
Svenskt Vatten

UTVECKLING

Rapport

Nr 2025-16

Version 2

Virus i dricksvatten – förmåga att infektera och reduktion efter rening

Kristina Nyström



Svenskt Vatten

UTVECKLING

Svenskt Vatten Utveckling (SVU) är kommunernas eget FoU-program om kommunal VA-teknik. Programmet finansieras i sin helhet av kommunerna. Programmet lägger tonvikten på tillämpad forskning och utveckling inom det kommunala VA-området.

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

Svenskt Vatten Utveckling

Svenskt Vatten AB

POSTADRESS BOX 14057, 16714 Bromma

BESÖKSADRESS Gustavslundsvägen 12, 16751 Bromma

TELEFON 08-506 002 00

E-MAIL svensktvatten@svensktvatten.se

www.svensktvatten.se

RAPPORTENS TITEL	Virus i dricksvatten – förmåga att infektera och reduktion efter rening
TITLE OF THE REPORT	Viruses in drinking water – ability to infect and reduction after purification
FÖRFATTARE	Kristina Nyström, Institutionen för infektionssjukdomar, Göteborgs universitet
RAPPORTNUMMER	2025-16, version 2
ANTAL SIDOR	36
SAMMANDRAG	Projektet har med molekylära tekniker identifierat virus som ofta förekommer i vattentäkter, och dessutom bedömt hur effektiva dagens mikrobiologiska barriärer är när det gäller att minska virusnivåer vid vattenverk. Både avskiljande barriärer som filtrering och inaktiverande barriärer som UV-ljus, klor och klordioxid har undersökts. Effekten av UV-ljus, klor och klordioxid undersöktes också när det gällde humana virus överlevnadsförmåga och infektionsförmåga.
SUMMARY	Using molecular techniques, the project has identified viruses that are commonly found in water sources, and also assessed how effective current microbiological barriers are at reducing virus levels in water treatment plants. Both separating barriers such as filtration and inactivating barriers such as UV light, chlorine, and chlorine dioxide were investigated. The effect of UV light, chlorine, and chlorine dioxide was also studied in terms of viral survival and infectivity in cultured cells.
SÖKORD	Dricksvatten, ultraviolet ljus, UV-ljus, klor, klordioxid, desinfektion, virusviabilitet, vattenverk, virom, metagenomik, RT-qPCR
KEYWORDS	Drinking water, ultraviolet light, chlorine, chlorine dioxide, disinfection, virus viability, drinking water treatment plant, virome, metagenomics, RT-qPCR
MÅLGRUPPER	Vattenverkspersonal, vattenforskare, virologer
RAPPORT	Finns att hämta hem som pdf från Vattenbokhandeln. https://vattenbokhandeln.svensktvatten.se/
UTGIVNINGÅR	2026
UTGIVARE	© Svenskt Vatten AB
REFERENS	Nyström K. (2025). <i>Virus i Dricksvatten – förmåga att infektera och reduktion efter rening</i> . SVU-rapport 2025-16, version 2. Stockholm: Svenskt Vatten.

Om projektet

PROJEKTNUMMER	20-102
PROJEKTETS NAMN	Virus i dricksvatten – Viabilitet och reduktion efter rening
PROJEKTETS FINANSIERING	Svenskt Vatten Utveckling

Förord

Kunskapen kring virusförekomst i dricksvatten är bristfällig eftersom det har saknats lämpliga analysmetoder. De flesta humanpatogena virus som kan finnas i och spridas med vatten är storleksmässigt betydligt mindre än bakterier och de kan inte odlas, utom ett fåtal som kan växa i cellkultur. De är därför svåra att påvisa och det behövs nya specifika analystekniker för att kunna bedöma den mikrobiologiska barriärverkan på virus både vid desinfektion och vid avskiljning. Detta projekt har undersökt desinfektionsmetoder för inaktivering av virus samt förekomst och rening av virus vid dricksvattenverk i Sverige.

Göteborgs universitet har i samarbete med Lunds universitet och sex olika VA-organisationer (Norrvatten, Kretslopp och vatten Göteborgs stad, Stockholm Vatten och Avfall, Sydvatten, Vatten & Miljö i Väst AB samt Nodra AB) samlat in vatten under ett års tid för att studera de olika reningsstegen vid vattenverken med avseende på virusförekomst. Vatten har även analyserats vid Göteborgs universitet gällande virus förmåga att infektera celler efter UV- och klorbehandling. Vi som har arbetat med projektet är, förutom jag själv, Daniel Hellström, Norrvatten, Olof Bergstedt och Henrik Rydberg, Kretslopp och vatten Göteborgs stad, Ebru Poulsen, Stockholm Vatten och Avfall, Britt-Marie Pott, Sydvatten AB, Alexander Keucken, Vivab, och Bodil Widell, Nodra AB.

Detta är version 2 av SVU-rapport 2025-16, där vi har förtydligat information framför allt kring vattenverkens reningssteg, men även kring inaktivering av virus med klor.

Jag hoppas att detta material ska ge mer information gällande virusrening av vatten. Vi vill rikta ett stort tack till alla som hjälpt till i detta projekt.

Kristina Nyström, projektledare

Innehåll

Förord.....	2
Sammanfattning.....	4
Summary	5
Ordlista.....	6
1 Inledning.....	7
1.1 Bakgrund	7
1.2 Projektets syfte och frågeställningar	7
1.3 Projektets genomförande	8
1.4 Rapportens disposition.....	8
2 Fakta om virus i vatten	9
2.1 Struktur.....	10
2.2 Spridning	10
2.3 Detektion.....	11
2.4 Andra virus i människans magtarmkanal	12
2.5 Övriga virus	12
3 Vattenverkens mikrobiologiska barriärer	13
3.1 Avskiljning av virus.....	13
3.2 Inaktivering av virus.....	14
4 Material och metoder	15
4.1 Virusinfektioner.....	15
4.2 UV-behandling	15
4.3 Klor- och klordioxidbehandling	16
4.4 NGS-detektion av virus i vattenprover	17
4.5 RT-qPCR-detektion av virus i vattenprover	19
5 Resultat och diskussion	20
5.1 Inaktivering av virus med UV-ljus.....	20
5.2 Inaktivering av virus med klor och klordioxid.....	21
5.3 Virus i råvatten och dricksvatten detekterade med NGS.....	24
5.4 Viruseliminering i sex olika vattenverk	27
6 Slutsatser och lärdomar	31
6.1 Slutsatser	31
6.2 Råd och framtida möjligheter	32
Referenser.....	33

Sammanfattning

Projektet har med molekylära tekniker identifierat virus som ofta förekommer i vattentäkter, och dessutom bedömt hur effektiva dagens mikrobiologiska barriärer är när det gäller att minska virusnivåer vid vattenverk. Både avskiljande barriärer som filtrering och inaktiverande barriärer som UV-ljus, klor och klordioxid har undersökts. Effekten av UV-ljus, klor och klordioxid undersöktes också när det gällde humana virus överlevnadsförmåga och infektionsförmåga.

Kunskapen kring virusförekomst i dricksvatten är bristfällig då det har saknats lämpliga analysmetoder. De flesta humanpatogena virus i vatten är storleksmässigt betydligt mindre än bakterier och kan inte odlas; ett fåtal kan växa i cellkultur. De är därför svåra att påvisa och nya specifika tekniker behövs för att kunna bedöma den mikrobiologiska barriärverkan på virus både vid avskiljning och desinfektion. De molekylära metoder som utvecklades i projektet kan användas för att övervaka virusnivåer i vattenverk och för att studera vattenverkens effektivitet.

Göteborgs universitet har i samarbete med sex VA-organisationer studerat reningsstegen vid vattenverken med avseende på virusförekomst. Prover samlades in från sex vattenverk varannan månad under ett års tid från råvatten, dricksvatten och de olika reningsstegen. Råvatten och dricksvatten analyserades med en ny metod, *next-generation sequencing* (NGS). Man hittade 152 olika virus tillhörande 76 olika familjer i vattenproverna. Majoriteten av alla virus var bakteriofager. Vissa virus kunde hittas både i råvatten och i det renade dricksvattnet. De virus som studerades närmare visade att virusnivåerna minskade mellan 0,52 log₁₀ (3,3 gånger) och 4,4 log₁₀ (25 100 gånger) från råvattnet till dricksvattnet.

Fyra olika virus valdes ut som kunde hittas med NGS i relativt hög nivå i många prover. Från dessa virus analyserades RNA och DNA med RT-qPCR, en metod som kan mäta exakt hur mycket virusgener som finns i ett prov. Resultaten visade att ultrafiltrering avlägsnade större virus mest effektivt, men andra barriärer som snabb sandfiltrering med föregående koagulering och sedimentering verkade vara effektiva för att även avlägsna mindre virus. Effektiviteten hos vissa barriärer påverkades av faktorer som temperatur, virustyp och olika vattenkällor. En barriär räckte inte för att avlägsna alla typer av virus, utan flera barriärer behövdes.

Viruset PMMoV hittades i relativt hög mängd i proverna och kan vara ett ytterligare verktyg som kan användas som en markör för mängden avföring i vatten samt för att övervaka dricksvatten som förorenats med virus i människans magtarmkanal. PMMoV är ett virus som infekterar paprika och chilifrukt, och utsöndras i human avföring.

Vatten har också analyserats gällande virus förmåga att infektera celler efter UV- och klorbehandling. Tre olika virus användes: enterovirus, rotavirus och adenovirus. Cellkulturer infekterades med virus som hade utsatts för olika mängder UV-ljus. En UV-dos på 400 J/m² var effektivt för att inaktivera virus med enkelsträngade genom, men 600 J/m² behövdes för att inaktivera virus med dubbelsträngade genom. 600 J/m² UV-m² minskade virus infektivitet med 3 log₁₀ (1 000 gånger), där 400 J/m² används vid många dricksvattenverk. Vid behandling av vatten med klor och klordioxid uppnåddes 3 log₁₀-reduktion av virus redan efter två minuters behandling, men höga nivåer av organiskt material i vattnet minskar effekten av klor och leder till att en hög dos av klor krävs för att få mätbara nivåer av klor i vattnet efter 120 minuter.

Summary

Using molecular techniques, the project has identified viruses that are commonly found in water sources, and also assessed how effective current microbiological barriers are at reducing virus levels in water treatment plants. Both separating barriers such as filtration and inactivating barriers such as UV light, chlorine, and chlorine dioxide were investigated. The effect of UV light, chlorine, and chlorine dioxide was also studied in terms of viral survival and infectivity in cultured cells.

Knowledge about virus occurrence in drinking water is limited due to the lack of suitable analysis methods. Most human pathogenic viruses that can be present in and spread through water are significantly smaller than bacteria and cannot be cultivated, except for a few that can grow in cell culture. They are therefore difficult to detect, and new, specific analytical techniques are needed to assess the microbiological barrier effect on viruses, both for separation and disinfection. The methods developed in the project can be used to monitor virus levels in water treatment plants and to study their effectiveness.

The University of Gothenburg, in collaboration with Lund University and six water and wastewater organisations, studied the purification stages in water treatment plants in regard to virus presence. Samples were collected from six water treatment plants every other month over the course of a year from raw water, drinking water, and the various purification stages. Raw water and drinking water were analysed using a new method called next-generation sequencing (NGS). A total of 152 different viruses belonging to 76 different families were found in the water samples. The majority of all viruses were bacteriophages. Some viruses were found in both raw water and the treated drinking water. Closer study of selected viruses showed that virus levels decreased between $0.52 \log_{10}$ (3.3 times) and $4.4 \log_{10}$ (25,100 times) from raw water to drinking water.

Four different types of viruses that were found at relatively high levels in many samples were selected for analysis using NGS. RNA and DNA from these viruses were analysed using RT-qPCR, a method that can accurately measure the amount of virus genome present in a sample. Ultrafiltration was found to remove larger viruses most effectively, but other barriers such as rapid sand filtration with coagulation and sedimentation appeared to be more effective at removing smaller viruses as well. The effectiveness of certain barriers was influenced by factors such as temperature, virus type, and different water sources. A single barrier was not sufficient to remove all types of viruses, and multiple barriers were needed.

PMMoV was found in relatively high amounts in the samples and may be an additional tool that can be used as a fecal virus indicator for monitoring drinking water contaminated with enteric viruses – that is, viruses found in the human gastrointestinal tract. PMMoV is a virus that infects peppers and chili fruits and is excreted in human feces.

Water was also analysed at the University of Gothenburg for the ability of viruses to infect cells after UV and chlorine treatment. Three different viruses were used: enterovirus, rotavirus, and adenovirus. Cell cultures were infected with viruses that had been exposed to varying amounts of UV light. A UV-dose of 400 J/m^2 was effective for inactivating viruses with single-stranded genomes, but 600 J/m^2 was needed to inactivate viruses with double-stranded genomes. 600 J/m^2 of UV light reduced viral infectivity by $3 \log_{10}$ (1,000 times). When treating water with chlorine and chlorine dioxide, a $3 \log_{10}$ virus reduction was achieved after just two minutes of treatment, but high levels of organic material in the water reduced the effectiveness of chlorine.

Ordlista

Adenovirus	Virus som kan orsaka förkylning eller magsjuka
Astrovirus	Virus som kan orsaka magsjuka
Bakteriofager	Virus som infekterar bakterier
Barriärer i vattenverk	Reningssteg vid vattenverk
Calicivirus	Virus som orsakar vinterkräksjukan
Ct-värde	Den nivå där ett virus kan detekteras med RT-qPCR
CT-värde	Koncentration gånger tid vid klorbehandling
Desinfektion	Att påverka en mikroorganism så den inte kan infektera
Echovirus	Ett virus som infekterar magtarmkanalen
Enteriska virus	Gruppen av virus som infekterar magtarmkanalen
Enterovirus	En grupp virus som infekterar magtarmkanalen, men även luftvägarna
Humanpatogener	Mikroorganismer som orsakar sjukdom hos människor
Inaktivering av virus	Att behandla ett virus så att det inte kan infektera längre
Indikatorvirus	Ett virus som kan användas för att visa på mängd av biologiskt material, t.ex. avföring
Infektivitet	Förmåga hos mikroorganism att orsaka infektion
Kapsid	Proteinlager som skyddar virusets genom
Metagenomik	Sekvensering av allt genomiskt material
Next-generation sequencing (NGS)	Ny metod för att analysera många olika kopior av ett genetiskt material som amplifierats med PCR
Norovirus	Ett virus som tillhör gruppen calicivirus
Pepper milde mottle virus (PMMoV)	Ett virus som infekterar chili- och paprikafrukter och kan återfinnas i mänsklig avföring
PCR	En metod som används för att amplifiera en viss DNA-sekvens
Rotavirus	Ett virus som orsakar magsjuka
Reverse transkription kvantitativ PCR (RT-qPCR)	En metod som används för att visa exakt hur mycket virus som finns i ett prov
Ultrafiltrering	Membranbaserad filtreringsteknik
UV-ljus	Ljus med våglängd kortare än synligt ljus
Viabilitet	Virus förmåga att fortsatt kunna orsaka infektion

1 Inledning

1.1 Bakgrund

Kunskapen kring virusförekomst i dricksvatten är bristfällig eftersom det har saknats lämpliga analysmetoder. De flesta humanpatogena virus som kan finnas i och spridas med vatten är storleksmässigt betydligt mindre än bakterier och de kan inte odlas, utom ett fåtal som kan växa i cellkultur. De är därför svåra att påvisa och det behövs nya specifika analystekniker för att kunna bedöma den barriärverkan som vattenverkens två principer av mikrobiologiska barriärer (avskiljning och inaktivering) har på virus. Vid användning av ”nya” barriärer som UV-ljus och ultrafiltrering (UF) krävs det kunskap om olika virus tålighet för UV-ljus respektive storlek i förhållande till porvidden vid ultrafiltrering.

Vi känner inte till om barriärverkan för virus är tillfyllest med de metoder som används i dag i vattenverken eller om den behöver förbättras, t.ex. med ökad avskiljning eller högre UV-dos, eller med andra kompletteringar av beredningen. Dessutom finns det behov av att bedöma barriärverkans effektivitet om halten av patogena virus i råvatten skulle vara högre än vad som är känt att beredningen nu klarar.

Lite är också känt när det gäller om antal virustyper och virusmängd har någon säsong- och/eller geografisk variation i råvatten i förhållande till renat dricksvatten, speciellt när det gäller humanpatogener, det vill säga virus som framkallar sjukdom hos människor. Det är osannolikt att det inom överskådlig tid kommer att finnas snabba och allmänt tillgängliga kvantifieringsmetoder för att påvisa alla humanpatogena virus i större volymer vatten. Därför behövs det kvantitativa analyser både av olika patogena virus i råvatten och av virus som kan användas som markörer för virusreduktion (indikatorvirus). Indikatorvirus kan påvisa förändringar i virusmängder. För att kunna användas för bedömning av risk för konsument och olika barriärers riskreduktion behöver en indikatorparameter (i det här fallet virus) kunna detekteras i olika steg i reningsprocessen. Indikatorvirusen behöver finnas och kunna detekteras i tillräckligt hög halt och samtidigt påverkas likartat som sjukdomsframkallande virus för att utgöra en bra indikator.

