



Folkhälsomyndigheten

Virus i vatten – metoder för detektion av norovirus



Virus i vatten – metoder för detektion av norovirus

Bindningar och jäv

För Folkhälsomyndighetens egna experter och sakkunniga som medverkat i rapporter bedöms eventuella intressekonflikter och jäv inom ramen för anställningsförhållandet.

När det gäller externa experter och sakkunniga som deltar i Folkhälsomyndighetens arbete med rapporter kräver myndigheten att de lämnar skriftliga jävsdeklarationer för potentiella intressekonflikter eller jäv. Sådana omständigheter kan föreligga om en expert t.ex. fått eller får ekonomisk ersättning från en aktör med intressen i utgången av den fråga som myndigheten behandlar eller om det finns ett tidigare eller pågående ställningstagande eller engagemang i den aktuella frågan på ett sådant sätt att det uppkommer misstanke om att opartiskheten inte kan upprätthållas.

Folkhälsomyndigheten tar därefter ställning till om det finns några omständigheter som skulle försvåra en objektiv värdering av det framtagna materialet och därmed inverka på myndighetens möjligheter att agera sakligt och opartiskt. Bedömningen kan mynna ut i att experten kan anlitas för uppdraget alternativt att myndigheten föreslår vissa åtgärder beträffande expertens engagemang eller att experten inte bedöms kunna delta i det aktuella arbetet.

De externa experter som medverkat i framtagandet av denna rapport har inför arbetet i enlighet med Folkhälsomyndighetens krav lämnat en deklARATION av eventuella intressekonflikter och jäv. Folkhälsomyndigheten har därefter bedömt att det inte föreligger några omständigheter som skulle kunna äventyra myndighetens trovärdighet. Jävsdeklarationerna och eventuella kompletterande dokument utgör allmänna handlingar som normalt är offentliga. Handlingarna finns tillgängliga på Folkhälsomyndigheten.

Denna titel kan laddas ner från: www.folkhalsomyndigheten.se/publicerat-material/.

Citera gärna Folkhälsomyndighetens texter, men glöm inte att uppge källan. Bilder, fotografier och illustrationer är skyddade av upphovsrätten. Det innebär att du måste ha upphovsmannens tillstånd att använda dem.

© Folkhälsomyndigheten, 2018.

Artikelnummer: 18046

Förord

Under senare år har ett flertal projekt som rör detektion av norovirus i vatten avslutats och det finns även flera pågående projekt. Svenskt Vatten Utveckling har därför tillsammans med Folkhälsomyndigheten identifierat ett behov av att sammanställa kunskapen inom området för detektion av virus i vatten, med fokus på norovirus. Resultaten sammanfattas i denna rapport, för att underlätta kunskapsspridningen och öka kännedomen om projekten.

Informationen i rapporten kan används som utgångspunkt för att vidareutveckla metodiken för detektion av framför allt norovirus i vatten. Kännedom om vilka olika angreppssätt som använts och vilka som utfört försöken kan också underlätta framtida projekt. Rapporten riktar sig till bland annat dricksvattenproducenter, utvecklingsingenjörer, VA-konsulter, forskare och smittskyddsläkare.

Majoriteten av datainhämtningen och sammanställning av rapporten har utförts av Elisabeth Hallin-Bergvall, enheten för parasitologi vid avdelningen för mikrobiologi. Vidare har Sara Byfors, enhetschef för laborativ bakterieövervakning vid avdelningen för mikrobiologi, och utredare Caroline Schönning, enheten för övervakning och samordning vid avdelningen för smittskydd och hälsoskydd, bidragit med synpunkter och utveckling av rapporten. Rapporten har också granskats av Svenskt Vatten Utveckling och av dem utsedda personer med kunskap inom området. Rapporten publiceras också hos Svenskt Vatten Utveckling som en C-rapport.

Folkhälsomyndigheten

Karin Tegmark Wisell
Avdelningschef mikrobiologi

Innehåll

Förkortningar	10
Ordlista	11
Sammanfattning.....	12
Summary.....	13
Waterborne viruses – Methods for detection of norovirus	13
Bakgrund.....	14
Virus i vatten är en betydande orsak till sjukdom.....	14
Flera virus ger vattenburen smitta.....	15
Detektion av virus i vatten kräver särskilda metoder	15
Metoder utvärderas genom utbyte, kontroller och grad av hämning	16
Flera metoder för riskbedömning	18
Mikrobiologisk barriäranalys (MBA).....	18
Kvantitativ mikrobiologisk riskanalys (QMRA)	18
Tidigare publikationer om norovirus från Folkhälsomyndigheten.....	19
Syfte och mål.....	20
Genomförande	21
Informationsinsamling för projektet.....	21
Litteraturstudie.....	21
Sammanställning av genomförda projekt	22
Reducing the risk from food-borne viruses in the Nordic countries (FOOD-VIRUS)	22
Metod.....	22
Resultat av metod	23
Humanpatogena virus i svenska vattentäkter (NORVID).....	23
Metod.....	23
Resultat av metod	25
Fynd i vatten.....	25
QMRA och MBA inom NORVID	25
Virus i vatten, Skandinavisk kunskapsbank (VISK)	26
Metoder.....	26

Resultat av metod	28
Fynd i vatten.....	28
Barriärverkan inom VISK	29
QMRA inom VISK.....	30
Impact of climate change on the transport, fate and risk management of viral pathogens in water (VIROCLIME).....	31
Metod.....	31
Resultat av metoderna	33
Fynd i vatten.....	33
Stärkt beredskapskapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad provberedning, pre-PCR processing.....	33
Ökad förmåga till detektion av virus i livsmedel och humanprover för förbättrad smittspårning	33
Identifiering av kända och nya virus i vatten och deras spridning i befolkningen.....	34
Snabbare och effektivare analysmetoder för förbättrad risk och kvalitetshantering i livsmedelskedjan	34
Verifiera desinfektionseffekten med naturligt förekommande mikroorganismer	35
Sammanställning av andra publicerade artiklar.....	36
Förekomst av norovirus och adenovirus i floden Vantaa, en ettårsstudie och en metodjämförelse, Maunula m.fl. 2012.....	36
Metod.....	36
Resultat för metoderna	38
Fynd i vatten.....	38
Jämförelse av fyra metoder för detektion av norovirus i flaskvatten, Schultz m.fl. 2011.	38
Metod.....	38
Resultat för metoderna	39
Optimerad detektion genom pre-PCR processing, Borgmästars m.fl. 2017	40
Metod.....	40
Resultat för metoderna	41
Internationell standardmetod.....	42
Diskussion	43
Variation i metoder för virusanalys	43

Val av filter kan påverka metodens utbyte	43
Val av virus påverkar metodens utbyte	44
Fynd i vatten och tolkning av resultat	44
Dricksvattenburna virusutbrott kräver kompletterande metoder	45
Norovirus i vatten har oklar betydelse för folkhälsan	45
Framtida behov av utveckling	46
Referenser	47
Bilagor.....	50
Bilaga 1	50
Bilaga 2	52
FOOD-VIRUS.....	52
NORVID.....	53
VISK, Glomma, metodoptimering, Grøndahl-Rosado m.fl. 2014.....	54
VISK, Glomma, försök, Grøndahl-Rosado m.fl. 2014	55
Viroclime	56
Maunula m.fl. 2012, jämförelse av metoder	57
Maunula m.fl. 2012, ettårsstudie.....	58
Schultz m.fl. 2011 jämförande studie	59
Schultz m.fl. 2011 utvärderande studie.....	60
Borgämstars m.fl. 2017	61

Förkortningar

Cq	Quantification cycle, kvantifieringsvärde, även kallat Ct
G	Genogrupp
GDP	God desinfektionspraxis, har ersatts av förkortningen MBA
HAV	Hepatit A-virus
LOD _x	Limit of detection, detektionsgräns. Anger vid vilken koncentration det är x procents sannolikhet att man får ett positivt fynd.
MBA	Mikrobiologisk barriäranalys, ersatt ODP och GDP
MRA	Mikrobiologisk riskanalys, har ersatts av QMRA
WGS	Whole genome sequencing, helgenomsekvensering
ODP	Optimal desinfektionspraxis, har ersatts av GDP och senare av MBA
PCR	Polymeras chain reaction, polymeraskedjereaktion
PEG	Polyetylenglykol
QMRA	Kvantitativ mikrobiologisk riskanalys, har ersatt MRA
RT-PCR	Reverse transcription-PCR, Omvänd transkription-polymeraskedjereaktion.
qPCR	Kvantitativ PCR
VLP	Viruslika partiklar

Ordlista

Amplifiera	Att kopiera upp flera kopior av samma DNA-sekvens, sker vid en PCR-reaktion
Eluera	Att tvätta ur en partikel som bundit till en yta så att den kommer i lösning igen.
Matris	Det material som virus befinner sig i, till exempel dricksvatten, råvatten eller bär
Mikro-koncentrator	En koncentreringsmetod baserad på storleksseparering för mindre volymer där vätskan och partiklar under en viss storlek passerar genom ett filter medan större partiklar fångas upp.
PCR	En reaktion där DNA amplifieras
RT-PCR	En reaktion där RNA först omvandlas till DNA innan DNA amplifieras i en PCR-reaktion
qPCR	En PCR-reaktion där amplifieringen av DNA mäts under själva reaktionen, vilket möjliggör att man mäter – kvantifierar – hur mycket DNA som skapas under processens gång

Sammanfattning

Att kunna analysera förekomsten, och ibland även halterna, av virus i vatten är nödvändigt för att utreda vattenburna utbrott och bedöma risker i dricksvattenkedjan.

Denna sammanställning av de senaste årens forskning visar att det saknas standardiserade metoder för att påvisa virus i vatten. Fokus för rapporten har varit metoder för norovirus. Metoder har tagits fram och utvärderats på olika sätt, vilket gör det svårt att jämföra dem. Faktorer såsom vattnets kvalitet och val av kontrollvirus påverkar metodens utbyte. Utbytet varierar även inom en metod och är ofta lågt.

Alla befintliga metoder bygger på att koncentrera en större volym vatten till en mindre, genom filtrering eller flockulering. Viruspartiklar som koncentrerats till en yta elueras med en buffert för vidare analys. Sekundär koncentration ingår i vissa metoder. Norovirus och andra virus påvisas sedan med hjälp av realtids-PCR (polymerase chain reaction). PCR-analysen anger om det finns genetiskt material från viruspartiklar i provet, men den visar inte om viruspartiklarna är intakta och därmed kan orsaka sjukdom hos människa.

Norovirus går inte att odla. Mottagaren av provsvaret ställs därför inför svårigheten att värdera analysresultatet i förhållande till både ett lågt utbyte och ett eget antagande om halten viabla virus i provet. Norovirus i ytråvatten påvisas i samtliga undersökta råvatten, framför allt under vinterhalvåret.

Dricksvattenproducenter måste ha god kännedom om sitt råvatten för att kunna säkerställa att abonnenterna får ett hälsosamt och rent dricksvatten. De kan bland annat göra olika typer av riskbedömningar såsom MBA (mikrobiologisk barriäranalys) och QMRA (kvantitativ mikrobiologisk riskanalys) för att få mer kunskap om sin beredning i förhållande till sitt råvatten. Faroanalyser är också ett bra komplement i processen med att säkerställa ett hälsosamt dricksvatten.

Det finns sammanfattningsvis ingen metod för att påvisa virus i vatten som fungerar optimalt under alla förutsättningar. Resultat från metoderna kan därför inte direkt inkorporeras i riskmodeller utan kräver att dricksvattenproducenten förstår metoden samt vet hur olika virus är beskaffade och hur riskmodellerna fungerar. De behöver ständigt vara medvetna om risken för virus i råvatten och ta med denna osäkerhet i det dagliga arbetet. Vid misstanke om utbrott finns det stort värde i att analysera vatten för att se eventuell närvaro av virus och att jämföra viruspartiklar hos patienter och vattenprov för att utröna om vatten kan vara en trolig smittkälla.

Summary

Waterborne viruses – Methods for detection of norovirus

It is necessary to be able to analyze water for the presence of viruses, and to establish the quantity of viruses if possible, in order to investigate and evaluate the risks in drinking water production.

This report summarizes research from recent years and concludes that there is a lack of standardized methods for the detection of viruses in water. The focus of the report has been on methods for detecting norovirus. Methods have been developed and evaluated in many different ways, and this has hampered comparisons of the methods. Water quality and choice of control virus affects the method's recovery, and the recovery also varies within the method and is usually low.

All current methods utilize the concentration of a larger volume into a smaller volume, which is achieved by filtration or flocculation. Virus particles concentrated onto a surface are eluted with a buffer for further analysis. Some methods employ a secondary concentration. Norovirus and other viruses are detected with real-time PCR (polymerase chain reaction). PCR detection only shows if there is genetic material from virus particles in the sample, and it does not specify if the virus particle is viable and thereby capable of infecting humans.

It is not possible to cultivate norovirus. Therefore, the recipient of the results must take into account the low method recovery and their own assumed level of viable virus in the sample. Norovirus was detected in all investigated raw waters, especially during the winter months.

Good knowledge about the raw water is essential in order to be able to deliver drinking water that meets health standards. Different types of risk assessment models are available, such as MBA (microbiological barrier analysis) and QMRA (quantitative microbiological risk assessment), for gaining knowledge about the raw water.

There is no method for the detection of viruses in water that works well under many different conditions. Thus the results from the different methods cannot be directly incorporated into risk assessment models, but require knowledge about the methods, variations between viruses, and how the risk assessment models work. Producers of drinking water need to keep up to date on the issue of the presence of viruses in raw water and need to include this uncertainty in their daily work. In case of a water-borne outbreak, it is essential to analyze water for the presence of viruses and to compare virus particles from patients with those from water samples in order to determine if the water is a possible source of infection.

N.B. The title of the publication is translated from Swedish, however no full version of the publication has been produced in English.

Bakgrund

Vatten är en grundförutsättning för allt liv, och i Sverige förväntar man sig att dricksvatten från kranen är säkert och av god kvalitet. Det finns många system, allt från lagstiftning till kontroller, för att säkerställa kvaliteten på dricksvatten. Kontrollen inkluderar bland annat analyser för att påvisa olika mikroorganismer i vatten. Det finns vedertagna metoder för att analysera många bakterier och de vanligaste parasiterna i vatten, men det saknas etablerade metoder för analys av virus. Flera olika virus kan dock spridas via vatten och orsaka sjukdom hos människa, däribland norovirus som ger upphov till det som kallas vinterkräksjuka.

Virus i vatten är en betydande orsak till sjukdom

Norovirus är en av de vanligaste orsakerna till magsjuka (gastroenterit) i världen och viruset har också orsakat flera vattenburna utbrott. Magsjukesutbrott leder till stora kostnader för samhället, och detektion underlättar smittspårning och påskyndar motåtgärder. Det finns stor efterfrågan på analyser för att undersöka förekomst av virus i vatten, liksom ett stort behov av kunskap för att kunna tolka och förstå relevansen av resultaten.

Klimat- och sårbarhetsutredningen från år 2007 slår fast att risken för vattenburna sjukdomsutbrott kommer att öka i och med klimatförändringar, och norovirus är det virus man oroar sig mest för (1). WHO har också pekat ut norovirus som ett potentiellt hot mot ett hälsosamt dricksvatten (2). En genomgång av vattenburna utbrott 1992–2011 i de nordiska länderna visar också att calicivirus, det vill säga virusfamiljen som norovirus ingår i, är den vanligaste orsaken till utbrott där orsakande mikroorganism har kunnat identifieras (3).

Studier inom projektet ”Klimatförändringar, råvattenkvalitet, rening och distribution – bedömning av mikrobiella risker genom hälsostudier” har tagit fasta på att det till stor del är okänt hur mycket ohälsa som beror på förekomst av smittämnen i dricksvatten. Resultaten återges översiktligt i två rapporter från Svenskt Vatten Utveckling (SVU) (4, 5). Bland annat har de studerat samband mellan ohälsa i Göteborg med variationer i nederbörd och råvattenkvalitet i Göta älv, och visat att det finns ett tidsmässigt samband mellan kraftig nederbörd, försämrad råvattenkvalitet och samtal till 1177. Detta pekar på att virus är den vanligaste orsaken till magsjuka (5).

Under de senaste åren har det pågått flera stora projekt för att utveckla metoder och kartlägga förekomsten av virus i vatten i Norden. Resultaten från dem sammanfattas i denna rapport, för att göra kunskapen mer lättillgänglig och för att säkerställa att den kunskap som byggts upp inom dessa projekt tas till vara på ett effektivt sätt.

Flera virus ger vattenburen smitta

Det finns flera virus som är möjliga orsaker vid vattenburen smitta. Denna rapport fokuserar på norovirus men tabell 1 visar ett urval av de virus som anses mest relevanta vid dricksvattenburna utbrott i Sverige. Tabellen visar även överlevnad i vatten och symtom vid infektion.

Tabell 1. Ett urval av virus som bedöms relevanta för spridning via dricksvatten. Gastroenterit (magsjuka) och hepatit (gulсот) är vanliga symtom. Modifierad från WHO (2).

Virus	Infektionsdos ¹	Symtom	Överlevnad i vatten ²	Resistens mot klor ³
Adenovirus	Låg	Gastroenterit, varierande	Lång	Måttlig
Astrovirus	Låg	Gastroenterit	Lång	Måttlig
Enterovirus	Låg	Gastroenterit	Lång	Måttlig
Hepatit A-virus	Låg	Hepatit	Lång	Måttlig
Hepatit E-virus	Låg	Hepatit	Lång	Måttlig
Norovirus	Låg	Gastroenterit	Lång	Måttlig
Rotavirus	Låg	Gastroenterit	Lång	Måttlig
Sapovirus	Låg	Gastroenterit	Lång	Måttlig

1 Infektionsdoserna för de olika mikroorganismerna kan variera stort beroende på flera faktorer såsom subtyp av den specifika mikroorganismen samt immunstatus och ålder hos personen som exponeras. En infektionsdos som anges vara "låg" kräver cirka 1–100 mikroorganismer för att orsaka infektion hos 50 % av exponerade (friska, vuxna) personer, "måttlig" kräver 100–10 000 och "hög" över 10 000 mikroorganismer.

2 Detektionsperiod av infektiös organism i vatten vid 20 °C. Kort överlevnad: upp till 1 vecka; måttlig 1 vecka–1 månad; lång över en månad.

3 Resistens av infektiösa stadiet när organismen är frilevande i vatten som behandlats av normal halt klor vid pH 7–8. Måttlig resistens mot klor innebär 99 % inaktivering efter 1–3 min.

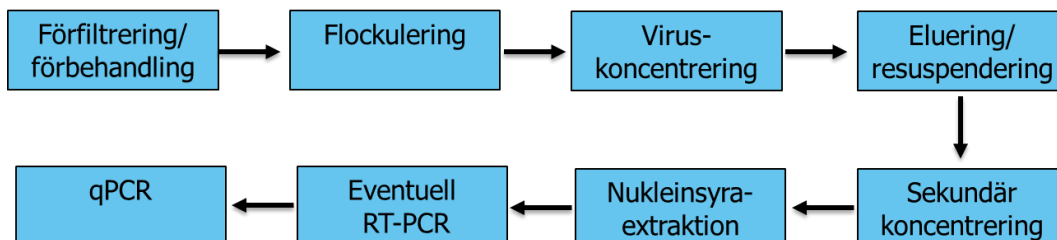
Detektion av virus i vatten kräver särskilda metoder

Vattenanalyser kräver analys av större volymer än till exempel analys av avföringsprov från patienter, eftersom koncentrationen av viruspartiklar är mycket lägre i vatten än i avföringen från en infekterad person.

