

## **Контроль вирусного загрязнения водных объектов**

Доскина Т.В., к.м.н., Дмитриева Р.А., к.б.н, ГУ НИИ экологии человека и гигиены окружающей среды им. А.Н. Сысина РАМН.

### **Представлены современные методы и показатели санитарно-вирусологического контроля водных объектов**

Интенсивное загрязнение поверхностных источников централизованного водоснабжения, обусловленное недостаточной надежностью существующих технологий очистки и обеззараживания сточных вод и ростом неконтролируемых локальных стоков, отсутствие или несоблюдение зон санитарной охраны водоисточников, нарушения в системах водоподготовки питьевой воды и ее подачи потребителям привело к неблагоприятной санитарно-эпидемической ситуации в отношении кишечных вирусных инфекций. Одним из путей решения проблемы является усиление контроля за эпидемической безопасностью водных объектов. Эпидемическая безопасность воды различного вида водопользования по вирусологическим показателям регламентируется документами водно-санитарного законодательства, которые включают как перечень нормируемых показателей, так и методы их контроля. Перечень санитарно-вирусологических показателей качества водных объектов включает:

- кишечные вирусы (энтеровирусы и аденовирусы, выделяемые в культурах ткани);
- антигены ротавирусов и вируса гепатита А в качестве маркеров вирусной контаминации;
- РНК вирусов гепатита А, ротавирусов, энтеровирусов (определяемые методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) со стадией обратной транскрипции (ОТ-ПЦР) и ДНК аденовирусов, определяемые методом ПЦР);
- колифаги - в качестве индикаторов вирусного загрязнения воды.

В России, как и в других странах, рутинный контроль осуществляется на основе принципа использования санитарно-показательных микроорганизмов. С этой целью в системе вирусологического мониторинга используют колифаги, которые по способу жизнедеятельности являются бактериальными (1), а по месту обитания – кишечными вирусами (3). По своим свойствам они полностью отвечают требованиям, предъявляемым к индикаторным микроорганизмам: не патогенны и безопасны для человека; имеют единый с энтеровирусами источник поступления в окружающую

среду; по размерам, морфологической структуре и физико-химическим параметрам, устойчивости к факторам окружающей среды и дезинфектантам наиболее близки к вирусам; обнаруживаются во всех водных объектах, где встречаются вирусы. Концентрация колифагов в воде на 2-3 порядка превышает концентрацию вирусов, что указывает на наличие «гигиенического запаса», необходимого для индикаторного микроорганизма. С 1981 г. колифаги регулярно включаются в различные документы водно-санитарного законодательства.

В настоящее время контролю подлежит общая группа, включающая РНК- и ДНК-содержащие колифаги. Это вызвано тем, что группа РНК-содержащих колифагов является наиболее устойчивой к воздействию различных физико-химических факторов окружающей среды и дезинфектантов, а группа ДНК-содержащих колифагов преобладает в водных объектах по их количественному содержанию. В соответствии с существующими нормативными документами, колифаги должны отсутствовать в 100 мл питьевой воды, воды плавательных бассейнов, сточной воды после очистки и обеззараживания. В воде поверхностных источников централизованного водоснабжения для колифагов установлен регламент не более 10 в объеме 100 мл.

В основу методов индикации колифагов, рекомендуемых для исследования воды разной степени загрязнения, положен принцип полного исследования нормируемого объема.

Для анализа питьевых вод на наличие колифагов разработаны три метода. Для альтернативной оценки «есть-нет» предложен метод обогащения исследуемого объема 100 мл с внесением 10-кратного мясо-пептонного бульона (МПБ), содержащего кишечную палочку *E. coli* К 12F<sup>+</sup> 3254 (*E. coli*), и последующим высевом на мясо-пептонный агар (МПА), содержащий *E. coli*. Наличие даже одной бляшки на МПА свидетельствует о присутствии колифагов в воде, и проба считается положительной, т.е. нестандартной по косвенному вирусологическому показателю. Преимуществом метода является небольшая себестоимость по количеству используемой посуды, МПБ и МПА, а также возможность одномоментного исследования большого количества проб. Недостаток – длительность анализа, результат получают на третьи сутки.

