

Абдикаримов С.Т., Касымбекова К.Т., Алтымышева Н.А., Шаршенова А.А.

ИЗУЧЕНИЕ МИКРОБНОЙ КОНТАМИНАЦИИ ВОДНОЙ ЭКОСИСТЕМЫ ПОБЕРЕЖЬЯ ОЗЕРА ИССЫК-КУЛЬ, ЕЕ РОЛЬ В ФОРМИРОВАНИИ КИШЕЧНОЙ МИКРОФЛОРЫ ДЕТЕЙ ИССЫК-КУЛЬСКОГО РЕГИОНА

614.777:579.2 + 616-34-053.2:578/579

В последние годы общий экономический кризис осложнил обстановку с обеспечением населения безопасной питьевой водой. Обострение проблемы водоснабжения населенных мест республики связано с отсутствием выделения средств бюджета на капитальный ремонт и строительство систем водоснабжения. Отмечается ухудшение санитарно-технического состояния водопроводных сооружений, разводящих сетей и зон санитарной охраны источников.

Из 1781 населенных пунктов республики не обеспечены централизованным водоснабжением 609, где проживает 722005 человек (24,7% всего населения). Если в целом по стране 82,4% жителей обеспечено централизованным водоснабжением, то в сельской местности этот показатель существенно ниже-78,8%.

Большая часть существующих водопроводов имеет неудовлетворительное санитарно-техническое состояние, нуждается в реконструкции и ремонте, что сказывается на качестве воды, подаваемой населению. Контроль качества" показал, что 12,16 % случаев она не соответствовала микробиологическим требованиям. Зачастую коли-титр имел резкое колебание в зависимости от времени года. Водопользование значительной части сельского населения осуществляется водой из колодцев и открытых водоисточников, в частности, из арычной системы ирригационных каналов. Пробы воды сельских водопроводов имеют сравнительно низкие санитарно-бактериологические показатели летом, в период сезонного подъема острых кишечных инфекций (ОКИ).

Отмечается увеличение антропогенного загрязнения водных объектов окружающей среды энтеробактериями, кишечными вирусами (вирусом гепатита А и Е, ротавирусами, возбудителями и энтеровирусных инфекций), паразитами (амебами, яйцами гельминтов и пр.). Высокая инфицированность микроорганизмами вод поверхностных водоемов является, как правило, результатом выброса недостаточно очищенных сточных вод [1-5]. В условиях интенсивного орошаемого земледелия существует реальный риск инфицирования объектов окружающей среды (почвы, сельхозкультур, плодов) и людей, что приводит к повышению уровня заболеваемости кишечными инфекциями. Одним из основных факторов передачи возбудителей кишечных инфекций в условиях производственной связи населения с водой поверхностных водоемов при орошаемом земледелии является водный. Это обуславливает реализацию водного пути передачи кишечных инфекций в нашей республике и гиперэндемичность территории Кыргызстана по

острым кишечным инфекциям (ОКИ), энтеральным вирусным гепатитам.

Острым остается вопрос обеззараживания сточных вод, т.к. она является одним из основных источников загрязнения водной среды. Особое внимание следует уделить очистным сооружениям побережья Иссык-Куля, выявлению возможных источников загрязнения озера с последующим решением проблем очистки и предотвращения попадания антропогенного загрязнения в поверхностные водоемы, места массового отдыха населения. Таким образом, проблема качества питьевой воды и антропогенного загрязнения водных объектов в процессе хозяйственно-бытовой деятельности человека является крайне острой проблемой для нашей республики, требующей проведения научного поиска и принятия неотложных мер.

В связи с этим, нами было проведено в рамках программы "INTAS" изучение вирусно-бактериальной контаминации водных объектов побережья Иссык-Куля, а также микробиологическое обследование детского населения на кишечную микрофлору.

Материалы и методы

Отбор проб воды для санитарно-микробиологического анализа проводили с соблюдением правил стерильности. Доставка проб осуществлялась в контейнерах холодильниках при температуре + 4 – + 40 °С.

Бактериологический анализ проб воды осуществлялся методом мембранных фильтров с использованием фильтровального аппарата типа Зейтца и фильтрующих мембран МФАС – ОС – 1, МФАС – ОС – 2, МФА – МА (номер 1 – 6). С помощью электроотсоса хирургического проводили последовательную фильтрацию через фильтровальный аппарат и фильтры 1,10 и 100 мл. исследуемой воды. Фильтры переносили на плотные питательные среды: агар Эндо, Сабуро, желточно-солевой агар, висмут-сульфит агар.

На одну чашку переносили 3 фильтра с разным объемом профильтрованной воды (1,10,100). Для определения общего микробного числа переносили в чашки Петри 1мл исследуемой воды, заливали 6-8 мл. расплавленного и остуженного до 45-46°С простого питательного агара.

