

Nýsköpun & neytendur
Innovation & Consumers

Vinnsla, virðisaukning & eldi
Value Chain, Processing
& Aquaculture

Mælingar & miðlun
Analysis & Consulting

Líftækni & lífefni
Biotechnology & Biomolecules

Öryggi, umhverfi & erfðir
Food Safety, Environment
& Genetics



Aðferðaþróun og skimun fyrir iðraveirum í matvælum og vatni – 2011

Sveinn H. Magnússon
Eyjólfur Reynisson
Viggó Þór Marteinnsson

Öryggi, umhverfi og erfðir

Skýrsla Matís 46-11
Desember 2011

ISSN 1670-7192

Report closed until 01.01.2014

<i>Titill / Title</i>	Aðferðaþróun og skimun fyrir iðraveirum í matvælum og vatni – 2011 / Method development and screening for enteric viruses in food and water – 2011		
<i>Höfundar / Authors</i>	Sveinn H. Magnússon, Eyjólfur Reynisson, Viggó Þór Marteinsson		
<i>Skýrsla / Report no.</i>	46-11	<i>Útgáfudagur / Date:</i>	Desember 2011
<i>Verknr. / project no.</i>	6018 - 1764	Skýrsla lokuð til 01.01.2014	
<i>Styrktaraðilar / funding:</i>			
<i>Ágríp á íslensku:</i>	<p>Iðraveirur, einkum nóróveirur eru einar algengustu orsakir matvælasýkinga á vesturlöndum. Þær berast með saurmenguðu vatni, matvælum og manna á milli. Markmið verkefnisins er að þróa aðferðafræði til greininga á iðraveirum í vatni og matvælum og nýta þær aðferðir til greininga á veirum í umhverfi og matvælum hérlendis. Þessi skýrsla lýsir vinnu við verkefnið árið 2011.</p> <p>Gerð var athugun á því hvort uppsett aðferð til greiningar á iðraveirum í drykkjarvatni væri nýtanleg til greiningar á iðraveirum í yfirborðsvatni. Gáfu þær prófanir góða raun og í kjölfarið var skimað fyrir nóróveirum og hepatitis A veirum völdum ám og lækjum í nágrenni Reykjavíkur. Umhverfisskimanir fyrir iðraveirum hafa ekki verið framkvæmdar hérlendis fyrr að því er við þekkjum til. Niðurstöður þeirrar skimunnar sýndu að nóróveirur var að finna víða í yfirborðsvatni í nágrenni byggðar.</p> <p>Einnig var unnið að innleiðingu aðferða til greiningar á nóróveirum í skelfiski og tekið þátt í samanburðarprófunum á vegum CEFAS í Bretlandi í því samhengi. Sú vinna sýndi að aðferðafræðinni var nokkuð ábótavant en ekki tókst að greina veiruna í menguðum skelfiski. Sá vandi liggur að öllum líkindum í RNA einangrunarskrefi aðferðarinnar og vonir standa til að nýtt kerfi til einangrunnar á kjarnsýru úr veirum (MiniMag, Biomérieux) sem Matís hefur nýverið fest kaup á muni leysa þá vankanta.</p>		
<i>Lykilorð á íslensku:</i>	<i>Nóróveirur, hepatitis A veirur, greiningaraðferðir, skelfiskur, yfirborðsvatn</i>		
<i>Summary in English:</i>	<p>Enteric viruses, particularly norovirus are the most common cause of foodborne illness in industrial countries. The viruses are transmitted by fecally contaminated waters, foods and from person to person. The aims of this project are the development of methods for the detection of enteric viruses in foods and water, and the implementation of those methods for studies of enteric viruses in foods and environment in Iceland. This report describes work within the project during 2011.</p> <p>The applicability of the analysis method for enteric viruses in drinking water was tested for surface waters. These testing gave promising results and showed that the method could be used for detecting enteric viruses in environmental waters. Environmental screening was performed to study the prevalence of norovirus and hepatitis A virus in surface waters around Reykjavík. The results of the screening showed that norovirus was commonly found in streams and rivers in proximity of inhabited areas.</p> <p>Analysis methods for the detection of enteric viruses was implemented and tested by partaking in a proficiency test supervised by CEFAS, UK. Those results showed the method to be somewhat lacking and no norovirus could be detected in contaminated shellfish. Newly acquired setup for the extraction of viral nucleic acid (Minimag, Biomérieux) is expected to resolve the current shortcomings of the method.</p>		
<i>English keywords:</i>	<i>Norovirus, hepatitis A virus, analysis methods, shellfish, surface water</i>		

Efnisyfirlit

Inngangur	1
Framkvæmd.....	2
Niðurstöður	4
Umræður	6
Samantekt	8

Inngangur

Iðraveirur s.s. nóróveirur og hepatitis A eru algengar orsakir iðrasýkinga vegna neyslu mengaðs drykkjarvatns og matvæla. Það eru einkum nóróveirur sem valda iðrasýkingum hérlendis en nóróveirur eru taldar orsök yfir helmings allra iðrasýkinga á vesturlöndum. Nóróveirur smitast einkum við neyslu saurmengaðra matvæla og drykkjarvatns. Það eru einkum matvæli sem neytt er hrárra eða lítið eldaðra s.s. skelfisks, grænmetis og ávaxta sem eru varhugarverð m.t.t. nórósýkinga. Veiran þolir frost en drepst við hitun yfir 60°C. Veiran er ennfremur bráðsmitandi og berst hratt milli manna. Hún berst í miklum magni frá sýktum einstaklingum gegnum saur og uppsölu. Sýkt fólk sem vinnur að framleiðslu eða framreiðslu matvæla getur því hæglega komið af stað hópsýkingum.

Lengi vel var ekki mögulegt að greina nóróveirur í vatni og matvælum. Ekki er hægt að rækta veiruna og hana verður að greina með sameindalíffræðilegum aðferðum. Svið Öryggis, umhverfis og erfða hefur sett upp greiningaraðferðir byggðar á real time PCR tækni til greiningar á erfðaefni nóróveira og hepatitis A veira. Í fyrra (2010) var haldið áfram með þá vinnu og einkum unnið að uppsetningu aðferðar til einangrunar á veirum úr vatnssýnum og hefur greiningaraðferðin hefur verið sett upp fyrir kranavatn.

Vinnu við uppsetningu og innleiðingu aðferða til greiningar á iðraveirum í vatni og matvælum hefur verið haldið áfram í ár (2011) með áherslu á greiningu iðraveira í yfirborðsvatni og úr skelfiski.

