



VIRUSI, SPREGLEDANI ONESNAŽEVALCI VODA

dr. NEJC RAČKI¹, dr. ION GUTIERREZ-AGUIRRE², prof. dr. MAJA RAVNIKAR³

Povzetek

Med patogene mikrobe, ki povzročajo biološko onesnaženje voda, štejemo patogene praživali, bakterije, glive in viruse. Kljub temu da so pri ljudeh virusi odgovorni za skoraj polovico vseh okužb, ki se širijo z vodo, so pogosto spregledani. V okoljskih vodah se patogeni virusi pojavljajo v nizkih koncentracijah, ki pa zaradi izjemne infektivnosti še vedno lahko povzročijo okužbo, še posebej, če zaidejo v pitno vodo. Njihova prisotnost v okoljskih in pitnih vodah je med drugim tudi posledica neučinkovitosti tradicionalnih metod čiščenja voda, ki so bile razvite za odstranjevanje patogenih praživali in bakterij, ter so zato pri odstranjevanju ali inaktivaciji mnogo manjših in robustnejših virusov pogosto manj učinkovite. Do nedavnega je problem predstavljala tudi detekcija virusov. Skupaj z razvojem novih molekularnih metod, ki omogočajo učinkovit in zanesljiv način določanja virusov v vodah, se spreminjajo tudi trendi pri regulatornih telesih, ki so odgovorna za nadzor kakovosti vode. V nekaterih državah so virusi v pitnih vodah delno že regulirani. V prispevku bomo predstavili rezultate večletnih raziskav, v katerih smo se skupaj s partnerskimi institucijami posvetili izboljšavi in razvoju metod za koncentriranje, določanje in kvantifikacijo tako humanih kot tudi rastlinskih virusov v vodah ter razvili novo metodo odstranjevanja virusov iz odpadnih vod.

Ključne besede: detekcija, koncentriranje, kvantifikacija, odstranjevanje, virusi v vodah, zakonodaja

Abstract

Biological contamination of water is caused by pathogenic microbes such as protozoa, bacteria, fungi and viruses. Despite viruses are responsible for approximately half of the waterborne infections, they remain overlooked by majority of water regulatory bodies. In the environment waterborne viruses are usually found in low concentrations that due to their extremely low infectivity dose still pose a threat to human health, especially if they find their way into drinking waters. Traditional water treatment was designed for removal of pathogenic protozoa and bacteria, thus being much less effective for removal of the much smaller and robust waterborne viruses. Until just recently, the detection of viruses was long, inefficient and laborious. The development of molecular methods that enable efficient and

¹ Dr. Nejc Rački, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

² Dr. Ion Gutierrez-Aguirre, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo

³ Prof. dr. Maja Ravnikar, Nacionalni inštitut za biologijo, Oddelek za biotehnologijo in sistemsko biologijo



reliable waterborne virus detection has resulted in a marked progress towards regulation of waterborne viruses. In some countries waterborne viruses in drinking waters are already being regulated. In the following article we are reviewing our work on waterborne viruses in collaboration with partner institutions. Our research has been focused on improvement and development of methods for concentration, detection and quantification of plant and human waterborne viruses. Also a new method for waterborne virus removal has been developed.

1. UVOD

Skoraj četrtnina svetovnega prebivalstva dnevno uživa vodo, ki je fekalno onesnažena [31]. Takšna voda vsebuje patogene mikrobe (praživali, bakterije in viruse), ki lahko povzročajo najrazličnejše bolezni, v glavnem pa vnetje prebavil (gastroenteritis). To močno vpliva na zdravje ljudi, saj vnetje prebavil predstavlja sedmi najpogostejši vzrok smrti na svetu [28]. Za 90 % smrti zaradi vnetja prebavil so krive oporečna voda in slabe higiensko-komunalne razmere [28]. Do večine okužb z vodo prihaja v deželah, kjer ljudje nimajo dostopa do čiste pitne vode in kjer ni komunalnih sistemov, vendar pa do izbruhov bolezni zaradi okužb z biološko oporečno vodo prihaja tudi v deželah z visoko razvitim vodovodnim in komunalnim omrežjem, [5, 10]. Kljub temu da so pri ljudeh virusi odgovorni za skoraj polovico vseh okužb, ki se širijo z vodo [26, 29], so pogosto spregledani, saj ni predpisov, ki bi urejali njihovo prisotnost v pitnih ali okoljskih vodah, obstajajo samo predpisi, kakšna mora biti učinkovitost metod za dezinfekcijo virusov in kako jih preverjati.

