

УДК 616.988:578]-074/078(083/133)

**ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ ЗА ВОЗБУДИТЕЛЯМИ
ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ С ВОДНЫМ ПУТЕМ ПЕРЕДАЧИ
(ИНСТРУКЦИЯ ПО АЛГОРИТМУ ДЕЙСТВИЙ)*****Т. В. Амурсьева, З. Ф. Богуш, Н. В. Поклонская, О. Н. Казинец****Государственное учреждение «Республиканский
научно-практический центр эпидемиологии и микробиологии»,
г. Минск, Республика Беларусь*

Среди великого разнообразия вирусных болезней особое место занимает многочисленная группа инфекций, одним из путей передачи которых является вода (питьевая, открытых водоемов и бассейнов). Данный путь трансмиссии их возбудителей сегодня признается одним из самых эпидемически значимых в плане риска возникновения массовой заболеваемости с быстрым вовлечением в эпидемический процесс обширных территорий с последующим «запуском» других известных путей передачи инфекций (контактно-бытового, воздушно-капельного, пищевого), реализуемых через фекально-оральный механизм. В этих условиях эффективный и регулярный лабораторный контроль за этой группой инфекций является важной и неотъемлемой частью эпидемиологического и производственного надзора за водными объектами, играющими роль природного резервуара вирусных патогенов и источника инфицирования населения, обладающего высоким потенциалом массивного «вброса» в человеческую популяцию большого перечня возбудителей ряда инфекционных болезней. Среди них наибольшую актуаль-

ность имеют энтеро-, норо-, ротавирусы, аденовирусы 40 и 41 типов, астровирусы, вирус гепатита А. Данные возбудители могут вызывать довольно широкий круг вирусных инфекций, клинически протекающих под диагнозами «острая кишечная инфекции (ОКИ)», «острый гастроэнтерит (ОГЭ)», «острая респираторная вирусная инфекция (ОРВИ)», герпангина, миалгия, менингит, менингоэнцефалит, миокардит, вирусный гепатит и др. В связи с высокой социальной значимостью этих инфекций и невозможностью управления эпидемической ситуацией с помощью вакцин (таковые отсутствуют в отношении подавляющего их большинства), качественно осуществляемый на регулярной основе лабораторный контроль на уровне водных объектов - с одной стороны, и человеческой популяции – с другой, признается, несомненно, одной из главных профилактических мер, направленных на предупреждение и/или прерывание водного пути их распространения.

Обсуждая проблему лабораторного контроля вирусных инфекций с водным путем передачи, следует обратить внимание на их сложную и запутан-

ную эпидемиологию, особенно в условиях возникновения вспышечной заболеваемости. Расследование их часто заходит в тупик из-за технических и методических проблем индикации присутствующих в воде вирусов, а также оценки их эпидемической значимости. Важным моментом, определяющим его успех, является оперативность и согласованность действий разных специалистов при осуществлении системного лабораторного контроля как на уровне человеческой популяции, так и эпидемически значимых водных объектов. При этом нельзя не отметить, что лабораторное выявление вирусного загрязнения воды имеет ряд особенностей, затрудняющих его проведение. Во-первых, содержание вирусов в водных объектах может быть крайне низким. Лабораторные методы детекции, разработанные для индикации вирусов в клиническом материале, не обладают достаточной чувствительностью для обнаружения вирусной контаминации воды. Во-вторых, значительное количество кишечных вирусов (вирусы гепатитов А и Е, рота-, норовирусы, ряд энтеровирусов и др.) не могут быть выделены и накоплены в культурах клеток, что исключает возможность их обнаружения с помощью классических вирусологических методов. В связи с этим при контроле вирусного загрязнения водных объектов должны использоваться более эффективные методы, универсальные по своим возможностям для индикации и идентификации всего спектра потенциальных вирусов-контаминантов (культивируемых и некультивируемых). Низкая концентрация присутствующих в питьевой воде вирусов диктует необходимость забора и исследования проб большого объема (1000 л питьевой воды и 100 л воды открытых водоемов и бассейнов). Очевидно, что качественный анализ таких объемов представляет существенную проблему. Поэтому забор

