

Mirela WOLF\*

## **WIRUSY W WODZIE - ZAGROŻENIA I METODY KONTROLI**

W wodach powierzchniowych czy infiltracyjnych, ujmowanych na cele wodociągowe, zauważa się obecność zarówno szkodliwych związków chemicznych jak i drobnoustrojów. Proces uzdatniania wody może w istotnym stopniu obniżyć ilość wirusów w wodzie, jednakże nie jest w stanie ich całkowicie usunąć z bardzo dużych objętości wody. Stąd istnieje potrzeba prowadzenia szerokich badań dotyczących wirusów i opracowania norm jakości wody, które uwzględniłyby to zagadnienie. Obecność wirusów w wodzie przeznaczonej do spożycia powoduje najczęściej infekcje związane z układem pokarmowym (biegunka, wymioty), ale może także wywołać zapalenie spojówek, wątroby czy nawet mózgu. Uzdatnianie powinno całkowicie pozbawić wodę wirusów chorobotwórczych z uwagi na znaczne zagrożenie dla konsumentów. Do wykrywania wirusów w wodzie wykorzystywane są techniki oparte na hodowli komórkowej, mikroskopii elektronowej i immunomikroskopii, hemaglutynacji biernej – test SPACE oraz testach molekularnych (PCR, Multiplex PCR, Real-time PCR).

### 1. WSTĘP

Wirusy to struktury, zawierające w swoim składzie jedynie takie składniki, które są niezbędne do zakażenia komórek gospodarza oraz do powielania materiału genetycznego- replikacji. Wirusy najczęściej są wprowadzane do środowiska przez człowieka w wyniku wycieku ścieków miejskich, szamb, ścieków rolniczych, a także podczas wprowadzania ścieków ze statków. Ponad 100 typów wirusów chorobotwórczych jest wydalane wraz z wydzielinami ludzi i zwierząt. Wirusy te, które najczęściej określa się jako wodorozcieńczalne wirusy jelitowe, przenoszone są najczęściej drogą fekalno-oralną. Replikują się w przewodzie pokarmowym gospodarza, który jest im do tego niezbędny. Po replikacji, dojelitowe wirusy są wydzielane do ścieków i na-

---

\* Politechnika Wroclawska, Wydział Inżynierii Środowiska, Zakład Biologii Sanitarnej i Ekotechniki, Wyb. Wyspiańskiego, 50-370 Wrocław, mirela.wolf@pwr.edu.pl.

stępnie mogą zostać rozprzestrzenione w środowisku wodnym, gdyż większość procesów oczyszczania ścieków nie jest w stanie ich całkowicie usunąć.

Wirusy, które są w największym stopniu przekazywane drogą wodną to: wirusy polio, *Coxsackie*, *enterowirusy*, *adenowirusy*, *reowirusy*, *rotawirusy*, *WZW typu A* oraz *kalciwirusy*. Wirusy jelitowe, odpowiedzialne za pojawienie się patogenów chorobotwórczych przenoszonych drogą wodną ze względu na swoją strukturę komórkowa są odporniejsze na procesy uzdatniania wody niż wody niż bakterie. Są one również odporne na szeroki zakres pH (od 3 do 10).

Możliwość określenia dominujących źródeł zanieczyszczenia kałowego środowiska wodnego ma coraz bardziej istotne znaczenie w zarządzaniu jakością wody. Jednak określenie źródła skażenia wirusowego nie jest możliwe bez żmudnych i rozległych testów. Obecność wirusów zarówno w wodach powierzchniowych, gruntowych i w wodzie do picia wymusza silną potrzebę prowadzenia szerokich badań dotyczących wirusów i opracowania norm jakości wody, które uwzględniłyby to zagadnienie. Bardzo ważne jest również doskonalenie techniki badawczej, a zwłaszcza zastosowanie nowych metod wykrywania wirusów opartych o badania molekularne. Należy również poszukiwać skutecznych metod eliminacji wirusów, zwłaszcza z wody przeznaczonej do spożycia.

Tradycyjne metody detekcji wirusów (hodowle komórkowe) są uciążliwe, pracochłonne i kosztowne i coraz częściej są one zastępowane metodami sprawniejszymi, czulszymi i doskonalszymi metodami biologii molekularnej. Celem artykułu była odpowiedź na pytanie czy wirusy przenoszone drogą wodną stanowią zagrożenie dla zdrowia i życia ludzi oraz czy istnieje konieczność włączenia do rutynowej kontroli jakości wody badań wirusologicznych.

