

RIVM rapport 703719018/2007

**Optimalisatie van virusdetectie ten behoeve van het
Nederlandse Waterleidingbesluit**

S.A. Rutjes en A.M. de Roda Husman

Contact:

S.A. Rutjes

Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie

saskia.rutjes@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van Directoraat Generaal Milieubeheer, VROM-Inspectie, in het kader van project M/703719 Monitoring en Handhaving Drinkwater, Deelproject Operationalisering infectierisico.

Het rapport in het kort

Optimalisatie van virusdetectie ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit

Door technieken uit het klinische virusonderzoek te gebruiken voor watermonsters worden ziekteverwekkende virussen in het water vaker en in hogere concentraties aangetoond dan voorheen.

Het Nederlandse Waterleidingbesluit schrijft voor dat de drinkwaterkwaliteit voldoet als per jaar niet meer dan één op de 10.000 personen een infectie oploopt door consumptie van ongekookt drinkwater. Om dit zogenaamde 10^{-4} infectierisico te kunnen schatten zijn exacte gegevens nodig over de aantallen virussen in het water waarvan drinkwater geproduceerd wordt. Diverse factoren hebben invloed op de bepaling van de virusconcentraties in water, zoals het rendement van de concentratiemethode en de wijze van kwantificering. Verder is van belang of met de methode alleen infectieuze virussen worden aangetoond of ook niet-infectieuze virussen. Door de bestaande methoden voor het aantonen van virussen in water te optimaliseren kunnen virusconcentraties nauwkeuriger worden bepaald, waardoor met grotere betrouwbaarheid kan worden vastgesteld of de kwaliteit van het drinkwater voldoet aan het 10^{-4} infectierisico.

Door moleculaire methoden uit het klinische virusonderzoek te gebruiken voor het aantonen van virussen in water zijn 25 tot 1000 keer hogere virusconcentraties gevonden dan voorheen. Met deze moleculaire technieken kunnen zowel infectieuze als niet-infectieuze virussen worden aangetoond. Omdat alleen infectieus virus een infectie en mogelijk ziekte kan veroorzaken bij de mens, wordt de concentratie infectieus virus gebruikt voor de schatting van het infectierisico. Infectieuze enterovirussen worden al jaren met klassieke celkweekmethoden gemeten. Door celkweek- en moleculaire methoden te combineren kunnen nu ook infectieuze rota- en adenovirussen in water worden aangetoond. Van de virussen die met moleculaire technieken aangetoond zijn blijkt slechts één van de 50 tot 5000 virusdeeltjes infectieus te zijn, afhankelijk van het virus en het watermonster.

Trefwoorden: celkweek, drinkwater, infectierisicoschatting, moleculaire detectie, rendement

Abstract

Optimizing virus detection for the Dutch Drinking-water Directive

Pathogenic viruses are detected more regularly and in higher concentrations than previously through the introduction of clinical virological methods into water sampling.

Compliance of drinking-water quality with the Dutch Drinking-water Directive has been achieved when no more than one in every 10,000 persons per year is infected due to consumption of unboiled drinking water. To be able to assess this so-called 10^{-4} infection risk, accurate data are required on the numbers of viruses in the water used for producing drinking water. Various factors can influence the detection of viruses in water, such as the recoveries the method supports and the way viruses are quantified. It is also important to know if the method detects solely infectious viruses or includes non-infectious viruses as well. Virus concentrations in water can be more accurately determined by optimizing the current detection methods. A detailed study on the above mentioned aspects of virus detection was performed.

Molecular methods derived from clinical virology were applied here for virus detection in water, resulting in 25 to 1000 times higher virus concentrations than were measured previously. Using these molecular methods both infectious and non-infectious viruses are detected. Because only infectious viruses can cause an infection and possibly illness in humans, the concentration of infectious virus should be determined to assess the infection risk. Infectious enteroviruses have been determined by classical cell culture methods for years. By combining cell culture and molecular methods, infectious rota- and adenoviruses can also currently be measured. Of the viruses detected by molecular methods, only one of 50 to 5000 virus particles appeared to be infectious, depending on the virus and the water sample.

The improvements in virus detection in water will lead to a more precise estimation of the virus concentrations in that water, which will consequently improve the assessment of the 10^{-4} infection risk.

Key words: cell culture, drinking water, infectious risk assessment, molecular detection, recovery

Inhoud

Samenvatting	5
1 Inleiding	7
2 Detectiemethoden	9
2.1 Concentratie van virussen in water	9
2.2 Het rendement van virusconcentratie	9
2.3 Detectie van virussen met behulp van celkweek	12
2.4 Detectie van virussen met behulp van moleculaire technieken	14
2.5 Detectie van enterovirus met celkweek en met PCR	21
2.6 Detectie van virussen met behulp van celkweek-PCR (cc-PCR)	24
2.6.1 <i>Detectie van infectieus rotavirus met cc-PCR</i>	24
2.6.2 <i>Detectie van infectieus adenovirus met cc-PCR</i>	27
2.7 Real-time detectiemethoden	29
2.8 De betekenis van normoverschrijdingen voor de aanwezigheid van pathogene virussen	31
2.8 Virusmetingen in grondwater	31
2.9 Kwaliteitsborging voor de detectie van infectieuze enterovirussen	32
3 Discussie	33
4 Aanbevelingen	37
Dankwoord	39
Literatuur	41
Bijlage 1	45

Samenvatting

In 2004 is het rapport 'Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001' verschenen, waarin de methoden voor detectie van virussen in water beschreven staan zoals ze tot 1 februari 2006 werden uitgevoerd. Mede aan de hand van ontwikkelingen in de klinische diagnostiek zijn de methoden voor virusdetectie in watermonsters verder ontwikkeld. Voorliggend rapport beschrijft de vernieuwde methoden die vanaf 1 februari 2006 worden toegepast voor de detectie van virussen in watermonsters, waarbij de verschillen met de oude methoden worden toegelicht. Het rendement van de concentratiemethode, de kwantificering van het virus en het bepalen van de infectiviteit zijn van belang voor de detectie van voor de volksgezondheid relevante virussen en zijn daarom nader onderzocht.