Учет результатов проводили после инкубации при 37°С в течение 24 часов (на среде Эндо, висмут-сульфит агаре, простом питательном агаре) и 48 часов (на Сабуро, желточно-солевым агаре). Производился подсчет общего микробного числа (ОМЧ), коли-индекса (КИ), термотолерантных колиформных бактерий (ТТКБ).

Общее микробное число определяли путем подсчета количества колоний, выросших на чашках с простым питательным агаром. Результат выражали в числе колониообразующих единиц в 1 мл исследуемой пробы воды. Определение КИ проводили по формуле: $КИ = 1000 \text{ мл} \cdot n / V$; где n - количество выросших колоний группы кишечной палочки, V - объем исследованной воды.

К ТТКБ относили грамотрицательные неспорообразующие палочки, не обладающие оксидазной активностью, ферментирующие лактозу до кислоты и газа при температуре 44 °С в течение 24 часов.

Идентификацию выделенных штаммов энтеробактерий проводили с помощью тест-системы для ускоренной биологической идентификации энтеробактерий "Рапид - энтеро 200" (Санкт-Петербург) и тест-системы API 20 E (Франция).

Вирусологические исследования проб воды проводились на наличие энтеровирусов (полиовирусов, энтеровирусов группы Эхо и Коксаки), а также ротавирусов человека группы А и антигена вирусного гепатита А. Для отбора проб воды и концентрации вируса из водной среды применяли пакеты с макропористым стеклом МПС-1000 ВГХ (производства НИИ полиомиелита и вирусных энцефалитов им. Чумакова, Россия).

Пакеты доставляли в лабораторию с соблюдением холодового режима (+4 – +10°С) в течение 24 часов с момента забора пробы. Вирус элюировали из макропористого стекла, получая последовательно 3 фракции воды. Далее все три фракции воды исследовались с помощью иммуноферментного анализа (ИФА) на наличие антигена ротавируса человека группы А, а также на антиген вирусного гепатита (ВГА). Вторая фракция воды исследовалась на перевиваемых культурах ткани:

- RD (клетки из рабдомиосаркомы человека);
- Нер-2 (клетки из эпидермоидной карциномы рака гортани человека);
- а-20В (мышинной линии клетки с геномом человеческого полиовируса).

Выделение и идентификацию энтеровирусов проводили с помощью реакции нейтрализации со специфическими иммунными сыворотками к вирусам Эхо, Коксаки, полиовирусам 1-3 типов.

Спектрофотометрическую индикацию ротавирусов и антигена ВГА проводили в иммуноферментном анализе с использованием тест-систем "Рота-анализ" (производства АО "Биоиммуноген", Россия) и "Нераvir-A HAV-Ag" (производства НИИ им.Пастера, Россия). Измерение оптической плотности осуществляли при длине волны 492 нм на приборе "Multiscan MCC 340" (Labsystems).

Для изучения потенциальной возможности реализации водного пути передачи инфекции, нами проведено бактериологическое, вирусологическое и серологическое обследование детского населения региона. Проведено количественное бактериологическое исследование 166 проб фекалий. Посев проб осуществлялся количественным методом (по Гольду) на следующие питательные среды: агар Эндо, среду

Плоскирева, 5% кровяной агар, желточно-солевой агар, агар Сабура, висмут-сульфит агар, селенитовый бульон. Идентификация выделенных штаммов проводилась на основании изучения биохимических и антигенных свойств общепринятым методом

Вирусологическое исследование копрофильтратов на энтеровирусы осуществляли на перевиваемых линиях культур клеток (аналогично вирусологическому исследованию проб воды). Нами проведено серологическое исследование 184 проб сывороток детей 9-10 лет на маркеры энтеральных вирусных гепатитов: IgM ВГА, IgG ВГА, IgM ВГЕ, IgG ВГЕ. Использованы иммуноферментные тест-системы НИИ им. Пастера (Санкт-Петербург), а также спектрофотометр "Multiscan MCC 340" (Labsystems). Измерение проводили при длине волны 492 нм.

Определение ротавируса человека группы А проводили спектрофотометрически вышеуказанным методом, с использованием тест-системы "Рота-анализ" (производства АО "Биоиммуноген", Россия).

Результаты и обсуждение

Результаты вирусологического обследования практически здоровых детей показали, что в целом в регионе уровень колонизации кишечника детей энтеровирусами был невысок. Выявлены существенные различия в зависимости от места жительства детей. Наиболее высоким данный показатель был у детей из села Барскоон -6,9% из числа обследованных. В то время как в других населенных пунктах он был существенно ниже, варьируя от 3,4% до 4,3%. По-видимому, высокий показатель обнаружения энтеровирусов у детей в селе Барскоон связан с аварией в данном селе, при которой произошел выброс цианидов в речку. Для ликвидации последствий аварии населению села Барскоон, в первую очередь детям, была проведена массивная антибиотикотерапия, что привело к иммунологическим нарушениям. Изучение данного вопроса требует дальнейших клинико-иммунологических и микробиологических исследований.