Figur 1 visar principen för hur man kan påvisa virus i vatten. Metoderna inkluderar ibland ett förfiltreringssteg för att bli av med större störande partiklar eller en förbehandling, till exempel pH-justering eller tillsats av kemikalier som skapar flockar. Koncentreringen sker oftast genom adsorption till en yta (ett filter) men kan även innebära att flockar sedimenteras eller centrifugeras ner. När man har en koncentrerad pellet med viruspartiklar resuspenderas denna med en buffert. Vid eluering lösgörs viruspartiklar från filterytan med hjälp av en buffert eller genom att filtret backspolas. Om volymen fortfarande är för stor behövs sekundär koncentring som kan bestå av ytterligare filtrering med en mikrokoncentrator eller genom att viruspartiklarna fälls ut med PEG (polyetylenglykol). Därefter används olika kommersiella kit för att extrahera ut det genetiska materialet, det vill

säga nukleinsyran, från viruspartiklarna. Som sista steg används kommersiella kit för att omvandla norovirus RNA till DNA och påvisa och mäta mängden DNA i provet.

Figur 1. Generell princip för koncentring och påvisning av virus i vatten.



Norovirus går inte att odla med konventionella metoder (6), och vatten innehåller för låga halter virus för att man ska kunna påvisa virus med hjälp av elektronmikroskopi. Därför behövs molekylärbiologiska metoder för detektion. PCR är standardmetod för att analysera norovirus (och många andra virus) i både patient- och miljöprover. De molekylärbiologiska metoderna som används anger inte om viruset lever eller om de är infektiösa, utan anger endast att nukleinsyra från virus påvisats. Vid koncentring av vatten koncentreras inte bara viruspartiklarna utan även ämnen som kan inhibera PCR-reaktionen, och dessa hämmare är olika för olika typer av vatten.

En PCR-reaktion innebär att DNA amplifieras, det vill säga att en viss DNA-sekvens kopieras upp i många kopior. En konventionell PCR visar om den eftersökta viruspartikeln finns i provet eller inte. Realtids-PCR, också kallad qPCR (kvantitativ PCR), ger däremot inte bara svar på om det finns virusgenom utan visar också halten av virusgenom genom att kontinuerligt mäta amplifieringen.

Virus innehåller genetiskt material som antingen DNA eller RNA. Norovirus, felint calicivirus och murint norovirus är RNA-virus, medan mengovirus och heptatit A-virus är DNA-virus. För att kunna mäta halten genetiskt material, nukleinsyra, hos RNA-virus måste RNA först omvandlas till DNA i en process som kallas omvänd transkription-PCR, RT-PCR (reverse transcription-PCR). Denna process sker efter extraktion av nukleinsyra men innan PCR-steget.

En sammanfattning av olika steg i analysförfarande för virus med ytterligare förklaring av de ingående momenten finns i SVU-rapporten Analysmetoder för norovirus i ytvatten (7).

Metoder utvärderas genom utbyte, kontroller och grad av hämning

Genom att tillsätta en känd mängd virus går det att beräkna hur mycket som går förlorat i analysprocessen (8) och hur metoder fungerar under olika förhållanden. Utbytet för en metod anger hur mycket av det tillsatta viruset som återfinns efter slutsteget, och det anges i procent. Detektionsgränsen (LOD, limit of detection) för

en metod fås genom att använda en känd mängd virus-DNA som späds tills det inte längre kan påvisas. Då har metodens detektionsgräns uppnåtts, vilken brukar anges som antalet genomkopior per liter. Om det inte är känt hur många kopior av ett virus eller virus-DNA som satts till provet kan vid vilken PCR-enhet per liter som viruset går att påvisa anges istället. För de virus som går att odla, som t ex adenovirus, kan man undersöka hur många virus i provet som har förmåga att infektera odlade celler. Det ger ett mått på hur många viruspartiklar som potentiellt skulle kunna infektera celler och därmed utgöra risk för sjukdom hos människa.

Det är svårt att säga om förlusten av en viss mängd kontrollvirus beror på själva matrisen (materialet som virus befinner sig i, som dricksvatten eller råvatten) eller på de olika stegen i analysprocessen såsom viruskoncentrering, eluering, sekundär koncentrering, extraktion och PCR-analys. För att kontrollera en matris hämmande effekt kan man jämföra gränsvärden i PCR av ett spikat vattenprov med ett spikat ”rent vatten”, till exempel kranvatten (8).

Ett vanligt sätt att hantera hämning i PCR-reaktionen är att späda provet. Förhoppningen är att tillräcklig hög koncentration av virus finns kvar i provet men att inhibitorerna har minskat till en nivå som inte stör metoden i lika stor utsträckning.

Det går att kontrollera för hämning av qPCR på olika sätt. Kontrollerna kan vara antingen interna (kontroll satt till samma vattenprov som även analyseras för önskat virus) eller externa (kontroll satt till separat vattenprov som inte undersöks för önskat virus). Ett annat sätt att mäta inhibering är att analysera förskjutningar i amplifieringseffektiviteten. Gibson m.fl. (2012) (9) undersökte graden av hämning i 3 193 prover från grundvatten, ytvatten, orenat inkommande avloppsvatten, avrinningsvatten från jordbruk och dricksvatten i USA. Någon generell hämning beroende på provtyp eller volym kunde inte konstateras, inte heller någon korrelation mellan den provvolym som koncentrerats och analyserats med graden av hämning av qPCR. Däremot påvisas hämning i alla provtyper. Författarna föreslår därför att andra faktorer såsom plats eller säsong påverkar hämningen mer än provvolym.

Kontrollvirus är viktigt att använda vid analys av virus i vatten eftersom metoderna brukar uppvisa stor variabilitet och ge dåligt utbyte. En studie av Petterson m.fl. (2015) (10) visar att mengovirus inte var lämplig som kontroll vid analys av humanvirus då det uppskattade utbytet av mengovirus och humant virus (norovirus och adenovirus) skilde sig mycket åt inom samma prov. En metaanalys av olika metoder för koncentrering av virus visade att signifikanta skillnader i utbytet berodde på typ av virus snarare än vattentyp, analysvolym eller filtertyp (11). Det är vanligt att man använder kontrollvirus som processkontroll för att undersöka förlust av virus i olika steg i metoden, men inte lika vanligt att resultaten från försök räknas upp för att korrigera för dessa förluster (10).

Flera metoder för riskbedömning

Förekomsten av virus i råvatten från två av studierna har använts i någon typ av riskbedömning för att försöka tydliggöra de påvisade halternas betydelse i samhället. I Sverige används framför allt MBA (mikrobiologisk barriäranalys) eller QMRA (kvantitativ mikrobiologisk riskanalys) för detta ändamål. Syftet är se vilken rening eller vilka andra åtgärder som krävs för att kunna leverera ett säkert dricksvatten. Givetvis påverkas resultaten av de data som används i modellerna och producentens kunskap om sitt vatten.

Mikrobiologisk barriäranalys (MBA)

MBA är ett systematiskt sätt att värdera barriäreffekter. Det kallades tidigare för god desinfektionspraxis (GDP), och före det optimal desinfektionspraxis (ODP). MBA kan användas för att räkna ut vilken desinfektionsgrad som behövs i slutsteget av reningen, efter att hänsyn tagits till råvattenkvalitet, barriärer och annan vattenbehandling (12). MBA ger ”poäng” för olika åtgärder, till exempel avskiljande processer i vattenverket eller ett skyddat tillrinningsområde. Verktöget kan alltså användas för att se hur väl anpassad reningsprocessen är till förutsättningarna. Stor vikt har lagts vid skydd av vattentäkten och förebyggande åtgärder för att minimera mikrobiologisk förorening. Det går att lägga till eller dra ifrån logreduktionen av olika process-steg, eller att testa att minska reduktionen. Nackdelen är att MBA inte tar hänsyn till variabiliteten i systemet och det är svårt att studera effekten av förändringar i processen (12).

Kvantitativ mikrobiologisk riskanalys (QMRA)

QMRA är en metod för att uppskatta risker i dricksvattenproduktion. Verktöget ställer högre krav på data jämfört med MBA och kan användas för att modellera ett vattenverk i syfte att öka förståelsen för vattenverkets funktion, styrkor och svagheter. Det går också att hypotetiskt studera effekten på dricksvattnets mikrobiologiska kvalitet vid olika justeringar och förändringar i beredningsprocessen. Dessutom kan olika scenarion simuleras, till exempel utsläpp av orenat avloppsvatten, för att beräkna hur dessa påverkar reningsprocessen. Resultatet av modelleringarna presenteras i form av antalet infektioner som teoretiskt kan orsakas av respektive patogen. Verktöget tar med variationer och osäkerheter i beräkningarna, vilket är en fördel. Metoden är dock inte alltid användbar eftersom det är nödvändigt att ha kunskap om vilka mikroorganismer som finns och i vilken mängd, och att veta hur de påverkas av de olika reningsstegen. Visserligen kan standardvärden från litteraturen användas, men ytterligare studier och kartläggningar av mikroorganismer i det egna vattenverket ökar säkerheten i beräkningarna. Modellen används främst för att jämföra olika processkombinationer, se vilka barriärer som är mest kritiska och undersöka konsekvensen om någon del inte fungerar på ett korrekt sätt. De maximala halterna av patogena mikroorganismer vid råvattenintag kan uppskattas och sedan jämföras med verkets barriärverkan under suboptimala förhållanden. QMRA-modellen tar dock inte hänsyn till försämringar i ett tidigare steg, även om denna försämring

påverkar efterkommande steg. Svenskt Vatten har tillsammans med Abrahamsson m.fl. tagit fram ett svenskt QMRA-verktyg (13), och mer information finns på Svenskt Vattens [hemsida](#) (14).

Majoriteten av metoderna som nämns i denna rapport har inte använt QMRA för att analysera de uppmätta halternas effekt på ett reningsverks behov av reningsprocesser. QMRA är bara applicerbart på de studier som utgått från råvatten eftersom det är råvattnet som renas i dricksvattenverk.

Tidigare publikationer om norovirus från Folkhälsomyndigheten

Folkhälsomyndigheten (tidigare Smittskyddsinstitutet) har tidigare gett ut publikationen ”Norovirus i vatten – en litteraturstudie” (15, 16). Den innehåller information om till exempel smittvägar, genetik och effekt av olika desinfektionsmedel på norovirus samt exempel på rapporterade vattenburna norovirusutbrott. Folkhälsomyndigheten har också gett ut rapporten ”Vinterkräksjuka i vården. Kunskapsunderlag för att minska spridningen av norovirus” (17) som är ett nationellt kunskapsunderlag med förslag till åtgärder för att förebygga spridningen av norovirus. Rapporten sammanställer aktuell kunskap om epidemiologi, diagnostik och vårdhygien samt ger förslag till handläggning utifrån aktuell evidens och erfarenhet.

Syfte och mål

Folkhälsomyndigheten och Svenskt Vatten har identifierat ett behov av att sammanställa kunskapen inom området virus i vatten. Denna rapport ska därför ge svar på frågor såsom: Vilken kunskap har vi och vilka kunskapsluckor finns? Genom att sprida projektresultaten vill vi bidra till en bättre samordning inom området och till att resurserna nyttjas effektivare.

Målet med rapporten är att sammanställa vilken kunskap som finns, framför allt i Sverige, men även i övriga Norden, när det gäller följande frågor:

- Vilka metoder används i Norden för att analysera virus i vatten? Vilka styrkor och svagheter har dessa metoder?
- Hur tolkas resultaten av analyserna?
- Hur har projekten använt sina resultat för beräkningar i QMRA eller MBA?
- Vilka virus har studerats och vilka halter har uppmätts i olika typer av vatten (till exempel ytvatten, grundvatten, rekreationsvatten)?
- Vilken kunskap finns i dag om olika barriärers effekt på virus i vatten?
- Vilken betydelse har förekomst av norovirus för folkhälsan?
- Vilka kunskapsluckor finns?

Syftet har framför allt varit att kartlägga de projektrapporter som finns inom området och göra det enklare att få en överblick över tillgänglig information. Därefter har vi sammanställt de viktigaste resultaten och metoderna med fokus på metodens utförande och olika steg, metodens utbyte och de uppmätta halterna av virus.

Rapporten är en kunskapssammanställning av det arbete inom området virus i vatten som utförts och rapporterats under senare år, från 2008 fram till i dag (2017).

Sammanställningen gäller främst förhållanden i Norden, men även utanför om sådana studier ansetts vara av särskilt intresse. Författaren har gjort begränsningen att endast ta med publikationer där norovirus ingår som enda eller ett av flera undersökta virus.

Genomförande

Informationsinsamling för projektet

För att informera om projektet och samla information har Folkhälsomyndigheten presenterat projektet vid ett antal olika möten och seminarier.

Projektet presenterades första gången på Svenskt Vattens forsknings- och utvecklingsworkshop om risk för virusmitta i dricksvatten den 28 oktober 2014. Experter från Sverige och Norge som arbetar med virus i vattenområdet bjöds in att presentera aktuell kunskap. Projektet har lyfts även i andra sammanhang, bland annat på ett referensgruppsmöte för mikrobiologiska dricksvattenrisker på Livsmedelsverket den 4 november 2014, på Nationellt nätverk för dricksvattens arbetsgruppsmöte för forskning och utveckling den 20 januari 2015, på Nordiska Dricksvattenkonferensen den 29 september 2016 och på Nationella Dricksvattenkonferensen den 27 april 2017.

Information om projektet har gått ut via mejl ut till intressenter i olika nätverk, där mottagarna också uppmuntrades att sprida informationen vidare till parter som kunde vara intresserade men inte var inkluderade i mejllistan. I de fall författaren har haft kännedom om relevanta aktiviteter har författaren sökt upp personer för att få tillgång till dessa studier.

Litteraturstudie

En litteraturgenomgång inriktad på analys av norovirus i vatten har genomförts med hjälp av en informationsspecialist på Folkhälsomyndigheten. Många studier omfattar fler virus men i denna rapport redovisas framför allt resultaten för norovirus. I bilaga 1 finns information om sökningarna.

Det första urvalet i sökresultaten var baserat på screening av titlar och sammanfattningar. Om det direkt var tydligt att informationen inte var relevant analyserades artikeln inte vidare. Detta första urval resulterade i 106 unika artiklar och rapporter. Författaren läste sedan igenom sammanfattningarna och plockade ut de som visade sig vara relevanta, vilket resulterade i 29 artiklar som granskades mer i detalj.

En genomgång av relevanta publikationer från Svenskt Vattens rapportdatabas har också gjorts.

Sammanställning av genomförda projekt

Nedan redovisas projekt som har genomförts eller pågår. Projekten redovisas under egna rubriker. För ytterligare detaljer hänvisas till bilaga 2 och respektive referens. Tabell 2 listar inkluderade rapporter samt referens. Det kan utöver detta finnas relevanta projekt som inte har kommit till vår kännedom. Hur informationen samlats in beskrivs ovan i kapitlet Genomförande.

Tabell 2. Rapporter med aktuell referens som ingår i sammanställningen av genomförda projekt.

Inkluderade rapporter	Referens nr
Reducing the risk from food-borne viruses in the Nordic countries (FOOD-VIRUS)	18, 19
Humanpatogena virus i svenska vattentäkter (NORVID)	7, 20
Virus i vatten, Skandinavisk kunskapsbank (VISK)	10, 21-25
Impact of climate change on the transport, fate and risk management of viral pathogens in water (VIROCLIME)	26, 27
Stärkt beredskapskapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad provberedning, pre-PCR processing	28, 29
Ökad förmåga till detektion av virus i livsmedel och humanprover för förbättrad smittspårning	30
Identifiering av kända och nya virus i vatten och deras spridning i befolkningen	31
Snabbare och effektivare analysmetoder för förbättrad risk och kvalitetshantering i livsmedelskedjan	32
Verifiera desinfektionseffekten med naturligt förekommande mikroorganismer	33

Reducing the risk from food-borne viruses in the Nordic countries (FOOD-VIRUS)

Nordiskt kontaktorgan för jordbruksforskning (NJK) finansierade under 2008–2011 ett nordiskt samarbete där Sverige (Livsmedelsverket och Smittskyddsinstitutet), Finland (Helsingfors Universitet), Norge (Norges Veterinärhögskola), Danmark (Danmarks Tekniska Universitet) och Island (Matís) ingick i projektet ”Reducing the risk from food-borne viruses in the Nordic countries” (FOOD-VIRUS). Inom projektet testades en metod för att påvisa norovirus och adenovirus i 20 typer av dricksvatten från de nordiska länderna. Studien finns redovisad som manuskript i en doktorsavhandling (18).

Metod

Metoden gick ut på att dricksvattenprover på 1,5 liter spikades med norovirus GI, GII och adenovirus 41 samt med mengovirus som användes som processkontroll. Därefter filterades hela volymen genom ett positivt laddat membran, och virus eluerades från filter genom att täcka filtret med NucliSens lysis buffer under skakning. Hela volymen användes till extrahering med NucliSens mini-MAG, följt

av cDNA-produktion med Superscript III. Varje land utförde sina egna analyser till och med detta steg. Därefter skickades de frysta proverna till Danmark där qPCR utfördes med hjälp av TaqMan universal PCR för norovirus GI, GII och mengovirus, och QuantiTect Probe PCR kit för adenovirus. Alla analyser kördes på ABI StepOne. Analysförfarandet liknar metod B i Schultz m.fl. 2011 (19), se nedan, med ändringen att filter från Sartorius användes i stället för Zetapor. För flödesschema över analysförfarandet, se figur 7.

Resultat av metod

Medelutbytet för alla 20 vattentyper var: 43 procent för norovirus GI, 45 procent för norovirus GII, 15 procent för adenovirus och 46 procent för mengovirus. LOD₅₀ (anger vid vilken koncentration det är 50 procent sannolikhet att man får ett positivt fynd, det vill säga påvisar virus) räknades också ut för alla proverna och uppmättes till 13 PCR U/1,5 L för norovirus GI, 9 PCR U/1,5 L för norovirus GII och 12 PCR U/1,5 L för adenovirus. Dessa LOD₅₀ är jämförbara med de som Schultz m.fl. rapporterar (19).

Utbytet varierade med virus, vattentyp och utförande laboratorium och det är svårt att med säkerhet ange vilken parameter som påverkade utbytet mest. För norovirus GI, norovirus GII och adenovirus 41 hade vattentypen signifikant effekt på utbytet, medan vattentypen och laboratoriet hade signifikant effekt på utbytet för kontrollen mengovirus. Eftersom olika laboratorier utförde spikning och analys fram till och med produktion av cDNA är det svårt att säga vad som beror på vattentyp och vad som beror på laboratoriet. Laboratorierna hanterade nämligen olika vattentyper (kvaliteter). En svaghet i studien är att inga inhibitionsförsök utfördes.