De VROM-Inspectierichtlijn 'Analyse microbiologische veiligheid drinkwater' schrijft voor dat de concentratie pathogene micro-organismen in het ruwe water gecorrigeerd dient te worden voor het werkelijk behaalde rendement. Het rendement van virusconcentraties kan bepaald worden door de concentraties aan bacteriofagen zowel direct in het water als in het geconcentreerde watermonster te bepalen. Uit de gegevens in dit rapport blijkt dat als twee monsters van één locatie gelijktijdig gefiltreerd worden de gevonden rendementen sterk overeen komen. Rendementen van niet-gelijktijdige bemonsteringen op dezelfde locatie kunnen sterk verschillen. Het is daarom aan te bevelen dat het rendement van de concentratie bij elke bemonstering wordt bepaald. Het rendement van somatische bacteriofagen wordt gebruikt om de gemeten enterovirusconcentratie in het water te corrigeren voor het verlies tijdens de concentratiemethode, het rendement van F-specifieke bacteriofagen wordt gebruikt om te corrigeren voor de norovirus en hepatitis A- en E-virusconcentratie.

Met moleculaire detectietechnieken worden zowel infectieuze als niet-infectieuze virussen gedetecteerd, terwijl met celkweektechnieken alleen infectieuze virussen worden aangetoond. Van infectieuze virussen is bekend dat ze tot infecties kunnen leiden en mogelijk tot ziekte. Voor watermonsters was tot op heden alleen voor enterovirussen een celkweekmethode beschikbaar. Door celkweekmethoden te combineren met moleculaire detectiemethoden is ook voor rotavirus en adenovirus een methode ontwikkeld waarmee infectieus virus gedetecteerd kan worden. De verhouding infectieus / niet-infectieus virus is voor verschillende virussen in een aantal monsters bepaald en blijkt te variëren van 1 op 50 tot 1 op 5000. Hoewel dus slechts een deel van de moleculair gedetecteerde virusdeeltjes infectieus is, laten deze resultaten zien dat ook virusconcentraties die bepaald zijn met moleculaire detectietechnieken van belang zijn voor het schatten van risico's voor de volksgezondheid.

De implementatie van methoden uit de klinische diagnostiek in de watervirologie heeft ertoe geleid dat de methoden voor moleculaire detectie van virussen in water gevoeliger zijn geworden. Het aantal watermonsters waarin virus is gedetecteerd is toegenomen met het gebruik van de vernieuwde methodes. De virusconcentraties die met de nieuwe methoden zijn bepaald liggen een factor 25 tot 1000 hoger dan voorheen. Hoewel de hogere virusconcentraties waarschijnlijk dichter bij de werkelijke virusconcentratie liggen, is aannemelijk dat met de geoptimaliseerde methodes de virusconcentratie nog steeds wordt onderschat.

Specifieke en kwantitatieve detectie van virussen in water is nodig om een schatting te kunnen doen van het infectierisico door blootstelling aan leidingwater zoals voorgeschreven door de VROM-Inspectierichtlijn 'Analyse microbiologische veiligheid drinkwater'. Zoals beschreven in voorliggende rapportage is toepassing van de nieuwste technieken van invloed op de concentraties infectieuze humane pathogene virussen die in water gedetecteerd worden. Met name de correctie voor het rendement van de concentratiemethode, een verbeterde gevoeligheid door het toepassen van methoden en uit klinische virologie en het combineren van

celkweektechnieken met moleculaire technieken zijn van invloed op de bepaling van de virusconcentratie. Het effect van de vernieuwde detectiemethoden op het infectierisico moet nader geschat worden.

1 Inleiding

De Europese Drinkwaterrichtlijn is vertaald naar het in 2001 in werking getreden hernieuwde Nederlandse Waterleidingbesluit (Anoniem, 2001), met als een van de belangrijkste peilers de waarborg dat drinkwater betrouwbaar is. Hier wordt invulling aan gegeven door te voldoen aan de kwaliteitseisen uit de tabellen I, II en III uit Bijlage A van het Waterleidingbesluit. Dit betekent voor de microbiologische parameters *E. coli* en enterococci dat ze afwezig moeten zijn in 100 ml drinkwater, in lijn met de eerdere versie van het Waterleidingbesluit. Daarnaast zijn in Bijlage A ook nieuwe microbiologische parameters opgenomen, waaronder *Campylobacter*, (entero)virussen, *Cryptosporidium* en *Giardia*. De haakjes om ‘entero’ in enterovirussen is om aan te geven dat mogelijk ook andere virusgroepen die kritisch zijn voor de drinkwatervoorziening onder het Waterleidingbesluit vallen. Voor deze nieuwe microbiologische parameters is geen maximumwaarde opgenomen maar moet een risicoanalyse worden uitgevoerd, zoals staat beschreven in de VROM-Inspectierichtlijn ‘Analyse microbiologische veiligheid drinkwater’, die vanaf 1 februari 2006 van kracht is (Anoniem, 2006). Uitgangspunt van deze risicoanalyse is dat bij consumptie van ongekookt drinkwater het infectierisico lager is dan 1 infectie per 10.000 personen per jaar. Omdat de concentraties van deze pathogene micro-organismen in het drinkwater te laag zijn om aan te tonen dient de veiligheid van het drinkwater aantoonbaar te worden gemaakt met een kwantitatieve risicoanalyse aan de hand van gegevens over de kwaliteit van de bron op basis van metingen van de desbetreffende pathogene micro-organismen in het ruwe water en de effectiviteit van de zuivering. Verder zijn voor het uitvoeren van een infectierisicoschatting gegevens nodig over het rendement van de meetmethode, de consumptie van drinkwater en dosis-respons relaties. De betrouwbaarheid van de schatting van het infectierisico is afhankelijk van een groot aantal factoren, waaronder de efficiëntie van de detectie van pathogene micro-organismen en de bepaling van hun infectiviteit.