## 2. MOŻLIWOŚĆ USUWANIA WIRUSÓW W PROCESIE UZDATNIANIA I DEZYNFEKЦИИ WODY

Ujmowanie wód powierzchniowych czy infiltracyjnych do celów wodociągowych wiąże się z obecnością w niej zarówno szkodliwych związków chemicznych jak i drobnoustrojów. Przed wprowadzeniem do sieci wodociągowej należy ją poddać procesowi uzdatniania. Podstawowym celem uzdatniania wody jest skuteczne eliminowanie zanieczyszczeń, patogenów, a także związków ulegających biodegradacji przed końcowym etapem jakim jest dezynfekcja, a także jej utrzymanie na odpowiednim poziomie podczas dystrybucji do odbiorcy (zabezpieczenie przed wtórnym zanieczyszczeniem) [1].

Zanieczyszczenie wody przeznaczonej do spożycia przez wirusy może być spowodowane przedostaniem się ich do wody wraz z wydzielinami ludzi zainfekowanych. Niezwykle liczne i ważne dla zdrowia są wirusy, które infekują przewód pokarmowy.

Najczęściej wirusy są przekazywane z otoczenia do wody wraz z fekaliami. Badania prowadzone w Niemczech w latach dziewięćdziesiątych wykazały, że dopuszczalne mikrobiologiczne wskaźniki wodne takie jak *E. coli* czy enterokoki nie wykluczają skażenia wirusowego, które nie jest określane normami. Typowe procesy uzdatniania, w tym chlorowanie, nie wykazują całkowitej eliminacji wirusów, mogą jedynie spowodować ich inaktywację. Dlatego istnieje możliwość, że zakaźne wirusy po oczyszczeniu ścieków pozostaną i będą stanowiły ewentualne źródło zanieczyszczenia wód. W konsekwencji tego wirusy jelitowe są obecne w zanieczyszczonej wodzie powierzchniowej i gruntowej, wykorzystywanej jako zasoby wody uzdatnianej do spożycia [2, 3].

Tabela 1. Skuteczność procesów oczyszczania wody w usuwaniu domieszek i zanieczyszczeń [5]

| Zanieczyszczenie<br>lub wskaźnik | Rodzaj i skuteczność procesów, % |  |                    |                   |          |                               |                           |                         |                     |                |                |             |
|----------------------------------|----------------------------------|--|--------------------|-------------------|----------|-------------------------------|---------------------------|-------------------------|---------------------|----------------|----------------|-------------|
|                                  | napowietrzanie                   | Koagulacja<br>+sedymentacja<br>+ filtracja | zmiękczenie wapnem | wymiana<br>jonowa |          | adsorpcja                     |                           |                         | procesy membranowe  |                |                | dezynfekcja |
|                                  |                                  |  |                    | kationity         | anionity | granulowany<br>węgiel aktywny | pylisty węgiel<br>aktywny | aktywny<br>tlenek glinu | odwrócona<br>osmoza | ultrafiltracja | elektrodializa |             |
| Wirusy                           | 0–20                             | 60–100                                     | 60–100             | 0–20              | 0–20     | 0–20                          | 0–20                      | 0–20                    | 90–100              | 60–90          | 60–100         | 60–100      |

Uzdatnianie wody może w istotnym stopniu obniżyć ilość wirusów w wodzie, jednakże proces ten nie jest w stanie ich całkowicie usunąć z bardzo dużych objętości wody. Badania nad eliminacją wirusów z wody z wykorzystaniem środków dezynfekcyjnych zaczęto prowadzić już w latach sześćdziesiątych. Lowtsewicz próbował usunąć enterowirusy z wody wodociągowej przy użyciu chloru, promieni UV, a także promieni  $\alpha$ . Do procesu końcowego uzdatniania, jakim jest dezynfekcja, najczęściej jest stosowany chlor wolny lub dwutlenek chloru. Jednakże działanie chloru na wirusy jest ograniczone. Stosowane dawki chloru są w stanie wyeliminować z wody mikroorganizmy takie jak np. *E. coli*, natomiast nie są w stanie usunąć wirusów, mogą jedynie zmniejszyć ich ilość, gdyż wirusy są odporne na chlor. Ta zwiększona odporność powoduje, że aby zniszczyć całkowicie wirusy w wodzie, dawka chloru lub kwasu podchloraowego musiałaby być ponad 20 razy większa niż dawka zabijająca bakterie. Często stosowanym dezynfektantem- od końca lat 80-tych – jest dwutlenek chloru, który inaktywuje wirusy ECHO i *Coxsackie*, ale podczas jego stosowania powstają niebezpieczne dla ludzi chloryny i chlorany. W trakcie usuwania wirusów z wody najlepsze efekty uzyskuje się stosując ozon, ale nie spełnia on jednego z podstawo-

wych celów dezynfekcji jakim jest zapewnienie stabilności biologicznej w sieci wodociągowej, co wiąże się z koniecznością użycia dodatkowych dezynfektantów [4]. Skuteczność usuwania wirusów w procesie oczyszczania wody przedstawiono w tabeli nr 1.