Þétting veira úr yfirborðsvatni

Mun erfiðara getur reynst að einangra iðraveirur úr yfirborðsvatni en kranavatni sökum þess hve mikið getur verið af óhreinindum, s.s. jarðvegsögnum og lífrænum ögnum í yfirborðsvatni. Þéttingar iðraveira úr vatnssýnum byggir á síun gegnum himnusíu og óhreinindi úr vatnssýninu gera síun óskilvirka og geta haft neikvæð áhrif á losun veira af filternum. Ennfremur er ekki hægt að komast hjá því að eitthvað af þessum efnun fylgi veirunum gegnum allt einangrunarferlið, sé að finna í RNA kjarnsýru sýnisins og valdi PCR hindrun við greiningu.

Til að kanna skilvirkni þéttingar og greiningaraðferðarinnar í heild sinni til greiningar á iðraveirum á yfirborðsvatni var sýni af yfirborðsvatni smitað og greint m.t.t. nóróveira, GI og GII.

Skimun yfirborðsvatns

Tilvist og útreiðsla iðraveira í vatni og umhverfi hefur ekki verið rannsökuð hérlandis en slík skimun hefur ekki verið gerð hérlandis áður. Skimað var eftir iðraveirunum, nóró og HAV í nokkrum völdum vatnsföllum og tjörnum á suðvesturhorninu. Sýni voru tekin yfir þriggja mánaða tímabil (Janúar-Febrúar-Mars) úr nokkrum vatnsföllum í kringum höfuðborgarsvæðið. Reynt var að finna sýnatökustaði sem mögulega gætu verið megnaður af skólpi. Sýkingar af völdum iðraveira, einkum nóróveira eru mjög algengar sérstaklega yfir vetrartímann.

CRL-nóróveiru og hepatitis A ringtrial í skelfiski

Markmiðið er að geta greint iðraveirur í fleiri matrisum en vatni og því var hugað að uppsetningu aðferðar til greiningar á iðraveirum í skelfiski. Í því augnamiði var tekið þátt í nóróveiru og hepatitis A CRL ring-trial á vegum CEFAS.

Framkvæmd

Þétting veira úr yfirborðsvatni

Vatnssýni úr ánni Bugðu í Kjós var notað til aðferðaprófunar. Sýnið var tilraunasmitað með með nóróveiru (GII) menguðum sýni sem fengið var frá Veirufræðideild Landspítalans. Síaður var ~1L af menguðu sýni og ~1L af ómenguðu sýni. Sýnin voru for-síuð gegnum servíettu (Kimberly-Clark) til að sía frá grugg. Sýnið var þvínæst síað gegnum Zetapor filter eftir að pH var fellt niður undir 7 með nokkrum dropum af 1M HCl. Skipta þurfti um filter 1-2x til að ná að sía 1L af sýni. Veirur voru losaðar af filter með 3ml af 50mM Glycine-NaOH buffer [pH 9.5] pH þvínæst fellt í ~7 með 0.1M HCl og sýni þétt með spunasúlu (Amicon Ultra-4). Sýni voru fryst við -20°C fram að RNA einangrun. RNA var einangrað við RN-asa fríar aðstæður með

QIAamp viral RNA einangrunar súlum samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda (Qiagen, Valencia, CA). Real time PCR greiningar voru gerðar samkvæmt prótókól fyrir genótýpu GI og GII. Gerðar voru örverutalningar á sýninu m.t.t. saurkóli og enterokokka til að fá hugmynd um hvort undirliggjandi saurmengun væri í sýninu.

Skimun yfirborðsvatns

Vatnssýnum var safnað af tíu stöðum í umhverfi Reykjavíkur og á suð-vesturlandi, valin voru nokkur vatnsföll á suðvesturlandi nærri byggð ásamt Tjörninni í Reykjavík og Fossvogslæk (sjá töflu yfir sýnatökustaði og yfirlitsmyndir í viðauka). Sýni voru tekin einu sinni í mánuði af öllum sýnatökustöðum yfir þriggja mánaða skeið (Febrúar-Mars-Arpíl) veturinn 2011.

5L af sýni voru teknir á hverjum stað og sýni geymd við 4°C þar til síun var framkvæmd. Talningar á saurkólí bakteríum voru framkvæmdar úr öllum sýnum. Sýnin voru skimuð fyrir nóróveirum með real-time PCR greiningarhvörfum að undangenginni síun. Síun fór fram á eftirfarandi máta: 1L af yfirborðsvatn var for-síaður gegnum servíettu (Kimberly-Clark) þar sem mikið af gruggi var í mörgum sýnanna. ~1L af vatnssýni var þvínæst síaður gegnum electrópósitívan Zetapor filter eftir að pH var fellt niður undir 7 með nokkrum dropum af 1M HCl. Skipta þurfti um filter 1-2x til að ná að sía 1L af sýni. Veirur voru losaðar af filter með 3ml af 50mM Glycine-NaOH buffer [pH 9.5] (ATHs. Filterar úr sýnum 1-8 voru mögulega þvegnir með ~200mM glycine buffer en ekki 50mM), pH þvínæst fellt í ~7 með 0.1M HCl og sýni þétt með spunasúlu (Amicon Ultra-4). Sýni voru fryst við -20°C fram að RNA einangrun.

Síaður var 1L af NoV smituðu sýni. Jákvætt veirusýni var útbúið úr menguðum saur frá Veirufræðideild Landspítalans. Útbúin var 1X PBS með viðbættu magnesíum og kalsíum - þessar jónir stabilísera veirurnar í lausninni – ásamt sýklalyfjum (100ug/ml) ampicillin og kanamycin. Sýni 5 var notað til smitunnar en mjög lítil örverumengun var í því sýni.

RNA var einangrað við RN-asa fríar aðstæður með QIAamp viral RNA einangrunar súlum samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda (Qiagen, Valencia, CA). Real time PCR greiningar voru gerðar samkvæmt prótókól fyrir GI og GII.

CRL-nóróveiru og hepatitis A ringtrial í skelfiski

Sýni fyrir ring trial samanstóðu af náttúrulega smituðum og tilraunasmituðum Kyrrahafs ostrum (*Crassostrea gigas*) ásamt „lenticules“ og frostþurrkuðum meltingarkirtlum úr náttúrulega smituðum ostrum. Nánari lýsingu á undirbúningi sýnanna má sjá í ítarefni frá CEFAS sem fylgdi sýnunum (Norovirus and hepatitis A virus (HAV) ring trial (RT 39) – 2011).