Humanpatogena virus i svenska vattentäkter (NORVID)

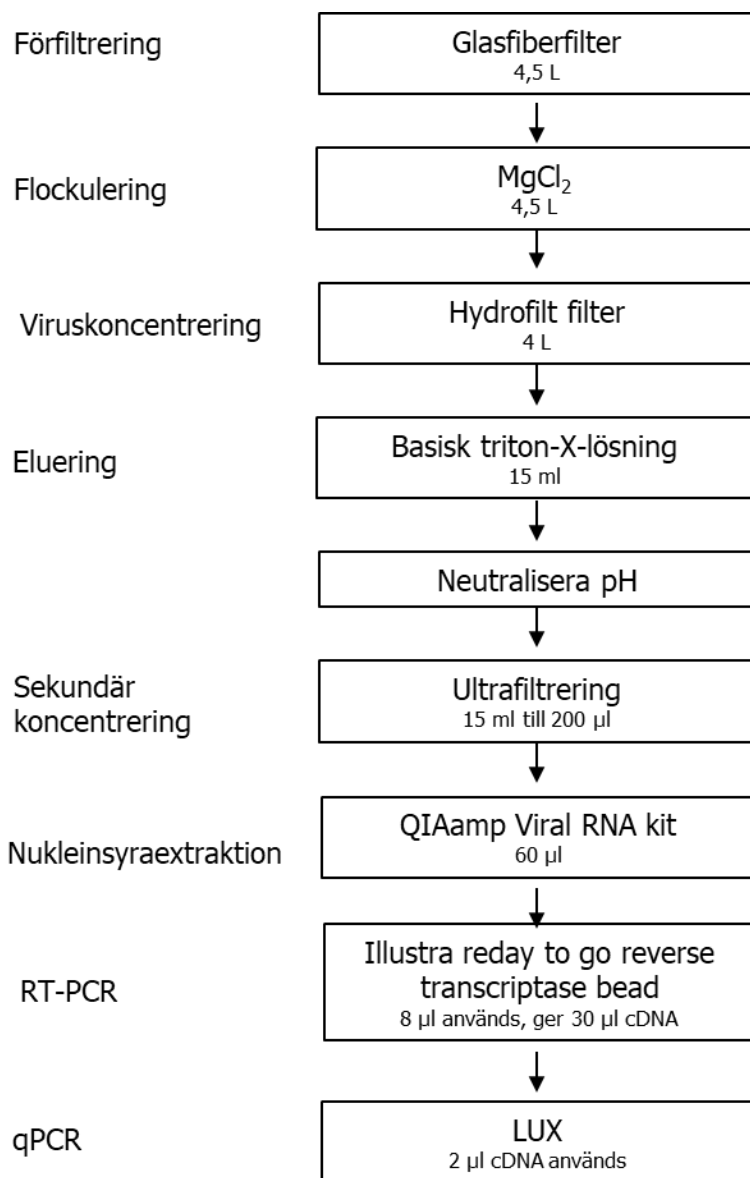
Humanpatogena virus i svenska vattentäkter (NORVID) är ett projekt som delfinansierades av Svenskt Vatten Utveckling där aktörer från Stockholm Vatten, Norrvatten, Göteborg stad- Kretslopp och Vatten, Linköpings universitet och Länsjukhuset Ryhov deltog. Projektet pågick 2009–2012 och var uppdelat i två faser. I fas 1 tog man fram metoder för analys av norovirus i ytvatten som finns presenterade i rapporten ”Analysmetod för norovirus i ytvatten”, SVU 2010-09 (7). Fas 2 där provtagningen genomfördes syftade till att utvärdera resultaten med hjälp av MRA, och finns presenterad i rapporten NORVID – Riskanalys med MRA och GDP baserad på långtidsundersökning av norovirusförekomst i svenska ytvattentäkter, SVU 2013-20 (20). Metoden i Fas 1 (7) justerades något ytterligare under fas 2, bland annat korrigerades metoden för att kunna hantera 4 liter vatten i stället för 1 liter. Metoden användes också för råvattenanalyser vid mindre volymer vatten från Göta älv och Väneren inom ett annat projekt - VISK, se nedan.

Metod

Metoden, se figur 2, utgår från att 4 liter vatten förfilterades genom ett glasfiberfilter, som därefter flockulerades med magnesiumklorid. Provet filtrerades

sedan genom filter av celluloesaester. För att ta bort magnesiumjoner tvättades filtret med svag svavelsyra. Filtret eluerades genom att recirkulera en tvättlösning bestående av basisk Triton-X-lösning, och lösningen neutraliserades genom tillsats av syra. Hela volymen koncentrerades med hjälp av en mikrokoncentrator och återstående volym extraherades och omvandlades till cDNA följt av en realtids-PCR. Vid utvärdering av metoden tillsattes norovirus som processkontroll.

Figur 2. Flödesschema för NORVID:s metod för analys av norovirus i råvatten (7, 20).



I projektet ingick också långtidsprovtagning av ytvattentäkter, och man analyserade totalt 104 vattenprover som samlades in augusti 2010–september 2011 från Ringsjön, Göta älv och två punkter i Mälaren med metoden ovan. Vid analys av ytvattenproverna användes murint norovirus som processkontroll för anrikningen för att kunna uppskatta utbytet av filtreringen. Murint norovirus sattes till ytvattenproverna och till kranvatten som analyserades parallellt. Kranvattnet

analyserades endast i PCR. Skillnaden i detektionsnivå mellan provet och kranvattenkontrollen blev ett mått på förlusten över filtreringssteget. Förlustkoefficienten användes dock inte till att räkna upp halterna i ursprungsproverna. Vid sådan korrigering hade halterna blivit mycket höga, samtidigt som det är oklart hur stor andel av viruspartiklarna som är viabla. Enligt forskarna avstod man från uppräknings eftersom det skulle kunna slå fel i efterföljande beräkningar av virushalten i ytvattnet, vilket i sin tur påverkar beräkningar av risken.

Resultat av metod

Under utvärderingen av metoden tillsattes humant norovirus som kontroll av utbytet, och utbytet av metoden var 7–13 procent för norovirus GI och 9–22 procent för GII. Utbytet vid långtidsprovtagningen är inte angivet då förlustkoefficienten från tillsatsen av murint norovirus inte redovisas.

Fynd i vatten

Undersökningen visar att norovirus förekom i samtliga undersökta vattentäkter. Uppmätta maxvärden var för GI 3 000 virusgenom/L råvatten och för GII var det 10 000 virusgenom/L råvatten. Båda dessa uppmättes i samma ytvatten. I dessa försök användes murint norovirus som processkontroll. Halten GII var signifikant högre än halten GI. Fynd av GI och GII gjordes framför allt under de kallare månaderna.

Negativa prover analyserades inte om med en spädning, vilket innebär att prover som anges som ”ej påvisat” kan ha varit hämmade i PCR-steget. Detektionsgränsen varierar också över tid, vilket innebär att halter som kunde påvisas en viss månad inte skulle ha detekterats månaden efter när detektionsnivån var lägre. För resultatet ”ej påvisat” har det numeriska värdet 0 använts i beräkningar, vilket kan vara missvisande då virus kan ha förekommit men under detektionsnivån i metoden.

QMRA och MBA inom NORVID

I projektet användes ett fiktivt ytvattenverk för att visa hur man kan använda MRA (numera QMRA) och GDP (numera MBA). Det ska motsvara ett ”typiskt ytvattenverk” (flockulering, sedimentering, snabbfiltrering, eventuellt följt av ytterligare avskiljande steg och desinfektion). Beräkningarna för QMRA och MBA visar att olika processkombinationer ger olika logreduktioner för norovirus, men slutsatsen för det fiktiva vattenverket visar att risken för spridning av norovirus till konsumenterna är låg under normala förhållanden om man har flera barriärer. Detta kan dock påverkas av olika händelser, till exempel bräddning av avlopp till en recipient som utgör en råvattentäkt eller nedsatt barriärfunktion. Detta vattenverk beräknas ha en process som kan hantera 2–10 000 detekterade norovirusgenom/L råvatten.

Virus i vatten, Skandinavisk kunskapsbank (VISK)

VISK (Virus i vatten, Skandinavisk kunskapsbank) var ett treårigt projekt inom ramen för EU-programmet Interreg IV A Öresund-Kattegatt-Skagerrak som pågick under perioden 2010–2013. Projektets syfte var att minska samhällets sårbarhet för vattenburen virusmitta i ett förändrat klimat genom att

- skapa kunskapsnätverk
- beskriva åtgärder för riskhantering
- ta fram bättre metoder för analys och avskiljning av virus i vatten
- sprida information om risk och säkerhet.

Projektet delades in i olika arbetspaket och det involverade 18 forskningsinstitutioner, myndigheter och kommuner i Sverige (bland annat Chalmers Tekniska Högskola, Göteborgs Stad, Livsmedelsverket, Länssjukhuset Ryhov, Statens Veterinärmedicinska Anstalt och Svenskt Vatten), Norge (Norges Veterinärhögskola och Norskt Vann) och Danmark (Danmarks Tekniska Universitet). VISK har också en egen hemsida där rapporter, publikationer och information om projektet finns samlade: www.visk.nu.

Inom VISK kartlades bland annat virusförekomsten i vattendragen Glomma i Norge och Göta älv i Sverige med avseende på halt och typ av virus, vilket användes som underlag i riskmodeller. Inom VISK undersökte man också hur bra olika barriärer i vattenverken är på att avlägsna sjukdomsframkallande virus.

Metoder

Inom arbetspaket 3 tog man fram metoder för detektion av norovirus i olika typer av vatten. Arbetet genomfördes främst av Livsmedelsverket, Länssjukhuset Ryhov och Norges Veterinärhögskola.

Inom projektet användes råvatten och avloppsvatten från Göta älv respektive Glomma och olika metoder användes av respektive deltagande laboratorium.

Resultaten från arbetspaket 3 har ännu inte publicerats i en egen rapport. Viss översiktlig information finns i SVU rapport 2016-03 ”Virus i vatten – skandinavisk kunskapsbank” (21), men eftersom den rapporten är en sammanfattning saknas information om metoddetaljer, utbyte m.m. Därför kan inga resultat återges från försöken i Göta älv. Detsamma gäller arbetet med att ta fram och optimera en metod för att analysera stora volymer dricksvatten. Livsmedelsverket har dock arbetat vidare med metoden för stora volymer vatten. Metoden och resultaten presenteras under kapitlet: Sammanställning av andra publicerade artiklar, Optimerad detektion genom pre-PCR modifieringar.

Råvatten Glomma

Information och resultat från försöken från Glomma finns tillgängliga i två vetenskapliga publikationer (10, 22). Under utvecklingen av metoder för att

analysera råvatten från Glomma testades fyra olika filter och tre olika buffertar, se tabell 3.

Tabell 3. Olika kombinationer av filter och elueringsbuffertar som testats vid analys av virus i råvatten från Glomma (22).

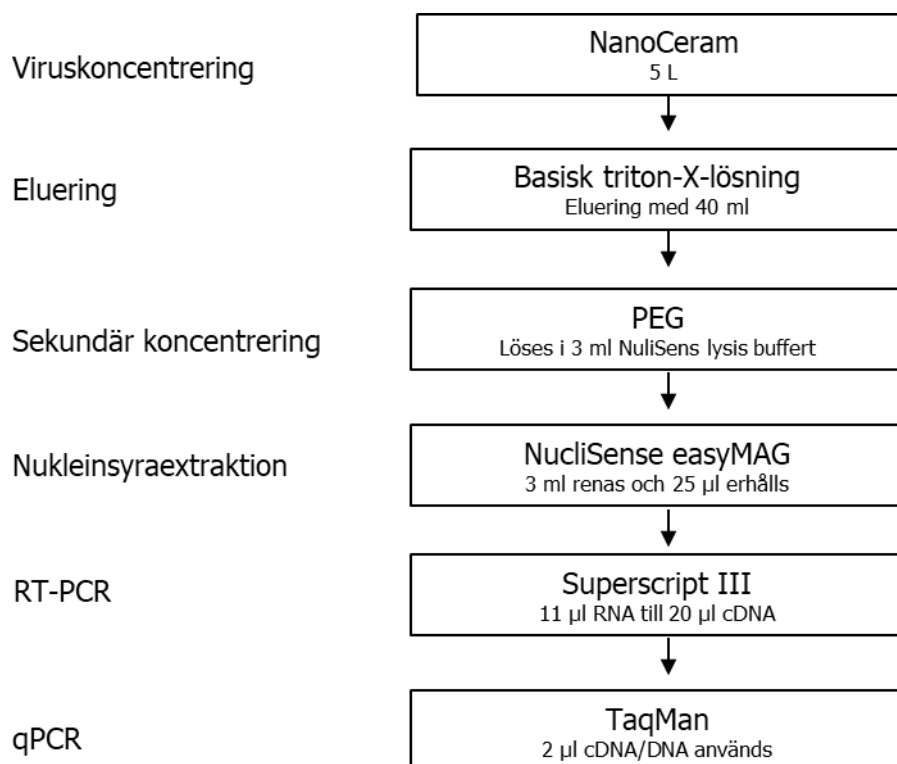
		Buffert		
		1: Kött-glycin	2: Basisk triton-X	3: NucliSense lysisbuffert
Filter	1: NanoCeram	X	X	
	2: Glasull i kolonn	X	X	
	3: Millipore	X	X	
	4: Zetapor			X

Vid testning av filter 1–3 ingick ett sekundärt koncentreringssteg med PEG. Under optimeringsförsöken spikades prover med mengovirus, adenovirus 40 och norovirus av okänd genogrupp. För varje metod använde man 1 respektive 10 liter vatten i triplikat, och värden för C_q (kvantifieringsvärde) från qPCR användes för att utvärdera metoderna.

Utbytet var bäst för NanoCeram och Millipore. NanoCeram upplevdes som enklare att arbeta med och användes för fortsatta försök. Ytterligare optimeringar genomfördes för NanoCeram genom att filtrera 1 liter, 5 liter och 10 liter vatten och jämföra C_q-värden från qPCR.

Metoden innebär att 5 liter råvatten som spikats med mengovirus filtrerades genom NanoCeram följt av eluering med basisk triton-X-buffert och sekundär koncentreringssteg med PEG. Hela precipitatet löstes upp i lysisbuffert. RNA och DNA extraherades med mini-MAG och cDNA skapas med Superscript III följt av TaqMan-PCR för detektion, se figur 3. För att undvika inhibition av PCR-reaktionen analyserades både ospädda och spädda prover, där spädning också innebar att hämmare späddes ut och därmed hade mindre påverkan på reaktionen. Positiva och negativa kontroller ingick i alla körningar. För att beräkna utbytet för hela metoden tillsattes 2 ml lysisbuffert till 1 ml ofiltrerat vatten som spikats med mengovirus. Detta RNA-extraherades sedan.

Figur 3. Flödeschema för metoden som användes för analys av norovirus i råvatten från Glomma i VISK (10, 22).



Resultat av metod

Resultaten från studien av Petterson m.fl. (10) visade att medelutbytet för processkontrollen mengovirus var 1,2 procent med stor spridning. Medelutbytet för andra virus var: adenovirus 0,31 procent, norovirus GI 0,15 procent och norovirus GII 0,053 procent, men spridningen för dessa tre var också mindre. Om resultatet justerades för metodens utbyte ökade den uppskattade virushalten med minst 1,8 \log_{10} för adenovirus, 3,5 \log_{10} för norovirus GI och 4,6 \log_{10} för norovirus GII. Författarna jämförde resultat från mengovirus och norovirus GI, norovirus GII och adenovirus från samma försök, och det framgick att det uppskattade utbytet skiljer sig åt om man räknat på mengovirus jämfört med resultat från humana virus. De uppvisade alltså dålig korrelation.

Fynd i vatten

Av 52 vattenprover från Glomma innehöll ungefär 60 procent norovirus GI, med uppmätt medianhalt 94 genomkopior/L, och ungefär 45 procent innehöll norovirus GII med uppmätt medianhalt 456 genomkopior/L (22). Inhibition påvisades i 35 procent av ytvattenproverna.

Barriärverkan inom VISK

I VISK-handboken finns en sammanfattning av olika barriärers effekt på bakterier, virus och parasiter. Virus är den mikroorganism som i många fall avskiljs sämst, förutom vid användning av klor och ozon. Rapporten i sin helhet finns att läsa [här](#) (23).

Inom arbetspaket 4 (24) studerades avskiljning och inaktivering av virus i vattenverk med hjälp av ultrafiltrering, kolfilter, klor, snabbfilter och kemisk fällning. Försök har utförts dels på laboratorier och dels genom pilotstudier på anläggningar. Reduktionerna som anges baseras på resultat från ibland enstaka försök, eller resultat från olika anläggningar med olika förutsättningar och involverar analys av kolifager eller viruslika partiklar (VLP), eller tillsatser av virus i vattnet för att kunna utföra försöken. I de flesta fall anser forskarna inom arbetspaket 4 att resultaten överensstämmer med litteraturen och egna erfarenheter, förutom för kemisk fällning där resultaten är sämre än vad som tidigare antagits. Man förslår en justering av logkrediterna för kemisk fällning inom MBA. Resultaten för olika barriärer visas i tabell 4. För att få mer kunskap om halter och förekomst av virus rekommenderar författarna av arbetspaket 4 studier för att analysera virus i både råvattnet och utgående vatten från avloppsreningsverk. Renat vatten innehåller ofta låga halter virus och metoderna som används varierar i utbyte, vilket gör det svårt att fastställa reduktionen av virus över barriärer. Därför rekommenderas inte analys av virus i renat vatten då resultaten är behäftade med osäkerhet och kan ge falsk trygghet. Forskarna inom arbetspaket 4 (24) föreslår att varje producent undersöker hur väl reningen fungerar i olika steg under varierande förhållanden, eller introducerar extra barriärer.

Tabell 4. Reduktionen från försök på laboratorier och pilotanläggning inom VISK arbetspaket 4. Resultaten baseras på enstaka försök eller försök från olika anläggningar med olika förutsättningar. Modifierad från (24).

Barriär	Logreduktion (%)
Filtrering genom 40 m sand (omättad zon varierade från 1 till 5 m för 3 olika grundvattenplatser)	4 (99,99 %)
Kemisk fällning och filtrering	1–3 (90–99,9 %)
Kolfilter	0–1 (0–90 %)
Ultrafiltrering	2–4 (99–99,99 %)
Klor	0,5–6 (68–99,9999 %)

Virus eller fager som tillsats till vattnet för att mäta barriäreffekten behöver inte bete sig som naturligt förekommande virus när det gäller till exempel aggregering. Aggregerade virus avskiljs lättare genom till exempel koagulering, sedimentering, och filtrering, medan inaktivering (desinfektion) kan ha sämre effekt då viruset skyddas av aggregatet. Effekten av kemisk fällning är beroende av virusets laddning och kommer därför variera med viruset. Ingen metod har visat sig kunna täcka alla funktioner, men forskarna inom arbetspaket 4 föreslår att man använder

partikelräknare, VLP eller online-turbiditetsmätningar för att kontrollera effekten vid kemisk fällning och ultrafiltrering. För att kontrollera effekten vid inaktivering med klor föreslås användning av CT (kontakttid) och eventuellt analys av levande celler (infärgning som anger om cellen har intakt cellvägg eller inte).

QMRA inom VISK

I dagsläget (oktober 2017) finns endast en preliminär version av arbetspaket 5 tillgänglig på VISK:s hemsida och denna har använts som informationskälla. Inom arbetspaket 5 (25) har man använt QMRA för att räkna på reduktionsförmåga i två olika vattenverk: Överby som ligger i anslutning till Göta älv i Sverige, och Nedre Romerike Vattenverk som ligger i anslutning till Glomma i Norge. För att räkna på reduktionen har man utgått från tre olika informationskällor:

- 1) Uppmätta värden från prover tagna i råvattnet. Forskarna inom arbetspaket 5 anser att dessa data är osäkra då norovirus endast detekterades i ett fåtal prover. Dessutom har man inte kunnat ta hänsyn till den analyserade volymen eller utbytet i metoden.
- 2) Uppmätta halter av fekala indikatorn E. coli. Arbetspaket 5 har använt modellering för scenarion där E. coli antas härstamma från antingen obehandlat avloppsvatten eller behandlat avloppsvatten. Enligt slutsatserna från arbetspaket 5 är två svagheter med att använda E. coli att källan inte behöver vara avloppsvatten och att E. coli och norovirus inte har samma överlevnad, vilket antas i modellen.
- 3) Hydrodynamisk modellering för att testa olika scenarion av tillflöde av norovirus genom varianter av tillförsel från reningsverk uppströms.

