

Analysmetoder för norovirus i ytvatten

Utveckling av molekylärbiologisk metodik för detektion och kvantifiering i vatten och slam

Erik Dalin
Johanna Ansker
Peder Häggström
Bengt Dahlberg
Britt-Marie Pott
Per Ericsson
Per-Eric Lindgren



Svenskt Vatten Utveckling

Svenskt Vatten Utveckling (SV-Utveckling) är kommunernas eget FoU-program om kommunal VA-teknik. Programmet finansieras i sin helhet av kommunerna, vilket är unikt på så sätt att statliga medel tidigare alltid använts för denna typ av verksamhet.

SV-Utveckling (fd VA-Forsk) initierades gemensamt av Svenska Kommunförbundet och Svenskt Vatten. Verksamheten påbörjades år 1990. Programmet lägger tonvikten på tillämpad forskning och utveckling inom det kommunala VA-området. Projekt bedrivs inom hela det VA-tekniska fältet under huvudrubrikerna:

Dricksvatten
Ledningsnät
Avloppsvatten
Ekonomi och organisation
Utbildning och information

SV-Utveckling styrs av en kommitté, som utses av styrelsen för Svenskt Vatten AB. För närvarande har kommittén följande sammansättning:

Anders Lago, ordförande	Södertälje Kommun
Olof Bergstedt	Göteborg Vatten
Per Fåhraeus	Varbergs Kommun
Carina Färm	Eskilstuna Energi & Miljö AB
Daniel Hellström	Svenskt Vatten AB
Marie Nordkvist Persson	Sydvatten AB
Lars-Gunnar Reinius	Stockholm Vatten AB
Mats Rostö	Gästrike Vatten AB
Bo Rutberg	Sveriges Kommuner och Landsting
Lena Söderberg	Svenskt Vatten AB
Ulf Thysell	VA SYD
Susann Wennmalm	Käppalaförbundet
Fred Ivar Aasand	Norsk Vann, adjungerad

Författarna är ensamma ansvariga för rapportens innehåll, varför detta ej kan åberopas såsom representerande Svenskt Vattens ståndpunkt.

Svenskt Vatten Utveckling
Svenskt Vatten AB
Box 47 607
117 94 Stockholm
Tfn 08-506 002 00
Fax 08-506 002 10
svensktvatten@svensktvatten.se
www.svensktvatten.se

Svenskt Vatten AB är servicebolag till föreningen Svenskt Vatten.

Rapportens titel:	Analysmetodik för norovirus i ytvatten
Title of the report:	Analysis methodology of noroviruses in surface water
Rapportnummer:	2010-09
Författare:	Erik Dalin (Linköpings universitet), Johanna Ansker (växeltel: +46 (0)8 522 120 00, e-post: johanna.ansker@stockholmvatten.se, Stockholm Vatten), Peder Häggström (Stockholm Vatten), Bengt Dahlberg (Göteborg Vatten), Britt-Marie Pott (Sydvatten), Per Ericsson (Norrvatten), Per-Eric Lindgren (Linköpings universitet)
Projektnummer:	28-114
Projektets namn:	Humanpatogena virus i svenska ytvattentäkter, del 1
Projektets finansiering:	Svenskt Vatten Utveckling, Stockholm Vatten, Norrvatten, Sydvatten, Göteborg Vatten och Linköpings universitet
Rapportens omfattning	
Sidantal:	56
Format:	A4
Sökord:	Molekylärbiologisk analys, Norovirus, Vattenburen smitta, Vattenanalys, Virus
Keywords:	Molecular Analysis, Norovirus, Virus, Water analysis, Waterborne infections
Sammandrag:	Beskrivning av virus som kan orsaka vattenburna utbrott. Utveckling av anrikningsmetod och analysmetodik för mätning av bakgrunds nivåer av norovirus i ytvattentäkter. Detektionen utförs med en automatiserad molekylär analyskedja.
Abstract:	Viruses causing water-borne outbreaks and concentration methods for viruses in water is described. Analysis methodology for measuring background levels of norovirus in surface water sources has been developed. The detection is performed using an automated molecular analysis chain.
Målgrupper:	VA-ansvariga, utvecklingsingenjörer, tillsynsmyndigheter, VA-konsulter, forskare
Omslagsbild:	Råvatten till vattenverk analyseras med molekylärbiologisk metodik. Foto: Erik Dalin
Rapport:	Finns att hämta hem som PDF-fil från Svenskt Vattens hemsida www.svensktvatten.se
Utgivningsår:	2010
Utgivare:	Svenskt Vatten AB © Svenskt Vatten AB

Förord

Vattenburna sjukdomsutbrott kan orsakas av virus, vilka på senare år uppmärksammas kunna utgöra allvarliga hälsorisker inom dricksvattenberedning. Kunskapen om virus i vattentäkter är begränsad och fortfarande saknas en standardiserad metod för att bestämma virushalter i vatten. Då virus är motståndskraftiga mot desinfektion och kan finnas kvar lång tid i vatten är det angeläget att utforska området.

Projektet, som utförts på Avdelningen för medicinsk mikrobiologi vid Linköpings universitet, har initierats av Görvålgruppen: Johanna Ansker (Stockholm Vatten), Peder Häggström (Stockholm Vatten), Per Ericsson (Norrvatten), Britt-Marie Pott (Sydvatten) och Bengt Dahlberg (Göteborg Vatten), i samverkan med Avdelningen för medicinsk mikrobiologi: Per-Eric Lindgren.

Rapportens inledande del beskriver humanpatogena virus som kan orsaka vattenburna utbrott samt en sammanställning av beskrivna metoder för anrikning av virus i vatten. Fokus har lagts på norovirus, som orsakar vinterkräksjukan, eftersom det anses utgöra den största mikrobiella hälsoriskerna inom svensk dricksvattenberedning. Rapportens senare del beskriver den experimentella utvecklingen av förbättrad analysmetodik av norovirus i vatten.

Det är i vissa fall ofrånkomligt att använda fackuttryck som inte alltid är självklara för rapportens läsare. Dessa återfinns i en lista i appendix A.

Linköping den 15 mars 2010

Erik Dalin

Innehåll

Förord.....	3
Sammanfattning.....	6
Summary.....	7
1 Inledning.....	8
2 Svensk dricksvattenberedning.....	10
2.1 Mekanisk avskiljning.....	10
2.2 Kemisk fällning, sedimentering och filtrering.....	10
2.3 Långsamfiltrering/kolfiltrering.....	10
2.4 Desinfektion.....	11
3 Vattenburna humanpatogena mikroorganismer.....	12
3.1 Vattenburna sjukdomar.....	13
4 Vattenburna virus.....	14
4.1 Vattenburna virus som kan orsaka sjukdomsutbrott.....	14
4.2 Smittspridning av mag-tarmvirus.....	16
4.3 Avskiljning och inaktivering av virus i vattenverk.....	18
4.4 Kvalitetskontroll och dess svagheter.....	18
5 Norovirus.....	21
5.1 Struktur och klassificering.....	21
5.2 Infektioner och symtombild.....	22
5.3 Förekomst och smittspridning.....	23
5.4 Vattenburna norovirusutbrott.....	23
5.5 Inaktivering av norovirus.....	25
5.6 Ökning av antalet norovirusfall.....	26
6 Detektionsmetoder för norovirus.....	27
6.1 Elektronmikroskopi.....	27
6.2 Enzymkopplade antikroppar (ELISA).....	27
6.3 PCR.....	28
7 Analyskedja för detektion av norovirus i vatten.....	31
7.1 Anrikning av norovirus i vatten.....	32
8 Anrikningsmetodik för norovirus i vatten.....	36
8.1 Anrikningsmetod enligt Gilgen et al. (1997).....	36
8.2 Vidareutveckling av Gilgens anrikningsmetod.....	36
8.3 Slutsatser anrikningmetodik.....	40
9 Utveckling av analysmetodik för norovirus i slam.....	41
9.1 Analys av prov med tillsats av norovirus.....	41
9.2 Analys av autentiska slamprov.....	42
9.3 Slutsatser slamanalys.....	42

10	Automatisering av molekylärbiologisk analys	43
10.1	Utvärdering av automatiserade processer.....	43
10.2	Molekylärbiologisk analys av norovirusprov	44
10.3	Slutsatser automatiserad analyskedja	44
11	Diskussion	45
12	Slutsatser	47
13	Referenser.....	48
Appendix A.....		55
Appendix B		56

Sammanfattning

Norovirus har i Klimat och sårbarhetsutredningen pekats ut som det virus som har störst betydelse för Sverige med avseende på vattenburen smitta via dricksvatten. Detta är en utveckling av den bedömning som WHO gjort av de största vattenburna smittoämnena och deras betydelse för dricksvattenförsörjningen. Viruset har orsakat flera stora vattenburna utbrott i Sverige, men problemets omfattning för dricksvattenberedningen är oklar. Sveriges förhållandevis enkla beredningsprocesser befaras vara sårbara för hög virusbelastning, ett problem som kan bli större vid en framtida klimatiförändring. Idag saknas uppgifter om normalhalter och – variationer av norovirus i svenska vattentäkter, vilket försvårar tillförlitlig riskvärdering. Detta beror till stor del på att det inte finns någon välutvecklad och standardiserad metodik för analys av virus i låga halter i vattenprov.

Projektet avser dels att ge en sammanställning av befintliga anrikningsmetoder för virus i ytvatten, dels att experimentellt utveckla en analysmetodik för mätning av norovirus i svenska dricksvattentäkter.

Under projektet vidareutvecklades en befintlig anrikningsmetod för norovirus i vattenprov. Den nya anrikningsmetoden ger cirka fem gånger effektivare anrikning och har hög reproducerbarhet. Den utgår från cirka en liter ytvatten och kan enkelt skalas upp för analys av 20 liter vatten.

Då den absoluta majoriteten viruspartiklar i råvattnet antas avskiljas i samband med kemisk fällning och snabbsandfiltrering vid dricksvattenberedning, bör virusnivåer i sedimenteringsslammet spegla vattnets virusnivåer. Därför utvecklades även en enkel och snabb analysmetod för norovirus i slam, vilken applicerades på slam från fyra svenska vattenverk. I slam från två av dem kunde norovirus påvisas.

För att erhålla en effektiv molekylärbiologisk analysmetodik för detektion och kvantifiering av norovirus utvecklades en automatiserad analyskedja. Analyskedjan är robust med hög reproducerbarhet och låg risk för kontamination. Den möjliggör även parallell hantering av ett stort antal prov.

Analysmetoderna för vatten och slam avses skalas upp för analys av större provolymer. Uppskalningen är sannolikt nödvändig för att erhålla ett system med tillräcklig känslighet för mätning av låga halter av norovirus. Därefter kan metoderna tillämpas för att undersöka virusförekomst i ytvattentäkter. Förvärvade data kan användas i riskvärderingsmodeller för norovirus.

Summary

WHO has identified norovirus as the potentially greatest threat to healthy drinking water. The virus has caused several large water borne outbreaks in Sweden. However, the extent of the problem for Swedish drinking water treatment is still unclear. The relatively simple drinking water treatment process in Sweden might be vulnerable to high viral load, a concern which may be even greater in the future due to a possible climate change. Today, there is no data of normal norovirus levels in Swedish surface waters. Hence, accurate risk assessment is hampered.

The project intends to give a summary of existing methods for concentrating viruses in surface waters. Furthermore, the aim of the project was to develop a methodology for determining background levels of norovirus in Swedish surface waters.

During the project, a previously described method for concentrating norovirus in surface water was further improved. The new method gives approximately five times higher yield with high reproducibility. About one litre can be analysed, but it can rather easily be scaled up for analysis of 20 litres of water.

Since the vast majority of the virus particles are believed to be removed in the chemical precipitation process, virus levels in the settling sludge should reflect the virus levels in the water. Therefore, an assay for analysing norovirus in sludge was developed. Using this assay, norovirus was detected in sludge samples from two out of four Swedish drinking water treatment plants analysed.

In order to obtain an effective analysis for detection and quantification of norovirus, a highly automated molecular analysis chain was set up. The analysis is robust with high reproducibility, low risk of contamination and enables handling of a large number of samples in parallel.

The analytical methods for water and sludge will be scaled up for analysis of larger sample volumes. This is probably necessary to measure the low background levels of norovirus. Thereafter, the methods can be applied to determine the prevalence of norovirus in four Swedish surface water supplies. Acquired data can be used in risk assessment models, to assess the risks norovirus poses to healthy Swedish drinking water.

1 Inledning

Tillgång till rent dricksvatten är enligt WHO en grundläggande mänsklig rättighet och av stor betydelse för god hälsa. Kontaminerat dricksvatten kan ge allvarliga konsekvenser med omfattande utbrott, där många människor insjuknar på kort tid. Vattenburna sjukdomsutbrott kan orsakas av såväl bakterier som av virus eller protozoer. De största mikrobiella riskerna är förenade med konsumtion av dricksvatten som kontaminerats med avföring (Pond et al. 2004; WHO 2004).

Mellan 1980 och 2004 rapporterades 142 vattenburna sjukdomsutbrott i Sverige med totalt 63 000 sjukdomsfall. Bakterien *Campylobacter* är det mikrobiella smittämne som identifierats flest gånger, följt av vinterkräksjuket viruset norovirus och parasiten *Giardia lamblia*. I merparten av de vattenburna utbrotten har smittämnet dock inte kunnat bestämmas. (SMI 2010a)

Historiskt sett har bakterier fått mest uppmärksamhet, men genom utveckling av snabba och känsliga molekylära detektionsmetoder har virus alltmer börjat uppmärksammas som viktig källa till kontaminering. Idag anses virus utgöra allvarliga hälsorisker inom dricksvattenberedningen och misstänks ligga bakom majoriteten av utbrott där smittämnet inte kunnat identifieras. (Patel et al. 2008; Pond et al. 2004; Wyn-Jones and Sellwood 2001)

Beredningstekniken i svenska dricksvattenverk är förhållandevis enkel och huvudsakligen anpassad för att avlägsna sjukdomsalstrande bakterier (Svenskt Vatten 2007). Kontroll av mikrobiell kontaminering inom dricksvattenproduktionen sker idag med indikatororganismer, i huvudsak koliforma bakterier, för att säkerställa att dricksvattnet är fritt från kontamination från avföring (Lundberg Abrahamsson et al. 2009). Indikatororganismer är emellertid inte representativa för virus, eftersom egenskaperna skiljer sig åt. Virus är i regel mer motståndskraftiga mot desinfektion och kan överleva lång tid i vattenmiljö (Bae and Schwab 2008; Ødegaard et al. 2006), vilket innebär att förekomst av virus inte kan uteslutas trots att provet är fritt från koliformer.

Norovirus orsakar den så kallade vinterkräksjukan och ger upphov till en betydande andel av både milda och allvarliga mag-tarminfektioner världen över (Patel et al. 2008). I västvärlden uppskattas viruset ligga bakom 70–80 % av utbrotten av magsjuka (Fankhauser et al. 2002). Norovirus har egenskaper som gör att det har stor potential att orsaka utbrott; det har hög smittsamhet, sprids i stora kvantiteter och är stabilt i miljön (Thornton et al. 2004). Under de två senaste decennierna har antalet rapporterade norovirusfall ökat lavinartat (Widdowson et al. 2005), sannolikt på grund av uppkomst av en ny, mer aggressiv norovirusstam (Lindesmith et al. 2008; Lopman et al. 2008). Den primära smittspridningen är relativt outforskad, men en viktig spridningsväg är via kontaminerat dricksvatten (Karim et al. 2009).

WHO har pekat ut norovirus som en av de patogener som kan utgöra ett betydande hot mot hälsosamt dricksvatten i utvecklade länder (WHO

2004). Norovirus bedöms också utgöra en av de största mikrobiologiska riskerna för svensk dricksvattenförsörjning (Svenskt Vatten 2007). Det finns ett flertal nordiska norovirusutbrott som förknippats med kontaminerat, kommunalt dricksvatten (Kukkula et al. 1999; Maunula et al. 2005; SMI 2009). Genom bättre molekylärbiologiska metoder har man så senare tid kunnat visa att norovirus är mycket frekvent i samband med större vattenburna utbrott i Sverige. Det ligger därför nära till hands att anta att en betydande andel av de utbrott där smittoämnet inte kunnat bestämmas orsakats av norovirus (och andra magsjukesvirus).

Många studier bedrivs för att utreda virusförekomst i miljön. Ännu krävs dock mycket forskning, inte minst kring utveckling av kvantitativa och kvalitativa analysmetoder för virus i dricksvattentäkter. Exempelvis saknas standardiserade metoder för att påvisa virus i vatten. Problemet ligger i att virusnivåerna ofta är så låga att de är svåra att detektera, men likväl tillräckligt höga för att utgöra en hälsorisk. (Bosch et al. 2008)

Kunskapen om normalhalten av norovirus och deras variation i rum och tid i svenska dricksvattentäkter är mycket begränsad, vilket innebär att dagens riskanalyser i stor utsträckning baseras på undermåligt underlag. Det är därför angeläget att öka kunskapen om eventuell virusförekomst i svenska vattentäkter, för att kunna förebygga störningar i dricksvattenförsörjningen.

Projektets syfte

Syftet med detta projekt är dels att sammanfatta hittills beskrivna analysmetoder för virus i ytvatten, dels att utveckla en analysmetodik för mätning av norovirus i svenska dricksvattentäkter.

För att kunna använda resultaten i de riskanalysverktyg som finns framtagna krävs att metoden har en detektionsnivå som är tillräckligt låg för att mäta bakgrundsnivåer av norovirus. Men eftersom information om förekommande norovirusnivåer i svenska ytvatten saknas är kravet på detektionsnivån svårt att definiera. Metoden ska vara personoberoende och bygga på konventionell utrustning, så att den går att sätta upp på ett annat virologiskt laboratorium. Därtill ska den även vara tids- och kostnadseffektiv.

2 Svensk dricksvattenberedning

Sverige har en gynnsam vattenförsörjningssituation med god tillgång på täkter med vatten av hög kvalitet. Hälften av Sveriges dricksvattenförsörjning kommer från ytvatten, resterande del från grundvatten. Den goda råvattenkvaliteten har lett till att beredningstekniken är förhållandevis enkel och de svenska vattenverken är konstruerade för att i huvudsak rena vatten från sjukdomsalstrande bakterier. Ytvattenverkens reningsprocess utgörs vanligen av mekanisk avskiljning, kemisk fällning, sedimentering, filtrering, långsam- eller kolfiltrering och slutligen desinfektion. En schematisk beskrivning av ett ytvattenverk ges i appendix B. Delprocesserna varierar lite mellan olika ytvattenverk, men grundprincipen är densamma. (Svenskt Vatten 2007)

2.1 Mekanisk avskiljning

Uttag av råvattnet från ytvattentäkter görs generellt på flera meters djup, intagsdjupet kan ofta varieras beroende på årstid och vattnets kvalitet. Vattnet passerar, grov- och/eller mikrosilar, varvid fisk, vattenväxter, löv och grova partiklar avskiljs. Råvattenpumpar transporterar vattnet till vattenverket. I vattenverken förflyttas vattenmassorna därefter ofta genom självfall genom de olika behandlingsstegen.