Eftir að sýni bárust til Matís voru þau geymd við 4°C þar til unnin. Skelfissýni voru unnin samkvæmt protocol frá CEFAS útgefnum 2006. Aðferðin var svohljóðandi í fljótri yfirferð. Meltingarkirtlar skelfisskanna voru fjarlægðir og þeir vegnir. Frostþurrkaðir meltingarkirtlar voru meðhöndlaðir á sama máta Kirtlarnir voru þvínæst skornir niður og próteinasá K bætt

við (ml fyrir g) og incuberaðir í hitaskáp við 37°C í 60+/-5min á hristiplatta. Secondary incubation var þvínæst framkvæmd við 65°C í vatnsbaði í 15+/-1min. Sýnin voru þvínæst spunnin við 3000rpm í 5 mínútur og flotið tekið til RNA einangrunar. „Lenticules“ voru leystar upp í 10ml af sterílu vatni lausn tekin til RNA einangrunar

RNA var einangrað úr sýnunum með QiaAMP viral RNA minikit (Qiagen). Teknir voru 140ul af floti/lausn og RNA einangrað samkvæmt aðferðalýsingu framleiðanda. RNA leyst upp í RNasa fríum buffer og spunið niður í RNasa frí eppendorf glös. RNA geymt við -20°C fram að PCR greiningu.

Real time PCR hvörf til greiningar á nóróveirum GI og GII auk HAV voru keyrð á sýnunum skvt. prótókól Matís.

Niðurstöður

Þétting veira úr yfirborðsvatni

Örverutalningar úr sýninu sýndu 8 saurkólí og 3 enterokokka í 100ml. Niðurstöður real time PCR greiningar á einangruðum sýnum má sjá í töflu 1. Sterkt svar við nóróveiru GII greinist í tilraunasmituðu sýni. Ósmitað sýni gáfu hins vegar einnig GII mögnun sem gefur til kynna að um náttúrulegt smit sé að ræða í sýninu fyrir.

Tafla 1. Niðurstöður real-time PCR greiningar á tilraunasmituðu og ósmituðu yfirborðsvatni.

	GI (Ct)	GI (Ct)
Smitað sýni	No Ct	29.80
Ósmitað sýni	No Ct	43.07

Skimun yfirborðsvatns

Örverutalningar og niðurstöður skimunar á nóró og HAV veirum með real time PCR greininga eru dregnar fram í töflum 2-4.

Tafla 2. Niðurstöður örverugreininga úr vatnssýnum, febrúar sýnataka.

	<i>sampling site</i>	<i>t °C</i>	<i>pH</i>	<i>fecal coliforms</i>	<i>enterococci</i>	<i>GI (Ct)</i>	<i>GII (Ct)</i>	<i>HAV (Ct)</i>
1	Varmá Hverag.	15	7,55	16000	3800	No Ct	32,18	No Ct
2	Úlfarsá	1,2	7,45	48	23	No Ct	No Ct	No Ct
3	Varmá Mos.	2,4	7,50	270	63	No Ct	No Ct	No Ct
4	Suðurá	1,4	7,15	280	42	33,74	42,63	No Ct
5	Bugða	1,3	7,30	8	3	No Ct	43,07	No Ct
6	Elliðaár no. 1 (litlu Elliðaár)	1,9	7,50	470	79	No Ct	No Ct	No Ct
7	Elliðaár no.2 (stóru Elliðaár)	1,2	7,55	41	71	No Ct	No Ct	No Ct
	Tjörninn no.1							
8	(Hljómskálagarður)	7,8	7,85	230	51	No Ct	No Ct	No Ct
9	Tjörninn no.2 (Vatnsmýri)	7,6	7,75	1400	81	No Ct	No Ct	No Ct
10	Fossvogslækur	8,2	7,70	380	100	No Ct	33,81	No Ct

Tafla 3. Niðurstöður örverugreininga úr vatnssýnum, mars sýnataka.

	<i>sampling site</i>	<i>t °C</i>	<i>pH</i>	<i>leiðni µs/cm</i>	<i>fecal coliforms(100ml)</i>	<i>GI (Ct) stock</i>	<i>GII (Ct) stock</i>	<i>GII (Ct) 1/10 diluted</i>	<i>HAV (Ct) stock</i>
1	Varmá Hverag.	14	7,65	200	36000	34,48	34,1	35,1	No Ct
2	Úlfarsá	4,5	7,6	120	9	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
3	Varmá Mos.	5,4	7,55	140	240	No Ct	40,7	40,1	No Ct
4	Suðurá	4,5	7,2	93	240	34,53	36,6	No Ct	No Ct
5	Bugða	5,5	7,35	68	0	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
6	Elliðaár no. 1	5,5	7,55	120	180	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
7	Elliðaár no.2	5,2	7,7	90	8	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
8	Tjörninn no.1	10,1	7,75	72	4500	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
9	Tjörninn no.2	8,6	8,05	78	230	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
10	Fossvogslækur	9,9	7,55	210	2300	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct

Tafla 4. Niðurstöður örverugreininga úr vatnssýnum, apríl sýnataka.

	<i>sampling site</i>	<i>t °C</i>	<i>pH</i>	<i>leiðni µs/cm</i>	<i>fecal coliforms(100ml)</i>	<i>GI (Ct)</i>	<i>GII (Ct)</i>	<i>HAV (Ct)</i>
	Varmá							
1	Hvearag.	15,5	7,35	210	2500	32,37	No Ct	No Ct
2	Úlfarsá	6,5	7,5	120	17	No Ct	No Ct	No Ct
3	Varmá Mos.	6,6	7,5	150	700	No Ct	No Ct	No Ct
4	Suðurá	5,7	7,25	100	540	No Ct	No Ct	No Ct
5	Bugða	4,6	7,2	68	1	No Ct	No Ct	No Ct
6	Elliðaár no. 1	7,4	7,35	120	10	No Ct	No Ct	No Ct
7	Elliðaár no.2	7,2	7,45	99	5	No Ct	No Ct	No Ct
8	Tjörninn no.1	11,9	7,9	360	450	No Ct	No Ct	No Ct
9	Tjörninn no.2	10,8	8,15	660	510	No Ct	No Ct	No Ct
10	Fossvogslækur	12,6	7,7	310	5300	No Ct	No Ct	No Ct

CRL-nóróveiru og hepatitis A ringtrial í skelfiski

Niðurstöður úr real time PCR greiningum sýnanna má sjá í töflum 5 og 6.

