

ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

Aim. To define the role of the main factors, which influence respiratory and acute intestinal infections incidence in military units.

Materials and methods. There was studied respiratory and acute intestinal infections incidence in servicemen for the period from 1994 to 2013, and the factors that influenced on their spread among the troops.

Results. The lack of immunity to respiratory infections, specific conditions of the military service, intensive combat training, peculiarities of the epidemic process of respiratory and acute intestinal infections affect the risk of carrying and spread of these infections in military units.

Conclusions. One of the main risk factors for respiratory infections in the armed forces is the lack of immune protection in the servicemen. Active military training in the field, taking young recruits, possible deterioration of the sanitary and hygienic state of the territory and objects of vital activity of the military units are the factors that increase the epidemic risk of spread of acute intestinal infections in the troops.

Key words: risk factors, respiratory infections, acute intestinal infections, conditions of military service.

Відомості про автора:

Півник В.М. – д. м. н., доцент, доцент кафедри організації медичного забезпечення збройних сил Української військово-медичної академії. Адреса: Київ, вул. Мельникова, 24. тел.: (044) 243-15-24.

УДК 578.822:57.089.83:578.2

© КОЛЕКТИВ АВТОРІВ, 2015

Ю.О.Соломко, О.П.Трохименко, І.В.Дзюблик

КУЛЬТИВУВАННЯ БОКАВІРУСУ ЛЮДИНИ ПЕРШОГО ТИПУ В УМОВАХ IN VITRO В ДИФЕРЕНЦІЙОВАНИХ ЕПІТЕЛІАПЛЬНИХ КЛІТИНАХ

Національна медична академія післядипломної освіти
імені П.Л.Шупика

Вступ. Бокавірус людини (HBoV) - це новий патогенний вірус, який був відкритий у 2005 році в Швеції у зразках клінічного матеріалу хворих на пневмонію та ідентифікований методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Проблеми взаємодії цих вірусів та чутливої клітини і наслідків цієї взаємодії, ще не досить зрозумілі. Розробка моделі бокавірусної інфекції людини в культурі клітин в умовах in vitro, все ще залишається актуальною проблемою вірусології.

Мета. Розробити модель для культивування бокавірусу людини першого типу в умовах in vitro та оцінити її ефективність методом полімеразної ланцюгової реакції.

Результати. Розроблено клітинну модель для культивування бокавірусу людини першого типу в умовах in vitro та проведена оцінка її ефективності методом полімеразної ланцюгової реакції. Показана здатність цього вірусу до репродукції в культурі клітин тестикул поросят. Представлена модель бокавірусної інфекції є перспективною щодо вивчення особливостей взаємодії бокавірусів з клітиною-господаря, удосконалення лабораторної діагностики бокавірусної інфекції із застосуванням класичних вірусологічних методів досліджень, впровадження її в систему доклінічних випробувань протівірусних хіміопрепаратів та дезінфектантів.

Ключові слова: бокавіруси людини, бокавірусна інфекція, культивування бокавірусів, модель бокавірусної інфекції, полімеразна ланцюгова реакція, ідентифікація вірусів.