Verschillende virussen kunnen via water een risico voor de volksgezondheid opleveren, met name de gastro-enterale virussen. Deze virussen worden in hoge concentraties uitgescheiden in de feces. Ze zijn over het algemeen bestand tegen passage door de maag en kunnen overleven buiten het lichaam, vooral wanneer ze zich bij lage temperaturen en luchtvochtigheid bevinden. Omdat virussen alleen kunnen repliceren in een gastheer zullen ze zich in het water niet vermenigvuldigen maar kunnen wel via besmet water worden overgedragen. De belangrijkste fecaal-oraal overdraagbare pathogene virussen en dus potentieel voedsel- en wateroverdraagbaar zijn norovirus, rotavirus, enterovirus, astrovirus, de humane adenovirussen en hepatitis A- en E-virus (Carter, 2005). Op de adenovirussen na, waarvan het erfelijk materiaal DNA is, zijn alle genoemde virussen RNA-virussen. De gastro-enterale virussen zijn wat symptomen betreft op te splitsen in twee categorieën. De virussen in de eerste categorie repliceren daadwerkelijk in het maagdarmkanaal en geven ook de typisch bijbehorende symptomen van gastro-intestinale infectie; diarree en braken. Voorbeelden van deze virussen zijn noro- en rotavirus. Virussen uit de tweede categorie kunnen zich verder verspreiden naar andere delen van het lichaam waar ze symptomen kunnen veroorzaken anders dan maagdarmklachten. Voorbeelden hiervan zijn de door enterovirus veroorzaakte verlamningsverschijnselen en hersenvliesontsteking, maar ook leverontsteking veroorzaakt door hepatitis A- en E-virus of oogontsteking door adenovirus. Virussen hebben in het algemeen een lage dosis-respons relatie, zo zijn slechts enkele norovirusdeeltjes voldoende om een infectie bij de mens te veroorzaken (Lindesmith et al., 2003).

Vervuiling van het oppervlaktewater met gastro-enterale virussen kan verschillende oorzaken hebben. Rioolwaterzuiveringsinstallaties lozen hun gezuiverde water op het oppervlaktewater. Rioolwaterzuiveringsprocessen die met name gericht zijn op de verwijdering van bacteriën verlagen de virusconcentratie in afwezigheid van tertiaire zuiveringsprocessen slechts matig; voor de meeste virussen wordt nog geen 2 log₁₀-reductie bereikt (Lodder en De Roda Husman, 2005; Van den Berg, et al., 2005; Fleischer et al., 2000; Schvoerer et al., 2001). Naast ongezuiverde

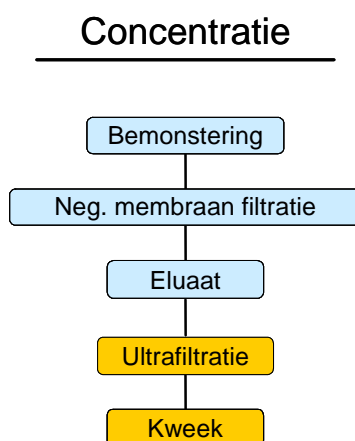
lozingen kan lozing van gezuiverd rioolwater dus aanzienlijk effect hebben op de virusconcentratie in het oppervlaktewater, wetende dat virusconcentraties in gezuiverd rioolwater in de orde van grootte zijn van 10 tot 100 infectieuze virus deeltjes tot 10^3 Polymerase Chain Reaction (PCR) detecteerbare eenheden per liter (Lodder en De Roda Husman, 2005; Pusch et al., 2005; Sedmak et al., 2005; Berg, van den et al., 2005). Andere bronnen van microbiële verontreiniging van het oppervlaktewater zijn riooloverstorten na hevige regenval en afspoeling van mest. Als een dergelijke gebeurtenis heeft plaatsgevonden of als er andere redenen zijn om aan te nemen dat naast enterovirussen andere pathogene virussen in het water aanwezig zouden kunnen zijn in concentraties waarin zij een gevaar voor de volksgezondheid kunnen opleveren dient niet alleen voor enterovirus maar ook voor deze virussen een infectierisicoschatting te worden uitgevoerd.

In 2004 is het RIVM-rapport 'Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001' verschenen, waarin een overzicht is gegeven van de detectiemethoden voor virussen in water. Het rapport beschrijft de detectiemethoden voor bacteriofagen en entero-, rota- en norovirussen in water zoals ze destijds werden uitgevoerd. Het rapport is te downloaden vanaf de RIVM website (<http://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/330000007.html>). Verschillende aspecten van de procedure voor de detectie van virussen in water zijn de afgelopen jaren geoptimaliseerd. Rendementen van de verschillende stappen in de procedure voor de concentratie van virussen in water zijn gedetailleerd onderzocht. Op het gebied van de moleculaire detectiemethoden is de isolatie van viraal RNA of DNA vele malen efficiënter geworden waardoor de virusconcentraties die na deze optimalisatie gevonden worden soms wel 1000 keer hoger blijken te zijn dan voorheen kon worden aangetoond. Verder is voor de risicoanalyse van belang dat niet alleen virusdeeltjes kunnen worden aangetoond met moleculaire detectietechnieken, maar ook of deze virusdeeltjes infectieus zijn. Dit rapport beschrijft detectiemethoden voor rotavirussen en adenovirussen met behulp van een gecombineerde celkweek-PCR-methode, waarmee infectieuze rotavirussen en infectieuze adenovirussen gedetecteerd kunnen worden. Dit is met name van belang voor de risicoanalyse omdat nu zowel voor enterovirus als voor adeno- en rotavirus de verhouding van infectieus en niet-infectieus virus bepaald kan worden. Deze verhouding blijkt per monster grote verschillen te vertonen. De geoptimaliseerde detectiemethoden worden in voorliggend rapport beschreven, waarbij de verschillen met de methoden die tot op heden gebruikt zijn zullen worden toegelicht. Hoewel virussen nu beter kunnen worden aangetoond, zijn de gevonden virusconcentraties reëler dan voorheen, maar door beperkingen in de methoden waarschijnlijk nog steeds een onderschatting van de werkelijke concentratie. Verder wordt beschreven hoe het gebruik van deze reëlere getallen de schatting van het infectierisico kan beïnvloeden.