Результаты серотипирования выделенных энтеровирусов показали, что в большинстве случаев (4,3%) это были нетипирующиеся энтеровирусы, лишь в 0,6% случаев выделен вирус Эхо 15-22. Следует отметить, что носительство в кишечнике детей неполиоэнтеровирусов в силу интерференции снижает приживаемость вакцинных штаммов полиовирусов и формирование поствакцинального иммунитета. Среди обследованных нами детей ни у одного не обнаружены вакцинные штаммы полиовируса.

Спектрофотометрическое исследование копрофильтратов здоровых детей на наличие антигена ротавируса человека группы А не обнаружило колонизации кишечника детей вирусом. Полученные нами данные отличаются от литературных источников, согласно которым среди детского населения существует бессимптомное носительство ротавируса, обуславливающее феномен "айсберга" в реализации ротавирусной инфекции [6,7]. Возможно, для нашего региона при высоких среднемесячных

температурах воздуха, показатель выживаемости ротавируса и соответственно его приживаемости в кишечнике здоровых детей ниже, чем в Европейском регионе.

Результаты серологических исследований сывороток крови детей на маркеры энтеральных вирусных гепатитов (ВГА и ВГЕ) выявили высокий уровень инфицированности детей: 22,8 % и 24,7% соответственно. Частота обнаружения антител класса Ig G к вирусному гепатиту E составила 19,6%, что свидетельствует о возможной реализации водного пути передачи инфекции. Анализ частоты индикации маркеров энтеральных гепатитов в зависимости от места проживания детей показал, что в селе Боконбаево были самые высокие показатели обнаружения IgM -ВГА (67,3%) и в то же время самые низкие показатели выявления IgM -ВГЕ и IgG-ВГЕ:10,4% и 12,2% соответственно. Наиболее высокие показатели инфицированности детей ВГЕ были в с. Барскоон и пгт. Каджи-Сай:

-IgM ВГЕ составил 35,4% и 32,6%

-IgG ВГЕ 22,9% и 23,3% соответственно.

Нами была выявлена закономерность: в населенных пунктах, где выявлен высокий показатель инфицированности детей ВГА отмечалась низкая частота обнаружения маркеров ВГЕ и наоборот. Возможно, в силу интерференции инфицированность одним вирусом энтерального гепатита, снижает приживаемость другого вируса.

Анализ количественного бактериологического исследования проб фекалий детей на условно-патогенную микрофлору показал, что в 34,9% случаев обнаружены диагностически значимые бактерии. Различий частоты бактериальной колонизации кишечника детей в зависимости от места проживания не выявлено. Однако, анализ видового состава бактерий показал, что только в с. Кызыл-Суу в 3 случаях (10,3%) были обнаружены патогенные энтеробактерии: *Sh. dysenteriae* и энтеропатогенные эшерихии *E.coli* O111 и O151. В то время как в других населенных пунктах у детей патогенные энтеробактерии не обнаружены. Среди условно-патогенной микрофлоры преобладали *E.coli*

haemolyticus, бактерии рода *Citrobacter*, грибы рода *Candida* и бактерии рода *Staphylococcus*. Причем, если в с. Боконбаево и пгт. Каджи-Сай преобладали гемолитические кишечные палочки и бактерии рода *Citrobacter*, то в селе Барскоон чаще высевали *Staphylococcus* и грибы рода *Candida*. По-видимому, это является результатом применения интенсивной антибиотикотерапии населения в данных селах, повлекшим за собой изменение нормобиоценоза кишечника.

Таким образом, результаты микробиологического обследования детей позволяют сделать вывод о высоком уровне инфицированности детей с. Барскоон вирусным гепатитом E, энтеровирусами, а также колонизации кишечника грибами рода *Candida* и *Staphylococcus*. Вместе с тем, вызывают крайнюю настороженность выявление здорового носительства патогенных энтеробактерий у детей с.Кызыл-Суу.

Результаты сравнительного изучения циркуляции энтеровирусов, ротавирусов и антигена ВГА в 6 водных объектах Ыссык-Кульского региона показали, что в зимний период года пробы воды были свободны от вирусов. В летне-осенний период (август месяц) 22,2% исследованных проб воды были контаминированы ротавирусом.человека группы А, в 12,3% проб обнаружен антиген ВГА и в 3,7% проб изолированы энтеровирусы (табл.1).