För Överby har forskarna inom arbetspaket 5 använt samtliga tre angreppssätt för att räkna på möjlig virusförorening, medan man för Nedre Romerike Vattenverk har använt sig av nummer 1–2.

För Överby vattenverk gav de uppmätta halterna av norovirus (inte korrigerade för processförluster) lägst antagen halt av norovirus i vattnet och också minst behov av reduktion i vattenverket. Högst antagna halt sågs när man utgick från E. coli-värden. Beräkningarna visar att logreduktionen av norovirus i vattnet i hög grad beror på kontakttiden och koncentrationen av fritt klor i vattenverkets rening, och att den förutsätter god cirkulation av hela vattenmassan som renas så att inga fraktioner passerar relativt opåverkade av klor. Som alltid är det svårt att isolera en del av reningsprocessen eftersom effekten av klor är beroende av att tidigare steg i reningen fungerat. Hydrodynamisk modellering vid Göta älv visar att tillförsel av norovirus från uppströms avloppsreningsverk (Vänersborgs avloppsreningsverk) var den viktigaste källan till norovirus vid Överbys råvattenintag. Att minska mängden norovirus som släpps ut från avloppsreningsverket skulle få stor effekt på sjukdomsrisker. Likaså är information om uppströmshändelser och kunskap om transporttider viktiga för att kunna anpassa intaget och den efterföljande behandlingen i vattenverket.

Vid beräkning av halten norovirus i Glomma korrigerades för förluster i utbyte, vilket gav värden som är högre än vad som tidigare rapporteras i litteraturen. Förlusterna räknades ut genom att tillsätta ett kontrollvirus, mengovirus. Utbytet var i medeltal 2,4 procent men det varierade stort mellan prover, 0,0001–10 procent. I snitt erhöles 10 gånger fler viruspartiklar efter korrigering för utbytet i metoden, men för den övre 95:e percentilen skrevs halten upp närmare 10 000 gånger. Medianhalten låg på ca 1 000 genomkopior/L medan den i den övre 95:e percentilen kunde överstiga 1 000 000 genomkopior/L. Alltså behöver dricksvattenproducenter god kännedom om sin metods utbyte och veta inom vilket intervall koncentrationsutbytet gäller för att kunna räkna ut förväntad halt norovirus i provet. Till detta kommer att molekylärbiologiska metoder inte tar hänsyn till om viruspartikeln är viabel och kan infektera människa eller inte. För Glomma stämde den beräknade halten norovirus utifrån indikatororganismerna *E. coli* och *Clostridium perfringens* väl överens med de uppmätta virushalterna.

Generellt sett har både Överby (koagulering, flockulering, sedimentering; snabbfilter; långsamfilter; och klordesinfektion) och Nedre Romerike Vattenverk (koagulering, flockulering; snabbfilter; aktivt kol; UV-desinfektion; och klordesinfektion) god avskiljningsförmåga under normala förhållanden. Däremot påverkades reningen av fluktuationer i olika parametrar. QMRA-beräkningar från Nedre Romerike Vattenverk visade att kortare störningar såsom backspolning gjorde att risken för infektion av norovirus blev tio gånger högre per dygn, medan feldosering av koagulant hade större effekt och ökade risken med en faktor på 100–200. Klor är en viktig barriär för båda vattenverken och kontakttiden är av stor betydelse.

Impact of climate change on the transport, fate and risk management of viral pathogens in water (VIROCLIME)

Projektet VIROCLIME pågick januari 2010–mars 2012 och finansierades av EU:s sjunde ramprogram (FP7) för forskning. Syftet med projektet var att undersöka hur klimatförändringar påverkar virusförekomsten och därmed vattenkvaliteten vid fyra olika platser med ytvatten i Europa och Amazonas genom olika hydrologiska modeller. Projektet använde så kallad källspårning där man undersöker om det går att ange en förorenings ursprung, till exempel människa, fågel eller nötkreatur. Platserna var utvalda baserat på modeller om var klimatförändringarna kommer resultera i ökad nederbörd.

VIROCLIME innehöll deltagare från flera länder och huvudsyftet var inte att ta fram nya metoder även om metodoptimering och försök genomfördes. Eftersom denna rapport fokuserar på Norden har författaren valt att ta med de försök och resultat som finns tillgängliga från Umeälven i Sverige.

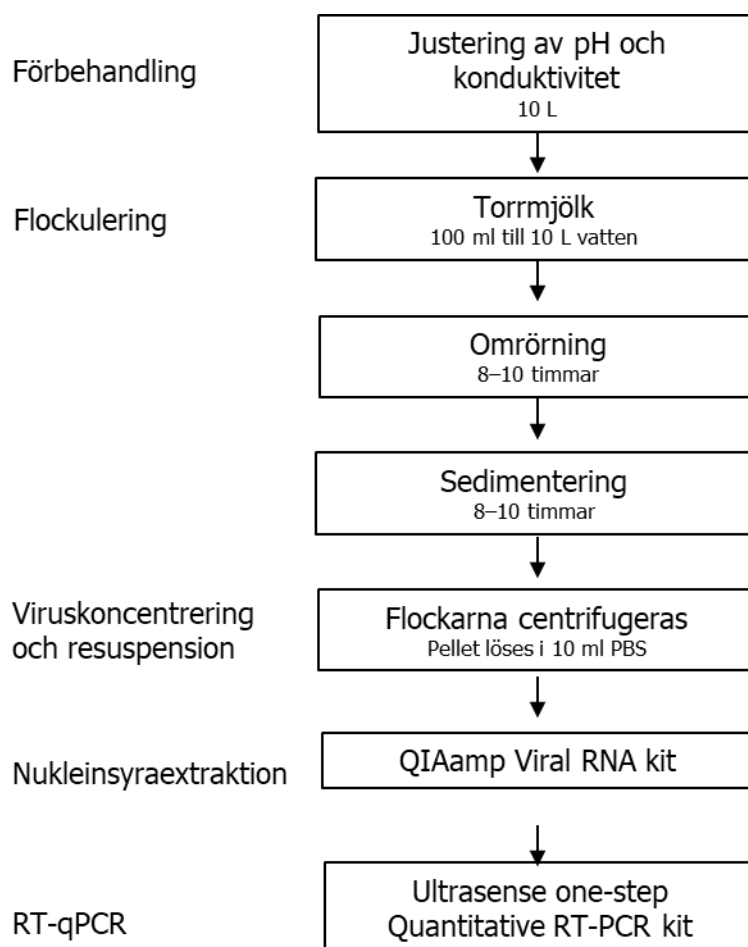
Metod

Ett första steg i projektet var att välja och optimera en metod. Valet föll på flockulering med mjölkpulver enligt Calgua m.fl. (26), en metod som används för

både sötvatten, marint vatten och avloppsvatten. Projektet tog också fram egna metoder för själva koncentrationen med flockulering. Metoderna för sötvatten och marint vatten är snarlika. Provet justerades till pH 3,5 och om konduktiviteten var för låg tillsattes artificiellt havsvatten. Provet flockades i 8–10 timmar under omrörning följt av sedimentering i 8–10 timmar. Sedimentet centrifugerades och pelleten löstes upp i PBS, följt av extraktion med QIAamp viral RNA kit och real-tids-PCR med Ultrasense One-step Quantitative RT-PCR kit, se figur 4. Ett annat kit testades först, QuantiTect RT-PCR för real-time mix, men bytet till RNA Ultrasense One-step Quantitative RT-PCR kit ökade känsligheten för alla RNA-virus utom enterovirus (27).

Adenovirus 35 användes som processkontroll. För att prova ut metoden spikades vatten med enterovirus 35, polyomavirus JC, enterovirus echovirus 7, norovirus GII och influensavirus (27).

Figur 4. Flödesschema för metoden för detektion av norovirus, utarbetad vid Viroclime i Umeå (26, 27).



Resultat av metoderna

Tillsats av 1 procent w/v (vikt/volym) saltvatten ökade känsligheten i metoden med 1–2 cykler på Ct-värdet, medan ytterligare tillsats av saltvatten inte hade någon effekt på sensitiviteten (27). Resultat från Umeå visar att medelutbytet varierade mellan olika virus: 49 procent för adenovirus, 92 procent för polyomavirus JC, 22 procent för enterovirus, 8 procent för norovirus GII och 13 procent för influensavirus A. Resultaten för enterovirus och norovirus GII är baserade på resultaten före bytet till RNA Ultrasense One-step Quantitative RT-PCR-kittet, vilket alltså förbättrade resultaten.

DNA-virusen (adenovirus och polyomavirus) påverkades inte av hämning från matrisen. Det gjorde däremot RNA-virusen (enterovirus, norovirus GII och influensavirus A), vilket antagligen beror på att hämningen sker i omvänt transkriptas-steget.

Fynd i vatten

Sapovirus och enterovirus påvisades inte i några ytvattenprov. Norovirus GI eller GII påvisades i 6 procent av proverna från Umeälven.

Stärkt beredskapskapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad provberedning, pre-PCR processing

Under 2014–2016 genomfördes det MSB-finansierade projektet ”Stärkt beredskapskapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad provberedning, pre-PCR processing” där huvudsökande var Rikspolisstyrelsen via Statens kriminaltekniska laboratorium. Projektet syftade till att bygga en samverkansplattform för effektivare DNA- och RNA-baserad analys och därigenom stärka beredskapskapaciteten avseende mikroorganismer och forensiska spår i ett sektorsövergripande perspektiv. Projektet genomfördes i samarbete med Lunds Tekniska Högskola, Livsmedelsverket, FOI och SVA med fokus på att förbättra detektionsgränsen och öka provflödet av olika typer av DNA- och RNA-prover. Livsmedelsverket vidareutvecklade sin metod för detektion av norovirus i råvatten inom projektet, och metoden bygger på analys av stora volymer vatten genom ett ultrafilter följt av optimerad förbehandling före PCR-reaktion (28). Del av projektet arbete finns också redovisat i Borgmästars m.fl. (2017) (29).

Ökad förmåga till detektion av virus i livsmedel och humanprover för förbättrad smittspårning

Projektet Ökad förmåga till detektion av virus i livsmedel och humanprover för förbättrad smittspårning finansieras av MSB:s 2:4-anslag och löper under 2015–2017 med förlängning under 2018 (30). Det är ett samarbete mellan

Livsmedelsverket, Folkhälsomyndigheten, Sahlgrenska sjukhuset och Länssjukhuset Ryhov. Projektets mål är att ta fram molekylärbiologiska detektions- och/eller typningsmetoder för norovirus GI, GII och GVI; sapovirus GI, GII, GIV och GV; rotavirus A, B och C; astrovirus; adenovirus F40, F41 och G52; humant enterovirus; hepatit A; hepatit E; aichivirus; och fästingburen encefalit-virus (TBEV).

Syftet med projektet är att ta fram metoder för att förbättra smittspårningen i livsmedels- och dricksvatten när det gäller utbrott med virus. Metoderna ska möjliggöra effektiv extraktion av virus från olika matriser såsom dricksvatten, bladgrönsaker och olika feta livsmedel. Man designar och testar olika PCR-metoder, både konventionell PCR och qPCR, som fungerar på prover från både människa och livsmedel. Metoder ska även testas ut för virus som normalt inte analyseras för på kliniska mikrobiologiska laboratorier, såsom norovirus GIV, för att kunna undersöka om de ger upphov till utbrott. (M Simonsson, Livsmedelsverket, personlig kommunikation mars 2015).

Identifiering av kända och nya virus i vatten och deras spridning i befolkningen

Forskningsrådet Formas har beviljat projektet ”Identifiering av kända och nya virus i vatten och deras spridning i befolkningen” vid Göteborgs universitet finansiering under 2016–2018. I studien kommer förekomsten av nio olika humanpatogena tarmvirus undersökas i vatten före och efter behandling. Klimatfaktorer och deras påverkan på rening och viruspopulationer ska studeras genom att samla in vatten regelbundet under två år. Fynd av virusstammar i avloppsvatten kommer att jämföras med stammar som har isolerats från patienter från samma region och tidsintervall. Mängden virus i vattnet kommer att relateras till uppskattat antal personer som utsöndrar viruset, till antalet personer som är smittade och sökt sjukvård, och till antalet telefonsamtal om gastrointestinala sjukdomar till 1177 Vårdguiden. Från avloppsvatten koncentreras virus genom flockulering med mjölkpulver och från råvatten med hjälp av ett elektropositivt filter. De vanligaste virustyperna kommer att identifieras med PCR och sekvensering. Djupsekvensering och nya djupanalysstrategier kommer användas för att bestämma hittills okända virus. Patientprover kommer också undersökas för dessa tidigare okända virus. För mer information se Formas [hemsida](#) (31).

Snabbare och effektivare analysmetoder för förbättrad risk och kvalitetshantering i livsmedelskedjan

Vinnova finansierar projektet ”Snabbare och effektivare analysmetoder för förbättrad risk och kvalitetshantering i livsmedelskedjan” under 2015–2018. Syftet med projektet är att möjliggöra bättre detektion och kvantifiering av mikrober i livsmedel och förhindra spridning av smittan genom snabba och tillförlitliga rutinanalysmetoder. De analysmetoder som utvecklas i projektet är inriktade mot, men inte begränsade till, PCR-baserad metodik. Huvudsökande är SP Sveriges Tekniska

Forskningsinstitut och medsökande är bland annat Göteborgs universitet, Livsmedelsverket, Lunds universitet, Norrvatten, Statens Veterinärmedicinska Anstalt och Stockholm Vatten. (J. Håkansson, SP Sveriges Tekniska Forskningsinstitut, personlig kommunikation mars 2016, samt Vinnovas [hemsida](#) (32)).

Verifiera desinfektionseffekten med naturligt förekommande mikroorganismer

Vid Lackarebäckens vattenverk har man i en studie försökt använda kolifager som en processindikator i stället för humana virus, för att komma runt svårigheterna med att detektera humanpatogena virus i vatten. Analys av kolifager för processkontroll är enklare än direkt detektion av virus men nackdelen är att metoden mer liknar en indikatoranalys och inte visar direkt effekt av barriärer på humanpatogena virus. Genom att isolera klortåliga fager ur avloppsvatten och använda dem i desinfektionsförsök försökte man i studien utveckla en välfungerande processkontroll, och resultaten finns publicerade i SVU-rapport 2014-24 (33). Försöken var ett första steg för att bättre förstå klorinaktivering av virus. Studien resulterade i identifieringen av 1–3 fager som är klortåliga och kan odlas med standardmetoder för somatiska kolifager. Fagerna kan propageras upp till tillräckligt hög halt för att detektera inaktivering över 8 log. Försöken visade också att det fanns skillnader mellan den uträknade logreduktionen från MBA och den uppmätta logreduktionen. Reduktionen av levande celler motsvarade virusreduktionen enligt Cq-beräkningar.

Sammanställning av andra publicerade artiklar

Utöver ovanstående projekt finns också flera relevanta vetenskapliga artiklar och rapporter från enskilda forskargrupper. Nedan presenteras ett urval som berör norovirusmetodik och/eller nordiska förhållanden. Tabell 5 listar inkluderade artiklar samt aktuell referens. För ytterligare detaljer hänvisas till bilaga 2 och respektive referens.

Tabell 5. Artiklar med aktuell referens som ingår i sammanställningen av publicerade artiklar.

Inkluderade artiklar	Referens nr
Presence of human noro- and adenoviruses in river and treated wastewater, a longitudinal study and method comparison	34
Collaborative validation of a rapid method for efficient virus concentration in bottled water	19
Improved detection of norovirus and hepatitis A virus in surface water by applying pre-PCR processing	29
Internationell standardmetod för bestämning av hepatit A virus och norovirus i livsmedel med realtids RT-PCR	ISO/TS 15216-1:2013 SS-EN ISO 15216-1 2017

Förekomst av norovirus och adenovirus i floden Vantaa, en ettårsstudie och en metodjämförelse, Maunula m.fl. 2012

I Finland har Maunula m.fl. (2012) genomfört en ettårig studie för att undersöka förekomsten av norovirus i floden Vantaa samt jämfört tre olika metoder på vatten som samlats in vid olika tidpunkter och på olika platser (34).

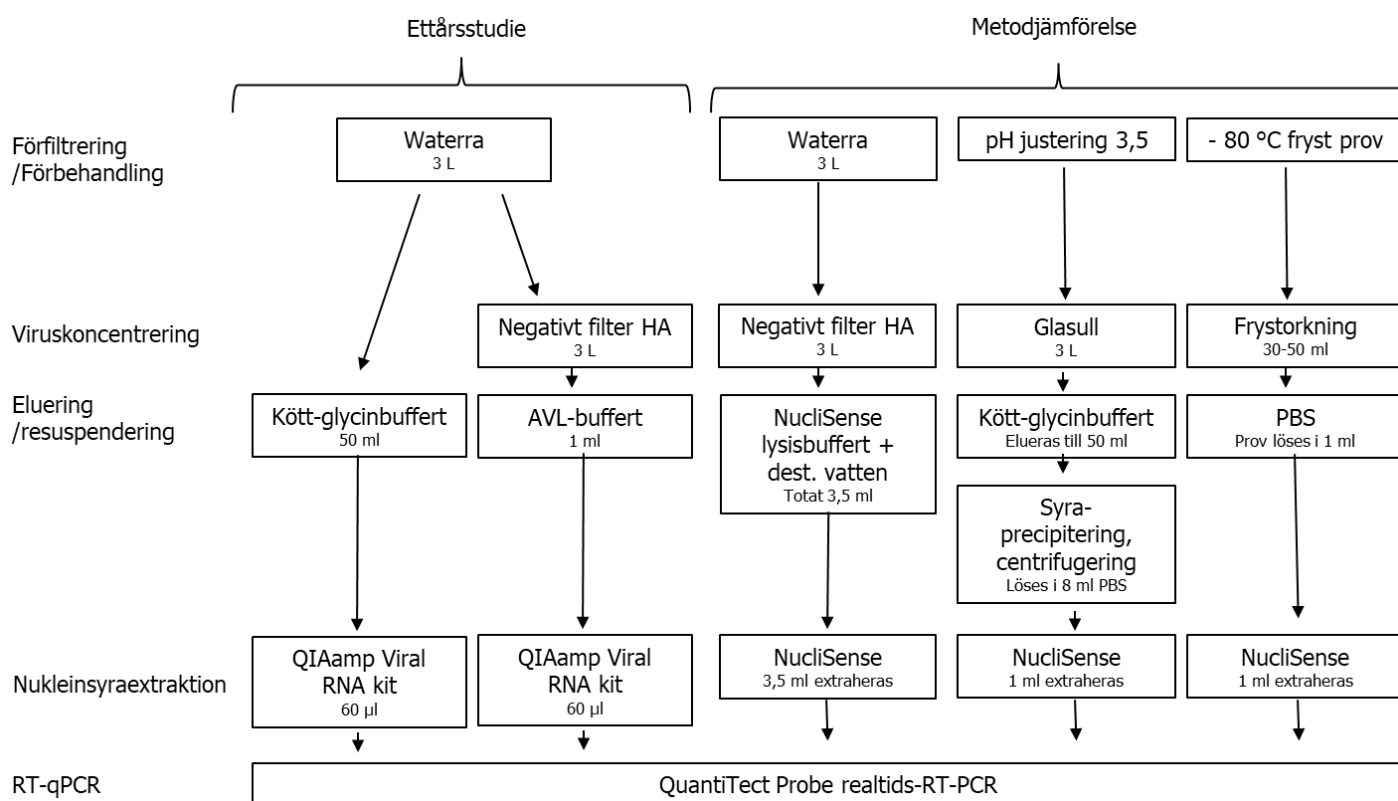
Metod

Förekomsten av virus i floden Vantaa undersöktes under mars 2007–februari 2008. Prover togs då en gång per månad vid 5 olika provtagningsplatser. Vid dessa provtagningar filtrerades 3 liter vatten. Om vattnet såg ut att innehålla mycket partiklar förfiltrerades provet genom Waterrafilter och därefter genom negativt laddade HA-membran. HA-membranen eluerades med AVL-buffert under skak. För att få med eventuella virus som fastnat i Waterrafiltret eluerades detta med kött-glycinbuffert. Elueringarna extraherades sedan separat. Extrahering genomfördes med QIAamp Viral RNA kit. Endast norovirus analyserades med en one-step realtids-RT-PCT med QuantiTect Probe RT-PCR, se figur 5. PCR kördes alltid på ospädda prover och på prover som späts till 1:10.