2. VIRUSI V VODAH

Viruse uvrščamo med biološke oblike življenja, ki za razmnoževanje nujno potrebujejo celico gostitelja. Sestavljeni so iz dednine (RNA ali DNA) in proteinskega ovoja (virusna kapsida), nekateri pa imajo še dodatno lipidno-proteinsko ovojnico (virusno ovojnico). Praviloma so mnogo manjši od bakterij.

V vodah se patogeni virusi pojavljajo v nizkih koncentracijah, ki pa zaradi izjemne infektivnosti še vedno lahko povzročijo okužbo, še posebej, če zaidejo v pitno vodo. Že nekaj zaužitih virusnih delcev je lahko dovolj za okužbo [6]. Viruse v vodah lahko v večini primerov uvrstimo med enterične viruse (okužujejo črevesje), ki se v okolje sproščajo z iztrebki okuženih oseb. Njihova prisotnost v okoljskih in pitnih vodah je med drugim posledica neučinkovitosti tradicionalnih metod čiščenja vode, ki so bile razvite za odstranjevanje patogenih praživali in bakterij, ter so zato pri odstranjevanju ali inaktivaciji mnogo manjših in robustnejših virusov pogosto manj učinkovite. V nasprotju z bakterijami se v vodah virusi niso sposobni razmnoževati. Kroženje vode v okolju tako izkoriščajo zgolj za premostitev razdalje med gostitelji [6]. Skupna lastnost večine z vodo prenosljivih virusov je njihova stabilnost. V okolju lahko ostanejo infektivni od nekaj dni do nekaj let [4, 21, 23]. Zaradi omenjene stabilnosti pa so virusi v primerjavi z bakterijami mnogo odpornejši proti dezinfekciji, ki se uporablja pri obdelavi pitne vode [2, 24].

2.1. Zakonodaja

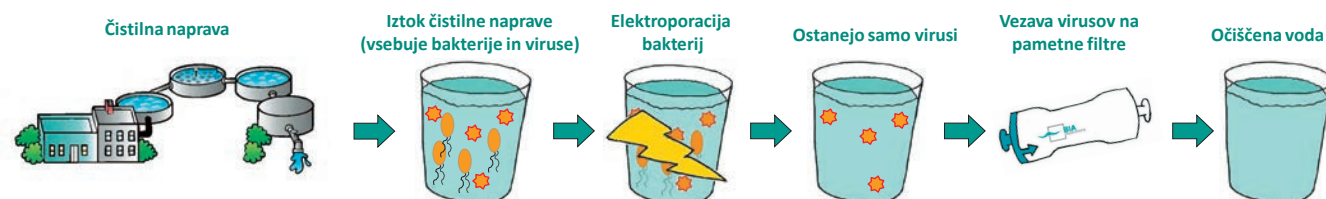
Virusi spadajo poleg bakterij med glavne povzročitelje okužb pri ljudeh, ki se prenašajo z vodo [26, 29]. Kljub temu da je preverjanje koliformnih bakterij v pitni vodi rutinski postopek, predpisan v mnogih deželah, predpisanih rutinskih postopkov za spremljanje prisotnosti virusov v vodi ni [7]. Razlog za pomanjkanje ustreznih predpisov, ki bi določali nadzor nad prisotnostjo virusov v vodah, je pomanjkanje ustreznih detekcijskih metod in posledično slabo poznavanje preživetja in pojavljanja virusov v vodah. V primerjavi z detekcijo koliformnih bakterij, ki lahko rastejo na relativno enostavnem gojišču, virusi za razmnoževanje potrebujejo gostiteljske celice, zato za klasično detekcijo virusov potrebujemo zahtevne, drage in dolgotrajne metode, ki niso primerne za izvajanje rutinskih analiz. Poleg tega pa nekaterih virusov v laboratorijskem okolju še ne znamo gojiti in jih zato s klasičnimi metodami tudi ne moremo določati. Poleg pomanjkljivih detekcijskih metod pa izziv predstavlja tudi to, da ne poznamo univerzalne metode, ki bi bila učinkovita pri odstranjevanju ali inaktivaciji vseh različnih virusov v vodah različne kakovosti [7].