2.2 Kemisk fällning, sedimentering och filtrering

Vid behov höjs det inkommande vattnets pH med kalk eller lut. Flockningskemikalie, vanligen aluminiumsulfat eller järnklorid, samt eventuellt hjälpkoagulant tillsätts. Vattnet blandas i flockningskammare, där flockningskemikalien bildar komplex med partiklar och lösta ämnen såsom mikroorganismer och humus. Under uppehållstiden i flockningskamrarna slås de bildade komplexen ihop till större avskiljbara flockar. Därefter leds vattnet till sedimenteringsbassänger där flockarna sjunker till botten och avlägsnas i form av slam. Avskiljning av kvarvarande flockar sker genom att vattnet får passera ett snabbsandfilter eller ett filter med granulerat aktivt kol. Filtren rengörs med jämna mellanrum genom backspolning med vatten alternativt vatten och luft för att de inte ska sätta igen.

2.3 Långsamfiltrering/kolfiltrering

Efter kemisk fällning och filtrering förs vattnet till långsamfilterbassänger med finare sand eller filter av aktivt kol. I långsamfilter med sand sker förutom en fysisk filtrering även nedbrytning av lukt- och smakstörande ämnen med hjälp av mikroorganismer. De mikrobiologiska processerna bidrar också till inaktivering av patogena mikroorganismer. Därtill förbru-

kas en del näringsämnen i vattnet vilket minskar risken för tillväxt senare i ledningsnätet. För att erhålla optimalt pH för de biologiska processerna tillsätts kalk. Kolfilter binder istället de störande ämnena. En viss mikrobiologisk aktivitet sker sannolikt även här, särskilt när kolfiltret närmar sig mättnad.

2.4 Desinfektion

I Sverige används kemisk desinfektion med klorföreningar såsom hypoklorit eller klordioxid. Klorering är normalt slutsteget före distribution. Förutom klordesinfektion tillämpar vissa vattenverk inaktivering av mikroorganismer med UV-bestrålning eller med ozon. Slutligen justeras pH upp med kalkvatten eller lut i syfte att minimera dricksvattnets korrosiva egenskaper.

3 Vattenburna humanpatogena mikroorganismer

De främsta hoten mot hälsosamt dricksvatten är de mikrobiella riskerna (Pond et al. 2004; WHO 2004). Ett stort antal olika humanpatogena mikroorganismer, såsom bakterier, protozoer och virus, kan orsaka vattenburna infektioner. Typiskt för dessa är att de kan finnas kvar lång tid i vattenmiljö, från dagar till månader. Särskilt stort hot mot svensk dricksvattenberedning utgör de mikroorganismer som kan överleva i kallt vatten och är tåliga mot desinfektion med klor (Svenskt Vatten 2007). Mikroorganismernas förmåga att infektera minskar gradvis med tiden och beror på ett flertal faktorer, bland annat på vattnets temperatur, ultraviolett (UV) strålning från solljus samt på predation (andra mikroorganismers konsumtion av virus) (Leclerc et al. 2002).

Kunskapen om mikroorganismers förekomst i svenska ytvattentäkter är viktig för att avgöra om avskiljningsgraden är tillräcklig. Olika mikroorganismer avskiljs i varierande grad i reningsprocesserna och de har också olika känslighet mot olika desinfektionsmetoder. Kännedomen om bakterieförekomst i svenska ytvattentäkter och deras avskiljning i olika renings- och desinfektionsprocesser är förhållandevis god, men kunskapen om exempelvis virus är mycket ringa (Lundberg Abrahamsson et al. 2009).

Bakterier representerar en stor grupp encelliga organismer med mycket varierande egenskaper. Majoriteten bakterier är helt ofarliga för oss människor medan några få har stor betydelse för vattenburen smitta. Av störst vikt i Sverige är framförallt *Campylobacter spp.* men även *Escherichia coli* och *Legionella spp.* (Svenskt Vatten 2007; Ødegaard et al. 2006). *Campylobacter* och *E. coli* är tarmlevande bakterier med god överlevnad i vattenmiljö, men de kan normalt inte föröka sig i ytvatten (Leclerc et al. 2002). *Legionella spp.* är vattenlevande och kan under gynnsamma förhållanden föröka sig i ytvatten. Infektionsdosen (det antal mikroorganismer som krävs för att med 50 % sannolikhet orsaka infektion) för *Campylobacter spp.*, *E. coli* och *Legionella spp.* är låg till måttlig.

De vanligaste förekommande och medicinskt mest betydande vattenburna protozoerna är *Cryptosporidium* och *Giardia* (Hansen and Stenström 1998). *Cryptosporidium* är den vanligaste dokumenterade orsaken till vattenburna sjukdomsutbrott i västvärlden (Ødegaard et al. 2006). *Giardia* och *Cryptosporidium* har god överlevnadsförmåga i vattenmiljö. Därtill är de motståndskraftiga mot desinfektion och har låg infektionsdos, varför dagens vattenreningsprocesser kan vara otillräckliga.

Virus betydelse för vattenkvalitén har länge till stor del förbisetts. På senare år har dock nya detektionsmetoder för mikroorganismer visat att utbrott orsakade av virus är vanliga. Olika virus som kan orsaka vattenburna utbrott beskrivs i avsnitt 4.

3.1 Vattenburna sjukdomar

Vattenburna sjukdomar är sjukdomar där vattnet utgör en passiv bärare av smittämnet. Smittan överförs genom konsumtion och en smittad person kan antingen insjukna (symtomatisk infektion) eller förbli symtomfri (asymtomatisk infektion). En person med asymtomatisk infektion kan likväl sprida vidare smittämnet i höga koncentrationer, och därigenom smitta andra. Många vattenburna bakterier och virus som sprids i låga koncentrationer i vatten ger just asymtomatiska infektioner. (Leclerc et al. 2002)

Infektionsrisken vid exponering beror på patogenens infektionsdos, dess överlevnadsförmåga i vattenmiljö och den exponerade individens mottaglighet för infektioner. De främsta riskgrupperna för vattenburna infektioner utgörs av mycket unga, gamla, gravida och personer med nedsatt immunförsvar (Pond et al. 2004).

4 Vattenburna virus

Virus är små, mycket enkelt uppbyggda parasiter, bestående av arvsmassa som är omsluten av en kapsid (en kapsel av proteiner). Arvsmassan är av typen RNA eller DNA, beroende på virusets strategi att föröka sig. För att göra det infekterar viruset en cell, en värdcell, och drar nytta av dess funktioner. Cellens eget maskineri utnyttjas för att producera stora mängder nya virus. Vissa virus har även ett hölje (ett lipidmembran) som underlättar virusets inträde i värdcellen. Höljet är dock inte lika stabilt som kapsiden, vilket gör att det lätt förstörs utanför värdcellen. Detta medför att virus med hölje snabbt förlorar sin infektionsförmåga i naturen trots att deras kapsid är intakt. Höljelösa virus är stabilare och kan således spridas och överleva länge utanför värdcellen. Virus kan infektera såväl djur, växter, bakterier och protozoer. Varje virusstam är dock normalt specifik för en viss art, varför virusmitta från djur till människa endast är möjlig i mycket sällsynta fall. Virus som angriper bakterier benämns bakteriofager.

Vattenburna virusutbrott är i huvudsak associerade till mag-tarmvirus, vilka infekterar celler i mag-tarmkanalen. (Leclerc et al. 2002) Det finns fyra stora grupper av dessa: rotavirus, calicivirus (bland annat norovirus och sapovirus), astrovirus och vissa adenovirus. Ytterligare virus som kan smitta via kontaminerat dricksvatten är enterovirus (bland annat poliovirus), hepatit A och hepatit E. De virus som utgör störst risk för svensk dricksvattenproduktion är angivna i tabell 4-1 (Svenskt Vatten 2007). Särskilt stor risk bedöms norovirus utgöra.

Tabell 4-1 Virus som utgör störst risk för svensk dricksvattenproduktion (Svenskt Vatten 2007).

Virus	Arvsmassa	"Överlevnadstid" i ytvatten	Sjukdomsbild
Adenovirus	dsDNA ¹	> en månad	Varierar med subtyp
Calicivirus (norovirus & sapovirus)	ssRNA ²	> en månad	Mag-tarminfektion
Enterovirus (polio)	ssRNA	> en månad	Hjärnhinneinflammation
Hepatit A	ssRNA	> en månad	Leverinflammation
Hepatit E	ssRNA	> en månad	Leverinflammation
Rotavirus	dsRNA	> en månad	Mag-tarminfektion

¹ ds – dubbelsträngat, ² ss – enkelsträngat

4.1 Vattenburna virus som kan orsaka sjukdomsutbrott

4.1.1 Adenovirus

Adenovirus är dubbelsträngade DNA-virus (Ødegaard et al. 2006). Det finns ett stort antal undergrupper, så kallade serotyper. Dessa har varierande spridning, infektionsdos och symtombild. Serotyperna 40 och 41 ger mag-

tarminfektion och kan smitta via kontaminerat dricksvatten. De kan överleva lång tid i miljön och är dessutom motståndskraftiga både mot desinfektion med klor och UV-strålning (Jiang 2006). Förekomst har påvisats i såväl rå- som dricksvatten (WHO 2004).

4.1.2 Calicivirus

Calicivirus är små, enkelsträngade RNA-virus (Thiel and König 1999). Till familjen hör bland annat sapovirus och norovirus, vilka kan smitta människor via kontaminerad mat eller kontaminerat vatten. Norovirus ger de allvarligaste symtomen av de två och orsakar sannolikt de flesta av utbrotten av mag-tarminfektioner i industrialiserade länder (Fankhauser et al. 2002). Även om dödsfall är relativt ovanliga i västvärlden medför norovirusinfektioner höga samhällskostnader (Lopman et al. 2004b). Det finns indikationer som talar för att norovirus är tåliga mot miljömässig inaktivering via lågt pH, klor, klordioxid och hög temperatur (AWWA 1999), men avsaknaden av odlingssystem gör det svårt att bestämma virusets motståndskraft. I Norden, liksom i övriga världen, anses norovirus utgöra ett stort hot mot dricksvattenförsörjningen och har orsakat ett stort antal vattenburna utbrott (WHO 2004; Ødegaard et al. 2006). En mer utförlig beskrivning av norovirus ges i kap 5.

4.1.3 Enterovirus

Enterovirus är mycket små, enkelsträngade RNA-virus (WHO 2004). Familjen innefattar ett sjuttiototal serotyper, varav poliovirus utgör tre av dem. Vaccination mot polio ingår sedan länge i barnvaccinationsprogrammet, varför risken för poliosmitta är mycket liten. Något inhemskt fall av polio har inte rapporterats sedan 1977 (SMI 2010a). Kontaktsmitta och inandning av virus i aerosol (vätskepartiklar) anses vara de vanligaste spridningsvägarna för enterovirus (WHO 2004). De har också påvisats i rikliga mängder i råvattenkällor. Smittspridning misstänks därför kunna ske via kontaminerat dricksvatten. Studier om smittspridning är mycket svåra att utföra eftersom symtombilden varierar i hög grad.

4.1.4 Hepatitvirus

Hepatit A-virus och hepatit E-virus är enkelsträngade RNA-virus tillhörande en grupp virus som orsakar leverinflammation. De har dock inget nära genetiskt släktskap. Hepatit A-virus är starkt associerat till vattenburna utbrott och har mycket låg infektionsdos samtidigt som infekterade individer utsöndrar mycket rikligt med virus via avföringen. Infektioner är allvarliga, men har sällan dödlig utgång och läker normalt ut utan medicinsk behandling. Viruset kan ge mycket omfattande epidemier, även om antalet utbrott i västvärlden på senare tid har minskat (Bosch et al. 2008).

Hepatit E-virus förekommer främst i tropiska och subtropiska områden. Förekomsten i Europa är låg, men har ökat under de senaste åren. Infektioner av hepatit E-virus kan dock ge mer allvarliga infektioner än hepatit A-virus, med framförallt ökad dödlighet för gravida kvinnor. (Norder et al. 2009)

4.1.5 Rotavirus

Rotavirus är dubbelsträngade RNA-virus och den vanligaste orsaken till allvarlig diarré hos barn världen över (Palombo and Bishop 2006). Den begränsade möjligheten att behandla uttorkning i u-länder gör att dödligheten där är mycket hög. I västvärlden orsakar viruset framförallt höga sjukvårdskostnader. Rotavirus är mycket smittsamma och kan spridas via intag av kontaminerat dricksvatten. De har god överlevnad i vattenmiljö och är bland annat resistent mot pH-variation (AWWA 1999). Däremot är viruset känsligt mot desinfektion med klor, ozon och UV.

4.2 Smittspridning av mag-tarmvirus

Mag-tarmvirus smittar effektivt genom kontaktsmitta (person-till-person) eller genom aerosol (vätskepartiklar) som bildas vid diarré eller kräkningar. Utbrott är vanliga inom skola, vård, barn- och äldreomsorg, där spridning lätt kan ske mellan personer (Hedlund et al. 2000; Parashar et al. 2001).

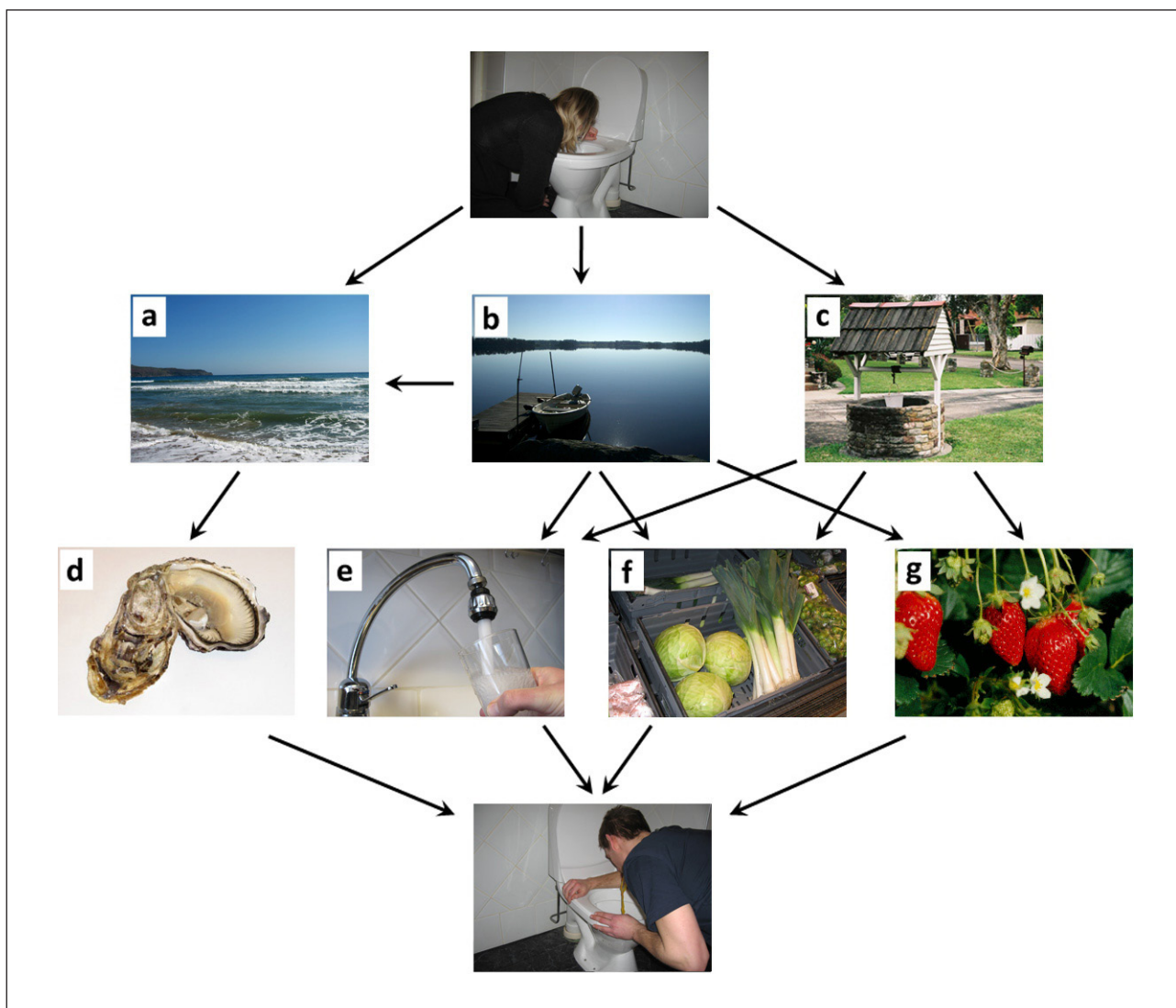
Infektionsförmågan för virus är i regel mycket hög och ofta räcker det med ett fåtal virus för att orsaka infektion (Atmar et al. 2008; Bosch 1998). Virusavsöndringen kan nå extremt höga koncentrationer, upp till 10^{12} viruspartiklar per gram avföring. Smittade individer insjuknar generellt efter kort tid och drabbas av i huvudsak diarré. Även om symtomen normalt är lindriga och dödligheten för mag-tarmvirus i i-länder mycket låg, är den totala samhällskostnaden ofta mycket hög (Lopman et al. 2004b).