и пробоподготовка воды при санитарно-вирусологических исследованиях должны быть выделены в отдельный этап и осуществляться с помощью специальных средств. Наиболее перспективной технологией отбора проб на сегодняшний день признано использование фильтрационных систем, основанных на пропускании необходимого объема воды через специальные фильтры, способные обратимо сорбировать присутствующие в ней вирусы. После сорбции вирусов на фильтре они элюируются малым объемом специального раствора. Результатом этого этапа является концентрирование уловленных вирусов в объеме нескольких миллилитров, что позволяет успешно проводить их дальнейшие лабораторные исследования. Таким образом, использование специальных стандартизованных наборов для отбора и концентрирования проб воды, в основе которых лежит сорбция вирусов в проточной системе с последующей их элюцией, представляет собой ключевой этап анализа, от эффективности которого зависит результативность последующих этапов санитарно-вирусологических исследований.

Кроме указанной специфики лабораторных исследований по выявлению вирусного загрязнения воды, не менее сложной и трудоемкой является задача по установлению причинно-следственной связи между событием зарегистрированной инфекционной заболеваемости и фактом обнаружения ее возбудителя (вирусного агента) в воде. Эта задача сегодня также может быть успешно решена. Для этого, наряду с известными классическими эпидемиологическими методами, необходимо использование современных методов молекулярной эпидемиологии с применением сравнительного биоинформационного анализа геномов двух вирусных

объектов - вируса, обнаруженного в воде, и вируса, выявленного у пациента с клиническими признаками инфекции и идентифицированного в качестве ее этиологического агента. Наличие тесного генетического родства между «клиническим» вирусом и его «водным» аналогом является неоспоримым доказательством участия воды в передаче регистрируемой вирусной заболеваемости.

С учетом вышеизложенного нами предлагается следующий алгоритм осуществления лабораторного контроля за возбудителями вирусных инфекций с водным путем передачи. В настоящее время он внедрен в практику и успешно используется лабораторной службой Республики Беларусь. Основной его целью являются детекция и идентификация этиологического агента предполагаемой «водной» инфекции в клиническом материале пациента, а также в воде с последующим получением аргументированных доказательств водного пути ее передачи.

Планирование организации исследований

Лабораторные исследования клинического материала и проб воды на предмет выявления и идентификации вирусных патогенов проводятся в плановом порядке, внепланово и в рамках производственного контроля, который осуществляют только для проб воды.

Плановые исследования осуществляются в течение определённого времени для получения информации о циркуляции возбудителей среди населения, включая среду его обитания, если предполагается, что эффективность эпидемиологического надзора на данной территории недостаточна (или требуются дополнительные данные) и группа

населения, в отношении которой предпринимается надзор, находится в следующих условиях:

- имеются сведения о недавней циркуляции в обследуемой группе населения вируса, вызвавшего групповую или вспышечную заболеваемость;
- имеется риск заноса «новых» для данной территории высокопатогенных вирусов из других стран (территорий);
- есть необходимость в проведении специальных исследований с научными целями.

Внеплановые вирусологические исследования материалов проводятся в случае непредвиденных изменений санитарно-эпидемиологической ситуации на определённой территории в условиях, когда можно предположить существование водного пути передачи вирусных инфекций.

К таким условиям относится подъём заболеваемости вирусными инфекциями с возможным водным путем передачи, возникновение очага групповой заболеваемости из двух или более пациентов, при наличии информации о следующих установленных фактах:

- употреблении заболевшими питьевой воды из одного источника;
- контакте заболевших с водой одних и тех же открытых водоемов, плавательных бассейнов и других водных объектов;
- генетической идентичности (близкородственности) вирусов, выявленных у заболевших пациентов и в пробах употребляемой воды;
- авариях или нарушениях в системах водоснабжения или канализации, в результате которых могло произойти интенсивное биологическое загряз-

нение поверхностных и подземных водоисточников, а также питьевой воды;

- нарушениях в технологическом и производственном процессах при приготовлении воды, расфасованной в емкости.