Бокавірус людини (HBoV) - це новий патогенний вірус, який був відкритий у 2005 році в Швеції у зразках клінічного матеріалу хворих на пневмонію та ідентифікований методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). За період з 2009 -2010 рр. були виділені та охарактеризовані ще три типи бокавірусів. На часі описано 4 типи бокавірусів людини, які відповідно позначаються як HBoV1-4. Встановлено, що бокавіруси людини першого типу (HBoV-1) є етіологічними агентами гострих респіраторних вірусних інфекцій (ГРВІ) у дітей, а бокавіруси 2, 3 та 4 типів (HBoV-2-4) можуть викликати ураження шлунково-кишкового тракту, що супроводжується діарейним синдромом. Нові повідомлення про виявлення HBoV в матеріалах хворих людей різних вікових груп на ГРВІ або гострі кишкові інфекції (ГКІ) постійно надходять із Франції, Австралії, Японії, Італії, Ізраїлю, Іспанії, Німеччини, Індії та Росії [1]. Є перші повідомлення про виявлення та ідентифікацію HBoV-1 в клінічному матеріалі дітей з ГРВІ та загостренням бронхіальної астми в Україні [2,3]. За сучасною класифікацією бокавіруси людини віднесені до родини Parvoviridae, підродини Parvovirinae, роду Bocavirus та найбільш подібні до парвовірусу великої рогатої худоби (BPRV) та парвовірусу собак (CnMV). Бокавіруси людини посіли друге місце серед парвовірусів, патогенних для людини. Перше місце залишилося за парвовірусом B19, збудником інфекційної еритеми у дітей [4]. Через те, що HBoV були ідентифіковані та визнані як нові збудники лише нещодавно, багато питань, пов'язаних з цими вірусами, із взаємодією вірусу та чутливої клітини і наслідків цієї взаємодії, ще не досить зрозумілі. Вивченню тонких механізмів патогенезу на рівні клітини та біології збудника заважає відсутність культури клітин, чутливої до HBoV, пермісивної системи, в якій би бокавірус формував гостру продуктивну інфекцію.

Перші спроби розробити модель бокавірусної інфекції в умовах *in vitro* із застосуванням первинно-трипсинізованих та перещеплювальних культур клітин були зроблені вже у 2009 році та продовжуються дотепер [5, 6]. Не зважаючи на отримані нові знання про HBoV, розробка моделі бокавірусної інфекції людини в культурі клітин в умовах *in vitro*, все ще залишається актуальною проблемою вірусології.

Мета. Розробити модель для культивування бокавірусу людини першого типу в умовах *in vitro* та оцінити її ефективність методом полімеразної ланцюгової реакції.

Матеріали і методи. В роботі використовували 45 мазків з носової порожнини від дітей віком від 1 до 4 років, хворих на ГРВІ, госпіталізованих до стаціонарних відділень Львівської дитячої міської клінічної лікарні. Всі матеріали відбирались у жовтні 2014 року на 2-4 день від початку захворювання. Клінічний матеріал відбирався сухим стерильним велюровим тампоном (COPAN, Італія), вміщувався у вірусне транспортне середовище (COPAN, Італія) і зберігався при -20 °С до моменту дослідження. Для виділення HBoV1 в культурі клітин використовувались тільки ті клінічні проби, в яких методом ПЛР було ідентифіковано ДНК збудника. Ці позитивні зразки перед внесенням в культуру клітин розморожували, розбавляли у 5 разів середовищем RPMI-1640 для культур клітин без сироватки, деконтамінували фільтруванням через міліпорові фільтри з діаметром пор 0,22 мкм, аліквотували по 200 мкл для подальшого дослідження. Для створення моделі HBoV1- інфекції використовували перещеплювальну культуру

ІНФЕКЦІЙНІ ХВОРОБИ

клітин аденокарциноми гортані людини (HEP-2), трансформовані клітини кісткового мозку людини (L-41), одержані із банку клітинних ліній Інституту експериментальної патології, онкології і радіології імені Р.Є.Кавецького НАН України, а також перещеплювальну культуру клітин тестикул поросят (ПТП), одержану із інституту ветеринарної медицини НААН України. Поточне пасажування клітин HEP-2, L-41, ПТП проводилось в стаціонарних умовах у полістиролових матрасах Sarstedt (Німеччина), у живильному середовищі RPMI-1640 з додаванням сироватки крові ембріонів корів (Sigma, США) до 5 % та антибіотиків: пеніциліну і стрептоміцину (Артеріум, Україна) до кінцевої концентрації 100 Од/мл і 100 мкг/мл відповідно [7]. Зняття клітин з поверхні росту здійснювалось розчином Версену БіоТестМед (Україна). Виявлення та ідентифікацію HBoV1 в клінічному та культуральному матеріалі проводили методом ПЛР у мультиплексному форматі із застосуванням наборів реагентів АмпліСенс, Росія. Виділення ДНК проводилось при використанні наборів реагентів РИБО-преп. Ампліфікація з наступною детекцією ампліфікатів методом гібридаційно-флюоресцентної детекції в реальному часі проводилось з використанням набору ГРВІ-скрин-FL» (Росія) на приладі Rotor Gene 6000 виробництва Corbett Research, Австралія.

