

Hvordan kan vi vite om vannet vårt inneholder virus?

Om påvisning av humanpatogene virus i vann

Av Mette Myrmel

Mette Myrmel er ansatt ved Institutt for Mattrygghet og Infeksjonsbiologi, Norges Veterinærhøgskole.

Innlegg på fagtreff 11. oktober 2004.

Aktuelle agens

Virus har de siste 10-15 årene fått økt oppmerksomhet i forbindelse med utbrudd av vannbåren sykdom. Spesielt norovirus (tidligere kalt Norwalk-liknende virus) har forårsaket en rekke utbrudd av gastroenteritt, i Norge og internasjonalt, der drikkevannet har vært smitekilden (1, 2). Teoretisk sett er det flere virus med en fekal-oral smittevei som kan forårsake slike utbrudd. Både rota-, astro- og enterisk adenovirus smitter denne veien, men forårsaker ikke vannbårne utbrudd slik som norovirus gjør. Årsaken er trolig at norovirus kun induserer kortvarig immunitet, mens de andre gir en livslang immunitet. Det gjør at store deler av befolkningen til enhver tid er mottakelige for infeksjon med norovirus, mens infeksjoner i barndommen forhindrer reinfeksjon senere i livet med rota-, astro- og enterisk adenovirus. Vi kan imidlertid ikke se bort ifra sporadiske tilfeller av vannbåren smitte med alle de nevnte agens.

Sporadiske tilfeller av vannbåren smitte med hepatitt A virus (HAV) i Norge kan heller ikke utelukkes, selv om sannsynligheten er lav. Vi har en lav prevalens av registrerte HAV-tilfeller og gode sanitære forhold. Likevel, i en undersøkelse av avløpsvann i Oslo-området ble HAV påvist i 10 % av prøvene fra ubehandlet vann (3). Hepatitt A virus ble også påvist i en prøve av rensset avløpsvann. Det er sannsynlig at avløpsvann fra andre store norske byer også inneholder HAV i påvisbare mengder. Barn har gjerne asymptomatiske HAV-infeksjoner, men skiller likevel ut virus fra tarmen. Dette bidrar trolig til funnene av HAV i små prøvevolum av avløpsvann (4). Under uheldige omstendigheter, der avløpsvann forurenser drikkevann samtidig som drikkevannsbehandlingen feiler, vil HAV være et potensielt smittestoff. På grunn av lav immunitet mot HAV i den norske befolkningen er mottakeligheten for viruset stor.

Videre finnes det en rekke enterovirus med en fekal-oral smittevei som hyppig blir påvist i vann (5, 6). Disse

forårsaker imidlertid i stor grad asymptomatiske infeksjoner og det er ukjent hvorvidt det forekommer vannbårne sykdomstilfeller i Norge.

Påvisning

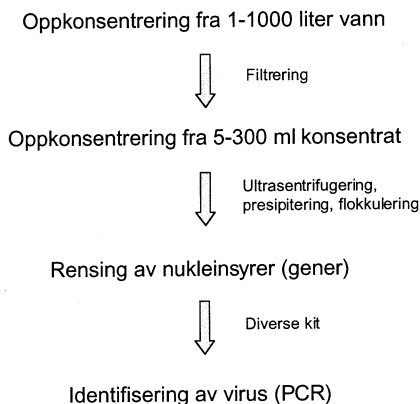
Det hadde vært gunstig å kunne benytte en indikatororganisme for fekal forurensning av vann fordi det eksistere så mange forskjellige enteriske virus som kan smitte denne veien. Dagens indikatorbakterier er imidlertid ikke ideelle med tanke på virus. De har dårligere overlevelsessevne i miljøet og inaktiveres mer effektivt ved vannbehandling enn virus (7). Direkte påvisning av virus i vann har derfor blitt aktuelt i flere situasjoner.

I oppklaring av utbruddssituasjoner vil direkte viruspåvisning være til nytte, spesielt hvis det epidemiologiske bildet er uklart. Som regel vil imidlertid den sikreste måten å knytte virus til drikkevann være å benytte epidemiologisk utredning fordi viruspåvisning er vanskelig. Likevel, viruspåvisning er ikke umulig og i en del tilfeller har man klart å påvise norovirus i vannkilden eller i drikkevannet (8, 9, 10). Viruspåvisning er også nødvendig for å gjøre risikoanalyser. Man trenger da kunnskap om utbredelse av virus i vannkilder, overlevelsessevne og effekt av eventuell vannbehandling.

