

6. Матвійчук В. В., Квашина Л. В., Родіонов В. П. Імунокорекція негативних впливів мікрофлори носоглотки на імунорезистентність здорових дітей молодшого віку // Перинатологія і педіатрія. – 2009. – №3(39). – С. 74–77.
7. Недельская С.Н., Бессикало Т.Г., Пахольчук О.П. Сравнительная характеристика проявлений сезонных респираторных симптомов у детей в Запорожской области // Запорож. мед. журн. – 2009. – № 4. – С. 34–36.
8. Стельмахівська В.П., Березань В.І. Здоров'я дітей та підлітків і навколишнє середовище // Проблеми екології та медицини. – 2008. – № 1-2. – С. 33–36.
9. Саїдов М.З., Давудов Х.Ш. Экспрессия TLR в носовых полипах и на клетках периферической крови у больных полипозным риносинуситом // Иммунология. – 2008. – № 5. – С. 272–278.
10. Сквіва Л. М., Позур В. В. Реакції за участю Toll-like-рецепторів у протективному імунітеті та за патологічних станів // Укр. біохім. журн. – 2008. – 80. – № 3. – С. 5–20.
11. Хаїтов Р.М., Пащенко М.В., Пинегин Б.В. Роль паттернраспознающих рецепторов во врожденном и адаптивном иммунитете // Иммунология. – 2009. – № 1. – С. 66–76.
12. Хорева М.В., Ковальчук Л.В., Варивода А.С., Грачева Л.А. Подходы к оценке рецепторов врожденного иммунитета // Российский иммунологический журнал. – 2008. – 2. – № 2-3. – С. 151–155.
13. Mertz D., Frei R., Periat N. Exclusive *Staphylococcus aureus* – throat carriage: at-risk populations// Arch. Intern. Med. – 2009. – 169. – P.172–178.
14. Michael O. *Staphylococcus epidermidis* – the “accidental” pathogen // Nat. Rev. Microbiol. – 2009. – N 7. – P. 555–567.
15. Naglik J.R., Moyes D. Epithelial cell innate response to *Candida albicans* // Adv. Dent. Res. – 2011. – N 23. – P. 50–55.
16. Sakwinska O., Blanc D. S., Lazor-Blanchet C., Moreillon M., Giddey M., Moreillon P. Ecological temporal stability of *Staphylococcus aureus* nasal carriage // J. Clin. Microbiol. – 2010. – 48. – P. 2724–2728.

Отримано 10.03.2013

УДК 628.314:[578.347+578.835.11

В.А. Понятовський, В.В. Бобир, В.П. Широбоков

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, кафедра мікробіології, вірусології та імунології, проспект Перемоги 34, Київ, 01601, Україна

ОЧИЩЕННЯ СТИЧНИХ ВОД ВІД ЕНТЕРОВІРУСІВ ТА БАКТЕРІОФАГІВ НА СПОРУДАХ БОРТНИЦЬКОЇ СТАНЦІЇ АЕРАЦІЇ

У роботі наведено дані щодо результатів вірусологічного та молекулярно-генетичного дослідження проб стічної води за 2010-2011 рр. Дано оцінку ефективності роботи очисних споруд Бортницької станції аерації відносно вірусних агентів. Доведено ефективність застосування ПЛР при дослідженні проб стічної води, що сприяє об'єктивнішій оцінці ентеровірусного забруднення об'єктів зовнішнього середовища.

Ключові слова: ентеровіруси, ЗТ-ПЛР, очисні споруди.

Науково-технічний прогрес призводить до залучення людиною у процеси матеріального забезпечення все більших обсягів природних ресурсів. Одним із головних таких ресурсів є вода, потреба у якій постійно зростає, виникає її дефіцит та необхідність повторного використання. Питання щодо якості води є актуальним для більшості країн світу, зокрема для України. Інтенсивний розвиток науки дозволив відкрити нові інфекційні агенти, які можуть передаватися через водні середовища, тим самим поширюватися на значні відстані та викликати як спорадичні випадки, так і спалахи захворювання.