### 3. ZAGROŻENIA DLA CZŁOWIEKA SPOWODOWANE OBECNOŚCIĄ WIRUSÓW W WODZIE

Woda spełnia istotną rolę w przenoszeniu wielu mikroorganizmów chorobotwórczych dla człowieka. Rola ta jest zależna od dostatecznie długiego czasu utrzymania się w wodzie wirulentnych czynników chorobotwórczych. Czas ich obecności w wodzie jest zależny od wielu aspektów. W przypadku wirusów należałoby wymienić tu przede wszystkim zmianę termicznych warunków, panujących w wodzie. Wszystkie mikroorganizmy chorobotwórcze to mezofile; ich optymalna temperatura wzrostu i rozwoju mieści się w granicach 30–40°C. Specyficzna budowa wirusów powoduje, że mogą zachowywać swoje właściwości infekcyjne w wodzie w temperaturze wyraźnie niższej. Istotnym czynnikiem jest również stopień zanieczyszczenia wody, a szczególnie obecność w niej związków chemicznych [13].

Tabela 2. Rodzaje wirusów występujących w wodzie [15]

| Rodzina               | Rodzaj   | Typowy gatunek               | Gospodarz |
|-----------------------|--|------------------------------|-----------|
| <i>Caliciviridae</i>  | wirus powodujący wirusowe zapalenie wątroby typu E | <i>Hepatitis E virus</i>     | kręgowce  |
|                       | wirus Norwalk                                      | <i>Norwalk virus</i>         | kręgowce  |
|                       | <i>Calcivirusy</i>                                 | <i>HuCV</i>                  | kręgowce  |
| <i>Picornaviridae</i> | <i>Enterovirus</i>                                 | <i>Poliovirus</i>            | kręgowce  |
|                       | <i>Hepatovirus</i>                                 | <i>Hepatitis virus A</i>     | kręgowce  |
|                       | <i>Parechovirus</i>                                | <i>Human echovirus</i>       | kręgowce  |
|                       | <i>Coxsackie A</i>                                 | -                            | kręgowce  |
|                       | <i>Coxsackie B</i>                                 | -                            | kręgowce  |
| <i>Astroviridae</i>   | <i>Astrovirus</i>                                  | <i>Human astrovirus</i>      | kręgowce  |
| <i>Reoviridae</i>     | <i>Rotavirus</i>                                   | <i>Simian rotavirus SA11</i> | kręgowce  |
| <i>Adenoviridae</i>   | <i>Aviadenovirus</i>                               | -                            | kręgowce  |

Wirusy są bardzo rozpowszechnione w przyrodzie. Mogą znajdować się zarówno w wodach stojących, płynących, gruntowych, jak również w powietrzu atmosferycznym czy glebie. Na ich żywotność w środowisku wpływa temperatura, nasłonecznienie-

nie, wilgotność, wartość pH, jak również pora roku [14]. Najczęściej spotykane wirusy wodne zestawiono w tabeli nr 2 [15].

Wirusy i bakterie chorobotwórcze dostają się do wód powierzchniowych wraz ze ściekami bytowo-gospodarczymi jak również wodami opadowymi. Nie mogą się one namnażać w wodzie; jedynie mogą przeżyć poza ustrojem chorego krótki okres czasu. Okres ten umożliwia rozprzestrzenianie się chorób infekcyjnych poprzez wodę. Aby nastąpiło zakażenie zdrowego człowieka wymagane jest wprowadzenie pewnej ilości wirusów, która określana jest minimalną dawką zakaźną [16].