2 Detectiemethoden

2.1 Concentratie van virussen in water

Virussen in oppervlaktewater zijn in dusdanig lage concentraties aanwezig dat grote volumina moeten worden onderzocht om virus te kunnen detecteren. Door de virussen in het water te concentreren kan op een relatief eenvoudige manier het te onderzoeken volume aanzienlijk verkleind worden van 1500 liter tot enkele tientallen milliliters (Rutjes en De Roda Husman, 2004). Een 100- tot 1000-voudige reductie in volume wordt bereikt door water te filtreren over een negatief geladen membraan, waarbij onder toevoeging van $MgCl_2$ en verlagen van de pH virus aggregaten ontstaan die tijdens filtratie achterblijven op het filter. Vervolgens kunnen de geaggregeerde virussen door te spoelen met een buffer met hoge pH (beef extract) van het filter worden geëluëerd. Een eventuele verdere concentratie van dit eluaat kan worden bereikt door onder een druk van 3 bar een tweede filtratiestap uit te voeren, waarbij gebruik gemaakt wordt van ultrafiltratiefilters met een dusdanig kleine poriëgrootte (10 kDa) dat de virusdeeltjes het filter niet kunnen passeren maar achterblijven in het concentraat. Beide concentratiestappen staan schematisch weergegeven in Figuur 1. Zoals staat beschreven in het rapport 'Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001' (Rutjes en De Roda Husman, 2004) kan dit concentraat gebruikt worden voor de detectie van zowel infectieuze bacteriofagen als infectieuze enterovirussen met behulp van celkweek.



Figuur 1: Schematische weergave van de opeenvolgende filtratiestappen voor de concentratie van virussen in water.

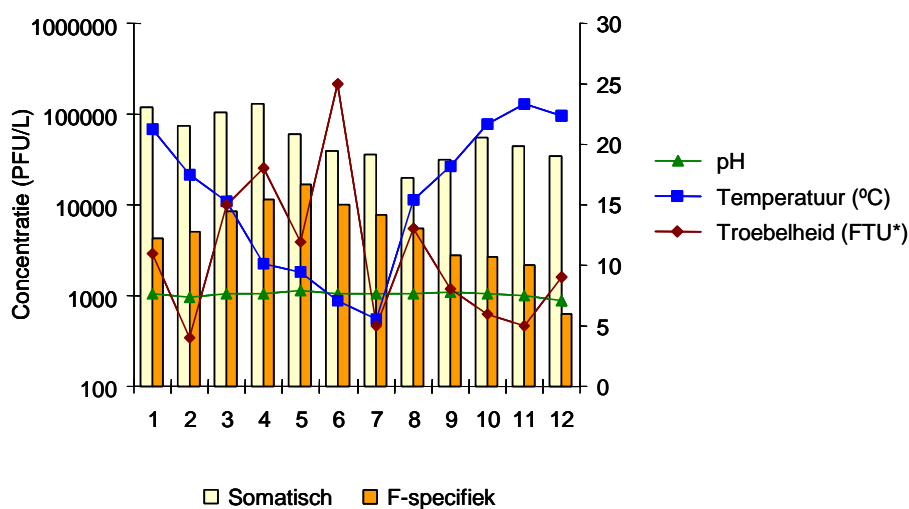
2.2 Het rendement van virusconcentratie

Het rendement van deze concentratiemethode voor de concentratie van virussen in oppervlaktewater is nader onderzocht door de rendementen van de afzonderlijke concentratiestappen en het rendement van de twee concentratiestappen van de negatieve membraanfiltratie en ultrafiltratie gezamenlijk te bepalen. Het rendement is bepaald aan de hand van de concentraties aan bacterievirussen, somatische en F-specifieke bacteriofagen, die in voldoende hoge concentraties in het water aanwezig zijn om direct in het water gedetecteerd te kunnen worden. Hiertoe zijn op één locatie twaalf keer gelijktijdig twee monsters van 600 liter oppervlaktewater genomen. Bacteriofaag concentraties zijn vervolgens direct in het oppervlaktewater, in het eluaat en in het concentraat bepaald volgens ISO 10705-2 en ISO 10705-1 (Rutjes en De Roda Husman, 2004). Aan de hand van de gevonden concentraties bacteriofagen in het concentraat en de bijbehorende concentratiefactor kan teruggerekend worden

wat de concentraties in het oppervlaktewater waren. De gemiddelde concentraties somatische en F-specifieke bacteriofagen staan weergegeven in Figuur 2, samen met de pH, temperatuur en troebelheid op het moment van bemonstering. De gemiddelde concentratie somatische bacteriofagen was 62229 ± 47261 plaque vormende eenheden per liter (PFU/L), de gemiddelde concentratie F-specifieke bacteriofagen was een factor 10 lager; 6439 ± 4678 PFU/L. Met name de concentratie F-specifieke bacteriofagen lijkt gecorreleerd aan de temperatuur van het water (-0,80); hoe hoger de temperatuur hoe lager de concentratie F-specifieke bacteriofagen (Tabel 1). Temperatuur van het water en concentratie lijken voor somatische bacteriofagen juist niet gecorreleerd te zijn (-0,003). Een mogelijke verklaring voor dit grote verschil is dat bacteriofagen sneller afsterven bij een hogere temperatuur. Dat voor somatische bacteriofagen toch geen correlatie wordt gevonden zou verklaard kunnen worden door het feit dat sommige van deze fagen zich onder specifieke omstandigheden kunnen vermenigvuldigen (Havelaar 1993). Verder blijkt de concentratie F-specifieke bacteriofagen in enige mate gecorreleerd te zijn aan pH (0,65) en troebelheid (0,53). Voor somatische fagen is deze correlatie voor beide condities beduidend minder (respectievelijk 0,16 en 0,23) (Tabel 1).