Для проведения плановых и внеплановых лабораторных исследований составляется план их проведения, который должен включать:

- продолжительность и сроки отбора проб;
- характеристику группы населения, в отношении которой предпринимается исследование (численность населения, состав и т.д.);
- распределение ответственности за сбор, обработку, исследование проб;
- наличие нормативных и методических документов, материального обеспечения для проведения исследований, протоколов проведения исследований;
- наличие обученного персонала и контроля качественного проведения исследований;
- определение порядка отчетности о результатах исследования;
- определение возможностей для своевременной пересылки выделенных штаммов вирусов (или РНК-, ДНК-позитивных материалов) для подтверждения и дальнейшего изучения в установленном порядке.

Исследования проб воды в рамках производственного контроля проводятся по специально разработанной рабочей программе с целью санитарно-вирусологической оценки производственных (технологических) процессов в

соответствии с действующими нормативными и инструктивно-методическими документами.

Объекты исследований

Объектами исследований являются:

- клинический материал (фекалии, рвотные массы, сыворотка крови, носоглоточные смывы, спинномозговая жидкость, аутопсийный материал);
- пробы воды (питьевой, открытых водоемов, плавательных бассейнов и аквапарков, сточной);
- вирусы (норовирусы I и II генотипов, энтеровирусы, ротавирусы, аденовирусы 40 и 41 типов, астровирусы, вирус гепатита А).

Отбор проб, пробоподготовка, сортировка

Пробы клинического материала

Для идентификации этиологического агента ОКИ проводятся исследования проб фекалий и/или рвотных масс, полученных от пациентов в течение 24-48 часов с момента появления клинических симптомов инфекции. Пробоподготовка осуществляется в соответствии с инструкцией «Лабораторная диагностика вирусных острых кишечных инфекций» (утверждена МЗ РБ, рег. № 111-1210 от 24.12.2010, раздел 4).

При наличии у пациентов клинических симптомов энтеровирусной инфекции и соответствующих эпидемиологических данных отбор проб (фекалии, рвотные массы, сыворотка крови, носоглоточные смывы, спинномозговая жидкость, аутопсийный материал) и их обработка проводятся в соответствии с «Инструкцией по лабораторной диагно-

стике энтеровирусных инфекций» (утверждена МЗ РБ, рег. № 133-1204 от 12.04.2005, разделы 3-5).

Пробы воды разного вида пользования

Отбор проб производится в самые ранние, насколько это возможно, сроки на основании результатов предварительного эпидемиологического расследования при наличии указаний на водный путь передачи инфекции. Их исследование чаще выполняется после исследований клинического материала.

Отбор проб, улавливание вирусов и их концентрирование осуществляется в соответствии с «Инструкцией по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов» (утверждена МЗ РБ, рег. № 134-1204 от 12.04.2005, разделы 5.3.1, 6.6, 6.7) и инструкцией по применению «Санитарно-вирусологический контроль воды плавательных бассейнов» (утверждена МЗ РБ, рег. № 112-1210 от 02.12.2010, раздел 4.3.1).

Сортировка проб

После проведения пробоподготовки каждый образец клинического и санитарно-вирусологического материала делится на 2 равные аликвоты, одна из которых используется для идентификации содержащегося в нем этиологического агента инфекции, а другая хранится при -20°C для использования на этапе получения доказательства генетической идентичности (близкородственности) вирусов, выявленных в клиническом и санитарно-вирусологическом материалах (воде).

Лабораторная диагностики вирусных инфекций с водным путем передачи

Диагностика вирусных инфекций носит комплексный характер и предусматривает оценку клиники заболевания совместно с данными эпидемиологического анамнеза и результатами лабораторных исследований.

1. Диагноз ОКИ (ОГЭ) при sporadic заболееваемости устанавливается на основании клинических, эпидемиологических данных и обязательного лабораторного подтверждения.

