

Metody detekcji wirusów w różnych środowiskach pracy¹

Methods of virus detection in various work environment

dr inż. AGATA STOBNICKA-KUPIEC
email: agsto@ciop.pl
prof. dr hab. RAFAŁ GÓRNY
email: ragor@ciop.pl
Centralny Instytut Ochrony Pracy –
Państwowy Instytut Badawczy
ul. Czerniakowska 16
00-701 Warszawa

Słowa kluczowe: wirusy, środowisko pracy, bioaerozol, wymazy powierzchniowe, PCR.

Keywords: viruses, occupational environment, bioaerosol, surface swabs, PCR.

Streszczenie

Wirusy to szkodliwe czynniki biologiczne, które mogą stwarzać zagrożenie dla pracowników wielu grup zawodowych. Informacje o występowaniu wirusów w różnych środowiskach pracy są bardzo nieliczne, przede wszystkim z uwagi na trudności analityczne związane z ich rutynowym wykrywaniem. Kontrole sanitarne stanowisk pracy oceniające stopień ich zanieczyszczenia drobnoustrojowego nie są efektywne wobec wirusów, co sprawia, że ryzyko zawodowe pracowników narażonych na czynniki biologiczne jest w dalszym ciągu niedoszacowane. Taki stan rzeczy w zasadniczy sposób uniemożliwia prawidłowe zarządzanie bezpieczeństwem pracy. Efektywność oznaczania wirusów w próbkach środowiskowych jest uza-

leżniona zarówno od sposobu pobierania i transportu próbek, jak i od techniki izolacji materiału genetycznego wirusa oraz metody jego detekcji.

Celem niniejszej publikacji jest próba krytycznego przeglądu piśmiennictwa przedmiotu w celu określenia najefektywniejszej i najkorzystniejszej metody oznaczania wirusów w środowisku pracy. Taka metoda mogłaby posłużyć jako rutynowa w ocenie zagrożenia wirusami na różnych stanowiskach pracy. W artykule omówiono: metodykę pobierania próbek pod kątem analizy obecności wirusów, metody izolacji wirusowych kwasów nukleinowych oraz sposoby ich detekcji na podstawie: aktywności wirusa, metod biologii molekularnej oraz testów immunoenzymatycznych.

Summary

Viruses are harmful biological agents, which can pose a risk for workers from different occupational groups. Information regarding the occurrence of viruses in occupational environment is still scarce, primarily due to analytical difficulty of their routine detection. Hygiene control applied for microbiological contamination are not effective in case of viruses,

so the occupational risk for workers exposed to biological agents is still underestimated. Such a state of affairs fundamentally precludes a proper management of occupational safety. The effectiveness of virus detection in the environmental samples depends on methods of sampling and transport, and isolation and identification method.

¹ Publikacja opracowana na podstawie wyników IV etapu programu wieloletniego „Poprawa bezpieczeństwa i warunków pracy”, finansowanego w latach 2017-2019 w zakresie badań naukowych i prac rozwojowych przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego/Narodowe Centrum Badań i Rozwoju, projekt II.N.16.

Koordynator programu: Centralny Instytut Ochrony Pracy – Państwowy Instytut Badawczy.

The aim of this paper is an attempt to critically review the literature of the subject, determination of the best and the most effective method of virus detection and identification in the occupational environment, which could be used as a routine methodology for assessing

the risk of viruses in various workplaces. The article discusses methods of viral samples collection, viral nucleic acid isolation, and, their detection based on viral activity, molecular biology and immunoenzymatic assays.

WPROWADZENIE

Wirusy to proste struktury, które nie mają budowy komórkowej. W skład pojedynczej, aktywnej cząstki wirusa, czyli tzw. wirionu, wchodzi kwas nukleinowy (ssDNA, ang. *single stranded DNA*; dsDNA, ang. *double stranded DNA* lub ssRNA, ang. *single stranded RNA*; dsRNA, ang. *double stranded RNA*) otoczony przez płaszcz białkowy (kapsyd) i – jeśli występuje – przez otoczkę fosfolipidową będącą elementem komórki gospodarza. Cząstki wirusów są zróżnicowane pod względem rozmiarów, a ich wielkość mieści się w zakresie 10 ÷ 400 nm. Największym odkrytym dotąd wirusem jest *Pandoravirus*, którego rozmiary sięgają 500 nm, a materiał genetyczny zawiera ponad 2 500 genów. Wirusy nie mają cech organizmów żywych – nie podlegają podziałom poza komórką gospodarza, nie syntetyzują samodzielnie białek ani nie replikują samodzielnie swojego genomu (*Gelderbrom 1996*).

Podstawowe procesy, które zachodzą podczas infekcji, to: wnikanie wirusa do komórki gospodarza, przyłączenie się genomu wirusa do genomu gospodarza, replikacja genomu wirusa oraz produkcja białek wirusowych, składanie wirionów i ich uwolnienie z komórki. Niemniej jednak wniknięcie wirusa do organizmu oraz konsekwencje tego procesu w postaci jego namnażania i zmian patologicznych, prowadzących do rozwoju choroby, nadal nie są do końca poznane (*Heczko i in. 2014*).

Leczenie infekcji wirusowych jest trudne, ponieważ wirusy nie mają własnego metabolizmu, który można byłoby zablokować, tak jak czyni się to za

pomocą antybiotyków w przypadku zakażeń bakteryjnych. Dlatego większość metod leczenia opiera się jedynie na ograniczeniu dalszego rozwoju infekcji w organizmie chorego. Dodatkowo zakażeniom wirusowym mogą towarzyszyć bakteryjne. Infekcje wirusowe mogą nawracać (co jest związane z latencją, czyli uśpieniem wirusa w organizmie, np. w przypadku wirusa opryszczki) lub też ujawniać się po bardzo długim czasie. Mimo postępu medycyny wiele chorób wirusowych jest nadal nieuleczalnych (np. wścieklizna, AIDS), a szereg infekcji wywołanych przez wirusy onkogenne, np. wirus brodawczaka ludzkiego, może prowadzić do rozwoju chorób nowotworowych (*Faridi i in. 2011*).

Zgodnie z wymaganiami dyrektywy (Dyrektywa...2000), jak i rozporządzeniem Ministra Zdrowia (Rozporządzenie... 2005), pracodawca jest zobowiązany do dokonania i udokumentowania oceny ryzyka zawodowego stwarzanego przez szkodliwe czynniki biologiczne. Informacje o zagrożeniach ze strony wirusów w różnych środowiskach pracy są do tej pory bardzo nieliczne, przede wszystkim z uwagi na trudności z ich rutynowym wykrywaniem. Kontrole sanitarne uwzględniające obecność bakterii i grzybów wobec wirusów okazują się mało efektywne. Taki stan rzeczy sprawia, że ryzyko zawodowe pracowników narażonych na czynniki biologiczne w dalszym ciągu jest niedoszacowane, co w zasadniczy sposób uniemożliwia prawidłowe zarządzanie bezpieczeństwem pracy.