2.2. Trendi na področju virusov v vodah

Vendar pa se stanje na področju virusov v vodah spreminja. Razvoj in nedavni razmah molekularnih metod, s katerimi določamo prisotnost nukleinskih kislin (RNA ali DNA) izbranega organizma, je prinesel pravo revolucijo na področju virologije. Molekularne metode so odpravile potrebo po dolgotrajnem gojenju virusov v laboratoriju. Čas detekcije se je tako z več dni skrajšal na samo nekaj ur, hkrati pa omogočil detekcijo praktično vseh poznanih virusov [8]. Z razvojem novih molekularnih metod pa se začenjajo spreminjati tudi trendi pri zakonodajalcih, ki so odgovorni za nadzor kakovosti vode. Največji korak naprej na področju spremljanja virusov v vodah so naredile ZDA, ki so uvedle predpis, da morajo metode, ki se uporabljajo za pripravo pitne vode, odstraniti vsaj 99,99 % virusov [29]. V pripravi pa je tudi predlog za redno spremljanje in nadzor nad prisotnostjo nekaterih najpogostejših virusov (adenovirusi, kalicivirusi, enterovirusi in hepatitis A virus) v pitni vodi. Pričakuje se, da bomo trendom sledili tudi v Evropi.

3. RAZISKOVANJE NA PODROČJU VIRUSOV V VODAH PRI NAS

Z razvojem in vpeljavo novih molekularnih metod na področju virologije v okoljskih in pitnih vodah se že več kot desetletje ukvarjamo tudi na našem oddelku. V sodelovanju z različnimi partnerskimi institucijami (BIA Separations, Centralna čistilna naprava Domžale - Kamnik, Inštitut za mikrobiologijo in imunologijo Medicinske fakultete v Ljubljani, Fakulteta za elektrotehniko, Nacionalni laboratorij za zdravje okolje in hrano) smo pred kratim zaključili uspešen projekt – Razvoj novih tehnologij za odstranjevanje patogenih mikrobov in toksinov iz različnih vodnih virov (ARRS, L2-4314), v okviru katerega smo se posvetili raziskovanju koncentriranja, detekcije, kvantifikacije in odstranjevanja virusov iz vode. Projekt je poleg virusov zajemal tudi bakterije (slika 1), vendar se bomo v tem prispevku osredotočili samo na virusni del.



Slika 1: Grafični povzetek projekta Razvoj novih tehnologij za odstranjevanje patogenih mikrobov iz različnih vodnih virov

3.1. Razvoj nove metode za koncentriranje virusov

Patogeni virusi se v okoljskih vodah pojavljajo v izjemno nizkih koncentracijah, zato jih je treba pred določanjem koncentrirati. Metode za koncentriranje virusov izkoriščajo fizikalne lastnosti virusnih delcev. Med učinkovitejše in bolj priljubljene spadajo metode, ki za koncentriranje virusov izkoriščajo njihov naboj [6].

V sodelovanju s slovenskim visokotehnološkim podjetjem BIA separations smo z uporabo njihovih pametnih filtrov razvili metodo za koncentriranje virusov iz vode. Pametni filtri so zgrajeni iz posebnega monolitnega kromatografskega materiala, ki preko naboja omogoča dobro vezavo večjih bioloških delcev, kot so virusi. Pokazali smo, da je z uporabo takšnih pametnih filtrov mogoče hkrati koncentrirati vsaj pet različnih patogenih virusov, ki jih najdemo v vodah. Prav tako smo dokazali, da metoda deluje tudi v zelo zahtevnem vodnem vzorcu, kot je iztok iz čistilne naprave. Iztok iz čistilne naprave sam po sebi vsebuje različne patogene viruse, hkrati pa zaradi svoje pestre vsebnosti raznoraznih molekul in manjših delcev predstavlja poseben izziv za učinkovito delovanje pametnih filtrov in s tem koncentracijo virusov. V iztoku čistilne naprave smo tako uspešno koncentrirali in določili dva tipa norovirusa, rotavirus, sapovirus in astrovirus. Omenjena metoda koncentriranja virusov iz vod je signal prisotnosti virusov ojačila od 23- do 137-krat [27].