Результати досліджень та їх обговорення. Встановлено, що із 45 досліджених методом ПЛР у мультиплексному форматі клінічних проб від дітей з ГРВІ, в чотирьох зразках (№№3, 5, 36, і 37) було виявлено та ідентифіковано HBoV1. Відповідно ці 4 позитивні зразкинами використовували для створення моделі бокавірусної інфекції людини в умовах *in vitro*. При моделюванні бокавірусної інфекції людини використовували дві гомологічні перещеплювальні клітинні лінії людини HEP-2, L-41 і гетерологічну – диференційовані епітеліальні клітини свині ПТП. Клітини культур знімали з поверхні росту розчином Версена, суспендували у ростовому живильному середовищі в оптимальних для кожної з них посівних концентраціях 350-400 тис. кл/мл, вносили у лунки культурального планшету по 0,1 мл і культивували при 37оС впродовж 24 годин в атмосфері 5 % CO₂. Якість сформованих моношарів клітин контролювали під інвертованим мікроскопом. Кожним зразком підготовленого клінічного матеріалу, об'ємі 0,01-0,02 мл, інфікували по 6 клітинних моношарів з наступною адсорбцією вірусу впродовж 1 години при кімнатній температурі. Після адсорбції в кожну лунку додатково вносили підтримуюче середовище на основі RPMI-1640 без сироватки об'ємом 0,09-0,08 мл відповідно. Інфіковані культури інкубували при 37оС в атмосфері 5 % CO₂ впродовж 72 годин. Кожні 24 години проводили макро- і мікроскопічний контроль інфікованих клітинних моношарів та реєстрували наявність ЦПД. Через 72 години на кожному пасажі культуральна рідина із лунок кожної культури відбирали і досліджували методом ПЛР у мультиплексному форматі та визначали інфекційний титр HBoV1.

Загалом було проведено по три пасажі кожного зразка в трьох типах культур клітин з наступною ідентифікацією ДНК HBoV1 методом ПЛР. При моделюванні бокавірусної інфекції ЦПД, зумовлене HBoV1, виявляли тільки в культурі клітин ПТП на всіх трьох пасажах і не виявляли в жодному випадку в культурах клітин людини L-41 і HEP-2. Цитопатична дія HBoV1 в культурі клітин ПТП характеризувалась порушенням цілісності клітинного моношару, появою осередків часткової дегенерації клітин спочатку на периферії

моношару з наступним залученням у цей процес всіх клітин та їх поступовим відшаруванням від поверхні росту. Характер ЦПД виявився однаковим у всіх досліджених моношарах культури ПТП на трьох пасажах, при інфікуванні клітин відібраними зразками клінічного матеріалу (проби №№3, 5, 36, і 37). Слід зазначити, що при оцінці ефективності створеної моделі НВоV1 в культурі клітин ПТП з наступною ідентифікацією збудника методом ПЛР в культуральній рідні після трьох пасажувань всі проби виявились позитивними.

В подальшому НВоV1 культивувався в культурі клітин ПТП з метою накопиченням вірусу та визначення його інфекційного титру. Встановлено, що його інфекційний титр визначався в межах 2,0-2,5 Іg ТЦД50/0,1 мл. Результати проведених експериментальних досліджень підтверджують здатність НВоV1 до репродукції в культурі клітин ПТП з формуванням гострої продуктивної інфекції. Представлена модель бокавірусної інфекції має певні перспективи щодо вивчення особливостей взаємодії бокавірусів з клітиною-господаря, удосконалення лабораторної діагностики бокавірусної інфекції із застосуванням класичних вірусологічних методів досліджень, впровадження її в систему доклінічних випробувань противірусних хіміопрепаратів та дезінфектантів.