MOŻLIWOŚCI KONTAKTU Z WIRUSAMI W RÓŻNYCH ŚRODOWISKACH PRACY

W środowisku pracy wirusy mogą stanowić aktywny biologicznie składnik bioaerozolu emitowanego z zanieczyszczonych systemów klimatyzacyjnych, mogą też być uwalniane w trakcie procesów produkcyjnych z powierzchni roboczych lub przetwarzanego surowca. Ich źródłem mogą być również płyny ustrojowe i wydzieliny ciała człowieka (np. krew, ślina, wymiociny) oraz wektory (np. kleszcze, komary). Wiriony mogą dostawać się do organizmu

człowieka przez skórę lub błony śluzowe (układu oddechowego, układu pokarmowego, spojówek). Skóra stanowi barierę chroniącą organizm przed drobnoustrojami, niemniej jednak w przypadku otarcia lub innego uszkodzenia naskórka wirusy mogą ją pokonać i przedostać się do krwiobiegu. Wirusy wnikające przez błony śluzowe mają zdolność bezpośredniej adsorpcji do komórek nabłonka, gdzie zachodzi wstępne namnażanie materiału genetycznego

wirusa. Jednak układ, którym wirus dostaje się do organizmu, nie zawsze jest tym, który jako pierwszy zostaje dotknięty infekcją. Przykładowo enterowirusy, które wywołują zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, atakują układ nerwowy, choć do organizmu wnikają przez przewód pokarmowy i to w nim się namnażają (Collier, Oxford 1993).

Chociaż wykrywanie wirusów jest istotne w wielu dziedzinach badań, takich jak: diagnostyka medyczna i weterynaryjna, procesy biotechnologiczne czy ochrona roślin, to w badaniach środowiska pracy jest to procedura nadal bardzo rzadko stosowana. Wynika to przede wszystkim z trudności analitycznych w ich oznaczaniu. Próbkę środowiskową są zwykle bardzo złożone, często mają małą zawartość wody, zawierają inne czynniki biologiczne, takie jak bakterie i grzyby, oraz niejednokrotnie różnego rodzaju zanieczyszczenia fizyczne i chemiczne. Wirusy w środowisku, np. w powietrzu, występują najczęściej w bardzo małym stężeniu, dlatego kluczowym czynnikiem gwarantującym powodzenie

ich detekcji jest wybór odpowiednich metod pomiarowych. Możliwość wykrycia wirusa w badanej próbce jest uzależniona od całej procedury badawczej, począwszy od techniki pobierania próbki (są to np.: wymaz, próbka powietrza, próbka surowca), poprzez transport próbki do laboratorium (istotne są: właściwe podłoże, czas i temperatura transportu), aż po wybór odpowiedniej dla pobranej próbki metody detekcji danego wirusa (Druce i in. 2012).

Narażenie na czynniki wirusowe może występować w wielu grupach zawodowych – wśród pracowników: służby zdrowia, biurowych, nauki i oświaty, obsługi ruchu lotniczego, oczyszczalni ścieków czy sortowni odpadów. Listę przykładowych wirusów mogących stanowić zagrożenie dla pracowników w wybranych grupach zawodowych, ze wskazaniem potencjalnego materiału do badań pod kątem obecności tych wirusów w środowisku pracy, przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1.

Wirusy mogące stanowić zagrożenie zdrowotne dla pracowników w wybranych grupach zawodowych ze wskazaniem potencjalnego materiału do badań pod kątem wykrycia ich obecności w środowisku pracy (Dutkiewicz i in. 2002)

Wirusy	Grupa zagrożenia*	Narażona grupa zawodowa	Przenoszenie	Potencjalny materiał do badań wirusologicznych	Działanie na człowieka	Profilaktyka
Adenowirusy (<i>Adenoviridae</i>)	2	pracownicy biurowi, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia, pracownicy sortowni odpadów	powietrzno-kropelkowe, bezpośrednie	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – gorączki adenowirusowe	unikanie kontaktu z chorymi, czystość w miejscu pracy, dezynfekcja, czyszczenie i konserwacja systemów klimatyzacyjnych
Arenawirusy (<i>Arenaviridae</i>)	2	pracownicy spichrzów i wytwórni produktów zbożowych, rolnicy	bezpośrednie (skaleczenie), powietrzno-pyłowe	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – limfocytarne zapalenie opon mózgowych i spłotów naczyniowych	ochrony osobiste, urządzenia odpylające, dezynfekcja
Hantawirus (<i>Bunyaviridae</i>)	2	pracownicy spichrzów i wytwórni produktów zbożowych, pracownicy magazynów, pracownicy zakładów przetwarzających biomase, rolnicy	powietrzno-pyłowe, powietrzno-kropelkowe, bezpośrednie (skaleczenie)	bioaerozol, wymazy z powierzchni, próbki biomasy	zakaźne – gorączka krwotoczna z zespołem nerkowym	ochrony osobiste, tępienie gryzoni, dezynfekcja

cd. tab. 1.

Wirusy	Grupa zagrożenia*	Narażona grupa zawodowa	Przenoszenie	Potencjalny materiał do badań wirusologicznych	Działanie na człowieka	Profilaktyka
Koronawirusy (<i>Coronaviridae</i>)	2	pracownicy biurowi, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy, pracownicy biurowi	powietrzno-kropelkowe	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – łagodne choroby górnych dróg oddechowych	unikanie kontaktu z chorymi, czystość w miejscu pracy, dezynfekcja, czyszczenie i konserwacja systemów klimatyzacyjnych
Wirus Norwalk, norowirus (<i>Caliciviridae</i>)	2	pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy, pracownicy oczyszczalni ścieków, pracownicy instalacji kanalizacyjnych, pracownicy sortowni odpadów, pracownicy ochrony zdrowia	pokarmowe	bioaerozol, wymazy z powierzchni próbki ścieków	zakaźne – zapalenie jelit: biegunka, wymioty	czystość w miejscu pracy, dezynfekcja
Wirus zapalenia wątroby typu C (<i>Flaviviridae</i>)	2	pracownicy ochrony zdrowia, pracownicy sortowni odpadów, pracownicy oczyszczalni ścieków, pracownicy instalacji kanalizacyjnych, fryzjerzy i kosmetyczki	bezpośrednie (skaleczenie), przez krew, surowicę krwi i inne płyny ustrojowe człowieka	wymazy z powierzchni, próbki ścieków	zakaźne – zapalenie wątroby	ochrony osobiste, dezynfekcja
Wirus Epsteina-Barr'a (<i>Herpesviridae</i>)	2	pracownicy biurowi, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia	bezpośrednie, przez kontakt ze śliną chorych	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – mononukleozą, zespół proliferacji limfocytów, zespół Duncana, chłoniak Burkitta; rakotwórcze – nowotwór jamy nosowo-gardłowej	dezynfekcja, unikanie kontaktu z chorymi, czystość w miejscu pracy

cd. tab. 1.

