

УДК: 628.3:578.835.1

В.А. Понятовський, В.В. Бобир, В.П. Ширококов

ВИКОРИСТАННЯ МЕТОДУ ПОЛІМЕРАЗНОЇ ЛАНЦЮГОВОЇ РЕАКЦІЇ ДЛЯ ВИЯВЛЕННЯ ЕНТЕРОВІРУСІВ У СТИЧНИХ ВОДАХ

Національний медичний університет ім. О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

В роботі приведені дані про результати молекулярно-генетичного дослідження проб стічної води, що були відібрані на різних етапах очистки Бортницької станції аерації (м. Київ) у 2010–2011 рр. Частота виділення ентеровірусної РНК із стічних вод складала 48,3%. Дана оцінка ефективності очисних споруд відносно ентеровірусного забруднення.

Ключові слова: ентеровіруси, молекулярно-генетичні дослідження, стічні води.

В наш час людина залучає все більші обсяги природних ресурсів для забезпечення необхідних умов життя. Одним із найважливіших таких ресурсів є вода, потреба у якій постійно зростає, що спричиняє її дефіцит, а тому виникає необхідність повторного її використання. Питання щодо якості питної води є актуальним для більшості країн світу, в тому числі для України. Одним з головних забруднювачів водних об'єктів в Україні є недостатньо очищені побутові стічні води житлово-комунального господарства населених пунктів та промислових підприємств.

На сьогоднішній день відомо більше 100 патогенних бактерій, вірусів та найпростіших, що здатні тривалий час перебувати у водних об'єктах і за певних умов викликати спалахи інфекційних хвороб. Серед вірусних інфекцій особливе місце посідають ентеровіруси. Найбільша їхня кількість знаходиться у стічних водах, де концентрація та їх видовий склад коливаються у значних межах. Найчастіше в стічні води ентеровіруси потрапляють із фекаліями хворих людей, а також вірусоносіїв.

“Золотим стандартом” лабораторного дослідження на наявність ентеровірусів в зразках оточуючого середовища є використання вірусологічного методу, який передбачає виділення вірусу у культурі клітин. Даний спосіб є досить коштовним та тривалим. Крім того при його використанні виникає цілий ряд проблем, що пов'язано з токсичністю деяких органічних та неорганічних сполук, які містяться в досліджуваних зразках. При використанні даного методу ефективність виділення вірусу залежить від багатьох умов: тривалості взаємодії вірусної

частинки з клітиною хазяїна, наявності інгібіторів реплікації вірусів, контамінація матеріалу різноманітними бактеріальними агентами та найпростішими. Але одним з найважливіших недоліків цього методу є те, що деякі віруси (наприклад, Коксакі А, вірус гепатиту А) не здатні культивуватися у культурах клітин [4, 10, 7].

Ці проблеми можна вирішити, застосовуючи сучасні молекулярно-генетичні методи. Революція в ДНК-технологіях, яка почалась з відкриття Келі Мюллісом у 80-х роках 20 століття полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР), продовжується і сьогодні. Постійно виникають альтернативні методи ампліфікації нуклеїнових кислот та підходи до аналізу фрагментів ДНК. Метод ПЛР широко використовується в найрізноманітніших напрямках медицини та біології. Останніми роками йому належить провідна роль у діагностиці інфекційних хвороб. З появою ПЛР значно розширилися можливості виявлення кишкових вірусів, що перебувають у навколишньому середовищі, у тому числі в стічних водах [9].

Оскільки ентеровіруси є РНК-вмісними мікроорганізмами, то для їхньої індикації використовують ПЛР з етапом зворотної транскрипції (ЗТ-ПЛР). Етап зворотної транскрипції являє собою ферментативну реакцію, за допомогою якої виділена РНК переводиться в комплементарну їй ДНК (кДНК). Скорочення часу для аналізу, зменшення вартості та більш висока чутливість ЗТ-ПЛР дозволяє знайти РНК в низьких концентраціях, що звичайно має місце в зразках з об'єктів зовнішнього середовища, тому в останні роки даний метод став широко застосовуватися для визначення кишкових вірусів в санітарній вірусології.

Матеріали та методи

Проведено дослідження 60 проб стічної води, що були відібрані протягом календарного року (з червня 2010 року по червень 2011 року) після різних етапів очистки на Бортницькій станції аерації (м. Київ, Україна). Всі дослідження проводилися з використанням ЗТ-ПЛР в класичній постановці.