Tabel 1: Correlatiecoëfficiënten van bacteriofagen en chemische parameters

	Somatische bacteriofagen	F-specifieke bacteriofagen
Somatische bacteriofagen		
F-specifieke bacteriofagen	0,28	
pH	0,16	0,65
Temperatuur	-0,003	-0,80
Troebelheid	0,23	0,53

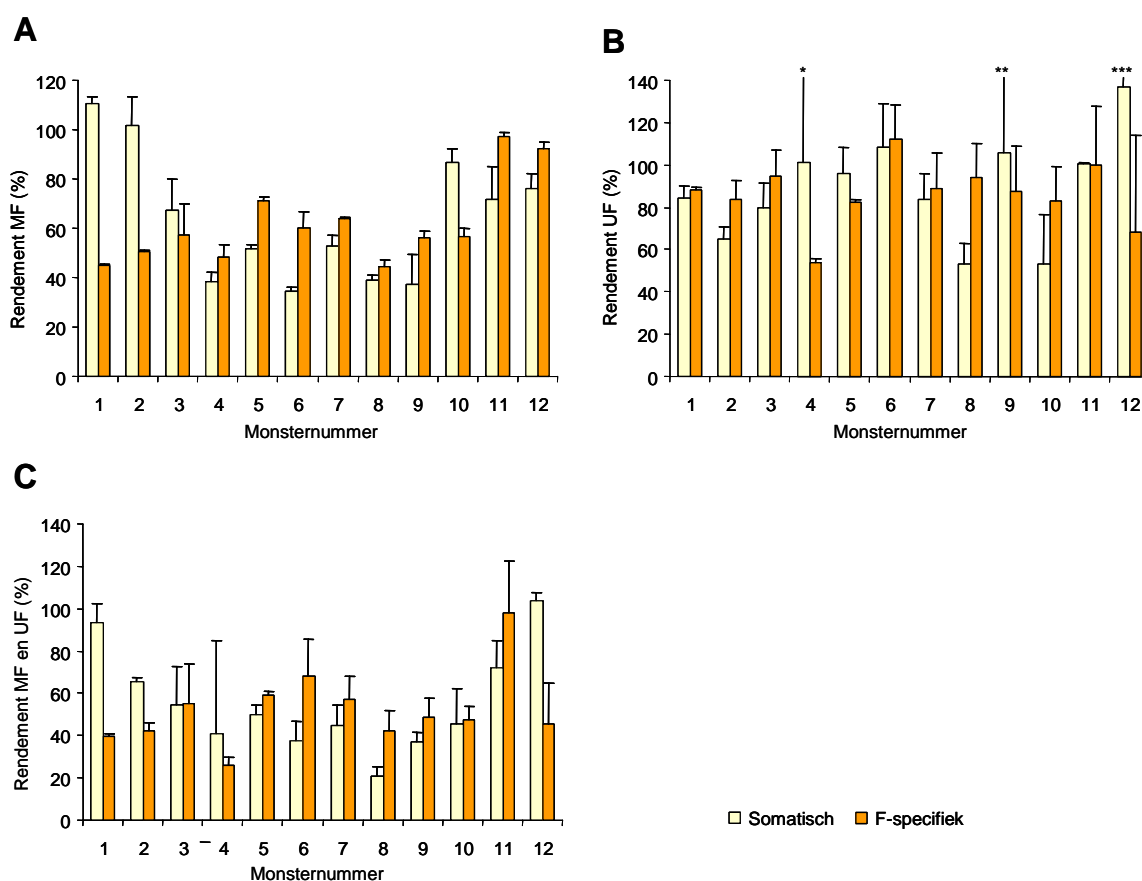


Figuur 2: Somatische en F-specifieke bacteriofaagconcentraties gemeten in het concentraat van grootvolumemonsters (600 L) oppervlaktewater. Bepalingen zijn uitgevoerd in duplo. Concentraties staan weergegeven op de linker Y-as als plaque vormende eenheden per liter (PFU/L). De pH, temperatuur en troebelheid op het tijdstip van bemonstering staan weergegeven op de rechter Y-as. * FTU; Formazine Turbidity Unit

Om te kunnen corrigeren voor het verlies van bacteriofagen tijdens de gehele opwerkingsprocedure moet het rendement van de methode berekend worden. Hiervoor zijn gegevens nodig over de bacteriofaag concentraties in het bemonsterde water, in het concentraat

en desgewenst in het eluaat. Door de concentratie fagen gemeten in het concentraat te delen door de concentratie die direct in het water is gemeten en het geheel te vermenigvuldigen met honderd wordt het rendement van de methode in procenten verkregen. Figuur 3 geeft inzicht in de berekende rendementen; het rendement van de eerste filtratiestap (A), het rendement van de ultrafiltratie (B) en het totale rendement van de methode (C).

Zoals blijkt uit Figuur 3 wordt de variabiliteit in het rendement van een duplobepaling vooral veroorzaakt door variatie in efficiëntie van de ultrafiltratiestap (Figuur 3B), wat blijkt uit de grote standaard afwijkingen voor met name somatische bacteriofagen (0,5% - 105%). Het rendement van de negatieve membraanfiltratie (Figuur 3A) geeft per bemonstering een constanter rendement (de standaard afwijking varieert voor beide bacteriofagen van 0,5% tot 13%), maar is weer meer variabel als verschillende tijdstippen van bemonstering met elkaar vergeleken worden. Zo wordt voor somatische bacteriofagen met monster 1 een gemiddeld rendement gehaald van 110% en met monster 6 van 35%. Voor F-specifieke fagen is deze variatie minder extreem (44% - 97%). Het rendement lijkt afhankelijk te zijn van variabele factoren in het oppervlaktewater waardoor soms F-specifieke bacteriofagen en soms somatische bacteriofagen efficiënter geconcentreerd worden (Figuur 3A). Het rendement van somatische bacteriofagen lijkt meer dan van F-specifieke bacteriofagen gecorreleerd te zijn aan de temperatuur van het water; een correlatiecoëfficiënt van respectievelijk 0,58 en 0,08 (Tabel 2). Verder lijken pH (-0,66) en troebelheid (-0,32) mogelijk negatief gecorreleerd te zijn aan het rendement van somatische bacteriofagen, dus hoe hoger de pH en troebelheid des te lager het rendement. Voor F-specifieke fagen is deze correlatie voor beide condities minder duidelijk (respectievelijk 0,11 en -0,12) (Tabel 2).