Wiedza o cechach i schorzeniach wirusowych jest niezbędna każdemu, kto potrzebuje zrozumieć ryzyko zetknięcia się z nimi, zobaczyć zakres ich szkodliwości oraz działanie, jakie jest przedstawione w wytycznych WHO dotyczącej wody przeznaczonej do spożycia [7]. Przebieg procesu zakażenia organizmu przez wirusy to w głównym stopniu wypadkowa suma procesów namnażania (adsorpcji, wnikania, ekspresji genów, replikacji materiału genetycznego oraz powstawania potomnych cząstek wirusowych) wraz z przeciwdziałającymi im czynnikami odpornościowymi organizmu. Wynik takich działań obserwuje się przebiegiem procesu zakażenia, czasem trwania oraz ostrością objawów jakie mu towarzyszą. Infekcja wirusowa może mieć krótkotrwały przebieg, jak i może być procesem, który trwa całe życie (często zaczyna się jeszcze przed urodzeniem). Zakażenie często też przebiega w sposób bezobjawowy, dlatego jest bardzo ciężkie do zdiagnozowania [15].

Bardzo często choroby o bardzo podobnych objawach są powodowane przez wirusy, które należą do zupełnie różnych grup taksonomicznych. Podstawowe rodzaje wirusów występujących w wodzie zostały przedstawione w tabeli nr 3 wraz z wywoływanymi przez nie choroby.

Tabela 3. Choroby przenoszone przez wirusy drogą wodną [ 17–19, 24, 25]

| Czynnik chorobotwórczy | Schorzenie  | Objawy   |
|------------------------|---|--|
| Hepatitis A            | zapalenie wątroby typ A                                   | gorączka, złe samopoczucie, żółtaczka  |
| Wirus typu Norwalk     | zapalenia żołądkowo-jelitowe                              | biegunka, wymioty, bóle brzucha, gorączka                                      |
| rotawirusy             | zapalenia żołądkowo-jelitowe                              | biegunka, wymioty, odwodnienie organizmu, wysoka gorączka                      |
| ECHO                   | zapalenia żołądkowo-jelitowe                              | biegunka, zapalenie spojówek,  |
| Coxackie               | choroby serca i dróg oddechowych, choroby układu krążenia | zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, mięśnia sercowego i układu oddechowego     |
| polio                  | Choroba Heinego-Medina                                    | wysoka gorączka, wymioty, sztywność karku i pleców, porażenie mięśni rąk i nóg |
| astrowirusy            | zapalenie żołądka i jelit                                 | zazwyczaj samowyleczalne choroby żołądkowo-jelitowe                            |
| adenowirusy            | zapalenie żołądka   | zapalenie spojówek i gardła, gorączka, nieżyt gardła                           |

#### 4. WYBRANE METODY WYKRYWANIA I OZNACZANIA WIRUSÓW W WODZIE

Badania rutynowe wody oraz ścieków na obecność wirusów jelitowych nie są prowadzone. Jednakże w wyjątkowych okolicznościach takich jak ogniska chorób czy specjalistyczne badania naukowe może być rozsądne i uzasadnione przeprowadzenie testów na obecność wirusów. Bardzo często niektóre z tych metod związane są z dużą ilością specjalistycznego sprzętu do przetwarzania próbek i oznaczenia wirusa, a jego identyfikacja zwykle związana jest z hodowlą komórkową. Wykrywanie wirusów w wodzie, odbywające się poprzez odzysk zakaźnego wirusa ma zazwyczaj trzy główne kroki:

- zebranie reprezentatywnej próbki,
- koncentrację wirusów w próbce oraz ich identyfikację,
- oszacowanie ilości koncentratu.

Podczas wykrywania wirusów w środowisku wodnym można napotkać szereg problemów, do których należą przede wszystkim małe rozmiary wirusa (ich średnica mieści się w przedziale od 20 do 100nm), niskie stężenie i zmienność wirusów obecnych w wodzie, a także ich zmienność genetyczna, obecność różnych innych rozpuszczonych jednostek w wodzie, które kolidują z procedurami wykrywania wirusów, oraz ograniczenia związane z szacowaniem i identyfikacją wirusa [3].

Wykrywanie wirusów w wodach opiera się zazwyczaj na zateżnieniu próbek, a następnie hodowanie w odpowiednich komórkach gospodarza, prowadzenie technik immunologicznych czy stosowanie mikroskopii elektronowej. Niestety metody te są bardzo czasochłonne, niedokładne, kosztowne i zachodzi w nich konieczność obecności wykwalifikowanego personelu, dlatego częściej wykorzystywane są techniki oparte na hodowlach komórkowych, do których można zaliczyć przede wszystkim identyfikację bez wszczepienia do wrażliwych systemów, mikroskopię elektronową i immunomikroskopię, hemaglutynację bierną – test SPACE oraz testy molekularne (PCR, Multiplex PCR, Real-time PCR) [6, 23].