Asymtomatiska infektioner är vanliga för vattenburna virus. En person som infekterats från exempelvis förorenat vatten kan förbli frisk, men kan smitta andra via kontaktsmitta (så kallad sekundär smittspridning). Virusutbrott upptäcks därför ofta först efter att sekundär smittspridning skett, vilket försvårar smittspårning. Det kan därför vara besvärligt att knyta utbrott till dricksvatten, vilket sannolikt bidrar till att risken för vattenburen smitta i många fall underskattas. (Wyn-Jones and Sellwood 2001)

4.2.1 Förekomst och spridning i miljön

Bristande insikt i virusproblematik, för stort fokus på bakterier och avsaknad av bra detektionsmetoder har länge begränsat kunskapen kring virus i miljöprov. På senare tid har molekylära metoder utvecklats för att påvisa virus i såväl vattenmiljöer som kontaminerade livsmedel. Ännu har dock ingen metod fastställts som standard för rutintester. Även om de senaste årens forskning har gett förbättrade insikter i spridningsvägar är fortfarande mycket okänt om virus i vattenmiljöer. (Pond et al. 2004)

Primär smittspridning av mag-tarmvirus kan ske via ett flertal olika spridningsvägar, figur 4-1 (Bosch et al. 2008). Infekterade individer utsöndrar mycket stora mängder virus via avföring eller kräkningar, och avloppsvatten innehåller höga koncentrationer av en mångfald av humanpatogena virus och andra mikroorganismer. Koncentrationerna i avloppsvatten är högre än reningsverken kan avskilja, varför virus når floder och sjösystem (Leclerc et al. 2002; WHO 2004). Detta kan i sin tur leda till utbrott i samband med bad eller vattenkonsumtion. Höga viruskoncentrationer har påvisats i såväl



Figur 4-1 Möjliga spridningsvägar av norovirus och andra mag-tarmvirus i miljön. Virus sprids i extremt höga koncentrationer i avföring och uppkastningar från infekterade personer. Genom orenat, otillräckligt renat eller läckage av avloppsvatten når viruspartiklar (a) hav, (b) sjösystem och (c) privata brunnar. Personer kan sedan exponeras via ett flertal spridningsvägar såsom via (d) ostron och musslor från avloppsexponerade odlingar, (e) kontaminerat dricksvatten från sjöar eller brunnar samt (f) grönsaker och (g) bär som bevattnats med kontaminerat vatten.

orenat som renat avloppsvatten (da Silva et al. 2007; Katayama et al. 2008; Nordgren et al. 2009). Påvisbara mängder virus har också hittats i nordiska dricksvattentäkter i samband med virusutbrott (Kukkula et al. 1999; Larsson 2009; Maunula et al. 2005).

Utbrott kan dessutom inträffa genom avloppsvattenläckage som förorenat privata brunnar eller dricksvattentäkter (Bosch et al. 2008). Virus kan också kontaminera bär- och grönsaksodlingar som bevattnats med förorenat vatten. I vissa länder sker bevattning av odlingarna med avloppsvatten och bara i Sverige finns en mängd rapporter där importerade, kontaminerade bär orsakat utbrott av norovirus (Hjertqvist et al. 2006).

Utbrott i samband med konsumtion av ostron är också väldokumenterat (Le Guyader et al. 2006). Ostronen filtrerar vattnet varvid virus ackumuleras. Problematiken är särskilt betydande för odlingar nedströms reningsverk.

4.3 Avskiljning och inaktivering av virus i vattenverk

Vattenleverantören ansvarar för regelbunden kvalitetskontroll och övervakning av produktionsprocessen i syfte att säkerställa en tillförlitlig produktionskedja (WHO 2004). För att uppnå detta utnyttjas multibarriärsystem, däribland skydd av vattentäkt och rening genom kemisk fällning, filtrering och desinfektion (Flyborg and Persson 2007).

Reduktionen av mikroorganismer och oönskade ämnen i vattnet beskrivs med $\log_{10}$ -enheter, där 1 $\log_{10}$ -reduktion innebär 90 % avskiljning, 2 $\log_{10}$ -reduktion innebär 99 % avskiljning och så vidare. Viruspartiklar reduceras främst i fällningsprocessen, det vill säga virus och andra partiklar binds till större sediment- och filterbara flockar. Viruset anrikas således i slammet och kan avskiljas. Reduktionen uppskattas till mellan 1–2 $\log_{10}$ -enheter, medan den efterföljande filtreringen reducerar antalet virus ytterligare med omkring 1 $\log_{10}$ -enhet. Långsamfilter uppskattas ge en omkring 2 $\log_{10}$ -reduktion (Smeets et al. 2006).

Inaktivering av mikrobiella patogener, såsom bakterier, virus och protozoer sker normalt genom tillsats av reaktiva kemiska ämnen såsom klor eller ozon, men användandet av UV-ljus ensamt eller i kombination med kemisk desinfektion ökar (WHO 2004; Ødegaard et al. 2006). Desinfektion är ett viktigt moment för beredningen av dricksvatten. Tillsats av klor är fortfarande vanligast och utgör normalt en effektiv barriär, framförallt mot bakterier. Effektiviteten varierar beroende på typ av klorförening, vattnets pH och humushalt. Hög humushalt försämrar effekten påtagligt eftersom klorföreningen istället reagerar med humusen. Virus tål betydligt högre klordos än bakterier (Payment et al. 1985). Inaktiveringseffekten är olika för olika virus, men i regel omkring 1–2 $\log_{10}$ -enheter sämre än koliforma bakterier. Viruspartiklarna är sannolikt bundna till större partiklar, vilka kan skydda viruset från exponering av desinfektionsmedlet (Shin and Sobsey 2008).

Användningen av ozon är mycket begränsad i Sverige, och även i Norge och Finland. Ozon utgör ett effektivt desinfektionsmedel mot såväl bakterier som virus. Förutom desinfektion avlägsnar ozonering lukt- och smakstörande ämnen, ger lägre färgtal samt medför oxidation av järn och mangan. Ett problem med ozonering är att det ökar omfattningen av efterväxt i distributionsnätet, varför det bör efterföljas av långsamfilter eller filtrering med kolfilter. (Seger 1998; Ødegaard et al. 2006)

Tåligheten mot desinfektion med UV-bestrålning varierar mycket mellan olika virustyper. Virus med enkelsträngad arvsmassa (DNA eller RNA) är relativt känsliga mot UV-exponering medan virus med dubbelsträngad arvsmassa (DNA eller RNA) kan klara betydligt högre doser. Exempelvis uppvisar adenovirus (dubbelsträngat DNA-virus) mycket högre resistens än norovirus (enkelsträngat RNA-virus). (Ødegaard et al. 2006)

4.4 Kvalitetskontroll och dess svagheter

Kvalitetskontroll av dricksvatten baseras i huvudsak på efterkontroller av vattnet med hjälp av indikatororganismer, detta eftersom det sällan är praktiskt genomförbart att kontinuerligt mäta enskilda mikroorganismer i det

distribuerade dricksvattnet. I Norden är de mest använda indikatororganismerna *E. coli*, *Clostridium perfringens*, koliforma bakterier och enterokocker. Testerna syftar till att upptäcka föroreningar från avföring och till att bestämma reningsprocessernas effektivitet. (Pond et al. 2004; WHO 2004; Ødegaard et al. 2006)

Flera problem har uppmärksammats med dessa stickprovsbaserade efterkontroller:

- *Indikatororganismer* – Virus kan överleva länge i vattenmiljö, har ofta låg avskiljningsgrad och är i många fall mer motståndskraftiga mot desinfektion. Indikatorbakterier är således inte pålitliga indikatorer för virusförekomst. Alternativa indikatororganismer för virus har föreslagits, såsom F-specifik bakteriofag, colifager och bakteriofag MS2, men ingen kan entydigt påvisa förekomst av mag-tarmvirus. (Bosch 1998; Hernandez-Morga et al. 2009b; Hörman et al. 2004; Maunula et al. 2005; Rose et al. 2004)
- *Svar i efterhand* – Analysen av mikroorganismer tar tid, varför det finns risk för att en förorening upptäcks för sent, när vattnet redan hunnit nå konsumenterna.
- *Stickprov* – Stickprov ger en god ögonblicksbild över vilka patogena mikroorganismer som finns vid det givna tillfället. Eftersom mikroorganisminivåerna fluktuerar finns dock risk att plötsliga förändringar i vattenkvaliteten missas.
- *Analyserbarhet* – Patogener som har låga infektionsdoser kan orsaka sjukdomar vid mycket låga halter, vilket gör dem mycket svåra att detektera. Dessutom är endast en bråkdel av de patogena mikroorganismerna i vattnet odlingsbara, vilket gör att mörkertalet är stort.

De metoder som i dag används för vattenkontroll är således inte tillräckliga för att garantera ett hälsosamt dricksvatten. Mycket talar också för en successiv ökning av föroreningshalterna i vattentäkter orsakad av den pågående klimatförändringen med generell nederbördsökning i större delen av landet under höst, vinter och vår (Svenskt Vatten 2007). Dessutom beräknas extremväder med skyfall bli vanligare, vilket ökar risken för bräddning och akuta föroreningsutsläpp. Omfattande nederbörd kan orsaka påtagligt förhöjda mikrobiella nivåer och sporadiskt hög turbiditet, vilket kan överbelasta reningsprocesser och medföra stora effekter på dricksvattenkvaliteten (Svenskt Vatten 2007; WHO 2004). Dessa tillfälliga föroreningsstoppar med tillfälligt försämrad råvattenkvalité kan vara förrädiska och lätta att missa i stickprovsbaserade övervakningssystem.

De senaste åren har ett flertal riskanalysmodeller utvecklats för dricksvattenverk, däribland ODP (Optimal desinfektionspraxis) och MRA (Mikrobiologisk riskanalys).

Analys med kvantitativ riskbedömning, som MRA bygger på, är ett mycket användbart verktyg för att utvärdera mikrobiella risker. Metodiken bygger på att man tar tillvara på all tillgänglig information kring ett system (råvattenkvalitet, reningssteg och driftstörningar) och genererar ett mått (en sannolikhet) på risken att en mikroorganism kan ge upphov till vattenburen smitta. (Lundberg Abrahamsson et al. 2009).

Riskanalysmodellerna bygger på litteraturdata från mikrobiologiska provtagningar och avskiljningsförsök. Dessa data baseras ofta på s.k. indikatororganismer vilka sällan ger en korrekt bild av den mikroorganism man egentligen vill studera. Vad gäller virus är kunskapen mindre än för bakterier och protozoer. Dels saknas en välutvecklad och standardiserad metod för analys av virus i vatten dels saknas lämplig indikatororganism .

Kunskapen om virus, dess förekomst i ytvattentäkter, inaktiveringsgrad i miljön och reduktion i dricksvattenprocesser är (mycket) knapphändig (Pond et al. 2004; WHO 2004).

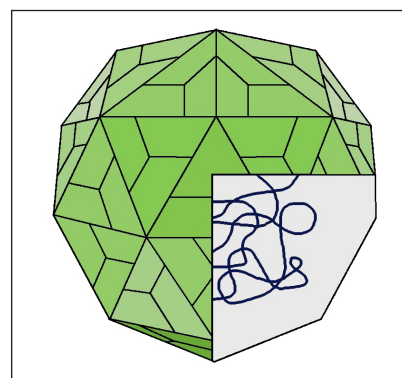
5 Norovirus

Vinterkräksjukan beskrevs redan år 1929 och karakteriseras av plötsliga kräkningar och omfattande diarréer (Kapikian 2000). Som namnet antyder är sjukdomen vanligare under vintermånaderna. Det var inte förrän 1972 som viruset bakom sjukdomen kunde identifieras och kopplas till ett utbrott av diarré. Då utbrottet inträffade i en skola i orten Norwalk (Ohio) erhöll viruset samma namn, och virus av samma släkte benämndes ”Norwalk-like viruses” eller ”Small Round Structured Viruses” (SRSVs). 2002 namngavs virusläktet norovirus efter beslut av den internationella kommittén för virustaxonomi (ICTV). Många artiklar refererar emellertid fortfarande till de äldre namnen.

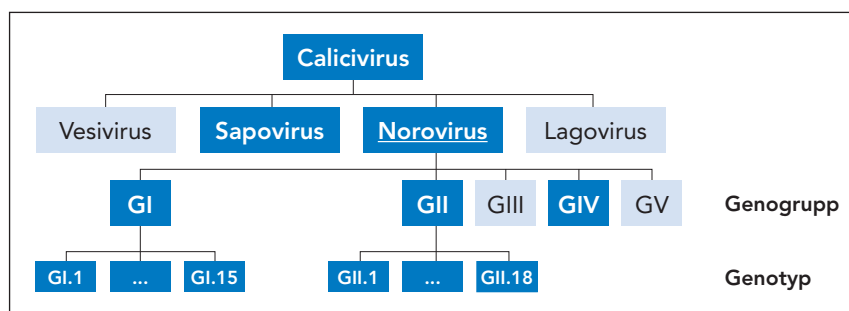
5.1 Struktur och klassificering

Norovirus är enkelsträngade RNA-virus som saknar hölje (Hardy 2005; Thiel and König 1999; Zheng et al. 2006). Kapsiden som innesluter dess arvmassa (RNA) ger den ett sfäriskt utseende och viruset tillhör de allra minsta (cirka 30 nm), figur 5-1. Arvsmassan är enkel och kodar (utgör mall) för några få proteiner, dels sådana som bygger upp kapsiden och dels för proteiner som krävs för att viruset ska föröka sig.

Norovirus tillhör familjen Calicivirus (Thiel and König 1999; Zheng et al. 2006), figur 5-2. Till familjen Calicivirus hör även sapovirus och två animala virus, vesivirus och lagovirus. Norovirus har, såsom övriga Calicivirus, en mycket variabel arvsmassa, det vill säga viruset är under ständig förändring. Detta har lett till uppkomst av ett stort antal varianter med delvis olika egenskaper. Norovirus delas in i fem olika grupper (GI till GV), så kallade genogrupper, utifrån genetiska likheter. (Zheng et al. 2006). Varje genogrupp kan i sin tur delas in i ett stort antal genotyper (exempelvis GI.1, GI.2 och så vidare). GI, GII och GIV kan infektera människor, medan GIII infekterar nötboskap och GV möss. I dagsläget är dock inga zoonoser (spridning mellan djur och människa) kända för norovirus (Rohayem 2009).



Figur 5-1
Schematisk skiss av norovirus.



Figur 5-2 Schematisk bild över familjen Calicivirus släkttred. Sapovirus och norovirus kan infektera människor. Norovirus delas i sin tur in i fem genogrupper. Vissa virusgrupper infekterar människor (mörkblå), andra djur (ljusblå).

Inom genogrupperna finns mycket stora genetiska skillnader (Khamrin et al. 2007). GI och GII, vilka är mycket vanligare än GIV, kan delas upp i minst 15 respektive 18 genotyper och benämns GI.1 till GI.15, respektive GII.1 till GII.18. Olika virusstammar kan dessutom utbyta arvsmassa varvid en ny, så kallad rekombinant, typ uppstår. GII är den dominerande genogruppen och svarar för majoriteten av dokumenterade utbrott samt sporadiska sjukdomsfall (Kroneman et al. 2008). Särskilt vanlig är GII.4 som årligen infekterar ett stort antal människor under vintermånaderna i Europa. Den ger dessutom allvarligast symtom (Gallimore et al. 2007). GII.4 är därför särskilt välstuderad och delas ofta in i ytterligare undervarianter (Bull et al. 2006; Lopman et al. 2004a).

Virusets genogrupp bestäms med hjälp av PCR eller med immunologiska metoder (se avsnitt 6) (Gray et al. 2007; Nordgren et al. 2008). För att vidare klassificera viruset (fastställa virusets genotyp och stam) måste nyckelregioner i arvsmassan sekvenseras. Det innebär att den exakta sekvensen för arvsmassan bestäms. Typ- och stambestämningen försvåras av att det saknas en erkänd standardnomenklatur för norovirus.

5.2 Infektioner och symtombild

Norovirus är mycket virulenta och så få som 10 till 100 viruspartiklar är tillräckligt för att orsaka infektion (Atmar et al. 2008; Patel et al. 2009; Thornton et al. 2004). Spridning sker mycket effektivt från person till person genom kontaktsmitta eller via aerosol som bildats vid kräkning eller diarré. Virusnivåerna hos en infekterad individ är enorma, upp till 10^{12} viruspartiklar per gram avföring (Atmar et al. 2008). Nivåerna är högst under perioden för symtom, men utsöndringen är omfattande i flera dagar, ibland i flera veckor efter att personen blivit symtomfri.

Tiden från smittotillfället till dess att sjukdomen bryter ut är mycket kort, mellan 24 och 48 timmar (Atmar et al. 2008; Kaplan et al. 1982; Patel et al. 2009). Karakteristiska symtom är illamående, magsmärtor, plötsliga kräkningar och diarréer. Viruset infekterar individer i alla åldrar, men äldre, mycket unga och personer med nedsatt immunförsvar är mer mottagliga för infektion och får svårare symtombild, varför dessa ofta behöver sjukvård (Patel et al. 2009; Thornton et al. 2004). I industrialiserade länder förekommer dödsfall inom riskgrupper i samband med obehandlad uttorkning (Atmar and Estes 2001; Thornton et al. 2004). I dagsläget saknas läkemedelsbehandling av norovirusinfektioner. Vården består istället främst av att upprätthålla vätskebalansen. För normalpopulationen är sjukdomen dock i regel självutläkande.

Norovirusinfektioner ger såväl symtomatiska som asymtomatiska infektioner. I försök där frivilliga exponerats för viruset blev 80 % infekterade. Av dessa utvecklade merparten symtom, medan ett mindre antal personer förblev symtomfria. (Parashar et al. 2001)

5.3 Förekomst och smittspridning

Under lång tid har orsaken till merparten av mag-tarminfektioner inte kunnat fastställas (Patel et al. 2009). De senaste årens intensiva norovirusforskning har belyst virusets omfattande utbredning (Kirkwood 2004; Parashar et al. 2001), och idag är norovirus erkänt som den främsta orsaken till magsjuka (Lopman et al. 2003; Widdowson et al. 2005). Viruset beräknas orsaka över 90 % av alla ickebakteriella och ungefär 50 % av alla epidemier och sporadiska fall av mag-tarminfektioner världen över. I industrialiserade länder tros norovirus orsaka så mycket som 70–80 % av alla utbrott av magsjuka (Fankhauser et al. 2002). Norovirus antas årligen ligga bakom mer än 20 miljoner fall av magsjuka i USA och bedöms vara den vanligaste orsaken till magsjuka från kontaminerad mat (Mead et al. 1999). Dessutom uppskattas årligen 900 000 barn i industrialiserade länder uppsöka sjukvård till följd av norovirusinfektioner. För infektioner med mildare symtom, där den drabbade inte behöver uppsöka sjukvård, saknas uppgifter.

Utbrott av norovirus är starkt associerat till mat- och vattenburen smitta och utbrott har påvisats i samband med många olika livsmedelsprodukter, däribland ostron, sallader, bär och dricksvatten (Flint 2004; Patel et al. 2009). Sekundär spridning via person-till-person är trots allt dominerande. Utbrott är därför mycket vanliga i slutna miljöer som skolor, dagis, äldreboenden och inom sjukvården, där spridning lätt kan ske mellan personer (Hedlund et al. 2000; Parashar et al. 2001). Att virusutsöndring fortgår dagar till veckor efter att den smittade blivit symtomfri ökar risken för att ytterligare människor smittas. Många återvänder alltför tidigt till arbetet och ett stort antal utbrott har kunnat knytas till personer som hanterar livsmedel och som tidigare varit magsjuka (Mead et al. 1999).

