

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

рования АдВ в результате потребления питьевой воды на средних уровнях от 1/1000 дм³ до 1/100 дм³ в диапазоне от 8,3/10000 человек до 8,3/1000 человек соответственно [16].

Целью работы являлась гигиеническая оценка загрязнения АдВ водных объектов в Одесской области.

Материалы и методы исследования

Оценку загрязнения АдВ водных объектов Одесской области за период 1994–2008 гг. осуществляли по данным мониторинга Центральной иммуно- вирусологической лаборатории (ЦИМВЛ) Одесской областной СЭС. Объектами мониторинга служили сточные воды, вода открытых водоемов (речная + озерная, морская + лиманная), питьевая вода. Изучение барьерной роли водоочистной станции (ВОС) “Днестр” (речная, водовод, питьевая) проводили по данным мониторинга за период 2000–2003 гг. Идентификацию АдВ проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием соответствующего набора реагентов для выявления ДНК аденовирусов производства ФГУН ЦНИИЭ Роспотребнадзора [2]. Исследовано следующее количество проб воды: сточная — 2312; речная + озерная — 1716; морская + лиманная — 4007; вода р. Днестр — 576; питьевая вода из водоводов — 328; питьевая вода из сети — 13214.

Эксперименты по вирулицидному действию диоксида хлора (ДОХ) проводили на базе ЦИМВЛ. В качестве тест-вирусов использовали свежeweделенные из фекалий больных АдВ (серотип 4). Накопление, титрование вируса по цитопатогенному действию (ЦПД) проводили в чувствительных культурах клеток карциномы гортани человека НЕР-2 [6]. В исследуемую воду вносили вирус в такой пропорции, чтобы его титр составлял 1×10^{-6} , 1×10^{-5} . Использовали дозы ДОХ, которые широко применяют в практике водоподготовки для обеззараживания воды (природных водоисточников, питьевой) и сточных вод: 0,3–0,5–1,0–1,5–2,0 мг/дм³. Экспозиция дезинфекции составляла 1 час при температуре +4°C. Оценку вирулицидной активности ДОХ проводили в соответствии с требованиями методических рекомендаций [8]. Число повторностей для каждого вируса составило 20. При расчете достоверности различия χ^2 [4, 5] учитывали, что для 95% достоверности (ошибка не более 5%) $\chi^2_{05} = 3,84$, а для 99% — $\chi^2_{01} = 6,63$, то есть при таких значениях и более различие достоверно. Получение ДОХ и определение его доз

производили в соответствии с методическими рекомендациями “Санитарно-эпидемиологический взгляд за незаражением воды у системах централизованного господарсько-питного водопостачання діоксидом хлору” [7].

Результаты и их обсуждение

На рис. 1 представлены результаты исследования контаминации АдВ сточной, речной и озерной, морской и лиманной и питьевой вод в Одесской области в динамике за 1994–2008 гг. Интенсивность контаминации АдВ сточных и поверхностных вод за анализируемый период была различной. Вместе с тем, полученные данные позволяют установить некоторые общие закономерности. За период с 1994 по 2004 гг. высокий удельный вес ПЦР-положительных проб, полученных при исследовании сточных и поверхностных вод, сопровождался, как правило, усилением контаминации АдВ питьевой воды. При этом, с одной стороны, уровни вирусного загрязнения питьевой воды не всегда уменьшались по сравнению с таковыми для сточных и поверхностных, а если и снижались, то не в той мере, которая позволяет судить об эффективности их очистки и обеззараживания (1995–2000 гг.).

Достоверные различия в контаминации различных водных объектов получены для следующих сочетаний: “питьевая-сточная” ($\chi^2=114,8$); “питьевая-речная” ($\chi^2=35,6$); “сточная-речная” ($\chi^2=122,0$); “речная-морская” ($\chi^2=115,3$). В то же время в системе “сточная-морская” вода различия были недостоверны ($\chi^2=0,4350$), то есть система биологической очистки сточных вод перед сбросом их в море неэффективна в отношении АдВ.