Проби стічної води концентрували за допомогою природного глинистого матеріалу бентоніту,

© В.А. Понятовський, В.В. Бобир, В.П. Ширококов

який переведений в дрібнодисперсну гелієву форму [3]. РНК ентеровірусів виділяли із концентратів шляхом поєднання двох методик — гуанідинтіоціанат-хлороформ-фенольної екстракції та методу сорбції РНК на частинках силікагелю за Boometal. З цією метою використовували комерційні набори “РибоСорб” та “РибоЗольС” (“Амплиценс”, Росія) згідно інструкції виробника. Реакцію зворотної транскрипції проводили одразу після виділення РНК, в зв'язку з поганою стійкістю останньої в очищеній формі. ДНК, комплементарну вірусній РНК, одержували за допомогою ферменту ревертази (М-MLV — зворотна транскриптаза) з набору “Реверта-L-100” (“Амплиценс”, Росія) згідно інструкції виробника. Реакційна суміш містила 10 мкл вірусної РНК, 10 мкл суміші випадкових гексануклеотидів і дезоксинуклеотидтрифосфатів (з набору “Реверта-L-100”) і 1 мкл ревертази з активністю 200 од/мкл. Реакція відбувалась при 37°C 30 хвилин в термостаті Perkin Elmer (США).

Ампліфікацію вірусної к-ДНК проводили в об'ємі 25 мкл, на багатоканальному ампліфікаторі з активним регулюванням “GeneAmp PCR System 2400” (США) за звичайною методикою. В реакції використовували реагенти “Амплиценс® Enterovirus-EPh”.

В режимі ампліфікації було проведено 42 автоматичних циклів, протягом яких кількість копій досліджуваної ділянки ДНК, збільшуючись в геометричній прогресії з кожним циклом, стає достатньою для візуального обліку після електрофорезу в агарозному гелі.

Наявність та якість ПЛР-продуктів аналізували методом гель-електрофорезу, який проводили у 1,5% агарозному гелі в однократному трис-ацетатному буфері рН 8,5 (0,04 Мтрис-ацетат, 0,002 М ЕДТА), що містив 0,5 мкг/млетидія броміду.

Результати та їх обговорення

Результати експериментальних досліджень дали змогу встановити, що частота виділення ентеровірусного геному з проб стічних вод у кожному місяці була різною і коливалася в значних межах. В цілому із 60 досліджених проб 29 виявилися позитивними на наявність вірусної РНК, що складає 48,3%. Динаміка отримання позитивних результатів ампліфікації характеризувалася не рівномірністю і залежала від сезону року. Детальний помісячний аналіз показав, що найбільша частота визначення ентеровірусного геному спостерігалася в осінній період. Максимальна кількість припала на період з жовтня по грудень (рис. 1). В ці

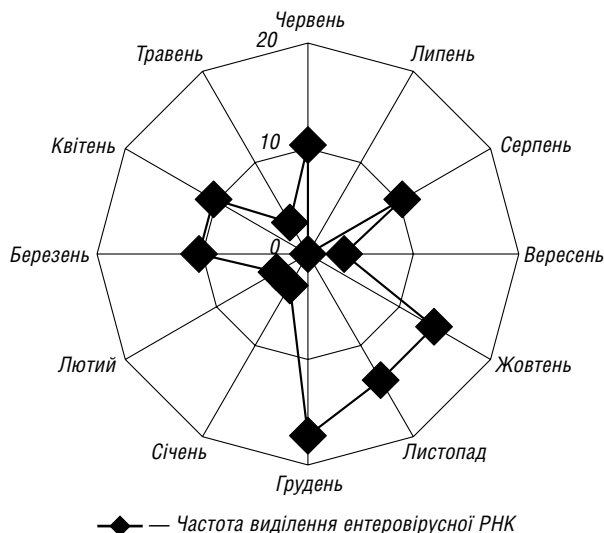


Рисунок 1. Сезонність виділення ентеровірусної РНК з стічних вод в м. Києві (2010–2011 рр.)

місяці було виділено 44,82% від усіх позитивних проб. Найменші ж показники спостерігалися у зимовий період. Коливання частоти ізоляції ентеровірусної РНК найбільш ймовірно пов'язано з особливостями циркуляції даного патогену серед населення та впливом факторів навколишнього середовища на стан стічних вод — рівень інсоляції, температура, при зниженні якої збільшується тривалість виживання ентеровірусів, що підтверджується на графіку (рис. 1) підйомом виділення генетичного матеріалу ентеровірусів з вересня по грудень.

Таким чином, експериментальні дослідження дали змогу встановити, що стічні води в період з вересня по грудень представляють собою найбільшу епідемічну небезпеку.

При оцінці ефективності очисних споруд по відношенні до вірусологічного забруднення ентеровірусами було встановлено, що частота виділення ентеровірусної РНК на етапі надходження на очистку становила 52,38%, на етапі механічної очистки (відбір із відстійників) 58,82%, після очистки 36,36% (табл.). Ці показники свідчать про недостатню ефективність очисних споруд каналізації щодо ентеровірусного забруднення (рис. 2).