1.2 Projektets syfte och frågeställningar

Syftet med projektet var:

- att med molekylära tekniker identifiera virus som ofta förekommer i vattentäkter
- att utveckla tekniker där virus som förekommer i vattentäkter kan användas för att studera rening av virus vid vattenverk
- att bedöma effektiviteten av dagens mikrobiologiska barriärer när det gäller att minska virusnivåer vid vattenverk över tid både genom avskiljande barriärer som filtrering och inaktiverande barriärer som UV-ljus, klor och klordioxid
- att undersöka effekten av UV-ljus, klor och klordioxid när det gäller virus överlevnadsförmåga (viabiliteten) samt infektionsförmågan (infektiviteten) på odlade celler.

Frågeställningar som skulle besvaras i projektet:

- Är de mikrobiologiska barriärer som används i dag i vattenverken tillräckliga för att reducera virus, eller behöver de förbättras?
- Överlever vissa virus de desinfektionsbehandlingar som används i dag (UV-ljus, klor, klordioxid)?
- Går det att identifiera möjliga indikatorvirus som kan användas för att påvisa förändringar i virusmängder?

1.3 Projektets genomförande

Projektet genomfördes som ett samarbete mellan Norrvatten, Sydvatten AB, SVOA, Vivab, Nodra, Kretslopp och Vatten, Lunds universitet och Göteborgs universitet.

Projektet har med hjälp av molekylära metoder undersökt desinfektionsmetoder för inaktivering av virus samt förekomst och rening av virus vid ett antal vattenverk i Sverige. Undersökningsmetoderna är utvecklade vid Göteborgs universitet.

I samarbete med Lunds universitet och Kretslopp och Vatten har pilotförsök genomförts på labb vid Göteborgs universitet gällande inaktivering av virus med UV-ljus och klor. Olika virus har satts till vatten som sedan behandlats med UV-ljus av olika doser eller klor och klordioxid i olika koncentrationer. Därefter har det undersökts hur dessa virus kunde infektera celler efter denna behandling.

Universiteten och VA-organisationerna samlade in vattenprover varannan månad under ett års tid. De olika reningsstegen vid vattenverken studerades med avseende på virusförekomst. Vattenprover som samlats in analyserades vid Göteborgs universitet för att studera vilka virus som hittades i de olika vattenverken. Analyser utvecklades för att mäta mängder av virus som hittas vid olika vattenverk för att studera hur mycket virus som renas bort i de olika reningsstegen. Förväntningen var att deltagande vattenverk skulle få en bild av den totala förekomsten och reduktionen av virusmängden efter desinfektion och avskiljning.

1.4 Rapportens disposition

Kapitel 2 i rapporten är en kunskapssammanställning av fakta om virus i vatten.

Kapitel 3 beskriver vattenverkens olika mikrobiologiska barriärer.

Kapitel 4 handlar om material och metoder som har använts i projektet.

Kapitel 5 innehåller resultat och diskussion.

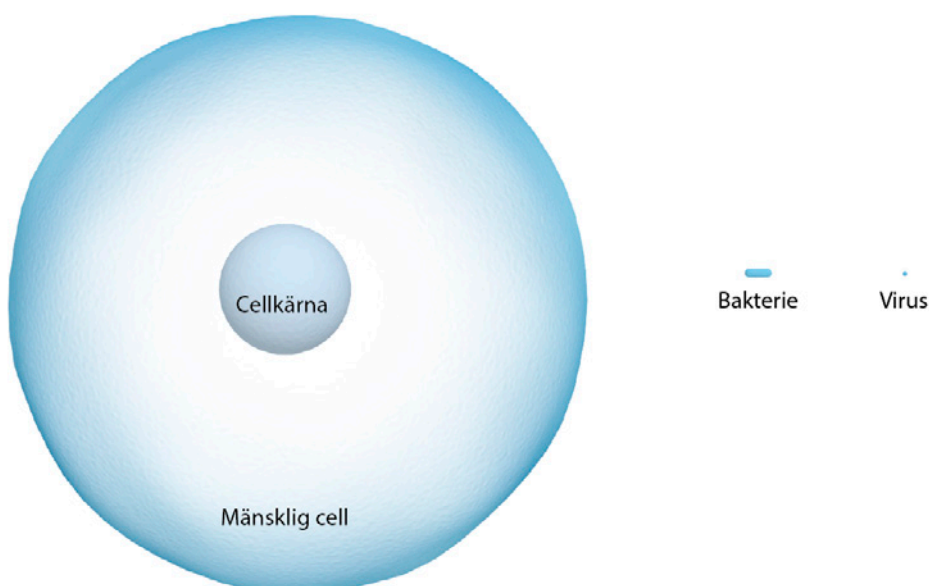
Kapitel 6 omfattar slutsatser om projektets frågeställningar. Där finns också råd till vattenverken och tankar om framtida möjligheter på området virus i dricksvatten.

2 Fakta om virus i vatten

Virus är mycket små partiklar som består av ett genetiskt material, RNA eller DNA som en ensam sträng eller dubbelsträngad, som skyddas av ett lager med proteiner (kapsiden). Vissa virus har även ett membran med fett (hölje) utanför kapsiden där det sitter olika proteiner fästa. För att virus ska kunna föröka sig behöver de celler. Virus binder till celler med proteinerna i höljet eller med delar av kapsiden. Efter att viruset har bundit till en cell så tas den upp av cellen och utnyttjar cellens system att göra proteiner och kopiera genetiskt material för att göra flera kopior av viruset. Dessa tar sig sedan ut från cellen för att kunna infektera nya celler.

Figur 2.1 är en storleksjämförelse mellan virus, bakterier och mänskliga celler.

Hur stort är ett virus?



Figur 2.1

Virus är mycket små jämfört med mänskliga celler.

(Källa: www.genteknik.se/ordlista/virus. Illustratör: Gunilla Elam)

De flesta virus som är associerade med vattenburen smitta infekterar magtarmkanalen, dvs. de är enteriska virus. Enteriska virus hittas i kontaminerade vattenkällor samt mat. Det finns i dag mer än 150 olika enteriska virus (Gall et al. 2015). Dessa virus tillhör olika virusfamiljer, som Adenoviridae (adenovirus), Reoviridae (rotavirus och reovirus), Picornaviridae (enterovirus), Astroviridae, Hepeviridae (hepatit E-virus) och Caliciviridae (norovirus och sapovirus).

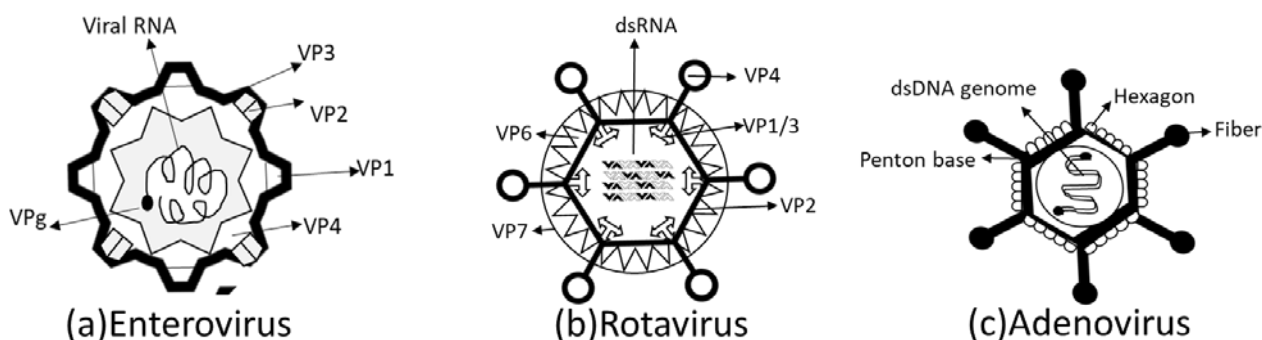
Enteriska virus orsakar oftast sjukdom i form av gastroenterit (magsjuka) med kort inkubationsperiod, men kan även orsaka svårare sjukdom hos gravida kvinnor, små barn, äldre och individer med nedsatt immunförsvar. Enteriska virus kan utsöndras i höga nivåer i avföring, med 10^{11} kopior/g faeces (Gray 2011; Yezli and Otter 2011). De förökar sig i celler i tarmen och är relativt tåliga för värme, torka, surt pH, desinfektionsmedel och i vissa fall även UV-ljus. De kan vara infektiösa även ner till under 10 kopior (Teunis et al. 2008). I vanliga fall brukar avloppsrening eliminera 20–80 % av dessa virus (Cloete et al. 1998; La Rosa et al. 2012). Det gäller även för svenska förhållanden.

2.1 Struktur

Projektet har använt enterovirus (echovirus), rotavirus och adenovirus (Figur 2.2). Enterovirus är enkelsträngade RNA-virus som är små till storleken, 30 nm, och saknar hölje. Virusgenomet är 7 400 baser och kodar för 11 olika proteiner (Dahllund et al. 1995). Rotavirus är dubbelsträngade RNA-virus, utan hölje med ett uppdelat genom bestående av 11 olika segment som kodar för 12 proteiner. Genomet är 18 000 baser och kapsiden är 70–100 nm i diameter (Desselberger 2014). Adenovirus är också virus utan hölje, med dubbelsträngat DNA-genom på 48 000 baser som kodar för 40 gener. Adenovirus kapsid är 90–100 nm i diameter med fibrer som sitter fästa på kapsidens utsida (Kulanayake and Tikoo 2021). Andra virus som används för att mäta virusreduktion är MS2, en bakteriofag som infekterar bakterier. Dessa är enkelsträngade virus, som saknar hölje och är 25–27 nm i diameter.

Figur 2.2

Struktur hos a) enterovirus, b) rotavirus och c) adenovirus.



2.2 Spridning

Enterovirus

Enterovirus tillhör familjen Picornaviridae där echovirus som använts i detta projekt är ett enterovirus. Enterovirus är globalt spridda, men har högre förekomst i områden med sämre sanitära förhållanden och sämre möjlighet för bra hantering av avloppsvatten och rening av dricksvatten. Det förekommer även frekvent utbrott i mera utvecklade länder, framför allt under sommar- och höstsäsonger (Dos Santos et al. 2011; Oberste et al. 1999; Savolainen-Kopra et al. 2011; Yarmolskaya et al. 2015). Nyligen har elva echovirusutbrott med fatala neonatala infektioner rapporterats i Sverige, Storbritannien, Kroatien, Frankrike och Italien (Grapin et al. 2023; Piralla et al. 2023), men där smittkälla till de nya echovirusfallen inte har kunnat fastställas. Enterovirus sprids via kontaminerat vatten, mat eller respiratoriska droppar från en infekterad person (Eichenwald and Shinefield 1962). Sjukdom varierar från väldigt milda symptom till viral hjärnhinneinflammation och hjärtmuskelinflammation. Det finns inget vaccin eller antiviral behandling för enterovirusinfektioner, med undantag av vacciner för poliovirus som är ett enterovirus.

Rotavirus

Rotavirus tillhör familjen Reoviridae, med subfamiljerna Sedovirinae och Spinareovirinae. Sedovirinae är vidare uppdelade i sex undergrupper där rotavirus är en av dem. Rotavirus är vidare uppdelade i grupper A-H, där grupp A är den epidemiologiskt viktigaste för människor. Rotavirus separeras vidare beroende på strukturen av VP4-proteinet på kapsiden, som ger P-serotypen, och proteinet VP7, vars struktur ger G-serotypen. Rotavirus finns således i kombinationer som P[8]G1, P[4]G2, P[8]G3 och P[8]G4. Dessa fyra varianter av rotavirus står för 88 % av all rotavirusinducerad sjukdom hos barn globalt sett (Santos and Hoshino 2005). Rotavirus orsakar 200 000 dödliga

fall årligen globalt, med 90 % av dessa i utvecklingsländer (Lanata et al. 2013; Tate et al. 2012). I industrialiserade länder är rotavirus mera vanligt förekommande under vintersäsong, medan säsongvariationer är mindre uttalade i utvecklingsländer (Patel et al. 2013). Barn under 5 år har störst risk för rotavirusinfektioner. Viruset replikerar (förökar sig) i tunntarmen, men kan spridas systemiskt också till levern, nervsystemet och bukspottkörteln. Rotavirusinfektioner kan vara asymptomatiska (utan symptom) eller orsaka diarré och kräkningar. Symptomen brukar vara i 3–5 dagar med feber och brukar ge med sig efter 7 dagar. Mortalitet vid rotavirusinfektion orsakas oftast av allvarlig dehydrering och hjärtsvikt. IgA-antikroppar i tarmen ger skydd mot infektion. Det finns ingen antiviral behandling mot rotavirus, men väl vaccin. Dessa vaccin är levande orala vaccin, RotaTeq och Rotarix och rekommenderas av WHO i nationella vaccinprogram. Ytterligare två vaccin godkändes 2018: Rotavac och ROTASIL.

Adenovirus

Adenovirus tillhör familjen Adenoviridae, där undergruppen mastadenovirus infekterar människor. Dessa är klassificerade i ytterligare undergrupper A-G (Benko et al. 2022). Det finns 104 olika typer av adenovirus, med majoriteten tillhörande undergrupp D (73 stycken). Många adenovirusepidemier sker på vintern eller tidig vår, men kan ske när som helst på året. Adenovirus B1, C2, E4, C5, C6 och B7 är en vanlig orsak till luftvägsinfektioner hos barn under 5 år. Adenovirus F40 och F41 är vanliga orsaker till gastroenterit. Samtliga av dessa adenovirus står för 60 % av humana adenovirusinfektioner globalt (Goncalves et al. 2011; Iturriza Gomara et al. 2008; Kajon et al. 2010; Marie-Cardine et al. 2002; Soares et al. 2002; Zhu et al. 2009). Inga adenovirusutbrott har beskrivits i Sverige de senaste åren, men F41 hittas regelbundet i avloppsvatten vid miljöövervakning i Sverige (Wang et al. 2023). Inkubationsperioden för F40 och F41 är 8 till 10 dagar och symptom med kräkningar, feber, diarré och magsmärta varar i 7 till 10 dagar. Mortalitet kan ske på grund av akut dehydrering. Cidofovir är ett läkemedel som utvecklats för behandling av cytomegalovirus, men har även visad effekt mot adenovirusinfektion (Gavin and Katz 2002; Naesens et al. 2005).

2.3 Detektion

Enteriska virus detekteras vanligast med hjälp av *reverse transkription kvantitativ PCR* (RT-qPCR). PCR är en metod som kopierar en gen eller annan del av DNA så det blir väldigt många kopior. För att göra kopior av RNA görs först en DNA-kopia med reverse transkriptas. En prob används vid reaktionen för att kunna kvantifiera hur många DNA-kopior som finns. Specifikt virus-RNA och virus-DNA kan detekteras i provmaterial som avföring, halsprover, blod osv. Denna metod är väldigt känslig och kan detektera väldigt få virusgenomkopior, men är även mycket specifik för det virus man letar efter. Virus kan även detekteras via infektion av odlade celler, vilket användes före utvecklingen av RT-qPCR. Den metoden visar om virus är infektiösa, men tar mycket längre tid och är mycket mindre specifik. Olika virus kan dock vara specialiserade för vissa typer av celler. Virusinfektioner kan även detekteras med hjälp av antikroppssvaren från serologiska analyser, där IgM-antikroppar visar ny infektion och IgG-antikroppar visar på en genomgången infektion. Dock är det mycket korsreaktivitet mellan antikroppsvaret mot olika serotyper av enterovirus. Metoder som liknar de som används för att detektera antikroppssvar kan även användas för att detektera virusproteiner i prover, men är mindre känsliga än RT-qPCR. Nyare metoder som *next-generation sequencing* (NGS) och metagenomik tillåter detektion av allt genetiskt material som finns i ett prov. Dessa kan vara användbara för att till exempel hitta nya virus. NGS beskrivs närmare i kapitel 4.4 i Material och metoder.

2.4 Andra virus i människans magtarmkanal

Det finns många olika virus i världen. Uppskattningar är att det finns över 100 miljoner olika virus, där 1 miljon virus uppskattas kunna infektera vertebrater (ryggradsdjur). Däremot finns det bara 11 273 olika typer av virus namngivna på ICTV, the International Committee on Taxonomy of Viruses. Det finns fler kända enteriska virus som infekterar humana tarmar än de som har studerats här och beskrivits ovan.

Norovirus är RNA-virus som orsakar närmare 1/5 av alla beskrivna gastroenteritfall. Norovirus är ett virus som är globalt spridd och där så få som färre än 10 viruspartiklar kan ge en infektion.