Следует отметить, что энтеровирусы были изолированы лишь из проб воды реки Тон (в 25% случаев). Антиген ВГА был обнаружен в 3 из 6 исследованных водных объектов побережья Иссык-Куля: реках Тосор, Чон Кызыл Суу и воде озера Иссык-Куль, - составив 50%, 33,3% и 11,1% соответственно.

Наиболее высокими были показатели контаминации проб воды антигеном ротавируса человека группы А, варьируя от 25% до 50% исследованных проб. Лишь в воде озера Иссык-Куль и реки Каджи-Сай положительные находки составили единичные случаи. Корреляции между уровнем инфицированности населения и вирусной контаминацией водных объектов населенных пунктов выявлено не было.

Табл.1.

Результаты вирусологического исследования водных объектов побережья озера Иссык-Куль

№	Водный объект	Кол-во исследованных точек	Кол-во проб	Из них положительных на:					
				Ротавирус человека группы А		Энтеро-вирус		Антиген вирусного гепатита А	
				абс	%	абс	%	абс	%
1	Тон	4	12	5	41.7	3	25	-	-
2	Каджи-Сай	2	6	1	16.6	-	-	-	-
3	Тосор	2	6	3	50	-	-	3	50
4	Барскоон	4	12	3	25	-	-	-	-
5	Чон Кызыл Суу	3	9	5	55.5	-	-	3	33.3
6	Озеро Иссык-Куль	12	36	1	2.8	-	-	4	11.1
Итого:		27	81	18	22.2	3	3.7	10	12.3

Таким образом результаты проведенных исследований позволили сделать следующие выводы:

1. Выявлен высокий уровень инфицированности детей ВГА и ВГЕ: 22,8 % и 24,7% соответственно. Частота обнаружения антител класса Ig G к вирус-

ному гепатиту E составила 19,6%, что свидетельствует о реализации водного пути передачи инфекции

2. Результаты идентификации выделенных энтеровирусов показали, что в большинстве случаев

(4,3%) это были нетипирующиеся энтеровирусы, лишь в 0,6% случаев выделен вирус Эхо 15-22.

3. Спектрофотометрическое исследование копрофильтратов здоровых детей на наличие антигена ротавируса человека группы А не обнаружило колонизации кишечника детей вирусом.

4. Результаты микробиологического обследования детей позволяют сделать вывод о высоком уровне инфицированности детей с Барскоон вирусным гепатитом Е, энтеровирусами, а также колонизации кишечника грибами рода *Candida* и *Staphylococcus*, что может быть последствием аварии с выбросом цианидов в данном населенном пункте.

5. Результаты сравнительного изучения циркуляции энтеровирусов, ротавирусов и антигена ВГА в 6 водных объектах Иссык-Кульского региона показали, что в зимний период года пробы воды были свободны от вирусов. В летне-осенний период 23,1% исследованных проб воды были контаминированы ротавирусом человека группы А, в 12,8% проб обнаружен антиген ВГА и в 3,8% проб изолированы энтеровирусы

Литература:

1. Grabow, W. O. K., Clay, C. G., Vivier, J. C. Detection and rapid differentiation of human enteroviruses in water sources by restriction enzyme analysis // *Water Science and Technology*. 2001. Vol. 43(12). P.209-212
2. Vantarakis, A. C., Papapetropoulou, M. Detection of Enteroviruses and Adenoviruses in Coastal Waters of SW Greece by Nested Polymerase Chain Reaction// *WATER RESEARCH* 1998. Vol. 32(8): P.2365-2372
3. G Tambini, J K Andrus, E Marques, M Pallansch, C A de Quadros, O Kew. Direct detection of wild poliovirus circulation by stool surveys of healthy children and analysis of community wastewater// *JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES* 1993. Vol. 168(6). P.1510-1514
4. F Friedrich. Molecular evaluation of oral poliovirus vaccine strains during multiplication in humans and possible implications for global eradication of poliovirus// *ACTA VIROLOGICA* Vol. 44(2). P.109-117 2000
5. Show R.D, Greenberg H.B.// *Encyclopedia of Virology/ Eds R. Webster, A. Granoff.*-New York,1994.-Vol.3.- P.1274-1281
6. Б.Я.Васильев, Семенов Н.В., Семенов Н.В., Новикова Н.А. и др. Электрофоретическая гетерогенность популяции ротавирусов, выделенных в Ленинграде в осенне-зимний сезон 1986-1987 гг.// *Вопросы вирусологии.*1990.N2.C.156-157.
7. Б.Я.Васильев, Р.И. Васильева, Ю.В. Лобзин. Острые кишечные заболевания. Ротавирусы и ротавирусная инфекция. Санкт-Петербург. 2000. 268 с.