Vid metodjämförelsestudien som utfördes 2009 togs prover en gång i månaden under 3 månader (februari, mars och maj) från 4 olika provtagningsplatser. Tre olika metoder jämfördes:

- A) 3 liter vatten förfiltrerades genom Waterra och därefter genom negativt laddade HA-membran. Membranet eluerades med lysisbuffert under skak och därefter tvättades membranet med destillerat vatten. Lysisbuffert och destillerat vatten poolades och användes till RNA-extraktion med NucliSens följt av RT-PCR.
- B) 3 liter vatten som justerades till pH 3,5 filtrerades genom glasfiberull. Filter eluerades med kött-glycinbuffert och därefter sänktes pH till 3,5 igen. Proven centrifugerades och pelleten löstes upp i PBS och nukleinsyra extraherades med NucliSens.
- C) 30–50 ml vatten som frysts vid -80 °C utsattes för frystorkning under 2 dagar. Materialet löstes upp i PBS och användes till nukleinsyraextraktion med NucliSens.

Figur 5. Flödesschema för metod för analys av norovirus från råvatten från floden Vantaa. Modifierad från (34).



Extraktion genomfördes med NucliSens magnetic extraction kit för samtliga metoder. För norovirus användes en one-step realtids-RT-PCR med QuantiTect Probe RT-PCR, och PCR kördes alltid på ospädda prover och på prover som späts till 1:10. För både metodjämförelsen och ettårsstudien användes ett patientprov med hög titer för norovirus GII.4 för att skapa en standardkurva. PCR-enheter användes för beräkningar då exakt antal genomkopior var okänt för kontrollprovet. Detektionsgränsen för både norovirus och adenovirus var 1 enhet per 5 µl extraherad volym i en PCR-reaktion.

Resultat för metoderna

Vid metodjämförelsestudien detekterades inte norovirus under tremånadersperioden i något prov med någon metod. Adenovirus påvisades i 11 av 12 prover totalt med alla metoder. Med glasullsmetoden påvisades adenovirus i 9 av 11 prover, med förfiltrering och HA-filter påvisades adenovirus i 8 av 12 prover, och med frystorkning påvisades adenovirus i 4 av 12 prover. Medelkoncentrationen av adenovirus under mars för glasullsmetoden var $1,17 \times 10^5$ PCR-enheter/L, och för förfiltrering och HA-filter var den $5,39 \times 10^2$ PCR-enheter. PCR-hämning undersöktes genom att späda proverna men påvisades inte.

Fynd i vatten

I ettårsstudien påvisades norovirus framför allt under vintermånaderna (december–april). Norovirus GII påvisades signifikant oftare än norovirus GI. Över året påvisades norovirus 3–5 gånger per år och provplats. Totalt påvisades norovirus i 20 av 65 prover över året, vilket motsvarar ungefär 30 procent av proverna. Eftersom Cq-värdena låg nära detektionsgränsen och det är lågt utbyte i metoderna har författarna inte räknat ut kvantitativa värden för virus i flodvatten.

Jämförelse av fyra metoder för detektion av norovirus i flaskvatten, Schultz m.fl. 2011.

I en europeisk studie har Schultz m.fl. jämfört fyra olika metoder (A–D) för detektion av norovirus i flaskvatten (19). Denna studie låg till grund för försök som senare utfördes av Uhrbrand m.fl. (18) och som redogörs för under FOOD-VIRUS ovan.

Metod

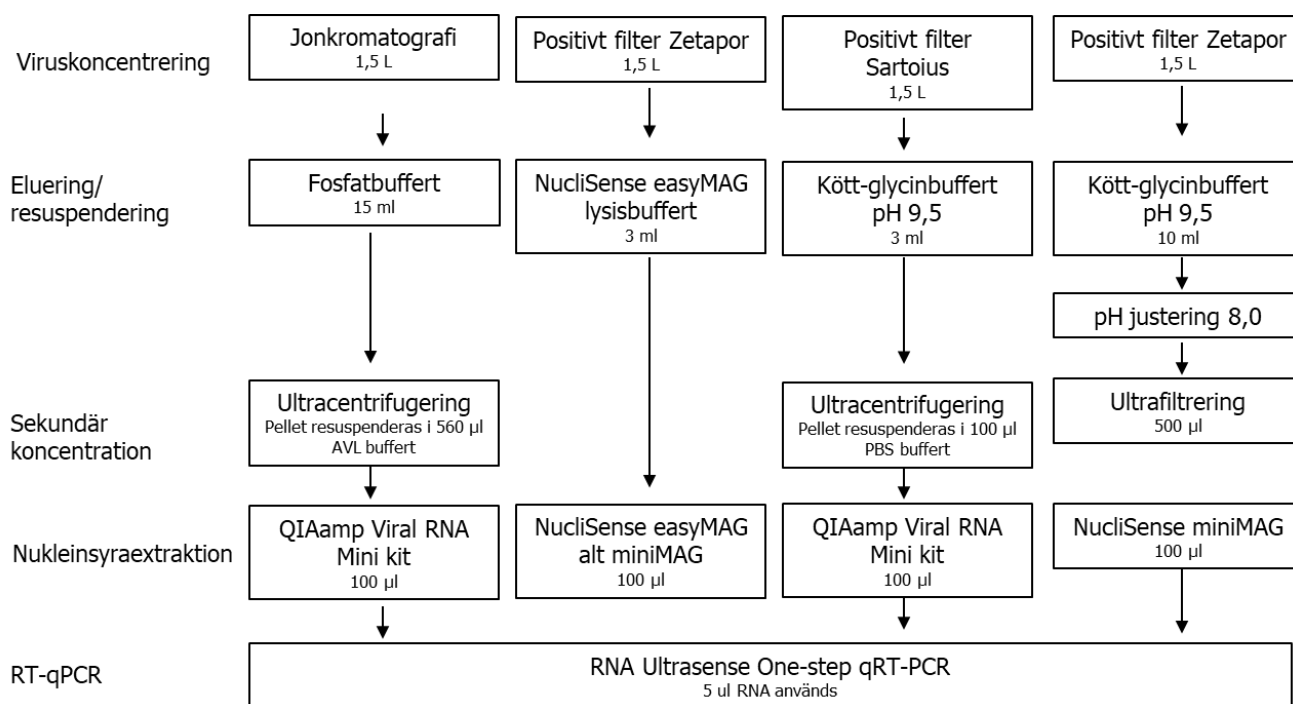
Fyra metoder jämfördes och utvärderades genom att proverna spikades med felint calicivirus och hepatit A-virus. Tre laboratorier deltog; alla prover analyserades i triplikat och PCR analyserades i duplikat. Varje laboratorium utförde bara en metod i jämförelse med D (alltså A + D, B + D och C + D). Se figur 6 för schematisk bild. Här följer en kort beskrivning av de olika metoderna:

- A) Prov pumpades igenom anjonkromatografisystem och virus eluerades med fosfatbuffer. Eluatet koncentrerades ytterligare med hjälp av ultracentrifugering, och pelleten resuspenderades i AVL-buffer följt av RNA-isolering.
- B) Prov filtrerades genom positivt laddat Zetaporfilter. De inkuberades med NucliSens easyMAG lysisbuffert och eluerades med NucliSens easyMAG.
- C) Prov filtrerades genom elektropositivt filter. Filtret inkuberades med köttglycinbuffert under skak följt av ultracentrifugering. Pelleten resuspenderades i PBS och RNA extraherades med QIAamp viral RNA mini kit.

- D) Prov filtrerades genom positivt laddat Zetaporfilter. Filtret inkuberades med kött-glycin buffert. pH justerades till 8,0 och vätskan koncentrerades med en microconcentrator. RNA extraherades med NucliSens MiniMAG. Metoden bygger på Gilgen m.fl. 1997 (35) och anges som referensmetod i artikeln som man jämför metod A, B och C mot.

RNA från felint calicivirus och hepatit A-virus detekterades med two-step TaqMan RT-PCR. RNA från norovirus GI och GII detekterades med one-step TaqMan RT-PCR och RNA Ultrasense One-step qRT-PCR system.

Figur 6. Flödesschema för metoden för flaskvatten som publicerats av Schultz m.fl. 2011 (19). En variant av metoden med NucliSense användes också av Uhrbrand 2012 (18).



Resultat för metoderna

Genomgången visade att metod B hade signifikant lägre Cq-värde för både felint calicivirus och hepatit A-virus jämfört med referensmetoden D än metoderna A och C. Man gick då vidare med metod B och utvärderade den genom att låta fem olika laboratorier utföra analyser med alla eller några av följande virus: felint calicivirus, hepatit A-virus, norovirus GI och norovirus GII.

För metod B varierade utbytet för felint calicivirus för de fem laboratorierna: mellan 1 procent \pm 1 och 72 procent \pm 28 med ett medelutbyte på 34 procent \pm 32. Utbytet för hepatit A-virus var mellan 8 procent \pm 6 och 70 procent \pm 35 med medelutbytet 51 procent \pm 26. Utbytet för norovirus GI för de två laboratorierna som utförde analysen var 61 procent \pm 8 respektive 61 procent \pm 13 med ett medelutbyte på 61 procent \pm 0. Utbytet för norovirus GII för de tre laboratorierna som utförde analysen var mellan 17 procent \pm 29 och 64 procent \pm 25 med ett medelutbyte på 35 procent \pm 25.

Optimerad detektion genom pre-PCR processing, Borgmästars m.fl. 2017

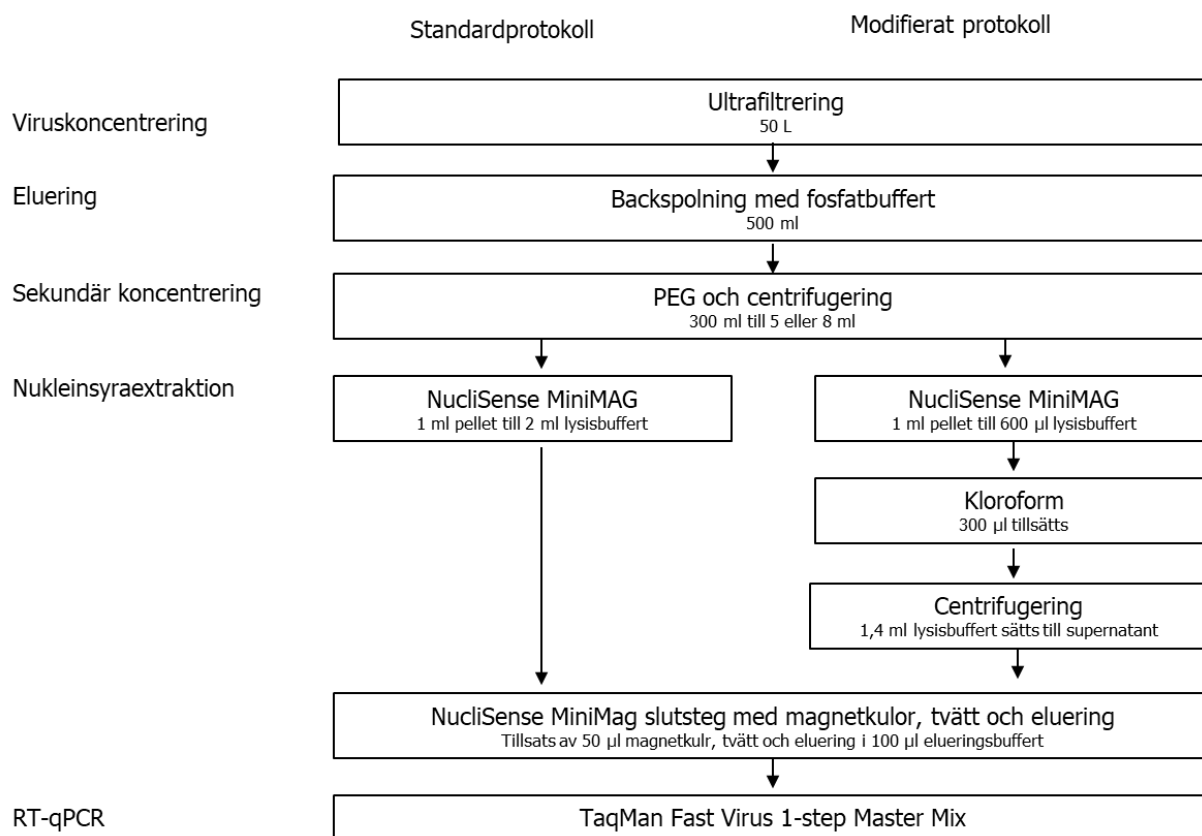
Borgmästars m.fl (2017) (29) har undersökt möjligheten att minska matrisens hämmande effekt på PCR-steget genom att modifiera stegen innan PCR-reaktionen, så kallat pre-PCR processing. Studien eftersökte en qPCR-master mix som inte påverkades av inhibitorer, och försökte även minska mängden inhibitorer som följer med i koncentrationssteget samt att modifiera primrarna. Tre olika vatten jämfördes; dricksvatten, Almungevatten och Görvälnvatten. Almungevatten anger författarna som ett högkomplext vatten som kan innehålla många inhiberande substanser, medan Görvälnvatten anges som ett mellankomplext vatten och kranvatten som ett lågkomplext vatten. Denna indelning baserar sig på bland annat färgtal, turbiditet, kemisk syreförbrukning (COD_{Mn}), totalorganiskt kol (TOC), och löst organiskt kol (DOC).

Metod

Metoden börjar med ultrafiltrering av 50 liter vatten följt av eluering med PBS. Del av eluatet precipiterades med PEG, centrifugerades och pelleten resuspenderades i PBS. Därefter genomfördes nukleinsyraextraktion och standardprotokollet för NucliSense miniMAG (A) jämfördes med ett modifierat protokoll (B), se även figur 7.

- A. 1 ml elutat blandades med 2 ml lysisbuffert, inkuberades och därefter tillsattes 50 μ l magnetkolor, och ordinarie protokollet följdes.
- B. 1 ml elut blandades med 600 μ l lysisbuffert, inkuberades med skak, 300 μ l kloroform tillsattes och provet skakades kraftigt, inkuberades igen innan centrifugering. Elutet blandades med 1,4 ml lysisbuffert och inkuberades och därefter tillsattes 50 μ l magnetkolor och ordinarie protokollet följdes.

Figur 7. Flödesschema för påvisning av norovirus inklusive skillnad mellan standarprotokoll och modifierat protokoll för nukleinsyraextraktion som tagits fram för högkomplexa vatten (29).



Ultrafiltreringssteget genomfördes i triplikat med två olika koncentrationer av norovirus G, norovirus GII och hepatit A-virus. Mengovirus tillsattes till alla proven som en intern processkontroll, och ett ospikat vattenprov fungerade som negativ kontroll vid alla försök.

Efter extraktionen påbörjades PCR-steget som utvärderades genom att jämföra fyra olika RT-qPCR kit: TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix, SensiFast Probe No-ROX One-Step kit, One-Step PrimeScript RT-PCR Kit, och qScript XLT one-step RT-qPCR ToughMix. De olika kiten utvärderades genom att analysera extraherat norovirus GII i spädningsserier och jämföra bland annat LOD och utbytet i PCR. De två kit som uppvisade bäst resultat undersöktes vidare genom att testa hur väl de detekterade norovirus GII spikat i olika volymer högkomplex vatten. Proverna analyserades ospätt och spädda i duplikat.

Författarna modifierade också primrarna så att de skulle klara högre annealingtemperatur.

Resultat för metoderna

Det modifierade protokollet för nukleinsyraextraktion fungerade bättre än standardprotokollet för det mest komplexa vattnet, Almungevatten. Hämmning

påvisades i PCR-reaktionen med standarprotokollet men inte i det modifierade protokollet. Värt att notera är att 1:10 spädning av eluatet från standarprotokollet också minskade den hämmande effekten till samma nivå som för det modifierade protokollet. Ingen signifikant skillnad mellan de två protokollen för nukleinsyraextraktion detekterades för kranvatten eller Görvälnvatten.

Utbytet blev signifikant bättre med modifierade protokollet än standardprotokollet för mengovirus i ett högkomplext vatten, och en stor skillnad noterades även för norovirus GI även om skillnaden inte var signifikant. Inga signifikanta skillnader i utbyte påvisades i mellankomplext vatten för något virus med det modifierade protokollet. Däremot var utbytet bättre för standardprotokollet än modifierade protokollet för lågkomplexa vattnet och skillnaden var signifikant för mengovirus. Att standardprotokollet var bättre för lågkomplext vatten än det modifierade protokollet tror författarna beror på större förlust av nukleinsyra i det modifierade protokollet än i standardprotokollet.

Utbytet i det högkomplexa vattnet med det modifierade protokollet var 33 procent för mengovirus, 13 procent för norovirus GI, 8 procent för norovirus GII och 4 procent för hepatit A-virus. Den teoretiska LOD för 50 liter ultrafilterat mellan- och lågkomplextvatten var 4×10^3 genomkopior för norovirus GI och 8×10^3 genomkopior för norovirus GII.

Det RT-qPCR kit som uppvisade bäst förmåga att motstå inhibitorer var TaqMan Fast Virus 1-step Master Mix som tolererade störst volym högkomplext vatten vid detektion av norovirus GII, det vill säga var mest tolerant mot hämmande ämnen i matrisen.

De modifierade primrarna förbättrade detektionen av framförallt norovirus GII men även norovirus GI. Modifierade primrar testades inte för hepatit A-virus eller mengovirus.

Internationell standardmetod

En standardmetod, kallad CEN/TC275/WG6/TAG4, ISO/TS 15216-1:2013, har tagits fram för att detektera hepatit A-virus och norovirus i mat inklusive flaskvatten med realtids-RT-PCR. Mengovirus används som processkontroll. Metoden har använts vid detektion av norovirus i musslor och bivalver (36, 37) och har modifierats och testats på råvatten av bland andra Grøndahl-Rosado m.fl. (2014) (22). Under 2017 kom en ny version av standarden, nu också på svenska, SS-EN ISO 15216-1 2017.

Diskussion

Denna sammanställning bygger på publicerade studier och vetenskaplig litteratur samt på information om pågående projekt som forskargrupper frivilligt delat med sig av. Det kan dock finnas studier eller arbeten som författaren inte känner till.

Variation i metoder för virusanalys

Genomgången visar att olika projekt och forskargrupper rapporterar olika utbytesresultat för liknande metoder och samma virus. Metoderna som använts är dock aldrig identiska. Därutöver har man använt olika kontrollvirus, utvärderat metodens prestanda på olika sätt, använt vatten med olika karaktärer och så vidare. Alla dessa faktorer påverkar resultaten och gör det svårt att jämföra metoderna med varandra. Vissa trender kan dock skönjas:

- Vanligast är att använda ett positivt laddat filter.
- De som gör sekundär koncentrerings använder oftast mikrokoncentrator eller PEG-fällning.
- Extraktion sker oftast med QiaAmp viral RNA kit eller NucliSens system.
- I många metoder analyseras mindre volymer vatten (1,5–5 liter) men inom Viroclime analyserades 10 liter och Borgmästars m.fl. använde 50 liter.