На сьогоднішній день відомо більше 100 патогенних бактерій, вірусів та найпростіших, що здатні доволі тривалий час зберігати свої вірулентні властивості у водних об'єктах і за певних умов призводити до виникнення інфекційних хвороб [1, 9]. Серед вірусних інфекцій особливе місце посідають ентеровіруси. Найбільша кількість ентеровірусів знаходиться у стічних водах, де концентрація та видовий склад цих вірусів коливаються у значних межах

© В.А. Понятовський, В.В. Бобир, В.П. Широбоков, 2014

[9, 11, 12]. Саме тому дослідження даного об'єкту є найбільш інформативним, а ймовірність виділення ентеровірусів за допомогою рутинних методів найвища. Рядом дослідників було показано, що існуючі схеми очистки стічних вод не є достатньо ефективними відносно ентеровірусів [2, 5, 3]. Це сприяє їх подальшому потраплянню у воду поверхневих водойм та водопровідну мережу, що певною мірою зумовлює безперервність епідемічного процесу. Даний факт підтверджують роботи останніх років із використанням сучасних молекулярно-генетичних методів [9, 10].

Метою даної роботи була оцінка роботи очисних споруд Бортницької станції аерації у вірусологічному відношенні на сучасному етапі.

Матеріали і методи. Нами проведено дослідження 63 проб стічної води, що були відібрані протягом календарного року (з червня 2010 р. по червень 2011 р.) після різних етапів очистки на Бортницькій станції аерації (м. Київ, Україна).

Концентрування ентеровірусів із проб стічної води проводили за допомогою природного глинистого матеріалу бентоніту, який переведений в дрібнодисперсну гелеву форму [6].

РНК ентеровірусів виділяли із концентратів шляхом поєднання двох методик – гуанідинтіоціанат-хлороформ-фенольної екстракції та методу сорбції РНК на частинках силікагелю за Boom et al. [4]. З цією метою використовували комерційні набори «Рибо Сорб» та «Рибо Золь С» («Амплі Сенс», Росія) згідно з інструкцією виробника. Реакцію зворотної транскрипції проводили одразу після виділення РНК, у зв'язку з поганою стійкістю останньої в очищеній формі. ДНК, комплементарну вірусній РНК, одержували за допомогою ферменту ревертази (M-MLV – зворотна транскриптаза) з набору «Реверта-L-100» («Амплі Сенс», Росія) згідно з інструкцією 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 у термостаті Perkin Elmer (США).

Ампліфікацію вірусної кДНК проводили в об'ємі 25 мкл, на багатоканальному ампліфікаторі з активним регулюванням «Gene Amp PCR System 2400» (США) за звичайною методикою. В реакції використовували реагенти «Амплі Сенс® Enterovirus-EPh».

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 М трис-ацетат, 0,002 М ЕДТА), що містив 0,5 мкг/мл етидія броміду.

Для виділення цитопатогених вірусних агентів із концентратів було використано наступні перещеплювані культури клітин:

HEp-2 (Circinnati) – лінія клітин, отримана з епідермоїдної карциноми людини;

RD — культура клітин, що походить із рабдоміосаркоми людини.

Перещеплювані клітинні культури вирощували за загальноприйнятою методикою [7]. Середовища росту містили 10 % ембріональної сироватки або сироватки новонароджених телят («Sigma»). Роботу з виділення ентеровірусів проводили відповідно до методичних вказівок «Санітарно-вірусологічний контроль водних об'єктів» (Наказ № 284 від 30.05.2007) та «Рекомендації по надзору за вирусом полиомиелита в окружающей среде» (Женева: ВОЗ, 2003).

Визначення F-специфічних РНК-бактеріофагів кишкової палички (фаги MS₂) здійснювали методом агарових шарів за Грація відповідно до методичних вказівок «Санітарно-вірусологічний контроль водних об'єктів» (Наказ № 284 від 30.05.2007).

Результати та їх обговорення. Досліджувалися проби стічної води, які відбиралися одночасно на окремих очисних спорудах Бортницької станції аерації:

вхідна вода, при надходженні на очистку;

після кінцевої механічної очистки (первинні відстійники);

очищена вода із зливного каналу (після вторинних відстійників).