Astrovirus är också ett RNA-virus som orsakar gastroenterit. Asymptomatiska infektioner av astrovirus är inte ovanliga. Det finns även två hepatitvirus som är enteriska virus, Hepatit A-virus (HAV) och Hepatit E-virus (HEV). De smittar båda fekal-oralt. HAV infekterar tarmen och sprider sig vidare via blodet, där det sedan kan orsaka inflammation av levern. HEV, som tillhör en annan virusfamilj än HAV, sprider sig också vidare från tarmen till blodet. Genotyp 1 och 2 sprids främst via kontaminerat vatten. De är humanspecifika genotyper som bara förekommer i Asien, Afrika och Centralamerika. Genotyper 3 och 4 infekterar både människor och djur. Genotyp 3 finns i Sverige och kan hittas hos vildsvin och ibland hos grisar. Där kan människor smittas från att ha ätit kontaminerat kött.

2.5 Övriga virus

Nya metoder som next-generation sequencing (NGS) och metagenomik gör att vi hittar många nya virus. Detta gäller även i sjöar, floder och grundvatten. En stor del av de virus som hittas i vattenmiljöer är bakteriofager, som infekterar bakterier. Vilka typer av virus som återfinns varierar även med årstider. I en sjö som studerades hittades flest virus med enkelsträngade DNA-genom på våren, medan många virus med dubbelsträngade DNA-genom hittades på sommaren (Lopez-Bueno et al. 2009). Temperaturen i vatten kan även påverka vattencirkulationen i sjöar. Temperaturskillnader på vattnet i sjöar påverkar dess densitet, där vatten vid 4 grader har högre densitet, vilket resulterar i att temperaturskillnader i vattnet kan få visst vatten att sjunka till botten och annat vatten att stiga, resulterande i en cirkulationsprocess. Även vind kan påverka vattnets cirkulation. När vattnet cirkulerar i en sjö gör även bakterier och alger det, vilka vissa virus kan infektera. Även virus som infekterar växter återfinns i vattenkällor. Växtvirus som hittats i vattenmiljöer har visat sig kunna vara infektiösa i 50–3000 dagar (Mehle and Ravnikar 2012). För att kunna jämföra de virus som kan återfinnas i vattenmiljöer med humanpatogena virus behöver egenskaper som storlek, hölje, pH-beroende laddning och detektionskänslighet vara likartade.

3 Vattenverkens mikrobiologiska barriärer

Tillgång till rent vatten är en mänsklig rättighet. Vattenverk och deras förmåga att rena vatten från farliga patogener är en viktig del i tillgången till rent vatten. Råvattnet till svenska vattenverk är ytvatten, naturligt grundvatten eller konstgjort grundvatten som framställts genom infiltration.

Mikrobiologiska barriärer vid vattenverk är en åtgärd som motverkar förekomst av sjukdomsframkallande virus, bakterier eller parasiter i dricksvattnet. Mikrobiologiska barriärer kan bygga på avskiljning eller inaktivering av mikroorganismer.

Om ytvatten används som råvatten så krävs det fler beredningssteg för att rena vattnet i vattenverket än om råvattnet är grundvatten. En typisk ytvattenberedning består av kemisk fällning med sedimentering och filtrering för avskiljning, följt av desinfektion med UV-ljus, klor och klorföreningar för inaktivering.

3.1 Avskiljning av virus

Kemisk fällning med sedimentering

De flesta naturligt förekommande partiklar har en negativ nettoladdning. Genom att tillsätta ett flockningsmedel som aluminiumsulfat bildas flockar med partiklar och de positivt laddade aluminiumjonerna. Flockningsmedlet kallas ibland koagulant eftersom det också gör att till exempel humusämnen kan bindas in i flockarna. Sedimentering är den vanligaste metoden för att avskilja huvuddelen av flockarna under förutsättningen att de har tillräckligt hög densitet. Flockningen är i hög grad pH-beroende och inbindningen av virus förutsätter att de är negativt laddade vid aktuellt fällnings-pH.

Snabbfilter

Normalt förekommer en koagulerings- och sedimenteringsprocess innan snabb sandfiltrering (Asami et al. 2016). Tillsammans är flockning, sedimentering och snabbfiltrering en avskiljningsbarriär. Avskiljningen av flockar genom sedimentering är inte fullständig och därför behövs ett filtreringssteg. Snabbfiltrering genom sand är vanligt förekommande hos vattenverken. Filtermassan kan även bestå av till exempel aktivt kol för att adsorbera lösta föroreningar. Snabbfilter tillåter ett relativt stort vattenflöde över filterlagret jämfört med långsamfiltrering.

Långsamfilter

Långsamfiltrering genom sand är ett traditionellt reningssteg, där det finns ett övre lager med biofilm, där mikroorganismer och andra små partiklar kan både bindas och brytas ner (Prem 2018). Långsamfilter används ofta som ett poleringssteg efter snabbfilter. Ett långsamfilter har mer finkornig sand än ett snabbfilter. Därför rinner vattnet långsammare genom det. Långsamfilter räknas som egen avskiljningsbarriär. Effekten av långsam sandfiltrering kan vara lägre vid kallare temperaturer, och även djupet på sandbädden kan påverka virusreduktionen (McConnell et al. 1984).

Ultrafilter

Ultrafiltrering med porer mindre än de flesta virus används som en robust mikrobiologisk barriär vid flera vattenverk i Sverige, och även i ett av vattenverken som ingår i studien. Det är visat att ultrafiltrering kan reducera stora virus med 3–5 log₁₀, dvs. mellan 1000 och 100 000 gånger (Jacquet et al. 2021; Shirasaki et al. 2017; Wang et

al. 2020). Det har även visats att effekten var bättre vid högre ursprungskoncentration av virus i vattnet, beroende på bildandet av aggregat med viruspartiklar (Jacquet et al. 2021). Förutom storleken på porer, vilken kan variera mellan 10–100 nm, så är även elektrostatisk laddning hos membran och viruspartiklar viktiga, där calicivirus har en svag positiv laddning vid pH 7–8 och då kan filtreras bort vid ultrafiltrering med ett positivt laddat ultrafiltermembran (Frohnert et al. 2015).

3.2 Inaktivering av virus

UV-ljus

UV-ljus används för att inaktivera virus och andra mikroorganismer. UV-ljus kan inaktivera virus utan att påverka den kemiska sammansättningen eller smaken hos vattnet. Vanligt är att kvicksilverlampor används som avger ljus av våglängden 254 nm. Denna våglängd påverkar virusgenom genom att orsaka dimerer mellan nukleotider, en skada på DNA eller RNA som leder till att DNA- eller RNA-strängen inte fungerar som den ska. Den genetiska strängen kan då inte användas för att göra fler kopior. Enkelsträngade virus är således mera känsliga för UV-skador på virusgenomet, då den inte kan stabiliseras av en annan DNA- eller RNA-sträng som dubbelsträngade virusgenom har att binda till. Ett brott på ett enkelsträngat genom leder till att det inte längre kan vara ett komplett genom. Adenovirus, ett dubbelsträngat DNA-virus, är mera resistent mot UV-ljus då det har två strängar med genetiskt material, men även mekanismer för att motverka genetiska skador på virusets genom.

Klor och klorföreningar

Klor (hypoklorit), klordioxid och monokloramin är tre desinfektionsmedel som används vid vattenverk. Monokloramin är mera stabilt och ger längre effekt genom hela distributionsnätet men inaktiverar inte mikroorganismerna lika mycket. Därför räknas inte monokloramin som en mikrobiologisk barriär i Sverige, utan används för att förhindra efterväxt i distributionssystemet.

När klorgas eller natriumhypoklorit löser sig i vattnet bildas hypokloritsyra (HOCl) och hypokloritjoner (OCl⁻). HOCl kan reagera med nukleinsyra i virusgenomet, men kan även reagera med proteiner. Hur mycket av det ena eller andra som bildas beror på pH i vattnet. Koncentrationen av dessa lösningar anges som fritt klor, vilket motsvarar mängden klorgas som är löst i vatten. För enkelhetens skull används uttrycket ”klor” för vattenlösningar av klorgas och natriumhypoklorit i den här rapporten. Klor och klordioxid kan reagera med både organiskt material, proteiner och DNA/RNA. Det betyder att mängden organiskt material i vattnet påverkar hur mycket av desinfektionsmedlen som är tillgängligt för att förstöra mikroorganismernas proteiner och DNA. Vidare så bildas oönskade desinfektionsbiprodukter när klor reagerar med organiskt material i vatten. USEPA (USA Environmental Protection Agency) har riktlinjer för klorbehandling av vatten, som även används i Sverige, där effekten av klorbehandling beräknas i förhållande till CT-värde, där CT är koncentrationen av klor x tid. CT är koncentrationen av fritt klor under kontakttiden, dvs arean under den sjunkande kurvan för mätningen av fritt klor under kontakttiden. Kontakttiden i fullskala avser de första 10 procenten av vattnet som passerar kontaktbassängen. Där är specifika CT-värden angivna för hur effektivt specifika mikroorganismer inaktiveras vid vissa mängder av fri klor över tid.

4 Material och metoder

I detta projekt har virus studerats dels i labbmiljö där deras infektivitet (förmåga att infektera) har undersökts med infektion av celler och RT-qPCR, dels genom provtagning av vatten från de sex vattenverk som ingår i projektet. På vattenverken har hela viruspopulationen studerats, och effekten i reningsstegen har analyserats genom att mäta koncentrationen av vissa virus med RT-qPCR.

4.1 Virusinfektioner

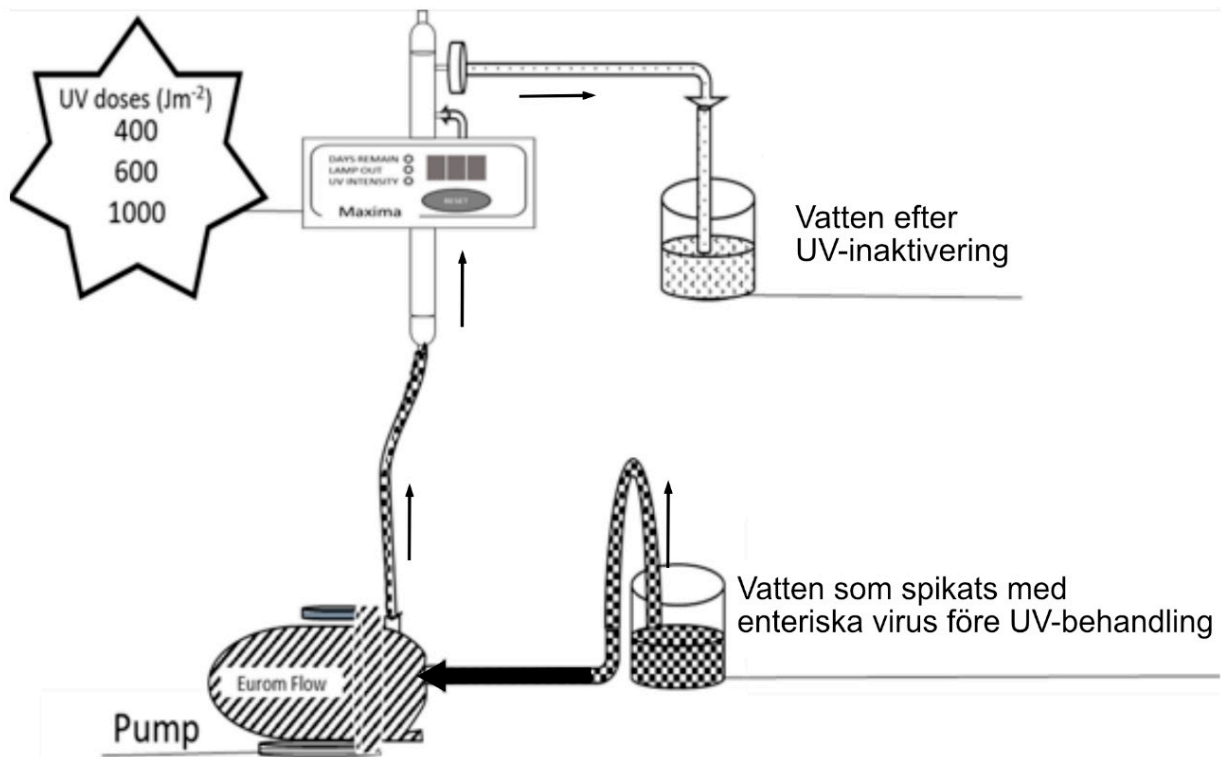
Tre olika virus användes för infektionsstudier: echovirus (E30), rotavirus (RV SA11) och adenovirus (HAdV2) (Figur 2.2). E30 odlades på veroceller i MEM-medium med 5 % fetalt kalvserum, 1 % L-glutamin och 1 % penicillin och streptomycin. RV SA11 odlades i MA-104-celler med medium 199 med 2,5 % fetalt kalvserum. HAdV2 odlades på A549 i samma medium som veroceller. Samtliga celler växte vid 37 grader och 5 % CO₂ (Saguti et al. 2022; Saguti et al. 2023).

Virusens infektivitet bestämdes via titrering av virus med TCID₅₀ (*tissue cell culture infectious dose 50*). I korthet späddes virus i 10-spädningar och den spädning av virus där 50 % av brunnarna visade cytopatogen effekt var TCID₅₀-koncentrationen som visade hur mycket infektiöst virus som fanns i provet (Saguti et al. 2022; Saguti et al. 2023). Virus med en koncentration på mellan 10⁷ och 10⁸ användes.

Virus detekterades också med RT-qPCR, där i korthet RNA och DNA extraherades från prover med total NA-kit (*Qiamp circulating nucleic acid kit*). Total NA-extraktionerna analyserades med specifika primrar och taqman prober för E30, RV SA11 och HAdV2 i 45 cykler. En plasmid sattes vid varje körning i 4 spädningar, med känd koncentration för att kvantifiera de prover som kördes i samma körning (Saguti et al. 2022; Saguti et al. 2023).

4.2 UV-behandling

Virus inaktiverades med UV-ljus med hjälp av en UV-lampa och pump (Figur 4.1). Flödet (liter/sekund) i pumpen mättes kontinuerligt, och 90–100 % effektivitet av UV-lampan i anordningen användes för beräkningarna (ny UV-lampa), där flödet justerades för att uppnå 400, 600 och 1000 J/m². Virus sattes till 3 liter kranvatten i en koncentration där det skulle gå att mäta 4 log₁₀-reduktion (10 000 gånger) av virus. 4 ml viruslösning samlades före och efter varje UV-ljusbehandling för att mäta infektivitet i cellodling (se avsnitt 4.1) samt även virusgenomkoncentration med RT-qPCR för att bekräfta infektivitet (Saguti et al. 2022).



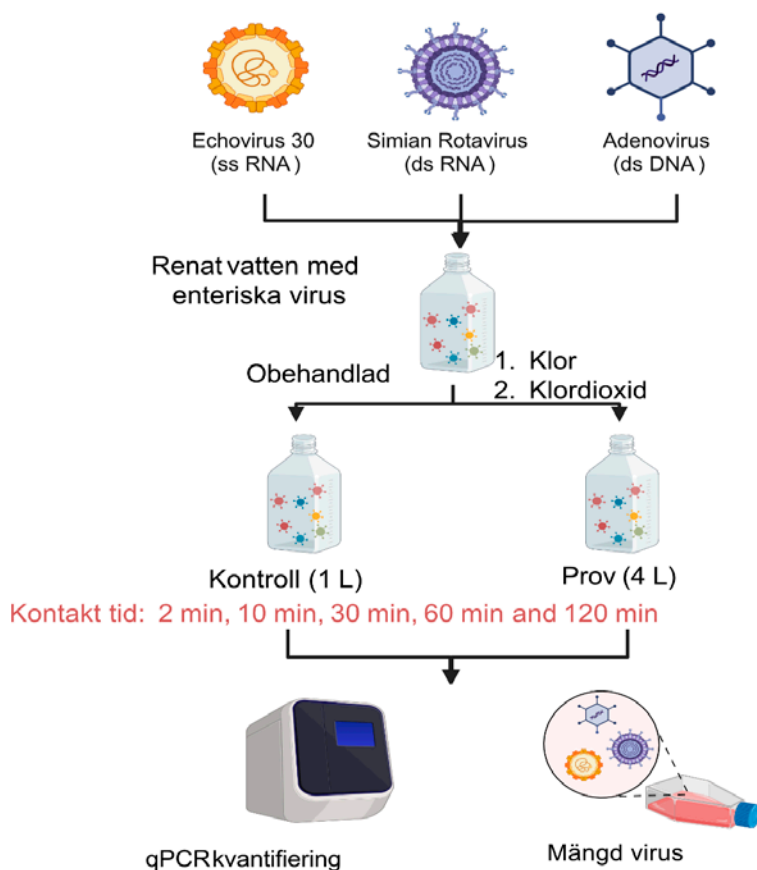
Figur 4.1

Metod för UV-behandling. UV-ljus med doser 400, 600 och 1000 J/m² reglerades via pump. Virus tillsattes till vatten innan UV-ljusbehandling och prover togs före och efter UV-ljus.