Förekomst av norovirus rapporteras året runt, men samtidigt uppvisas säsongsmässiga mönster där genogrupp två (GII) är vanligare under vintermånaderna. Förekomst av genogrupp ett (GI) är inte säsongsbundet i samma utsträckning utan figurerar året om. (Kroneman et al. 2008; Lopman et al. 2008; Nordgren et al. 2009; Thornton et al. 2004)

Olika genogrupper av norovirus uppvisar olika egenskaper gällande förekomst och spridningsvägar. GI och då framförallt GI.4 dominerar fullständigt utbrott där spridning sker via person-till-person-smitta. De orsakar årligen ett stort antal utbrott under vinterperioden i Europa. Skälet till att utbrotten är starkt säsongsbundna är ännu oklart. GI.4 förekommer dock i lägre utsträckning i samband med mat- och vattenburna utbrott. Istället domineras livsmedelsknutna utbrott av genotyper inom GI. Orsaken antas vara att GI är mer motståndskraftig mot miljöfaktorer och därigenom kan vara infektiös under längre tid. (Kroneman et al. 2008)

5.4 Vattenburna norovirusutbrott

Ett antal egenskaper hos norovirus gör att viruset är mycket potent att orsaka utbrott och omfattande epidemier, tabell 5-1 (Patel et al. 2009).

Tabell 5-1 Egenskaper hos norovirus som bidrar till virusets omfattande spridning och potential till att orsaka sjukdomsutbrott. Modifierat från Patel et al. 2009.

Egenskap	Anmärkning
Låg infektionsdos	Endast 10–100 partiklar är tillräckligt för att orsaka infektion
Asymtomatisk virusutsöndring	Virusutsöndring fortgår dagar till veckor efter att den infekterade är symtomfri. Dessutom kan smittade personer vara symtomfria och ändå sprida höga koncentrationer virus.
Hög stabilitet	Viruset har mycket hög "överlevnad" i miljön. Viruset tål dessutom att frysas samt upphettning till 60 °C.
Hög motståndskraft mot desinfektion	Viruset har god förmåga att motstå höga koncentrationer av klor.
Avsaknad av långvarig immunitet	Smittade individer kan infekteras vid återexponering av samma virusstam under samma säsong.

Det finns i dagsläget ingen standardiserad metodik för rutintester av norovirus i vattenmiljö. Vid misstanke om vattenburna utbrott har smittspårning främst baserats på virusförekomst i patientprov, vilket kräver omfattande utredningar för att styrka att föroreningen härrör från vattenburen smitta (Kukkula et al. 1999). Möjligheten att sätta in tidiga smittbegränsande åtgärder är således liten. Antalet sjukdomsfall är också lågt så länge föroreningen är begränsad. Ett omfattande utbrott krävs för att myndigheter ska börja misstänka dricksvatten som infektiionskälla.

I Norden finns ett antal rapporterade vattenburna utbrott där konsumtion av vatten kontaminerat av norovirus har identifierats vara huvudorsaken till utbrottet, tabell 5-2.

Tabell 5-2 Nordiska vattenburna utbrott av norovirus.

Beskrivning	Sjukdomsfall	Referens
I en by i Dalarna insjuknade 173 personer i magsjuka under påsken 2009. Vid analys av det kommunala dricksvattnet kunde SMI påvisa norovirus av samma genotyp som påvisats hos sex insjuknade bybor.	173	(SMI 2010b)
I slutet av 2008 insjuknade ett stort antal personer i norovirus (GII.4) i Lilla Edet. Orsaken var kontaminerat kommunalt dricksvatten.	2300	(Larsson 2009)
Under 2002 finns minst åtta rapporterade vattenburna norovirusutbrott i Sverige.	30–400	(Lysén et al. 2009)
Läckage av avloppsvatten som kontaminerat en privat grundvattenbrunn låg bakom ett utbrott på ett konferenscenter i Stockholm under 2001.	200	(Nygård et al. 2003)
I Finland har 17, varav 5 större, vattenburna norovirusutbrott rapporterats mellan 1998 och 2003. De större utbrotten orsakades i de flesta fall av kontaminerat grundvatten.	12 stycken: < 200 5 stycken: 200–5500	(Maunula et al. 2005)

Vattenburna utbrott är mycket allvarliga då ett stort antal personer kan insjukna under kort tid. Detta innebär en stor samhällsbelastning och är förenat med mycket stora kostnader (Lopman et al. 2004b). Kostnaden för ett vattenburet sjukdomsutbrott har bedömts till 136 Mkr i en kommun med 20 000 invånare och 415 Mkr i en kommun med 60 000 invånare (VAS-rådet 2009). Förutom utbrott misstänks bakgrunds nivåer av virus i dricksvatten kontinuerligt ge upphov till sporadiska sjukdomsfall i samhället (Lindberg and Lindqvist 2005).

I likhet med andra mag-tarmvirus kan norovirus smitta via ett flertal spridningsvägar, figur 4-1 (Bosch et al. 2008). Virus når dricksvattentäcker genom otillräcklig avloppsvattenrening samt i samband med exempel-

vis avloppsvattenläckage eller bräddning av avloppsvatten i samband med extrem nederbörd (Leclerc et al. 2002; WHO 2004). Norovirus har detekterats i mycket höga koncentrationer i Ryaverket, ett svenskt reningsverk (Nordgren et al. 2009). Det inkommande avloppsvattnet innehöll mellan 10^3 – 10^7 viruspartiklar/liter och det utgående, renade avloppsvattnet upp till 10^6 viruspartiklar/liter. Avskiljningen var tämligen liten under normal drift, i genomsnitt 1,5 $\log_{10}$ -enheter, vilket innebär att stora mängder norovirus släpps ut i miljön. Norovirus har även påvisats i floder och sjösystem (Haramoto et al. 2005; Hernandez-Morga et al. 2009b; Kukkula et al. 1999; Rutjes et al. 2006; Westrell et al. 2006).

5.5 Inaktivering av norovirus

I vattenmiljö sker en successiv minskning av halten norovirus efter utsläppspunkten genom kemisk inaktivering, exponering för ogynnsamt pH, solljus och värme. I likhet med många andra mag-tarmvirus är norovirus mycket motståndskraftiga mot miljömässig inaktivering. Norovirus har påvisats finnas kvar under långa tider i vatten (Thornton et al. 2004; Wyn-Jones and Sellwood 2001) och låga vattentemperaturer gynnar virusförekomsten (Bae and Schwab 2008; Rohayem 2009). Emellertid baseras kunskapen på påvisande av virusets arvsmassa, medan det inte finns några uppgifter om mängden infektiösa norovirus.

För att utreda hur snabbt viruset blir inaktiverat i miljöprov har många studier utförts på andra virus inom familjen calicivirus, främst på musnorovirus och kattcalicivirus. Dessa virus är, till skillnad från humant norovirus, möjliga att odla. Då de är genetiskt och strukturellt mycket lika humant norovirus har de antagits ha jämförbara egenskaper. Vid experiment med ytvatten minskade antalet infektiösa calicivirus i mycket liten grad, mellan 0,09 och 0,18 $\log_{10}$ -enheter per dag, beroende på vattentemperatur och typ av calicivirus. Försöken tyder samtidigt på att mängden detekterbar arvsmassa bryts ned i långsammare takt. Arvsmassan för humant norovirus reducerades med cirka 0,02 $\log_{10}$ -enheter per dag, vilket var långsammare än för övriga calicivirus. (Bae and Schwab 2008)

Mycket talar dock för att egenskaperna mellan olika virus inom calicivirus skiljer sig åt. Exempelvis har humant norovirus visats vara mer värme-stabilt än övriga (Hewitt et al. 2009). Dessutom varierar stabiliteten i vattenmiljö även mellan olika genogrupper av humant norovirus. Till exempel domineras vattenburna utbrott av genogrupp I, trots att virus av genogrupp II totalt sett är mycket vanligare.

5.5.1 Motståndskraft mot klor

Norovirus motståndskraft mot klor är omtvistad och resultaten från utförda studier spretar. I tidiga experiment med försökspersoner har norovirus visat mycket hög motståndskraft mot klor (Keswick et al. 1985). Klorhalter på 3,75 mg/l under 30 minuter var inte tillräckligt för att inaktivera (oskadliggöra) alla virus, utan merparten av försökspersonerna insjuknade. Även senare experiment har visat att klornivåer långt över tillåten dosering i Sve-

rige krävs för att inaktivera viruset (Duizer et al. 2004). En studie av Shin och Sobsey (2008) motsäger detta då klorering med 1 mg/l påvisades vara mycket potent för att inaktivera ett flertal virus, däribland norovirus. Försök med musnorovirus visar också på en omfattande inaktivering, även vid relativt låga doser klor (0,2 mg/l) (Cromeans et al. 2009).

Olika försöksbetingelser är sannolikt förklaringen till de spretande resultaten. Ett flertal parametrar påverkar inaktiveringseffektiviteten, främst pH, mängd organiskt och oorganiskt material (främst ammoniumförekomst) och kontakttid (Lundberg Abrahamsson et al. 2009). Exempelvis utfördes Shin och Sobseys försök vid pH 6, varvid kloreten i hög utsträckning föreligger som underklor-syrighet (HOCl). Desinfektionseffekten för underklor-syrighet är 80–100 gånger effektivare än när kloreten föreligger som hypokloritjon (OCl⁻), den form som merparten av kloreten föreligger i vid klorering av dricksvatten (pH > 7,5) (AWWA 1990).

Inga utredande studier är utförda under vanliga svenska förhållanden (låga klordoser, pH > 8, korta kontakttider och betydande humusförekomst), det vill säga förhållanden som talar för en mycket begränsad inaktiveringseffekt. Ytterligare studier krävs för att utreda norovirus motståndskraft mot klor.

5.6 Ökning av antalet norovirusfall

Antalet rapporterade norovirusfall har ökat enormt under de två senaste decennierna (Widdowson et al. 2005). Förbättrade diagnostiseringsmetoder kan till viss del förklara ökningen. De tidigt utvecklade metoderna var alltför okänsliga, något som har medfört att antalet utbrott av norovirus sannolikt har underskattats. I takt med utveckling av molekylära detektionsmetoder har virusets påtagliga utbredning blivit alltmer uppenbar. Samtidigt visar studier på uppkomst av en ny, mycket virulent norovirusstam, GII.4, vilken idag förorsakar mellan 60–90 % av alla rapporterade fall av mag-tarminfektion (Gallimore et al. 2007). Varianter av denna genotyp har förorsakat pandemiska (världsomfattande) utbrott sedan mitten av 90-talet och cirkulerar fortfarande, vilket bidrar till det mycket höga antalet rapporterade diarréer (Lindesmith et al. 2008; Lopman et al. 2008). Varför just GII.4 orsakar pandemier är oklart, men orsakerna tros vara en kombination av bland annat bättre biologisk anpassning, kraftigare virusutsöndring från infekterade individer och snabb mutationshastighet.

Dagens förändrade livsstil tros också bidra till virusets ökade utbredning. Många människor vistas i högre utsträckning på begränsade ytor såsom i skolor, på dagis, sjukhus, äldreboende, men även i samband med resor på färjor, flygplan och hotell. Den ökade konsumtionen av ”färdigmat”, såsom färdiga sallader, smörgåsar, och annan mat som förtärs utan tillagning förmodas även öka smittspridningen från matproducenter (Parashar et al. 2001). Mat som hanteras av många personer vid produktion blir allt vanligare och konsumtionen av färska bär, frukter och grönsaker har ökat, vilka i hög utsträckning odlas i länder där bevattning med avloppspåverkat vatten är vanligt (Hjertqvist et al. 2006).

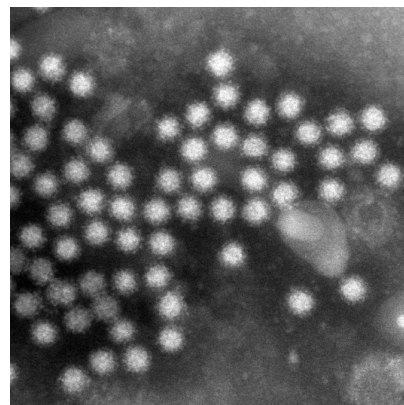
6 Detektionsmetoder för norovirus

Sedan länge har detektion av mikroorganismer baserats på odling. Odlingsmetoder är dock inte tillämpbara för norovirus eftersom lämpliga odlingsbetingelser inte har hittats (Kirkwood 2004; Patel et al. 2009). Elektronmikroskopi var länge enda metoden för att påvisa norovirus. Molekylära metoder vid detektion och utvärdering av mikroorganismer har kommit att utgöra en alltmer central del för nutida mikrobiell diagnostik. Under de två senaste årtiondena har utveckling av två molekylära diagnostiska metoder, PCR och ELISA påtagligt förbättrat kunskapen om norovirus (Patel et al. 2008; Widdowson et al. 2005).

6.1 Elektronmikroskopi

Tekniken bakom elektronmikroskopi (EM) utvecklades redan på 1930-talet. I elektronmikroskop ersätts ljus av en elektronstråle för att återge en bild av det som studeras. Det studerade objektet beskjuts med elektroner, vilka har en kortare våglängd än synligt ljus. Detta möjliggör omkring 1 000 gånger bättre upplösning för EM jämfört med traditionell ljusmikroskopi, vilket är nödvändigt för att kunna se virus. Känsligheten för direkt elektronmikroskopi av virus är låg och för detektion krävs minst 10^6 – 10^7 viruspartiklar per gram avföring. De enorma kvantiteterna av mag-tarmvirus i avföring gör att metoden trots allt är användbar och den tillämpas fortfarande för att påvisa norovirus i patientprov. Apparaturen är dyr och kräver stor erfarenhet för att användas för virusdetektion. (Atmar and Estes 2001; Parashar et al. 2001)

Genom att sätta till molekyler, som specifikt binder in till norovirus, klumpar viruspartiklarna ihop sig och blir lättare att upptäcka (Parashar et al. 2001). Denna teknik gör mikroskoperingen 10–100 gånger känsligare och benämns immunelektronmikroskopi (IEM). Tekniken användes då norovirus för första gången detekterades i avföring och kunde kopplas till magsjuka utbrott (figur 6-1) (Kapikian et al. 1972). Metoden kan användas för att bestämma upphov till utbrott, men är egentligen alltför okänslig och ospecifik för norovirus (Fisman et al. 2009). Känsligheten är dessutom långt ifrån tillräcklig för att tillämpas på vattenprov.



Figur 6-1

Elektronmikroskopibild av norovirus
(Foto: Kjell-Olof Hedlund,
Smittskyddsinstitutet).

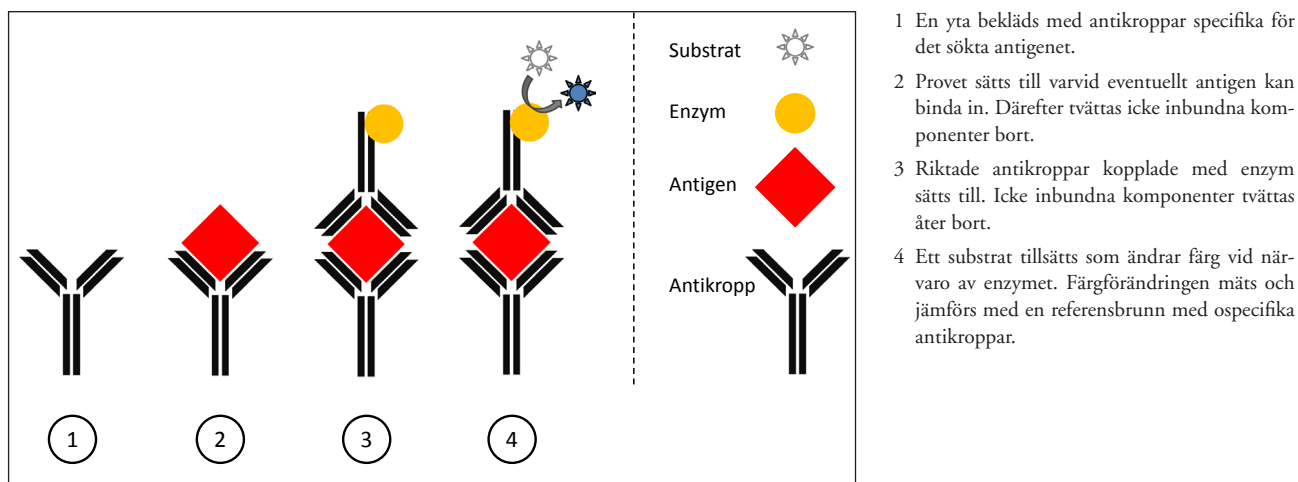
6.2 Enzymkopplade antikroppar (ELISA)

Så kallad antigen-ELISA kan användas för att påvisa förekomst av noroviruspartiklar i ett prov, figur 6-2. Tekniken bygger på den mycket specifika bindningen mellan antikropp och antigen. En antikropp är en molekyl bildad av kroppens immunförsvar vid kontakt med ett främmande ämne (antigen), vilket i detta fall utgörs av norovirus ytstrukturer.

Prov sätts till en platta med brunnar. Vissa brunnar är beklädda med antikroppar riktade mot norovirus, andra brunnar med ospecifika antikroppar. De senare utgör referensbrunnar. Om norovirus finns i provet binder de in

till de specifika antikropparna i brunnarna. Icke inbundna komponenter tvättas bort. Därefter tillsätts norovirusantikroppar kopplade med enzym. Icke inbundna komponenter tvättas åter bort och ett substrat tillsätts som ändrar färg vid närvaro av enzymet. Färgintensiteten ökar linjärt med mängden virus i provet. Proven jämförs med en referensbrunn.

De första antikroppsbaseade detektionsmetoderna för norovirus hade en känslighet i nivå med elektronmikroskopi (Widdowson et al. 2005). Senare, med hjälp av konstgjorda viruspartiklar, kunde mer specifika antikroppar tas fram, varvid känsligheten avsevärt kunde förbättras. Numera är känsligheten inte långt efter dagens realtids-PCR-system (Fisman et al. 2009). Emellertid är ELISA inte tillräckligt känslig för detektion av norovirus i vattenprov.