Podczas oznaczania wirusów w drodze testów łyśinkowych używana jest najczęściej jednowarstwowa hodowla komórkowa, która jest zaszczipiana badanym materiałem z wirusem i oczekuje na jego adsorpcję. Zawiesina wirusa w odpowiednim rozcieńczeniu powoduje powstanie okrągłych, przejaśnionych pól w warstwie komórek, czyli łyśinki, a także powoduje zmiany morfologiczne, które można zaobserwować pod mikroskopem świetlnym – efekt taki uzyskuje się zalewając warstwę komórkową agarem z barwnikiem przyżyciowym. łyśinki mogą zostać policzone w celu ustalenia ilości zakaźnych wirusów w zawiesinie wyjściowej. Wadą tej metody jest selektywność, gdyż większości wirusów nie potrafimy hodować (np. wirusy z rodziny *Caliciviridae*) oraz brak możliwości wykrycia wirionu, który został pozbawiony otoczki przez przeciwciała. Jest to metoda, którą warto stosować, gdyż pozwala ona

na wykrycie wirusów, których obecności w badanym miejscu się nie spodziewano lub takich, które nie były dotychczas poznane [6, 20].

Klasyczne techniki identyfikacji, polegające na hodowlach komórkowych, nie są jedyne. Równoległe z nimi, prowadzone są metody, bazujące na reakcjach immunologicznych: immunomikroskopii, mikroskopii elektronowej i hemaglutynacji biernej.

#### 4.1. MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA I IMMUNOMIKROSKOPIA

Metody mikroskopii elektronowej i immunomikroskopii bazują na wprowadzeniu próbki do analizy w kontakcie z surowicą, zawierającą przeciwciała skierowane przeciw danemu typowi wirusa. Obecność wirusa można stwierdzić przez pojawienie się kompleksu wirus-przeciwciała. Takie połączenie można obserwować przy pomocy mikroskopu elektronowego. Mikroskop elektronowy może być używany jako osobna metoda identyfikująca wirusy w wodzie. Ograniczeniem tej metody jest możliwość wykrywania tylko wirusów, które mają charakterystyczną budowę np. rotawirusów [8].

#### 4.2. TEST SPACE

Test SPACE (hemaglutynacja bierna) oparty jest na segregacji stałej sprzężonych erytrocytów i jest prowadzony w dwóch etapach. W pierwszej fazie immunologicznej, przeciwciała skierowane jest przeciwko studzienkom mikropłytki. Próbki, które mają być dalej analizowane są kierowane do inkubatora. W tej fazie wirus, który jest obecny w próbce łączy się z przeciwciałem, w efekcie czego powstaje kompleks antygen-przeciwciała. Po usunięciu pozostałości próbki z każdej studzienki płytki, wirusy zostaną jako kompleksy przymocowane do przeciwciał. W drugim etapie – zwanym także fazą ujawnienia – erytrocyty połączone z przeciwciałami są identyczne z tymi, które są dołączone do studzienek. Przeciwciała łączą się z wirusami, tworząc nowe kompleksy antygeny-przeciwciała, które są uwidocznione przyczepnością erytrocytów do ścianek studzienki. Metoda ta została wykorzystana po raz pierwszy w 1979 roku przez Brandburne'a i może być stosowana do wykrycia rotawirusów w studniach [8].

#### 4.3. METODA IMMUNOLOGICZNO-ENZYMATYCZNA

W metodzie immunologiczno-enzymatycznej wykorzystywane jest znakowanie i obecność enzymu wskazującego reakcję. Jest to jeden z najczęściej stosowanych testów do badań naukowych i diagnostycznych. Nowoczesne podejścia, najczęściej stosowane, są w większości miniaturyzacją tej metody. Polega ona na wykorzystaniu dwóch przeciwciał, z których jedno jest przyłączone do podłoża (jego zadaniem jest

wychwycenie antygeny z próbki), natomiast drugie jest dodane (jego funkcją jest przyłączenie się do immobilizowanego na powierzchni-przez pierwsze przeciwciało-antygeny i wygenerowanie sygnału). Do tego celu można użyć przeciwciał z innych gatunków zwierząt lub stosując cząstki znakowane przy użyciu biotyny. Podczas wykrywania mierzy się aktywność enzymatyczną w poszczególnych dołkach 96-cio dołkowej płytki. Metoda ta jest tania, stosunkowo prosta w wykonaniu oraz dzięki możliwości automatyzacji nadaje się do badań posiewowych stosowanych na większą skalę [9].