4.3 Klor- och klordioxidbehandling

Lösningar av natriumhypoklorit och klordioxid förbereddes av personal på Lackarebäckens vattenverk. En natriumhypoklorit-klorlösning motsvarande 150 g/liter klor tillsattes till 4 liter ultrafiltrerat dricksvatten. Klorkoncentration mättes enligt SS-EN ISO 7303-2 metod. Klordioxid framställdes samma dag som försöket genom att blanda saltsyra och natriumklorat, och klordioxid mättes enligt SS-EN 1031-4. Total klor och fritt klor mättes efter 0, 2, 10, 30, 60 och 120 minuter.

Den mängd klor som krävs för specifik log₁₀-reduktion av virusnivåer uppskattas ofta via CT-värde (koncentration x tid). Klor och klordioxid mättes för att kunna nå tillräckligt CT-värde efter 120 minuter. Virus, infekterade enligt ovan, sattes till 5 liter vatten där 1 liter användes som obehandlad kontroll, och till resten tillsattes klor eller klordioxid (Figur 4.2). Efter 2, 10, 30, 60 och 120 minuter samlades prover som neutraliserades med natriumtiosulfat för att avstanna desinfektionen. Sedan sattes proverna till infektivitetsanalys med TCID₅₀ enligt ovan och även skörd av prov för RT-qPCR (Saguti et al. 2023).



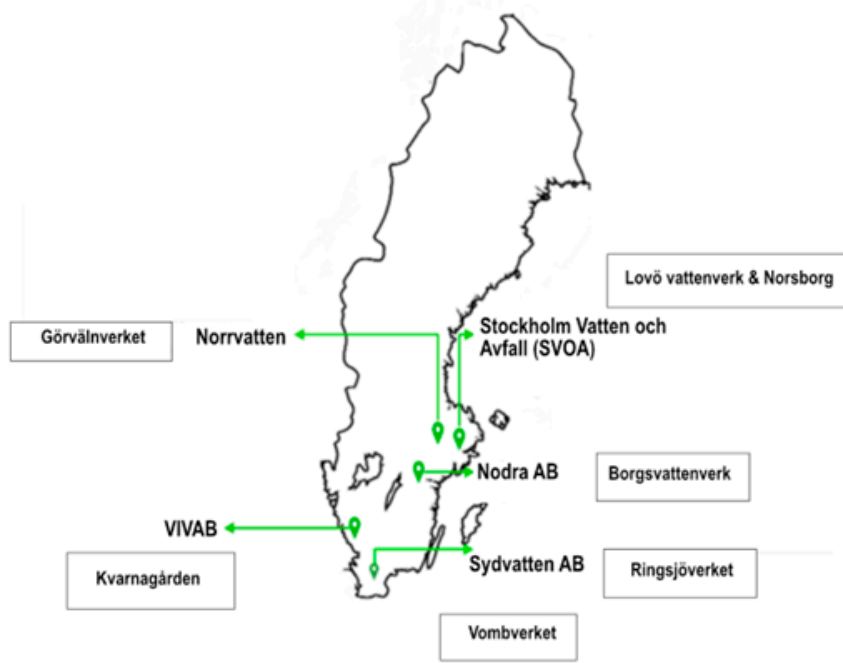
Figur 4.2

Metodologi för klor och klordioxidbehandling. Echovirus, rotavirus och adenovirus sattes till vatten där 4 liter sedan behandlades med klor eller klordioxid. Obehandlat samt behandlat vatten analyserades med qPCR samt infektivitet i cellkultur.

4.4 NGS-detektion av virus i vattenprover

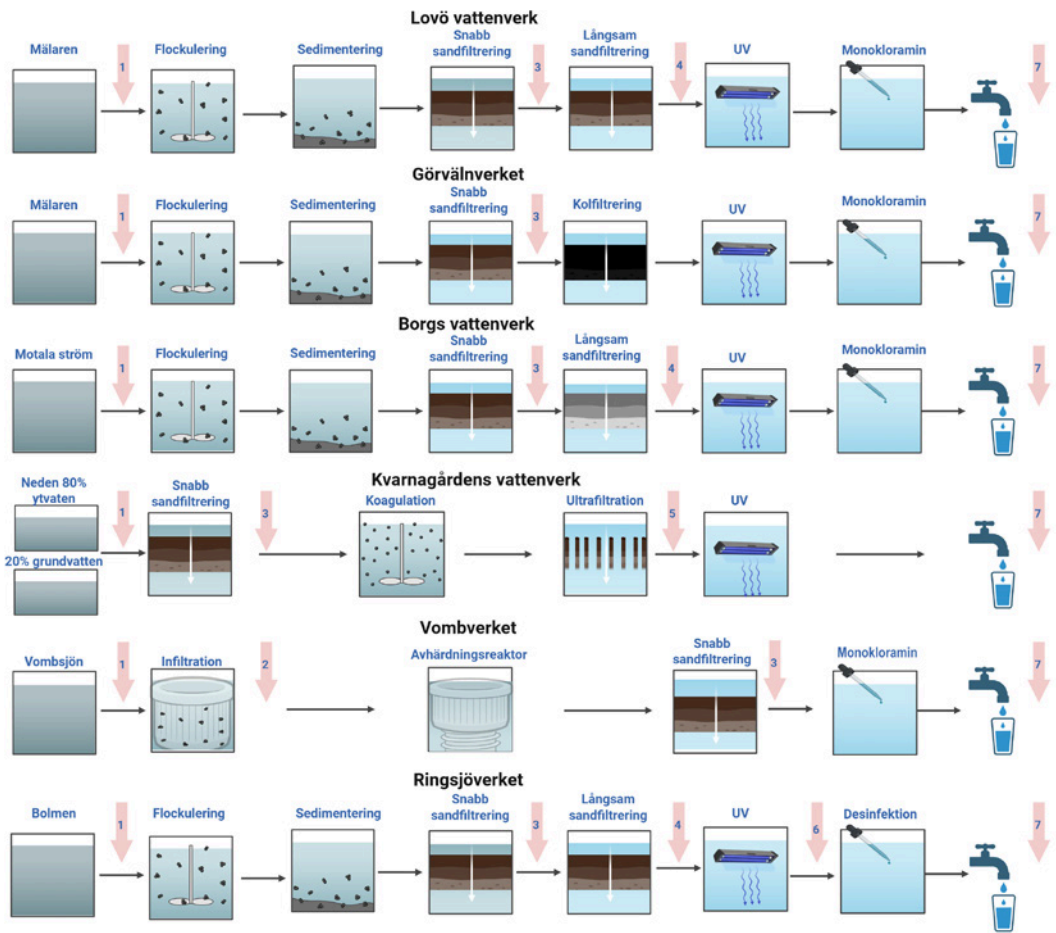
Proversamlades in från Lovö vattenverk, Görvålnverket, Borgsvattenverk, Kvarnagårdens vattenverk, Vombverket och Ringsjöverket (Figur 4.3). Prover samlades mellan mars 2021 och april 2022 varannan månad. Vid två tillfällen samlades även prover in vid olika reningssteg för nästa del i projektet med analys via RT-qPCR (Figur 4.4).

Vid provtagning samlades vatten in via Nano-Ceram-filtre, som är effektivt att binda virus och används vid monitorering av avloppsvatten, där flödet över filtret kalkylerades så att provtagning vid utgående vatten i största möjliga mån var samma vatten som det inkommande vattnet. På grund av mycket partiklar i vattnet var provtagning av råvatten inte alltid möjlig via filter, så 20 liter vatten skickades i så fall till Göteborgs universitet där det kunde centrifugeras och sedan filtreras. Från Nano-Ceram-filtren filtrerades bakterier bort via Sartobran Capsule, och resterande material ultracentrifugerades för att koncentrera resterande material. RNA och DNA extraherades sedan från proverna. RNA omvandlades till cDNA med hjälp av RT-PCR och cDNA och DNA-prover amplifierades med random primers (Wang et al. 2020). Proverna sekvenserades sedan med nästags generationssekvensering (NGS) på Illumina NovSeq X. Sekvenser från NGS analyserades och vid analys användes de sekvenser som efter första analysen blev längre än 500 baspar (bp) för vidare analys. Sekvenserna längre än 500 bp analyserades med två olika databaser (NCBI och Kraken) där de sekvenser som gav resultat med båda databaserna tolkades som sant positiva. De virus som identifierades i vattenproverna sorterades sedan i grupper beroende på storlek av viruspartikeln och efter värdorganism för virus, enligt data från ICTV. Storlek av virus delades upp i 0–60 nm, 61–120 nm och >120 nm. Sortering enligt värdorganism grupperades i tre grupper, grupp 1 med en värdorganism som kan hittas i reningsprocessen på vattenverken, grupp 2 med värdorganismer som troligen inte finns i reningsprocessen och grupp 3 med värdorganismer som inte finns i reningsprocessen.



Figur 4.3
Kartan över Sverige med de sex vattenverk som samlade vattenprover för detta projekt samt översikt över deras reningssteg.

Figur 4.4
Översikt över reningsstegen hos de sex vattenverken i projektet. Prover samlades vid 1) råvatten, 2) efter infiltration, 3) efter snabb sandfiltrering, 4) efter långsam sandfiltrering, 5) efter ultrafiltrering, 6) efter UV-ljus, 7) i dricksvatten.



4.5 RT-qPCR-detektion av virus i vattenprover

INGS-analyserna analyserades råvattenproverna samt dricksvattenprover. Prover samlades också in i de olika reningsstegen (Figur 4.4) vid två provtagningstillfällen. Från dessa prover extraherades RNA och DNA enligt ovan. Viralt RNA och DNA från dessa prover analyserades sedan med RT-qPCR för att kunna kvantifiera den exakta mängd av virusgenom som finns. Med hjälp av resultaten i NGS-analysen valdes tre olika virus som återfanns i hög koncentration i råvatten, samt ett virus som tidigare har visats kunna fungera som indikatorvirus då den förekommer i mänsklig avföring, nämligen paprikaviruset PMMoV. PMMoV är ett virus som infekterar olika paprikasorter och som utsöndras i human avföring genom att vi äter paprika och chilifrukter (Tabell 4.1). Övriga tre virus som analyserades via RT-qPCR var phycodnavirus, entomopoxvirus och boolarravirus. Samtliga detekterades i relativt höga koncentrationer i NGS-analysen. Av de fyra virus som analyseras är det både större och mindre virus, samt virus med DNA och RNA som genom (Tabell 4.1).

Tabell 4.1

Virus i denna studie samt deras olika egenskaper.

Virus	Genus	Genom	Morfologi	Storlek	Värd
PMMoV	Virgaviridae	ssRNA	Avlång capsid	300 nm x 18–20 nm	Chili- och paprikafrukter
Phycodnavirus	Phycodnaviridae	dsDNA	Ikosahedral kapsid	110–220 nm	Mikroalger
Entomopoxvirus	Poxviridae	dsDNA	Höljebärande	250–300 nm	Insekter
Boolarravirus	Alphanodavirus	ssRNA	Ikosahedral kapsid	30 nm	Insekter

5 Resultat och diskussion

5.1 Inaktivering av virus med UV-ljus

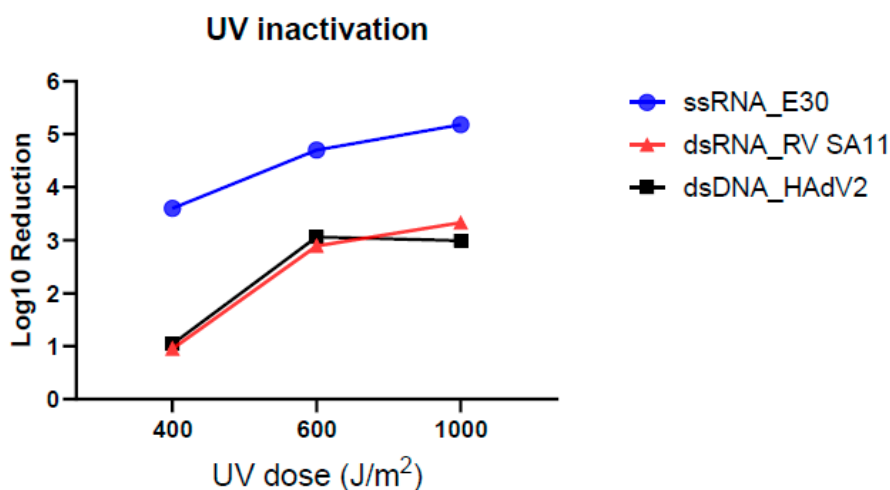
Effekten av UV-ljus är beroende på den dos av UV-ljus som används. Olika virus är olika känsliga för UV-ljus, då virus med dubbelsträngade genom, särskilt adenovirus med dubbelsträngat DNA-genom, är mindre känsliga för UV-ljus jämfört med virus med enkelsträngade genom.

Tre olika virus inaktiverades med UV-ljus: echovirus (E30), rotavirus (RV SA11) och adenovirus (HAdV2). E30 är ett virus med ett enkelsträngat RNA (ssRNA), RV SA11 har dubbelsträngat RNA (dsRNA) och HAdV2 ett dubbelsträngat DNA (dsDNA). Tre olika nivåer av UV-ljus användes: 400, 600 och 1000 J/m². E30 inaktiverades med 3,6 log₁₀ (4 000 gånger) vid 400 J/m², och 4,7 log₁₀ (50 000 gånger) vid 600 J/m², och 5,18 log₁₀ (150 000 gånger) vid 1 000 J/m² (Figur 5.1). Tidigare studier har visat liknande minskning av E30 (Gerba et al. 2002; Mayer et al. 2010; Park et al. 2011). Även studier på andra virus med ssRNA-genom som poliovirus och coxsackievirus B5 resulterade i 4 log₁₀-reduktion (10 000 gånger) vid 280–500 J/m² (Gerba et al. 2002; Mayer et al. 2010). Detta visar att E30 inaktiveras liknande som andra ssRNA-virus.

RV SA11 och HAdV2 inaktiverades bara med 1 log₁₀ (10 gånger) vid 400 J/m². Vid högre mängd UV-ljus, 600 och 1000 J/m², inaktiverades båda virus med mellan 2,89 och 3,33 log₁₀ (mellan 776 och 2 138 gånger) (Figur 5.1). Tidigare studier på HAdV2 har visat 1, 2 och 3 log₁₀-reduktion (10, 100 respektive 1 000 gånger) vid 400, 780 och 1 190 J/m² (Baxter et al. 2007; Gerba et al. 2002). Tidigare studier på RV SA11 visade dock på 3 log₁₀-inaktivering (1 000 gånger) vid 280–440 J/m² (Araud et al. 2020; Chang et al. 1985; Li et al. 2009). Skillnaderna jämfört med den här studien kan ligga i avståndet till UV-ljuset, djupet av vattnet, men även att den här studien använde kranvatten och andra studier använde PBS (saltlösning). Det här projektet använde även en UV-utrustning där vatten aktivt passerade förbi UV-ljuset, liknande det som används vid vattenverk där en UV-lampa använd mindre än 24 timmar används och mäts och kontrolleras av utrustningen samt vattenpumpen. Många andra studier använder UV-ljus som belyser stillastående vatten i en petriskål, vilket inte motsvarar rening vid vattenverk lika väl.

Sedan 2003 rekommenderar USEPA en UV-dos på 1860 J/m² för att vara säkra på att få en 4 log₁₀-minskning (10 000 gånger) av alla virus i dricksvatten. I de nordiska länderna rekommenderas UV-ljus mellan 250–400 J/m² för att minska adenovirus med 0,75–1,75 log₁₀ (5–56 gånger) och andra virus med 2,5–3,5 log₁₀ (300–3000 gånger) (Ødegaard et al. 2014). Dessa resultat stämmer väl överens med det som är visat i denna studie (Saguti et al. 2022).

Virus med dubbelsträngade genom är kända för att vara mera resistent mot UV-ljus. Detta beror på den stödjande funktion som den extra genomsträngen spelar vid strängbrott vid UV-ljusbehandling (Qiao et al. 2018). Vi kunde inte visa på mer inaktivering av virus mellan 600 och 1000 J/m². Även en annan studie visade att högre UV-ljus inte resulterade i mer inaktivering (Bounty et al. 2012). Här kunde vi visa att 400 J/m² var tillräckligt för att inaktivera virus med ssRNA-genom, medan 600 J/m² krävdes för virus med dubbelsträngade genom.