Для реалізації поставленого завдання нами була проведена оцінка за такими показниками – наявність ентеровірусного геному, бактеріофагів та вірусних цитопатогених агентів.

Загалом із 63 досліджених проб 31 виявилася позитивною на наявність вірусної РНК, що складає 49,21 % (табл. 1). Динаміка одержання позитивних результатів ампліфікації характеризувалася нерівномірністю та залежала від етапу очистки. Так у пробах стічної води, що були відібрані при надходженні на очистку, частота виділення становила 50 %, на етапі

механічної очистки (відбір із відстійників) 57,14 %, після повної очистки 40 % (відбір із зливного каналу) (рис. 1).

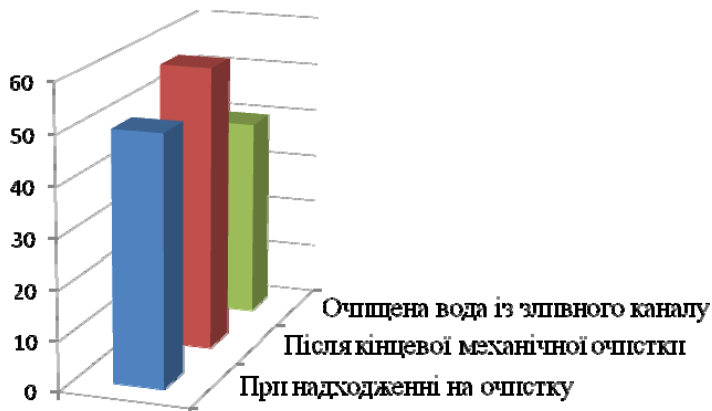


Рис. 1. Частота виділення вірусної РНК на різних етапах очистки

Таблиця 1

Виділення ентеровірусної РНК із стічних вод

Місце забору проб	Кількість досліджених проб	Кількість проб, що виявилися позитивними на наявність ентеровірусної РНК	
		абс.	%
При надходженні на очисні споруди	22	11	50
З відстійників (механічна очистка)	21	12	57,14
Після очистки	20	8	40

Використання класичного культурального методу дало змогу встановити, що при виділенні інфекційних агентів спостерігається та сама закономірність, що й при виділенні вірусної РНК (табл. 2). Частота виділення інфекційних агентів із нативної стічної води становила 36,36 %, після механічної очистки частота виділення сягала 52,38 %, на виході 20 % (рис. 2).

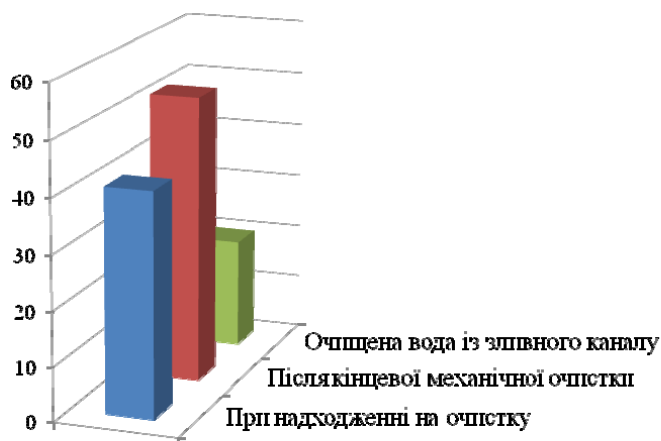


Рис. 2. Частота виділення цитопатогенних агентів на різних етапах очистки

Дана закономірність спостерігалася і при встановленні концентрації виділених вірусів. У пробах вхідної води титр ентеровірусів складав 750–1500 БУО/л, після механічної очистки 1000–3000 БУО/л, на виході 500–875 БУО/л (рис. 3).