Исследование барьерной роли очистных сооружений по отношению к АдВ на ВОС “Днестр” свидетельствует о недостаточной очистке речной воды, поступающей в водовод (10,9 и 6,4% ПЦР — положительных проб соответственно). В водоразводящей сети было зафиксировано возрастание удельного веса ПЦР-положительных проб до 7,7% ($\chi^2 = 4,9413$), предположительно, за счет вторичного загрязнения очищенной воды (рис. 2).

Приведенные данные согласуются с результатами исследований роли водного фактора в распространении гепатита А в Одессе [3]: средства водоподготовки снижают вирусное загрязнение, однако в водоразводящей сети Одессы число ПЦР — положительных проб вновь возрастает, что свидетельствует о вторичной контаминации питьевой воды и недостаточной эффективности дополнительного хлорирования воды.

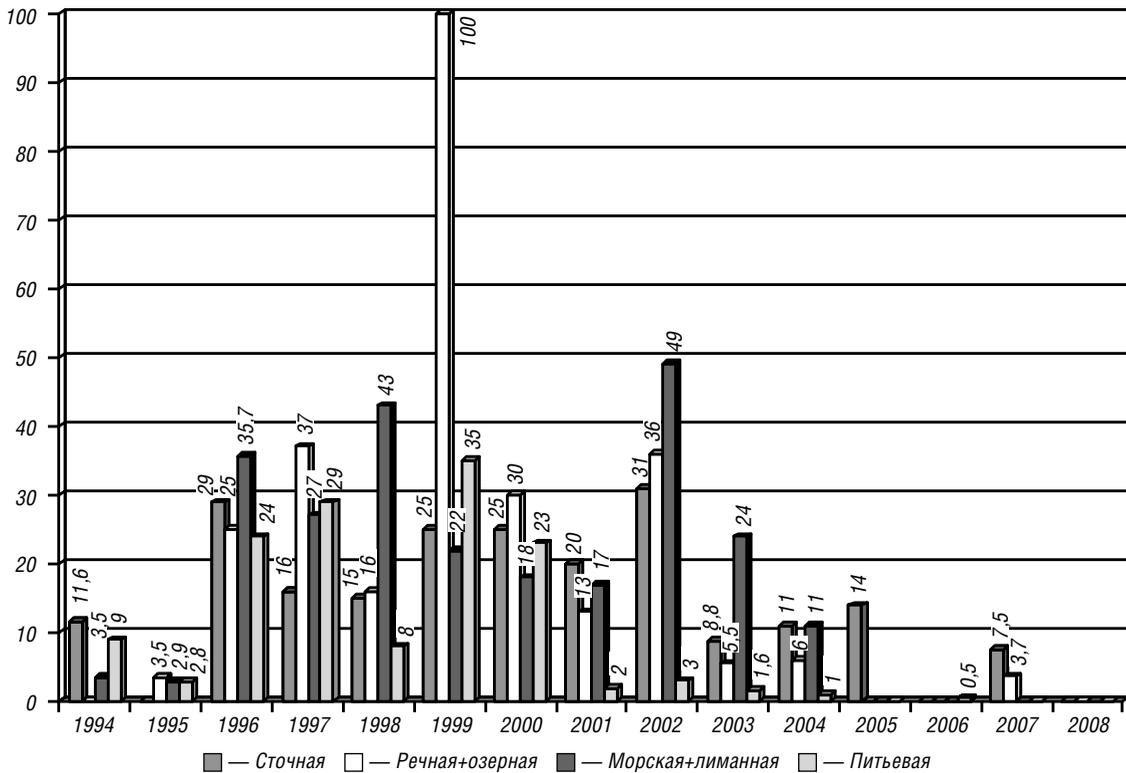


Рисунок 1. Результаты исследований проб воды на АдВ (% ПЦР — положительных проб)

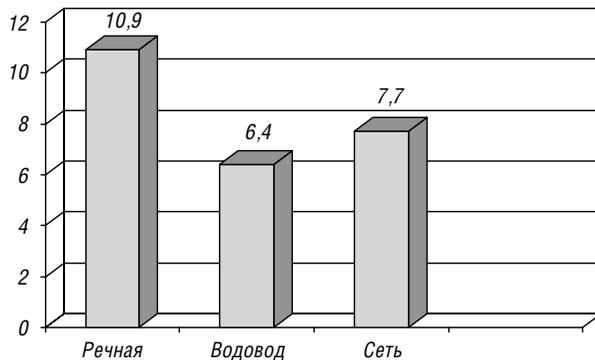


Рисунок 2. Динамика выделения АдВ из воды после водоочистки на ВОС “Днепр” и транспортировки (2000–2003 гг.)