Skillnader i utvärdering av metoderna visar också att det behövs ett brett accepterat standardförfarande för att utvärdera analysmetoder, så att studierna blir mer jämförbara och forskarsamhället gemensamt kan utvärdera hur olika förhållanden påverkar respektive metod.

Steg för steg förtydligas dock till exempel vilken effekt virus har på utbytet och utbytesvariationen inom samma metod. En svårighet är att metoderna som undersöks ger mycket varierande utbyte och det blir då svårt att jämföra metoden vid upprepade försök. Beror utbytet på vattenkvaliteten, på viruspartikeln, på naturliga inter- och intrametodvariationer eller någon annan faktor? Genom att fastställa hur metoderna ska utvärderas går det åtminstone att jämföra olika metoder. Samtidigt påverkas metoden av hur den utvärderas, och den kan fungera bättre under naturliga förhållanden än under fastställda utvärderingsförhållanden.

Val av filter kan påverka metodens utbyte

Adsorptionsytan hos filter kan ha olika egenskaper: den kan vara positivt laddad, negativt laddad eller av glasull. Studier med positivt laddade filter rapporterar ett utbyte för norovirus på 0–84 procent för dricksvatten (18, 38) och 0,5–12 procent för flodvatten (39). Studier med elektronegativa filter har visat ett utbyte av norovirus från dricksvatten på 2–80 procent (40, 41) och från flodvatten på 4–35 procent (40, 41). Användandet av glasull har genererat utbyte för dricksvatten om ungefär 3–30 procent (38, 42). Koncentrerings kan också ske med till exempel flockulering med tormmjölk. En studie med flockulering visar ett utbyte om ca 50 procent för norovirus i flodvatten (26).

Cashdollar m.fl. 2013 (11) har genomfört en metaanalys av rapporterade medelutbyten för norovirus, poliovirus och bakteriofager i ytvatten, havsvatten och dricksvatten vid användandet av elektropositiva och elektronegativa filter. De visar att vattentyp och analysvolym inte hade signifikant effekt på utbytet. Likaså var det ingen signifikant skillnad i medelutbytet för elektropositiva filter, elektronegativa filter eller ultrafiltrering, men ultrafiltrering var baserat på färre studier.

I flera av de genomgångna projekten har olika varianter av filter undersökts, men då har också andra parametrar såsom elueringsbuffert eller efterföljande steg varierat. Detta gör att man inte kan dra någon slutsats om enbart filtrets påverkan på utbytet.

Val av virus påverkar metodens utbyte

En publikation av Petterson m.fl. 2015 (10) visar att mengovirus inte verkar vara ett optimalt kontrollvirus för metoder som ska påvisa norovirus. En metaanalys av Cashdollar m.fl. från 2013 visar även att valet av virus signifikant påverkar utbytet, oavsett typ av filter, vattentyp eller analysvolym. Det är oklart om denna skillnad beror på olika egenskaper hos virus när det gäller isoelektrisk punkt, viruspartikelns struktur och storlek, eller andra faktorer (11). Fler liknande granskningar krävs för att utvärdera vilka kontrollvirus och metoder som fungerar under olika förutsättningar. Studierna visar också på vikten av att utföra försöken med det virus man avser undersöka i stället för att optimera en metod med hjälp av modellvirus. Modellvirus är dock ett bra komplement, särskilt vid arbete med virus som inte går att odla.

Fynd i vatten och tolkning av resultat

Flera av studierna rapporterar fynd av norovirus i råvatten, framför allt under vintermånaderna. Det är inte förvånande eftersom råvatten kan påverkas av renat avloppsvatten som normalt innehåller virus och andra patogener då reduktionen i avloppsreningsverken inte är fullständig. Halterna varierar men det är utan tvekan så att det finns norovirus i våra råvattenkällor. Om halterna dessutom skulle räknas upp för att korrigera för det låga utbytet i metoden blir halterna av norovirus i många fall mycket höga. För att kunna använda resultaten från metoderna i riskbedömningar krävs att halter av virus anges. De få beräkningar av reduktioner i vattenverken som gjorts inom de olika projekten visar dock att vattenverken under normala förhållanden har god förmåga att reducera de beräknade virushalterna.

Vid tolkning av resultaten behöver man ta hänsyn till både processförlusten (utbytet) och det faktum att inte alla påvisade virusgenom är infektiösa. Att virus inte påvisas i PCR-analysen innebär inte nödvändigtvis att vattnet är fritt från virus, utan endast att virus inte kunde påvisas. Orsakerna kan vara flera, bland annat att utbytet var dåligt, att halterna var under detektionsgränsen för metoden, att fraktionen vatten som filtrerades inte innehöll virus och att PCR-reaktionen var hämmad.

Resultaten av virusförekomst i råvatten kan med fördel kopplas samman med annan data, såsom förekomsten av sjukdomssyndrom i befolkningen enligt sjukvårdsupplysningen och funktionen Hälsoläge som finns tillgänglig via Folkhälsomyndigheten. Hälsoläge är baserat på samtal till 1177 Vårdguiden och analyserar automatiskt om det finns förhöjda nivåer av samtal som rör förutbestämda symtom jämfört med vad man kan förvänta sig i ett viss geografiskt område. Vid förhöjda nivåer av magsjuka uppströms finns risk för ökat tillskott av virus till recipienten som senare kan fungera som någon annans råvatten. Uppmätta virushalter i råvatten kan också jämföras med rapporterad magsjuka i vattenverkets distributionsområde.

Dricksvattenburna virusutbrott kräver kompletterande metoder

Vid ett dricksvattenburet utbrott är det alltid önskvärt att kunna spåra en trolig smittkälla. Halterna virus i dricksvatten är ofta låga, och om till exempel en bräddning ligger bakom ett utbrott är det troligt att flera olika typer av patogena mikroorganismer, inklusive olika genotyper av norovirus, påvisas hos patienter. I vissa fall kan även olika varianter av norovirus påvisas i vattnet. Vid ett utbrott kan typning av virus användas för att stärka sambandet mellan dricksvatten och patienter. Typning innebär att undersöka om virus hos patient och vatten är lika på nukleotidnivå. De metoder som används i studierna baseras på en Realtids-PCR, det vill säga att man försöker ange halten virus i ett prov och inte endast närvaro av virus. Vid utbrottsituationer är det viktigare att kunna påvisa virus i vatten och att jämföra virus från patient och humanprover med typning, än att bestämma halten, och då kan konventionell PCR vara av värde. Realtids-PCR har ofta högre känslighet än konventionell PCR. Nackdelen med Realtids-PCR är att man inte kan jämföra nukleotiderna från olika prover med varandra, vilket man kan med konventionell PCR. Även med konventionell PCR innebär inte frånvaro av virus att vattnet är fritt från virus, utan det betyder endast att virus inte kunde påvisas.

Mångårig erfarenhet från arbete med utbrott och smittspårningar på Folkhälsomyndigheten visar att påvisande av samma typ av virus i vatten och patient har stor betydelse för hur ett utbrott hanteras och accepteras. Med ett påvisat samband brukar det bli lättare att sätta in åtgärder för att hindra fortsatt smittspridning och förhindra nya utbrott.

Norovirus i vatten har oklar betydelse för folkhälsan

Det är svårt att bedöma vilken betydelse norovirus i dricksvatten har för folkhälsan. Calicivirus, den virusfamilj där norovirus ingår, är dock den vanligaste kända mikrobiologiska orsaken till dricksvattenburna sjukdomsutbrott (43). En studie i Sverige har uppskattat att upp till 175 000 personer per år kan insjukna i svår magsjuka på grund av smitta via dricksvatten, men inte specifikt av virussmitta (44). En studie av Tornevi m.fl. (2016) (45) visar vidare att ökad barriärverkan i vattenverken har stor effekt på antalet fall av magsjuka i befolkningen under perioder då virus är en vanlig orsak till magsjuka. Sammantaget visar detta att virus i vatten, och framför allt norovirus i vatten, sannolikt kan spridas via dricksvatten.

Dricksvattenburna norovirusutbrott pågår inte konstant i befolkningen även om norovirus påvisas i råvatten. Det kan bero dels på att reningen i vattenverken är tillräckligt god, dels på att alla påvisade virus inte är viabla och inte kan orsaka infektion. Molekylärbiologiska metoder ger inte svar på om påvisade virus är viabla eller inte. I dag finns alltså en kombination av lågt utbyte, många faktorer som påverkar påvisning av norovirus och metoder som inte anger om virus är viabla eller inte. Därmed är det svårt att ange vilken risk ett visst vatten utgör för människors hälsa om det används vid dricksvattenproduktion.

Dricksvattenproducenter behöver känna sitt vatten och veta vilka halter av indikatororganismer och patogener som brukar förekomma i det, för att kunna upptäcka variationer och värdera vilken risk de medför. Klart är att humanpatogena virus ofta finns närvarande och att perioder med höga halter kan antas bero på en ökad tillförsel till råvattnet från människor via till exempel avloppsvatten. Högre halter virus ställer högre krav på reningen av råvattnet för att dricksvattenproducenten ska kunna leverera ett säkert dricksvatten. Metoder såsom analys av VLP och kolifager används av vissa vattenverk för att undersöka barriäreffekten. Ingen av dessa varianter korrelerar med virusförekomst utan används enbart för att undersöka barriärverkan.

Framtida behov av utveckling

Ett flertal projekt och studier av olika storlek har genomförts under de senaste tio åren, och stora resurser har tillförts från olika finansiärer, både nationellt och internationellt. Trots detta finns det i dagsläget (2017) inte någon allmänt accepterad och väl fungerande metod för att påvisa virus i vatten. Det finns stora variationer i utbyte, och det är fortfarande svårt att koppla PCR-resultat till viabilitet, i de fall virus inte kan odlas.

Fortsatt arbete krävs för att utveckla metoder för påvisning och haltbestämning av virus i vatten. Mycket arbete har genomförts, men utan någon revolutionerande teknikutveckling under tiden som påverkat metoderna. Frågan är om vi har kommit så långt det är möjligt med de nuvarande metoderna. Behövs nya angreppssätt och innovationer för att ta ett stort kliv framåt?

Försöken med att ta fram realtids-PCR för att påvisa och haltbestämma virus i vatten bör inte överskugga behovet av konventionell PCR med efterföljande typning för användning vid smittspårning.

Ett annat alternativ vid detektion av okänt virus är att använda helgenomsekvensering (WGS, whole genome sequencing) men då krävs en relativt hög halt viruspartiklar. Folkhälsomyndigheten leder ett nystartat MSB-finansierat 2:4-krisberedskapsprojekt kallat "Stärkt förmåga till analys av råvatten och dricksvatten vid oväntad kemisk, mikrobiologisk och radioaktiv förorening i fredskriser, för det civila försvaret och höjd beredskap". Syftet med det är bland annat att undersöka användandet av WGS vid frågeställningar om mikroorganismer i vatten. Det återstår att se om denna teknik kan vara del av lösningen eller om ytterligare utveckling krävs.

Referenser

1. SOU. http://www.regeringen.se/contentassets/94b5ab7c66604cd0b8842fd6510b42c9/sverige_infor_klimatforandringarna---hot_och_mojligheter_bilagedel_b_forteckning_bilaga_b-32-35_sou-200760. 2007:60, bilaga B34.
2. WHO. Guidelines for Drinking-water quality, 4ed World Health Organization. 2011;http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/dwg_guidelines/en/.
3. Folkhälsomyndigheten. Sjukdomsutbrott orsakade av dricksvatten. Utbrott i Sverige år 1992-2011. Solna; 2015.
4. Malm A BO, Axelsson G, Barregård L, Forsberg B, Ljunqvist J, Pettersson T. Bedömning av hälsorisker på ledningsnätet vid läcklagning. . SVU rapport nr 2015-22. 2015.
5. Tornevi A BO, Forsberg B. Tidsmässiga samband mellan nederbörd, råvattenkvalitet och magsjuka. SVU rapport nr 2015-21. 2015.
6. Duizer E, Schwab KJ, Neill FH, Atmar RL, Koopmans MP, Estes MK. Laboratory efforts to cultivate noroviruses. The Journal of general virology. 2004;85(Pt 1):79-87.
7. Dalin E, Ansker J, Häggström P, Dahlberg B, Pott BM, Ericsson P, et al. Analysmetoder för norovirus i ytvatten. Utveckling av molekylärbiologisk metodik för detektion och kvantifiering i vatten och slam. SVU rapport nr 2010-09. 2010.
8. Francy DS, Stelzer EA, Brady AM, Huitger C, Bushon RN, Ip HS, et al. Comparison of filters for concentrating microbial indicators and pathogens in lake water samples. Applied and environmental microbiology. 2013;79(4):1342-52.
9. Gibson KE, Schwab KJ, Spencer SK, Borchardt MA. Measuring and mitigating inhibition during quantitative real time PCR analysis of viral nucleic acid extracts from large-volume environmental water samples. Water Res. 2012;46(13):4281-91.
10. Petterson S, Grondahl-Rosado R, Nilsen V, Myrmel M, Robertson LJ. Variability in the recovery of a virus concentration procedure in water: Implications for QMRA. Water research. 2015;87:79-86.
11. Cashdollar JL, Wymer L. Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies. Journal of applied microbiology. 2013;115(1):1-11.
12. Ødegaard H, Østerhus S, Melin E. Veiledning til bestemmelse av god desinfeksjonspraksis. Slutrapport fra prosjektet Optimal desinfesjonspraksis. Norsk Vann Rapport nr 170-2009. 2009.
13. Abrahamsson JL AJ, Heinicke G. MRA - Ett modellverktyg för svenska vattenverk. SVU rapport nr 2009-05. 2009.
14. <http://www.svenskvatten.se/vattentjanster/dricksvatten/riskanalys-och-provtagning/riskanalyser-och-ravattenskydd/haccp/>. 171020.
15. Smittskyddsinstitutet. Norovirus i vatten - en litteraturstudie. Solna; 2012.
16. Hallin E. Norovirus i vatten - en litteraturstudie. SVU Rapport nr 2012-06. 2012.
17. Folkhälsomyndigheten. Vinterkräksjuka i vården. Kunskapsunderlag för att minska spridningen av norovirus. Solna; 2014.

18. K. U. Development and evaluation of methods for recovery of noroviruses from food, water and air. Doctoral Thesis Technical University of Denmark. 2012.
19. Schultz AC, Perelle S, Di Pasquale S, Kovac K, De Medici D, Fach P, et al. Collaborative validation of a rapid method for efficient virus concentration in bottled water. *International journal of food microbiology*. 2011;145 Suppl 1:S158-66.
20. Ansker J EE, Häggström P, Lindgren PE, Nyström F, Pott BM. Riskanalys med MRA och GDP baserad på långtidsundersökning av norovirusförekomst i svenska ytvattentäkter. SVU rapport nr 2013-20. 2013.
21. Ottoson J BL, Simonsson M. Virus i vatten - skandinavisk kunskapsbank. SVU rapport nr 2016-03. 2016.
22. Grondahl-Rosado RC, Yarovitsyna E, Trettenes E, Myrmel M, Robertson LJ. A One Year Study on the Concentrations of Norovirus and Enteric Adenoviruses in Wastewater and A Surface Drinking Water Source in Norway. *Food and environmental virology*. 2014.
23. http://visk.nu/wp-content/uploads/2016/02/VISK_handbok_2013_se.pdf. 170918.
24. Hakonsen Tea. Work package 4: Virusfejrning i vannverk. VISK. 2013.
25. Petterson S SE, Rosado R, Håkonsen T, Ottoson J, Nilsen V, Stenström TA, Heistad A, Seidu R. Work package 5: Case study report. Quantitative microbial risk assessment for evaluation and management of drinking water systems. wwwvisknu. Draft from 2013.
26. Calgua B, Fumian T, Rusinol M, Rodriguez-Manzano J, Mbayed VA, Bofill-Mas S, et al. Detection and quantification of classic and emerging viruses by skimmed-milk flocculation and PCR in river water from two geographical areas. *Water research*. 2013;47(8):2797-810.
27. Allard A. Mailkonversation, december 2015. Umeå Universitet. .
28. Hedman J JL, Eriksson R, Forsberg C, Jinnerot T, Noppa L, Rådström P. Pre-PCR procesing-projektet, P4. Stärkt beredskapskapacitet via rationell laboratoriediagnostik samt förenklad provberedning. NFC Rapport, Avdelningskansliet 2017:04. 2017.
29. Borgmastars E, Jazi MM, Persson S, Jansson L, Radstrom P, Simonsson M, et al. Improved Detection of Norovirus and Hepatitis A Virus in Surface Water by Applying Pre-PCR Processing. *Food and environmental virology*. 2017;9(4):395-405.
30. [https://www.msb.se/Upload/Forebyggande/Krisberedskap/Anslag_2_%20Krisberedskap/bilaga_%201\)%20beviljade%20projekt%202015%20myndigheter.pdf](https://www.msb.se/Upload/Forebyggande/Krisberedskap/Anslag_2_%20Krisberedskap/bilaga_%201)%20beviljade%20projekt%202015%20myndigheter.pdf). 2015.
31. <http://proj.formas.se/detail.asp?arendeid=33399&x=250&y=20&sprak=1&redovisning=0.171020>.
32. <https://www.vinnova.se/p/snabbare-och-effektivare-analysmetoder-for-forbatttrad-risk-och-kvalitetshantering-i-livsmedelskedjan/>. 171020.
33. Forsberg E. Verifiera desinfektionseffekten med naturligt förekommande mikroorganismer. SVU Rapport nr 2014-24. 2014.
34. Maunula L, Soderberg K, Vahtera H, Vuorilehto VP, von Bonsdorff CH, Valtari M, et al. Presence of human noro- and adenoviruses in river and treated wastewater, a longitudinal study and method comparison. *Journal of water and health*. 2012;10(1):87-99.

35. Gilgen M, Germann D, Luthy J, Hubner P. Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *International journal of food microbiology*. 1997;37(2-3):189-99.
36. Butot S, Le Guyader FS, Krol J, Putallaz T, Amoroso R, Sanchez G. Evaluation of various real-time RT-PCR assays for the detection and quantitation of human norovirus. *J Virol Methods*. 2010;167(1):90-4.
37. Le Guyader FS, Parnaudeau S, Schaeffer J, Bosch A, Loisy F, Pommepuy M, et al. Detection and quantification of noroviruses in shellfish. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(3):618-24.
38. Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Calgua B, Huguet JM, Courtois S, Girones R. Comparison of methods for concentrating human adenoviruses, polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR. *J Virol Methods*. 2009;158(1-2):104-9.
39. Karim MR, Rhodes ER, Brinkman N, Wymer L, Fout GS. New electropositive filter for concentrating enteroviruses and noroviruses from large volumes of water. *Applied and environmental microbiology*. 2009;75(8):2393-9.
40. Victoria M, Guimaraes F, Fumian T, Ferreira F, Vieira C, Leite JP, et al. Evaluation of an adsorption-elution method for detection of astrovirus and norovirus in environmental waters. *J Virol Methods*. 2009;156(1-2):73-6.
41. Haramoto E, Katayama H, Utagawa E, Ohgaki S. Recovery of human norovirus from water by virus concentration methods. *J Virol Methods*. 2009;160(1-2):206-9.
42. Lambertini E, Spencer SK, Bertz PD, Loge FJ, Kieke BA, Borchardt MA. Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters. *Applied and environmental microbiology*. 2008;74(10):2990-6.
43. Folkhälsomyndigheten. Sjukdomsutbrott orsakade av dricksvatten. Utbrott i Sverige år 1992-2011. Solna: Folkhälsomyndigheten. 2015;<http://www.folkhalsomyndigheten.se/pagefiles/22024/Sjukdomsutbrott-vatten-1992-2011.pdf>.
44. Toljander JS-S, M. Simonsson, M. Risken att bli magsjuk av dricksvatten - en svensk kohortstudie. Livsmedelsverket Rapport 15-2016. 2016.
45. Tornevi A, Simonsson M, Forsberg B, Save-Soderbergh M, Toljander J. Efficacy of water treatment processes and endemic gastrointestinal illness - A multi-city study in Sweden. *Water research*. 2016;102:263-70.