2. В очагах регистрации групповой заболееваемости ОКИ (ОГЭ) лабораторное обследование для установления этиологии инфекции проводится:

при регистрации очага в организованных группах до 15 заболевших - у всех лиц, при количестве заболевших от 15 до 30 - не менее чем у 10 лиц, при большем количестве заболевших - не менее чем у 20 % из них;

при ограничении очага по территориальному принципу до 30 заболевших - у всех лиц, при количестве заболевших от 30 до 100 - не менее чем у 30 лиц, при большем количестве заболевших - 20 % из них.

3. Критерием установления роли возбудителя, как основного этиологического агента в очаге групповой заболееваемости, служит его выявление не менее чем у 30 % обследованных в соответствии с п. 5.2.

4. В очаге групповой заболееваемости (в соответствии с пп. 5.2 и 5.3) допускается установление диагноза у части пострадавших на основании клинико-эпидемиологического анамнеза без лабораторного подтверждения.

5. Лабораторная диагностика для идентификации этиологических агентов вирусных инфекций с водным путем передачи проводится в отношении следующих возбудителей:

- норовирусы I и II геногруппы;
- энтеровирусы;
- ротавирусы;
- аденовирусы 40 и 41 типов;
- астровирусы;
- вирус гепатита А.

6. Порядок и очередность проведения исследований в отношении различных возбудителей определяются на основании клинической картины заболевания. Изолированный синдром гастроэнтерита является показанием к проведению лабораторной диагностики в отношении норо-, рота- и астровирусов.

7. Методом выбора при проведении лабораторной диагностики для идентификации этиологических агентов вирусных инфекций с водным путем передачи является ПЦР с гибридно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции. При невозможности проведения исследований методом ПЦР для лабораторной диагностики могут быть использованы метод ИФА для выявления антигенов вирусов или хроматографический экспресс-тест.

8. Лабораторная диагностика для идентификации этиологических агентов вирусных инфекций с водным путем передачи в клиническом материале проводится в соответствии с требованиями инструкции по применению «Лабораторная диагностика вирусных острых кишечных инфекций» (утверждена МЗ РБ, рег. № 111-1210 от 24.12.2010) и «Инструкции по лабораторной диагностике энтеровирусных инфекций» (утверждена МЗ РБ, рег. № 133-1204 от 12.04.2005).

Индикация и идентификация вирусной контаминации воды

1. Исследования сконцентрированных проб санитарно-вирусологического материала (вода разного вида пользования) проводятся после установления этиологии возникшей инфекционной заболеваемости и осуществляются в отдельном боксовом помещении, в котором не проводились исследования клинического материала.

2. При наличии эпидемиологических или иных показаний на установление водного пути передачи инфекции пробы воды анализируются на предмет выявления в них конкретного(ых) вирусного агента(тов), который(е) идентифицирован(ы) в качестве возбудителя(ей) возникшего инфекционного заболевания.

3. В зависимости от вида искомого вирусного патогена для выявления и идентификации вирусной контаминации воды могут быть использованы разные методы лабораторных исследований. Среди них наибольшее предпочтение отдается методам, основанным на амплификации нуклеиновых кислот (ПЦР), в связи с их высокой чувствительностью, что обуславливает возможность детекции вирусных агентов при их традиционно низком содержании в воде. Наиболее целесообразно использовать для исследования этих проб метод ПЦР с гибридно-флюоресцентной детекцией продуктов реакции в связи с низким риском контаминации продуктами предыдущих реакций. Использование других методов детекции вирусного материала в воде, например, ИФА и хроматографических тестов, является менее предпочтительным в связи с их недостаточной чувствительностью.

Для хорошо культивируемых в системе *in vitro* вирусов, в частности, энтеровирусов, одним из методов выбора может быть их выделение и последующая идентификация в культурах чувствительных клеток.