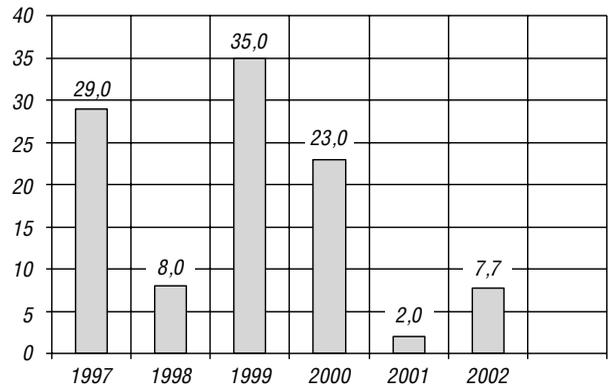


Рисунок 3. Результаты исследований проб питьевой воды в г. Одессе на АдВ за 1997–2002 гг. (% ПЦР — положительных проб)

Представленные результаты сопоставимы с опубликованными нами ранее относительно вируса гепатита А [1].

Значимость контаминации питьевой воды в водоразводящей сети подтверждается идентификацией АдВ в питьевой воде Одессы за период 1997–2002 гг. (рис. 3).

В результате изучения эффективности инактивации АдВ ДОХ было установлено влияние различных доз ДОХ на данный вирус:

- Доза $0,33 \pm 0,04$ мг/дм³ практически не оказала воздействия на АдВ, ЦПД было аналогичное контролю, различие статистически не достоверно.

- Доза $0,51 \pm 0,05$ мг/дм³ оказалась несколько эффективнее. ЦПД проявилось только на 4-е сутки и обнаруживалось в половине культур, в то время как в контроле к этому же времени были поражены все культуры. Начиная с 5-х суток и до 6-х включительно, ЦПД составляло 100%, как и в контроле; различие статистически не достоверно.
- Доза $1,01 \pm 0,07$ мг/дм³ оказалась высокоэффективной: начиная со 2-х суток и по 6-е включительно, практически полностью подавлено развитие вируса, ЦПД не обнаруживалось. Различие с контролем достоверно, ошибка на вторые сутки составляет менее 5%, а начиная с третьих — менее

1%. Для подтверждения полной нейтрализации вируса было сделано два дальнейших пассажа. В обоих пассажах на протяжении 6 суток ЦПД не отмечалось, в то время как в контроле ЦПД наблюдалось в 100%. Следует отметить, что вирулицидное действие ДОХ на АдВ с титрами 1×10^{-5} и 1×10^{-6} практически идентичное с одним отличием: при титре 1×10^{-5} и воздействии дозы ДОХ $0,31 \pm 0,03$ мг/дм³ ЦПД наступило на сутки позже, чем при титре 1×10^{-6} .

Известно единственное сообщение, касающееся инактивации ДОХ АдВ при различных температурах и pH [11]. Установлено, что уровни инактивации АдВ более высоки при pH 8, чем при pH 6 и при 15°C, чем при 5°C. При этом, дозы ДОХ в зависимости от температуры и pH колебались следующим образом: при температуре 5°C и pH 6 и 8 (от >0,77 до <1,53) мг/дм³ и (от >0,80 до <1,59) мг/дм³ соответственно; при температуре 15°C и pH 6 и 8 — (от >0,49 до <0,74) и <0,12 мг/дм³.

Полученными нами данные в определенной степени согласуются с результатами, приведенными выше, поскольку эффективные дозы ДОХ при pH=7,3–7,4 и температуре 5°C в зависимости от титра (1×10^{-6} , 1×10^{-5}) составили $1,01 \pm 0,07$, $1,03 \pm 0,07$ мг/дм³ соответственно.