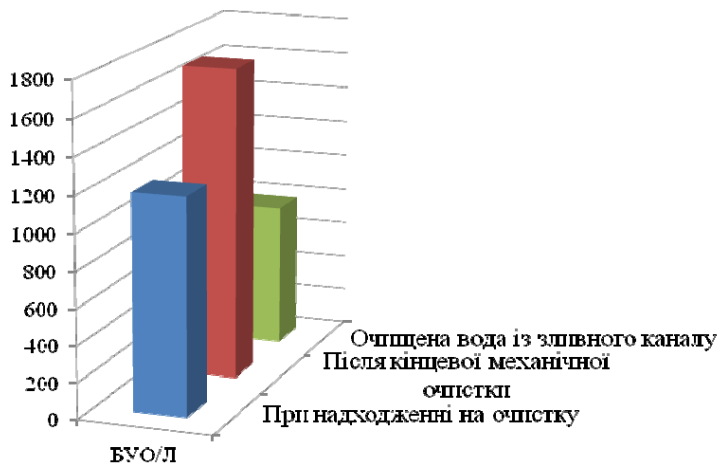


Рис. 3. Концентрація ентеровірусів на етапах очистки БСА

При проведенні санітарно-вірусологічного дослідження міських стічних вод нам вдалося ізолювати та закріпити в наступних пасажах 23 штами ентеровірусів. Всі вони були піддані серологічній ідентифікації в реакції віруснейтралізації. Вдалося протипувати 17 виділених штамів, 6 штамів не нейтралізувалися набором використаних діагностичних сироваток та були віднесені до групи не типованих ентеровірусів. Всі ідентифіковані ентеровіруси було віднесено до 9 серотипів. Найбільш численну групу склали віруси Коксакі В (8 штамів), на другому місці віруси ЕСНО (7 штамів) та не типовані ентеровіруси (6 штамів), на третьому – поліовіруси (2 штами).

Наведені дані щодо виділення інфекційних агентів підтверджують загальну закономірність, що була встановлена рядом дослідників (В.М. Гирін, Г.А. Багдасарян, В.А. Казанцева, Л.В. Григор'єва), про те, що на спорудах первинної (механічної) очистки не лише не відбувається звільнення стічних вод від вірусних часток, а навпаки, збільшується частота виділення інфекційних агентів. Це явище можна пояснити роздробленням великих конгломератів, що, в свою чергу, призводить до виходу з них вірусних часток. Більш ефективним виявився етап біологічної очистки. Так в пробах стічної води, що були відібрані в зливному каналі, після повної біологічної очистки частота виділення ентеровірусного геному склала 40 %, інфекційних вірусів – 20 %. Слід зазначити, що ефективність даного етапу загалом залишається досить низькою (зменшення частоти виділення геному лише на 17,14 %, та на 32,38 % вірусних агентів порівняно з попереднім етапом). Основним механізмом, на думку багатьох авторів, завдяки якому відбувається зниження концентрації вірусів при біологічній очистці, є їх адсорбція на частинках активного мулу, де надалі відбувається руйнування капсули та пошкодження вірусного геному.

Таблиця 2

Виділення цитопатогених агентів із стічних вод

Місце забору проб	Кількість досліджених проб	Кількість проб, що виявилися позитивними на наявність інфекційних агентів	
		абс.	%
При надходженні на очисні споруди	22	8	36,36
З відстійників (механічна очистка)	21	11	52,38
Після очистки	20	4	20

При дослідженні проб стічної води було встановлено, що кількість позитивних зразків на наявність ентеровірусної РНК значно вища, чим позитивних проб відносно цитопатогених ентеровірусів. Цю різницю можна пояснити присутністю нецитолітичних ентеровірусів, які не проявляють ЦПД на культурі клітин, а також тим, що інактивація вірусів у стічних водах відбувається в основному внаслідок вивільнення нуклеїнової кислоти з подальшою деградацією геному. Якщо інактивація вірусів відбувається із-за змін в капсулі, то дані ЗТ-ПДП та

культурального аналізу можуть не мати повної кореляції [8], що спостерігалось і у нашому випадку.

Паралельно із цитопатогеними агентами досліджували наявність бактеріофагів MS₂. Показано, що при надходженні стічної води на очистку та після повної механічної очистки бактеріофаги виділялися в усіх досліджуваних зразках. Чіткої закономірності збільшення титру бактеріофагів при механічній очистці не спостерігалось, хоча в більшості випадків дане явище підтверджувалося (рис. 4). Це можна пояснити тим, що десорбованні ентеробактерії, які є господарями для бактеріофагів, після дезагрегації в первинних відстійниках знову сорбуються завислими частинками та випадають в осад. У пробах стічної води, що надходила на очистку, титр бактеріофагів складав від $5,5 \times 10^4$ до $4,02 \times 10^5$ БУО/л. Після механічної очистки від $2,5 \times 10^3$ до $3,94 \times 10^5$ БУО/л залежно від сезону року.