Bilagor

Bilaga 1

Söksträngar och antal träffar vid genomgång av litteraturen för analys av norovirus i vatten.

Databas: Scopus (Elsevier)		Datum: 2015.02.13	
Sökning Nr	Sökfält	Söksträng	Antal träffar
1	Title, Abstract, Keywords	TITLE-ABS-KEY (norovirus OR "norwalk virus" OR calicivirus) AND PUBYEAR > 2009	2915
2	Title, Abstract, Keywords	TITLE-ABS-KEY (analysis OR characterization OR isolation OR determination OR detection) AND PUBYEAR > 2009	4112192
3	Title, Abstract, Keywords	TITLE-ABS-KEY ((drinking water) OR groundwater OR ground-water OR (water supply) OR (water resource) OR lake OR (surface water)) AND PUBYEAR > 2009	300204
4		#1 AND #2 AND #3	167

Databas: SciFinder (CAS)		Datum: 2015.02.18	
Sökning Nr	Sökfält	Söksträng	Antal träffar
1	Research Topic (Keyword/Title/Abstract)	analysis norovirus in drinking water	14
2	Research Topic (Keyword/Title/Abstract)	analysis norovirus in groundwater	20
3	Research Topic (Keyword/Title/Abstract)	detection of norovirus in groundwater	14
4	Research Topic (Keyword/Title/Abstract)	detection of norovirus in drinking water	20
5	Research Topic (Keyword/Title/Abstract)	norovirus PCR	878
6		#5. Refined by publication year: 2010 –	484

7		#6. Refined by language: English	375
---	--	-------------------------------------	-----

Databas: PubMed (NCBI)		Datum: 2015.02.02	
Sökning Nr	Sökfält	Söksträng	Antal träffar
1	MeSH	"Norovirus"[Mesh]	3000
2	MeSH	"Drinking Water"[Mesh] OR "Water Resources"[Mesh] OR "Groundwater"[Mesh] OR "Water Supply"[Mesh]	33232
3		#1 AND #2	85
4	MeSH	"Norovirus/analysis"[Mesh] OR "Norovirus/isolation and purification"[Mesh]	1556
5		#2 AND #4	59
6	MeSH	"Caliciviridae/analysis"[Mesh] OR "Caliciviridae/isolation and purification"[Mesh]	2085
7		#6 AND #2	65
8	Title, Abstract	norovirus[Title/Abstract] OR "norwalk virus"[Title/Abstract]	3285
9	Title, Abstract	"drinking water"[Title/Abstract] OR drinking-water[Title/Abstract] OR groundwater[Title/Abstract] OR ground-water[Title/Abstract] OR "ground water"[Title/Abstract] OR "water supply"[Title/Abstract] OR "water-supply"[Title/Abstract] OR "water resource"[Title/Abstract] OR "water resources"[Title/Abstract]	52760
10		#6 AND #7	136

Databas: PubMed (NCBI)		Datum: 2015.02.13	
Sökning Nr	Sökfält	Söksträng	Antal träffar
1	MeSH	"Norovirus"[Mesh]	3000
2	MeSH	"Drinking Water"[Mesh) OR "Groundwater"[Mesh) OR "Water Resources"[Mesh) OR "Water Supply"[Mesh) OR "Fresh Water"[Mesh]	68502
3		#1 AND #2	142
4		#3. Filter: Published last five years	54
5	Title, Abstract	norovirus[Title/Abstract] OR norwalk virus[Title/Abstract] OR calicivirus[Title/Abstract] OR enteric virus[Title/Abstract]	4423
6	Title, Abstract	drinking water[Title/Abstract] OR ground water[Title/Abstract] OR ground-water[Title/Abstract] OR groundwater[Title/Abstract] OR fresh water[Title/Abstract] OR freshwater[Title/Abstract] OR water supply[Title/Abstract] OR water-supply[Title/Abstract] OR water-resource[Title/Abstract] OR water resource[Title/Abstract] OR lake[Title/Abstract] OR pond[Title/Abstract] OR surface water[Title/Abstract] OR surface-water[Title/Abstract]	100897
7		#1 OR #5	5059
8		#2 OR #6	135391
9		#7 AND #8	328
10		#9. Filter: Published last five years	146

Bilaga 2

FOOD-VIRUS

Vattenkälla och provplats	Dricksvatten. 20 olika dricksvatten från tappkran från Sverige, Norge, Danmark, Finland, Island.
---------------------------	--

Volym, antal prover och tidpunkt	1,5 L, 160 prover (20 provplatser, 4 olika koncentrationer av virus i dubbelprov) under hösten 2009.
Virus analyserade	Norovirus GI, GII, adenovirus 41, mengovirus
Adsorption och elueringsmetod	1,5 L dricksvatten spikades med virus och filtreras genom ett 47 mm positivt laddat membran med porstorlek 0,45 µm med hjälp av vakuum. Virus eluerades från filter med 3 ml NucliSens lysisbuffert (BioMerieux) under skak RT, 15 min. Hela volymen användes till efterföljande nukleinsyraextraktion.
Extraktion och molekylärbiologisk metod	Nukleinsyraextraktion genomfördes med NucliSens mini-MAG (BioMerieux) till 100 µl eluat. cDNA producerades med Superscript III RT kit (Invitrogen). Extraktion och cDNA utfördes av varje laboratorium (land) för sig. Prover förvarades i -20 °C innan transport till Danmark för realtids-PCR-analys. Realtids-PCR utfördes för norovirus GI, GII och mengovirus med TaqMan universal PCR (Applied Biosystems). För adenovirus användes QuantiTect Probe PCR kit (Qiagen). Alla analyser analyserades på ABI StepOne (Applied Biosystems).
Kontrollvirus	Mengovirus tillsattes som processkontroll tillsammans med övriga virus i vattnet. Negativ kontroll bestod av fos.
Utbyte	Medelutbytet för alla 20 vattentyper var: 43 % för norovirus GI, 45 % för norovirus GII, 15 % för adenovirus, 46 % för mengovirus. LOD50 räknades också ut för alla proverna och uppmättes till 13 RT-PCR U/1,5 L för norovirus GI, 9 RT-PCR U/1,5 L för norovirus GII, 12 RT-PCR U/1,5 L för adenovirus. Variation i utbyte mellan olika typer av virus, de olika dricksvattentyperna och utförande laboratorerna. Dricksvattentypen påverkade signifikant utbytet av alla virus. Utbytet påverkades också av vilken virustyp som undersöktes. Ingen kontroll användes för att kontrollera hämning av RT-PCR-steget.

NORVID

Vattenkälla och provplats	Råvatten. Ringsjön, Mälaren, Göta Älv
Volym, antal prover och tidpunkt	4 L, 2 gånger/vecka september 2010–september 2011, totalt 104 prover.
Virus analyserade	Norovirus GI, GII, murint norovirus
Adsorption och elueringsmetod	Provet reducerades 20 000 gånger, från 4 L ner till 200 µl. Förfiltrering: 4,5 L vatten spikat med murint norovirus filtrerades över glasfiberfilter med porstorlek 2 µm, maxflöde på 450 ml/min, följt av flockulering med 25 mM magnesiumklorid. Filtrering: 4 L filtrerades genom cellulosaeesterfilter med porstorlek på 0,45 µm med maxhastighet av 200 ml/min. Filtret tvättades med 200 ml 0,5 mM svavelsyra för att ta bort magnesiumjoner, därefter eluerades viruspartiklarna genom att recirkulera 15 ml tvättlösning med högt pH (basisk Triton-X-tvättlösning) i motsatt riktning i 2 min. Sedan

	neutraliseras filtratet. Ultrafiltrering: Hela volymen sattes till en mikrokoncentrator på 50 kDa och kylcentrifugerades i 35 min vid 4 000 g. Retentatet var max 200 µl.
Extraktion och molekylärbiologisk metod	Extraktionen med QIAamp viral RNA mini kit (Qiagen) gav 60 µl varav 8 µl användes till att skapa 30 µl cDNA med en RT-PCR (Illustra ready to go reverse transcriptase bead, GE). 2 µl användes till PCR på LigthCycler (Roche) med LUX-primrar (Invitrogen),
Kontrollvirus	Murint norovirus tillsattes till vattenproverna samt till ett dricksvattenprov som kördes parallellt.
Utbyte	Detektionsgräns med hänsyn tagen till metoden och utbyte är 1 000 viruspartiklar/L råvatten. Utbyte i råvatten från Göta älv var 7–13 % för GI, 9–22 % för GII.
Fynd i vatten	Norovirus förekom i samtliga undersökta vattentäkter, framför allt under oktober–februari. Uppmätta maxvärden var för GI 3 000 virusgenom/L råvatten och för GII 10 000 virusgenom/L råvatten. Både dessa uppmättes i samma ytvatten.
Övriga resultat	Ingen korrelation mellan halter av norovirus och de kemiska (pH, temp, FNU, TOC, COD) eller mikrobiologiska (C. perfringens, E. coli, koliforma bakterier) parametrarna.
Övrig information	Eftersom man i utvecklingen av metoden inte pH-justerar provet använder man inte ett positivt laddat filter utan ett hydrofilt filter, MCE (mixed cellulose ester). Slutmetoden har satts upp på Ryhov för att användas inom VISK. En del viruspartiklar avskiljs antagligen vid flockuleringen då de är aggregerade till större partiklar.

VISK, Glomma, metodoptimering, Grøndahl-Rosado m.fl. 2014

Vattenkälla och provplats	Råvatten. Glomma; Inkommande ytvatten - Nedre Romerike Vattenverk
Volym, antal prover och tidpunkt	30 L provtogs men 1 och 10 L användes för analyserna. Prov togs vid 5 tillfällen september–december 2010.
Virus analyserade	Mengovirus, adenovirus 40 och 41, norovirus GI, GII.
Adsorption och elueringsmetod	Fyra olika filter testades med tre olika buffertar, där filter 1–3 testades med buffert 1–2 och filter 4 med buffert 3 följt av RNA-extraktion. Vid uttestning av filter 1–3 ingick ett sekundärt koncentreringssteg med PEG 8000, 80 g/L och NaCl 17,5 g/L pH 7,3 med omrörning över natt vid 4 °C följt av centrifugering vid 10 000 x g för 45 min vid 4 °C. Filter 1: 147 mm NanoCeram aluminiumfiberdiskfilter, porstorlek 2 µm (Argonide); Filter 2: Glasull packat i kolonn; Filter 3: MF-Millipore 47 mm cellulosaeesterfilter, porstorlek 0,45 µm; Filter 4: Zetapor Sp 47 mm diskfilter porstorlek 0,45 µm (Cuno Filtration SAS 3M). Buffert 1: 3 % köttextrakt med 0,1 mol/L glycin, pH 9,5; Buffert 2: 0,05 M KH ₂ PO ₄ , 1 M NaCl, 0,1 % (v/w) Triton X-100,

	pH 9,2; buffert 3: Lysisbuffert (NucliSens easyMAG, Biomerieux). För varje metod användes 1 L och 10 L vatten i triplikat, och Cq-värden (quantification cycle) från qPCR användes för att utvärdera metoderna. När en viss metod valts ut (filter 1 och buffert 2) gjordes ytterligare optimeringar genom att filtrera 1, 5 och 10 L vatten och jämföra Cq-värden från qPCR.
Extraktion och molekylärbiologisk metod	Nukleinsyraextraktion med NucliSens easyMAG (Biomerieux) enligt tillverkarens instruktioner. Pelleten resuspenderades i 3 ml lysisbuffert och förvarades i -20 °C. Vid fortsatt analys tillsattes 50 µl magnetiska kulor, och extraherat RNA/DNA eluerades i 25 µl och förvarades vid -80 °C. cDNA skapades med superscript III (Invitrogen) random hexamers och 11 µl RNA enligt tillverkarens instruktioner, till totalvolym av 20 µl. Alla prover amplifierades i duplikat i Stratagene MX3005P (Agilent Technologies Inc) med TaqMan Environmental Master Mix (Applied Biosystems) med 2 µl cDNA/DNA i 20 µl totalvolymreaktion. Spädda och ospädda prover analyserades parallellt för att späda ut eventuella inhibitorer. Positiva och negativa kontroller ingick i alla körningar.
Kontrollvirus	Mengovirus användes som processkontroll. Ett prov med endast elueringsbuffert analyserades varje vecka som negativ kontroll. För att kunna beräkna utbyte tillsattes 2 ml lysisbuffert till 1 ml ofiltrerat vatten som spikats med mengovirus, och som sedan RNA-extraherades.
Övriga resultat	Filter 1 och filter 3 tillsammans med buffert 2 uppvisade konsekvent lägst Cq-värden (högst utbyte). Filter 1 (NanoCeram) var lättare att hantera, och Cq-resultat från försök med olika volymer samt utbyte från spikningsförsök visade att filtrering av 5 L gav bäst utbyte.

VISK, Glomma, försök, Grøndahl-Rosado m.fl. 2014

Vattenkälla och provplats	Råvatten. Glomma; Inkommande ytvatten - Nedre Romerike Vattenverk
Volym, antal prover och tidpunkt	30 L vid 55 tillfällen (ca 1 gång i veckan) under januari 2010–april 2012. Från juni 2011 var 5 L standard vid analys.
Virus analyserade	Mengovirus, adenovirus 40 och 41, norovirus GI, GII.
Adsorption och elueringsmetod	Ytvatten spikades med mengovirus som processkontroll, blandades och stod i 2 tim i 4 °C. Provet delades i 2–3 replikat om 5 L och filtrerades inom 4–8 tim från provtagning med en peristaltisk pump med flöde 80 ml/min (Watson-Marlow) genom 147 mm NanoCeram nano aluminiumfiberdiskfilter porstorlek 2 µm (Argonide). Filter eluerades genom att cirkulera 40 ml av buffert innehållande 0,05 M KH ₂ PO ₄ , 1 M NaCl, 0,1 % (v/w) Triton X-100, pH 9,2 i 1 min. Eluatet koncentrerades ytterligare genom PGE-fällning och pelleten resuspenderades i 3 ml lysisbuffert och förvarades i -80 °C i väntan på nukleinsyraextraktion.

Extraktion och molekylär-biologisk metod	Nukleinsyraextraktion med NucliSens easyMAG (Biomerieux) enligt tillverkarens instruktioner. Pelleten resuspenderades i 3 ml lysisbuffert och förvarades i -20 °C. Vid fortsatt analys tillsattes 50 µl magnetiska kulor, och extraherat RNA/DNA eluerades i 25 µl och förvarades vid -80 °C. cDNA skapades med superscript III (Invitrogen) random hexamers och 11 µl RNA enligt tillverkarens instruktioner, till totalvolym av 20 µl. Alla prover amplifierades i duplikat i Stratagene MX3005P (Agilent Technologies Inc) med TaqMan Environmental Master Mix (Applied Biosystems) med 2 µl cDNA/DNA i 20 µl totalvolymreaktion. Prover analyserades spädda och ospädda för att upptäcka eventuell inhibition. Positiva och negativa kontroller ingick i alla körningar.
Kontrollvirus	Mengovirus användes som processkontroll. Ett prov med endast elueringsbuffert analyserades varje vecka som negativ kontroll. För att kunna beräkna utbytet tillsattes 2 ml lysisbuffert till 1 ml ofiltrerat vatten som spikats med mengovirus som sedan RNA-extraheras. PCR-metoderna följer rekommendationerna från CEN/TC275/WG6/TAG4
Utbyte	LOD var 7 genomkopior/L för alla virus. Bara prov över LOD användes i vidare beräkningar (dvs. man tog inte med negativa prover som 0). Relativa standarddeviationen var 7–97 % för alla virus, och relativ medelstandarddeviation var 45 % för adenovirus, 53 % för norovirus GI, och 54 % för norovirus GII. Inhibition detekterades i 35 % av proverna.
Fynd i vatten	Viruskoncentrationen är högre under vintern (november–mars), när lufttemperaturen är låg (-26,3–6,8 °C) och nederbörden är låg (0–27 mm/dag). Viruskoncentrationen var högst vid neutralt pH, och hög vid hög konduktivitet, och uppvisade ingen samvariation med turbiditet.

Viroclime

Vattenkälla och provplats	Flodvatten. 2 platser vid Umeälven.
Volym, antal prover och tidpunkt	10 L, 14–20 experiment per virus i Umeå, januari 2011–juni 2012.
Virus analyserade	Norovirus GI, GII, sapovirus, humant adenovirus, polyomavirus JC, enterovirus, influensavirus A. För utvärdering av metoden användes adenovirus 35, polyomavirus JC, enterovirus echovirus 7, norovirus GII och influensavirus.
Adsorption och elueringsmetod	Vid mycket material i vattnet sedimenterades provet i 15 min och vattenfasen överfördes till ny behållare. pH justerades till 3,5. Vid behov justerades konduktiviteten till över 1 200 µl. 100 ml av 1 % torrmjölkslösning i artificiellt saltvatten med pH 3,5 tillsattes provet följt av omrörning i 8–10 timmar vid rumstemperatur, därefter sedimenterades provet i 8–10 timmar. Supernatanten togs av och flockarna samlades upp och centrifugerades vid 8 000 x g, 30 min, 4 °C. Pelleten löstes upp i totalt 10 ml PBS.

Extraktion och molekylär-biologisk metod	Virus extraherades med QIAamp Viral RNA kit (Qiagen) följt av realtids-PCR med Ultrasense One-step Quantitative RT-PCR kit (Invitrogen) för RNA-virus och Taqman Environmental PCR kit för DNA-virus (Applied Biosystems).
Kontrollvirus	Till processkontroll vid försök med metoden användes adenovirus 35 som tillsattes till ett separat prov innan flockulering.
Utbyte	Medelutbytet varierade mellan olika virus: 49 % för adenovirus, 92 % för polyomavirus JC, 22 % för enterovirus, 8 % för norovirus GII och 13 % för influensavirus A. Resultaten för enterovirus och norovirus GII är baserade på resultaten från QIAGENS mix, innan bytet till Invitrogens kit.
Fynd i vatten	Sapovirus och enterovirus påvisades inte i några ytvattenprov. Norovirus GI eller GII påvisades i 6 % av proverna från Umeälven. Detta var lägst förekomst av alla platserna som undersöktes i Viroclime.
Övrig information	Först användes QuantiTect RT-PCR för real-time mix (QIAGEN), men byttes senare ut mot RNA Ultrasense One-step Quantitative RT-PCR kit (Invitrogen). Byte av kit ökade sensitiviteten för alla RNA-virus utom enterovirus. Tillsats av 1 % w/v saltvatten ökade också sensitiviteten med 1–2 cykler på Ct-värdet. DNA-virusen (adenovirus och polyomavirus) visade ingen hämning av matrisen. Det gjorde däremot RNA-virusen (enterovirus, norovirus GII och influensavirus A) vilket antagligen beror på hämning av ”reverse transkriptase”-steget.