Det er flere utfordringer forbundet med viruspåvisning i vann; to vesentlig problemer er de vanligvis lave konsentrasjonene av virus som finnes i vann og innholdet av organisk materiale som kan interferere med påvisningen. Påvisning av virus i

råvann og særlig i behandlet drikkevann krever først oppkonsentrering av viruspartiklene. Selve påvisningen blir i dag gjort med molekylærmetodikk, det vil si at man påviser kjente områder av virusgener. Metoden som benyttes er polymerasekjedereaksjon (PCR) som er veldig følsom, men som er sårbar for inhiberende stoffer (for eksempel humus i vannet). En annen ulempe med PCR er at vi ikke vet om genene vi påviser stammer fra infektive viruspartikler. Foreløpig har vi ikke noe alternativ til PCR fordi tradisjonell virusdiagnostikk med virusdyrking ikke kan benyttes på NV og HAV. Norovirus kan ikke dyrkes og miljøstammer av HAV er vanskelige å dyrke. Trinnene i en standard viruspåvisning blir dermed: oppkonsentrering (2 runder), rensing av nukleinsyrer (gener) og identifisering av virus (PCR), Figur 1.

Figur 1. Figuren viser de enkelte trinnene som utgjør prosedyren for påvisning av virus i vann.



Oppkonsentrering av virus fra vann

Vannvolumet det blir analysert på vil variere med målet for analysen. En screening av vannkilder som antas å ha en liten grad av fekal forurensning vil kreve et stort volum på opptil 1000 liter. Et slikt prøvevolum krever selvfølgelig at prøven oppkonsentreres på stedet. I en utbruddssituasjon der man analyserer på råvann med høyere forurensningsgrad kan volumet reduseres til ca. 10 liter. En slik prøve kan sendes inn til Norges Veterinærhøgskole for analyse.

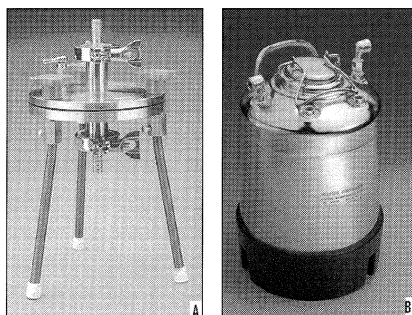
Det finnes en rekke metoder for oppkonsentrering og det finnes ingen standardisert metodikk. Metoden velges ut ifra blant annet volum og kvalitet på vannet. På vannvolum fra 10 til 1000 liter er det mest hensiktsmessig å benytte filtrering. Her er det to forskjellige prinsipper; ultrafiltrering der virus holdes tilbake på grunn av ekstremt små poreåpninger i filteret og vanlig filtrering der virus adsorberer til filteret. Ved å benytte materiale som har en motsatt ladning til viruspartikkelen oppnår man at virus adsorberer til filtre med store poreåpninger. Filtrene kan ha en porestørrelse på 0,45 mm i diameter, mens norovirus har en diameter på ca. 30 nm. I vannet vil virus gjerne være festet til partikulært materiale, men selv frie viruspartikler vil kunne adsorbere under de rette forholdene.

I vann med nøytral pH vil de aktuelle virus ha en negativ ladning. Ved bruk av negativt ladet filter (for eksempel HAWPO4700, Millipore), må vannet forbehandles ved senkning av pH og tilsetning av ioner for å oppnå virusadsorpsjon. Dette er

upraktisk ved filtrering av store volum. Da benyttes i stedet et noe dyrere positivt ladet filter (Virosorb 1-MDS, Cuno) slik at forbehandling av vannet er unødvendig.

For vannvolum på over 50 liter må man bruke sylindrefiltre, mens mindre volum kan filtreres gjennom diskformede membranfiltre av forskjellig størrelse (for eksempel 47 mm og 130 mm i diameter). For de største membranfilterne må man benytte en kraftig filterholder og en trykktank for håndtering av vannprøven, Figur 2.

Figur 2. A, filterholder for et 130 mm membranfilter. B, trykktank. (Bildene er gjengitt med tillatelse fra Millipore).



Eluering av virus fra filteret

Etter første runde med oppkonsentrering vil viruspartiklene finnes fritt i retentatet (ultrafiltrering) eller festet til filteret (vanlig filtrering). I sistnevnte tilfelle må viruspartiklene vaskes ut av filteret. Til dette benyttes en proteinrik (gjerne glycin) buffer med høy pH. Avhengig av type og størrelse på filteret, vil buffervolumet variere fra 5-300 ml.