На спорудах первинної (механічної) очистки не лише не відбувається звільнення стічних вод від ентеровірусної РНК, а навпаки збільшується частота виділення геному патогенів, що можна пояснити дезагрегацією конгломератів вірусів, які адсорбовані на частинках твердої фази. Більш ефективним виявився етап біологічної очистки, але слід відмітити, що його ефективність в цілому

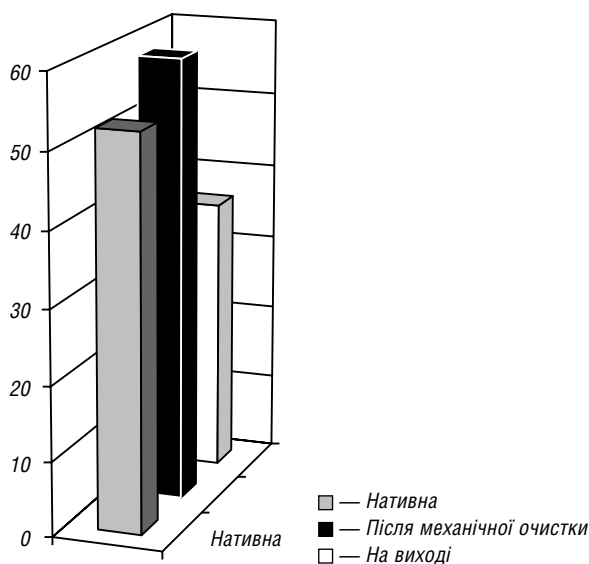


Рисунок 2. Частота виділення вірусної РНК на різних етапах очистки

Таблиця 1. Виділення ентеровірусної РНК із стічних вод

Місце забору проб	Кількість досліджених проб	Кількість проб, що виявилися позитивними на наявність ентеровірусної РНК	
		Абс. число	%
При надходженні на очисні споруди	21	11	52,38
З відстійників (механічна очистка)	17	10	58,82
Після очистки	22	8	36,36

залишається досить низькою (зменшення частоти виділення на 22,46% в порівнянні з попереднім етапом). Основним механізмом, завдяки якому знижується концентрація вірусів при біологічній очистці, є їх адсорбція на частинках активного мулу, на яких в подальшому відбувається руйнування капсули та пошкодження вірусного геному.

Порівнюючи наші дані з даними, що були отримані В.М. Гиріним [1] при дослідженні даних очисних споруд у період 1975–1980рр. з використанням класичного вірусологічного методу можна зробити висновок про збереження основних закономірностей. Автором було показано низьку ефективність роботи споруд біологічної очистки (зі стічних вод видалялося не більше 70–73% ентеровірусних частинок), а також збільшення частоти ізоляції вірусних частинок та підвищення титрів вірусів після механічної очистки, що також було підтверджено у наших дослідженнях.

На сучасному етапі підходи до виявлення ентеровірусів потребують постійного вдосконалення, зокрема — застосування сучасних молекулярно-генетичних методів дослідження. Це, в свою чергу, також дасть можливість визначити молекулярно-епідеміологічні особливості циркуляція ентеровірусів на території України.

Висновки

1. Молекулярно-генетичними дослідженнями доведено, що стічні води м. Києва містять віруси, які належать до роду ентеровірусів. Із 60 досліджених проб стічної води 29 виявилися позитивними на наявність вірусної РНК, що складає 48,3%.

2. Встановлено, що частота виділення ентеровірусної РНК із стічних вод залежить від сезону року. Найчастіше ентеровірусна РНК була виявлена в осінній період, найрідше — у зимові місяці.

3. Доведена недостатня ефективність очищення стічних вод від ентеровірусів в цілому. Встановлено, що частота виділення ентеровірусної РНК на етапі надходження на очистку становить 52,38%, на етапі механічної очистки (відбір із відстійників) — 58,82%, після біологічної очистки — 36,36%.

Перспективи подальших досліджень полягають у розробці науково обґрунтованих підходів до здійснення епідеміологічного та вірусологічного моніторингу поширеності ентеровірусів в об'єктах зовнішнього середовища.

