэффективны относительно АдВ. Установлен персистирующий характер загрязнения АдВ водных объектов Одесской области и водопроводной воды вследствие неудовлетворительного санитарно-технического состояния водоразводящих сетей. Обоснована высокая эффективность использования диоксида хлора в дозах $1,01 \pm 0,07$; $1,03 \pm 0,07$ мг/дм³ для инактивации АдВ.

Ключевые слова: водные объекты, питьевая вода, аденовирусы, диоксид хлора.

Аденовирусы (АдВ) — вирусы среднего размера (80 нм), просто устроенные, ДНК-содержащие, способны вызывать различные поражения глаз, органов дыхания, пищеварения и мочеполовой системы [9]. АдВ имеют большую стабильность в окружающей среде по сравнению с другими известными кишечными вирусами, поэтому их

наличие в сточных водах и воде поверхностных водоисточников создает угрозу загрязнения питьевой воды [10]. АдВ значительно чаще и в больших количествах по сравнению с другими энтеровирусами обнаруживают в неочищенных сточных водах [14, 15].

Исследованиями, проведенными J. Van Heerden и соавт. в 2000–2001 гг. было показано, что при условии соблюдения требований водообработки в соответствии с международными стандартами производства безопасной питьевой воды из поверхностных водоисточников, АдВ обнаруживались в 13 (12,75%) образцах исходной и 9 (4,41%) — обработанной воды [12].

Те же авторы в следующем году (2001–2002 гг.) провели аналогичные исследования и констатировали обнаружение АдВ в 29,8% (59/198) изученных проб обработанной питьевой воды, 16% (8/50) проб воды из водозаборов и 44% (22/50) образцов речной воды [13].

Использование математической модели позволило предположить ежегодные риски инфици-

© А.В. Мокиенко, Н.Ф. Петренко, Л.И. Засыпка, Л.С. Котлик, Е.Ф. Тарасюк