

Ny internasjonal interesse for UV-bestråling som metode for inaktivering av *Cryptosporidium* i drikkevann

Av Helge Liltved

Helge Liltved er forsker ved Norsk institutt for vannforskning

Sammendrag

Nyere undersøkelser viser at både mellomtrykks- og lavtrykkslamper effektivt inaktiverer *Cryptosporidium*. Det er rapportert at UV-doser helt ned til 3 mJ/cm² resulterer i mer enn 3 log₁₀-enheters inaktivering (99,9%) når en *in vivo* metode (infektivitet i mus) ble benyttet for å bestemme graden av oocyst-overlevelse etter bestråling. Dette i sterk kontrast til resultatene fra tidligere undersøkelser hvor UV-bestråling ble vurdert som en lite effektiv metode ovenfor *Cryptosporidium* i drikkevann. Det blir hevdet at hovedårsaken til det endrede bildet ligger i at det tidligere i hovedsak ble benyttet surrogat metoder (*in vitro* metoder) for å bestemme graden av oocyst-overlevelse, og at disse metodene overestimerer UV-dosen som er nødvendig for å forhindre infeksjon i en mottakelig vert. Det blir anbefalt å benytte *in vivo* metoden for å få et riktig bilde av oocystenes evne til å infisere etter bestråling.

De nye resultatene tilsier økt fokus på UV-bestråling som en alternativ hygienisk barriere innen drikkevannsbehandling.

Summary

New studies reveal that both medium-pressure and low-pressure UV systems are effective against *Cryptosporidium*. It is reported that doses as low as 3 mJ/cm² result in more than 99,9% inactivation. These findings are in sharp contrast to early studies where UV-irradiation was reported to be ineffective against *Cryptosporidium*. The changed situation is in part explained by the fact that early evaluations of UV's effect on *Cryptosporidium* relied on the surrogate *in vitro* assays to indicate oocyst viability. These assays overestimated the UV dosage required to prevent infection in susceptible hosts. It is recommended to use the *in vivo* assay (neonatal mouse infectivity assay) until suitable alternative surrogate assays are identified.

These findings have sparked a new interest in UV-irradiation as a supplement to drinking water treatment.

Bakgrunn

Cryptosporidium parvum er en parasitt som stammer fra mennesker og pattedyr og kan smitte ved hjelp av miljøresistente oocyster. Hos men-

nesker forårsaker parasitten vanligvis diare og magesmerter (kryptosporidiose), men kan være livstruende hos mennesker med nedsatt immunforsvar. Dyr eller mennesker som er smittet skiller ut en mengde oocyster som kan overleve lenge i naturen. Drikkevannkilder kan bli infisert gjennom utslipp av ubehandlet eller behandlet kloakk, eller ved utvasking av avføring fra mennesker eller dyr i forbindelse med nedbør eller snøsmelting. Undersøkelser fra norske drikkevannskilder har vist at parasitten forekommer, men i lavt antall og på omtrentlig samme nivå som i andre europeiske land hvor undersøkelser har vært utført (Robertson 2000). Analysemetodikken for kvantifisering er basert på membranfiltrering for oppkonsentrering, etterfulgt av immunomagnetisk separasjon og immunofluorescensmikroskopi (Gjerde 1998). Det har ikke vært mulig med statistisk signifikans å korrelere forekomster av *Cryptosporidium* til andre mikrobiologiske eller fysiske/kjemiske vannkvalitetsparametere (Liltved og medarb. 2000).

Oocystene er små (4-6 μm) og vil derfor kunne passere gjennom vannbehandlingsprosesser som koagulering/direktefiltrering dersom prosessen ikke drives optimalt (Huck og medarb. 2000). Ved optimalisert koagulering før filtrering er det imidlertid vist at det er mulig å fjerne 99,9 – 99,999% av råvannets parasittinnhold. Membranfiltrering er også en god metode for å fjerne parasitter fra drikkevann. Imidlertid er det svært mange norske vannverk som hverken har koagulering/direktefiltrering eller membranfil-

trering, og må derfor stole på at desinfeksjonstrinnet sikrer vannets hygieniske kvalitet.

Klorering er en effektiv desinfeksjonsmetode ovenfor bakterier og virus, men har vist seg som lite egnet for inaktivering av parasitter (Korich og medarb. 1990, Robertson og medarb. 1994). Inntil helt nylig har også UV-bestråling blitt vurdert som uegnet for inaktivering av *Cryptosporidium*. I en undersøkelse av Ransom og medarb. (1993), ble det vist at man måtte opp i en UV-dose på 120 millijoule pr. cm^2 (mJ/cm^2) for å oppnå 99% inaktivering.