Figuur 3: Rendementsbepalingen van de negatieve membraanfiltratie (MF) (A), ultrafiltratie (UF) (B) en membraanfiltratie en ultrafiltratie gecombineerd (C). De concentratie somatische en F-specifieke bacteriofagen zijn in duplo bepaald, zowel direct in het water, na negatieve membraanfiltratie en na ultrafiltratie waaruit de rendementen berekend zijn. * Standaarddeviatie is 105% (205%), ** Standaarddeviatie is 45% (150%), *** Standaarddeviatie is 7% (143%).

Tabel 2: Correlatiecoëfficiënten chemische parameters en filtratierendementen van bacteriofagen

	<i>Somatische bacteriofagen</i>	<i>F-specifieke bacteriofagen</i>
Somatische bacteriofagen		
F-specifieke bacteriofagen	0,07	
pH	-0,66	0,11
Temperatuur	0,58	0,08
Troebelheid	-0,32	-0,12

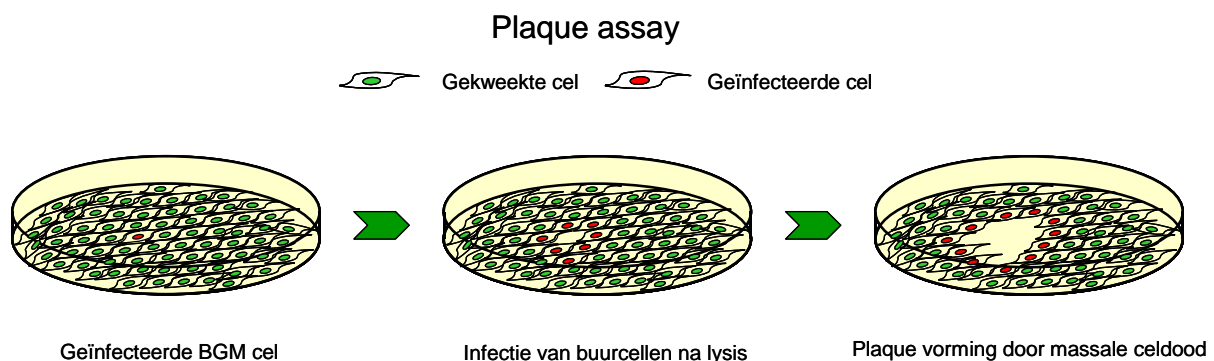
Bacteriofagen kunnen gebruikt worden als indicator organismen voor de efficiëntie van zuiveringsprocessen van virussen in water en membraanfiltratie voor de concentratie van virussen in water. Vanwege de morfologische en fysisch-chemische eigenschappen, zoals structuur, grootte en iso-elektrisch punt, zijn somatische bacteriofagen een goed indicator organisme voor enterovirussen (Dowd et al., 1998; Mandel 1971; McKenna et al., 1992) en de F-specifieke bacteriofagen voor norovirussen en hepatitis A- en E-virussen (Dowd et al., 1998; Ferguson et al., 2003; Zerda en Gerba 1984). Om de werkelijke virusconcentratie in het water te bepalen zou gecorrigeerd moeten worden voor het verlies tijdens de concentratiemethode aan de hand van het gevonden rendement. Voor somatische bacteriofagen varieert het rendement over de gehele concentratieprocedure van 9% tot 106%, voor F-specifieke bacteriofagen is het laagste rendement 29% en het hoogste rendement 115%. Het gemiddelde rendement van alle 24 bemonsteringen is voor somatische bacteriofagen $55 \pm 26\%$ en voor F-specifieke bacteriofagen $52 \pm 20\%$. Deze rendementgegevens kunnen gebruikt worden om bijvoorbeeld de gemeten enterovirusconcentraties te corrigeren. De gemeten enterovirusconcentratie in het concentraat is dus maar 55% van wat er in het ruwe water aan enterovirussen aanwezig was. Als gecorrigeerd wordt voor het gemiddelde rendement moet dus de gemeten virusconcentratie vermenigvuldigd worden met een factor 1,8 ($1 / (55 \times 0,01)$), wat betekent dat de werkelijke virusconcentratie in het ruwe water bijna twee keer zo hoog is als in het concentraat is gemeten. Indien mogelijk wordt echter geen gemiddeld rendement ter correctie genomen maar het rendement van de betreffende bemonstering om een nog betrouwbaardere bepaling van de werkelijke virusconcentratie te kunnen uitvoeren.

De VROM-Inspectierichtlijn 'Analyse microbiologische veiligheid drinkwater' schrijft voor dat de concentratie pathogene micro-organismen in het ruwe water gecorrigeerd moet worden voor het werkelijk behaalde rendement. Hiertoe zal het verlies van virus tijdens de concentratieprocedure bepaald moeten worden aan de hand van het rendement van bacteriofagen. Na correctie zal de concentratie aan pathogenen in het ruwe water hoger zijn dan wanneer niet gecorrigeerd is voor het verlies van virus tijdens de concentratieprocedure. Hierdoor zal bij de berekening van het infectierisico de virusconcentratie in de grondstof gemiddeld ongeveer twee keer zo hoog zijn dan wanneer niet gecorrigeerd is.

2.3 Detectie van virussen met behulp van celkweek

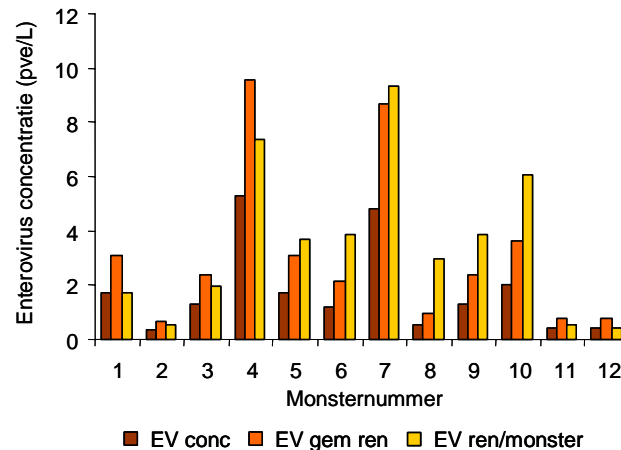
Volgens de VROM-Inspectierichtlijn dient onder andere voor enterovirussen een infectierisicoschatting gedaan te worden. Om een dergelijke schatting te kunnen uitvoeren is het noodzakelijk dat het aantal infectieuze enterovirusdeeltjes bepaald wordt. Enterovirussen zijn kweekbaar omdat ze in staat zijn bepaalde cellijnen te infecteren en zich vervolgens in deze cellen te repliceren. Uiteindelijk zal de geïnfecteerde cel doodgaan en lyseren. Het hierbij vrijkomende nieuw geproduceerde virus is weer in staat om cellen te infecteren waarna de