Выводы

1. Барьерная роль сооружений очистки сточных вод в отношении АдВ практически отсутствует, что объясняет высокие уровни контаминации морской воды этими возбудителями и подтверждается недостоверностью различий между со-

держанием этих вирусов в сточной и морской воде ($\chi^2=0,4350$).

2. Недостоверность различий в содержании АдВ в речной воде и водоводе ($\chi^2=3,1126$) свидетельствует о недостаточной эффективности традиционной схемы очистки воды поверхностных водоемов и обеззараживания ее хлором в отношении АдВ (10,9% и 6,4% ПЦР — позитивных проб до и после очистки соответственно), что согласуется с данными литературы.

3. Получены данные, свидетельствующие о вторичной контаминации питьевой воды в водоразводящих сетях, обусловленной их неудовлетворительным санитарно-техническим состоянием: содержание АдВ в водоводе (6,4%) и сети (7,7%) достоверно различалось ($\chi^2=4,9413$).

4. Диоксид хлора в концентрациях $1,01 \pm 0,07$ и $1,03 \pm 0,07$ мг/дм³ является высокоэффективным средством инактивации АдВ с титрами 1×10^{-6} — 1×10^{-5} .

Перспективы дальнейших исследований

Представляется целесообразным проведение дальнейших исследований взаимосвязи контаминации воды водных объектов АдВ, в том числе питьевой воды на этапах очистки, обеззараживания и транспортировки, и заболеваемостью населения гастроэнтероколитами аденовирусной этиологии. Особенно это касается аварийных ситуаций на водоразводящих сетях. Следует признать необходимым изучение вирулицидной эффективности средств обеззараживания воды, в том числе, диоксида хлора по отношению к АдВ.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гигиеническая оценка загрязнения вирусами водных объектов и питьевой воды в Одесской области. Сообщение второе: вирус гепатита А — контаминация / А.В. Мокиенко, Н.Ф. Петренко, Л.И. Засыпка [и др.] // Профілактична медицина. — 2010. — № 2. — С. 39–43.
2. Инструкция по применению набора реагентов для выявления ДНК аденовирусов (*Adenovirus*) в клиническом материале методов полимеразной цепной реакции (ПЦР) с электрофоретической детекцией продуктов амплификации в агаровом слое “АмплиСенс Adenovirus-EPH” / Дата изменения 16.07.2008. — 14 с.
3. *Козишкурт О.В.* Епідеміологічна характеристика та роль водного фактору в поширенні гепатиту А в м. Одесі : автореф. дис. на здобуття наук. ступ. канд. мед. наук : спец. 14.02.02 “Епідеміологія” / О.В. Козишкурт. — К., 2006. — 21 с.
4. *Минцер О.П.* Методы обработки медицинской информации / О.П. Минцер, Б.Н. Угаров, В.В. Власов К.: Вища школа, 1982. — 2.3. Оценка различий между частотами появления признака в отдельных сериях наблюдений. — С. 44–50.
5. Разработка компьютерной программы эпидемиологического и эпизоотологического анализа базы данных мониторинга туляремии в Украине и некоторых других программ для научно-исследовательских работ. // Отчет по НИР УкрНИПЧИ им.И.И.Мечникова. — № госрегистрации 0102И001226. — Одесса, 2003. — 435 с.
6. Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита // Глобальная программа по вакцинации и иммунизации. РПИ. ВОЗ. Женева. — М., 1998. — 45 с.
7. Санітарно-епідеміологічний нагляд за знезараженням води у системах централізованого господарсько-питного водопостачання діоксидом хлору. Метод. рекомендації / А. І. Гоженко, Н. Ф. Петренко, А. В. Мокієнко [та ін.]. — МОЗ України, 2007. — 23 с.
8. Тимчасові методичні рекомендації МР 9.9.4.5.–126–2006 “Визначення віруліцидної активності дезінфекційних препаратів”. Затверджено МОЗ України, Наказ № 333 від 26.05.2006 р. — Київ. — 19 с. / 10. Знезараження води. — С. 17.