Wirusy	Grupa zagrożenia*	Narażona grupa zawodowa	Przenoszenie	Potencjalny materiał do badań wirusologicznych	Działanie na człowieka	Profilaktyka
Wirus opryszczki pospolitej (ang. <i>Herpes Simplex Virus</i> , HHV1, dawniej HSV), (<i>Herpesviridae</i>)	2	pracownicy biurowi, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia, fryzjerzy i kosmetyczki	bezpośrednie, przez uszkodzoną skórę, przez kontakt rąk	wymazy z powierzchni	zakaźne – opryszczka: zapalenie pęcherzykowe błon śluzowych, zapalenie skóry (wysypki pęcherzykowe), zapalenie rogówki	dezynfekcja, unikanie kontaktu z chorymi, czystość w miejscu pracy
Wirus cytomegalii (<i>Cytomegalovirus hominis</i>), (<i>Herpesviridae</i>)	2	nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia, fryzjerzy i kosmetyczki	bezpośrednie, przez kontakt ze śliną i moczem chorych	wymazy z powierzchni	zakaźne – mononukleozą z gorączką; postać wrodzona: uszkodzenia płodu	ochrony indywidualne, dezynfekcja, sterylizacja, ochrona pracownic w ciąży przed możliwym kontaktem z wirusem, oświata zdrowotna
Ludzki wirus B-limfotropowy (HBLV-HHV-6), (<i>Herpesviridae</i>)	2	nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia, fryzjerzy i kosmetyczki	bezpośrednie	wymazy z powierzchni	zakaźne – wysypka, odrzucanie przeszczepu nerek	ochrony indywidualne, dezynfekcja, sterylizacja
Ludzki herpeswirus 7 (<i>Herpesviridae</i>)	2	nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia, fryzjerzy i kosmetyczki	bezpośrednie	wymazy z powierzchni	zakaźne – wysypka, odrzucanie przeszczepu nerek	ochrony indywidualne, dezynfekcja, sterylizacja
Wirus ospy wietrznej i półpaśca (VZV), (<i>Herpesviridae</i>)	2	nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia	powietrzno-kropelkowe	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – ospa wietrzna, półpaśiec	ochrony indywidualne, szczepienia ochronne, dezynfekcja, sterylizacja
Wirus zapalenia wątroby typu B (<i>Hepadnaviridae</i>)	2	pracownicy ochrony zdrowia, pracownicy oczyszczalni ścieków, pracownicy sortowni odpadów, pracownicy instalacji kanalizacyjnych	bezpośrednie (skałeczenie), przez krew, surowicę krwi i inne płyny ustrojowe człowieka	wymazy z powierzchni, próbki ścieków	zakaźne – zapalenie wątroby, często postać przewlekłą; rakotwórcze – rak wątroby	
Wirus grypy (typ A, B i C), (<i>Orthomyxoviridae</i>)	2	pracownicy biurowi, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia	powietrzno-kropelkowe	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – grypa, zapalenie płuc	szczepienia ochronne, witaminizacja, izolacja grup wysokiego ryzyka

cd. tab. 1.

Wirusy	Grupa zagrożenia*	Narażona grupa zawodowa	Przenoszenie	Potencjalny materiał do badań wirusologicznych	Działanie na człowieka	Profilaktyka
Wirus brodawczaka ludzkiego HPV (<i>Papovaviridae</i>)	2	pracownicy biurowi, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy	bezpośrednie – przez uszkodzoną skórę	wymazy z powierzchni	zakaźne – brodawki skóry i błon śluzowych	dezynfekcja
Wirusy BK i JC (<i>Papovaviridae</i>)	2	nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia	powietrzno-kropelkowe	bioaerozol	zakaźne – zakażenie bezobjawowe nerek, wirus JC może powodować u ludzi z obniżoną odpornością wieloogniskową leukoencefalopatię	ochrony indywidualne, dezynfekcja, sterylizacja
Wirus paragrypy (typy 1-4), (<i>Paramyxoviridae</i>)	2	pracownicy biurowi, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia	powietrzno-kropelkowe, bezpośrednie	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – zapalenia dróg oddechowych	unikanie kontaktu z chorymi, czystość w miejscu pracy, dezynfekcja, czyszczenie i konserwacja systemów klimatyzacyjnych
Wirus odry (<i>Paramyxoviridae</i>)	2	nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia	powietrzno-kropelkowe, bezpośrednie	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – odra (choroba wieku dziecięcego), możliwe powikłania: zapalenie uszu, płuc, mózgu	szczepienia ochronne, izolacja chorych
Wirus zapalenia przyusznic (<i>Paramyxoviridae</i>)	2	nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia	powietrzno-kropelkowe, bezpośrednie	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – zapalenie przyusznic (<i>mumps</i> , choroba wieku dziecięcego, młodzieńczego), możliwe powikłania: zapalenie opon mózgowo-rdzeniowych, mózgu, trzustki, jąder	szczepienia ochronne, izolacja chorych
Parwovirus ludzki (B19), (<i>Parvoviridae</i>)	2	pracownicy biurowi, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia	powietrzno-kropelkowe	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – gorączka z wysypką, anemia, poronienia	unikanie kontaktu z chorymi, czystość w miejscu pracy, dezynfekcja, czyszczenie i konserwacja systemów klimatyzacyjnych

cd. tab. 1.

Wirusy	Grupa zagrożenia*	Narażona grupa zawodowa	Przenoszenie	Potencjalny materiał do badań wirusologicznych	Działanie na człowieka	Profilaktyka
Wirus ostrego krwotocznego zapalenia spojówek (AHC), (<i>Picornaviridae</i>)	2	pracownicy biurowi, nauczyciele i wychowawcy, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia	powietrzno-kropelkowe	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – ostre, krwotoczne zapalenie spojówek	unikanie kontaktu z chorymi, czystość w miejscu pracy, dezynfekcja, czyszczenie i konserwacja systemów
Wirus Coxsackie (grupy A i B), (<i>Picornaviridae</i>)	2	pracownicy biurowi, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy, pracownicy ochrony zdrowia	powietrzno-kropelkowe, bezpośrednie	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – gorączki, zapalenia układu oddechowego, angina, zapalenie mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych, paraliż, zapalenie wątroby, stany zapalne skóry z wysypką, biegunka, zapalenie mięśnia sercowego i osierdzia (grupa B), pleurodynia (grupa B)	unikanie kontaktu z chorymi, czystość w miejscu pracy, dezynfekcja, czyszczenie i konserwacja systemów klimatyzacyjnych
Wirus ECHO (<i>Human parechovirus</i>), (<i>Picornaviridae</i>)	2	pracownicy biurowi, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy	powietrzno-kropelkowe, bezpośrednie	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – zapalenia układu oddechowego, gorączki, zapalenia mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych, paraliż, zapalenie wątroby i jelit, stany zapalne skóry z wysypką, zapalenie spojówek, biegunka, zapalenie mięśnia sercowego i osierdzia	dezynfekcja, unikanie kontaktu z chorymi, czystość w miejscu pracy

cd. tab. 1.