Figur 5.1

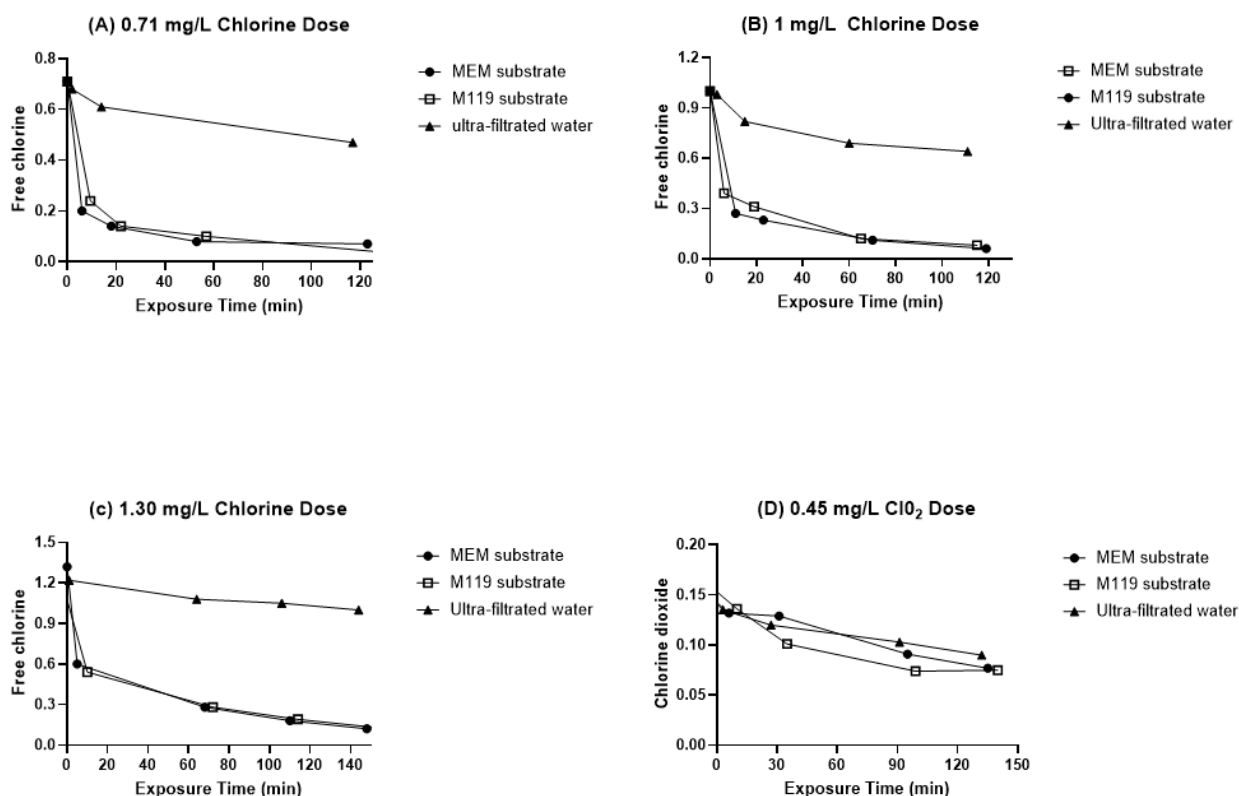
Log₁₀-reduktion av echovirus (E30), rotavirus (RV SA11) och adenovirus (HAdV2) vid 400, 600 och 1000 J/m² UV-ljus.

5.2 Inaktivering av virus med klor och klordioxid

Klor och klordioxid kan båda inaktivera virus. Fritt klor kan inaktiveras av organiskt material. Cellodlingsmedium, som behövs för odling av virus i cellkultur, innehåller organiskt material som skulle kunna påverka den desinficerande effekten av klor och klordioxid. Därför undersöktes den påverkan som använda cellodlingsmedium (MEM och M119) gav vid samma mängd som behövs vid tillsats av virusen E30, RV SA11 och HAdV2 i vatten. Vid tillsats av klor konsumerades fritt klor av både MEM- och M119-medium. Den snabba reaktionen med organiskt material, initialförbrukning, är i dessa försök högre än för vanligt dricksvatten. För klor var initialförbrukningen 0,6 mg/liter. För att ha fritt klor i lösningen efter 120 minuter, behövde det tillsättas 1,3 mg/liter klor. För klordioxid ser förbrukningen annorlunda ut och det räckte med 0,45 mg/liter klordioxid (Figur 5.2).

Figur 5.2

Mätning av fritt klor (a, b, c) och klordioxid (d) till tillsats av olika nivåer av klor och klordioxid i ultrafiltrerat vatten samt medium med organiskt material som används vid odling av celler (MEM- och M119-substrat).



Klor och klordioxid sattes till 5 liter vatten, och fritt klor mättes parallellt med virusinaktivering efter 2 min, 10 min, 30 min, 60 min och 120 min. Nivåerna av klor och klordioxid när virus hade tillsatts i vattnet motsvarar mängderna som mättes med MEM och M119-substrat (Figur 5.2 C och D). Virusen E30, RV SA11 eller HAdV2 sattes även till vattnet, före tillsats av klor och klordioxid, i sådan mängd att det skulle gå att detektera en inaktivering på 4 log₁₀ (10 000 gånger). Virus infektivitet mättes med TCID₅₀, dvs den spädning av virus som ger infektion i 50 % av brunnarna. Virusgenom mättes även med RT-qPCR i proverna. Tabell 5.1 visar TCID₅₀-mätningen, dvs hur många 10-spädningar av viruset som behövdes för att se 50 % infektivitet samt vid vilken cykel (ct-värde) som virus genom kunde påvisas i obehandlat samt klorbehandlat vatten där E30, RV SA11 eller HAdV2 tillsatts. Vid inaktivering av E30 kunde inget infektiöst virus detekteras redan efter 2 min klorbehandling. För RV SA11 och HAdV2 kunde viss mängd infektiöst virus detekteras efter 2 min, men inget vid 10 min klorbehandling. För RV SA11 och HAdV2 kunde lägre nivåer av virusgenom detekteras upp till 120 minuter. Vid klordioxidbehandling kunde lägre mängd infektiöst virus endast detekteras för RV SA11 efter 2 min, och inget infektiöst E30 eller HAdV2 detekteras (Tabell 5.2).

Virus	Tid (min)	Klor			
		Obehandlat virus log ₁₀ TCID ₅₀ /ml (RT-qPCR cykler)		Behandlat virus log ₁₀ TCID ₅₀ /ml (RT-qPCR cykler)	
		Försök I	Försök II	Försök I	Försök II
Echovirus (E30)	2	3,00	3,25 (14,3)	0,00	0,00 (und)
	10	3,50	3,75 (13,9)	0,00	0,00 (und)
	30	3,50	3,25 (14,2)	0,00	0,00 (17,6)
	60	3,75	3,00 (14,2)	0,00	0,00 (und)
	120	3,50	3,25 (14,6)	0,00	0,00 (und)
Rotavirus (RV SA11)	2	5,00 (25,7)	5,00 (29,5)	2,25 (24,1)	1,25 (25,2)
	10	4,50 (24,9)	4,25 (28,7)	0,00 (36,6)	0,00 (38,4)
	30	4,25 (24,5)	4,00 (27,9)	0,00 (39,2)	0,00 (36,1)
	60	5,00 (24,5)	4,00 (28,6)	0,00 (29,2)	0,00 (36,0)
	120	4,50 (25,3)	3,50 (28,7)	0,00 (39,0)	0,00 (37,0)
Adenovirus (HAdV2)	2	3,75 (8,8)	5,00 (9,6)	0,00 (26,5)	0,75 (9,3)
	10	3,75 (7,7)	4,50 (8,9)	0,00 (27,2)	0,00 (11,9)
	30	3,75 (8,0)	4,50 (9,1)	0,00 (27,5)	0,00 (26,2)
	60	3,75 (8,2)	4,50 (9,0)	0,00 (27,3)	0,00 (28,2)
	120	4,00 (7,4)	5,00 (8,9)	0,00 (26,9)	0,00 (24,6)

Tabell 5.1

Tabell 5.2. Virusnivåer av echovirus (E30), rotavirus (RV SA11) och adenovirus (HAdV2) uppmätt med TCID₅₀ efter 2, 10, 30, 60 och 120 min behandling med klordioxid. Mätning av genomkopior med cykler (ct-värde) inom parentes, där en högre siffra motsvarar mindre mängd virus. Und = odetekterbar.

Virus	Tid (min)	Klordioxid			
		Obehandlat virus \log_{10} TCID50/ml (RT-qPCR cykler)		Behandlat virus \log_{10} TCID50/ml (RT-qPCR cykler)	
		Försök I	Försök II	Försök I	Försök II
Echovirus (E30)	2	3,75	3,50 (14,3)	0,00	0,25 (17,99)
	10	3,25	4,00 (14,8)	0,00	0,00 (und)
	30	3,75	4,25(14,0)	0,00	0,00 (und)
	60	3,75	3,25 (und)	0,00	0,00 (14,0)
	120	4,25	3,75 (17,8)	0,00	0,00 (und)
Rotavirus (RV SA11)	2	4,75 (25,2)	5,00 (29,4)	1,25 (25,9)	1,25 (29,5)
	10	4,50 (25,6)	5,25 (28,2)	0,00 (27,6)	0,00 (36,9)
	30	4,75 (25,2)	5,00 (28,8)	0,00 (37,3)	0,00 (38,1)
	60	4,00 (25,5)	4,50 (27,2)	0,00 (28,6)	0,00 (37,8)
	120	4,50 (25,7)	4,25 (26,9)	0,00 (und)	0,00 (37,6)
Adenovirus (HAdV2)	2	4,50 (8,2)	5,00 (9,5)	0,00 (25,0)	0,00 (26,0)
	10	4,25 (7,4)	4,75 (9,2)	0,00 (23,6)	0,00 (24,5)
	30	3,50 (8,1)	5,00 (9,6)	0,00 (22,4)	0,00 (23,5)
	60	3,75 (8,3)	3,75 (9,3)	0,00 (20,2)	0,00 (23,5)
	120	4,00 (9,3)	4,75 (9,8)	0,00 (22,8)	0,00 (22,6)

Tabell 5.2

Virusnivåer av echovirus (E30), rotavirus (RV SA11) och adenovirus (HAdV2) uppmätt med TCID50 efter 2, 10, 30, 60 och 120 min behandling med klordioxid. Mätning av genomkopior med cykler (ct-värde) inom parentes, där en högre siffra motsvarar mindre mängd virus. Und är ej detekterbar.

Klor och klordioxid kan anges som CT-värden, dvs. koncentration x tid (min. mg/liter). USEPA anger vilket CT-värde för klor och klordioxid för olika virus som motsvarar en standardiserad effekt på inaktivering av dessa olika virus (Tabell 5.3 och 5.4). Då organiskt material i vatten påverkar mängden fritt klor, kunde vi i denna studie nå motsvarande inaktivering av E30, RV SA11 och HAdV2 som USEPA rekommenderar, men vid mycket lägre CT-värde, både för klor och klordioxid. Detta trots att det var klor som var mera känsligt för organiskt material än klordioxiden. Då vi hade en hög initialförbrukning av klor, men ej samma effekt på klordioxid från cellodlingsmedium krävdes det en tillsats på 1,3 mg/liter av klor, vilket efter 2 minuter hade minskat till mellan 0,35–0,55 mg/liter. Under denna initialförbrukning av klor kunde vi visa att även desinfektion av virus sker, men även klordioxid som var mindre känsligt för närvaro av organiskt material påvisade effektiv desinfektion av virus efter 2 minuter, redan vid tillsats av 0,5 mg/liter klordioxid. Flera studier har tidigare visat att lägre CT-värden inaktiverar virus (Berman and Hoff 1984; Blackmer et al. 2000; Lim et al. 2010; Page et al. 2009), det vill säga virus är generellt känsliga för olika typer av klorering.

Virus	Klor				
	Försök			USEPA	
	Fritt klor (mg/l)	CT (min. mg/l)	Log-reduktion	CT värde	Log-reduktion
Echovirus (E30)	0,44	1,80	3,13	4	3
Rotavirus (RV SA11)	0,36	1,53	3,25	4	3
Adenovirus (HAdV2)	0,45	1,76	4,25	6	4

Tabell 5.3

CT-värden (koncentration x tid) av E30, RV SA11 och HAdV2, samt \log_{10} -reduktion och klorkoncentration efter 2 min behandling med klor.

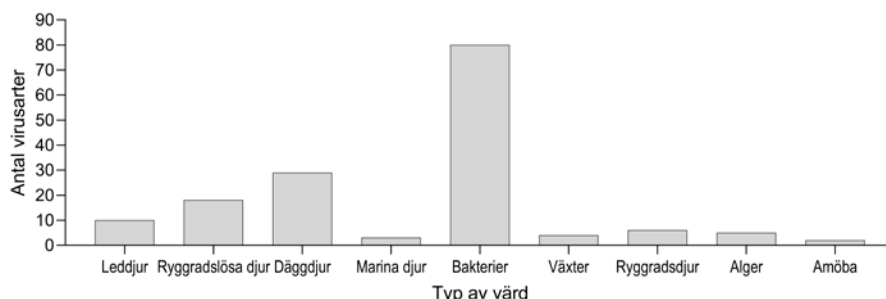
Virus	Klordioxid				
	Försök			USEPA	
	Klordioxid (mg/l)	CT (min.mg/l)	Log-reduktion	CT-värde	Log-reduktion
Echovirus (E30)	0,23	0,76	3,50	12,8	3
Rotavirus (RV SA11)	0,21	0,80	3,63	12,8	3
Adenovirus (HAdV2)	0,30	0,85	4,75	25,1	4

Tabell 5.4

CT-värden (koncentration x tid) av E30, RV SA11 och HAdV2, samt \log_{10} -reduktion och klordioxidkoncentration efter 2 min behandling med klordioxid.

5.3 Virus i råvatten och dricksvatten detekterade med NGS

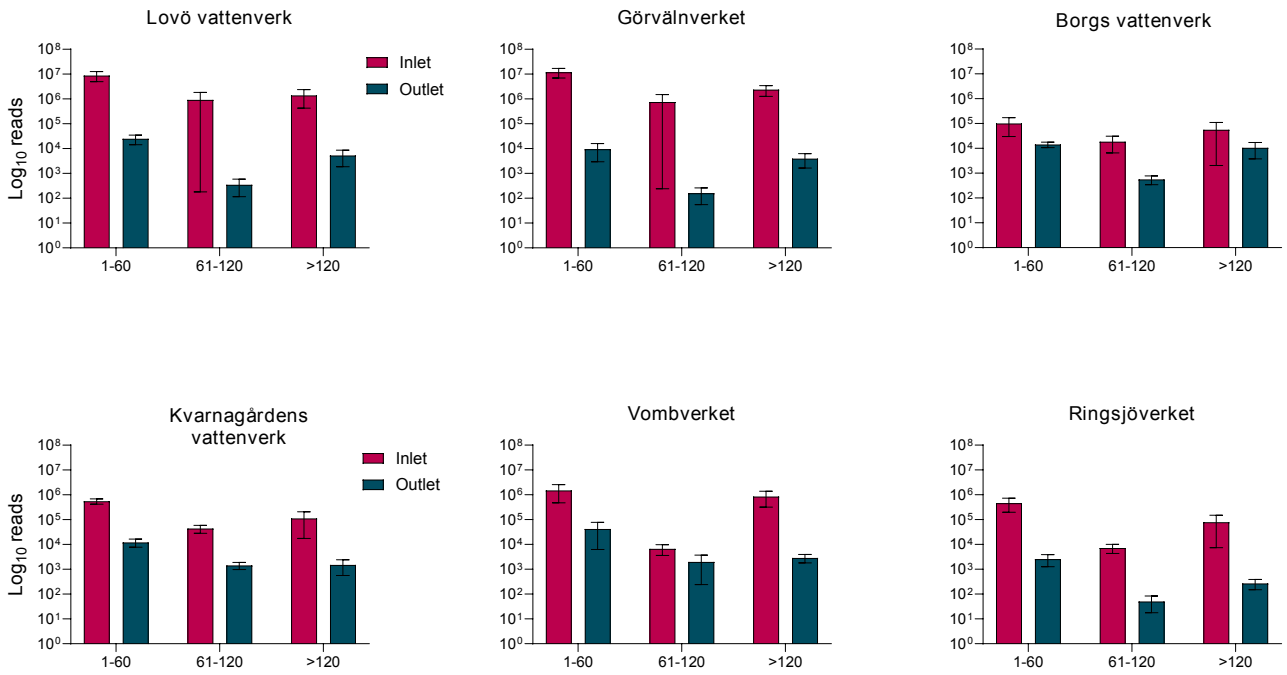
Inom detta projekt samlades prover in från sex olika vattenverk: Lovö vattenverk, Görvålnverket, Borgs vattenverk, Kvarnagårdens vattenverk, Vombverket och Ringsjöverket. Nanoceramfilter samlade in råvatten och dricksvatten varannan månad under ett års tid och flödet registrerades under perioden (se Figur 4.4 för de råvatten som samlades in). Filtren skickades till Klinisk Mikrobiologi på Sahlgrenska Universitetssjukhuset för extraktion av RNA och DNA samt detektion av alla sekvenser i provet med metagenomik och NGS. 152 olika virus tillhörande 76 olika virusfamiljer hittades i proverna. Majoriteten av alla virus som hittades var bakteriofager, men även virus som infekterar däggdjur, ryggradslösa djur, växter, insekter, alger och amöbor hittades (Figur 5.3). Flera virus hittades i både råvatten och dricksvatten.