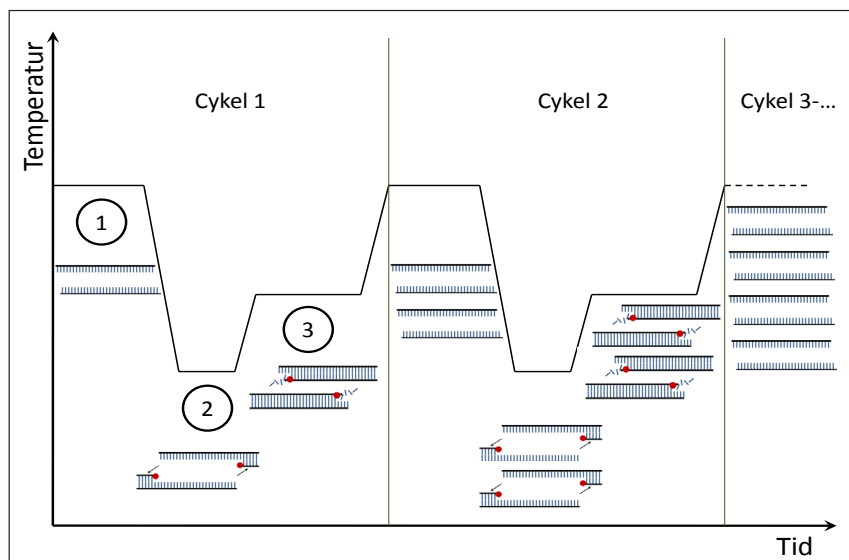
Figur 6-2 Principen för Antigen-ELISA.

6.3 PCR

PCR (från engelskans Polymerase Chain Reaction) är numera den mest använda analysmetoden för detektion av mikroorganismer (Mackay et al. 2002). Metoden är snabb, känslig, robust och enkel. Den är speciellt användbar för svårödlade mikroorganismer såsom exempelvis virus. Användningen av PCR begränsas av att åtminstone delar av organismens arvsmassa måste vara kartlagd, vilket medför att metoden endast kan tillämpas på kända virus. Problem uppstår också vid analys av snabbmuterande virus såsom RNA-virus, eftersom deras arvsmassa kan varieras mycket mellan olika genotyper och dess undertyper. Till exempel har det tidigare saknats bra system för att täcka det stora antalet norovirustyper, vilket historiskt har lett till ett stort mörkertal av norovirusutbrott (Parashar et al. 2001).

PCR beskrevs under mitten av 1980-talet. Det är en metod för att mångfaldiga specifika DNA-sekvenser. I korthet bygger principen på att en DNA-sekvens, exempelvis från en organisms arvsmassa, mångfaldigas in vitro (i provrör) så att DNAt kan detekteras. Metoden utnyttjar ett värmestabilt DNA-byggande enzym (polymeras), primrar (korta, specifika DNA-sekvenser som binder in till målsekvensen) samt enskilda nukleotider (DNAts byggstenar). (Mackay et al. 2002)

Genom att temperaturen cykliskt alterneras kan polymeraset göra kopior av en DNA-sträng, figur 6-3. Då temperaturen höjs separeras DNA-strängarna. När temperaturen åter sänks kan primrar och polymeras binda in. Temperaturen höjs något varvid polymeraset kan bygga upp en komplementär sträng utifrån originalet. Vid varje cykel dubblas målsekvensen, vilket slutligen ger miljontals kopior, som sedan kan detekteras. Metoden har kommit att revolutionera mikrobiologin. (Mackay et al. 2002)



Varje cykel består av tre faser:

- 1 Temperaturen höjs varvid DNA-strängarna separerar
- 2 Temperaturen sänks så att primer och polymeras kan bindas in
- 3 Temperaturen ökas något och polymeraset bygger en komplementär sträng utifrån originalet.

Figur 6-3 Principen för PCR. Till reaktionsröret sätts prov (DNA-templat), polymeras, primrar, nukleotider och buffert. Polymeraset kopierar DNA-strängen genom ett cykliskt temperaturprogram, vanligen 25–45 cykler.

Traditionell detektion av PCR-produkt utförs med elektrofores följt av visualisering med UV-ljus. Elektrofores innebär att de negativt laddade DNA-fragmenten får vandra i gel under inverkan av ett elektriskt fält. DNA-fragmenten separeras efter längd i och med att korta fragment färdas snabbare. Gelen läggs i en kemikalie som binder in till DNA:t och som sänder ut synligt ljus när den exponeras för UV-ljus. (Strachan and Read 1999)

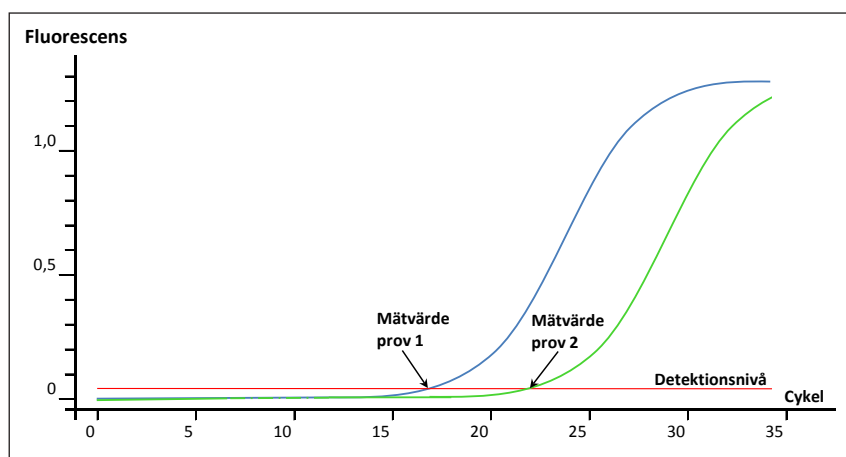
Med PCR detekteras arvs massa, vilket innebär att metoden inte skiljer infektiösa virus från inaktiverade (viruspartiklar som inte kan infektera), något som kan vara både till fördel och i vissa fall till nackdel. Fördelen är att arvs massa från såväl infektiösa som inaktiverade virus kopieras, vilket ger högre känslighet. Detta är betydelsefullt vid analys av vattenprov, där en mycket stor fraktion av viruspartiklarna antas vara inaktiverade. Nackdelen är att positiva PCR-resultat inte kan bevisa förekomst av infektiösa virus.

6.3.1 Realtids-PCR

Realtids-PCR är en vidareutveckling av konventionell PCR och möjliggör, precis som namnet antyder, att analys svar erhålls fortlöpande under processens gång. Metoden har flera fördelar; den är mycket snabb, har hög känslighet och kan ge en uppskattning av antalet virus i provet. Uppskattningen görs genom jämförelse med referensprov av kända koncentrationer. (Kubista et al. 2006) Ett typiskt mätintervall för realtids-PCR är 10 till 10⁷

virus/prov (Nordgren et al. 2008). Det stora mätintervallet för med sig att koncentrationssuppskattningen blir tämligen grov och antalet virus anges därför ofta i logskala (exempelvis 10^3 virus/prov).

Realtids-PCR utnyttjar en markör som binder in till det kopierade DNAt i varje cykel. Markören fluorescerar, det vill säga absorberar ljus av en våglängd och sänder ut ljus av en längre våglängd. Det utsända ljuset utgör en signal som är proportionell mot mängden PCR-produkt och detektion sker under varje cykel. Under de första cyklerna är signalen för svag för att kunna urskiljas från bakgrundsbruset. PCR-produktens exponentiella tillväxt innebär att den slutligen når över mätbara nivåer och kan detekteras. (Kubista et al. 2006). Ju färre cykler som behövs för att nå upp till mätbara nivåer, desto fler kopior av arvsmassan fanns ursprungligen i provet, figur 6-4. Det finns ett flertal framtagna system med fluorescerande markörer, såsom CYBR green, TaqMan, Molecular Beacons och Light Upon eXtension (LUXTM). LUXTM har hög känslighet och systemet har framgångsrikt använts för att detektera norovirus i avloppsvatten (Nordgren et al. 2008).



Figur 6-4 Realtids-PCR. Figuren visar två prov med olika mängd norovirus. Prov 1 (blå kurva) når detektionsnivån (röd linje) före prov 2 (grön kurva) och har därför fler ursprungliga kopior av norovirusarvsmassa. Proven koncentrationsbestäms genom jämförelse med referensprov av kända koncentrationer.

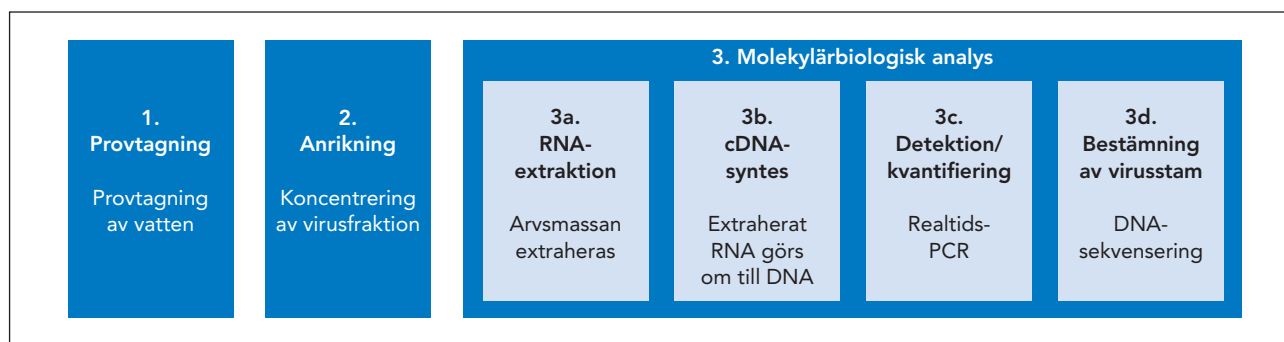
6.3.2 Syntes av DNA från RNA

Arvsmassan i vissa virus, däribland norovirus, utgörs av enkelsträngat RNA. För att kunna utnyttja PCR krävs att arvsmassan först har gjorts om till dubbelsträngat, komplementärt DNA, så kallad cDNA. cDNA kan syntetiseras (framställas kemiskt) från RNA med kommersiella kit (en färdigkomponerad uppsättning kemikalier, reagenser och provrör).

7 Analyskedja för detektion av norovirus i vatten

Realtids-PCR är den enda metod som har tillräckligt hög känslighet för detektion av icke odlingsbara virus i vattenmiljö. Koncentrationerna av virus i råvatten förväntas vara låga, vilket ställer krav på en omfattande virusanrikning (Pond et al. 2004). Anrikningen är dessutom nödvändig för att reducera volymen, eftersom PCR utförs på miljondelar av en liter. Den stora volymreducering innebär att det är ofrånkomligt med stora förluster, oavsett vilken anrikningsmetod som tillämpas. Typiska utbyten för 10 liter sjö- och flodvatten ligger mellan 0–10 % (Albinana-Gimenez et al. 2009). Det finns dock få artiklar som jämför olika metoder för anrikning av norovirus med samma typ av vatten, vilket innebär att det är mycket svårt att jämföra olika metoder. Ofta används dessutom andra virus, såsom adenovirus och poliovirus, vid försöksupställningar för att bestämma utbytet för metoden, trots att utbytet skiljer sig påtagligt mellan olika virus.

Analysmetodik för detektion av norovirus i vatten består av ett flertal steg, figur 7-1.



Figur 7-1 Översiktlig beskrivning av analyskedjan för molekylär detektion av RNA-virus i vattenprov med realtids-PCR.

De olika stegen i analyskedjan för norovirus i vatten är:

- 1 *Provtagning*. Provtagning av sjö- eller åvatten.
- 2 *Anrikning*. Provet koncentreras för att samla viruspartiklarna i en mindre volym. Därigenom ökar sannolikheten för att hitta dem i efterföljande steg. Det saknas en standardiserad anrikningsmetod (Bosch et al. 2008), vilket gör detta steg till den största utmaningen. Olika anrikningstekniker beskrivs senare i detta kapitel och utvecklingen av en modifierad metod beskrivs i kapitel 8.
- 3 *Molekylärbiologisk analys*. Detta steg kan delas upp i flera delmoment som det antingen finns färdiga kommersiella eller utarbetade system för. Dessa har satts samman till en automatiserad analyskedja, se avsnitt 10.
 - a *RNA-extraktion*. Arvsmassan (RNA) i provet extraheras med ett av flera kommersiella system.

- b *cDNA-syntes*. Arvsmassa i form av RNA görs om till cDNA (komplementärt DNA). Även för detta delsteg finns kommersiella system att tillgå.
- c *Detektion med realtids-PCR*. Ett analyssystem med hög känslighet för detektion med realtids-PCR finns utarbetat för norovirus (Nordgren et al. 2008). Systemet medger samtidigt kvantifiering av mängden norovirus i provet.
- d *DNA-sekvensering*. Virusets genotyp och stam fastställs genom att den exakta sekvensen för ett avsnitt av virusets arvsmassa bestäms. Om provet innehåller en blandning av flera norovirus krävs ytterligare analyssteg.

7.1 Anrikning av norovirus i vatten

Anrikning är ett nödvändigt steg för att möjliggöra analys av virus i vatten. För att mäta bakgrunds nivåer av virus i ytvattentäkter måste metoderna dessutom vidareutvecklas. En del av arbetet inom projektet har bestått i att kartlägga beskrivna metoder samt vidareutveckla en metod för att fungera under de givna förutsättningarna. En väl fungerande anrikningsmetod bör uppfylla ett antal kriterier: tekniskt enkel, snabb, billig, ha ett relativt högt utbyte, ge en liten slutvolym samt fungera för ett brett spektrum av magtarmvirus (Bosch et al. 2008). Därtill måste metoden vara robust och ha hög reproducerbarhet. Ingen metod idag uppfyller alla kraven, varför det normalt krävs anrikning i flera steg.

De låga viruskoncentrationerna kräver som tidigare nämnts anrikning utifrån relativt stora vattenvolymer, minst en liter för ytvatten (Gilgen et al. 1997). Innan provet anrikas måste det normalt konditioneras (kemikalie tillsätts för att ändra pH eller jonstyrka) eller förfiltreras. För att åstadkomma en hög koncentreringsgrad och nå ned till tillräckligt små volymer

Tabell 7-1A Tillämpade anrikningsmetoder för anrikning av virus i stora volymer (från cirka en liter). Dessa utgör generellt ett första anrikningssteg.

Princip	Metod	Startvolym (l)	Slutvolym (l)	Tillvägagångssätt
Adsorption/eluering	Positivt laddat filter	1–2	0,003	0,45 µm nylonmembran, 47 mm
Adsorption/eluering	Negativt laddat filter	0,5–500	0,01–0,2	0,45 µm HA-filter, 47 till 293 mm
Adsorption/eluering	Negativt laddat filter	10–600	0,650–1,800	1,2 µm filterkassett
Adsorption/eluering	Glasullskolonn	10–1500	≥ 0,1	Filtrering med glasullsfiler
Storleksseparering	Membranfilter	20–100	≥ 0,3	Ultrafiltersystem

Tabell 7-1B Tillämpade anrikningsmetoder för anrikning av virus med provvolym mindre än en liter. Detta steg utförs normalt som ett andra eller senare anrikningssteg.

Princip	Metod	Startvolym (ml)	Slutvolym (ml)	Tillvägagångssätt
Partikelfördelning mellan faser	Membranfilter	1000	15	Ultrafiltersystem
Partikelfördelning mellan faser	Mikrokoncentrator	2–20	0,1–0,7	Centricon 100 eller Centriprep YM50
Storleksseparering	Två-fas-separation	4	0,1	Fasseparation med kloroform
Storleksseparering	Två-fas-separation med PEG	50–650	1–5	Fällning med polyetenglykol (PEG)

för tillämpning av molekylärbiologisk analys utförs anrikningen i två eller fler steg. Extraktionen av virus-RNA utförs på så lite som några hundra mikroliter, vilket innebär att koncentrationen måste vara mellan 10^3 och 10^4 gånger per liter vattenprov.

Olika anrikningsmetoder är tillämpbara vid olika volymer och dessa utnyttjar olika fysikaliska principer. Vid anrikning av stora volymer (från en liter), används främst adsorption-/elueringsmetoder eller membranfiltrering, tabell 7-1A. Vid anrikning av mindre volymer (mindre än en liter), tillämpas i första hand koncentration med mikrokonzentrator eller fassparation, tabell 7-1B.

7.1.1 Adsorptions-/elueringsmetoder

Flera vanliga och välbeprövade adsorptions- och elueringsmetoder finns för anrikning av virus i vattenprov. Metoden bygger på att provet förs i kontakt med en matris (exempelvis genom ett filter) till vilken viruspartiklarna adsorberar. Filtratet, vätskan som passerat matrisen, kastas. Viruspartiklarna elueras från matrisen med en liten volym lösning som samlas upp. Vanligen utgörs matrisen av filter (med porstorlek 0,45 till 1,2 μm) eller av kolonner med glasull. Eftersom filtrens porstorlek är större än viruspartiklarna, används filter av elektrostatiskt laddade material. Viruspartiklarna, vilka bär laddade ytstrukturer, attraheras och binder härigenom in till filtret. I allmänhet justeras vattenprovets pH ned för att partiklarna ska fastna bättre i filtret. Vanligt är även att tillsätta flockningskemikalier så att viruspartiklarna bildar större komplex. Eluering sker generellt med en lösning med högt pH. (Wyn-Jones and Sellwood 2001)

Eftersom molekylära analystekniker använder bråkdelar av en milliliter är i de flesta fall slutvolymen likväl alltför stor. Därför krävs ytterligare minst en anrikningsprocess. Antingen upprepas metoden i mindre skala, eller så används en anrikningsmetod för mindre volymer, se tabell 7-1B. (Wyn-Jones and Sellwood 2001)

Hur stora vattenvolymer som kan hanteras beror på hur snabbt matrisen blir mättad, det vill säga hur snabbt ett filter sätts igen. Partikelrika vattenprov förfiltreras ofta med filter av större porstorlek. Därigenom kan provvolymen ökas, samtidigt som förfiltreringen reducerar antalet partiklar som annars riskerar att störa den efterföljande analysen.

Virusförluster vid anrikning är ofrånkomligt, och beror i stor utsträckning på vattenkvalitén/typen av vatten (destillerat vatten, dricksvatten och ytvatten) (Hamza et al. 2009; Haramoto et al. 2009). I många studier används poliovirus eller bakteriofag MS2 som modell för att utvärdera utbytet. Dessa virus är, till skillnad från norovirus, förhållandevis enkla att detektera och kan kvantifieras med odling. Eftersom virus är enkla organismer förväntas olika virus uppföra sig lika vid anrikningen. Emellertid tyder flera sentida studier på att utbytet skiljer sig mellan olika virus (Bae and Schwab 2008; Haramoto et al. 2009; Shin and Sobsey 2008). Då framtagna anrikningssystem ofta är utvärderade med olika virus och vattentyper är det svårt att jämföra anrikningsmetodernas effektivitet för humant norovirus.