Wirusy	Grupa zagrożenia*	Narażona grupa zawodowa	Przenoszenie	Potencjalny materiał do badań wirusologicznych	Działanie na człowieka	Profilaktyka
Wirus choroby Heinego-Medina (polio, typ 1-3), (<i>Picornaviridae</i>)	2	nauczyciele i wychowawcy, pracownicy oczyszczalni ścieków, pracownicy ochrony zdrowia	powietrzno-kropelkowe, bezpośrednie, pokarmowe	bioaerozol, wymazy z powierzchni, próbki ścieków	zakaźne – gorączka, zapalenia mózgu i opon mózgowo-rdzeniowych, paraliż (zwykle u dzieci), inwalidztwo	szczepienia ochronne, ochrony indywidualne, dezynfekcja, sterylizacja, asenizacja ścieków
Wirus zapalenia wątroby typu A (<i>Picornaviridae</i>)	2	pracownicy oczyszczalni ścieków, pracownicy sortowni odpadów, pracownicy instalacji kanalizacyjnych	kałowo-pokarmowe, bezpośrednie	wymazy z powierzchni, próbki ścieków	zakaźne – zapalenie wątroby typu A, zapalenie żołądka i jelit	szczepienia ochronne, bierne uodparnianie ludzką immunoglobuliną, ochrony indywidualne, dezynfekcja, sterylizacja, asenizacja kału i ścieków
Wirus RS (RSV), (<i>Pneumovirus RS</i>)	2	pracownicy biurowi, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy	powietrzno-kropelkowe	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – zapalenia dróg oddechowych, zapalenie uszu	unikanie kontaktu z chorymi, czystość w miejscu pracy, dezynfekcja, czyszczenie i konserwacja systemów klimatyzacyjnych
Rotawirus ludzki (<i>Reoviridae</i>)	2	pracownicy biurowi, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego, nauczyciele i wychowawcy, pracownicy oczyszczalni ścieków, pracownicy instalacji kanalizacyjnych, pracownicy sortowni odpadów	powietrzno-kropelkowe, kałowo-pokarmowe	bioaerozol, wymazy z powierzchni, próbki ścieków	zakaźne – zapalenie żołądka i jelit, biegunki	dezynfekcja, unikanie kontaktu z chorymi, czystość w miejscu pracy
Reowirusy (<i>Reoviridae</i>)	2	nauczyciele i wychowawcy, pracownicy biurowi, pracownicy obsługi ruchu lotniczego i naziemnego	powietrzno-kropelkowe, bezpośrednie	bioaerozol, wymazy z powierzchni	zakaźne – gorączki reowirusowe	ochrony osobiste, dezynfekcja

Objaśnienia:

* – wg rozporządzenia Ministra Zdrowia (Rozporządzenie... 2005).

METODYKA POBIERANIA PRÓBEK W KIERUNKU DIAGNOSTYKI WIRUSÓW

W środowisku pracy badaniom pod kątem obecności wirusów, w zależności od grupy zawodowej oraz charakteru stanowiska pracy, mogą zostać poddane różne rodzaje próbek, takie jak: wymazy powierzchniowe, próbki powietrza czy przetwarzany surowiec.

W przypadku wymazów powierzchniowych istotny jest nie tylko wybór rodzaju powierzchni, lecz także odpowiedniej techniki i materiałów. Na podstawie wyników dotychczasowych badań wykazano, że próbki wymazów powierzchniowych przeznaczone do badań pod kątem obecności wirusów powinny być pobierane za pomocą syntetycznych wymazówek wykonanych z: poliestru, nylonu lub sztucznego jedwabiu na pałeczkach poliestrowych lub aluminiowych, co zapewnia najlepszy odzysk cząstek wirusa. Niewskazane jest stosowanie wymazówek drewnianych z włóknem bawełnianym, z uwagi na pozostałości środków wybielających mogących prowadzić do rozkładu cząstek wirusowych. Wymazówki wykonane z alginianu wapnia nie nadają się do pobierania wirusów, ponieważ dezaktywują niektóre z nich, jak również mogą niekorzystnie wpływać na wyniki testów molekularnych (Ganime i in. 2015; Julian i in. 2011; Smith 2000). Dodatkowo wymazówka przed użyciem powinna zostać zwilżona płynem Ringera, solą fizjologiczną lub podłożem przeznaczonym do transportu wirusów. Podłoża tego typu opierają się na modyfikowanym roztworze Hanka (HBSS, ang. *Hank's Balanced Salt Solution*), w skład którego wchodzi: albumina z surowicy bydlęcej, laktoalbumina, glicerol, sacharoza, kwas glutaminowy i żelatyna. Roztwór powinien być zbuforowany do pH $7,3 \pm 0,2$ (jako wskaźnika pH używa się czerwieni fenolowej).

W celu zahamowania wzrostu mikroorganizmów stosuje się kombinacje następujących antybiotyków: amfoterycyna B-kolistyna-wankomycyna lub penicylina-streptomycyna-polimyksyna B-gentamycyna-nystatyna. Odpowiednio spreparowane podłoże wpływa znacząco na stopień odzysku materiału wirusowego z badanej próbki. Według danych z piśmiennictwa przedmiotu dobrze zbilansowane podłoże umożliwia przechowywanie pobranego materiału do 96 h w warunkach chłodniczych (Hardy Diagnostics 1996; Latorre-Margalef i in. 2016). Sposób transportu jest także ważnym czynnikiem warunkującym jakość tegorodzaju badań. Próbki w drodze do laboratorium należy transportować

w pozycji pionowej, w pojemniku termoizolacyjnym zapewniającym stałą temperaturę $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Johnson 1990). W piśmiennictwie brakuje danych jednoznacznie wskazujących, jaka wielkość powierzchni powinna zostać poddana badaniu, a proponowane przez badaczy powierzchnie, z których zazwyczaj pobierane są próbki, wahają się od 36, poprzez 64, do 100 cm^2 (Carducci i in. 2013; Ganime i in. 2015; Ibfelt i in. 2016; Stobnicka i in. 2017).