Figur 5.3

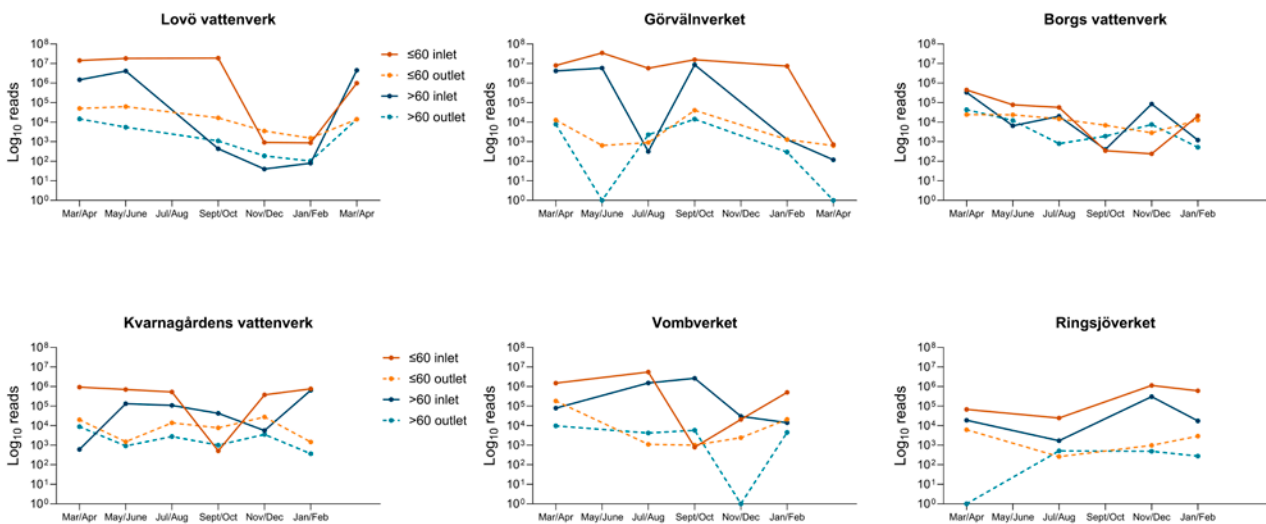
Antal virusarter av olika typer av virus som hittats i något av vattenproverna indelade efter värdorganism.

De virus som hittades i proverna separerades sedan baserat på storlek på viruspartikeln i grupperna 1–60 nm, 61–120 nm och >120 nm. Samtliga mätningar visade på högre nivåer av alla storlekar på virus i råvatten jämfört med dricksvatten. Medelvärdet för antal virussekvenser var 5,16–7,08 $\log_{10}/1\ 000$ liter i råvattnet jämfört med 3,50–4,39 $\log_{10}/1\ 000$ liter i dricksvattnet (Figur 5.4 och 5.5). Dock visade vissa enstaka prover inte någon skillnad mellan råvatten och dricksvatten i antal virussekvenser (Figur 5.5). Vid Borgs vattenverk hittades även i råvattnet relativt sett färre virusgenom, speciellt av mindre virus. Dricksvatten hos alla vattenverken utom Ringsjöverket hade mer än 4 $\log_{10}/1\ 000$ liter av virus mindre än 60 nm. Vid Kvarnagårdens vattenverk, som är utrustat med ultrafilter, var det relativt sett färre stora virus i dricksvattnet jämfört med den mindre storleken 1–60 nm. Även Vombverket var mera effektivt i att minska mängden av de största virusen i dricksvattnet. Lovö vattenverk, Görvålnverket och Ringsjöverket var även effektiva i minskningen av mängden virus i storlek 60–120 nm. Samtliga vattenverk hade högst nivå av virus 1–60 nm i dricksvattnet. Dock ska noteras att det är virusgenom som detekteras här, vilket inte kan visa på om det är infektiösa virus. För att kunna detektera infektiösa virus behövs mycket högre nivå av virus än den som kan renas fram i vatten.



Figur 5.4

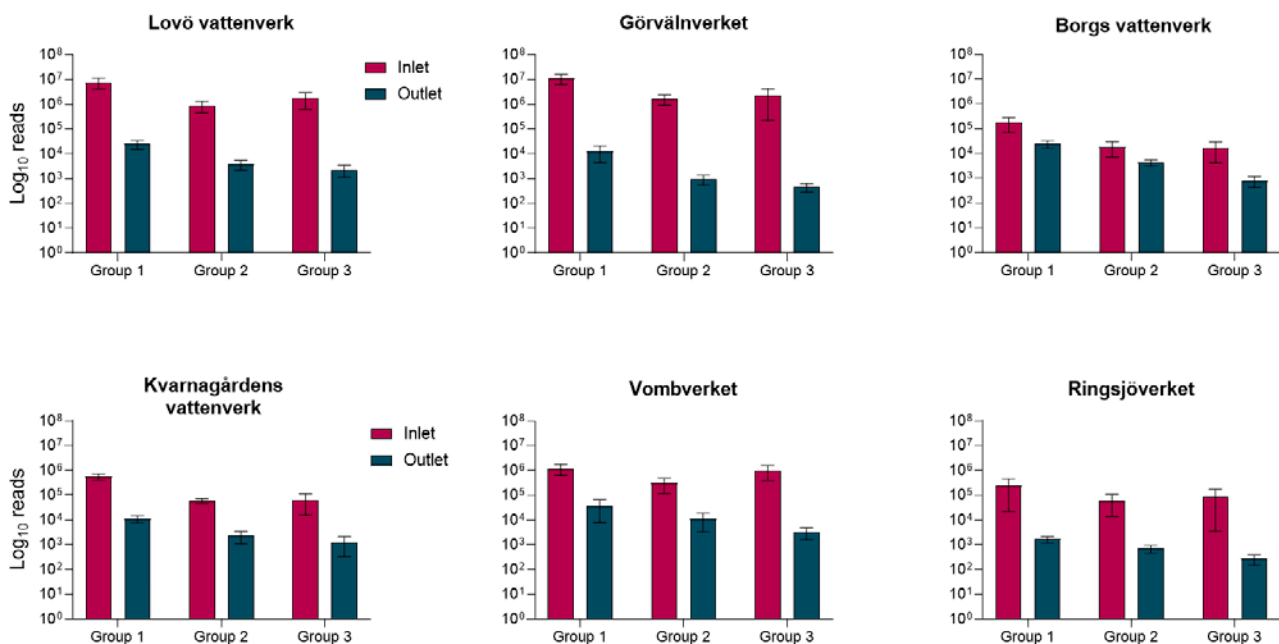
Log₁₀-nivåer per 1000 liter av virussekvenser av storlek 1-60 nm, 61-120 samt >120 i råvatten (Inlet, röda staplar) samt dricksvatten (Outlet, blågröna staplar) för varje vattenverk, medelvärde av alla prover.



Figur 5.5

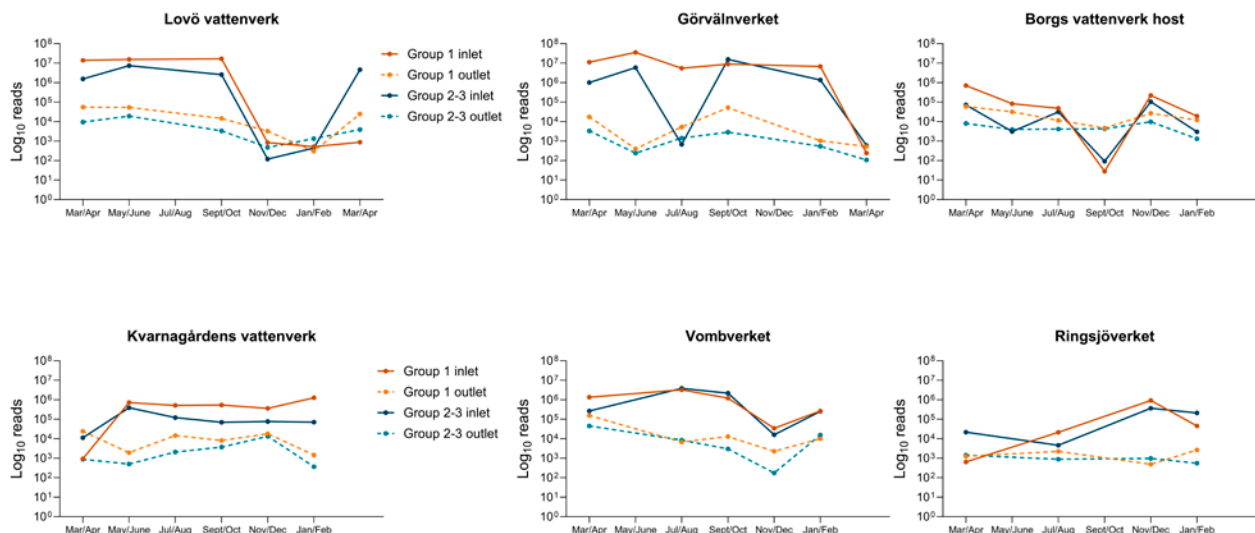
Log₁₀-nivåer per 1000 liter av virussekvenser för virus större än 60 nm eller mindre än 60 nm i råvatten (Inlet) samt dricksvatten (Outlet) i de olika proverna tagna över ett års tid.

De virus som hittades med metagenomik delades också upp i grupper i förhållande till om de organismer som virus infekterar kunde finnas i reningssystemen inom vattenverken eller inte (Figur 5.6 och 5.7). Grupp 1 är virus som infekterar organismer som kan finnas i vattenverken, grupp 2 är virus som troligen inte finns i vattenverken och grupp 3 är virus som inte finns i vattenverken. Grupp 1 hade relativt hög nivå av virus i råvatten. Många av dessa virus var bakteriofager och virus som infekterar alger, amöbor eller vattendjur. Dessa virus kan vara ett resultat av replikation i det inkommande vattnet samt under själva reningsprocessen. Grupp 2 bestod till stor utsträckning av bakteriofager som infekterar bakterier som vanligen finns hos ryggradsdjur och växter. Denna grupp reducerades mindre effektivt hos Borgs vattenverk och Vombverket. För Vombverket kan sedda virus sannolikt öka i halt i infiltrationsdammarna jämfört med råvatten, varför avskiljningsgraden skulle kunna vara falskt låg. Reduktionen för de olika grupperna tenderar att öka med minskad sannolikhet för tillförsel i reningsstegen, vilket verkar vara ett samband som gäller alla vattenverk. Grupp 3 var virus som infekterar ryggradslösa djur och ryggradsdjur. Dessa reducerades mest hos Lovö vattenverk, Gölvälverket och Vombverket. För att kunna mäta hur mycket virus som renas i de olika vattenverken behöver en mätning göras av virus i grupp 3, dvs virus som inte kan reproducera i vatten. Metagenomik visar vilka virus som finns i vattensystemen och vilka som kan finnas i höga mängder, men kvantitativa analyser behövs för att mäta exakta nivåer av dessa virus.



Figur 5.6

Log₁₀-nivåer per 1 000 liter av virussekvenser i råvatten samt dricksvatten. Grupp 1: virus som kan ha en värdorganism i reningssystemet i vattenverket. Grupp 2: virus som troligen inte har en värdorganism i reningssystemet. Grupp 3: virus som saknar en värdorganism inom reningssystemet.



5.4 Viruseliminering i sex olika vattenverk

Metagenomikanalyser på prover ger information om vilka virusgenom som hittas i vattenproverna och ungefärligt hur mycket virusgenom som hittas. För att kunna mäta mera exakta virusnivåer behövs RT-qPCR-analys av proverna. Fyra virus valdes ut från de olika typer av virus som hittades i större mängd i metagenomikanalysen: phycodnavirus, entomopoxvirus, boolarravirus och *pepper milde mottle virus* (PMMoV) (Tabell 4.1).

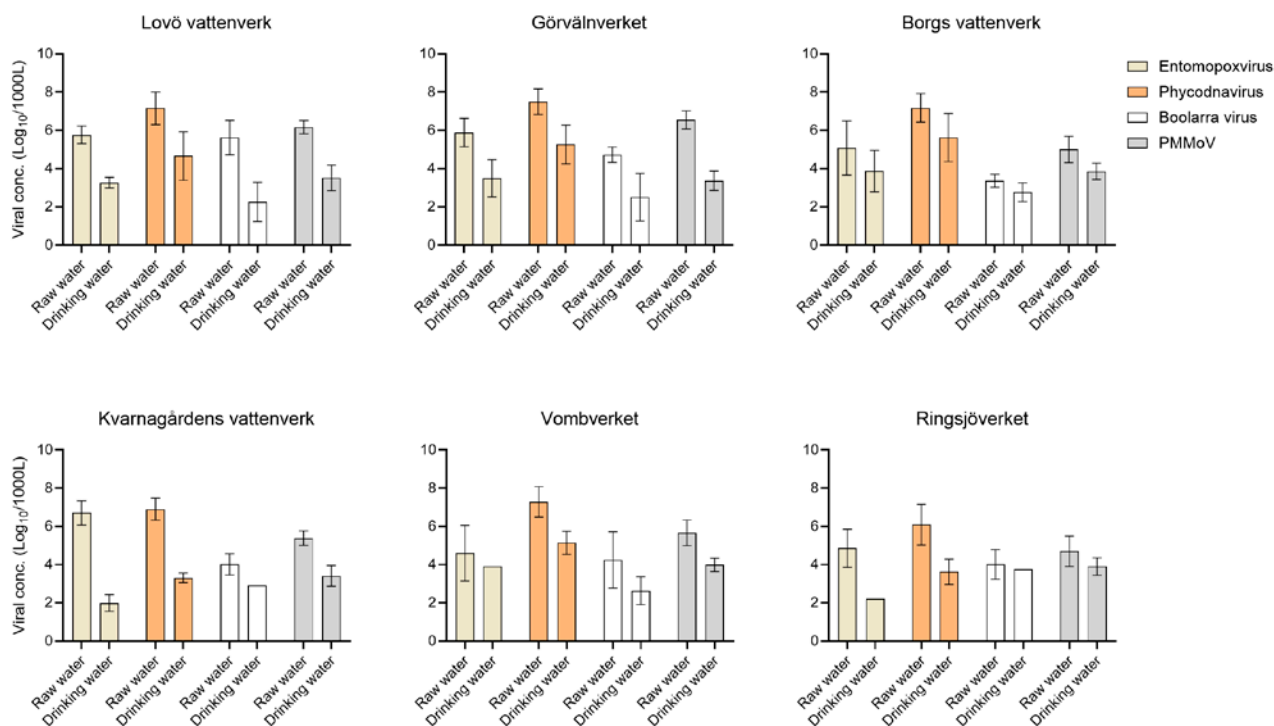
PMMoV är ett avlångt virus, 300x20 nm, har enkelsträngat RNA-genom och infekterar olika paprikafrukter. PMMoV återfinns ofta i human avföring efter konsumtion av chili- och paprikafrukter. Phycodnavirus är ett virus som infekterar mikroalger, har dubbelsträngat DNA-genom och är 110–220 nm stort. Entomopoxvirus är ett virus med dubbelsträngat DNA-genom, är 250–300 nm och infekterar insekter. Även Boolarravirus infekterar insekter, har enkelsträngat RNA-genom och är 30 nm stort. Dessa fyra virus analyserades i råvatten och dricksvatten, samt efter infiltration, efter snabb sandfiltrering, efter långsam sandfiltrering, efter ultrafiltrering och efter UV-ljus.

I råvattenproverna kunde phycodnavirus hittas i samtliga 36 prover. PMMoV hittades i 97,2 % av proverna (35/36) och entomopoxvirus och boolarravirus hittades i 80,5 % av proverna (29/36). Phycodnavirus hade också den högsta nivån av dessa virus i råvatten, med nivåer mellan 5,03 och 8,64 $\log_{10}/1000$ liter. Näst högst var nivåerna av PMMoV med 3,51–7,05 $\log_{10}/1000$ liter. I de prover där entomopoxvirus detekterades låg nivåerna på 3,58–7,79 $\log_{10}/1000$ liter. Boolarravirus detekterades i lägre nivåer (Figur 5.8). Entomopoxvirus var som högst mellan mars och juni månad. Under samma tidsperiod var Boolarravirus som lägst. Säsongsvariation av dessa två virus indikerar olika tider för aktivitet hos de insekter/larver dessa virus kan infektera.

Vid jämförelse mellan råvatten och dricksvatten var minskningen störst för phycodnavirus och entomopoxvirus, de två största virusen (Figur 5.8) vid Kvarnagårdens vattenverk, Borgs vattenverk och Ringsjöverket. Lovö vattenverk, Görvålverket och Vombverket hade en mer jämn minskning av alla fyra virusen. Även andra studier har visat att större virus är effektivare att rena bort i vattenverken (Wang et al. 2020). Vi kunde se liknande resultat i metagenomikstudien, där virus mindre än 60 nm var svårare att rena bort. Alla dessa vattenverk använder sig av multipla barriärer, som rekommenderas av WHO. Denna studie visar enbart på nivåer av virusgenom i vatten. Vidare studier behövs för att visa infektiviteten hos dessa virus.