virusreproductie weer opnieuw begint. Enterovirussen in concentraat kunnen zo in een zogenaamde plaque assay gedetecteerd worden. Hiertoe wordt een bepaalde hoeveelheid concentraat geïncubeerd op een cellaag van ‘buffalo Green Monkey’ (BGM) cellen waarna de eventueel aanwezige enterovirussen uit het concentraat de cellen zullen infecteren. Vervolgens wordt een overlay van agar op de cellen aangebracht, waardoor het virus in de cellen kan repliceren maar na lysis van de cellen niet vrij komt in het medium. Dit heeft als voordeel dat het vrijgekomen virus alleen buurcellen kan infecteren die vervolgens na infectie weer zullen lyseren. De resulterende groep dode cellen is zichtbaar als een gat in het celdek, een zogenaamde plaque (Figuur 4). Aan de hand van het aantal gevormde plaques is de enterovirusconcentratie in het oorspronkelijke watermonster te berekenen (aantal plaque forming units per liter (PFU/L)). Een gedetailleerde beschrijving van de plaque assay voor detectie van enterovirus staat beschreven in het RIVM rapport ‘Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001’ (Rutjes en De Roda Husman, 2004). Verder is de methode vastgelegd in de internationale norm NEN-EN 14486 (Water quality: Detection of human enteroviruses by monolayer plaque assay). Om de daadwerkelijke concentratie in het onderzochte watermonster te bepalen dient gecorrigeerd te worden voor het verlies van virus tijdens de concentratieprocedure, wat bepaald kan worden aan de hand van bacteriofaagconcentraties zoals hierboven staat beschreven. Om te corrigeren kan het gemiddelde rendement van een aantal monsters gebruikt worden als niet voor elk monster het rendement is bepaald. Het heeft echter de voorkeur om het rendement van de betreffende bemonstering te gebruiken om een betrouwbaardere bepaling van de werkelijke virusconcentratie te verkrijgen.



Figuur 4: Schematische weergave van het ontstaan van een plaque. Door het tellen van het aantal plaques kan de concentratie infectieuze virusdeeltjes berekend worden.

Om het effect van de verschillende correcties van het rendement op de uiteindelijke virusconcentratie te demonstreren is in twaalf van de 24 eerdergenoemde duplo bemonsteringen van 600 liter naast de concentraties aan bacteriofagen voor de berekening van het rendement ook de enterovirusconcentratie met behulp van celkweek bepaald. In Figuur 5 staan de enterovirusconcentraties weergegeven zoals ze direct in het waterconcentraat zijn bepaald (EV conc), maar ook de concentraties na correctie voor het gemiddelde rendement (EV gem ren) en het rendement per monster (EV ren/monster). Als met het gemiddelde rendement van somatische bacteriofagen gecorrigeerd wordt is in alle gevallen de enterovirusconcentratie met 1,8 vermenigvuldigd (zie paragraaf 2.2). Dit levert in zes van de twaalf monsters een hoger rendement op dan wanneer de enterovirusconcentratie gecorrigeerd wordt met het rendement in dat monster. In deze gevallen worden de werkelijke virusconcentraties dus overschat, in de andere zes monsters zal de werkelijke concentratie onderschat worden.



Figuur 5; Enterovirus concentraties gemeten in twaalf grootvolumemonsters (600 L) oppervlaktewater. Concentraties staan weergegeven zoals ze gemeten zijn in het concentraat (EV conc), gecorrigeerd met het gemiddelde rendement van somatische bacteriofagen van de twaalf bepalingen (55%) (EV gem ren) of gecorrigeerd met het rendement per bepaling (EV ren/monster).

Als bij de bepaling van de enterovirusconcentratie gecorrigeerd wordt voor het verlies aan virus tijdens de opwerkingsprocedure zal de werkelijke enterovirusconcentratie in het onderzochte watermonster gemiddeld 1,8 keer zo hoog zijn dan wanneer niet gecorrigeerd is voor dit verlies aan virus. Omdat deze rendementscorrectie tot dusver niet werd gedaan betekent dit voor de schatting van het infectierisico dat de enterovirusconcentraties in de grondstof gemiddeld 1,8 keer hoger zullen zijn dan de enterovirusconcentraties die tot nu toe werden gebruikt.

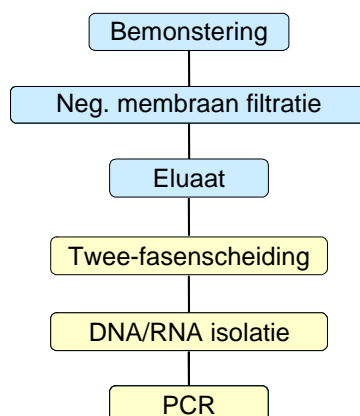
2.4 Detectie van virussen met behulp van moleculaire technieken