W przypadku próbek powietrza przeznaczonych do badań pod kątem obecności wirusów, na podstawie dostępnych w piśmiennictwie przedmiotu danych, wskazuje się na możliwość stosowania różnorodnych metod pomiarowych. Zastosowanie znajduje tu zarówno metoda impakcyjna, w tym impaktory pobierające próbkę na podłoże stałe (np. impaktor MAS-100, sześciostopniowy i jednostopniowy impaktor Andersena) oraz impingery pobierające próbkę na podłoże płynne (np. impinger AGI-30, OMNI-3000, BioSampler), jak i metoda filtracyjna (stosowane są m.in. aspiratory MD-8, Sioutas PCIS). Najlepszym podłożem stałym dla pobrania tego typu czynników biologicznych wydaje się agar ME (ang. *Mycoplasma Experience*), który zawiera dodatki: ekstraktu drożdżowego, surowicy końskiej, glukozy, octanu cynku i penicyliny. Taki skład warunkuje maksymalną stabilizację cząstek wirusowych przy jednoczesnym zahamowaniu wzrostu niepożądanego mikrobyoty (Zhao i in. 2014).

Do najczęściej stosowanych mediów płynnych należą z kolei: bufor fosforanowy z wapniem i manganem (PBS) wzbogacony albuminą surowicy bydlęcej z dodatkiem środka przeciwspieniającego oraz HBSS (Lednicky, Loeb 2013; Zhao i in. 2014). Niektórzy autorzy podają, że pokrycie podłoża stałego cienką warstwą płynnego medium umożliwi maksymalny odzysk infekcyjnych wirionów oraz wirusowych kwasów nukleinowych (Booth i in. 2005). Część autorów rekomenduje pobieranie próbek na filtry żelatynowe (o średnicy porów $\text{Ø} = 3\text{ }\mu\text{m}$) lub politetrafluoroetylenowe PTFE ($\text{Ø} = 0,3\text{-}3\text{ }\mu\text{m}$), (Lednicky, Loeb 2013; Verreault i in. 2008; Zhao i in. 2014). Odzysk cząstek wirusowych z filtra następuje poprzez jego rozpuszczenie (w przypadku filtrów żelatynowych) lub wyplukanie (w przypadku filtrów PTFE) w roztworze HBSS lub w MEM medium (ang. Eagle's minimum essential medium) zawierającym kompleks aminokwasów (Hatagishi i in. 2014; Zhao i in. 2014).

Należy jednak wyraźnie zaznaczyć, że w tego typu badaniach filtry nie są powszechnie używane, z uwagi na to, że powodują uszkodzenia cząstek wirusowych, co znacząco obniża możliwość do pozyskania liczby cząstek infekcyjnych. Ma to szczególne znaczenie, gdy dalsza diagnostyka odbywa się w warunkach *in vitro* i odpowiednio wysoki odzysk cząstek infekcyjnych jest parametrem o kluczowym znaczeniu. Filtry żelatynowe wydają się pod tym względem lepszym rozwiązaniem, gdyż nie wywierają negatywnego wpływu na zdolności infekcyjne wirionów. Nie nadają się one jednak do pobierania próbek w warunkach małej i dużej wilgotności powietrza, co może skutkować odpowiednio wysychaniem i pękaniem filtra lub możliwością przypadkowego rozpuszczenia filtra wewnątrz pobornika.

W przypadku późniejszej diagnostyki za pomocą technik molekularnych zdolności infekcyjne pobranych cząstek wirusowych nie mają większego znaczenia, ponieważ technika PCR umożliwia detekcję kwasów nukleinowych wirusa, co dostarcza informacji o ogólnym „ładunku” cząstek wirusowych w bioaerozolu (Verreault i in. 2008). Podobnie jak w przypadku wymazów powierzchniowych, w piśmiennictwie przedmiotu brakuje jednoznacznych zaleceń co do pobieranej objętości bioaerozolu.

Według dostępnych danych objętość pobieranych próbek powietrza jest bardzo zróżnicowana i uzależniona zarówno od rodzaju poszukiwanego wirusa, jak i środowiska pracy, w którym pobierano próbkę. Przykładowo do oznaczenia wirusa ospy w powietrzu pomieszczeń szpitalnych pobierano próbki o objętości $50 \div 100 \text{ dm}^3$, do oznaczenia reowirusów i enterowirusów w oczyszczalniach ścieków pobierano próbki o objętości $1800 \div 3000 \text{ dm}^3$, a do oznaczenia wirusa rzekomego pomoru drobiu na fermach drobiu pobierano próbki o objętości ponad 1 27000 dm^3 (Verreault i in. 2008).

Wirusy można oznaczać również w próbkach przetwarzanego surowca (np. w surowcach odzwierzęcych) oraz w próbkach materiału, z którym pracownicy mają bezpośredni kontakt (np. próbki ścieków czy biomasy). W przypadku tego typu próbek autorzy wskazują na ich różną objętość przeznaczoną do badań, przy czym dla próbek płynnych wynosi ona od 10 cm^3 (np. dla surowego mleka), (Tirziu i in. 2014) do 1000 cm^3 (np. dla wody i ścieków) (Hellmér i in. 2014; Nakamura i in. 2015). Dla próbek stałych proponuje się analizę próbki o wielkości $10 \div 100 \text{ g}$ (Bosch i in. 2011).

SPOSOBY IZOLACJI WIRUSOWYCH KWASÓW NUKLEINOWYCH

Wirusy nie ulegają replikacji poza żywą komórką. Metoda ich detekcji może zatem opierać się na: założeniu hodowli wirusów w warunkach *in vivo* w organizmach zwierząt laboratoryjnych, w warunkach *in vitro* w hodowlach komórkowych albo tkankowych lub na detekcji specyficznych sekwencji kwasu nukleinowego danego wirusa za pomocą technik biologii molekularnej. Z uwagi na: wysokie koszty, czasochłonność i pracochłonność związane z detekcją wirusów w warunkach *in vivo* i *in vitro*, największą popularnością cechują się genetyczne metody diagnostyczne bazujące na wykrywaniu DNA i RNA poszukiwanych wirusów oraz testy immunoenzymatyczne (więcej informacji w dalszej części tekstu).

Istnieje wiele różnych metod izolacji kwasów nukleinowych i stale opracowywane są nowe procedury. Ich głównym celem jest pozyskanie DNA lub RNA zarówno w jak największej ilości, jak i najlepszej czystości. Nowe metody izolacji muszą być efektywne, szybkie, wydajne i – co najważniejsze – tanie, tak by można było wykonywać wiele analiz na raz, nie zwiększając tym samym kosztów.

W przypadku izolacji kwasów nukleinowych wirusów istotne jest, aby wybrana metoda umożliwiała izolację zarówno DNA, jak i RNA wirusowego, co pozwoliłoby na ograniczenie pracochłonności i kosztów badań przy zachowaniu wysokiej wydajności procesu i zminimalizowaniu ryzyka kontaminacji próbek (Bergallo i in. 2006).