#### 4.4. PCR

PCR- technika oparta o amplifikację DNA. Reakcja łańcuchowa polimerazy, to obecnie jedna z najczęściej wykorzystywanych metod podczas identyfikacji drobnoustrojów wodnych oraz wirusów. W metodzie tej wykorzystywany jest enzym polimeraza, który może utworzyć wiele kopii docelowego DNA. Genom wirusa jest wykrywany przy pomocy krótkich odcinków syntetycznej nici, czyli tzw. starterów oligonukleotydowych, które mogą być selektywne w stosunku do wirusów. Metoda ta znajduje swoje zastosowanie głównie przy niewielkich ilościach wirusa w małych objętościach wody, a do jej zalet można zaliczyć zmniejszenie czasu i kosztów przetwarzania. Charakteryzuje się ona także większą czułością niż tradycyjne metody, opierające się na zakażeniu żywych komórek. Metoda PCR jest głównie stosowana w środowisku do wykrywania wirusów jelitowych z wód. Przy zastosowaniu tej metody, podczas jednej reakcji, można wykryć kilka różnych wirusów, poprzez zastosowanie różnych par starterów. Podczas wykrywania wirusów bezpośrednio z wody stosuje się najpierw ekstrakcję, a następnie amplifikację z wody. Przy pomocy metody PCR wykrywa się głównie takie wirusy jak: wirus zapalenia wątroby typu A, polio, kalciwirusy (wirus *Norwalk*), enterowirusy, adenowirusy, astrowirusy i rotawirusy. Ponadto, używając metody PCR można wykryć astrowirusy ze znacznie większą czułością niż podczas stosowania mikroskopii elektronowej, a także identyfikować różne serotypy rotawirusów- niezwykle ważna informacja z punktu widzenia badań epidemiologicznych przy infekcjach wirusowych [10, 21, 22].

#### 4.5. MULTIPLEX PCR

W testach Multiplex PCR stosuje się kilku zestawów starterów, co umożliwi amplifikację kilku matryc w czasie jednej reakcji PCR. Takie rozwiązanie prowadzi do oszczędności czasu i znacznego zmniejszenia kosztów, gdyż podczas pojedynczego testu PCR może być wykryte kilka typów wirusów. Opracowanie tego testu nie jest proste, gdyż wymagana jest optymalizacja warunków prowadzonej reakcji oraz

mieszaniny PCR. Metoda ta może służyć do wykrywania enterowirusów, rotawirusów czy wirusów zapalenia wątroby [11, 22].

#### 4.6. REAL-TIME PCR

Metoda Real-time PCR -zapewnia dane ilościowe na obecność genomów wirusów jelitowych, poprzez wykorzystanie barwnika fluorescencyjnego, takiego jak SYBR Green- które łączy się ze wzmocnieniem cDNA lub fluorochromem (cząsteczki zdolnej do fluorescencji) oznaczonych sond. Wykorzystane metody znakowania oznaczają się zróżnicowanym poziomem fluorescencji podczas połączenia z danym fragmentem DNA, co powoduje, że fluorescencja jest tym silniejsza im więcej powstanie kopii. Procedura jest mniej pracochłonna, gdyż nie jest wymagany etap potwierdzenia. Cała analiza może być wykonana w układzie zamkniętym, co może zmniejszyć zdolność zanieczyszczania. Zamknięte testy Real-time PCR wykazały skuteczność wykrywania porównywalną, a czasem nawet większą niż konwencjonalne PCR, jednakże zasadniczym ograniczeniem tej metody jest bardzo drogi sprzęt [12].

### 5. PODSUMOWANIE

Wirusy to niebezpieczne patogeny jelitowe, przedostające się bezpośrednio lub pośrednio do wody wraz z wydaliniami zakażonych ludzi i mogą wywoływać wiele schorzeń. Infekcje jakie powodują są najczęściej związane z układem pokarmowym- biegunka, wymioty- ale mogą także wywołać zapalenie spojówek, wątroby czy nawet mózgu. Ze względu na ryzyko związane z ich obecnością w wodzie; powinno się całkowicie pozbawić wodę wirusów chorobotwórczych. Deficyt wód dobrej jakości w Polsce, wymusza ujmowanie zanieczyszczonych wód powierzchniowych, co wiąże się z trudnością w ich uzdatnianiu. Przed badaniami na obecność wirusów kluczową rolę odgrywa zateżnienie próbek wody. Ze względu na rozmiary wirusów oraz ich ilość w wodzie ta czynność jest konieczna i pozwala uzyskać lepsze wyniki.