Positiva filter

Filter av nylon är av naturen positivt laddade, vilket har utnyttjats av olika forskargrupper för att anrika viruspartiklar i sjövattnen (Gilgen et al. 1997; Häfliger et al. 2000; Hörman et al. 2004; Kukkula et al. 1999; Maunula et al. 2005; Nygård et al. 2003). Viruspartiklarna har negativt laddade ytstrukturer, framförallt vid låga pH, och attraheras därför av det positivt laddade filtret. Elektropositiva filter kan användas utan att vattnet konditioneras, men fungerar bäst inom pH-intervallet 3–6, medan $\text{pH} > 7$ snabbt ger sämre utbyte (Wyn-Jones and Sellwood 2001). Viruspartiklarna elueras med en buffert med högt pH.

Negativa filter

Det finns studier som utnyttjar så kallade HA-filter ($0,45\ \mu\text{m}$), elektronegativa cellulosa-nitrat-filter, för att koncentrera virus i vatten (Haramoto et al. 2005; Haramoto et al. 2004; Haramoto et al. 2009; Katayama et al. 2008). Vanligen tillsätts Mg^{2+} till provet för att binda de negativa viruspartiklarna till större komplex. I vissa studier sänks dessutom provets pH till 3,5. En annan möjlighet är att ladda filtret genom att skölja det med Al^{3+} innan provet filtreras (Haramoto et al. 2007). Provet filtreras sedan varvid viruspartiklar binder in. För att underlätta eluering och för att avlägsna flervärda positiva joner, sköljs filtret i sur lösning ($\text{pH}\ 3,5$) och provet elueras därefter i buffert med högt pH. Andra studier har använt kassetter med filter med porstorlek $1,2\ \mu\text{m}$ (Rutjes et al. 2005; Rutjes et al. 2006; Westrell et al. 2006). För att motverka att filterkassetten sätter igen måste vattenprovet konditioneras före filtrering.

Glasullskolonner

Kolonner fyllda med behandlad glasull adsorberar virus kring neutralt pH utan att provet konditioneras (Wyn-Jones and Sellwood 2001). Tekniken har tillämpats på både yt-, grund- och dricksvatten (Lambertini et al. 2008; Vivier et al. 2004). Utbytet varierar mycket och beror på typ av virus, vattnets pH och partikelhalt. Anrikning med glasull är däremot ekonomiskt och lämpar sig väl vid analys av stora vattenvolymer vid gynnsamma vattenegenskaper.

7.1.2 Membranfiltrering

Membranfiltrering innebär att vattenprovet cirkuleras över ett membran där flödesriktningen är parallell med membranytan. Genom att vätskan trycksätts pressas små molekyler (vatten och joner) genom membranet, medan stora molekyler och partiklar blir kvar i ett koncentrat. Vätskans hastighet hålls hög nog för ett turbulent flöde. Därigenom undviks igensättning av membranet. Filtrets grovlek väljs utifrån storleken på det som ska anrikas. För små partiklar såsom virus, används så kallade ultrafilter, filter med mycket liten porstorlek. Provvolymen kan reduceras till den minsta volym som krävs för cirkulation. (Wyn-Jones and Sellwood 2001)

Membranfiltreringssystem finns i olika storlekar för att hantera från en liter upp till hundratals liter. Ett system som hanterar tio- till hundratals liter åtföljs ofta av ett mindre system för att ytterligare koncentrera provvolymer. Därefter reduceras provet vidare med en annan anrikningsmetod.

De största fördelarna med metoden är att vattenprovet inte måste konditioneras och att metoden kan tillämpas på ett stort antal olika virus. Systemen är dock ofta dyra att sätta upp och varje filtrering tar lång tid. Metoden har framgångsrikt tillämpats på 20 liter ytvatten och 100 liter dricksvatten (Hernandez-Morga et al. 2009b; Polaczyk et al. 2008).

7.1.3 Mikrokoncentrator

Koncentrering med mikrokoncentrator är tillämpligt för små provvolym, mellan 2–20 ml. Metoden är mycket användbar för anrikning i steg två eller senare och har använts i ett stort antal studier (Gilgen et al. 1997; Haramoto et al. 2005; Haramoto et al. 2004; Haramoto et al. 2009; Hörman et al. 2004; Kukkula et al. 1999; Liu et al. 2007). Principen bygger på storleksseparering med ett finmaskigt filter på en insats placerad i en behållare. Provet placeras i insatsen och centrifugeras varvid vatten, joner och partiklar med molekylvikt under ett visst ”cut off”-värde pressas genom filtret. Viruspartiklar och större partiklar kan inte passera filtret utan blir kvar i ett koncentrat. Det finns flera olika modeller och olika ”cut off”-värden för varje modell.

7.1.4 Två-fas-separation

Vid två-fas-separation blandas vattenprovet med två vätskor med olika egenskaper, exempelvis butanol/kloroform eller dextran/polyetenglykol (PEG). Vätskornas olika egenskaper gör att de separerar, varvid det bildas två vätskefaser. Vattnet återfinns i en av faserna. Provets partiklar löser sig olika bra i faserna beroende på deras fysikaliska och kemiska egenskaper och fördelas alltså i stor utsträckning i en av dem. Volymen för den fas där merparten av önskad partikel finns hålls liten. Partiklarna förflyttas således från en stor volym till en betydligt mindre. Metoden begränsas i volym till upp till cirka en liter, och används därför ofta vid anrikning i ett andrasteg (Hernandez-Morga et al. 2009a; Lambertini et al. 2008; Lodder and de Roda Husman 2005; Polaczyk et al. 2008; Westrell et al. 2006).

8 Anrikningsmetodik för norovirus i vatten

En anrikningsmetod utvecklad av Gilgen et al. (1997) valdes som utgångsmetod för anrikning av norovirus i vatten. Metoden har framgångsrikt använts av ett flertal olika forskargrupper för att påvisa norovirus i å- och sjövattnen (Gilgen et al. 1997; Kukkula et al. 1999; Maunula et al. 2005). Den är enkel att sätta upp, billig och kan skalas upp för analys av större vattenvolymer.

8.1 Anrikningsmetod enligt Gilgen et al. (1997)

Anrikningsmetoden av Gilgen et al. (1997) baseras på två anrikningssteg för att koncentrera provet cirka 7000 gånger. I det första steget utnyttjas adsorptions-/elueringssteg med ett positivt laddat filter. Användningen av just denna typ av filter har bestämts empiriskt och filtrets exakta funktion beskrivs inte närmare i metoden. Troligt är dock att viruspartiklar fångas genom elektrostatisk attraktion och att virus bundna till större aggregat fastnar i filtret av steriska skäl. Det andra steget utgörs av storleksseparation med hjälp av mikrokonzentrator. Förutom själva anrikningsstegen ingår ett antal ytterligare moment som beskrivs nedan. Uppdelningen har gjorts för att underlätta för läsaren att följa med i utvecklingsdelen av metoden som beskrivs i 8.2.

- I pH-justering av vattenprov: Ingen pH-justering av vattenprov.
- II Förfiltrering: Provet filtreras genom ett neutralt glasfiberfilter, porstorlek 2 µm. Efter användning kastas förfiltret och filtratet med viruspartiklarna sparas.
- III Anrikningsteg ett: Provet filtreras genom ett positivt laddat nylonfilter (porstorlek 0,45 µm) varvid viruspartiklarna adsorberar till filtret.
- IV Eluering: Viruspartiklarna elueras från filtret genom att det försiktigt skakas i 3 ml 50 mM glycinbuffert, pH 9,5, med 1 % köttextrakt. (Köttextrakt är en odefinierad proteinblandning som förbättrar utbytet)
- V pH-justering av eluat (lösningen med frigjorda viruspartiklar): 2 ml av provet justeras till pH 8.
- VI Anrikningsteg två: Provet koncentreras till 100 µl med mikrokonzentrator och volymen justerades sedan till 140 µl inför RNA-extraktion.

8.2 Vidareutveckling av Gilgens anrikningsmetod

För att vara användbar på vatten med låga norovirushalter krävdes vidareutveckling av metoden som beskrivs av Gilgen et al. (1997). Det är som tidigare nämnts ofrånkomligt med förluster vid anrikning av virus i vattenprov då vattenvolymen reduceras tusentals gånger. Virusförlusten i de olika delmomenten utvärderades och olika parametrar som kunde påverka utbytet undersöktes.

Norovirus från utspädda, kliniska avföringsprov sattes till vattenprov. Samma mängd norovirus analyserades direkt och utgjorde referensprov. Samtliga försök utfördes med triplikat och de olika momenten genomfördes i enlighet med Gilgens metod om annat ej angivits. Molekylärbiologisk analys utfördes enligt avsnitt 10.2 och de uppmätta halterna justerades med avseende på spädnings effekter.

I Konditionering av vattenprov

Utbytet från filtrering av vatten med pH 7,6 och 4,5 jämfördes. Då det surare vattenprovet gav högre utbyte upprepades försöket med pH 7,6; 5,5; 4,5 och 4,0. I detta utökade försök användes en större elueringsvolym jämfört med Gilgens metod och eluatet konditionerades inte. Effekten av dessa förändringar beräknas inte ha påverkat utvärderingen av det initiala konditionerings- pH:t då samma ändring genomfördes för samtliga jämförda prov.

Ingen statistiskt påvisbar skillnad i utbyte erhöles mellan vatten med pH 5,5 och 4,5. Vatten med pH 7,6 och 4,0 gav 3 respektive 1,5 gånger lägre utbyte än vatten med pH 5,5 och 4,5.

II Förfiltrering

Förlust vid förfiltrering studerades genom eluering av virus från förfiltret av glasfiber. Elueringen utfördes i enlighet med protokollet för eluering av virus från nylonfilter enligt Gilgens metod, se avsnitt 8.1.

Endast en obetydlig virusfraktion kunde påvisas i förfiltren, varför dessa sannolikt inte påverkar utbytet negativt om provet utgörs av kranvatten. Det kan dock inte uteslutas att elueringsprocessen fungerar sämre för glasfiberfilter jämfört med nylonfiltren för vilka den är utvecklad. Om så är fallet kan det finnas förluster i förfiltreringssteget.

Förlusten vid förfiltreringen är möjligen även större för ett mer partikelrikt vatten, sjö- och åvatten, då viruspartiklarna kan binda till större partiklar som i sin tur fastnar i förfiltret. Detta undersöktes genom tester på ytvatten från Motala Ström och Göta Älv. Vattenproven pH-justerades till 5,5 och norovirus tillsattes. Proverna blandades väl och filtrerades därefter genom ett neutralt glasfiberfilter med porstorlek 1 eller 2 μm . Eluering utfördes enligt beskrivningen ovan och eluaten analyserades.

Endast försumbara halter norovirus kunde påvisas i samtliga förfilter. Virusförlusterna vid förfiltrering kan därför antas vara låga. Förfiltrering medför att nylonfiltret (0,45 μm), i anrikningssteg ett, inte sätter igen i samma utsträckning, vilket gör att större volymer kan filtreras. Även med förfiltrering är det dock svårt att analysera större vattenvolymer än en liter eftersom nylonfiltret likväl sätts igen vid filtrering av partikelrikt vatten.

III Anrikningssteg ett

Detta moment med adsorption av virus till ett positivt nylonfilter modifierades inte, utan genomfördes i enlighet med Gilgens metod. Alternativ till nylonfilter ansågs inte relevanta då de antingen har fel laddning eller är alltför kostsamma.

IV Eluering

Effektiviteten av elueringen från nylonfiltret undersöktes genom att två elueringsmoment från samma filtrat utfördes. Kranvatten med pH 4,5

samt 7,6 användes. Den första elueringen genomfördes med glycin/köttextraktbuffert i enlighet med Gilgens metod. Den andra elueringen utfördes antingen som den första eller med 500 µl RLT-buffert (Qiagen) (En buffert som har sönder viruset och frigör RNAt).

Den andra elueringen med glycin/köttextraktbuffert innehöll eluatet en betydande andel norovirus, vilket innebär att virus kvarstår i filtret efter den första elueringen. Vid en andra eluering med RLT-buffert kunde virus påvisas i vatten med pH 7,6 men inte för vatten med pH 4,5. Nylonfiltret binder alltså virus även vid pH 7,6, men släpper virus sämre vid eluering med glycin-/köttextraktbuffert.

Eftersom viruselueringen är ofullständig med ett elueringssteg utvärderades eluering i två steg. Vatten från Göta Älv pH-justerat till pH 5,5 användes. Eluering i två steg jämfördes med eluering i ett steg enligt Gilgens protokoll men med 4 ml. I två-stegs-elueringen skakades provet kraftigt under 30 sekunder i elueringsbuffert. Eluatet togs bort och filtret inkuberades i 2 ml ny buffert i 5 minuter under lätt skakning. Eluaten analyserades var för sig.

Eluering i två steg gav cirka två gånger bättre utbyte och även högre precision än vid enbart en eluering (med samma totalvolym). Majoriteten av viruspartiklarna erhöles i det första elueringssteget i två av de tre replikaten. Summan av de viruspartiklar som eluerades vid de två elueringarna var mycket lika för alla replikaten. Experimentet visar samtidigt att viruspartiklarna tål att skakas kraftigt (vortexas).

V Konditionering av eluat

Behovet av konditionering från buffertens pH 9,5 till pH 8,0 före anrikningssteg två i enlighet med Gilgens metod undersöktes. Norovirus sattes till elueringsbuffert. Proven blandades och inkuberades i rumstemperatur under två timmar och analyserades därefter. Referensprov utgjordes av prov där norovirus blandades med elueringsbuffert och analyserades direkt, samt av prov utan tillsats av elueringsbuffert.

Prov med norovirus som inkuberats i två timmar i elueringsbuffert gav samma resultat som norovirus som tillsats till elueringsbuffert och analyserats direkt. Resultatet var dessutom signifikant högre än för norovirus som analyserats utan tillsats av elueringsbuffert. Detta bekräftades även i flera senare försök. Konditionering av eluatet är således inte nödvändigt.

VI Anrikningssteg två

Förluster vid användandet av mikrokonzentrator undersöktes genom att norovirus blandades med 4 ml elueringsbuffert och anrikades med mikrokonzentrator. Filtrat samt koncentrat analyserades.

Vid anrikning med mikrokonzentrator förlorades uppskattningsvis omkring 20–50 % av virusfraktionen, vilket var mer än förväntat. Samtidigt innehöll filtratet inte några påvisbara mängder virus. Förlusten orsakas således av att en del viruspartiklar blir kvar i mikrokonzentratorn, vilket delvis kan förklaras av att det är svårt att föra över hela koncentratvolymen. Trots förlusten ger förfarandet en koncentrationsökning med minst 10 gånger eftersom provvolymen reduceras från 4 till 0,2 ml.

Nödvändigheten av anrikningssteg två (mikrokonzentrering) undersöktes med olika elueringsvolym och buffert. Vattenprov konditionerades till pH 5,5 respektive 7,6 och filtrerades enligt Gilgens protokoll. Eluering med

glycin/köttextraktbuffert följt av anrikning med mikrokoncentrator jämfördes med eluering med enbart 500 µl RLT-buffert.

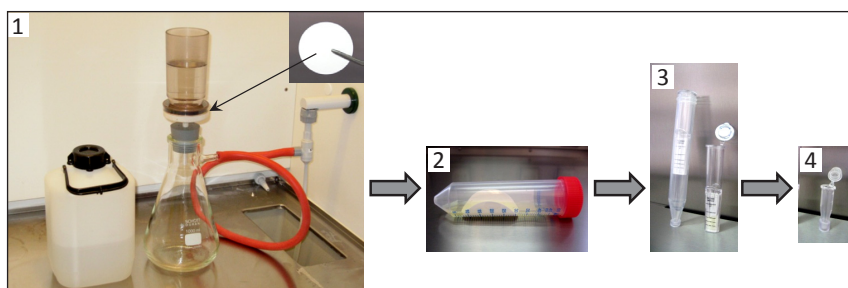
Eluering med RLT-buffert ger en snabbare och billigare analys eftersom anrikningssteget med mikrokoncentrator kan uteslutas. Emellertid var utbytet sämre än vid eluering med glycin/köttextraktbuffert följt av mikrokoncentrator. Eluering med RLT-buffert visade sig dessutom vara svårt att utföra för små volymer. Sammantaget medför ovanstående lägre precision och sannolikt även lägre reproducerbarhet vid eluering med RLT-buffert.

Utifrån ovanstående behålls eluering med glycin/köttextraktbuffert följt av anrikning med mikrokoncentrator som ett delsteg i anrikningsmetoden.

8.2.1 Modifierad anrikningsmetodik för norovirus i ytvatten

Precis som Gilgens metod utgår den vidareutvecklade varianten från en liter vatten. Större vattenvolym fungerar endast med partikelfattiga vatten eftersom partikelrika vatten snabbt sätter igen nylonfiltret i anrikningssteg ett, även när förfiltrering tillämpas. Följande steg ingår i anrikningsmetodiken för vattenprov (se även figur 8-1):

- I Konditionering av vattenprov: Justering av pH till 5,5.
- II Förfiltrering: Provet filtreras genom ett neutralt glasfiberfilter, med porstorlek 1 µm varefter förfiltret kastas.
- III Anrikningssteg ett: Filtratet från förfiltreringen filtreras med ett positivt laddat nylonfilter (Ø 47 mm, porstorlek 0,45 µm) varvid viruspartiklarna adsorberar till filtret.
- IV Eluering: Viruspartiklarna elueras från nylonfiltret med 50 mM glycinbuffert, pH 9,5, med 1 % köttextrakt i två steg:
 - a Filtret skakas kraftigt i 30 sekunder i 2 ml buffert och eluatet tas tillvara.
 - b Filtret inkuberas i ytterligare 2 ml buffert i 5 minuter under lätt skakning, eluatet tas tillvara.
- V Konditionering av eluat: Eluaten förs samman men utan att konditionering görs.
- VI Anrikningssteg två: Eluaten koncentreras till 200 µl i mikrokoncentrator.



- 1 En liter vatten pH-justeras till 5,5, förfiltreras och filtreras därefter med ett nylonfilter.
- 2 Filtret förs över till ett nytt rör och viruspartiklarna elueras med en elueringsbuffert.
- 3 Provet koncentreras med en mikrokoncentrator och koncentratet förs sedan över till ett nytt rör (4) inför molekylärbiologisk analys.

Figur 8-1 Anrikning av norovirus.

Den framtagna anrikningsmetodiken jämfördes med metodiken beskriven av Gilgen et al. (1997) med hjälp av vattenprov (Göta Älv) med tillsats av norovirus. Jämförelse gjordes mot referensprov.

Nära 8 % tillsatta norovirus kunde påvisas efter anrikning med den nya metoden. Resultatet var cirka fem gånger bättre än utgångsmetoden enligt

Gilgen et al. (1997). Dessutom var precisionen bättre med den nya metoden.