Biorąc pod uwagę wymienione uwarunkowania, techniką izolacji kwasów nukleinowych, która wydaje się najkorzystniejsza, jest technika kolumnkowa oparta na metodzie chromatograficznej wykorzystującej złożę krzemionkowe zamknięte na membranie kolumnki. Technika ta umożliwia jednoczesne wyizolowanie DNA i RNA wirusów przy zachowaniu bardzo dużej czystości wyizolowanego materiału, który jest gotowy do dalszych analiz, w tym reakcji PCR (Vanspauwen i in. 2014). Przy zastosowaniu tej techniki możliwa jest izolacja materiału genetycznego wirusów z szerokiej gamy próbek, w tym: wymazów powierzchniowych, płynów z hodowli czy płynów ustrojowych.

METODYKA DETEKCCI I IDENTYFIKACJI WIRUSÓW W BADANYCH PRÓBKACH

Najczęściej stosowane w detekcji wirusów są: metody bazujące na aktywności wirusa, metody biologii molekularnej oparte o amplifikację materiału genetycznego wirusa oraz testy immunoenzymatyczne. Najpopularniejszą metodą opartą na aktywności wirusa są testy łysinkowe. Wirus, zakażając komórki, powoduje zmiany, które można zaobserwować lub zmierzyć. Tradycyjnie wirusy są wykrywane na podstawie tego, że są w stanie generować łysinki na hodowlach komórkowych oraz powodować ich zmiany morfologiczne możliwe do zaobserwowania pod mikroskopem świetlnym (Gombold i in. 2014). Zaletą tej metody jest duża czułość, co pozwala na wykrycie wirusów, których obecność w danym miejscu nie była oczekiwana. Z drugiej strony mała specyficzność może być wadą tej metody, ponieważ części wirusów (np. *Caliciviridae* powodujących zatrucia pokarmowe) nie udaje się wyhodować w warunkach sztucznych (Gerba, Kayed 2003). Dodatkowym mankamentem tej metody jest długi czas detekcji i niemal całkowity brak jej automatyzacji. W wielu przypadkach metoda ta wykazuje znacznie mniejszą czułość w porównaniu z metodami molekularnymi, co może wynikać ze stosunkowo małej liczby infekcyjnych cząstek w całkowitej populacji wirusów potomnych.

Kolejną metodą, która opiera się na aktywności wirusa, jest BERA (ang. *Bioelectric Recognition Assay*). Żywe komórki po zakażeniu wirusem mogą generować mierzalny sygnał, który pochodzi ze zmiany potencjału błonowego towarzyszącego zakażeniu (Kintzios i in. 2004) lub przepływu jonów uwalnianych z wnętrza komórki (Dobozi-King i in. 2005). Użycie linii komórkowych wrażliwych na zakażenie wirusami, które mają być wykryte, pozwala na zarejestrowanie tego typu sygnałów. W technice BERA komórki tworzące biosensor zawieszane są w matrycy żelowej zawierającej elektrody. Dodanie próbki zawierającej wirusy powoduje zmianę napięcia mierzonego na elektrodach prądu. Zmiana napięcia wynosi kilka mV i występuje zwykle szybko, bo 1 ÷ 2 minuty po dodaniu próbki zawierającej wirusa. Podstawową wadą tej metody jest mniejsza czułość w porównaniu z metodami biologii molekularnej.

Pomimo pewnych zalet testów łysinkowych i metody BERA, niewątpliwie najskuteczniejszymi i najpowszechniej stosowanymi obecnie metodami detekcji i identyfikacji wirusów są te bazujące na

amplifikacji ich materiału genetycznego. Technika PCR, czyli łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. *Polymerase Chain Reaction*), oraz jej różnorodne modyfikacje umożliwiają wykrycie zarówno wirionów mających zdolności infekcyjne, jak i cząstek nieinfekcyjnych czy też fragmentów kwasów nukleinowych wirusa. Informacje takie są diagnostycznie bardzo cenne, ponieważ pozwalają potwierdzić fakt obecności wirusów w badanym środowisku, mimo że w danym momencie nie wywołują one infekcji. Reakcja PCR opiera się na powielaniu poszukiwanego fragmentu DNA charakterystycznego dla danego wirusa w wyniku wielokrotnego podgrzewania i oziębiania próbki. W diagnostyce wirusologicznej najczęściej stosuje się następujące modyfikacje techniki PCR:

- RT-PCR (ang. *reverse transcription*) – modyfikacja przeznaczona do detekcji RNA wirusów; synteza komplementarnego DNA (cDNA) prowadzona jest na matrycy RNA i odbywa się przy użyciu odwrotnej transkryptazy (RT), następnie fragmenty cDNA ulegają zwielokrotnieniu za pomocą zwykłej reakcji PCR (Gilgen i in. 1995)
- *real time PCR* (*quantitative PCR*, qPCR) – modyfikacja pozwalająca określić liczbę cząstek wirusa w badanej próbce; do środowiska reakcji wprowadzane są znakowane (np. barwnikami fluorescencyjnymi) nukleotydy bądź sondy łączące się z DNA, które pozwalają na podstawie odczytów w kolejnych cyklach określić ilość matrycy użytej do reakcji oraz śledzić liczbę powstających produktów (Mackay i in. 2002)
- *digital PCR* (dPCR) – modyfikacja qPCR pozwalająca na dokładne określenie liczebności wirusa w próbce bez konieczności tworzenia krzywej standardowej; reakcja PCR jest rozdzielona na szereg reakcji PCR (rozcieńczenie próbki), z których każda może dawać sygnał pozytywny lub negatywny, następnie na podstawie modelowania statystycznego z zastosowaniem rozkładu Poissona oblicza się ilość DNA w próbce (Pavšič i in. 2016)
- *multiplex PCR* – modyfikacja polegająca na amplifikacji kilku matryc w jednej reakcji PCR, co pozwala wykryć kilka rodzajów wirusów lub kilka genotypów tego samego wirusa w badanej próbce; głównym ograniczeniem

tej techniki są problemy w doborze odpowiednich proporcji starterów reakcji, jak również (w niektórych przypadkach) w ogóle nie ma możliwości dobrania kilku par starterów tak, by nie tworzyły między sobą par typu *primer-dimer* (Elnifro i in. 2000)

- *viability PCR* (vPCR) – modyfikacja ta polega na wstępnym inkubowaniu próbek określonymi odczynnikami interkalującymi, np. barwnikami, takimi jak monoazydek propydydy (PMA) lub monoazydek etydydy (EMA), dzięki czemu możliwe jest odróżnienie cząstek infekcyjnych wirusów od cząstek nieinfekcyjnych; wadą tej techniki jest brak skuteczności w wykrywaniu np. norowirusów czy wirusów grypy (Moreno i in. 2015).