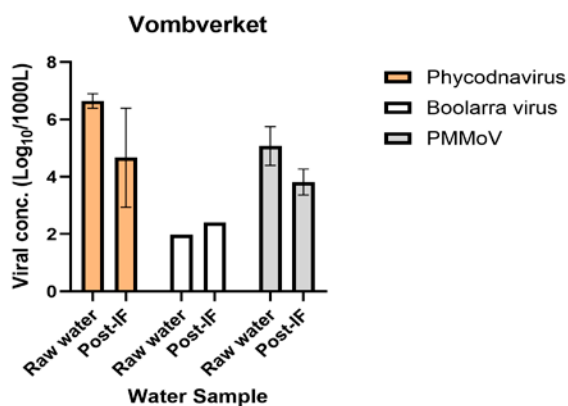
Figur 5.7

Log₁₀-nivåer av virussekvenser i råvatten samt dricksvatten vid de olika provtillfällena. Grupp 1: virus som kan ha en värdorganism i reningssystemet i vattenverket. Grupp 2: virus som troligen inte har en värdorganism i reningssystemet. Grupp 3: virus som saknar en värdorganism inom reningssystemet.



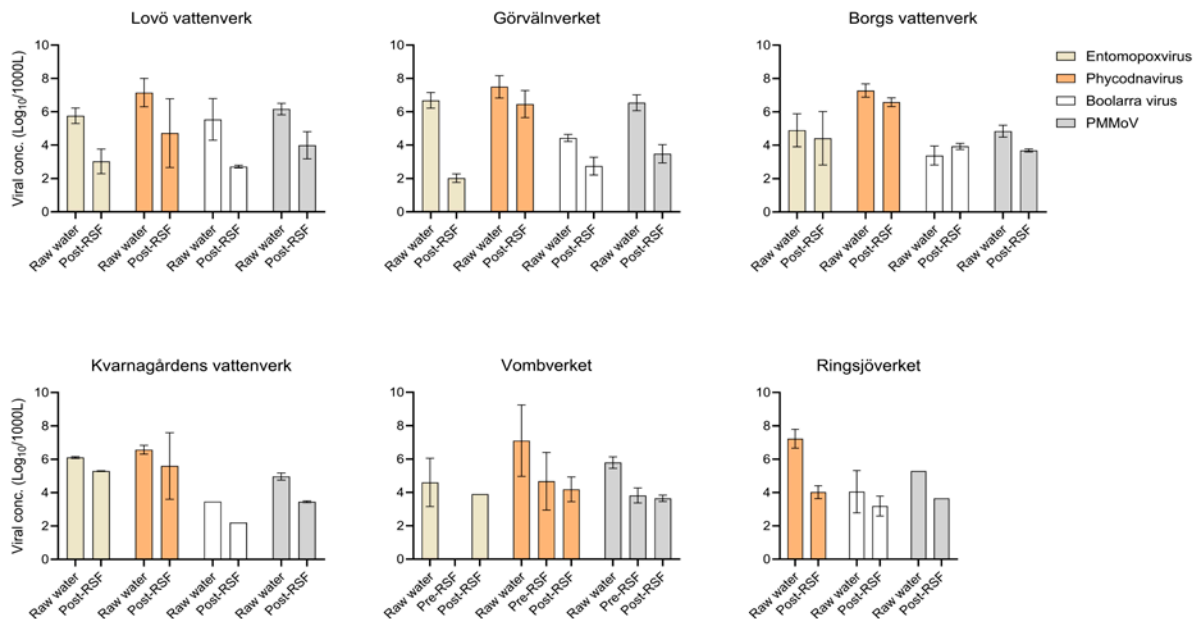
Figur 5.8
Mediannivåer av entomopoxvirus, phycodnavirus, boolarravirus och PMMoV i råvatten och dricksvatten mätt med RT-qPCR (log₁₀/1 000 liter).

Vombverket har infiltrering som första reningssteg, där vi tagit med i beräkningen en tidsförskjutning på 2 månader. Vid jämförelse före och efter infiltrering minskades phycodnavirus med nästan 2 log₁₀/1 000 liter. PMMoV minskades med nästan 1 log₁₀/1 000 liter, medan boolarravirus inte minskade efter infiltrering (Figur 5.9).



Figur 5.9
Figur 5.9 Mediannivåer av phycodnavirus, boolarravirus och PMMoV i råvatten och efter infiltration (post-IF) (log₁₀/1 000 liter), data från två olika provtagningsstillfällen

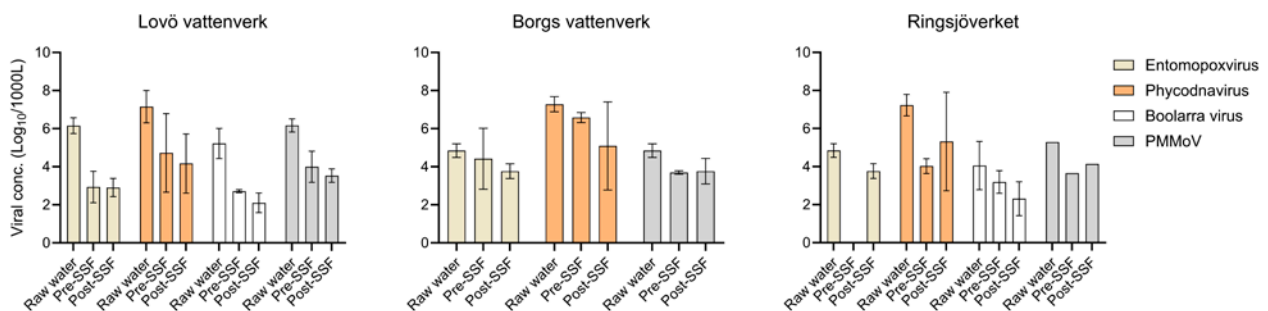
Samtliga sex vattenverk tog prover efter snabb sandfiltrering (post-RSF) (Figur 5.10) och resultaten jämfördes med halterna i råvattnet. Snabb sandfiltrering föregås av olika steg varför det endast är möjligt att jämföra Lovö vattenverk, Görvålverket, Borgs vattenverk och Ringsjöverket då dessa har kemisk fällning samt sedimentation före snabb sandfiltrering. För kombinationen av dessa steg (en barriär) minskades nivåerna av phycodnavirus med mellan 0,7-3,21 log₁₀/1 000. Även nivåerna av PMMoV minskades över denna barriär med mellan 1,15-3,16 log₁₀/1 000. I de prover där entomopoxvirus hittades, minskade nivåerna jämfört med råvatten med 0,48-4,67 log₁₀/1 000 liter. För boolarravirus ökade dock nivåerna vid Borgs vattenverk med 0,55 log₁₀/1 000 liter medan övriga vattenverk minskade nivåerna av boolarravirus över denna barriär med 0,87-2,83 log₁₀/1 000 liter. För Kvarnagården och Vombverket där avskiljningen vid snabb sandfiltrering, utan kemisk fällning och sedimentation, var minskningen mellan 0,18-1,52 log₁₀/1 000 liter.



Figur 5.10

Figur 5.10 Mediannivåer ($\log_{10}/1\ 000$ liter) av entomopoxvirus, phycodnavirus, boolarravirus och PMMoV i råvatten och efter snabb sandfiltrering (post-RSF) eller provtagning före snabb sandfiltrering (pre-RSF), data från två olika provtagningstillfällen.

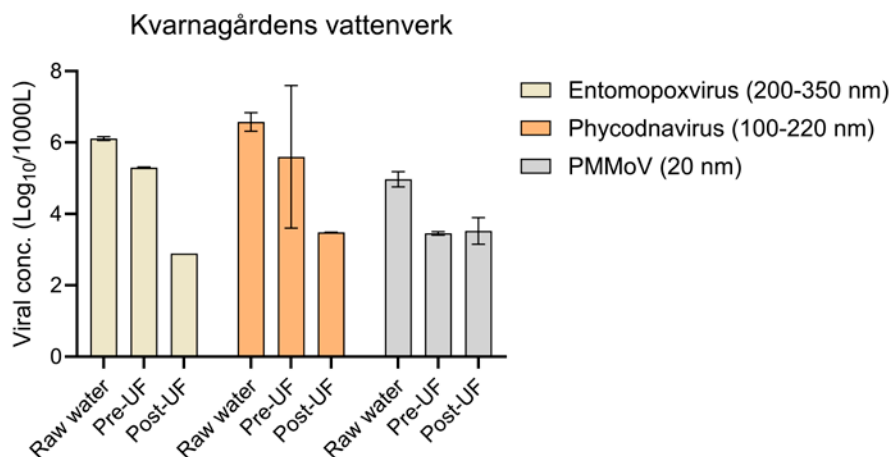
Tre vattenverk samlade prover efter långsam sandfiltrering (post-SSF), nämligen Lovö vattenverk, Borgs vattenverk och Ringsjöverket (Figur 5.11). Vid provtagning i januari detekterades av viss ökning av phycodnavirus och PMMoV vid Ringsjöverket. Detsamma gällde Borgs vattenverk vid samma tidpunkt för Entomopoxvirus. Vid övriga provtagningar minskade virusmängden av samtliga virus med mellan 0,18 och 1,49 $\log_{10}/1\ 000$ liter. Generellt var effekten av långsam sandfiltrering som minst vid kallare årstider. Även tidigare studier beskriver liknande effekt och att lägre biologisk och mikrobiell aktivitet i biofilm i sandfiltret som virus binder till kan påverkas av kallt väder (Moll et al. 1999).



Figur 5.11

Figur 5.11 Mediannivåer ($\log_{10}/1\ 000$ liter) av entomopoxvirus, phycodnavirus, boolarravirus och PMMoV i råvatten samt före och efter långsam sandfiltrering (pre- och post-SSF), data från två olika provtagningstillfällen.

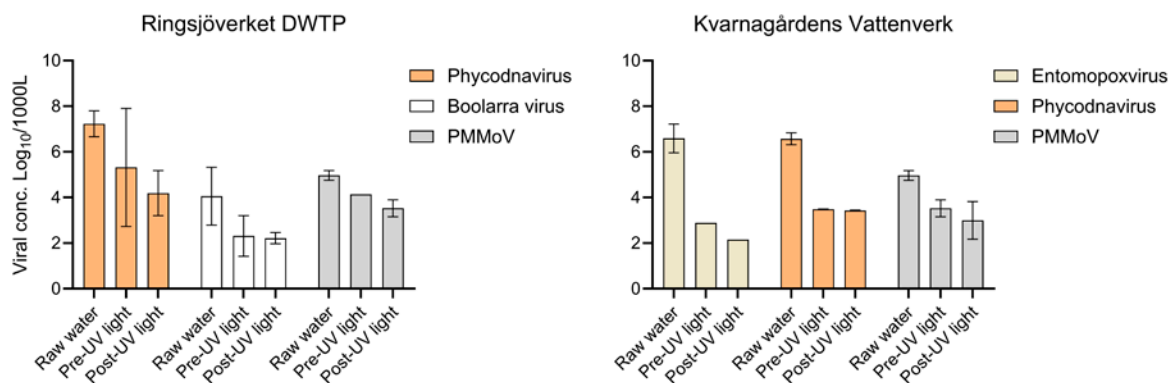
Kvarnagården är det vattenverk där vi samlade prover som har direktfällning i kombination med ultrafiltrering (UF). Ultrafiltret har en porstorlek på ca 20 nm. Större virus som phycodnavirus och entomopoxvirus minskade med i medeltal 2 $\log_{10}/1\ 000$ liter, medan PMMoV som är 18–20 nm i diameter kunde detekteras i samma mängd före som efter ultrafiltrering (Figur 5.12). Detta visar att ultrafiltrering är effektivt i att rena större virus, men beroende på vilken porstorlek ultrafiltret har kan små virus ta sig igenom. Det indikerar även att fällningskemikalien som tillsätts före ultrafiltren inte ensamt påverkar avskiljningen av små virus. Vi kunde detektera samma mängd PMMoV före och efter ultrafiltrering, vilket indikerar att små virus kunde ta sig igenom porerna, men vidare studier behövs för att visa om de virusgenom som tog sig igenom porerna ingår i en viruspartikel och kan infektera celler eller om det bara är det genetiska materialet från virus som passerat ultrafiltren.



Figur 5.12
Figur 5.12 Mediannivåer ($\log_{10}/1000$ liter) av entomopoxvirus, phycodnavirus, och PMMoV i råvatten och före och efter ultrafiltrering (pre- och post-UF), data från två olika provtagningsstillfällen.

Kvarnagården och Ringsjöverket tog även prover före och efter UV-behandling. Minskningen av samtliga detekterade virus var mellan 0,06 och 1,13 $\log_{10}/1\ 000$ liter (Figur 5.13). De flesta virus var väldigt lika i mängden virusgenom före och efter UV-ljus. Vi har tidigare visat att enkelsträngade virusgenom är mera känsliga för UV-ljus, men i den första studien undersökte vi framför allt infektivitet av virus. Här behövs vidare studier för att visa hur infektiösa de virus är som detekterades. RT-qPCR är mera känsligt för detektion av virus än infektivitetsstudier, och detektion av virusgenom med RT-qPCR betyder inte att viruset är infektiöst, då de strängbrott som kan uppstå inte behöver påverka RT-qPCR detektion, vilket också antyds av skillnaden i UV-känslighet mellan enkel- och dubbelsträngade virus.

Figur 5.13
Figur 5.13 Mediannivåer ($\log_{10}/1\ 000$ liter) av entomopoxvirus, boolaravirus, och PMMoV i råvatten och före och efter UV ljus (pre- och post-UV light).



6 Slutsatser och lärdomar

6.1 Slutsatser

För att undvika risk för smitta med enteriska virus som infekterar magtarmkanalen är det viktigt att virus renas effektivt på vattenverken. Mikrobiologiska barriärer kan bygga på avskiljning eller inaktivering av sjukdomsframkallande mikroorganismer. En typisk ytvattenberedning består av kemisk fällning med sedimentering och filtrering för avskiljning, följt av desinfektion med UV-ljus, klor och klorföreningar för inaktivering.

De studier som gjordes på sex olika vattenverk i Sverige visade att majoriteten av de virus som hittas i vatten i vattenverk var bakteriofager. De virus som studerades närmare visade att virusnivåerna minskade mellan $0,52 \log_{10}$ (3,3 gånger) och $4,4 \log_{10}$ (25 100 gånger) per 1 000 liter från råvattnet till dricksvattnet, med en genomsnittlig minskning på $2,09 \log_{10}$ (123 gånger) i de fyra virus som studerades.

Projektets frågeställningar och svar på frågorna

- *Är de mikrobiologiska barriärer som används i dag i vattenverken tillräckliga för att reducera virus, eller behöver de förbättras?*

Barriärer i vattenverken renar effektivare bort större virus än mindre. Mindre virus, i motsvarande storlek som de minsta humanpatogena virus, kunde ta sig ut i dricksvattnet till viss del. Fortsatta studier behövs dock för att visa om dessa är infektiösa.

Inget enskilt reningssteg var tillräckligt effektivt för att rena samtliga undersökta virus, utan flera reningssteg behövs. De metoder som utvecklades här (att kunna mäta nivåer av olika virus som finns naturligt i vattnet) kan användas för att övervaka virusnivåer i vattenverk och även för att studera deras effektivitet.

- *Överlever vissa virus de desinfektionsbehandlingar som används i dag (UV-ljus, klor, klordioxid)?*

Klor och klordioxid är effektivt för att inaktivera virus, men påverkas av den mängd organiska ämnen som finns i vattnet. Vid behandling med klor och klordioxid inaktiverades virus redan efter 2 minuters behandling. Det behövdes dock högre doser än vad som tillämpas i Sverige eftersom cellodlingsmedium resulterade i högre klorförbrukning. Resultaten kan indikera att hög klordos ger en snabb inaktivering av virus som inte beskrivs av det rätlinjiga förhållandet av C^*T .

UV-ljus är också effektivt för att inaktivera virus. Vid UV-ljusinaktivering räckte det med 400 J/m^2 för att inaktivera virus med enkelsträngade genom, men 600 J/m^2 behövdes för att inaktivera adenovirus och rotavirus med dubbelsträngade genom.

Vid provtagning vid vattenverken visade UV-ljus en mindre effekt på den mängd virus som detekterades i vattenproverna, vilket visar på att det är användbart att både kunna mäta virusnivåer i vatten med RT-qPCR, men även att kunna studera virusinfektivitet i cellkultur.

- *Går det att identifiera möjliga indikatorvirus som kan användas för att påvisa förändringar i virusmängder?*

I råvatten hittades flera virus i olika storlekar som kan användas för att visa på effekten av rening av virus i vattenverken.

6.2 Råd och framtida möjligheter

Det krävdes alltså 600 J/m^2 av UV-ljus i denna studie för effektiv inaktivering av virus med dubbelsträngade genom. Den nuvarande standarden på 400 J/m^2 är inte tillräcklig för att inaktivera virus med dubbelsträngade genom som adenovirus och rotavirus och bör ses över. I de aktuella försöken gav 600 J/m^2 en inaktivering med $3 \log_{10}$ (1 000 gånger).

Även klor är effektivt för att inaktivera virus, men är alltså beroende på mängden organiskt material i vattnet. För vattenverk är det därför viktigt att reducera halten av organiskt material innan klorbehandling för att optimera effekten av tillsatt klor.