Література

1. Обертинська О.В. Бокавіруси та захворювання, що вони викликають: структура та систематика збудника, епідеміологія, клінічні прояви, особливості лікування та методи діагностики / О.В. Обертинська., Ю.О. Бойко// Збірник НМАПО. – Київ. – 2014. – К. 23 (3) – С.- 626 -641.

2. Руденко С.М. Нові респіраторні віруси у дітей молодшого віку з бронхообструктивним синдромом/ С.М. Руденко, О.В. Обертинська, Ю.О. Бойко, О.М. Охотнікова, І.В. Дзюблик // Ж. Здоровье ребёнка. – 2014. - №4. – (5). –С. 84-88.

3. Охотникова Е.Н. Острые респираторные вирусные инфекции у детей и их роль в развитии вирус-индуцированной бронхиальной астмы/ Е.Н. Охотникова, И.В. Дзюблик, С.Н. Руденко.// Ж. Педиатрия. Восточная Европа. – 2013. - №3. –(03). – 118 – 127С.

4. Linder J. Human Bocavirus – a novel parvovirus. / J.Linder, S.Modrow// Intervirology. – 2008. – Vol. 51 (2). – P. 116-22.

5. McKillen John. Isolation in cell cultures and initial characterisation of two novel bocavirus species from swine in Northern Ireland / John McKillen, Francis McNeilly, Catherine Duffy, Michael McMenamy, Irene McNair, Bernt Hjertner, Andrena Millar, Karen McKay, Paula Lagan, Brian Adair, Gordon Allan Veterinary// Microbiology.-2011.- №152.-P. 39–45.

6. Dijkman Ronald. Human bocavirus can be cultured in differentiated human airway epithelial cells /Ronald Dijkman, Sylvie M.Koekkoek, Richard Molenkamp, Oliver Schildgen, Liavander Hoe // J Virol. -2009.- 83 (15). – P. 7739-7748. (<http://dare.uva.nl>) (pagedate: 2014-11-22).

7. Дзюблик І.В. Культура клітин у медичній вірусології / І.В. Дзюблик, О.П. Трохименко, С.О. Соловійов // Навчально-методичний посібник.- Київ.-2015.-144 с.

Ю.А. Соломко, Е.П. Трохименко, І.В. Дзюблик

Культивирование бокавируса человека первого типа в условиях *in vitro* в дифференцированных эпителиальных клетках

Национальная медицинская академия последипломного образования имени П.Л.Шупика

Вступление. Бокавирус человека 1 типа (HBoV-1) - это новый патогенный вирус, впервые обнаружен в 2005 году в Швеции в образцах клинического материала от больных пневмонией и идентифицированный методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). Проблемы взаимодействия HBoV-1 и чувствительной клетки, а также результаты этого взаимодействия, еще не достаточно изучены. Разработка модели бокавирусной инфекции человека в культуре клеток в условиях *in vitro*, сегодня является актуальной проблемой вирусологии.

Цель. Разработать модель для культивирования бокавируса человека первого типа в условиях *in vitro* и оценить ее эффективность методом полимеразной цепной реакции.

Результаты. Разработана клеточную модель для культивирования бокавируса человека первого типа в условиях *in vitro* и проведена оценка ее эффективности методом полимеразной цепной реакции. Показана способность этого вируса к репродукции в субстратзависимой культуре клеток перевиваемых тестикул поросят. Представленная модель бокавирусной инфекции может быть перспективной по изучению особенностей взаимодействия бокавируса с клеткой-хозяина, совершенствование лабораторной диагностики бокавирусной инфекции с применением классических вирусологических методов исследований, внедрения ее в систему доклинических испытаний противовирусных химиопрепаратов и дезинфектантов.

Ключевые слова: бокавирусы человека, бокавирусная инфекция, культивирование бокавирусов, модель бокавирусной инфекции, перевиваемая субстрат-зависимая культура клеток тестикул поросят, полимеразная цепная реакция, идентификация бокавирусов.