W dzisiejszej praktyce analitycznej qPCR jest jedną z najczęściej stosowanych technik szybkiego wykrywania wirusów. W stosunku do tradycyjnego PCR, poza znacznie zmniejszoną podatnością na generowanie zanieczyszczeń w amplifikowanym materiale genetycznym, charakteryzuje się: znacznie większą czułością wynosząca jedną kopię fragmentu DNA lub RNA na reakcję, skróconym czasem reakcji, znacznie przyspieszonym generowaniem wyniku oraz możliwością ilościowej oceny zawartości amplifikowanego materiału genetycznego w próbce. Dodatkowo istnieje możliwość połączenia odwrotnej transkrypcji i qPCR w jednej probówce (tzw. *one-step RT-qPCR*) dla RNA wirusów (Reid i in. 2004).

Kolejną techniką opartą na amplifikacji sekwencji kwasów nukleinowych jest NASBA (ang.

Nucleic Acid Sequence Based Amplification). W przeciwieństwie do PCR umożliwia ona izotermiczną amplifikację, w której preferowanym kwasem nukleinowym jest RNA. Wykorzystuje ona trzy różne enzymy: polimerazę RNA faga T7, RNazę H i odwrotną transkryptazę. Technika ta umożliwia bardzo wydajną amplifikację RNA, pozwalającą powielić materiał genetyczny w próbce nawet 109-krotnie w czasie zaledwie 2 h (Compton 1991). Ze względu na preferowany kwas nukleinowy technika ta sprawdza się doskonale w wykrywaniu wirusów mających jako materiał genetyczny jednoniciowe RNA (ssRNA). Główną jej wadą jest jednak konieczność zakupu kosztownego sprzętu przeznaczonego dla tej techniki.

Testy ELISA (ang. *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) stanowią jedną z często stosowanych metod do wykrywania wirusów w płynach ustrojowych (Mars i in. 2010). Zasada testu ELISA opiera się na wiązaniu przeciwciał z antygenami. Łączenie się antygeny ze specyficznym przeciwciałem uwiadczenia reakcja barwna, a sygnał mierzony jest poprzez pomiar absorbancji po konwersji substratu w barwny produkt. Metoda ta jest prosta w wykonaniu i nadaje się do zastosowania w badaniach przesiewowych. Niemniej jednak jej czułość w wykrywaniu antygenów jest mniejsza w porównaniu z reakcją PCR i jako taka może być brana pod uwagę tylko w przypadku analizy specyficznych próbek, takich jak np. próbki ścieków (Ndiaye i in. 2014; Soltan i in. 2016).

PODSUMOWANIE

Uwzględniając przedstawioną charakterystykę technik analitycznych, badania z zastosowaniem metod biologii molekularnej (reakcji PCR z jej modyfikacjami) z wykorzystaniem materiału biologicznego wyizolowanego za pomocą technik kolumnkowych wydają się najkorzystniejszą i najbardziej efektywną techniką przydatną z punktu widzenia

oceny narażenia na wirusy w środowisku pracy. Aby w możliwie pełny sposób oceniać stan higieniczny tego typu środowiska, badania jakościowe i ilościowe obecności wirusów muszą stać się immanentną częścią rutynowo wykonywanych czynności kontrolnych związanych z zagrożeniami szkodliwymi czynnikami biologicznymi.

PIŚMIENNICTWO

- Bergallo M., Costa C., Gribaudo G., Tarallo S., Baro S., Ponzi A.N., Cavallo R. (2006). Evaluation of six methods for extraction and purification of viral DNA from urine and serum samples. *New Microbiologica* 29, 111–119.
- Booth T.F., Kournikakis B., Bastien N., Ho J., Kobasa D., Stadnyk L., Li Y., Spence M., Paton S., Henry B., Mederski B., White D., Low D.E., McGeer A., Simor A., Vearncombe M., Downey J., Jamieson F.B., Tang P., Plummer F. (2005). Detection of airborne severe acute respiratory syndrome (SARS) coronavirus and environmental contamination in SARS outbreak units. *Journal of Infectious Diseases* 191, 1472–1477.
- Bosch A., Sánchez G., Abbaszadegan M., Carducci A., Guix S., Le Guyader F.S., Netshikweta R., Pintó R.M., van der Poel W.H.M., Rutjes S., Sano D., Taylor M.B., van Zyl W.B., Rodríguez-Lázaro D., Kovač K., Sellwood J. (2011). Analytical methods for virus detection in water and food. *Food Analytical Methods* 4(1), 4–12.
- Carducci A., Federigi I., Verani M. (2013). Virus occupational exposure in solid waste processing facilities. *Annals of Occupational Hygiene* 9, 1115–1127.
- Collier L., Oxford J. (1993). *Wirusologia – podręcznik dla studentów medycyny, stomatologii i mikrobiologii*. Warszawa, Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 59–64.
- Compton J. (1991). Nucleic acids sequence-based amplification. *Nature* 350, 91.
- Dobozi-King M., Seo S., Kim J.U., Young R., Cheng M., Kish L.B. (2005). Rapid detection and identification of bacteria: Sensing of Phage-Triggered Ion Cascade (SEPTIC). *Journal of Biological Physics and Chemistry* 5, 3–7.
- Druce J., Garcia K., Tran T., Papadakis G. (2012). Evaluation of swabs, transport media, and specimen transport conditions for optimal detection of viruses by PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 50(3), 1064–1065.
- Dutkiewicz J., Śpiewak R., Jabłoński L. (2002). Klasyfikacja szkodliwych czynników biologicznych występujących w środowisku pracy oraz narażonych na nie grup zawodowych. Lublin, Wydawnictwo Ad punctum.
- Dyrektywa 2000/54/WE Parlamentu Europejskiego oraz Rady Unii Europejskiej z dnia 18 września 2000 r. dotycząca ochrony pracowników przed ryzykiem związanym z narażeniem na czynniki biologiczne w miejscu pracy. *Official Journal of European Communities* L 262/21 z 17.10.00, 21–45.
- Elnifro E.M., Ashshi A.M., Cooper R.J., Klapper P.E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clinical Microbiology Reviews* 13(4), 559–570.
- Faridi R., Zahra A., Khan K., Idrees M. (2011). Oncogenic potential of human papillomavirus (HPV) and its relation with cervical cancer. *Virology Journal* 8, 269.
- Ganime A.C., Leite J.P.G., de Abreu Corrêa A., Melgaço F.G., Carvalho-Costa F.A. (2015). Evaluation of the swab sampling method to recover viruses from fomites. *Journal of Virological Methods* 217, 24–27.
- Gelderbrom H.R. (1996). Structure and classification of viruses. Rozdział 41 [W:] S. Baron. *Medical Microbiology*, 4th edition. Galveston.
- Gerba C.P., Kayed D. (2003). Caliciviruses: A major cause of foodborne illness. *Journal of Food Sciences* 68, 1136.
- Gilgen M., Wegmüller B., Burkhalter P., Bühler H.P., Müller U., Lüthy J., Candrian U. (1995). Reverse transcription PCR to detect enteroviruses in surface water. *Applied and Environmental Microbiology* 61(4), 1226–1231.
- Gombold J., Karakasidis S., Niksa P., Podczasy J., Neumann K., Richardson J., Sane N., Johnson-Leva R., Randolph V., Sadoff J., Minor P., Schmidt A., Duncan P., Sheets R.L. (2014). Systematic evaluation of in vitro and in vivo adventitious virus assays for the detection of viral contamination of cell banks and biological products. *Vaccine* 32(24), 2916–2926.
- Hardy Diagnostics (1996). [https://catalog.hardydiagnostics.com/cp_prod/Content/hugo/ViralTransportMedia.htm].
- Hatagishi E., Okamoto M., Ohmiya S., Yano H., Hori T., Saito W., Miki H., Suzuki Y., Saito R., Yamamoto T., Shoji M., Morisaki Y., Sakata S., Nishimura H. (2014). Establishment and clinical applications of a portable system for capturing influenza viruses released through coughing. *PLoS ONE* 9:e103560.
- Heczko P.B., Wróblewska M., Pietrzyk A. (2014). *Mikrobiologia lekarska*. Warszawa, PZWL, 173–185.
- Hellmér M., Paxéus N., Magnus L., Enache L., Arnholm B., Johansson A., Bergström T., Norder H. (2014). Detection of pathogenic viruses in sewage provided early warnings of hepatitis A virus and norovirus outbreak. *Applied and Environmental Microbiology* 80(21), 6771–6781.
- Ibfelt T., Frandsen T., Permin A., Andersen L.P., Schultz A.C. (2016). Test and validation of methods to samples and detect human virus from environmental surfaces using norovirus as a model virus. *Journal of Hospital Infection* 92, 378–384.
- Johnson F.B. (1990). Transport of viral specimens. *Clinical Microbiology Reviews* 3(2), 120–131.