Rekonsentrering av virus fra retentat eller elueringsbuffer

For å oppnå et endelig viruskonsentrat på ca. 1 ml, må virus rekonstreres. Små volum på 5-300 ml gjør at metodespekteret er stort; ultrafiltrering, filtrering, ultrasentrifugering, PEG-presipitering, flokkulering og immunomagnetisk separasjon er metoder som kan benyttes.

Ekstrahering og rensing av nukleinsyrer

Ved oppkonsentrering av viruspartikler blir også andre partikler og organisk materiale i vannet oppkonsentrert. Poenget med rensing er å bli kvitt mest mulig av dette materialet og ioner slik at den enzymatiske PCR-reaksjonen ikke blir inhibert. Det finnes en rekke kommersielle kit på markedet for rensing av RNA og DNA som skal benyttes til molekylær diagnostikk. Ved å ekstrahere nukleinsyrer fra et viruskonsentrat på 0,5-1 ml ender man opp med et sluttprodukt på 40-80 µl.

Molekylær påvisning (PCR)

Når man kjenner nukleotidsekvensen til hele eller deler av et genom kan man, ved hjelp av PCR, amplifisere opp et bestemt område som så kan påvises ved gelkjøring (manuell avlesning) eller ved real-time PCR (maskinell avlesning). Real-time PCR er en mer følsom påvisningsmetode og benyttes nå for både NV og HAV.

Viruspåvisning i vann er altså en relativt omstendelig prosess med mange trinn. I hvert trinn mister man en del viruspartikler, samtidig som man drar med seg en del organisk materiale som innvirker negativt på

videre analysering. Som et alternativ til direkte påvisning av potensielt patogene virus som NV og HAV er flere grupper av indikatorvirus lansert (6, 7, 11). De aktuelle indikatorvirus er bakteriofager som infiserer bakterier. En fordel med å benytte disse bakteriofagene er at de relativt enkelt kan dyrkes i sin bakterievert, slik at man kan påvise infektive virus og ikke bare virusgener som ved molekylær påvisning av NV og HAV.

Det kan være aktuelt å benytte bakteriofager som et supplement til dagens indikatorbakterier. Mye forskning gjenstår imidlertid før bakteriofager kan benyttes rutinemessig ved vannanalyser.

Referanser

- 1 Nygard K, Gondrosen B, Lund V. Sykdomsutbrudd forårsaket av vann i Norge. Tidsskr Nor Laegeforen 2003; 123: 3410-3.
- 2 Blackburn BG, Craun GF, Yoder JS, Hill V, Calderon RL, Chen N et al. Surveillance for waterborne-disease outbreaks associated with drinking water--United States, 2001-2002. MMWR Surveill Summ 2004; 53: 23-45.
- 3 Myrmel M, Berg EMM, Grinde B, Rimstad E. Enteric viruses in inlet and outlet samples from sewage treatment plants. J Water and Health 2004: Submitted manuscript.
- 4 Wilson ME, Kimble J. Posttravel hepatitis A: probable acquisition from an asymptomatic adopted child. Clin Infect Dis 2001; 33: 1083-5.

- 5 Ali MA, Al Herryay AZ, El Hawaary SE. Detection of enteric viruses, Giardia and Cryptosporidium in two different types of drinking water treatment facilities. *Water Res* 2004; 38: 3931-9.
- 6 Mendez J, Audicana A, Cancer M, Isern A, Llana J, Moreno B et al. Assessment of drinking water quality using indicator bacteria and bacteriophages. *J Water Health* 2004; 2: 201-14.
- 7 Havelaar AH, van Olphen M, Drost YC. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol* 1993; 59: 2956-62.
- 8 Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, von Bonsdorff CH. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 1999; 180: 1771-6.
- 9 Hafliger D, Hubner P, Luthy J. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *Int J Food Microbiol* 2000; 54: 123-6.
- 10 Nygard K, Torven M, Ancker C, Knauth SB, Hedlund KO, Giesecke J et al. Emerging genotype (GGIIB) of norovirus in drinking water, Sweden. *Emerg Infect Dis* 2003; 9: 1548-52.
- 11 Duran AE, Muniesa M, Moce-Llivina L, Campos C, Jofre J, Lucena F. Usefulness of different groups of bacteriophages as model micro-organisms for evaluating chlorination. *J Appl Microbiol* 2003; 95: 29-37.