Для количественной оценки разработан титрационный метод, в основе которого также лежит принцип обогащения. При этом. 100 мл пробы предварительно разливают по объемам: 50 мл и 5 объемов по 10 мл, в которые вносят 10-кратный МПБ, содержащий *E. coli*. Через 16-18 часов производят высеивание на чашку Петри с МПА, содержащим *E. coli*. Результаты учитывают по таблице НВЧ.

Преимуществом метода является возможность количественной оценки содержания колифагов в нормируемом объеме воды. Недостатком – его трудоемкость и получение результатов на третьи сутки.

Для количественной оценки содержания колифагов в питьевой воде используют прямой метод, который заключается в высеве всего нормируемого объема воды в чашки Петри (по 20 мл на 5 чашек). Достоинством метода является экспрессность (первые бляшки для ответа «есть» появляются через 6 часов). Окончательное количество колифага в воде подсчитывают через 16-18 часов. Недостаток метода заключается в необходимости предварительной оценки способности используемого МПА давать плотное агаровое покрытие при заливке 20 мл пробы.

Количественные методы рекомендуется использовать при оценке работы систем водоподготовки, при неблагоприятной санитарно-эпидемической ситуации, при авариях и т.д.

Для контроля воды поверхностных водоемов, включая воду водоисточников и для рекреационного водопользования, а также воду в черте населенных мест используют только метод прямого посева. При этом пробу воды предварительно хлороформируют для освобождения ее от посторонней микрофлоры. Так же, как и при исследовании питьевых вод, метод позволяет получать количественную оценку через 16-18 часов.

Для контроля качества сточных вод, прошедших очистку и обеззараживание, или на их отдельных этапах используют метод прямого посева с предварительной обработкой пробы хлороформом для освобождения от сопутствующей микрофлоры. При высокой степени загрязнения пробы допускается использование для посева соответствующих десятикратных разведений. Метод позволяет количественно оценить содержание колифагов в сточной воде через 16-18 часов.

Все описанные методы индикации колифагов в воде предусматривают контрольные исследования на качество используемой детекторной культуры *E. coli* K12 F<sup>+</sup> 3254, которую приобретают во Всероссийской Коллекции промышленных микроорганизмов (ГНИИ Генетика).

Присутствие колифагов в исследуемой воде выше нормируемого уровня свидетельствует о возможном ее инфицировании энтеровирусами, что требует проведения контроля эпидемической безопасности воды по непосредственному выделению энтеровирусов. Наиболее объективным показателем эпидемической безопасности воды в отношении кишечных вирусных инфекций является отсутствие в контролируемом объеме вирусов. Для этих

целей разработаны методы индикации энтеровирусов в водах разной степени загрязнения, различающиеся как по контролируемому объему исследуемой пробы, так и по способу концентрирования вирусов из больших объемов воды.

Этап концентрирования вирусов предусматривается при исследовании любых вод в связи с тем, что уровни вирусов в водных объектах незначительны, хотя вызвать заболевание у человека может даже одна вирусная частица, содержащаяся в воде. Перечень методов концентрирования и область их применения представлены в таблице 1. Выбор метода в вирусологическом мониторинге определяется как задачами исследования, так и оснащенностью лаборатории, осуществляющей анализ.

Для исследования воды водопроводной, бутылированной, из подземных водоисточников, бассейнов разработан метод концентрирования вирусов с использованием фильтрующих мембран типа ФМНЦ и ММК и фильтрационной установки. Время концентрирования 10 л воды составляет в среднем 1,5-2 часа с последующей 2-кратной механической элюцией 3% бифэкстрактом на трис-буфере с рН 9,1-9,5 и доведением рН элюата до нейтральных значений

Для концентрирования вирусов из чистых вод, воды поверхностных водоемов и сточных вод можно использовать метод сорбции на ионообменных смолах (аниониты АВ-17-8), которые предварительно обрабатывают по специальной методике. Концентрирование осуществляется самотеком воды через колонку со смолой высотой 10-12 см, регулирование скорости воды осуществляется системой шлангов. Время концентрирования 10 литров воды составляет 16-18 часов. Элюцию производят 0,5 М раствором фосфатного буфера с рН 8,2 при комнатной температуре в течение 1 часа с последующим доведением рН до нейтральных значений.