Tafla 5. Niðurstöður real time PCR greininga á nóróveirum og HAV.

Sýni	Nóróvírus G1 (Ct)	Nóróvírus GII (Ct)	Hepatitis A vírus (Ct)
Shellfish sample 1	No Ct	No Ct	No Ct
Shellfish sample 2	No Ct	No Ct	No Ct
Lenticule 1	No Ct	36,47	No Ct
Lenticule 2	No Ct	No Ct	No Ct
Lenticule 3	No Ct	38,59	30,92
Lenticule 4	32,55	No Ct	No Ct
Freeze dried	No Ct	No Ct	No Ct

Tafla 6. Ætlaðar niðurstöður úr sýnum (*copies/g eða copies/lenticule*)

Sýni	Nóróvírus G1 (Ct)	Nóróvírus GII (Ct)	Hepatitis A vírus (Ct)
Shellfish sample 1	-	-	+ (5.1 x 10 ²)
Shellfish sample 2	+ (4.8 x 10 ²)	+ (2.3 x 10 ³)	-
Lenticule 1	-	+ (4.8 x 10 ³)	-
Lenticule 2	-	-	-
Lenticule 3	-	-	+ (4.9 x 10 ⁵)
Lenticule 4	+ (1.7 x 10 ⁴)	-	-
Freeze dried	+ (6.2 x 10 ²)	+ (3.6 x 10 ²)	-

Umræður

Þétting veira úr yfirborðsvatni

Niðurstöður prófunarinnar sýna að uppsett aðferð til þéttingar og greiningar á iðraveirum úr kranavatni má einnig nota til greiningar á veirum úr yfirborðsvatni. Veiran greinist auðveldlega úr smituðu sýni en það sem meira er þá greinist hér einnig veira í náttúrulega vatnssýninu. Áhugavert er að greiningaraðferðin hefur nægjanlega næmni til að greina nóróveirur úr umhverfissýnum. Almenn er ekki hægt að greina nóróveirur úr yfirborðsvatni sökum þess í hve litlum mæli þær eru þar að finna. Ástæða þess að við finnum hér nóróveiru í vatnssýninu er væntanlega sú að miklar leysingar voru nóttina fyrir sýnatöku sem valdið hefir yfirflæði úr rotþrómi í sumarbústaðarlandi ofanvið sýnatökustaðinn. Það undirstrikar notagildi aðferðarinnar og sýnir að uppsett aðferð til þéttingar og einangrunar iðraveira má nýta til greiningar á nóróveirum í yfirborðsvatni og kranavatni.

Skimun yfirborðsvatns

Mikla mengun saurgerla má greina í velflestum þeirra vatnsfalla, lækja og tjarna sem skoðuð voru. Enterococcar finnast í saur manna og dýra og mengun af enterococcum bendir til saurmengunar og mögulegra mengunar af iðrasýklum. *E. coli* er vísbending um nýlega saurmengun þar sem bakterían lifir aðeins í skamman tíma í umhverfi. Öll vatnsföllin eru í meira eða minna mæli tengd eða í nágrenni byggðar. Þessa saurgerlamengun er þó ekki hægt að tengja mönnum sérstaklega heldur stafar hún einnig að miklu leiti frá dýrum og einkum fuglum. Nóróveirur í sýnunum teknum í: Varmá í Hveragerði, Varmá í Mosfellsbæ, Suðurá í Mosfellsdal, Fossvogslækur og Bugðu í Kjós benda þó óbyggjandi til skólpmengunar.

Miklar rigningar og flóð daginn fyrir febrúar sýnatökuna juku líkur á því að skólp bærist í vatnsföllin gegnum lekar skólplangir eða flæði upp úr skólplögnum og rotþróum. Sýni greindust í fernum ám og lækjum eftir það vatnsveður. Sýnataka í mars sýndi einnig jákvæð sýni úr fernum ám. Þannig að svo virðist sem leki úr skólperfi yfir í vatnsföll sé viðvarandi vandamál. Einkum í Suðurá í Mosfellsdal sem reyndist menguð bæði í febrúar og mars. Heilbrigðisfulltrúa Kjósasvæðis staðfesti þann grun og sagði skólpmengun frá byggð við Suðurá viðvarandi vandamál.

Í Varmá í Hveragerði greinast nóróveirur á öllum þrennum sýnatökutímum. Sú mengun þarf ekki að koma á óvart þar sem úr skólphreinsistöð Hveragerðis liggur í Varmá. Sýnatökustaðurinn var við í-rennsli úr skólphreinsistöðinni í Varmá. Nóróveirur eru nánast án undantekninga hægt að greina í skólpi. Þetta sýni má því í raun líta á sem hálfgert kontról sýni fyrir aðferðina.

Ljóst má vera af niðurstöðum rannsóknarinnar að nóróveirur geta leynst víða í umhverfinu. Nóróveiru jákvæð sýni greinast úr fimm vatnsföllum yfir rannsóknartímann. Veirurnar greinast í fernum ám eða lækjum í febrúar og mars en aðeins í Varmá í Hveragerði í apríl. Fjöldi nórósýkinga í samfélaginu er hæst yfir vetrarmánuðina (e. winter vomiting disease). Þar sem nóróveirur fjölga sér einungis í þörmum manna helst magn þeirra í umhverfinu vafalítið í hendur við þann árstíma sem sýkingar í mönnum eru hvað tíðastar. Þessar niðurstöður eru því í samræmi við þann veruleika en jákvæðum sýnum fækkar þegar líður að vori.

CRL-nóróveiru og hepatitis A ringtrial í skelfiski

Niðurstöðurnar sýna að við náðum ekki að greina veirur í skelfisk-matrisu með þeirri aðferð sem við beittum. Öll skelfisksýnin eru neikvæð sem kemur ekki saman við ætlaðar niðurstöður svo það er eitthvað í ferlinu sem veldur því að engin mögnun næst úr sýnunum – því það er bersýnilega veirumengun í þeim eins og sjá má af töflu 2.