3.2. Detekcija in določanje količine virusov

Klasične metode za detekcijo virusov s pomočjo celičnih kultur so se zaradi dolgotrajnosti in težavnosti v večini že umaknile hitrim, občutljivim in zanesljivim molekularnim metodam. Danes temelji prevladujoči tip detekcije virusov za analizo vode na encimskem pomnoževanju nukleinskih kislin [3, 9]. Temelj molekularnih metod, verižna reakcija s polimerazo – PCR (polimeraza je encim, ki omogoča pomnoževanje DNA) omogoča eksponentno pomnoževanje specifičnega odseka zaporedja tarčnega organizma DNA ali RNA, kar pomeni, da lahko zaznamo zelo nizke koncentracije DNA ali RNA. Uporaba fluorescentnih barvil pa je omogočila nadgradnjo PCR-ja v PCR v realnem času (qPCR), ki velja za eno izmed najbolj občutljivih detekcijskih metod za določanje prisotnosti tarčnih zaporedij DNA ali RNA, hkrati pa omogoča tudi kvantifikacijo (določanje števila kopij DNA). Možnost kvantifikacije virusov v vodi je vse pomembnejša, saj nove smernice pri upravljanju voda temeljijo na kvantitativnih in ne zgolj kvalitativnih parametrih prisotnosti patogenih mikrobov v preiskovanem vodnem viru [30]. Poleg tega so kvantitativne metode nepogrešljive pri proučevanju in ocenjevanju metod za odstranjevanje virusov iz vode [8].

V zadnjih nekaj letih se uporablja nov pristop kvantifikacije z uporabo PCR-reakcije, imenovan digitalni kapljični PCR. Nov pristop omogoča absolutno kvantifikacijo, neodvisno od standardov, hkrati pa ima povečano toleranco za prisotnost snovi (inhibitorjev), ki zavirajo proces pomnoževanja DNA. Inhibitorji se pogosto pojavljajo v okoljskih vzorcih, kamor spadajo tudi različni vodni vzorci [16].

Možnost absolutne kvantifikacije in povečana toleranca do prisotnosti inhibitorjev sta pri analizi vodnih vzorcev dobrodošla prednost, zato smo se odločili narediti primerjavo med starejšo uveljavljeno metodo (PCR v realnem času) in novo metodo (kapljični digitalni PCR) in bili prvi, ki smo novo metodo uporabili za kvantifikacijo virusov RNA. Obe metodi smo izžvali z različnimi koncentracijami virusa v različnih vodnih vzorcih in dokazali, da imata podobno občutljivost, novejša metoda pa je natančnejša in bolje deluje tudi ob prisotnosti inhibitorjev v vodnih vzorcih [20].

Podobno kot nekateri humani patogeni virusi lahko vodo za transport med gostiteljskimi rastlinami izkoriščajo tudi nekateri rastlinski virusi [12]. To povzroča probleme pri gojenju kulturnih rastlin, kjer virusi znižujejo hektarske donose, še posebej pri intenzivnem kmetijstvu, ki vključuje namakanje ali uporabo hidroponskih sistemov [1, 15, 23]. Zato smo v nedavni raziskavi, kjer smo testirali odpornost kapljičnega digitalnega PCR-ja proti prisotnosti inhibitorjev (iz okoljskih vzorcev), kot tarčni virus uporabili rastlinski virus RNA, virus blage lisavosti paprike (Pepper mild mottle virus). Koncentracijo virusa smo določali v vzorcih prsti, zelenih delih rastlin, semena in iztoku čistilne naprave. Izkazalo se je, da je v primerjavi s starejšo že uveljavljeno metodo nova metoda manj občutljiva za prisotnost vseh testiranih snovi, ki zavirajo reakcijo PCR in so pogoste v okoljskih vzorcih. Pokazali smo, da je odpornost proti inhibitorjem lastnost kapljičnega digitalnega PCR-ja ne glede na to, ali govorimo o detekciji in kvantifikaciji DNA ali RNA [18]. Z omenjenima raziskavama smo izpostavili prednosti in možnosti, ki jih metoda prinaša na področje določanja virusov v vodah.

3.3. Odstranjevanje virusov

Poleg zanesljivih in občutljivih metod za detekcijo in kvantifikacijo virusov je pomembno, da imamo ob prisotnosti virusov v vodah na voljo metode za odstranjevanje virusov iz vode. Onesnaženost vode z virusi lahko rešujemo s fizičnim odstranjevanjem virusov ali z njihovo inaktivacijo. V prvem primeru viruse podobno kot pri metodah za koncentriranje virusov odstranimo na podlagi njihovih fizikalnih lastnosti (flokulacija, adsorpcija, različni načini filtracij) [15]. Pri inaktivaciji pa viruse izpostavimo fizikalnim ali kemijskim dejavnikom, ki tako močno poškodujejo virusne proteine ali njihovo dednino, da niso več infektivni (kloriranje, UV-obsevanje, uporaba ozona) [2, 11, 12]. Povečevanje onesnaženosti vod s hkratnim hitrim naraščanjem potreb po vedno večji količini čiste industrijske in pitne vode vedno bolj razkriva pomanjkljivosti današnjih metod za odstranjevanje ali inaktivacijo virusov [24, 7]. Potrebujemo nove pristope in rešitve, ki bodo dopolnile ali nadomestile obstoječe.