Для повышения эффективности выделения вирусов из проб питьевой воды и воды водоисточников на ионообменной смоле можно использовать модифицированный 2-этапный метод концентрирования. Этот метод включает сорбцию на ионообменной смоле АВ-17 с гидроксидом алюминия и на втором этапе – вторичное концентрирование путем осаждения сульфатом аммония. Элюция со смолы производится 0,05 М глициновым буфером с рН 7,0-8,0. Вторичное концентрирование предусматривает дробное внесение в элюат насыщенного раствора сульфата аммония с последующим центрифугированием и растворением осадка в физиологическом растворе с рН 7,2-7,4.

Для индикации вирусов в очищенных и неочищенных сточных водах применяют метод двухфазного разделения с использованием

22% декстрана и 29% полиэтиленгликоля в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Метод включает центрифугирование исследуемой пробы в течение 10 минут при 1000 g. В надосадочную жидкость вносят растворы декстрана и полиэтиленгликоля с последующим выдерживанием пробы в течение 1 часа при температуре 4<sup>0</sup>С при непрерывном встряхивании. Для разделения на фазы подготовленную пробу переносят в делительную воронку и оставляют на ночь при 4<sup>0</sup>С с последующим сбором нижней и промежуточной фазы в стерильную пробирку. Осадок ресуспендируют в этой жидкости. Смесь обрабатывают хлороформом, центрифугируют, надосады обрабатывают хлороформом и исследуют на наличие вирусов.

Для выделения вирусов из воды поверхностных водоемов, сточной воды используют концентрирование на макропористом стекле. Порошок макропористого стекла обрабатывают 3% раствором перекиси водорода и 6 М раствором соляной кислоты с последующим отмыванием дистиллированной водой до нейтральных значений рН и высушивании при 100<sup>0</sup>С. Стерильные пакеты с макропористым стеклом закрепляют с помощью лески в токе исследуемой воды на 3-7 суток. Доставленный в лабораторию пакет после вскрытия помещают в колонку объемом 5-10 мл. Вирусы элюируют тремя растворами, отбирая фракции в отдельные флаконы для последующего исследования каждой фракции на культуре ткани изолированно.

Для исследования больших объемов водопроводной воды (до 1000 л) используют Набор для сбора и концентрирования вирусов из питьевой воды с помощью ловушечного устройства производства Республики Беларусь. Устройство предназначено для насадки на водопроводный кран. Скорость прохождения воды составляет 40-45 л в час в течение 24 часов. После использования ловушку извлекают, а ловушечное устройство обеззараживают для повторного применения. Адсорбент ловушки вымывают из вскрытого пакета струей дистиллированной воды, полученную смесь помещают в колонку, воду удаляют. Элюцию вирусов осуществляют 3 мл специального элюента. Для увеличения эффективности обнаружения вирусов в элюате рекомендуется применять дополнительное

Таблица 1.

## ОБЪЕМ ПРОБ, УСЛОВИЯ И ПЕРИОДИЧНОСТЬ ОТБОРА ПРОБ ВОДЫ ВОДНЫХ ОБЪЕКТОВ

№ п/п	Вид водного объекта	Объём исследуемой воды, показания к проведению и кратность анализа при контроле:					Методы концентрирования
		Плановом	Экстренном	В период эпидемического риска	По санитарно-эпидемическим показаниям	Производственном	
	Условия и периодичность отбора проб	В соответствии с рабочей программой	По экстренным показаниям	По согласованию с РПН*)	По согласованию с РПН*)	В соответствии с рабочей программой	
1.	Чистые воды: а) питьевая	10л	10-50л	10 и 1000л	10 и 1000л	10-50л	1.Ионообменная смола; 2.Мембранная фильтрация; 3.Двухэтапный метод;4.Ловушечное устройство (Беларусь).
	б) подземных источников	10л	10-50л	10 и 1000л	10 и 1000л	10-50л	
	в) плавательных бассейнов		10-50л	10 и 1000л	10 и 1000л	10-50л	
2.	Вода поверхностных водоемов (источник водоснабжения, рекреационные воды)	10л	10л	10л	10л	10л	1. Адсорбционный метод (МПС); 2.Ионообменная смола; 3.Мембранная фильтрация; 4.2-этапный метод.
3.	Сточные воды а) до очистки б) после очистки и обеззараживания	1л	1-5л	1-5л	1-5л	1-5л	1.2-фазный (ВОЗ); 2. Адсорбционный метод (МПС); 3.Ионообменная смола

- \*) РПН ( Роспотребнадзор)

концентрирование путем ультрацентрифугирования или осаждения полиэтиленгликолем (М.в. 6000).