8.3 Slutsatser anrikningsteknik

- Den vidareutvecklade anrikningstekniken ger nära 8 % utbyte vilket är cirka fem gånger högre än den metod som utvecklats av Gilgen et al (1997).
- Den nya anrikningstekniken är enkel att utföra och har hög reproducerbarhet.

Genom den förbättrade anrikningstekniken krävs fem gånger lägre halter norovirus för att påvisa dess förekomst i ytvatten än med Gilgens metod. Med den nya anrikningstekniken blir detektionsnivån för den kompletta analysen (från anrikning och molekylärbiologisk detektion, se figur 7-1) 100–400 norovirus per liter i ett råvattenprov. Detta värde erhålls genom sammanvägning av utbytet vid anrikningen samt den efterföljande molekylärbiologiska analysens detektionsnivå och dess förluster (då endast en delvolym kan analyseras i realtids-PCR). För att dessutom kunna bestämma viruskoncentrationen krävs cirka fem gånger högre virushalter, omkring 500–2 000 norovirus per liter råvatten.

Vid anrikningen fångas såväl infektiösa som inaktiva viruspartiklar. Den absoluta majoriteten norovirus i ytvatten är inaktiverade och kan därför inte smitta oss människor. Om höga halter norovirus uppmäts i ytvatten finns således risk att vattnet även innehåller infektiösa norovirus. Då ett normalt ytvattenverk med adekvata barriärer antas ha minst en 3 log₁₀-reduktion måste halterna i ytvatten vara tämligen höga (betydligt högre än analysmetodikens detektionsnivå) för att dricksvatten ska vara smittsamt.

9 Utveckling av analysmetodik för norovirus i slam

Vid dricksvattenberedningen antas en 3 log₁₀-reduktion av virus ske i samband med kemisk fällning och snabbsandfiltrering (Shirasaki et al. 2009). Halterna virus i sedimenteringsslammet bör därmed spegla halterna i vattenet. Följaktligen är det av intresse att undersöka även slammet med avseende på norovirus.

Den största problematiken med virusanalys av slam är att frigöra viruspartiklar utan att frisätta substanser som stör analysen eller bryter ned virusens arvsmassa. Kommersiella RNA-extraktionskit för miljöprov är mycket dyra, tidskrävande, kan endast hantera liten provmängd och är inte möjliga att automatisera.

Enskilda viruspartiklar är mycket små och sedimenterar normalt inte vid centrifugering. Detta utnyttjas för att analysera kliniska prov där fekalier löses upp i en neutral fosfatbuffert, varefter provet centrifugeras. En tillräckligt stor fraktion viruspartiklar förblir i vätskefasen medan större partiklar sedimenteras i botten på röret. I detta delprojekt utvecklades en analysmetodik för slam baserad på en centrifugerings- och elueringsmetodik.

9.1 *Analys av prov med tillsats av norovirus*

Till förtjockat slam tillsattes norovirus. Slamproven skakades kraftigt och fick stå på lätt skakning i en timme. Proven centrifugerades varvid partiklar sedimenterade till en pellet i botten av röret. Vätskan ovanför pelleten analyserades för att bestämma i vilken grad viruspartiklarna band till slammet. Resterande vätska dekanterades och pelletarna löstes upp parallellt i vardera tre olika buffertar: PBS, RLT- buffert respektive glycin-/köttextraktbuffert. Proven skakades kraftigt under en minut och inkuberades sedan under lätt skakning i en timme i rumstemperatur. Därefter centrifugerades proven och vätskefasen analyserades. Samma mängd virus som var tillsatt till slammet analyserades direkt och utgjorde referensprov. Alla prov var i triplikat och analyserades enligt avsnitt 10.2.

Noroviruspartiklarna band i hög grad till slammet. I vätskefasen återfanns mindre än 0,1 % av tillsatta viruspartiklar. Provet påvisades också vara fritt från störande ämnen. Även om det är ogörligt att efterlikna betingelserna i vattenverk tyder försöket på att det är rimligt att anta att en stor andel viruspartiklar avskiljs i flocknings- och sedimenteringsprocessen.

Glycin-/köttextraktbufferten frisatte majoriteten av alla inbundna viruspartiklar. Med PBS kunde endast en liten andel virus frigöras, medan inga virus kunde påvisas genom frisättning med RLT-buffert. RLT-bufferten påvisades frisätta störande eller nedbrytande substanser. I övriga prov fanns inga tecken på sådan frisättning. Ett skäl till att glycin-/köttextraktbufferten fungerade bäst är sannolikt dess höga pH, (pH 9,5). Det löser upp flockarna i slammet och partiklar som varit bundna till dessa frigörs.

9.2 *Analys av autentiska slamprov*

Centrifugerings- och elueringsmetodiken tillämpades på fyra autentiska prov av sedimenteringsslam från Norrvatten, Sydvatten, Göteborg Vatten och Stockholm Vatten. Proven analyserades enligt avsnitt 10.2.

Norovirus kunde påvisas i två av de fyra slamproven, men nivåerna var för låga för att kunna bestämmas.

9.3 *Slutsatser slamanalys*

- Sedimenteringsslam kan binda noroviruspartiklar i mycket stor utsträckning, vilket styrker antagandet om att det sker en betydande avskiljning vid kemisk fällning och snabbsandfiltrering.
- En centrifugerings- och elueringsmetod utvecklades för att frisätta viruspartiklar från sedimenteringsslam. Metoden fungerade väl på slam med tillsats av norovirus.
- Sedimenteringsslam från fyra svenska vattenverk testades med den framtagna metoden. I två av proven kunde norovirus detekteras.

10 Automatisering av molekylärbiologisk analys

Avföringsprov från norovirusinfekterade personer kräver endast enkel upp-
arbetning inför molekylärbiologisk analys, eftersom virusnivåerna i avföring
från smittade individer vanligen är extremt höga. Miljöprov, såsom ytvatten
eller sedimenteringsslam, är betydligt mer resurskrävande eftersom proven
måste upparbetas (anrikas respektive renas) inför molekylär analys. Oavsett
provtyp kan emellertid normalt samma molekylära analysmetodik tillämpas
när väl provet upparbetats.

Den sista delen av analysmetodiken, själva detektionen, genomförs med
realtids-PCR (se avsnitt 6.3.1). För att detta skall vara möjligt krävs att noro-
virusarvsmassan (RNA) utvinns ur provet. Därefter måste RNA omvandlas
till komplementärt DNA (cDNA) innan realtids-PCR kan användas. Dessa
moment är som nämnts tidigare till stor del utvecklade och olika kommer-
siella system finns tillgängliga. För att skapa en effektiv analys, från RNA-
extraktion till detektion och kvantifiering med realtids-PCR, utvärderades
olika robotiserade systemen var för sig och sattes samman till en automati-
serad analyskedja.

10.1 Utvärdering av automatiserade processer

Vid RNA-extraktion utvinns RNA från alla organismer som finns i pro-
vet, däribland arvsmassan från norovirus. Processen utförs vanligen med
manuella extraktionskit, men även robotiserade extraktionsprocesser, främst
avsedda för kliniskt bruk, är utvecklade.

En robotiserad RNA-extraktion sattes upp och utvärderades mot ett väl-
beprövat manuellt kit. Utbytet för RNA-extraktionsmetoderna påvisades
vara mycket lika. Den robotiserade metoden medgav hantering av stora
provserier (upp till 48 prov), och krävde mindre tid med mycket enkla
arbetsmoment.

Vid cDNA-syntes görs enkelsträngad arvsmassa (RNA) i provet om till
dubbelsträngad (DNA). Processen, som kan utföras kemiskt med kommer-
siella kit, består av flera steg där pipettering av små volymer är nödvändigt.
Även inför detektion med realtids-PCR krävs ett stort antal volymöverfö-
ringar, såsom pipettering av PCR-reagenser, prov och standardkurva.

Robotiserad pipettering utvärderades mot manuell pipettering vid
cDNA-syntes och realtids-PCR. Robotiserad pipettering gav stor tidsvinst
(framförallt för stora provserier), hög exakthet, precision och reproducer-
barhet. Roboten är enkel att använda, men kräver viss mjukvarukännedom
vid uppsättning av olika pipetteringsmallar.

10.2 Molekylärbiologisk analys av norovirusprov

Den robotiserade RNA-extraktionsmetoden användes. 200 µl prov blandades med lika volym RLT-buffert. Provet genomgår ett antal reningssteg, där störande ämnen tvättas bort och RNA samlas upp i 50 µl vatten. 20 µl av extraherat RNA gjordes om till 50 µl cDNA med ett kommersiellt kit. Realtids-PCR utfördes med ett analyssystem för detektion av norovirus utvecklat av Nordgren et al. (2008) baserad på LUX™. Vid såväl cDNA-syntes som vid realtids-PCR utfördes pipettering med robot.

10.3 Slutsatser automatiserad analyskedja

- Den automatiserade analyskedjan ger ett effektivt analysflöde med möjlighet att hantera ett stort antal prov parallellt.
- Analyskedjan är robust och oberoende av användaren samt ger en analys med hög precision och reproducerbarhet.
- Manuell provhantering är minimerad, vilket gör att analysen har låg risk för kontaminering och provförväxling.

11 Diskussion

Norovirus bedöms utgöra ett stort hot mot svensk dricksvattenberedning (Svenskt Vatten 2007). Trots att viruset har orsakat ett stort antal vattenburna utbrott i Sverige saknas uppgifter om normalhalter i svenska råvattentäkter. I dagsläget finns heller ingen standardiserad metod för att mäta virus i vatten.

Det är svårt att föreställa sig de ofantliga kvantiteter norovirus som en infekterad person kan utsöndra, upp till 10^{12} viruspartiklar per gram avföring (Atmar et al. 2008). Om de virus som en enda norovirusmittad individ utsöndrar under en dag sprids ut homogent i Bolmen (en sjö med 184 km² yta och ett medeldjup av 5,4 m) blir koncentrationen uppåt 1 000 viruspartiklar per liter. Merparten av dessa skulle dock aldrig nå råvattenintaget till ett dricksvattenverk och endast en mycket liten fraktion av dessa virus skulle i sin tur vara infektiösa.

För att ytterligare visa på att stora mängder norovirus frisätts i miljön kan en nyligen publicerad studie av Nordgren et al. (2009) nämnas. I studien utfördes provtagning av ett svenskt reningsverk månatligen under ett år. I inkommande vatten påvisades 10^4 – 10^7 noroviruspartiklar per liter. Medelreduktionen i reningsverket var endast 1,5 log₁₀-enheter, vilket innebär att stora mängder norovirus kvarstår i det utgående vattnet.

Inom detta projekt har en metodik för analys av norovirus i vatten tagits fram med syfte att användas för att studera bakgrundsnivåer av norovirus i svenska dricksvattentäkter. Med metodiken krävs uppskattningsvis 500–2 000 viruspartiklar per liter vatten för att bestämma virusnivåer i vattenprovet. Nivån för att detektera norovirus i vattenprovet är något lägre och kräver mellan 100–400 noroviruspartiklar per liter.

Detektionsnivån kan tyckas otillräcklig, då endast 10–100 noroviruspartiklar räcker för att orsaka infektion. Virusmätningarna är dock anpassade för orenat ytvatten, varför virusnivåerna förväntas vara tusentals gånger högre än i det distribuerade dricksvattnet. Dessutom förlorar viruspartiklar i vattenmiljö gradvis förmågan att infektera och de allra flesta viruspartiklarna i ytvattnet förväntas vara inaktiverade. Analysen med realtids-PCR detekterar norovirusarvsmassa, vilket innebär att såväl infektiösa som inaktiverade norovirus mäts. Det är samtidigt mycket troligt att totala antalet detekterade norovirus korrelerar med antalet infektiösa norovirus, det vill säga att höga uppmätta norovirusnivåer tyder på att ytvattnet är ohälsosamt.

Eftersom normalhalterna av norovirus förmodas vara låga i de flesta svenska ytvatten syftar metodutvecklingen i detta projekt till att uppnå god detektion av norovirus i just låga halter. Vid analys av prover som spikats med låga virushalter kan det dock vara svårt att räkna fram meningsfulla siffror på utbytet beroende på ett flertal faktorer som tillsammans ger höga standardavvikelser; 1) stokastiska effekter (det vill säga slump), 2) de ofrånkomligt många analysstegen samt 3) realtids-PCRens låga noggrannhet vid låga halter. Detta medför att försöksupställningarna blir komplicerade

med många varierande parametrar vilket i sin tur gör att det blir svårt att presentera utbyten ens med en enda värdesiffra (exempelvis 5 %).

Innan analysmetodiken tillämpas på ytvattenprov kommer den att förbättras ytterligare samt skalas upp för analys av omkring 20 liter vatten. Härigenom förbättras möjligheterna till mätning av låga bakgrunds nivåer.

Med den under projektet utarbetade analysmetodiken för slam påvisades norovirus i slamprov från två vattenverk. Nivåerna virus vara låga, strax över detektionsgränsen. Metodiken för slam kan skalas upp genom användning av ett anrikningssteg, något som avses utredas vidare.

Det finns idag bra verktyg för att utvärdera risker vid dricksvattenberedning (Lundberg Abrahamsson et al. 2009). För att utföra tillförlitliga riskanalyser krävs dock bra indata. Då det saknats analysmetoder för virus i svenska vattendrag har halter istället uppskattats med hjälp av utländska studier och indikatororganismer. Den i projektet utvecklade analysmetoden ger helt nya möjligheter att analysera norovirusförekomst i våra ytvatten. Metoden kan användas för att studera verkliga normalhalter och variationer vilket ger tillförlitligare underlag till dagens riskanalysmodeller. Tillförlitligare riskvärderingar ger i sin tur att bättre riktlinjer kan sättas upp för dricksvattenberedningen och därigenom säkerställa ett hälsosamt dricksvatten.

12 Slutsatser

Metodik för analys av norovirus i å- och sjövattnen har tagits fram. Två uppärbetningsmetoder har utvecklats, en för anrikning av norovirus i ytvatten och en för frisättning av norovirus från slam. Metoderna kan kombineras med en, under projektet utarbetad, molekylärbiologisk analyskedja för detektion och koncentrationsbestämning av norovirus. Analyskedjan är robust, i hög grad automatiserad med låg risk för kontamination och provförväxling.

Anrikningsmetoden för ytvatten är en vidareutveckling utifrån en befintlig metod. Den nya metoden fungerar väl för ytvatten med tillsats av norovirus. Metoden är cirka fem gånger bättre än den befintliga, har hög precision och reproducerbarhet.

Den utvecklade metoden för frisättning av norovirus i slam är billig, enkel och fungerar utmärkt för sedimenteringsslam med tillsats av norovirus. Med den framtagna metoden kunde norovirus påvisas i sedimenterings-slam från två svenska vattenverk.

De utvecklade systemen för mätning av norovirus är bra verktyg för att utreda förekomsten i svenska ytvattentäkter. De kan även användas för att studera verkliga normalhalter och variationer vattentäkterna för att ge tillförlitligare underlag till dagens riskanalysmodeller.

Uppärbetningsmetoderna för norovirus i råvatten och slam, kommer att förfinas, skalas upp och kan därefter appliceras för att mäta bakgrunds nivåer av norovirus i svenska dricksvattentäkter.

13 Referenser

Albinana-Gimenez, N., P. Clemente-Casares, B. Calgua, J. M. Huguet, S. Courtois et al., 2009 Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *J Virol Methods* 158: 104–109.

Atmar, R. L., and M. K. Estes, 2001 Diagnosis of noncultivable gastroenteritis viruses, the human caliciviruses. *Clin Microbiol Rev* 14: 15–37.

Atmar, R. L., A. R. Opekun, M. A. Gilger, M. K. Estes, S. E. Crawford et al., 2008 Norwalk virus shedding after experimental human infection. *Emerg Infect Dis* 14: 1553–1557.

AWWA, 1990 Water Quality and Treatment – a Handbook of Community Water Supplies, 4th ed, McGraw-Hill Inc. American Water Works Association 1990.

AWWA, 1999 Waterborne pathogens – Manual of water supply practise, M48 1st ed, American Water Works Association, USA.

Bae, J., and K. J. Schwab, 2008 Evaluation of murine norovirus, feline calicivirus, poliovirus, and MS2 as surrogates for human norovirus in a model of viral persistence in surface water and groundwater. *Appl Environ Microbiol* 74: 477–484.

Bosch, A., 1998 Human enteric viruses in the water environment: a mini-review. *Int Microbiol* 1: 191–196.

Bosch, A., S. Guix, D. Sano and R. M. Pinto, 2008 New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water. *Curr Opin Biotechnol* 19: 295–301.

Bull, R. A., E. T. Tu, C. J. McIver, W. D. Rawlinson and P. A. White, 2006 Emergence of a new norovirus genotype II.4 variant associated with global outbreaks of gastroenteritis. *J Clin Microbiol* 44: 327–333.

Cromeans, T. L., A. M. Kahler and V. R. Hill, 2009 Inactivation of Adenoviruses, Enteroviruses, and Murine Norovirus in Water by Free Chlorine and Monochloramine. *Appl Environ Microbiol*.

da Silva, A. K., J. C. Le Saux, S. Parnaudeau, M. Pommepuy, M. Elimelech et al., 2007 Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Appl Environ Microbiol* 73: 7891–7897.

Duizer, E., P. Bijkerk, B. Rockx, A. De Groot, F. Twisk et al., 2004 Inactivation of caliciviruses. *Appl Environ Microbiol* 70: 4538–4543.

Fankhauser, R. L., S. S. Monroe, J. S. Noel, C. D. Humphrey, J. S. Bresee et al., 2002 Epidemiologic and molecular trends of “Norwalk-like viruses” associated with outbreaks of gastroenteritis in the United States. *J Infect Dis* 186: 1–7.