Yu. Solomko, E.P. Trokhimenko, I.V. Dzyublik

Human bocavirus 1 type can be culture in differentiated epithelial cells

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education

Introduction. Human Bocavirus 1 type (HBoV) was discovered in 2005 using a molecular virus screening technique. It is often found in respiratory samples and is a likely cause for respiratory diseases in children with pneumoniae. The interaction problems of this virus with host-cell and consequences of this co-operation, clear yet not enough.

Aim. Development of model of Bocavirus infection of sensitive human cell culture of cages in the conditions of *in vitro*, still it remains the issue of the day of virology.

Results. Model of culturing of a Human Bocavirus 1 type *in vitro* was developed and its efficiency was estimated by polymerase chain reaction method. Ability of Human Bocavirus 1 type for a reproduction at the PTP cell-culture was confirmed/ The presented model of a Bocavirus infection is perspective at the studying the features Bocavirus infection with a cell-culture. Laboratory diagnostic of Bocavirus infection was improved with a classic virological methods and was introduced at the system of a preclinical researches.

Key words: Human Bocavirus, Bocavirus infection, modeling of the rumar Bocavirus infection, cells culture piglets of immortalized testicular, polymerase chain reaction, authentication viruses.

Відомості про авторів:

Соломко Юлія Олександрівна – очний аспірант кафедри вірусології НМАПО імені П.Л. Шупика, Київ., вул. Дорогожицька, 9, тел.: (044) 205 49 88.

Трохименко Олена Петрівна – к.біол. н., с. н. с. групи ЦНДЛ кафедри вірусології НМАПО імені П.Л. Шупика, Київ., вул. Дорогожицька, 9, тел.: (044) 205 49 88.

Дзюблик Ірина Володимирівна – д. мед. н., професор, завідувач кафедри вірусології НМАПО імені П.Л. Шупика, Київ., вул. Дорогожицька, 9, тел.: (044) 205 49 88.

УДК 615.453.6:615.246.8

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2015

Фарес Рами, Л.А. Бобрицкая, Т.В. Зборовская

ОБОСНОВАНИЕ ВЫБОРА ЭФФЕКТИВНОГО ПРЕПАРАТА ПРИ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ИНФЕКЦИЯХ

Национальный фармацевтический университет

Введение. Проблема лечения острых кишечных инфекций, для большинства которых характерна инфекционная диарея, является приоритетным направлением в здравоохранении.

Цель. Определение эффективного лекарственного препарата на фармацевтическом рынке антимикробных препаратов при острых кишечных инфекциях, вызывающих диарею.

Материалы и методы. Для изучения назначений врачей использовали данные проекта «RxTest - Мониторинг назначений лекарственных средств», амбулаторные карты.

Результаты. Согласно анализу назначений врачей для лечения инфекционной диареи, лидером являются препараты на основе нифуроксазида, как лекарственного средства №1 на фармацевтическом рынке Украины для лечения кишечных инфекций. Нифуроксазид эффективен в борьбе с бактериальными возбудителями острых кишечных инфекций и при этом не вызывает дисбактериоза, развития резистентных штаммов патогенных микроорганизмов.

Выводы. Согласно назначениям врачей для лечения инфекционной диареи лидирующие позиции занимают препараты на основе нифуроксазида. Для эффективного лечения кишечных инфекций целесообразно применять лекарственные комбинации с включением нифуроксазида или создавать комбинированные препараты с широким спектром действия.

Ключевые слова: препарат нифуроксазид, обоснование выбора, острые кишечные инфекции, эффективность.

Вступлення. Острые кишечные инфекции (ОКИ) считаются одними из самых массовых инфекционных заболеваний, поэтому вопросы рациональной этиотропной терапии ОКИ являются приоритетным направлением в здравоохранении. Для большинства ОКИ характерна диарея, которая вызывается чаще всего бактериальной или вирусной инфекцией [1]. Антимикробные препараты (АМП) занимают важное место в терапии ОКИ и назначаются только при бактериальной природе заболевания, инвазивном типе диареи [1, 2, 4]. Между тем нерациональный их выбор в амбулаторно-поликлинических условиях способствует росту резистентности