Identyfikacja wirusów w wodzie wyróżnia techniki oparte na hodowli komórkowej (oznaczanie wirusów w drodze testów lysinkowych) oraz mikroskopię elektronową, immunomikroskopię, test SPACE, metodę immunologiczno-enzymatyczną, a także metody molekularne jak np. PCR.

Techniki identyfikacji bez wszczepienia do wrażliwych systemów bazują w głównym stopniu na reakcjach immunologicznych, w których dochodzi do wytworzenia kompleksu: wirus-przeciwciało. Alternatywą dla tych metod stały się testy molekularne, które wykazują się większą czułością niż hodowle komórkowe, a podczas jednej reakcji, poprzez zastosowanie różnych par starterów, można wykryć kilka różnych wirusów. Identyfikacja wirusów w wodzie przeznaczonej do spożycia jest prowadzo-

na fragmentarycznie głównie ze względu na przekonanie, że końcowy etap uzdatniania – dezynfekcja – niszczy wszystkie wirusy obecne w wodzie, a także z uwagi na wysokie koszty badań związanych z ich detekcją. Jednakże z uwagi na zagrożenia chorobowe jakie wywołują (ostre infekcje układu pokarmowego), konieczna jest ich identyfikacja, a także stały monitoring poprzez wprowadzenie określenia ich obecności jako badania koniecznego przed skierowaniem wody do sieci wodociągowej.

## 6. WNIOSKI

Dane literaturowe pozwoliły ocenić zagrożenia wywołane przedostaniem się wirusów do sieci wodociągowej w wyniku uzdatniania wody w niedostatecznym stopniu.

1. Deficyt wód dobrej jakości w Polsce sprawia, że bardzo często na cele wodociągowe ujmowane są zanieczyszczone wody powierzchniowe.
2. Wirusy wodne powodują głównie choroby układu pokarmowego, a także infekcje dróg oddechowych, zapalenie spojówek, wątroby i chorób, które mają wysoki wskaźnik śmiertelności.
3. Ciąg technologiczny uzdatniania wody zmniejsza ilość wirusów, jednakże bardzo często nie uzyskuje się ich całkowitej eliminacji, gdyż absorbują one na pozostałych zanieczyszczeniach stałych.
4. Najczęściej stosowanym dezynfektantem jest chlor wolny lub dwutlenek chloru, jednakże ich działanie na wirusy jest ograniczone, a ich całkowita likwidacja możliwa wyłącznie przy zwiększonych dawkach dezynfektantów, które nie są bezpieczne dla odbiorcy.
5. Zateżenie próbek wody z wirusami pozwala na zastosowanie metod ich wykrycia, a także na uzyskanie materiału do badań i diagnostyki chorób, które są przez nie wywołane.
6. Testy molekularne wykazują większą czułość niż hodowle komórkowe, a podczas jednej reakcji, można wykryć kilka różnych wirusów nawet z różnych rodzin, jednakże metody te są drogie.
7. Ocena jakości sanitarnej wody opiera się wyłącznie na wskaźnikach takich jak oznaczenie *E. coli*, enterokoków i *E. coli* typu kałowego oraz całkowitej ocenie jakości mikrobiologicznej wody, jednak bakteryjne wskaźniki nie zawsze odzwierciedlają ryzyko chorobotwórcze wynikające z obecności wirusów, dlatego konieczne są badania na ich obecność w wodzie.