Við skoðun á aðferðinni sem notuð var til greiningar og samanburður á CEN aðferð sem mælt er með í dag, er fljótt á litið ekkert í sýnaundirbúningnum sem ekki var eins og það ætti að vera. Hinsvegar má benda á RNA einangrunina úr sýnunum sem mögulegan þröskuld. Við notumst við QiaAMP RNA minikit frá Qiagen, við nánari skoðun má sjá að þetta kit virðist einkum eiga að nota fyrir frumlausar lausnir s.s. vatn en ekki vefjasýni. Þetta gæti hafa haft úrslitaáhrif og valdið því að við greinum ekkert í sýnunum – það er einfaldlega ekkert eða lítið RNA í sýnunum eftir einangrun til greiningar! MiniMag platformið til RNA-einangrunar er væntanlegt á næstunni og það verður áhugavert að setja upp prófun á smituðum skelfisk með því setup-i.

Annað sem veldur einginlega meiri leiðindum en skortur á mögnun úr skelfisknum er fölsk jákvæð svörun úr L3 fyrir GII. Þetta sýni innihélt ekki GII en við skoðun á real-time PCR gögnunum er bersýnileg mögnun í lok hvarfsins, þó svo seint sé. Hingað til höfum við litið á síðbúna mögnun sem áreiðanlega en þetta setur þau viðmið í smá vanda. Mögulega hefur átt sér stað einhver krossmengun milli sýna. Þetta væri hyggilegt að skoða frekar þegar aðferðin verður aftur keyrð.

Samantekt

- Vinna ársins í ár sýnir okkur að einangrunaraðferðina fyrir vatn má nýta til að greina nóróveirur jafnt í kranavatni sem yfirborðsvatni - þó víst megi telja að sé mikið af gruggi í yfirborðsvatni hafi það neikvæð áhrif á heimtur og næmni aðferðarinnar.
- Okkur tókst ekki að greina veiruna í skelfiski. Skoða þarf ferlið við greiningu iðraveira í skelfiski og uppfæra m.t.t. nýjustu uppfærslu á aðferðafræðinni frá CEN.
- Við rýni í ferlið sýnist mér líklegt að RNA einangrunin hafi verið það sem fór úrskeiðis. QIAamp einangrunarkittið er til einangrunar úr frumlausum lausnum, einkum vatni. MiniMag kjarnsýru einangrunar tækjabúnaðurinn frá Biomerieux sem er væntanlegur mun sennilega leysa þann vanda og verður einangrun úr skelfiski prófuð þegar hann berst.

Efnisyfirlit

Inngangur	1
Framkvæmd.....	2
Niðurstöður	4
Umræður	6
Samantekt	8

Inngangur

Iðraveirur s.s. nóróveirur og hepatitis A eru algengar orsakir iðrasýkinga vegna neyslu mengaðs drykkjarvatns og matvæla. Það eru einkum nóróveirur sem valda iðrasýkingum hérlendis en nóróveirur eru taldar orsök yfir helmings allra iðrasýkinga á vesturlöndum. Nóróveirur smitast einkum við neyslu saurmengaðra matvæla og drykkjarvatns. Það eru einkum matvæli sem neytt er hrárra eða lítið eldaðra s.s. skelfisks, grænmetis og ávaxta sem eru varhugarverð m.t.t. nórósýkinga. Veiran þolir frost en drepst við hitun yfir 60°C. Veiran er ennfremur bráðsmitandi og berst hratt milli manna. Hún berst í miklum magni frá sýktum einstaklingum gegnum saur og uppsölu. Sýkt fólk sem vinnur að framleiðslu eða framreiðslu matvæla getur því hæglega komið af stað hópsýkingum.

Lengi vel var ekki mögulegt að greina nóróveirur í vatni og matvælum. Ekki er hægt að rækta veiruna og hana verður að greina með sameindalíffræðilegum aðferðum. Svið Öryggis, umhverfis og erfða hefur sett upp greiningaraðferðir byggðar á real time PCR tækni til greiningar á erfðaefni nóróveira og hepatitis A veira. Í fyrra (2010) var haldið áfram með þá vinnu og einkum unnið að uppsetningu aðferðar til einangrunar á veirum úr vatnssýnum og hefur greiningaraðferðin hefur verið sett upp fyrir kranavatn.

Vinnu við uppsetningu og innleiðingu aðferða til greiningar á iðraveirum í vatni og matvælum hefur verið haldið áfram í ár (2011) með áherslu á greiningu iðraveira í yfirborðsvatni og úr skelfiski.

Þétting veira úr yfirborðsvatni

Mun erfiðara getur reynst að einangra iðraveirur úr yfirborðsvatni en kranavatni sökum þess hve mikið getur verið af óhreinindum, s.s. jarðvegsögnum og lífrænum ögnum í yfirborðsvatni. Þéttingar iðraveira úr vatnssýnum byggir á síun gegnum himnusíu og óhreinindi úr vatnssýninu gera síun óskilvirka og geta haft neikvæð áhrif á losun veira af filternum. Ennfremur er ekki hægt að komast hjá því að eitthvað af þessum efnun fylgi veirunum gegnum allt einangrunarferlið, sé að finna í RNA kjarnsýru sýnisins og valdi PCR hindrun við greiningu.

Til að kanna skilvirkni þéttingar og greiningaraðferðarinnar í heild sinni til greiningar á iðraveirum á yfirborðsvatni var sýni af yfirborðsvatni smitað og greint m.t.t. nóróveira, GI og GII.

Skimun yfirborðsvatns

Tilvist og útreiðsla iðraveira í vatni og umhverfi hefur ekki verið rannsökuð hérlandis en slík skimun hefur ekki verið gerð hérlandis áður. Skimað var eftir iðraveirunum, nóró og HAV í nokkrum völdum vatnsföllum og tjörnum á suðvesturhorninu. Sýni voru tekin yfir þriggja mánaða tímabil (Janúar-Febrúar-Mars) úr nokkrum vatnsföllum í kringum höfuðborgarsvæðið. Reynt var að finna sýnatökustaði sem mögulega gætu verið megnaður af skólpi. Sýkingar af völdum iðraveira, einkum nóróveira eru mjög algengar sérstaklega yfir vetrartímann.

CRL-nóróveiru og hepatitis A ringtrial í skelfiski

Markmiðið er að geta greint iðraveirur í fleiri matrisum en vatni og því var hugað að uppsetningu aðferðar til greiningar á iðraveirum í skelfiski. Í því augnamiði var tekið þátt í nóróveiru og hepatitis A CRL ring-trial á vegum CEFAS.