9. Albert M.J. Enteric adenoviruses / M.J. Albert // Arch. Virol. — 1986. — Vol. 88. — P. 1–17.
10. Enriquez C.E. Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water / C.E. Enriquez, C.J. Hurst, C.P. Gerba // Water Research. — 1995. — Vol. 29, № 11. — P. 2548–2553.
11. Inactivation of Enteric Adenovirus and Feline Calicivirus by Chlorine Dioxide / J.A. Thurston-Enriquez, C.N. Haas, J. Jacangelo [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. — 2005. — Vol. 71, № 6. — P. 3100–3105.
12. Incidence of adenoviruses in raw and treated water / J. Van Heerden, M.M. Ehlers, W.B. van Zyl [et al.] // Water Research. — 2003. — Vol. 37, № 15. — P. 3704–3708.
13. Prevalence of human adenoviruses in raw and treated water / J. Van Heerden, M.M. Ehlers, W.B. van Zyl [et al.] // Water Science & Technology. — 2004. — Vol. 50, № 1. — P. 39–43.
14. Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCPyV in Wastewater Matrices / S. Bofill-Mas, N. Albinana-Gimenez, P. Clemente-Casares [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. — 2006. — Vol. 72, № 12. — P. 7894–7896.
15. Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses / S. Pina, M. Puig, F. Lucina [et al.] // Applied and Environmental Microbiology. — 1998. — Vol. 64. — P. 3376–3382.
16. Waterborne adenovirus: a risk assessment / K.D. Crabtree, C.P. Gerba, J.B. Rose [et al.] // Water Science & Technology. — 1997. — Vol. 35, № 11. — P. 1–6.

ГІГІЄНИЧНА ОЦІНКА ЗАБРУДНЕННЯ ВІРУСАМИ ВОДНИХ ОБ'ЄКТІВ І ПИТНОЇ ВОДИ В ОДЕСЬКІЙ ОБЛАСТІ. ПОВІДОМЛЕННЯ П'ЯТЕ: АДЕНОВІРУСИ

А.В. Мокієнко¹, Н.Ф. Петренко¹, Л.Г. Засипка², Л.С. Котлік², О.П. Тарасюк²

¹Державне підприємство “Український науково-дослідний інститут медицини транспорту” МОЗ України, м. Одеса
²Одеська обласна санітарно-епідеміологічна служба

Робота присвячена гігієнічній оцінці контамінації водних об'єктів і питної води аденовірусами (АдВ). Показано, що існуючі системи очистки стічних вод і питної води неефективні відносно АдВ. Встановлено персистуючий характер забруднення АдВ водних об'єктів Одеської області і водопровідної води внаслідок незадовільного санітарно-технічного стану водорозподільних мереж. Обґрунтована висока ефективність діоксиду хлору у дозах $1,01 \pm 0,07$; $1,03 \pm 0,07$ мг/дм³ при інактивації АдВ.

Ключові слова: водні об'єкти, питна вода, аденовіруси, діоксид хлору.

HYGIENIC ESTIMATION OF WATER SOURCES AND DRINKING WATER CONTAMINATION BY VIRUSES IN THE ODESSA REGION THE FIFTH REPORT: ADENOVIRUSES

A.V. Mokienko¹, N.F. Petrenko¹, L.I. Zasipka², L.S. Kotlik², Y.F. Tarasyuk²

¹State Enterprise “Ukrainian Research Institute for Medicine of Transport”
of Ukrainian Ministry of Public Health of Ukraine, Odessa;
²Odessa regional sanitary-and-epidemiology station

Work is devoted a hygienic assessment contamination of water objects and drinking water by adenoviruses (AdV). It is shown, that existing systems of wastewater treatment and drinking water are inefficient against AdV. It is established persistent character of contamination AdV of water objects and drinking water owing to an unsatisfactory sanitary — engineering state of water planting networks in the Odessa region. High efficacy chlorine dioxide in doses $1,01 \pm 0,07$; $1,03 \pm 0,07$ mg/dm³ at inactivation AdV is proved.

Key words: water objects, potable water, adenoviruses, chlorine dioxide.

Рецензент: д. мед. н., проф. В.И. Бондаренко