- Fisman, D. N., A. L. Greer, G. Brouhanski and S. J. Drews, 2009 Of gastro and the gold standard: evaluation and policy implications of norovirus test performance for outbreak detection. *J Transl Med* 7: 23.
- Flint, S. J. m. f. (Editor), 2004 Principles of virology.
- Flyborg, L., and K. Persson, M, 2007 Barriärtänkande vid extrema förhållanden. *Vatten* 4: 321–328.
- Gallimore, C. I., M. Iturriza-Gomara, J. Xerry, J. Adigwe and J. J. Gray, 2007 Inter-seasonal diversity of norovirus genotypes: emergence and selection of virus variants. *Arch Virol* 152: 1295–1303.
- Gilgen, M., D. Germann, J. Luthy and P. Hubner, 1997 Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *Int J Food Microbiol* 37: 189–199.
- Gray, J. J., E. Kohli, F. M. Ruggeri, H. Vennema, A. Sanchez-Fauquier et al., 2007 European multicenter evaluation of commercial enzyme immunoassays for detecting norovirus antigen in fecal samples. *Clin Vaccine Immunol* 14: 1349–1355.
- Hamza, I. A., L. Jurzik, A. Stang, K. Sure, K. Uberla et al., 2009 Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses. *Water Res* 43: 2657–2668.
- Hansen, A., and T. A. Stenström, 1998 Kartläggning av Giardia och Cryptosporidium i svenska ytvattentäkter.
- Haramoto, E., H. Katayama, K. Oguma and S. Ohgaki, 2005 Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses, and torque teno viruses in the Tamagawa River in Japan. *Appl Environ Microbiol* 71: 2403–2411.
- Haramoto, E., H. Katayama, K. Oguma and S. Ohgaki, 2007 Recovery of naked viral genomes in water by virus concentration methods. *J Virol Methods* 142: 169–173.
- Haramoto, E., H. Katayama and S. Ohgaki, 2004 Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater. *Appl Environ Microbiol* 70: 2154–2160.
- Haramoto, E., H. Katayama, E. Utagawa and S. Ohgaki, 2009 Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. *J Virol Methods* 160: 206–209.
- Hardy, M. E., 2005 Norovirus protein structure and function. *FEMS Microbiol Lett* 253: 1–8.
- Hedlund, K. O., E. Rubilar-Abreu and L. Svensson, 2000 Epidemiology of calicivirus infections in Sweden, 1994–1998. *J Infect Dis* 181 Suppl 2: S275–280.

- Hernandez-Morga, J., J. Leon-Felix, F. Peraza-Garay, B. G. Gil-Salas and C. Chaidez, 2009a Detection and characterization of hepatitis A virus and Norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration – RT-PCR integrated methods. *J Appl Microbiol* 106: 1579–1590.
- Hernandez-Morga, J., J. Leon-Felix, F. Peraza-Garay, B. G. Gil-Salas and C. Chaidez, 2009b Detection and characterization of hepatitis A virus and Norovirus in estuarine water samples using ultrafiltration – RT-PCR integrated methods. *J Appl Microbiol*.
- Hewitt, J., M. Rivera-Aban and G. E. Greening, 2009 Evaluation of murine norovirus as a surrogate for human norovirus and hepatitis A virus in heat inactivation studies. *J Appl Microbiol* 107: 65–71.
- Hjertqvist, M., A. Johansson, N. Svensson, P. E. Abom, C. Magnusson et al., 2006 Four outbreaks of norovirus gastroenteritis after consuming raspberries, Sweden, June–August 2006. *Euro Surveill* 11: E060907 060901.
- Häfliger, D., P. Hubner and J. Luthy, 2000 Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *Int J Food Microbiol* 54: 123–126.
- Hörman, A., R. Rimhanen-Finne, L. Maunula, C. H. von Bonsdorff, N. Torvela et al., 2004 *Campylobacter* spp., *Giardia* spp., *Cryptosporidium* spp., noroviruses, and indicator organisms in surface water in southwestern Finland, 2000–2001. *Appl Environ Microbiol* 70: 87–95.
- Jiang, S. C., 2006 Human adenoviruses in water: occurrence and health implications: a critical review. *Environ Sci Technol* 40: 7132–7140.
- Kapikian, A. Z., 2000 The discovery of the 27-nm Norwalk virus: an historic perspective. *J Infect Dis* 181 Suppl 2: S295–302.
- Kapikian, A. Z., R. G. Wyatt, R. Dolin, T. S. Thornhill, A. R. Kalica et al., 1972 Visualization by immune electron microscopy of a 27-nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *J Virol* 10: 1075–1081.
- Kaplan, J. E., G. W. Gary, R. C. Baron, N. Singh, L. B. Schonberger et al., 1982 Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann Intern Med* 96: 756–761.
- Karim, M. R., E. R. Rhodes, N. Brinkman, L. Wymer and G. S. Fout, 2009 A New Electropositive Filter for Concentrating Enterovirus and Norovirus from Large Volumes of Water. *Appl Environ Microbiol*.
- Katayama, H., E. Haramoto, K. Oguma, H. Yamashita, A. Tajima et al., 2008 One-year monthly quantitative survey of noroviruses, enteroviruses, and adenoviruses in wastewater collected from six plants in Japan. *Water Res* 42: 1441–1448.
- Keswick, B. H., T. K. Satterwhite, P. C. Johnson, H. L. DuPont, S. L. Secor et al., 1985 Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl Environ Microbiol* 50: 261–264.

- Khamrin, P., N. Maneekarn, S. Peerakome, S. Tonusin, R. Malasao et al., 2007 Genetic diversity of noroviruses and sapoviruses in children hospitalized with acute gastroenteritis in Chiang Mai, Thailand. *J Med Virol* 79: 1921–1926.
- Kirkwood, C., 2004 Viral gastroenteritis in Europe: a new norovirus variant? *Lancet* 363: 671–672.
- Kroneman, A., L. Verhoef, J. Harris, H. Vennema, E. Duizer et al., 2008 Analysis of integrated virological and epidemiological reports of norovirus outbreaks collected within the Foodborne Viruses in Europe network from 1 July 2001 to 30 June 2006. *J Clin Microbiol* 46: 2959–2965.
- Kubista, M., J. M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonak et al., 2006 The real-time polymerase chain reaction. *Mol Aspects Med* 27: 95–125.
- Kukkula, M., L. Maunula, E. Silvennoinen and C. H. von Bonsdorff, 1999 Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 180: 1771–1776.
- Lambertini, E., S. K. Spencer, P. D. Bertz, F. J. Loge, B. A. Kieke et al., 2008 Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Appl Environ Microbiol* 74: 2990–2996.
- Larsson, C., 2009 Rapport om utbrottet av magsjuka i Lilla Edet 2008, Smittskyddsenheten, Uddevalla.
- Le Guyader, F. S., F. Bon, D. DeMedici, S. Parnaudeau, A. Bertone et al., 2006 Detection of multiple noroviruses associated with an international gastroenteritis outbreak linked to oyster consumption. *J Clin Microbiol* 44: 3878–3882.
- Leclerc, H., L. Schwartzbrod and E. Dei-Cas, 2002 Microbial agents associated with waterborne diseases. *Crit Rev Microbiol* 28: 371–409.
- Lindberg, T., and R. Lindqvist, 2005 Riskprofil Dricksvatten och mikrobiologiska risker. Livsmedelsverket Rapport 28, 2005.
- Lindesmith, L. C., E. F. Donaldson, A. D. Lobue, J. L. Cannon, D. P. Zheng et al., 2008 Mechanisms of GII.4 norovirus persistence in human populations. *PLoS Med* 5: e31.
- Liu, J., Q. Wu and X. Kou, 2007 Development of a virus concentration method and its application for the detection of noroviruses in drinking water in China. *J Microbiol* 45: 48–52.
- Lodder, W. J., and A. M. de Roda Husman, 2005 Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 71: 1453–1461.
- Lopman, B., H. Vennema, E. Kohli, P. Pothier, A. Sanchez et al., 2004a Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant. *Lancet* 363: 682–688.

- Lopman, B., M. Zambon and D. W. Brown, 2008 The evolution of norovirus, the “gastric flu”. *PLoS Med* 5: e42.
- Lopman, B. A., M. H. Reacher, Y. Van Duynhoven, F. X. Hanon, D. Brown et al., 2003 Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995–2000. *Emerg Infect Dis* 9: 90–96.
- Lopman, B. A., M. H. Reacher, I. B. Vipond, D. Hill, C. Perry et al., 2004b Epidemiology and cost of nosocomial gastroenteritis, Avon, England, 2002–2003. *Emerg Infect Dis* 10: 1827–1834.
- Lundberg Abrahamsson, J., J. Ansker and G. Heinicke, 2009 MRA-Ett modellverktyg för svenska vattenverk. Rapport nr 2009-5, Svenskt Vatten Utveckling.
- Lysén, M., M. Thorhagen, M. Brytting, M. Hjertqvist, Y. Andersson et al., 2009 Genetic diversity among food-borne and waterborne norovirus strains causing outbreaks in Sweden. *J Clin Microbiol* 47: 2411–2418.
- Mackay, I. M., K. E. Arden and A. Nitsche, 2002 Real-time PCR in virology. *Nucleic Acids Res* 30: 1292–1305.
- Maunula, L., I. T. Miettinen and C. H. von Bonsdorff, 2005 Norovirus outbreaks from drinking water. *Emerg Infect Dis* 11: 1716–1721.
- Mead, P. S., L. Slutsker, V. Dietz, L. F. McCaig, J. S. Bresee et al., 1999 Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 5: 607–625.
- Norder, H., L. Sundqvist, L. Magnusson, S. Ostergaard Breum, M. Lofdahl et al., 2009 Endemic hepatitis E in two Nordic countries. *Euro Surveill* 14.
- Nordgren, J., F. Bucardo, O. Dienus, L. Svensson and P. E. Lindgren, 2008 Novel light-upon-extension real-time PCR assays for detection and quantification of genogroup I and II noroviruses in clinical specimens. *J Clin Microbiol* 46: 164–170.
- Nordgren, J., A. Matussek, A. Mattsson, L. Svensson and P. E. Lindgren, 2009 Prevalence of norovirus and factors influencing virus concentrations during one year in a full-scale wastewater treatment plant. *Water Res* 43: 1117–1125.
- Nygård, K., M. Torven, C. Ancker, S. B. Knauth, K. O. Hedlund et al., 2003 Emerging genotype (GGIIB) of norovirus in drinking water, Sweden. *Emerg Infect Dis* 9: 1548–1552.
- Palombo, E. A., and R. F. Bishop, 2006 Rotavirus.
- Parashar, U., E. S. Quiroz, A. W. Mounts, S. S. Monroe, R. L. Fankhauser et al., 2001 “Norwalk-like viruses”. Public health consequences and outbreak management. *MMWR Recomm Rep* 50: 1–17.
- Patel, M. M., A. J. Hall, J. Vinje and U. D. Parashar, 2009 Noroviruses: a comprehensive review. *J Clin Virol* 44: 1–8.

- Patel, M. M., M. A. Widdowson, R. I. Glass, K. Akazawa, J. Vinje et al., 2008 Systematic literature review of role of noroviruses in sporadic gastroenteritis. *Emerg Infect Dis* 14: 1224–1231.
- Payment, P., M. Trudel and R. Plante, 1985 Elimination of viruses and indicator bacteria at each step of treatment during preparation of drinking water at seven water treatment plants. *Appl Environ Microbiol* 49: 1418–1428.
- Polaczyk, A. L., J. Narayanan, T. L. Cromeans, D. Hahn, J. M. Roberts et al., 2008 Ultrafiltration-based techniques for rapid and simultaneous concentration of multiple microbe classes from 100-L tap water samples. *J Microbiol Methods* 73: 92–99.
- Pond, K., J. Ruedi and S. Pedley, 2004 Pathogens in drinking water sources. Microrisk report November 2004.
- Rohayem, J., 2009 Norovirus seasonality and the potential impact of climate change. *Clin Microbiol Infect* 15: 524–527.
- Rose, J. B., S. Farrah, V. J. Harwood, A. D. Levine, J. Lukasik et al., 2004 Reduction of pathogens, indicator bacteria and alternative indicators by wastewater treatment and reclamation processes. Water Environment Research Foundation/International Water Association.
- Rutjes, S. A., R. Italiaander, H. H. van den Berg, W. J. Lodder and A. M. de Roda Husman, 2005 Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification. *Appl Environ Microbiol* 71: 3734–3740.
- Rutjes, S. A., H. H. van den Berg, W. J. Lodder and A. M. de Roda Husman, 2006 Real-time detection of noroviruses in surface water by use of a broadly reactive nucleic acid sequence-based amplification assay. *Appl Environ Microbiol* 72: 5349–5358.
- Seger, A., 1998 Ozonbehandling följt av långsamfiltrering vid dricksvattenframställning. Rapport nr 1998-11, Svenskt Vatten Utveckling.
- Shin, G. A., and M. D. Sobsey, 2008 Inactivation of norovirus by chlorine disinfection of water. *Water Res* 42: 4562–4568.
- Shirasaki, N., T. Matsushita, Y. Matsui, A. Oshiba and K. Ohno, 2009 Estimation of norovirus removal performance in a coagulation-rapid sand filtration process by using recombinant norovirus VLPs. *Water Res.*
- Smeets, P., L. Rietveld, W. Hijnen, G. Medema and T. Stenström, 2006 Efficacy of water treatment processes. Microrisk report. April 2006.
- SMI, 2009 Årsredovisning 2008 – Smittskyddsinstitutet.
- SMI, 2010a Smittskyddsinstitutet <http://www.smittskyddsinstitutet.se/sjukdomar/vattenburen-smitta/> Hemsida besökt 2010-02.
- SMI, 2010b Årsredovisning 2009 – Smittskyddsinstitutet.

- Strachan, T., and A. P. Read, 1999 Human Molecular Genetics 2. BIOS Scientific Publishers Ltd, Oxford.
- Svenskt Vatten, 2007 Dricksvattenförsörjning i förändrat klimat, Underlagsrapport till Klimat- och sårbarhetsutredningen.
- Thiel, H. J., and M. König, 1999 Caliciviruses: an overview. *Vet Microbiol* 69: 55–62.
- Thornton, A. C., K. S. Jennings-Conklin and M. I. McCormick, 2004 Noroviruses: agents in outbreaks of acute gastroenteritis. *Disaster Manag Response* 2: 4–9.
- VAS-rådet, 2009 Samhällskostnader vid störningar i dricksvattenförsörjningen. Rapport nr 7.
- Westrell, T., P. Teunis, H. van den Berg, W. Lodder, H. Ketelaars et al., 2006 Short- and long-term variations of norovirus concentrations in the Meuse river during a 2-year study period. *Water Res* 40: 2613–2620.
- WHO, 2004 World Health Organisation. Guidelines for Drinking-water Quality. Volume 1 Recommendations. Third Edition.
- Widdowson, M. A., S. S. Monroe and R. I. Glass, 2005 Are noroviruses emerging? *Emerg Infect Dis* 11: 735–737.
- Vivier, J. C., M. M. Ehlers and W. O. Grabow, 2004 Detection of enteroviruses in treated drinking water. *Water Res* 38: 2699–2705.
- Wyn-Jones, A. P., and J. Sellwood, 2001 Enteric viruses in the aquatic environment. *J Appl Microbiol* 91: 945–962.
- Zheng, D. P., T. Ando, R. L. Fankhauser, R. S. Beard, R. I. Glass et al., 2006 Norovirus classification and proposed strain nomenclature. *Virology* 346: 312–323.
- Ødegaard, H., L. Fiksdal and S. W. Østerhus, 2006 Optimal desinfeksjonspraksis for drikkevann. Norvar-rapport 147 2006.

Appendix A

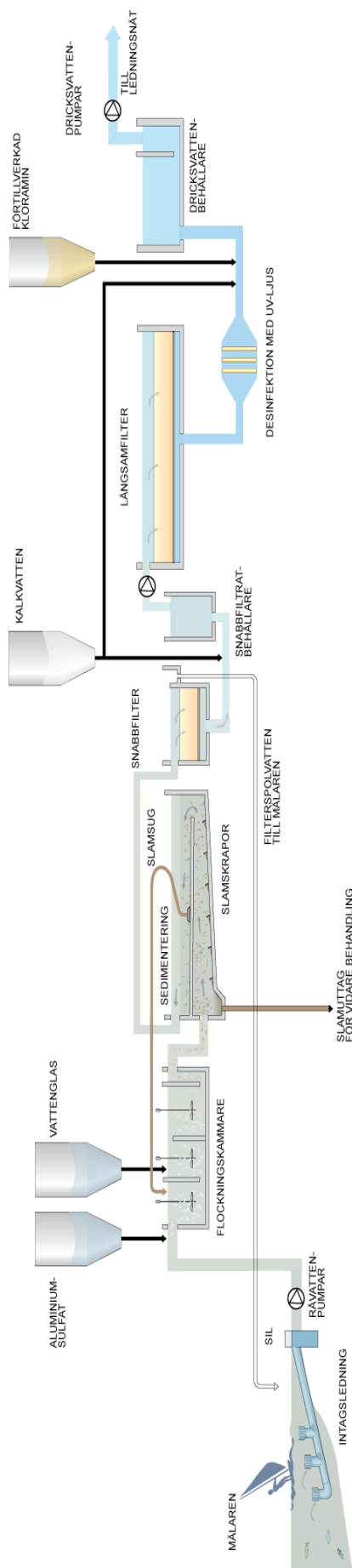
Ordlista

Adsorbera	Binda in
Antigen	Ett för kroppen främmande ämne, kan vara en del av mikroorganismers ytstrukturer
Antikropp	En molekyl bildad av det egna immunförsvaret vid kontakt med ett främmande ämne (antigen)
Asymtomatisk	En infektion där den smittade personen förblir symtomfri
Bakteriofag	Virus som angriper bakterier
Eluat	En lösning med frigjorda partiklar
Eluera	Att frigöra bundna partiklar med en lösning
Filtrat	Vätska som passerat ett filter
Humanpatogen	Mikroorganism som orsakar sjukdom hos människa
Inaktiverade virus	Virus som inte längre kan orsaka sjukdom.
Infektionsdos	Det antal mikroorganismer som krävs för att med 50 % sannolikhet orsaka infektion
Kapsid	Kapsel av proteiner hos virus
Kit	En färdigkomponerad uppsättning kemikalier, reagenser och provrör för ett specifikt syfte
Konditionering	Tillsats av kemikalie för att ändra jonstyrkan, ofta pH, i ett vattenprov
Köttextrakt	Köttextrakt är en odefinierad proteinblandning som förbättrar utbytet vid eluering. Detta har visats empiriskt och väldigt många studier använder det.
$\log_{10}$ -reduktion	1 $\log_{10}$ -reduktion innebär 90 % avskiljning 2 $\log_{10}$ -reduktion innebär 99 % avskiljning och så vidare
Mikrokoncentrator	En anordning som genom filtrering skiljer partiklar. Anordningen kan koncentrera partiklar i små provvolym
Pandemi	Världsomfattande utbrott
Patogen	Sjukdomsalstrande organism
PCR	(Polymerase Chain Reaction) – en molekylär metod för påvisning av arvsmassa.
RLT-buffert	En buffert som har sönder viruset och frigör RNA:t
Sekundär smittspridning	Andraledssmitta, från person-till-person
Serotyp	Undergrupp av samma mikroorganismart
Spp.	Species, engelska för arter
Syntetisera	Framställning av kemisk förening
Virulens	Förmåga att smitta

Appendix B

Schematisk beskrivning
av delprocesserna i ett
vattenverk.

Mario Salutskij,
Illustrerad Teknik.





Box 47607, 117 94 Stockholm

Tel 08 506 002 00

Fax 08 506 002 10

E-post svensktvatten@svensktvatten.se

www.svensktvatten.se