Framkvæmd

Þétting veira úr yfirborðsvatni

Vatnssýni úr ánni Bugðu í Kjós var notað til aðferðaprófunar. Sýnið var tilraunasmitað með með nóróveiru (GII) menguðum sýni sem fengið var frá Veirufræðideild Landspítalans. Síaður var ~1L af menguðu sýni og ~1L af ómenguðu sýni. Sýnin voru for-síuð gegnum servíettu (Kimberly-Clark) til að sía frá grugg. Sýnið var þvínæst síað gegnum Zetapor filter eftir að pH var fellt niður undir 7 með nokkrum dropum af 1M HCl. Skipta þurfti um filter 1-2x til að ná að sía 1L af sýni. Veirur voru losaðar af filter með 3ml af 50mM Glycine-NaOH buffer [pH 9.5] pH þvínæst fellt í ~7 með 0.1M HCl og sýni þétt með spunasúlu (Amicon Ultra-4). Sýni voru fryst við -20°C fram að RNA einangrun. RNA var einangrað við RN-asa fríar aðstæður með

QIAamp viral RNA einangrunar súlum samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda (Qiagen, Valencia, CA). Real time PCR greiningar voru gerðar samkvæmt prótókól fyrir genótýpu GI og GII. Gerðar voru örverutalningar á sýninu m.t.t. saurkóli og enterokokka til að fá hugmynd um hvort undirliggjandi saurmengun væri í sýninu.

Skimun yfirborðsvatns

Vatnssýnum var safnað af tíu stöðum í umhverfi Reykjavíkur og á suð-vesturlandi, valin voru nokkur vatnsföll á suðvesturlandi nærri byggð ásamt Tjörninni í Reykjavík og Fossvogslæk (sjá töflu yfir sýnatökustaði og yfirlitsmyndir í viðauka). Sýni voru tekin einu sinni í mánuði af öllum sýnatökustöðum yfir þriggja mánaða skeið (Febrúar-Mars-Arpíl) veturinn 2011.

5L af sýni voru teknir á hverjum stað og sýni geymd við 4°C þar til síun var framkvæmd. Talningar á saurkólí bakteríum voru framkvæmdar úr öllum sýnum. Sýnin voru skimuð fyrir nóróveirum með real-time PCR greiningarhvörfum að undangenginni síun. Síun fór fram á eftirfarandi máta: 1L af yfirborðsvatn var for-síaður gegnum servíettu (Kimberly-Clark) þar sem mikið af gruggi var í mörgum sýnanna. ~1L af vatnssýni var þvínæst síaður gegnum electrópósitívan Zetapor filter eftir að pH var fellt niður undir 7 með nokkrum dropum af 1M HCl. Skipta þurfti um filter 1-2x til að ná að sía 1L af sýni. Veirur voru losaðar af filter með 3ml af 50mM Glycine-NaOH buffer [pH 9.5] (ATHs. Filterar úr sýnum 1-8 voru mögulega þvegnir með ~200mM glycine buffer en ekki 50mM), pH þvínæst fellt í ~7 með 0.1M HCl og sýni þétt með spunasúlu (Amicon Ultra-4). Sýni voru fryst við -20°C fram að RNA einangrun.

Síaður var 1L af NoV smituðu sýni. Jákvætt veirusýni var útbúið úr menguðum saur frá Veirufræðideild Landspítalans. Útbúin var 1X PBS með viðbættu magnesíum og kalsíum - þessar jónir stabilísera veirurnar í lausninni – ásamt sýklalyfjum (100ug/ml) ampicillin og kanamycin. Sýni 5 var notað til smitunnar en mjög lítil örverumengun var í því sýni.

RNA var einangrað við RN-asa fríar aðstæður með QIAamp viral RNA einangrunar súlum samkvæmt leiðbeiningum framleiðanda (Qiagen, Valencia, CA). Real time PCR greiningar voru gerðar samkvæmt prótókól fyrir GI og GII.

CRL-nóróveiru og hepatitis A ringtrial í skelfiski

Sýni fyrir ring trial samanstóðu af náttúrulega smituðum og tilraunasmituðum Kyrrahafs ostrum (*Crassostrea gigas*) ásamt „lenticules“ og frostþurrkuðum meltingarkirtlum úr náttúrulega smituðum ostrum. Nánari lýsingu á undirbúningi sýnanna má sjá í ítarefni frá CEFAS sem fylgdi sýnunum (Norovirus and hepatitis A virus (HAV) ring trial (RT 39) – 2011).

Eftir að sýni bárust til Matís voru þau geymd við 4°C þar til unnin. Skelfissýni voru unnin samkvæmt protocol frá CEFAS útgefnum 2006. Aðferðin var svohljóðandi í fljótri yfirferð. Meltingarkirtlar skelfisskanna voru fjarlægðir og þeir vegnir. Frostþurrkaðir meltingarkirtlar voru meðhöndlaðir á sama máta Kirtlarnir voru þvínæst skornir niður og próteinasá K bætt

við (ml fyrir g) og incuberaðir í hitaskáp við 37°C í 60+/-5min á hristiplatta. Secondary incubation var þvínæst framkvæmd við 65°C í vatnsbaði í 15+/-1min. Sýnin voru þvínæst spunnin við 3000rpm í 5 mínútur og flotið tekið til RNA einangrunar. „Lenticules“ voru leystar upp í 10ml af sterílu vatni lausn tekin til RNA einangrunar

RNA var einangrað úr sýnunum með QiaAMP viral RNA minikit (Qiagen). Teknir voru 140ul af floti/lausn og RNA einangrað samkvæmt aðferðalýsingu framleiðanda. RNA leyst upp í RNasa fríum buffer og spunnið niður í RNasa frí eppendorf glös. RNA geymt við -20°C fram að PCR greiningu.

Real time PCR hvörf til greiningar á nóróveirum GI og GII auk HAV voru keyrð á sýnunum skvt. prótókól Matís.

Niðurstöður

Þétting veira úr yfirborðsvatni

Örverutalningar úr sýninu sýndu 8 saurkólí og 3 enterokokka í 100ml. Niðurstöður real time PCR greiningar á einangruðum sýnum má sjá í töflu 1. Sterkt svar við nóróveiru GII greinist í tilraunasmituðu sýni. Ósmitað sýni gáfu hins vegar einnig GII mögnun sem gefur til kynna að um náttúrulegt smit sé að ræða í sýninu fyrir.

Tafla 1. Niðurstöður real-time PCR greiningar á tilraunasmituðu og ósmituðu yfirborðsvatni.