*Praca współfinansowana w ramach badań statutowych S40-029.*

## LITERATURA

- [1] PREVOST M., ROMPRE A., COALLIER J.,SERVAIS P., LAURENT P.,CLEMENT B., LAFRANCE P., *Suspended bacterial biomass and activity in full-scale drinking water*, Water Research, 1998, Vol. 32, 1393–1406.
- [2] DONGDEM J.T. , SOYIRI I., OCLOO A., *Public health significance of viral contamination of, African Journal of Microbiology Research*, 2009, Vol. 3, No. 12, 856–861.
- [3] Association, America Public Health, *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater: Detection of Enteric Viruses in Water and Wastewater*, 21st Edition APHA, 2005, 969–975.
- [4] KOCWA-HALUCH R., *Wirusologia w inżynierii środowiska*, Politechnika Krakowska im. Tadeusza Kościuszki, Kraków 2002.
- [5] KOWAL A., ŚWIDERSKA-BRÓŻ M., *Oczyszczanie wody. Podstawy teoretyczne i technologiczne, procesy i urządzenia*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2007, 85–110.
- [6] COLLIER L., OXFORD J., *Wirusologia, podręcznik dla studentów medycyny, stomatologii i mikrobiologii*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL , 47–47.
- [7] KOCWA-HALUCH R., *Wirusy i ich występowanie w wodach i ściekach*, Politechnika Świętokrzyska w Kielcach, Kielce 2001.
- [8] BLOCK J.C., SCHWARTZBROD L., *Viruses in Water Systems Detection and Identification: Concentration Method*, New York , VCH Publishers, 1989, 33–48.
- [9] SAVILLE R., CONSTANTINE N., CLEGHORN F., BARTHOLOMEW, EDWARDS J., GOMEZ P., LATTNER W., *Fourth-generation enzyme-linked immunosorbent assay for the simultaneous detection of human immunodeficiency virus antigen and antibody*, Vol. 39, 2518.
- [10] NASSUTH A., POLLARI E., HELMECZY K., STEWART S., KOFALVI S., *Improved RNA extraction and onetube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extract*, J. Virol. Methods, Vol. 37.
- [11] FONG T.,LIPP E., *Enteric Viruses of Humans and Animals in Aquatic Environments: Health Risks, Detection, and Potential Water Quality Assessment Tools*, Microbiology and Molecular Biology Reviews, Vol. 69, 357–371.
- [12] M. McPHERSON M., MOLLER S., *PCR second edition*. Teylor& Francis, 209–216.
- [13] BIŁOZA, NAWROCKI ( red.), *Uzdatnianie wody, Procesy chemiczne i biologiczne*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Poznań 2000.
- [14] JABŁOŃSKI L. (red), *Wirusologia kliniczna*, PZWL, Warszawa 1972.
- [15] PIEKAROWICZ A., *Podstawy wirusologii molekularnej*, Wydawnictwo Naukowe PWN,Warszawa 2004.
- [16] PAWLACZEK-SZPILKOWA M., *Jakość zdrowotna wody przeznaczonej do spożycia*, Tom 50, 11–15, Wrocław 1993.
- [17] KAŃTOCH M., *Wirusologia lekarska*, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Łódź 1998, 477–491.
- [18] MURRAY P.R., KEN S. R., Pfaller M A., *Mikrobiologia medyczna*, MOSBY, 577–634.
- [19] KOWAL A., *Pasożyty-zagrożenia publicznego zaopatrzenia w wodę*, Ochrona środowiska, 1995, Wrocławska Oficyna Wydawnicza, Vol. 57, No. 2.
- [20] REPORT OF A WHO Scentific Group, Human viruses in water, wastewater and soil, Series 639, Geneva 1979.
- [21] HRYNISZYN A., SKONIECZNA M., WISZNIOWSKI J., *Methods for Detection of Viruses In Water and Wastewater*, 2013, Vol. 3, 442–449.
- [22] Li W., Wang X., Yuan, Zheng J. L., Jin M., Song N., et al., *Detection of Enteroviruses and Hepatitis a Virus in Water by Consensus Primer Multiplex, RTPCR*, Word Journal of Gastroenterology, 2002, Vol. 8, No. 4, 699–702.

- [23] STRAUB T., J. PEPPER L., GERBA C.P., *Comparison of PCR and Cell Culture for Detection of Enteroviruses in Sludge of Their Transport*, Applied and Environmental Microbiology, 1995, Vol. 61, No. 5, 2066–2068.
- [24] GUYADER F.S.LE, OLIVIER J., LE SAUX J.C., GARRY P., *Human enteric viruses and environmental waters*, ELSEVIER, Revue Francophone des Laboratoires, Vol. 2014, No. 459, 41–49.
- [25] ESTERS M.K., DESSELBERGER U., *Rotaviruses: cause of vaccine-preventable disease ye many fundamental questions remain to be explored*, ELSEVIER, Vol. 2012, 369–372.

#### VIRUSES IN WATER – THE RISKS AND THE CONTROL METHODS

In surface and infiltration water, which is taken to drink, harmful chemical compound and microorganisms could be observed. Water treatment process can significantly reduce the amount of viruses, but cannot not remove them completely from very large volumes of water, therefore there is a need for extensive research on the virus and the development of water quality standards which would take into account of this issue. The presence of viruses in drinking water causes the most common infections associated with GI (diarrhea, vomiting), but can also cause conjunctivitis, hepatitis or even inflammation of the brain. Water treatment should be completely deprived of water pathogenic viruses due to the significant risk to consumers. Nowadays, viruses in water are detected by techniques based on cell culture and electron microscopy immunomicroscopy, passive hemagglutination – SPACE test and molecular tests (PCR, multiplex PCR, real-time PCR).