Maunula m.fl. 2012, jämförelse av metoder

Vattenkälla och provplats	Råvatten. Floden Vantaa
Volym, antal prover och tidpunkt	Februari, mars och maj 2009, totalt 12 prover från 4 olika provplatser. Provtagning 1 gång/månad i 3 månader.
Virus analyserade	Norovirus, adenovirus
Adsorption och elueringsmetod	Tre olika metoder jämfördes: A) 3 L vatten förfiltrerades genom Waterra (FHT-700) och filterades därefter genom negativt laddade HA-membran (cellulosacetat och nitratmix, Millipore). Prov eluerades med 2,5 ml lysisbuffert (Biomerieux) under skak i 10 min, RT. Därefter tvättades membranet med 1 ml destillerat vatten. Lysisbuffert och destillerat vatten poolades och användes till RNA-extraktion med NucliSens (Biomerieux) följt av RT-PCR. B) 3 L vatten som justerats till pH 3,5 filterades genom glasfiberull (725, Rantigny). Eluerades med 200 ml 50 mmol/glycinbuffert pH 9,5 med 3 % köttextrakt, därefter sänktes pH till 3,5 igen. Provet centrifugerades vid 7 000 x g, 30 min och pelleten löses upp i 8 ml PBS, pH 7,2. 1 ml användes till nukleinsyraextraktion med NucliSens. C) 30–50 ml vatten som blivit fryst vid -80 °C utsattes för frystorkning (Heto DW3) i 2 dagar. Kvarvarande material löstes upp i 1 ml PBS och användes till nukleinsyraextraktion med NucliSens (Biomerieux).

Extraktion och molekylär-biologisk metod	Prov extraherades med NucliSens magnetic extraction kit (Biomérieux) till 60 µl eluat. För norovirus användes en one-step realtids-RT-PCT med QuantiTect Probe RT-PCR (Qiagen) och LightCycler Software 3.5 (Roche Applied Sciences). För adenovirus användes realtids-PCR och Rotorgene RG-3000 (Corbett/Qiagen). PCR kördes alltid på ospätt och 1:10 spätt prov.
Kontrollvirus	Ett patientprov med hög titer för norovirus GII.4 respektive adenovirus användes för att skapa en standardkurva.
Utbyte	PCR-enheter användes för beräkningar då exakt antal genomkopior var okänt för kontrollproven. Tiofaldiga spädningar av nukleinsyran testades med amplifiering och den högsta positiva spädningen bestämdes innehålla 1 PCR-enhet. Detektionsgränsen för både norovirus och adenovirus var 1 enhet per 5 µl extraherad nukleinsyra i en PCR-reaktion.
Fynd i vatten	Norovirus detekterades inte under denna tremånadersperiod i något prov med någon metod. Adenovirus påvisades i 11 av 12 prover. Med glasullsmetoden påvisades adenovirus i 9 av 11 prover, med förfiltrering och HA-filter påvisades adenovirus i 8 av 12 prover, och med frystorkning påvisades adenovirus i 4 av 12 prover. Medelkoncentrationen av adenovirus under mars för förfiltrering och HA-filter var $5,39 * 10^2$ PCR-enheter/L, och för glasullmetoden $1,17 * 10^5$ PCR-enheter/L. PCR-hämning påvisades inte genom spädning av proven.

Maunula m.fl. 2012, ettårsstudie

Vattenkälla och provplats	Råvatten. Floden Vanta
Volym, antal prover och tidpunkt	Mars 2007–februari 2008, totalt 65 prover från 5 olika provplatser. Provtagning 1 gång/månad.
Virus analyserade	Norovirus
Adsorption och elueringsmetod	3 L förfiltrerades genom Waterra (FHT-700, Anon 2000) om vattnet såg ut att innehålla mycket partiklar. Därefter filtrerades vattnet genom negativt laddade HA-membran (cellulosacetat och nitratmix, Millipore). Prov eluerades från HA-filter med 1 ml AVL-buffert (Qiagen) under skak i 10 min, RT. För att få med eventuella virus som fastnat i förfiltreringen med Waterra eluerades det filtret med 50 ml glycinbuffert 50 mmol/l pH 9,5 med 3 % köttextrakt.
Extraktion och molekylär-biologisk metod	Extrahering med QIAamp Viral RNA kit (Qiagen) till 60 µl eluat. Endast norovirus analyserades genom en one-step realtids-RT-PCT med QuantiTect Probe RT-PCR lite (Qiagen) och LightCycler Software 3.5 (Roche Applied Sciences). PCR utfördes alltid på ospätt och 1:10 spätt prov.
Kontrollvirus	Ett patientprov med hög titer för norovirus GII.4 användes för att skapa en standardkurva.
Utbyte	PCR-enheter användes för beräkningar då exakt antal genomkopior var okänt för kontrollproven. Tiofaldiga spädningar av nukleinsyran testades med amplifiering och den högsta positiva spädningen bestämdes innehålla 1 PCR-enhet (enhet). Detektionsgränsen för

	både norovirus och adenovirus var 1 enhet per 5 µl extraherad nukleinsyra i en PCR-reaktion.
Fynd i vatten	Ungefär 30 % av proverna var positiva för norovirus. Norovirus detekterades framför allt under vintermånaderna (december–april) och norovirus GII detekterades signifikant oftare än GI. Indikatorn E. coli påvisades också under hela året

Schultz m.fl. 2011 jämförande studie

Vattenkälla och provplats	Flaskvatten från Italien, ”Monte Cimone”
Volym, antal prover och tidpunkt	1,5 L, 5 flaskor spikades.
Virus analyserade	Felint calicivirus och hepatit A-virus
Adsorption och elueringsmetod	<p>5 flaskor spikades, försöken utfördes i tre repetitioner och PCR i duplikat. Metod D antogs vara referensmetod och utfördes av alla tre laboratorierna som sedan utförde jämförande studier mot antingen metod A, B eller C.</p> <p>4 metoder jämfördes:</p> <p>A) anjon-utbyteskromatografi med positivt laddat interaktivt media med monolitisk kolonn (BIA Separations, d.o.o) kopplad till en HPLC-pump och en UV/VIS-detektor (Knauer). Prov pumpades igenom och virus eluerades från matrisen genom att tvätta med minst 10 kolonnvolym av 50 mM fosfatbuffer med 1 M NaCl, pH 7,0. Elutet, ca 15 ml, koncentrerades ytterligare med hjälp av ultracentrifugering (Beckman L8-80 M) vid 8 5750 x g vid 4 °C i 1 tim, och pelleten resuspenderades i 560 µl AVL-buffer (QIAamp Viral RNA Mini kit, Qiagen).</p> <p>B) Prov filtrerades med vakuumsug genom positivt laddade Zetaporfilter porstorlek 0,45 µm (Cuno Filtration SAS 3M). Flödes hastigheten var ca 1,5 L per 17 min. Filtren inkuberades i 20 min vid omgivningstemperatur i petriskålar med 3 ml NucliSens easyMAG lysisbuffert (BioMerieux).</p> <p>C) Elektropositiva filter, porstorlek 0,45 µm (Startolon Polyamide, 25000-47-N, Sartorius). Filtret överfördes till 50 ml rör med 3 ml 50 mM glycin 1 % köttextrakt pH 9,4 buffert. Rören vortexades och skakades vid 500 rpm i 20 min. Vätskan ultracentrifugerades (TLA 100.4 Beckman Coulter) vid 165 000 x g i 4 timmar vid 4 °C. Pelleten resuspenderades i 100 µl fosfatbuffrad salinlösning (PBS).</p> <p>D) Metod D bygger på Gilgen m.fl. 1997 och anges som referensmetod som metod A, B och C jämförs mot. Proverna filtreras genom positivt laddade Zetaporfilter porstorlek 0,45 µm (Cuno Filtration SAS 3M). Flödes hastigheten var ca 1,5 L per 17 min (samma som för metod B). Filtret flyttades till rör och 10 ml 100 mM Tris 50 mM glycin 1 % köttextrakt pH 9,5 tillsattes och skakades vid 500 rpm i 20 min. pH justerades till 8,0 och vätskan koncentrerades med Amicon Ultra-15 (Ultracell-100, Millipore) vid 4 000 x g i 13 min tills volymen var 500 µl eller mindre. Vid behov justerades volymen till 500 µl med PBS.</p>

Extraktion och molekylär-biologisk metod	<p>A) RNA extraherades med QIAamp Viral RNA Mini kit enligt tillverkarens instruktioner.</p> <p>B) RNA extraherades från allt lysat på NucliSens easyMAG-plattform enligt tillverkarens instruktioner.</p> <p>C) RNA extraherades med QIAamp viral RNA mini kit.</p> <p>D) RNA extraherades med NucliSens MiniMAG (Biomerieux) enligt tillverkarens instruktioner.</p> <p>RNA från felint calicivirus och hepatit A-virus detekterades med two-step TaqMan RT-PCR, Stratascript bufffer (Stratogene) och TaqMan MasterMix (Applied BioSystems).</p>
Kontrollvirus	Ospikat prov användes som negativ processkontroll i varje försök. Två negativa kontroller inkluderades i varje körning. RNA från stamlösning av felint calicivirus och hepatit A-virus användes som positiva amplifieringskontroller. Standardkurvor med extraherat RNA kördes parallellt med försöken.
Utbyte	Utbyte i medelprocent beräknades för prover som spikats i 1:10 spädningar och baseras på 216 PCR-körningar och 72 Cq-värden per virus med 6 spikningsnivåer. Utbytet för referensmetoden D varierade för felint calicivirus för de tre laboratorerna: mellan $< 0,01 \% \pm 0,0$ och $0,8 \% \pm 0,6$. De individuella laboratorerna hade utbyte för metod A på $6 \% \pm 6$, metod B på $25 \% \pm 8$, och metod C på $0,5 \% \pm 0,4$. Utbytet för referensmetoden D för hepatit A-virus var mellan $< 0,1 \%$ och $3 \% \pm 3$. De individuella laboratorerna hade utbyte för metod A på $34 \% \pm 5$, metod B på $32 \% \pm 10$, och metod C på $0,3 \% \pm 0,1$. Kom ihåg att metoden A, B, C bara utfördes av ett laboratorium var.
Övriga resultat	Metod B hade signifikant lägre Cq-värde för både felint calicivirus och hepatit A-virus jämfört med referensmetoden D än de andra metoderna A och C. Metod C som innehöll ultracentrifugering hade högre Cq-värden än metod A och B för felint calicivirus och hepatit A-virus med lägre utbyte som följd. Metod C krävde också mer förberedelse innan RNA-extrahering. Metod A hade goda resultat med en logs lägre detektionsgräns för hepatit A-virus än metod B.

Schultz m.fl. 2011 utvärderande studie

Vattenkälla och provplats	Flaskvatten från Italien, "Monte Cimone"
Volym, antal prover och tidpunkt	1,5 L, 6 flaskor spikades.
Virus analyserade	Felint calicivirus, hepatit A-virus, norovirus GI och GII.
Adsorption och elueringsmetod	Försöken utfördes i två repetitioner och PCR i duplikat. Metod D antogs vara referensmetod och utfördes av alla fem laboratorerna. Alla fem laboratorerna utförde också analys av felint calicivirus och hepatit A-virus med metod B, två laboratorier analyserade norovirus GI med metod B, och tre laboratorier analyserade norovirus GII med metod B.

	Metod B: Prov filtrerades med vakuumsug genom positivt laddade Zetaporfilter porstorlek 0,45 µm (Cuno Filtration SAS 3M). Flödeshastigheten var ca 1,5 L per 17 min. Filtren inkuberades i 20 min vid omgivningstemperatur i petriskålar med 3 ml NucliSens easyMAG lysisbuffert (BioMerieux).
Extraktion och molekylär-biologisk metod	Extraktion genomfördes med två olika system: 4 laboratorier använde semi-automatisk NucliSens minMAG och 1 laboratorium använde den helautomatiserade easyMAG-plattformen (både Biomeieux) för extraktion. RNA från felint calicivirus och hepatit A-virus detekterades med two-step TaqMan RT-PCR, Stratascript buffert (Stratagene) och TaqMan MasterMix (Applied BioSystems). RNA från norovirus GI och GII detekterades med one-step TaqMan RT-PCR och RNA Ultrasense One-step qRT-PCR system (Invitrogen).
Kontrollvirus	Ospikat prov användes som negativ processkontroll i varje försök. Två negativa kontroller inkluderades i varje körning. RNA från stamlösning av felint calicivirus, hepatit A-virus och norovirus GI och GII användes som positiva amplifieringskontroller. Standardkurvor med extraherat RNA kördes parallellt med försöken.
Utbyte	Utbytet är baserat på 560 PCR-körningar och 28 Cq-värden per virus med 7 spikningsnivåer. Metod B används vid alla försök. Utbyte för felint calicivirus var för de 5 laboratorerna mellan 1 % ± 1 och 72 % ± 28 med ett medelutbyte på 34 % ± 32. Utbyte för hepatit A-virus var för de 5 laboratorerna mellan 8 % ± 6 och 70 % ± 35 med ett medelutbyte på 51 % ± 26. Utbyte för norovirus GI för de två laboratorerna var 61 % ± 8 respektive 61 % ± 13 med ett medelutbyte på 61 % ± 0. Utbytet för norovirus GII för de tre laboratorerna var mellan 17 % ± 29 och 64 % ± 25 med ett medelutbyte på 35 % ± 25.
Övriga resultat	Laboratorierna fick likvärdiga standardkurvor för alla virus oavsett om de använde NucliSens easyMAG (1 laboratorium) eller NucliSens MiniMAG (4 laboratorier). Alla laboratorerna använde samma metod B med samma parti vatten, samma kontrollvirus och samma reagens men trots det uppstår skillnader i utbytet. Skillnader i resultat kan alltså bero på skillnader i PCR-plattformar, otillräckligt reglerade viruskontroller eller den mänskliga faktorn. Det finns därmed ett tydligt behov av standardiserade kontrollvirus och RNA för valideringsförsök.

Borgämstars m.fl. 2017

Vattenkälla och provplats	Råvatten. Östra Långsjön (Almunge), Mälaren (Görvåln). Dricksvatten. Från tappkran i Uppsala
Volym, antal prover och tidpunkt	50 L användes för analyserna. Antal prover och tidpunkt för provtagning inte angivet.
Virus analyserade	Mengovirus, norovirus GI, GII, hepatit A-virus.

<p>Adsorption och elueringsmetod</p>	<p>Ultrafiltrering genomfördes tre gånger för varje spikningskoncentration, totalt 6 prover. Vid varje försök analyserades ett ospikat prov parallellt som negativ kontroll.</p> <p>REXEED-25A ultrafilter blockades genom att cirkulera 5 % fetalt kalvserum under 10 min följt av övernattinkubation vid 5 °C. Därefter tvättades filtret med 1 L av det vatten som sedan skulle analysera. 50 L spikat vatten filtrerades med hjälp av en Masterflex L/S peristaltisk pump (Cole-Parmer) med hastigheten 2900 ml/min. Filtret eluerades genom att backspola med 500 ml PBS innehållandes 0,01 % NaPP, 0,001 % Antifoam Y-30 och 0,01 % Tween 80 med en hastighet av 650 ml/min.</p> <p>Sekundär koncentrerings genomfördes genom att percipiera 300 ml av ultrafiltratet med 12 % PEG 8000, 1 % köttpulver och 0,3 M NaCl. Efter inkubering på skak med 250 rpm vid 5 °C över natt centrifugerades lösningen vid 10 000 x g under 30 min vid 5 °C. Supernatanten togs bort och pelleten centrifugerades ytterligare en gång vid 10 000 x g under 5 min. Återstående pellet resuspenderades i 1-4 ml PBS med 0,001 % Antifoam Y-30 och 0,01 % Tween 80. Efter resuspendering av pellet erhöles en volym av 5 ml för vatten från Görväln och dricksvatten och 8 ml för vatten från Almunge.</p>
<p>Extraktion och molekylärbiologisk metod</p>	<p>Nukleinsyraextraktion med NucliSens MiniMAG (Biomerieux): Två olika protokoll jämfördes, standardprotokoll (A) eller modifierat protokoll (B).</p> <p>A) 1 ml av resuspenderad pellet blandades med 2 ml lysisbuffert, inkuberades 10 min följt av tillsats av 10 µl silikakulor och tillverkarens instruktioner följdes.</p> <p>B) 1 ml resuspenderad pellet blandades med 600 µl lysisbuffert, vortexades och inkuberades 10 min. 300 µl kloroform tillsattes, blandas och inkuberas 3 min innan centrifugering 14000 x g, 5 min. Supernatanten överfördes till 1,4 ml lysisbuffert, vortexades och inkuberades 10 min vid RT. Därefter tillsattes 50 µl silikakulor och tillverkarens instruktioner följdes.</p> <p>Extraherad nukleinsyra renades med OneStep inhibitor removal kit. 4 positiva extraktionskontroller analyserades, en för varje virus spikningskoncentration och en för varje extraktionsprotokoll. 4 olika RT-qPCR kits testades:</p> <p>1) TaqMan Fast Virus 1-Step Master Mix (Applied Biosystems) 2) SensiFast Probe No-ROX One-Step Kit (Bioline), 3) One-Step PrimeScript RT-PCR Kit (Clontech), qScript XLT one-step RT-qPCR ThougMix (Quanta Biosciences) med ett LightCycler Nano instrument.</p> <p>För norovirus GI och GII utvärderades modifierade primrar som klarar högre annealingtemperaturer.</p>
<p>Kontrollvirus</p>	<p>Mengovirus användes som positiv processkontroll i alla proverna. Positiv extraktionskontroll för varje virus (norovirus GI, GII och HAV) användes för att avgöra spikningskoncentrationerna.</p>
<p>Utbyte</p>	<p>Utbytet i högkomplex vatten (Almunge) med standardprotokollet för extraktioner var 0,5 % ± 0,02 för norovirus GI; 0,06 % ± 0,02 för norovirus GII; 0,06 % ± 0,01 för HAV; 0,8 % ± 0,4 för mengovirus. Med modifierade protokollet var motsvarande utbyte</p>

	<p>13 % ± 0,8; 8 % ± 0,7; 4 % ± 0,3; 33 % ± 3. För mellankomplexa vatten (Görväln) med standardprotokollet var utbytet 14 % ± 2 för norovirus GI; 11 % ± 1 för norovirus GII; 7 % ± 0,5 för HAV; 42 ± 6 för mengovirus. Med modifierade protokollet var motsvarande utbyte 17 % ± 7; 21 % ± 2; 8 % ± 2; 45 % ± 5. För lågkomplexa vatten (dricksvatten) med standardprotokollet var utbytet 124 % ± 20 för norovirus GI; 89 % ± 8 för norovirus GII; 32 % ± 2 för HAV; 80 % ± 22 för mengovirus. Med modifierade protokollet var motsvarande utbyte 65 % ± 9; 65 % ± 2; 25 % ± 4; 49 % ± 5. Modifierade protokollet vara bara signifikant bättre för högkomplexa vatten.</p>
Övriga resultat	<p>Modifierade primrar för norovirus GII sänkte LOD₉₅ med två tredjedelar jämfört med standardprimrar, samma effekt sågs inte för norovirus GI. C_q-värden för TaqMan Fast Virus 1-Step Master (Applied Biosystems) påverkades inte av tillsats av 10 µl ultrafilteringseluat till skillnade mot övriga testade kit som uppvisade hämning.</p>

Rapporten sammanställer analysmetoder som tagits fram för att påvisa norovirus i råvatten och dricksvatten. Rapporten inkluderar projekt i Norden under perioden 2008–2017 och ett urval publicerade artiklar.

Sammanställningen utgör en grund för vidare utveckling av metoder och ger en nulägesbild av kunskapen inom området.

Rapporten riktar sig till de som har intresse av påvisning av virus i vatten, framför allt dricksvattenproducenter, utvecklingsingenjörer, VA-konsulter, forskare och smittskyddsläkare.



Folkhälsomyndigheten

Solna Nobels väg 18, SE-171 82 Solna **Östersund** Forskarens väg 3, SE-831 40 Östersund.

www.folkhalsomyndigheten.se