4. Обнаружение и идентификация вирусов в сконцентрированных пробах вод разного вида пользования осуществляется в соответствии с «Инструкцией по санитарно-вирусологическому контролю водных объектов» (утверждена МЗ РБ, рег. № 134-1204 от 12.04.2005, разделы 5.3.3-5.3.5, 6.7), инструкцией по применению «Санитарно-вирусологический контроль воды плавательных бассейнов» (утверждена МЗ РБ, рег. № 112-1210 от 02.12.2010, раздел 4.3.2-4.3.5).

5. Все этапы лабораторных исследований для индикации и идентификации вирусов-контаминантов воды проводятся с использованием препаратов и диагностических тест-систем, зарегистрированных на территории государства и предназначенных для исследований образцов воды.

Получение лабораторных доказательств в пользу водного пути передачи вирусных инфекций на основе использования биоинформационных методов анализа для доказательства генетической идентичности (близкородственности) вирусов, обнаруженных в клиническом материале пациентов и в пробах воды

1. Получение фрагментов нуклеотидной последовательности вирусов, выявленных в клиническом материале пациентов и в пробах воды.

Первым этапом биоинформационного анализа является получение

фрагментов нуклеотидной последовательности вирусов, выявленных в клиническом материале пациентов, и вирусов-контаминантов воды на основе метода секвенирования. Как правило, эти исследования проб клинического и санитарно-вирусологического материалов, хранившихся после сортировки при температуре -20°C , проводятся в специализированной лаборатории, владеющей данными технологиями (в Республике Беларусь это лаборатория на базе РНПЦ эпидемиологии и микробиологии). Транспортировка образцов осуществляется, используя холодовую цепь при температуре $4-8^{\circ}\text{C}$. В сопроводительных документах должны быть указаны следующие данные:

- вид клинического/санитарно-вирусологического материала;
- дата отбора проб;
- вид пробоподготовки;
- тип идентифицированного вирусного агента.

2. Проведение биоинформационного анализа нуклеотидных последовательностей

После получения результата секвенирования проводится сравнение полученных последовательностей между собой и с нуклеотидными последовательностями вирусов того же типа, выделенных на местных территориях и в других странах (референсные нуклеотидные последовательности). Целью этого исследования является получение информации о степени сходства и близкородственности вирусов, содержащихся в исследуемых пробах. Анализ проводят программой MEGA (версия 5.0 и выше, <http://www.megasoftware.net>). Далее осуществляется выравнивание исследуемых последовательностей вирусов, полученных от пациентов и из проб

воды, и последовательностей вирусов того же типа, выделенных в тот же период времени на территории конкретного государства и в других странах.

3. Анализ и интерпретация полученных результатов.

Подтверждением водного пути распространения вирусов является достоверно меньшая доля нуклеотидных различий между исследуемыми вирусами, обнаруженными у пациентов и в пробах воды, при сравнении их между собой, чем с референсными нуклеотидными последовательностями.

Пример: между нуклеотидной последовательностью А (норовирус выделен от пациента с гастроэнтеритом) и нуклеотидной последовательностью В (норовирус выделен из образца воды, которую употреблял заболевший) доля нуклеотидных различий составляет $0,4 \pm 0,4\%$, тогда как при сравнении А и В с другими норовирусами того же генотипа, циркулировавшими в это же время в Республике Беларусь, минимальная доля различий составляет $3,2 \pm 1,2\%$. Так как $0,4 \pm 0,4\%$ достоверно меньше, чем $3,2 \pm 1,2\%$, то полученный результат служит доказательством водного пути передачи норовируса.