Metoder for å bestemme overlevelse etter desinfisering

Oppfatningen om at UV-bestråling er lite effektivt har i stor grad vært basert på undersøkelser hvor graden av overlevelse ble bestemt ved hjelp av *in vitro* metoder basert på vitalfarging ("vital dyes") og evne til å frigjøre sporozoitte fra oocyste-stadiet ("excystation"). Ved den førstnevnte metoden benyttes to fargestoffer, 4,6-diamidino-2-fenylindol (DAPI) og propidiumjodid (PI), for å bestemme permeabiliteten og integriteten til oocystenes vegg og sporozoitteens membraner (Campell og medarb. 1992, Clancy og medarb. 1998). DAPI vil trenge gjennom intakte membraner, mens PI vil bli holdt ute. Levende oocyster vil derfor akkumulere DAPI i kjernen til sine sporozoitte, men vil ikke akkumulere PI. Inaktiverte oocyster vil akkumulere både DAPI og PI. Ved mikroskopering kan

således "levende" og "døde" skilles. Når den andre metoden benyttes inkuberes oocystene under forhold som simulerer forholdene i tarmen til et vertsyd. Oocystenenes evne til å frigi sporozoitte registreres som tegn på at oocystene er levende.

Nyere undersøkelser har vist at når *in vitro* metoder benyttes for å bestemme graden av overlevelse, overestimeres UV-dosen som er nødvendig for å forhindre infeksjon i en mottakelig vert (Bukhari og medarb. 1999). Når det benyttes en *in vivo* metode som baseres på oocystenenes infektivitet i levende mus, viser resultatene at UV-bestråling effektivt inaktiverer oocystene og forhindrer sykdom. Disse funnene har ført til ny interesse for UV-bestråling som en hygienisk barriere i drikkevannsforsyningen internasjonalt. I nye forskrifter fra Environmental Protection Agency (EPA) i USA (the Long Term 2 Enhanced Surface Water Treatment Rule) vil UV-bestråling bli inkludert som en akseptabel metode for inaktivering av *Cryptosporidium* i drikkevann (Clancy 2000).

Det skal tas med at underestimering av inaktiveringsgraden ved bruk av *in vitro* metodene også er blitt vist når ozon benyttes som desinfeksjonsmiddel (Finch og medarb. 1993, Bukhari og medarb. 2000).

UV-systemer

De to vanligste lampetyper som er i bruk i UV-anlegg er lavtrykks- og mellomtrykkslamper (refererer seg til gasstrykket inne i lampene). Begge lampetyper inneholder kvikksølv-damp som utstråler lys ved elektriske

utladninger. Lavtrykkslampene avgir nær 90 % av stråleenergien ved en bølgelengde på 254 nm, som er nær det optimale med tanke på DNA/RNA-skade i mikroorganismer. Mellomtrykkslampene avgir lys i flere områder av UV-spekteret (200 - 320 nm), og også mye effekt går tapt i varme. Imidlertid er det mulig å påtrykke mer effekt på disse lampene slik at UV-anleggene kan lages kompakte med lav hydraulisk oppholdstid. UV-dosen (mJ/cm^2) er et produkt av intensiteten (mW/cm^2) og vannets oppholdstid (s).

I det følgende er resultater fra noen nyere laboratorie-, pilot- og fullskalaforsøk referert, hvor oocyster er blitt UV-bestrålt med de to ulike lampetyper:

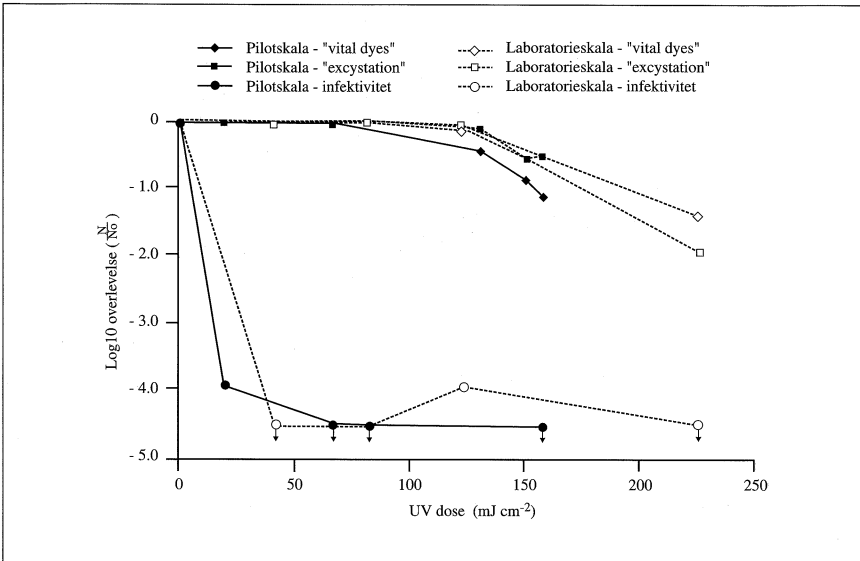
Mellomtrykkslamper

I en undersøkelse ble oocyster bestrålt med mellomtrykkslamper i laboratorie- og pilotskala (Bukhari og medarb. 1999). Resultatene fra laboratorieforsøkene viste at en UV-dose på $41 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ga mer enn $4 \log_{10}$ -enheters inaktivering når *in vivo* metoden basert på infektivitet i mus ble benyttet for å bestemme oocyst-overlevelse (Figur 1). Når *in vitro* metodene ble benyttet, ble det ikke påvist inaktivering ved denne UV-dosen, noe som tyder på at *in vitro* metodene overestimerer dosebehovet når hensikten er å forhindre infeksjon i et vertsyd. I pilotforsøk med en vanngjennomstrømning på 13,6 l/s og en UV-dose på $19 \text{ mJ}/\text{cm}^2$ ble det oppnådd en inaktiveringsgrad på $3,9 \log_{10}$ -enheter.

Disse forsøkene ble fulgt opp med forsøk hvor oocyster ble dosert inn i

vannstrømmen fra et badeanlegg før dette ble bestrålt med mellomtrykkslamper. Vannet inneholdt partikulære og løste forurensninger fra badende, og hadde en turbiditet på 2

FNU. Her ble det oppnådd mer enn 4,5 log₁₀-enheters inaktivering ved alle UV-dosene som ble forsøkt (10, 30 og 60 mJ/cm²) (Glancy 2000).

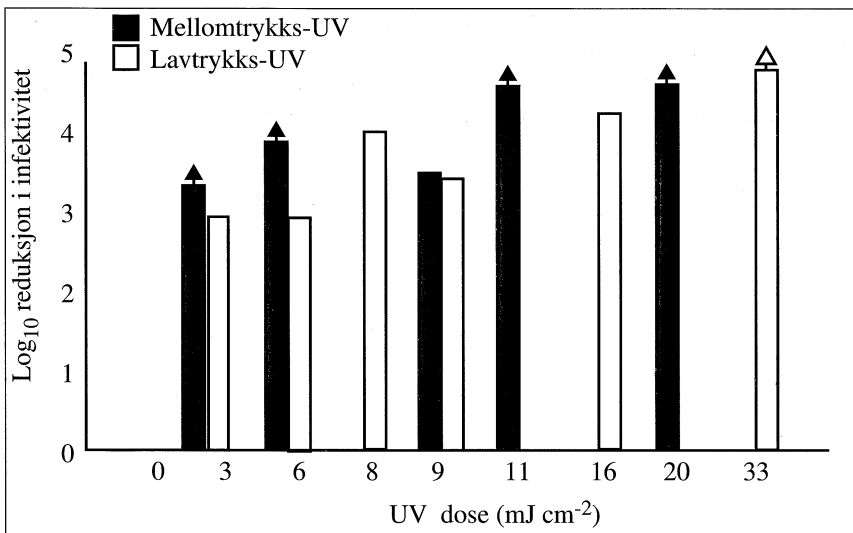


Figur 1. Log₁₀ overlevelse av oocyster (N/N₀) ved økende UV-dose i laboratorie- og pilotskala hvor *in vitro* og *in vivo* metoder er benyttet for å bestemme graden av overlevelse (etter Bukhari og medarb. 1999).

Lavtrykkslamper

Basert på de overnevnte undersøkelserne ble det en stund spekulert på om mellomtrykkslamper var mer effektive ovenfor *Cryptosporidium* enn ordinære lavtrykkslamper. Imidlertid er det vist at også lavtrykkslamper er effektive når infektivitet i mus benyttes som metode for å bestemme graden av inaktivering. I sammenliknende forsøk i laboratorieskala rapporterer Clancy og medarb. (2000) at en dose på 3 mJ/cm² fra en mellomstrykklampe ga 3,4 log₁₀-enheter inaktivering, mens tilsvarende dose

fra en lavtrykkslampe ga 3,0 log₁₀-enheters inaktivering (Figur 2). Høyere doser ga høyere inaktiveringsgrad for begge lampetypene. Disse forsøkene konkluderer med at det ikke er signifikante forskjeller i effekt mellom mellomtrykks- og lavtrykkslamper når det gjelder inaktivering av *Cryptosporidium*-oocyster. Dosenivåene som er benyttet her er på samme nivå som for UV-sensitive indikatorbakterier, og tilsier at det norske dosekravet på 16 mJ/cm² er tilstrekkelig for høy inaktivering av oocyster.