Na področju odstranjevanja virusov iz vode smo želeli unovčiti poznavanje delovanja metakrilatnih monolitnih kromatografskih nosilcev (pametnih filtrov, omenjenih v poglavju 3.1. Razvoj nove metode za koncentriranje virusov). Vedeli smo, da imajo ti materiali odlične lastno-



sti za vezavo večjih količin virusov, zato nas je zanimala njihova uporabnost pri odstranjevanju virusov iz vode. Za vodni vzorec smo namenoma izbrali iztok čistilne naprave, saj je njegova pestra sestava poseben izziv zaradi prisotnosti različnih kemikalij in anorganskih delcev ter zaradi biološke pestrosti. Hkrati so v njem naravno prisotni številni humani patogeni virusi [25]. Izkazalo se je, da je mogoče potencial za vezavo večjih količin virusov na monolitne nosilce izkoristiti tudi za učinkovito odstranjevanje virusov iz vode. S kombinirano uporabo dveh različnih metakrilatnih monolitnih nosilcev smo dosegli obetavne rezultate, saj smo uspešno odstranili vsaj pet različnih enteričnih virusov. To smo dokazali v kompleksnem vzorcu iztoka čistilne naprave, v enostavnejšem vzorcu, kot je vodovodna voda, pa je nova metoda pokazala še veliko večji potencial za odstranjevanje virusov [19].

4. ZAKLJUČEK

Spremembe načina življenja ljudi v razvitem svetu in tudi v državah v razvoju, intenzivna industrializacija in podnebne spremembe so v zadnjih nekaj desetletjih zdesetkale vire čiste pitne vode [17, 24]. Povečuje se potreba po smotrnejši uporabi vodnih virov in regeneraciji odpadne vode. Virusi kot eni izmed glavnih bioloških onesnažil v vodah zato zagotovo ne bodo ostali spregledani, če bomo želeli zagotavljati neoporečno čisto vodo.