	GI (Ct)	GI (Ct)
Smitað sýni	No Ct	29.80
Ósmitað sýni	No Ct	43.07

Skimun yfirborðsvatns

Örverutalningar og niðurstöður skimunar á nóró og HAV veirum með real time PCR greininga eru dregnar fram í töflum 2-4.

Tafla 2. Niðurstöður örverugreininga úr vatnssýnum, febrúar sýnataka.

	<i>sampling site</i>	<i>t °C</i>	<i>pH</i>	<i>fecal coliforms</i>	<i>enterococci</i>	<i>GI (Ct)</i>	<i>GII (Ct)</i>	<i>HAV (Ct)</i>
1	Varmá Hverag.	15	7,55	16000	3800	No Ct	32,18	No Ct
2	Úlfarsá	1,2	7,45	48	23	No Ct	No Ct	No Ct
3	Varmá Mos.	2,4	7,50	270	63	No Ct	No Ct	No Ct
4	Suðurá	1,4	7,15	280	42	33,74	42,63	No Ct
5	Bugða	1,3	7,30	8	3	No Ct	43,07	No Ct
6	Elliðaár no. 1 (litlu Elliðaár)	1,9	7,50	470	79	No Ct	No Ct	No Ct
7	Elliðaár no.2 (stóru Elliðaár) Tjörninn no.1	1,2	7,55	41	71	No Ct	No Ct	No Ct
8	(Hljómskálagarður)	7,8	7,85	230	51	No Ct	No Ct	No Ct
9	Tjörninn no.2 (Vatnsmýri)	7,6	7,75	1400	81	No Ct	No Ct	No Ct
10	Fossvogslækur	8,2	7,70	380	100	No Ct	33,81	No Ct

Tafla 3. Niðurstöður örverugreininga úr vatnssýnum, mars sýnataka.

	<i>sampling site</i>	<i>t °C</i>	<i>pH</i>	<i>leiðni µs/cm</i>	<i>fecal coliforms(100ml)</i>	<i>GI (Ct) stock</i>	<i>GII (Ct) stock</i>	<i>GII (Ct) 1/10 diluted</i>	<i>HAV (Ct) stock</i>
1	Varmá Hverag.	14	7,65	200	36000	34,48	34,1	35,1	No Ct
2	Úlfarsá	4,5	7,6	120	9	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
3	Varmá Mos.	5,4	7,55	140	240	No Ct	40,7	40,1	No Ct
4	Suðurá	4,5	7,2	93	240	34,53	36,6	No Ct	No Ct
5	Bugða	5,5	7,35	68	0	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
6	Elliðaár no. 1	5,5	7,55	120	180	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
7	Elliðaár no.2	5,2	7,7	90	8	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
8	Tjörninn no.1	10,1	7,75	72	4500	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
9	Tjörninn no.2	8,6	8,05	78	230	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct
10	Fossvogslækur	9,9	7,55	210	2300	No Ct	No Ct	No Ct	No Ct

Tafla 4. Niðurstöður örverugreininga úr vatnssýnum, apríl sýnataka.

	<i>sampling site</i>	<i>t °C</i>	<i>pH</i>	<i>leiðni µs/cm</i>	<i>fecal coliforms(100ml)</i>	<i>GI (Ct)</i>	<i>GII (Ct)</i>	<i>HAV (Ct)</i>
1	Varmá Hverag.	15,5	7,35	210	2500	32,37	No Ct	No Ct
2	Úlfarsá	6,5	7,5	120	17	No Ct	No Ct	No Ct
3	Varmá Mos.	6,6	7,5	150	700	No Ct	No Ct	No Ct
4	Suðurá	5,7	7,25	100	540	No Ct	No Ct	No Ct
5	Bugða	4,6	7,2	68	1	No Ct	No Ct	No Ct
6	Elliðaár no. 1	7,4	7,35	120	10	No Ct	No Ct	No Ct
7	Elliðaár no.2	7,2	7,45	99	5	No Ct	No Ct	No Ct
8	Tjörninn no.1	11,9	7,9	360	450	No Ct	No Ct	No Ct
9	Tjörninn no.2	10,8	8,15	660	510	No Ct	No Ct	No Ct
10	Fossvogslækur	12,6	7,7	310	5300	No Ct	No Ct	No Ct

CRL-nóróveiru og hepatitis A ringtrial í skelfiski

Niðurstöður úr real time PCR greiningum sýnanna má sjá í töflum 5 og 6.

Tafla 5. Niðurstöður real time PCR greininga á nóróveirum og HAV.

Sýni	Nóróvírus G1 (Ct)	Nóróvírus GII (Ct)	Hepatitis A vírus (Ct)
Shellfish sample 1	No Ct	No Ct	No Ct
Shellfish sample 2	No Ct	No Ct	No Ct
Lenticule 1	No Ct	36,47	No Ct
Lenticule 2	No Ct	No Ct	No Ct
Lenticule 3	No Ct	38,59	30,92
Lenticule 4	32,55	No Ct	No Ct
Freeze dried	No Ct	No Ct	No Ct

Tafla 6. Ætlaðar niðurstöður úr sýnum (*copies/g eða copies/lenticule*)

Sýni	Nóróvírus G1 (Ct)	Nóróvírus GII (Ct)	Hepatitis A vírus (Ct)
Shellfish sample 1	-	-	+ (5.1 x 10 ²)
Shellfish sample 2	+ (4.8 x 10 ²)	+ (2.3 x 10 ³)	-
Lenticule 1	-	+ (4.8 x 10 ³)	-
Lenticule 2	-	-	-
Lenticule 3	-	-	+ (4.9 x 10 ⁵)
Lenticule 4	+ (1.7 x 10 ⁴)	-	-
Freeze dried	+ (6.2 x 10 ²)	+ (3.6 x 10 ²)	-

Umræður

Þétting veira úr yfirborðsvatni

Niðurstöður prófunarinnar sýna að uppsett aðferð til þéttingar og greiningar á iðraveirum úr kranavatni má einnig nota til greiningar á veirum úr yfirborðsvatni. Veiran greinist auðveldlega úr smituðu sýni en það sem meira er þá greinist hér einnig veira í náttúrulega vatnssýninu. Áhugavert er að greiningaraðferðin hefur nægjanlega næmni til að greina nóróveirur úr umhverfissýnum. Almenn er ekki hægt að greina nóróveirur úr yfirborðsvatni sökum þess í hve litlum mæli þær eru þar að finna. Ástæða þess að við finnum hér nóróveiru í vatnssýninu er væntanlega sú að miklar leysingar voru nóttina fyrir sýnatöku sem valdið hefir yfirflæði úr rotþrómi í sumarbústaðarlandi ofanvið sýnatökustaðinn. Það undirstrikar notagildi aðferðarinnar og sýnir að uppsett aðferð til þéttingar og einangrunar iðraveira má nýta til greiningar á nóróveirum í yfirborðsvatni og kranavatni.