ЛІТЕРАТУРА

1. Гирин В.М. Энтеровирусы в сточных водах и научное обоснование способов деконтаминации: Дис. док. мед. наук: 03.00.06, 14.00.07 / Гирин Виталий Николаевич. М., 1982. — 303 с.
2. Лаврова Д.В. Использование метода полимеразной цепной реакции в системе санитарно-вирусологического контроля загрязнения воды различных водных объектов энтеровирусами: Дис. канд. биол. наук: 14.00.07/ Лаврова Дарья Вильямовна. — М., 2005. — 131 с.
3. Применение бентонита для выявления энтеровирусом у человека и в окружающей среде. Методические рекомендации: Киев. — 1986. — 23 с.
4. Chonmaitree T. Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses / T. Chonmaitree, C. Ford, C. Sandersand, H.L. Lucia // J. Clin. Microbiol. — 1988. — Vol. — 26. — P. 2576–2580.
5. DeRoda Husman A.M. Long-Term Inactivation Study of Three Enteroviruses in Artificial Surface and Groundwaters, Using PCR and Cell Culture / A.M. De Roda Husman, W.J. Lodder,

- S.A. Rutjes [et al.] // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2009. — Vol. 75. — № 4. — P. 1050–1057.
6. *Cho H.B.* Detection of adenoviruses and enteroviruses in tap water and river water by reverse transcription multiplex PCR / H.B. Cho, S.H. Lee, J.-C. Cho, and S.-J. Kim // *Can. J. Microbiol.* — 2000. — Vol. 46. — P. 417–424
 7. *Hosoya M.* Detection of enterovirus by polymerase chain reaction and culture in cerebrospinal fluid of children with transient neurologic complications associated with acute febrile illness / Hosoya M., Honzumi K., Suzuki H // *J. Infect. Dis.* — 1997. Vol. 175 (3). — P. 700–703.
 8. *La Rosa G.* Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy / G. La Rosa, M. Pourshaban, M. Iaconelli and M. Muscillo / *Ann Ist Supers Anlità.* — 2010. — Vol. 46. — № 3. — P. 266–273.
 9. *Rodríguez R.A.* Application of PCR-Based Methods To Assess the Infectivity of Enteric Viruses in Environmental Samples / R.A. Rodríguez, I.L. Pepperand, C.P. Gerba // *Applied and Environmental Microbiology*. — Jan. 2009. — Vol. 75. — № 2. — P. 297–307.
 10. *Rodríguez R.A.* Comparison of BGM and PLC/PRC/5 Cell Lines for Total Culturable Viral Assay of Treated Sewage / R.A. Rodríguez, P.M. Gundyand, C.P. Gerba // *Applied and Environmental Microbiology*. — 2008. — Vol. 74. — № 9. — P. 2583–2587.
 11. *Schwab K.J.* Concentration and Purification of Beef Extract Mock Eluates from Water Samples for the Detection of Enteroviruses, Hepatitis A Virus, and Norwalk Virus by Reverse Transcription-PCR / K.J. Schwab, R. De Leon, M.D. Sobsey // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1995. — Vol. 61. — № 2. — P. 531–537.
 12. *Straub T.M.* Comparison of PCR and cell culture for detection of enteroviruses in sludge-amended field soil and determination of their transport / T.M. Straub, I.L. Pepperand, C.P. Gerba // *Applied and Environmental Microbiology*. — 1995. — Vol. 61. — № 5. — P. 2066–2068.
 13. *Tansuphasiri U.* Rapid Detection of Polioviruses in Environmental water Samples by One-Step Duplex RT-PCR / U. Tansuphasiri, K. Vathanophas, A/ Pariyanonda [et al] // *South east Asian J. Trop Med Public Health*. — 2000. — Vol. 31. — № 1. — P. 47–56.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ ЭНТЕРОВИРУСОВ В СТОЧНЫХ ВОДАХ

В.А. Понятовский, В.В. Бобырь, В.П. Ширококов

Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии Национального медицинского университета имени А.А. Богомольца

В работе приведены данные о результатах молекулярно-генетического исследования проб сточной воды, которые были отобраны на разных этапах очистки Бортнической станции аэрации в 2010–2011 гг. Частота выделения энтеровирусной РНК из сточных вод составляла 48,3%. Дана оценка эффективности очистных сооружений в отношении энтеровирусного загрязнения.

Ключевые слова: энтеровирусы, молекулярно-генетическое исследование, сточные воды.

USE OF THE POLYMERASE CHAIN REACTION TO DETECT ENTEROVIRUSES IN WASTEWATER

V.A. Ponyatovsky, V.V. Bobyr, V.P. Shirobokov

Department of Microbiology, Virology and Immunology National Medical University Bogomolets

The work gives information about the results of molecular genetic studies of waste water samples, that were selected at different stages of Bortnitskoy station purification from 2010–2011. Separation frequency of enterovirus RNA from wastewater was 48.3%. Also it was appraised the effectiveness of treatment facilities relatively enterovirus contamination.

Key words: enteroviruses, molecular genetic studies, waste water.