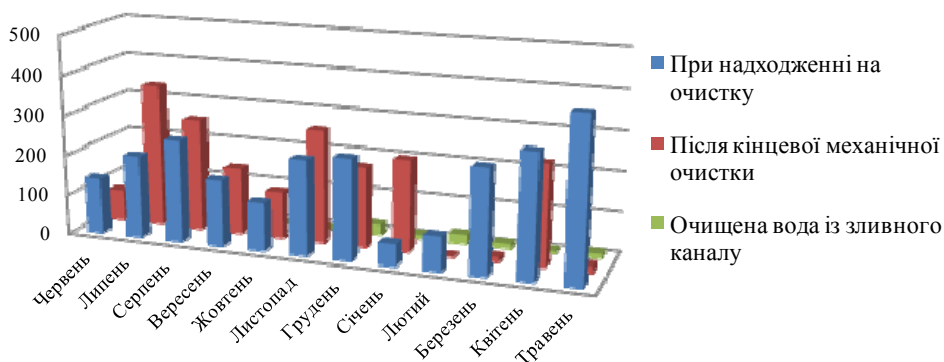


Рис. 4. Частота виділення бактеріофагу MS₂ на різних етапах очистки

Відповідно до СанПиН 4630-88 «Охрана поверхностных вод от загрязнения», Москва 1988, допустимий рівень коліфагів в очищеній стічній воді, яку дозволено скидати у водоймища, повинен не перевищувати 1000 бляшкоутворюючих одиниць в одному літрі (БУО/л). Результати наших досліджень дали змогу встановити, що 66,7 % проб стічної води, які були відібрані із зливного каналу при скиді очищених стічних вод, містили F-специфічні РНК-бактеріофаги. Концентрація фагів у цих зразках коливалася в межах від 1×10^3 до $24,5 \times 10^3$ БУО/л, що свідчить про недостатню ефективність очисних споруд відносно бактеріофагів MS₂.

Вищенаведені результати досліджень збігаються з даними В.М. Гиріна [3], що вивчав ефективність очисних споруд Бортницької станції аерації у вірусному відношенні у 70-х роках. Ним також було встановлено збільшення титру та частоту виділення ентеровірусів після механічної очистки. Було показано, що ефективність очистки стічної води на міській станції аерації складала в середньому 70–73 %. У вхідній нативній воді кількість ентеровірусів складала 240 ± 40 БУО/л, після механічної очистки 800 ± 86 БУО/л та на виході 65 ± 24 БУО/л.

Висновки. У роботі було здійснено комплексне вивчення контамінації стічних вод ентеровірусами, бактеріофагами MS₂ та встановлено закономірності їх видалення на етапах очистки БСА. Одержанні результати дають змогу зробити наступні висновки:

Доведена недостатня ефективність біологічного методу очистки стічних вод від ентеровірусів в цілому. Методи механічної та біологічної очистки, що використовуються на сьогоднішній день, не дозволяють повністю видалити із стічних вод ентеровіруси та бактеріофаги (у пробах стічної води, що були відібрані в зливному каналі після повної біологічної очистки, частота виділення ентеровірусного геному складала 40 %, вірусів – 20 %, а титр бактеріофагів коливалася в межах від 1×10^3 до $24,5 \times 10^3$ БУО/л).

Використання сучасних молекулярно-генетичних методів детекції ентеровірусів важливе для вірусологічного моніторингу об'єктів зовнішнього середовища, і дозволяє об'єктивніше оцінювати поширеність ентеровірусів на певній території.

Висока частота ізоляції ентеровірусів та їх геному із стічної води свідчить про інтенсивність циркуляції даних агентів серед населення м. Києва та визначає необхідність вдосконалення епідеміологічного нагляду за ентеровірусними інфекціями.