Som framgår av Livsmedelsverkets rekommendationer är det bra att kombinera flera barriärer för att rena vatten från virus. Genom att kombinera tillräckligt hög dos av UV-ljus med t.ex. ultrafiltrering renas stora mängder virus från vatten. Ultrafiltrering var effektivt för att filtrera bort större virus och med en liten porstorlek med få avvikande porer kan denna barriärkombination vara mycket robust och avlägsna de flesta virus effektivt. Även om en enskild barriär kan vara mycket effektiv så är en kombination av flera olika barriärer att föredra i den händelse att en barriär tappar kapacitet. Små virus kan vara viktiga att mäta, framför allt vid utbrott, speciellt vid membranavskiljning. För andra barriärer kan det vara viktigt att mäta små och stora virus, där fler små virus kan behöva användas för att mäta nivåer av både små och stora virus.

Vatten i vattenverk, både råvatten men även dricksvatten, innehåller mycket virus, främst bakteriofager, där många är av liknande storlek som humana virus. De fyra virus som hittades i större mängd i metagenomikanalysen, phycodnavirus, entomopoxvirus, boollarravirus och pepper milde mottle virus (PMMoV), är virus som finns i många olika vattenkällor och kan användas för att analysera reningsstegen i vattenverk. För att hitta ytterligare virus som kan finnas i vattensystemen finns det möjlighet att genom samarbete med forskare undersöka vilka virus som finns i olika vattenverk.

Detta projekt visar att det finns flera naturliga virus som kan användas för att mäta hur bra olika barriärer fungerar för virusreduktion. Om virusanalyserna blir kommersiellt tillgängliga till en för vattenverksägarna hanterbar kostnad så kan informationen bli ett bra komplement till befintliga indikatororganismer. Då många forskningslabbar har utrustning för att kunna utföra denna typ av analys, skulle detta kunna utföras.

Referenser

- Araud, E., Fuzawa, M., Shisler, J. L., Li, J. och Nguyen, T. H. (2020). Uv inactivation of rotavirus and tulane virus targets different components of the virions. *Appl Environ Microbiol*, 86.
- Asami, T., Katayama, H., Torrey, J. R., Visvanathan, C. och Furumai, H. (2016). Evaluation of virus removal efficiency of coagulation-sedimentation and rapid sand filtration processes in a drinking water treatment plant in bangkok, thailand. *Water Res*, 101, 84-94.
- Baxter, C. S., Hofmann, R., Templeton, M. R., Brown, M. och Andrews, R. C. (2007). Inactivation of adenovirus types 2, 5, and 41 in drinking water by uv light, free chlorine, and monochloramine. *Journal of Environmental Engineering*, 133, 95-103.
- Benko, M., Aoki, K., Arnberg, N., Davison, A. J., Echavarria, M., Hess, M., Jones, M. S., Kajan, G. L., Kajon, A. E., Mittal, S. K., Podgorski, I., San Martin, C., Wadell, G., Watanabe, H., Harrach, B. och Ictv Report, C. (2022). Ictv virus taxonomy profile: Adenoviridae 2022. *J Gen Virol*, 103.
- Berman, D. och Hoff, J. C. (1984). Inactivation of simian rotavirus sa11 by chlorine, chlorine dioxide, and monochloramine. *Appl Environ Microbiol*, 48, 317-23.
- Blackmer, F., Reynolds, K. A., Gerba, C. P. och Pepper, I. L. (2000). Use of integrated cell culture-pcr to evaluate the effectiveness of poliovirus inactivation by chlorine. *Appl Environ Microbiol*, 66, 2267-8.
- Bounty, S., Rodriguez, R. A. och Linden, K. G. (2012). Inactivation of adenovirus using low-dose uv/h2o2 advanced oxidation. *Water Res*, 46, 6273-8.
- Chang, J. C., Ossoff, S. F., Lobe, D. C., Dorfman, M. H., Dumais, C. M., Qualls, R. G. och Johnson, J. D. (1985). Uv inactivation of pathogenic and indicator microorganisms. *Appl Environ Microbiol*, 49, 1361-5.
- Cloete, T. E., Da Silva, E. och Nel, L. H. (1998). Removal of waterborne human enteric viruses and coliphages with oxidized coal. *Curr Microbiol*, 37, 23-7.
- Dahllund, L., Nissinen, L., Pulli, T., Hyttinen, V. P., Stanway, G. och Hyypia, T. (1995). The genome of echovirus 11. *Virus Res*, 35, 215-22.
- Desselberger, U. (2014). Rotaviruses. *Virus Res*, 190, 75-96.
- Dos Santos, G. P., Da Costa, E. V., Tavares, F. N., Da Costa, L. J. och Da Silva, E. E. (2011). Genetic diversity of echovirus 30 involved in aseptic meningitis cases in brazil (1998-2008). *J Med Virol*, 83, 2164-71.
- Eichenwald, H. F. och Shinefield, H. R. (1962). Viral infections of the fetus and of the premature and newborn infant. *Adv Pediatr*, 12, 249-305.
- Frohnert, A., Kreissel, K., Lipp, P., Dizer, H., Hambsch, B., Szewzyk, R. och Selinka, H. C. (2015). Removal of surrogate bacteriophages and enteric viruses from seeded environmental waters using a semi-technical ultrafiltration unit. *Food Environ Virol*.
- Gall, A. M., Marinas, B. J., Lu, Y. och Shisler, J. L. (2015). Waterborne viruses: A barrier to safe drinking water. *PLoS Pathog*, 11, e1004867.
- Gavin, P. J. och Katz, B. Z. (2002). Intravenous ribavirin treatment for severe adenovirus disease in immunocompromised children. *Pediatrics*, 110, e9.
- Gerba, C. P., Gramos, D. M. och Nwachuku, N. (2002). Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by uv light. *Appl Environ Microbiol*, 68, 5167-9.

-
- Goncalves, G., Gouveia, E., Mesquita, J. R., Almeida, A., Ribeiro, A., Rocha-Pereira, J. och Sao Jose Nascimento, M. (2011). Outbreak of acute gastroenteritis caused by adenovirus type 41 in a kindergarten. *Epidemiol Infect*, 139, 1672-5.
- Grapin, M., Mirand, A., Piquier, D., Basset, A., Bendavid, M., Bisseux, M., Jeannoel, M., Kireche, B., Kossorotoff, M., L'honneur, A. S., Robin, L., Ville, Y., Renolleau, S., Lemee, V., Jarreau, P. H., Desguerre, I., Lacaille, F., Leruez-Ville, M., Guillaume, C., Henquell, C., Lapillonne, A., Schuffenecker, I. och Aubart, M. (2023). Severe and fatal neonatal infections linked to a new variant of echovirus 11, france, july 2022 to april 2023. *Euro Surveill*, 28.
- Gray, J. (2011). Rotavirus vaccines: Safety, efficacy and public health impact. *J Intern Med*, 270, 206-14.
- Iturriza Gomara, M., Simpson, R., Perault, A. M., Redpath, C., Lorgelly, P., Joshi, D., Mugford, M., Hughes, C. A., Dalrymple, J., Desselberger, U. och Gray, J. (2008). Structured surveillance of infantile gastroenteritis in east anglia, uk: Incidence of infection with common viral gastroenteric pathogens. *Epidemiol Infect*, 136, 23-33.
- Jacquet, N., Wurtzer, S., Darracq, G., Wyart, Y., Moulin, L. och Moulin, P. (2021). Effect of concentration on virus removal for ultrafiltration membrane in drinking water production. *Journal of Membrane Science*, 634, 119417.
- Kajon, A. E., Dickson, L. M., Metzgar, D., Houng, H. S., Lee, V. och Tan, B. H. (2010). Outbreak of febrile respiratory illness associated with adenovirus 11a infection in a singapore military training camp. *J Clin Microbiol*, 48, 1438-41.
- Kulanayake, S. och Tikoo, S. K. (2021). Adenovirus core proteins: Structure and function. *Viruses*, 13.
- La Rosa, G., Fratini, M., Della Libera, S., Iaconelli, M. och Muscillo, M. (2012). Emerging and potentially emerging viruses in water environments. *Ann Ist Super Sanita*, 48, 397-406.
- Lanata, C. F., Fischer-Walker, C. L., Olascoaga, A. C., Torres, C. X., Aryee, M. J., Black, R. E., Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health, O. och Unicef (2013). Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: A systematic review. *PLoS One*, 8, e72788.
- Li, D., Gu, A. Z., He, M., Shi, H. C. och Yang, W. (2009). Uv inactivation and resistance of rotavirus evaluated by integrated cell culture and real-time rt-pcr assay. *Water Res*, 43, 3261-9.
- Lim, M. Y., Kim, J. M. och Ko, G. (2010). Disinfection kinetics of murine norovirus using chlorine and chlorine dioxide. *Water Res*, 44, 3243-51.
- Lopez-Bueno, A., Tamames, J., Velazquez, D., Moya, A., Quesada, A. och Alcamí, A. (2009). High diversity of the viral community from an antarctic lake. *Science*, 326, 858-61.
- Marie-Cardine, A., Goullain, K., Mouterde, O., Castignolles, N., Hellot, M. F., Mallet, E. och Buffet-Janvresse, C. (2002). Epidemiology of acute viral gastroenteritis in children hospitalized in rouen, france. *Clin Infect Dis*, 34, 1170-8.
- Mayer, B. K., Ryu, H., Gerrity, D. och Abbaszadegan, M. (2010). Development and validation of an integrated cell culture-qrtpcr assay for simultaneous quantification of coxsackieviruses, echoviruses, and polioviruses in disinfection studies. *Water Sci Technol*, 61, 375-87.
- Mcconnell, L. K., Sims, R. C. och Barnett, B. B. (1984). Reovirus removal and inactivation by slow-rate sand filtration. *Appl Environ Microbiol*, 48, 818-25.
- Mehle, N. och Ravnkar, M. (2012). Plant viruses in aqueous environment - survival, water mediated transmission and detection. *Water Res*, 46, 4902-17.
-

-
- Moll, D. M., Summers, R. S., Fonseca, A. C. och Matheis, W. (1999). Impact of temperature on drinking water biofilter performance and microbial community structure. *Environmental Science & Technology*, 33, 2377-2382.
- Naesens, L., Lenaerts, L., Andrei, G., Snoeck, R., Van Beers, D., Holy, A., Balzarini, J. och De Clercq, E. (2005). Antiadenovirus activities of several classes of nucleoside and nucleotide analogues. *Antimicrob Agents Chemother*, 49, 1010-6.
- Oberste, M. S., Maher, K., Kennett, M. L., Campbell, J. J., Carpenter, M. S., Schnurr, D. och Pallansch, M. A. (1999). Molecular epidemiology and genetic diversity of echovirus type 30 (e30): Genotypes correlate with temporal dynamics of e30 isolation. *J Clin Microbiol*, 37, 3928-33.
- Page, M. A., Shisler, J. L. och Marinas, B. J. (2009). Kinetics of adenovirus type 2 inactivation with free chlorine. *Water Res*, 43, 2916-26.
- Park, G. W., Linden, K. G. och Sobsey, M. D. (2011). Inactivation of murine norovirus, feline calicivirus and echovirus 12 as surrogates for human norovirus (nov) and coliphage (f+) ms2 by ultraviolet light (254 nm) and the effect of cell association on uv inactivation. *Lett Appl Microbiol*, 52, 162-7.
- Patel, M. M., Pitzer, V. E., Alonso, W. J., Vera, D., Lopman, B., Tate, J., Viboud, C. och Parashar, U. D. (2013). Global seasonality of rotavirus disease. *Pediatr Infect Dis J*, 32, e134-47.
- Piralla, A., Borghesi, A., Di Comite, A., Giardina, F., Ferrari, G., Zanette, S., Figar, T. A., Angelini, M., Pisoni, C., Pitrolo, A. M. G., Paolucci, S., Rovida, F., Pelliccioli, I., Bonanomi, E., Baldanti, F. och Ghirardello, S. (2023). Fulminant echovirus 11 hepatitis in male non-identical twins in northern italy, april 2023. *Euro Surveill*, 28.
- Prem, M. (2018). Schmutzdecke- a filtration layer of slow sand filter. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 7, 637-645.
- Qiao, Z., Ye, Y., Chang, P. H., Thirunarayanan, D. och Wigginton, K. R. (2018). Nucleic acid photolysis by uv(254) and the impact of virus encapsidation. *Environ Sci Technol*, 52, 10408-10415.
- Ruffell, K. M., Rennecker, J. L. och Mariñas, B. J. (2000). Inactivation of cryptosporidium parvum oocysts with chlorine dioxide. *Water Research*, 34, 868-876.
- Saguti, F., Churqui, M. P., Kjellberg, I., Wang, H., Ottoson, J., Paul, C., Bergstedt, O., Norder, H. och Nystrom, K. (2022). The uv dose used for disinfection of drinking water in sweden inadequately inactivates enteric virus with double-stranded genomes. *Int J Environ Res Public Health*, 19.
- Saguti, F., Kjellberg, I., Churqui, M. P., Wang, H., Tunovic, T., Ottoson, J., Bergstedt, O., Norder, H. och Nystrom, K. (2023). The virucidal effect of the chlorination of water at the initial phase of disinfection may be underestimated if contact time calculations are used. *Pathogens*, 12.
- Santos, N. och Hoshino, Y. (2005). Global distribution of rotavirus serotypes/genotypes and its implication for the development and implementation of an effective rotavirus vaccine. *Rev Med Virol*, 15, 29-56.
- Savolainen-Kopra, C., Paananen, A., Blomqvist, S., Klemola, P., Simonen, M. L., Lappalainen, M., Vuorinen, T., Kuusi, M., Lemey, P. och Roivainen, M. (2011). A large finnish echovirus 30 outbreak was preceded by silent circulation of the same genotype. *Virus Genes*, 42, 28-36.
- Shirasaki, N., Matsushita, T., Matsui, Y. och Murai, K. (2017). Assessment of the efficacy of membrane filtration processes to remove human enteric viruses and the suitability of bacteriophages and a plant virus as surrogates for those viruses. *Water Res*, 115, 29-39.
-

-
- Soares, C. C., Volotao, E. M., Albuquerque, M. C., Da Silva, F. M., De Carvalho, T. R., Nozawa, C. M., Linhares, R. E. och Santos, N. (2002). Prevalence of enteric adenoviruses among children with diarrhea in four brazilian cities. *J Clin Virol*, 23, 171-7.
- Tate, J. E., Burton, A. H., Boschi-Pinto, C., Steele, A. D., Duque, J., Parashar, U. D. och Network, W. H.-C. G. R. S. (2012). 2008 estimate of worldwide rotavirus-associated mortality in children younger than 5 years before the introduction of universal rotavirus vaccination programmes: A systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis*, 12, 136-41.
- Teunis, P. F., Moe, C. L., Liu, P., Miller, S. E., Lindesmith, L., Baric, R. S., Le Pendu, J. och Calderon, R. L. (2008). Norwalk virus: How infectious is it? *J Med Virol*, 80, 1468-76.
- Wang, H., Churqui, M. P., Tunovic, T., Enache, L., Johansson, A., Lindh, M., Lagging, M., Nystrom, K. och Norder, H. (2023). Measures against covid-19 affected the spread of human enteric viruses in a swedish community, as found when monitoring wastewater. *Sci Total Environ*, 895, 165012.
- Wang, H., Kjellberg, I., Sikora, P., Rydberg, H., Lindh, M., Bergstedt, O. och Norder, H. (2020). Hepatitis e virus genotype 3 strains and a plethora of other viruses detected in raw and still in tap water. *Water Res*, 168, 115141.
- Yarmolskaya, M. S., Shumilina, E. Y., Ivanova, O. E., Drexler, J. F. och Lukashev, A. N. (2015). Molecular epidemiology of echoviruses 11 and 30 in russia: Different properties of genotypes within an enterovirus serotype. *Infect Genet Evol*, 30, 244-248.
- Yezli, S. och Otter, J. A. (2011). Minimum infective dose of the major human respiratory and enteric viruses transmitted through food and the environment. *Food Environ Virol*, 3, 1-30.
- Zhu, Z., Zhang, Y., Xu, S., Yu, P., Tian, X., Wang, L., Liu, Z., Tang, L., Mao, N., Ji, Y., Li, C., Yang, Z., Wang, S., Wang, J., Li, D. och Xu, W. (2009). Outbreak of acute respiratory disease in china caused by b2 species of adenovirus type 11. *J Clin Microbiol*, 47, 697-703.
- Ødegaard E., H., Østerhus S,W., Pott, Bm. (2014). Microbial barrier analysis (mba) – a guideline. . Hamar, Norway.: Norwegian Water BA

Svenskt Vatten

UTVECKLING

Svenskt Vatten Utveckling
Svenskt Vatten AB

POSTADRESS BOX 14057, 16714 Bromma

BESÖKSADRESS Gustavslundsvägen 12, 16751 Bromma

TELEFON 08-50600200

E-MAIL svensktvatten@svensktvatten.se

www.svensktvatten.se