Приведенные методы концентрирования, используемые в настоящее время в нашей стране, обладают разной степенью эффективности, но сопоставимы с методами, применяемыми за рубежом.

Выделение энтеровирусов и других культивируемых вирусов осуществляют из полученных элюатов на клеточных культурах тканей. Оптимальными для этих целей являются первично-трипсинизированные клетки – почки зеленых мартышек и фибробласты человека (ФЭЧ). Эти клетки обладают высокой чувствительностью и широким спектром выделяемых вирусов, обладающих цитопатогенным действием. Параллельно пробы исследуются на перевиваемых культурах тканей, среди которых в настоящее время рекомендуется использовать: BGM (клетки почек африканской зеленой мартышки, чувствительные к вирусам полиомиелита и вирусам Коксаки В); Нер-2 (клетки карциномы гортани, на монослое которых выделяют вирус полиомиелита и Коксаки В, аденовирусы); RD (клетки рабдомиосаркомы матки, чувствительные к вирусам полиомиелита, ЕСНО, Коксаки А, за исключением А1, А19, А22). На культурах тканей проводят не менее 3 пассажей, наблюдая под микроскопом состояние клеток и сравнивая с контролем. Появление в клетках деструктивных изменений свидетельствует о наличии в пробе цитопатогенных вирусов.

Для выявления РНК-содержащих вирусов, не размножающихся в культуре клеток, в настоящее время используют метод полимеразной цепной реакции с этапом обратной транскрипции (ОТ-ПЦР), интегрированный с культурой ткани. Метод позволяет ускоренно определять жизнеспособные вирусы.

Следует отметить, что в последние годы в связи с рядом объективных причин практически не используются первично-трипсинизированные клетки. Это привело к снижению процента выделения вирусов из воды водных объектов, и соответственно, к затруднениям при оценке эпидемической безопасности воды. В этот же период были отменены Методические рекомендации по санитарно-вирусологическому контролю объектов окружающей среды, М. 1982 г. (2), в которых были определены контролируемые объемы воды разного вида водопользования, использованные при разработке нормативов колифагов для этих водных объектов. В связи с необходимостью повышения эффективности методов выделения, вирусов последовало ненормативное увеличение объема воды при исследовании на энтеровирусы. Однако использование неравнозначных по чувствительности методов индикации колифагов

(100 мл воды) и энтеровирусов (до 1000 л) позволило, с одной стороны, повысить процент выделения вирусов, а с другой, выявить несоответствие существующих нормативных уровней колифага в водных объектах, обеспечивающих эпидбезопасность воды, с непосредственным выделением вирусов. Это привело к некорректному выводу о нивелировании санитарно-показательной значимости колифагов в отношении энтеровирусов. Вышеизложенное свидетельствует о необходимости проведения дальнейшего совершенствования нормативной базы при контроле и оценке вирусного загрязнения воды разного вида водопользования. Представленные показатели и методы контроля включены в действующие в настоящее время нормативные и методические документы водно-санитарного законодательства страны. Дальнейшее совершенствование показателей и нормативов вирусного загрязнения позволит вносить соответствующие коррективы и в методическое обеспечение санитарно-вирусологического контроля.

#### Литература

1. Гольдфарб Д.М. Бактериофагия. Медгиз. 1961.
2. Методические рекомендации по санитарно-вирусологическому контролю объектов окружающей среды. Москва. МЗ СССР, 1982.
3. Gwy-Am Shin and D.Sobsey. Reduction of Norwalk Viruses , Poliovirus 1, and Bacteriophage MS-2 by Ozone Disinfection of Water. AEM, July 2003, p.3975-3978, vol. 69, №7.