4. Возможные проблемы при использовании биоинформационных методов анализа для установления водного пути передачи вирусных инфекций

Наиболее частая проблема, препятствующая использованию биоинформационных методов анализа, – низкое содержание нуклеиновых кислот возбудителя в пробах объектов окружающей среды, не позволяющее накопить достаточное количество ДНК - мишени для секвенирования. В такой ситуации, если вирусы - контаминанты являются культивируемыми (адено-, энтеровирусы), рекомендуется провести 3

пассажа исследуемого образца в культуре чувствительных клеток для накопления вирусного материала. Если вирусы-контаминанты относятся к некультивируемому, или плохо культивируемому (рота-, норо-, астровирусы), низкое содержание вируса в пробах объектов окружающей среды является непреодолимым препятствием для их секвенирования. В таком случае лабораторно подтвержденное наличие вирусной контаминации объектов окружающей среды в совокупности с данными эпидемиологического расследования могут рассматриваться в качестве доказательств для установления водного пути передачи вирусных инфекций.

Предлагаемый порядок действий и алгоритм осуществления лабораторного контроля за возбудителями вирусных инфекций с водным путем передачи могут представить профессиональный интерес для специалистов лабораторной службы разных ведомств и учреждений, ответственных за контроль качества воды разного вида пользования, а также специалистов лечебно-профилактических учреждений.

Ключевые слова: вирус, водный объект, лабораторный контроль, эпидемиологическая безопасность.

УДК 616.988:578J-074/078(083/133)

ЛАБОРАТОРНЫЙ КОНТРОЛЬ
ЗА ВОЗБУДИТЕЛЯМИ ВИРУСНЫХ
ИНФЕКЦИЙ С ВОДНЫМ ПУТЕМ
ПЕРЕДАЧИ
(ИНСТРУКЦИЯ ПО АЛГОРИТМУ
ДЕЙСТВИЙ)

Т. В. Амвросьева, З. Ф. Богуш,
Н. В. Поклонская, О. Н. Казинец

Государственное учреждение
«Республиканский научно-практический

центр эпидемиологии и микробиологии», г. Минск, Республика Беларусь

В данной работе обоснована необходимость контроля качества воды (питьевой, открытых водоемов, бассейнов) на предмет выявления вирусных патогенов. Подробно изложен эффективный алгоритм проведения санитарно - вирусологических исследований водных объектов для установления водного пути передачи социально значимых вирусных инфекций.

Ключевые слова: вирус, водный объект, лабораторный контроль, эпидемиологическая безопасность.

УДК 616.988:578]-074/078(083/133)

ЛАБОРАТОРНИЙ КОНТРОЛЬ
ЗА ЗБУДНИКАМИ ВІРУСНИХ ІНФЕКЦІЙ
З ВОДНИМ ШЛЯХОМ ПЕРЕДАЧІ
(ІНСТРУКЦІЯ З АЛГОРИТМУ ДІЇ)

*Т. В. Амвросьєва, З. Ф. Богуш,
Н. В. Поклонська, О. Н. Казинець*

*Державна установа "Республіканський
науково-практичний центр
епідеміології та мікробіології»,
м. Мінськ, Республіка Беларусь*

У роботі обґрунтована необхідність контролю якості води (питної, відкритих водойм, басейнів) з метою виявлення вірусних патогенів. Розглянуто ефективний алгоритм проведення санітарно - вирусологічних досліджень

водних об'єктів для встановлення водного шляху передачі соціально вагомих вірусних інфекцій.

Ключові слова: вірус, водний об'єкт, лабораторний контроль, епідемічна безпека.

LABORATORY CONTROL FOR WATER –
BORN VIRAL INFECTIONS PATHOGENS
(INSTRUCTIONS AND ALGORITHMS)

*T. V. Amvrosieva, Z. F. Bogush,
N. V. Poklonskaya, O. N. Kazinets*

*State Enterprise «Republican
Research-and-Practical Union
of Epidemiology and Microbiology»,
Minsk, Republic of Byelorussia*

In the work presented the problem of water quality (drinking, open water bodies, swimming pools) with the aim to is detect viral pathogens is discussed. An effective algorithm of sanitary – viral investigations of the water bodies and determination of the ways of social important viral infections carry - over is described.

Keywords: virus, water body, laboratory control, epidemiologic safety.

Впервые поступила в редакцию 27.05.2013 г. Рекомендована к печати на заседании редакционной коллегии после рецензирования.