- Julian T.R., Tamayo F.J., Leckie J.O., Boehm A.B. (2011). Comparison of surface sampling methods for virus recovery from fomites. *Applied and Environmental Microbiology* 77(19), 6918–6925.
- Kintzios S., Bem F., Mangana O., Nomikou K., Markoulatos P., Alexandropoulos N., Fasseas C., Arakeylan V., Petrou A.-L., Soukoulis K., Moschopoulou G., Yialouris C., Simonian A. (2004). Study on the mechanism of Bioelectric Recognition Assay: evidence for immobilized cell membrane interactions with viral fragments. *Bio-sensors & Bioelectronics* 20, 907–916.
- Latorre-Margalef N., Avril A., Tolf C., Olsen B., Waldenström J. (2016). How does sampling methodology influence molecular detection and isolation success in influenza A virus field studies. *Applied and Environmental Microbiology* 82(4), 1147–1153.
- Lednicky J.A., Loeb J.C. (2013). Detection and isolation of airborne influenza AH3N2 virus using a sioutas personal cascade impactor sampler. *Influenza Research and Treatment*, article ID 656825, Hindawi Publishing Corporation.
- Mackay I.M., Arden K.E., Nitsche A. (2002). Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Research* 30(6), 1292–1305.
- Mars M.H., van Maanen C., Vellema P., Kramps J.A., van Rijn P.A. (2010). Evaluation of an indirect ELISA for detection of antibodies in bulk milk against bluetongue virus infections in the Netherlands. *Veterinary Microbiology* 15(146), (3-4), 209–214.
- Moreno L., Aznar R., Sánchez G. (2015). Application of viability PCR to discriminate the infectivity of hepatitis A virus in food samples. *International Journal of Food Microbiology* 18(201), 1–6.
- Nakamura T., Hamasaki M., Yoshitomi H., Ishibashi T., Yoshiyama C., Maeda E., Sera N., Yoshida H. (2015). Environmental surveillance of poliovirus in sewage water around the introduction period for inactivated polio vaccine in Japan. *Applied and Environmental Microbiology* 81(5), 1859–1864.
- Ndiaye A.K., Diop P.A.M., Diop O.M. (2014). Environmental surveillance of poliovirus and non-polio enterovirus in urban sewage in Dakar, Senegal (2007-2013). *The Pan African Medical Journal* 19, 243.
- Pavšič J., Žel J., Milavec M. (2016). Digital PCR for direct quantification of viruses without DNA extraction. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 408, 67–75.
- Reid S.M., Ferris N.P., Hutchings G.H., King D.P., Alexandersen S. (2004). Evaluation of real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays for the detection of swine vesicular disease virus. *Journal of Virological Methods* 116, 169.
- Rozporządzenie Ministra Zdrowia z dnia 22.04.2005 r. w sprawie szkodliwych czynników biologicznych dla zdrowia w środowisku pracy oraz ochrony zdrowia pracowników zawodowo narażonych na te czynniki. DzU nr 81, poz. 716 ze zm.
- Smith T.F. (2000). Specimen requirements; selection, collection, transport, and processing [W:] *Clinical virology manual*, 3rd ed. [Red.] S. Spector, R.L. Hodinka, A. Young. Washington, D.C., ASM Press.
- Soltan M.A., Tsai Y.L., Lee P.Y.A., Tsai C.F., Chang H.F.G., Wang H.T.T., Wilkes, R.P. (2016). Comparison of electron microscopy, ELISA, real time RT-PCR and insulated isothermal RT-PCR for the detection of Rotavirus group A (RVA) in feces of different animal species. *Journal of Virological Methods* 235, 99–104.
- Stobnicka A., Gołofit-Szymczak M., Wójcik-Fatla A., Zajac V., Korczyńska-Smolec J., Górny R.L. (2017). Prevalence of human parainfluenza viruses and noroviruses on office fomites. *Food and Environmental Virology* [<https://doi.org/10.1007/s12560-017-9327-z>].
- Țirziu E., Cumpănașoiu C., Nichita I., Reman G.D., Sonea C., Șereș M. (2014). Performance assessment of three tests applied in enzootic bovine leucosis diagnosis. *Romanian Biotechnological Letters* 19(5), 9666–9677.
- Vanspauwen M.J., Wolfs P.F., Franssen F.M., Bruggeman C.A., Wouters E.F., Linssen C.F. (2014). Comparison of three different techniques for the isolation of viral RNA in sputum. *Journal of Clinical Virology* 61(2), 265–269.
- Verreault D., Moineau S., Duchaine C. (2008). Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and molecular biology reviews* 72(3), 413–444.
- Zhao Y., Aarnik J.A., Wang W., Fabri T., Koerkamp P.W.G.G., de Jong M.C.M. (2014). Airborne virus sampling – efficiencies of samplers and their detection limits for infectious bursal disease virus (IBDV). *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 21(3), 464–471.