ОЧИСТКА СТОЧНЫХ ВОД ОТ ЭНТЕРОВИРУСОВ И БАКТЕРИОФАГОВ НА СООРУЖЕНИЯХ БОРТНИЧЕСКОЙ СТАНЦИИ АЭРАЦИИ

Резюме

В работе приведены данные о результатах вирусологического и молекулярно-генетического исследования проб сточной воды за 2010-2011 гг. Дана оценка эффективности работы очистных сооружений Бортнической станции аэрации относительно вирусных агентов. Доказана эффективность применения ПЦР при исследовании проб сточной воды, что способствует более объективной оценке энтеровирусного загрязнения объектов внешней среды.

Ключевые слова: энтеровирусы, ОТ-ПЦР, очистные сооружения.

V.A. Ponyatovsky, V.V. Bobir, V.P. Shirobokov

*Bogomolets National Medical University,
Department of Microbiology, Virology and Immunology, Peremohy Avenue 34, Kyiv, 01601, Ukraine*

ENTEROVIRUSES AND BACTERIOPHAGES ELIMINATION FROM WASTEWATER ON BUILDINGS OF BORTNICHY AERATION STATION

S u m m a r y

The research contains data about virologic and molecular-genetic evaluation of sewage samples, obtained in 2010-2011. The efficacy of Bortnichy aeration station in an eliminating of viral agents has been evaluated. An efficiency of PCR as a method of sewage sample analysis has been proved, that results an enhanced evaluation of enteroviruses contamination in different environmental objects.

Keywords: enterovirus RT-PCR, treatment plants.

1. Багдасарян Г.А., Ловцевич Е.Л. Индикация и инактивация кишечных вирусов в объектах внешней среды. – М.: Медицина, 1976. – С. 155.
2. Бондаренко В.И., Гирин В.Н., Григорьева Л.В. и др. Экология энтеровирусов. – К.: Здоров'я, 1988. – С. 168.
3. Гирин В.Н. Энтеровирусы в сточных водах и научное обоснование способов деконтаминации: Дисс. на соиск. д-ра мед. наук. – К. 1982 – С. 303.
4. Лаврова Д.В. Использование метода полимеразной цепной реакции в системе санитарно-вирусологического контроля загрязнения воды различных водных объектов энтеровирусами: Дисс. на соиск. канд. мед. наук. – Москва, 2005. – С. 131.
5. Попова Т.А., Овечкина И.Н., Зуева Н.Н., Лобковский А.Г. Результаты мониторинга за циркуляцией энтеровирусов среди населения и в окружающей среде Тульской области за 10 лет (1985-1994) // Журнал микробиологии. – 1997. – № 1. – С. 35-39.
6. Применение бентонита для выявления энтеровирусов у человека и во внешней среде // Методические рекомендации. – Киев, 1986. – С. 24.
7. Руководство по вирусологическим исследованиям полиомиелита // ВОЗ. – Женева, 1998. – С. 114.
8. Carlos E. Enriquez, Morteza Abbaszadegan, Ian L. Pepper, Kenneth J. Richardson, Aaron B. Margolin and Charles P. Gerba. Comparison of Poliovirus Detection in Water by Cell Culture and Nucleic Acid Hybridization // Water Science & Technology. – 1993. – Vol. 27. – No. 3-4. – P. 315-319.
9. Cesari C. et al. Detection of Enteroviruses from urban sewage in Parma // Acta Biomed. – 2010. – Vol. 81. – P. 40-46.
10. D. Pusch, St. Ihle, M. Lebuhn, I. Graeber and J. M. López-Pila. Quantitative detection of enteroviruses in activated sludge by cell culture and real-time RT-PCR using paramagnetic capturing // Journal of Water and Health. – 2005. – Vol. 3. – P. 313-24.
11. Jane Sellwood, J. V. Dadswell and J. S. Slade. Viruses in sewage as an indicator of their presence in the community // J. Hyg., Camb. – 1981. – Vol. 86. – P. 217-225.
12. Morris R. Reduction of naturally occurring enteroviruses by wastewater treatment processes // J. Hyg., Camb. – 1984. – Vol. 92. – P. 97-103.

Отримано 10.06.2013