Skimun yfirborðsvatns

Mikla mengun saurgerla má greina í velflestum þeirra vatnsfalla, lækja og tjarna sem skoðuð voru. Enterococcar finnast í saur manna og dýra og mengun af enterococcum bendir til saurmengunar og mögulegra mengunar af iðrasýklum. *E. coli* er vísbending um nýlega saurmengun þar sem bakterían lifir aðeins í skamman tíma í umhverfi. Öll vatnsföllin eru í meira eða minna mæli tengd eða í nágrenni byggðar. Þessa saurgerlamengun er þó ekki hægt að tengja mönnum sérstaklega heldur stafar hún einnig að miklu leiti frá dýrum og einkum fuglum. Nóróveirur í sýnunum teknum í: Varmá í Hveragerði, Varmá í Mosfellsbæ, Suðurá í Mosfellsdal, Fossvogslækur og Bugðu í Kjós benda þó óbyggjandi til skólpmengunar.

Miklar rigningar og flóð daginn fyrir febrúar sýnatökuna juku líkur á því að skólþ bærast í vatnsföllin gegnum lekar skólplangir eða flæði upp úr skólplögnum og rotþróum. Sýni greindust í fernum ám og lækjum eftir það vatnsveður. Sýnataka í mars sýndi einnig jákvæð sýni úr fernum ám. Þannig að svo virðist sem leki úr skólþkerfi yfir í vatnsföll sé viðvarandi vandamál. Einkum í Suðurá í Mosfellsdal sem reyndist menguð bæði í febrúar og mars. Heilbrigðisfulltrúa Kjósasvæðis staðfesti þann grun og sagði skólpmengun frá byggð við Suðurá viðvarandi vandamál.

Í Varmá í Hveragerði greinast nóróveirur á öllum þrennum sýnatökutímum. Sú mengun þarf ekki að koma á óvart þar sem úr skólþhreinsistöð Hveragerðis liggur í Varmá. Sýnatökustaðurinn var við í-rennsli úr skólþhreinsistöðinni í Varmá. Nóróveirur eru nánast án undantekninga hægt að greina í skólþi. Þetta sýni má því í raun líta á sem hálfgert kontról sýni fyrir aðferðina.

Ljóst má vera af niðurstöðum rannsóknarinnar að nóróveirur geta leynst víða í umhverfinu. Nóróveiru jákvæð sýni greinast úr fimm vatnsföllum yfir rannsóknartímann. Veirurnar greinast í fernum ám eða lækjum í febrúar og mars en aðeins í Varmá í Hveragerði í apríl. Fjöldi nórósýkinga í samfélaginu er hæst yfir vetrarmánuðina (e. winter vomiting disease). Þar sem nóróveirur fjölga sér einungis í þörmum manna helst magn þeirra í umhverfinu vafalítið í hendur við þann árstíma sem sýkingar í mönnum eru hvað tíðastar. Þessar niðurstöður eru því í samræmi við þann veruleika en jákvæðum sýnum fækkar þegar líður að vori.

CRL-nóróveiru og hepatitis A ringtrial í skelfiski

Niðurstöðurnar sýna að við náðum ekki að greina veirur í skelfisk-matrisu með þeirri aðferð sem við beittum. Öll skelfisksýnin eru neikvæð sem kemur ekki saman við ætlaðar niðurstöður svo það er eitthvað í ferlinu sem veldur því að engin mögnun næst úr sýnunum – því það er bersýnilega veirumengun í þeim eins og sjá má af töflu 2.

Við skoðun á aðferðinni sem notuð var til greiningar og samanburður á CEN aðferð sem mælt er með í dag, er fljótt á litið ekkert í sýnaundirbúningnum sem ekki var eins og það ætti að vera. Hinsvegar má benda á RNA einangrunina úr sýnunum sem mögulegan þröskuld. Við notumst við QiaAMP RNA minikit frá Qiagen, við nánari skoðun má sjá að þetta kit virðist einkum eiga að nota fyrir frumlausar lausnir s.s. vatn en ekki vefjasýni. Þetta gæti hafa haft úrslitaáhrif og valdið því að við greinum ekkert í sýnunum – það er einfaldlega ekkert eða lítið RNA í sýnunum eftir einangrun til greiningar! MiniMag platformið til RNA-einangrunar er væntanlegt á næstunni og það verður áhugavert að setja upp prófun á smituðum skelfisk með því setup-i.

Annað sem veldur einginlega meiri leiðindum en skortur á mögnun úr skelfisknum er fölsk jákvæð svörun úr L3 fyrir GII. Þetta sýni innihélt ekki GII en við skoðun á real-time PCR gögnunum er bersýnileg mögnun í lok hvarfsins, þó svo seint sé. Hingað til höfum við litið á síðbúna mögnun sem áreiðanlega en þetta setur þau viðmið í smá vanda. Mögulega hefur átt sér stað einhver krossmengun milli sýna. Þetta væri hyggilegt að skoða frekar þegar aðferðin verður aftur keyrð.

Samantekt

- Vinna ársins í ár sýnir okkur að einangrunaraðferðina fyrir vatn má nýta til að greina nóróveirur jafnt í kranavatni sem yfirborðsvatni - þó víst megi telja að sé mikið af gruggi í yfirborðsvatni hafi það neikvæð áhrif á heimtur og næmni aðferðarinnar.
- Okkur tókst ekki að greina veiruna í skelfiski. Skoða þarf ferlið við greiningu iðraveira í skelfiski og uppfæra m.t.t. nýjustu uppfærslu á aðferðafræðinni frá CEN.
- Við rýni í ferlið sýnist mér líklegt að RNA einangrunin hafi verið það sem fór úrskeiðis. QIAamp einangrunarkittið er til einangrunar úr frumlausum lausnum, einkum vatni. MiniMag kjarnsýru einangrunar tækjabúnaðurinn frá Biomerieux sem er væntanlegur mun sennilega leysa þann vanda og verður einangrun úr skelfiski prófuð þegar hann berst.