LITERATURA IN VIRI

- Alonso, E., García Luque I., Avila-Rincón, M. J., Wicke, B., Serra, M. T., Díaz-Ruiz, J. R.: A tobamovirus causing heavy losses in protected pepper crops in Spain, *J. Phytopathol.*, 1989, 125, 1, str. 67–76.
- Berg, G.: Removal of viruses from sewage, effluents, and waters. I. A review. *Bull. World Health Organ.*, 1973, 49, 5, str. 451–460.
- Boonham, N., Kreuze J., Winter, S., Vlugt, R. van der, Bergervoet J., Tomlinson, J., Mumford, R.: Methods in virus diagnostics: From ELISA to next generation sequencing. *Virus Res.*, 2014, 186, str. 20–31.
- Carter, M. J.: Enterically infecting viruses: Pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *J. Appl. Microbiol.*, 98, str. 1354–1380.
- Center for Disease Control and Prevention (CDC), Morbidity and mortality weekly report, 2013, 62, 2005.
- Fong T., Lipp E. K.: Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2005, 69, 2, str. 357–371.
- Gall, A. M., Mariñas, B. J., Lu Y., Shisler J. L.: Waterborne Viruses: A Barrier to Safe Drinking Water, *Plos Pathog.*, 2015, 11(6):e1004867.
- Girones, R., Ferrús, M. A., Alonso, J. L., Rodríguez-Manzano, J., Calgua, B., Corrêa, A. D. A., Hundesa, A., Carratala, A., Bofill-Mas S.: Molecular detection of pathogens in water--the pros and cons of molecular techniques, *Water Res.*, 2010, 44, 15, str. 4325–4339.
- Kotwal, G., Cannon J. L.: Environmental persistence and transfer of enteric viruses, *Curr. Opin. Virol.*, 2014, 4, str. 37–43.
- Kukkula, M., Maunula, L., Silvennoinen, E., von Bonsdorff C. H.: Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses, *J Infect Dis.*, 1999, 180 (6), str. 1771–1776.
- Loo, S. L., Fane, A. G., Krantz, W. B., Lim, T. T.: Emergency water supply: a review of potential technologies and selection criteria, *Water Res.*, 2012, 46, 10, str. 3125–3151.
- Matsushita, T., Shirasaki, N., Matsui, Y., Ohno, K.: Virus inactivation during coagulation with aluminum coagulants, *Chemosphere*, 2011, 85, 4, str. 571–576.
- Mehle, N., Ravnikar, M.: Plant viruses in aqueous environment - Survival, water mediated transmission and detection, *Water Res.*, 2012, 46, 16, str. 4902–4917.
- Nwachuku, N., Gerba, C. P.: Emerging waterborne pathogens: can we kill them all?, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2004, 15, 3, str. 175–180.
- Pares, R. D.: A tobamovirus infecting capsicum in Australia. *Ann. Appl. Biol.*, 1985, 106, str. 469–474.
- Pinheiro, L. B., Coleman, V. A., Hindson, C. M., Herrmann, J., Hindson, B. J., Bhat, S., Emslie K. R.: Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification, *Anal. Chem.*, 2012, 84, str. 1003–1011.
- Qu, X., Alvarez, P. J. J., Li, Q.: Applications of nanotechnology in water and wastewater treatment, *Water Res.*, 2013, 47, 12, str. 3931–3946.
- Rački, N., Dreot, T., Gutierrez-Aguirre, I., Blejec, A., Ravnikar, M.: Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples, *Plant Methods*, 2014a, 10, 42.
- Rački, N., Kramberger, P., Steyer, A., Gašperšič, J., Štrancar, A., Ravnikar, M., Gutierrez-Aguirre, I.: Methacrylate monolith chromatography as a tool for waterborne virus removal, *J. Chromatogr. A*, 2015, 1381, str. 118–124.
- Rački, N., Morisset, D., Gutierrez-Aguirre, I., Ravnikar, M.: One-step RT-droplet digital PCR: a breakthrough in the quantification of waterborne RNA viruses, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2014b, 406, 3, str. 661–667.
- Reynolds K. A., Mena K. D., Gerba C. P.: Risk of waterborne illness via drinking water in the United States, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 2008, 192, str. 117–158.
- Rzezutka, A., Cook, N.: Survival of human enteric viruses in the environment and food, *FEMS Microbiol. Rev.*, 2004, 28, str. 441–453.
- Schwarz, D., Paschek, U., Bandte, M., Büttner, C., Obermeier, C.: Detection, spread, and interactions of pepino mosaic virus and pythium aphanidermatum in the root environment of tomato in hydroponics. *Acta Hortic.*, 2009, 808, str. 163–170.
- Shannon, M. A., Bohn, P. W., Elimelech, M., Georgiadis, J. G., Mariñas, B. J., Mayes, A. M.: Science and technology for water purification in the coming decades. *Nature*, 2008, 452, 7185, str. 301–310.
- Simmons, F. J., Xagoraki, I.: Release of infectious human enteric viruses by full-scale wastewater utilities, *Water Res.*, 2011, 45, 12, str. 3590–3598.
- Sinclair, R. G., Jones, E. L., Gerba, C. P.: Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: a review, *J. Appl. Microbiol.*, 2009, 107, 6, str. 1769–1780.
- Steyer, A., Gutiérrez-Aguirre, I., Rački, N., Beigot Glaser, S., Brajer Humar, B., Stražar, M., Škrjanc, I., Poljšak-Prijatelj, M., Ravnikar, M., Rupnik, M.: The detection rate of enteric viruses and *Clostridium difficile* in a waste water treatment plant effluent, *Food Environ. Virol.*, 2015, 7, 2, str. 164–172.
- UNICEF, Pneumonia and diarrhoea: Tackling the deadliest diseases for the world's poorest children, New York, NY: Statistics and Monitoring Section- Division of Policy and Strategy, 2012.
- USEPA, Occurrence and Monitoring Document for the Final Ground Water Rule, 2006. 160 str., pridobljeno s spletne strani http://www.epa.gov/ogwdw/disinfection/gwr/pdfs/support_gwr_occurrence-monitoring.pdf (9. feb. 2015).
- WHO, Guidelines for drinking-water quality. Fourth edition. 2011, 564 str., pridobljeno s spletne strani http://whqlibdoc.who.int/publications/2011/9789241548151_eng.pdf (15. feb. 2015).
- WHO, UNICEF, Progress on drinking water and sanitation: 2014 Update. Geneva, Switzerland, WHO Press, 2014.