Figur 2. Log₁₀-enheters reduksjon i infektive oocyster ved bruk av mellomtrykks- og lavtrykkslamper (etter Clancy 2000).

Konklusjon

Resultatene fra disse nye undersøkelser tyder på at vi må revurdere vår oppfatning når det gjelder effektiviteten av UV-bestråling ovenfor *Cryptosporidium*, noe som tilsier økt interesse for metoden som hygienisk barriere i Norge og internasjonalt. Imidlertid gjenstår å vise om UV-lys også er like effektivt ovenfor andre parasitter, som f.eks. *Giardia*-cyster, når infektivitet benyttes for å bestemme graden av overlevelse etter bestråling. En annen fordel med UV-bestråling for desinfeksjon er fravær av biprodukter som kan ha uheldige helsemessige effekter ved normal bestråling av naturlig overflatevann.

Referanser

- Bukhari Z., Hargy T.M., Bolton J.R., Dussert B. og Clancy J.L. 1999. Medium-pressure UV for oocyst inactivation. *Jour. American Water Works Association* 91, 86-94.
- Bukhari Z., Marshall M.M., Korich D.G., Fricker C.R., Smith H.V., Rosen J. og Clancy J.L. 2000. Comparison of *Cryptosporidium parvum* viability and infectivity assays following ozone treatment of oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2972-2980.
- Campbell A.T., Robertson L.J. og Smith H.V. 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of *in vitro* excystation with inclusion/exclusion of fluorogenic vital dyes. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58, 3488-3493.

- Clancy J.L., Hargy T.M., Marshall M.M. og Dyksen J.E. 1998. UV light inactivation of *Cryptosporidium* oocysts. Jour. American Water Works Association 90, 92-102.
- Clancy J. L. 2000. UV rises to the *Cryptosporidium* challenge. Water21, oktober 2000, 14-16.
- Clancy J. L., Bukhari Z., Hargy T.M., Bolton J.R., Dussert B. og Marshall M.M. 2000. Comparison of medium- and low-pressure UV light for *Cryptosporidium* inactivation. Jour. American Water Works Association (i trykk).
- Finch G.R., Black E.K., Gyurek L. og Belosevic M. 1993. Ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by in vitro excystation and animal infectivity. Appl. Environ. Microbiol. 59, 4203-4210.
- Gjerde B. 1998. Presentasjon av prosjektet "*Cryptosporidium* og *Giardia* i drikkevasskjelder i Noreg". Vann nr. 4, 33. årg., 445-448.
- Huck P.M., Coffey B.M., Emelko M.B. and O'Melia C.R. 2000. The importance of coagulation for the removal of *Cryptosporidium* and surrogates by filtration. Proceedings of the 9th Gothenburg Symposium 2000, oct. 2-4 (ed. by Hahn H.H., Hoffmann E. and Ødegaard H.), Istanbul, Turkey.
- Korich D.G., Mead J.R., Madore M.S., Sinclair N.A. og Sterling C.R. 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. Appl. Environ. Microbiol., 56, 1423-1428.
- Liltved H., Aas J.H., Thompson E., Oug E., Aanonsen A. og Robertson L.J. 2000. Undersøkelse av 17 drikkevannskilder i Aust-Agder med hensyn på parasitter (*Cryptosporidium* og *Giardia*) og andre mikrobiologiske og fysiske/kjemiske vannkvalitetsparametere. NIVA-rapport (i trykk).
- Ransom M.E., Whitmore T.N. og Carrington E.G. 1993. Effects of disinfectants on the viability of *Cryptosporidium parvum*. Water Supply, 11, 75-89.
- Robertson L.J. 2000. Parasitter, vi har dem i råvannet, de er desinfeksjonsresistente og kan være sykdomsfremkallende. Foredrag på Rensedagene i Grimstad, 23. og 24. mai 2000.
- Robertson L.J., Smith H.V., og Ongert H.J.E. 1994. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. Part III: Development of water treatment technologies to remove and inactivate oocysts. Microbiol. Europe, January/February 1994, 18-26.