Volgens het waterleidingbesluit dient in elk geval een infectierisicoschatting te worden uitgevoerd voor enterovirussen, maar ook voor andere pathogene virussen als er redenen zijn om aan te nemen dat deze aanwezig zijn in concentraties die nadelige gevolgen voor de volksgezondheid kunnen hebben (Anoniem, 2001). Norovirussen zijn verantwoordelijk voor de meerderheid van de uitbraken van virale gastroenteritis in westerse landen (Koopmans en Duizer 2004) en zouden door bronnen van fecale verontreiniging in dusdanige concentraties in het inname water aanwezig kunnen zijn dat ze een risico voor de volksgezondheid zouden kunnen vormen. Een celkweekstelsel voor de detectie van norovirussen is nog niet voorhanden (Duizer et al., 2004), maar ze kunnen wel met zogenaamde moleculaire detectie technieken aangetoond worden (Loisy et al., 2005; Rutjes et al., 2006; Vennema et al., 2002; Vinjé en Koopmans 2000) waarbij genetisch materiaal (DNA of RNA) wordt gedetecteerd. Andere virussen die mogelijk via drinkwater overdraagbaar zijn en dus mogelijk nadelige gevolgen voor de volksgezondheid kunnen hebben zijn hepatitis A- en E-virus, rotavirus, adenovirus en astrovirus. Voor geen van deze virussen is een robuuste methode voor handen om infectieuze virusdeeltjes aan te tonen, maar ze kunnen wel met moleculaire methoden worden aangetoond. Hoewel voor de detectie van enterovirussen een goede kweekmethode voorhanden is, heeft in bepaalde gevallen detectie met moleculaire methoden toch de voorkeur. Moleculaire detectietechnieken zijn over het algemeen sneller dan celkweek technieken, minder tijdrovend en daardoor minder kostbaar. Zo kost de detectie van enterovirussen met behulp van celkweek gemiddeld zes weken terwijl met moleculaire detectie binnen twee dagen resultaten verkregen kunnen worden.

De meest gebruikte moleculair biologische detectiemethode is PCR (polymerase chain reaction). Bij PCR wordt een klein gedeelte van het virale genoom (bijvoorbeeld adenovirus DNA) specifiek geamplificeerd, waarna bij voldoende efficiënte amplificatie de PCR-producten gedetecteerd kunnen worden. Voor de moleculaire amplificatie van RNA-virussen, zoals entero-, rota- of norovirus, moet eerst van het RNA een copyDNA (cDNA) gemaakt worden met behulp van het enzym 'reverse transcriptase' (RT). Moleculaire detectie van RNA met behulp van PCR wordt daarom ook wel RT-PCR genoemd. Door op het geïsoleerde RNA of DNA een (RT-)PCR uit te voeren kan bepaald worden of viraal RNA of DNA aanwezig was in het oorspronkelijke monster. Door ook verdunningen van dit monster op aanwezigheid van viraal RNA of DNA te onderzoeken kan de virusconcentratie semi-kwantitatief worden bepaald als 'most probable number' (MPN). Voor deze MPN-berekeningen wordt gebruik gemaakt van het computerprogramma Mathematica (Wolfram Research, Oxfordshire, UK), waarmee aan de hand van aan- of afwezigheid van een positief signaal in de verschillende verdunningen van het RNA, het inoculatievolume en het aantal replica's het aantal PCR-detecteerbare units (PDU) wordt bepaald met het bijbehorende 95% betrouwbaarheidsinterval. Het aantal PDU's in het oorspronkelijke watermonster kan vervolgens berekend worden door het aantal PDU's te delen door het onderzochte volume. Het principe van de PCR-methode staat uitgebreid beschreven in het rapport 'Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001' (Rutjes en De Roda Husman, 2004).

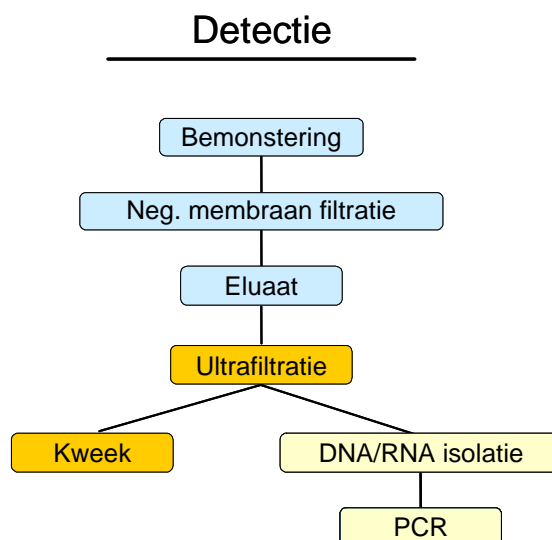
Moleculaire detectie begint bij het isoleren van het genetisch materiaal van het virus uit het geconcentreerde watermonster. Omdat in dit concentraat allerlei remmende factoren voor de PCR aanwezig kunnen zijn, zoals organische stoffen en humuszuren (Tebbe en Vahjen 1993), werd tot voor kort een zuivering op basis van twee-fasenscheiding toegepast om de eventueel aanwezige remmende factoren efficiënt te verwijderen (Lodder et al., 1999). Deze twee-fasenscheiding is gebaseerd op de selectieve verdeling van virussen tussen twee niet-mengbare fasen, waarbij de fase waarin het virus zich bevindt verder geconcentreerd werd met behulp van kolom-gel chromatografie (Pöyry et al., 1988). Op het gezuiverde materiaal (de doorloop van de kolom) werd vervolgens met behulp van silica het virale genoom geïsoleerd. Deze concentratiestappen voor moleculaire detectie staan schematisch weergegeven in Figuur 6.

Moleculaire detectie



Figuur 6: Schematische weergave van de concentratie en zuiveringsstappen voor moleculaire detectie van virussen in water zoals deze tot en met 2005 zijn uitgevoerd.

Voor de detectie met moleculaire technieken wordt het eluaat dus op een andere manier verder geconcentreerd dan voor celkweek, wat het onmogelijk maakt om op hetzelfde materiaal virussen met behulp van celkweek en met PCR te detecteren. Een bijkomend nadeel is dat achteraf niet meer van methoden gewisseld kan worden als blijkt dat bijvoorbeeld naast een kweekbaar virus toch ook een niet te kweken virus gedetecteerd moet worden in een monster. Met hernieuwde inzichten in DNA/RNA-isolatiemethoden om remmende factoren van moleculaire detectietechnieken te verwijderen hebben we een methode ontwikkeld waarmee direct op het ultrafiltraat een DNA/RNA-isolatie uitgevoerd kan worden. De benodigde concentratiestappen voor de gecombineerde detectie van kweekbare virussen en moleculaire detectie staan schematisch weergegeven in Figuur 7.



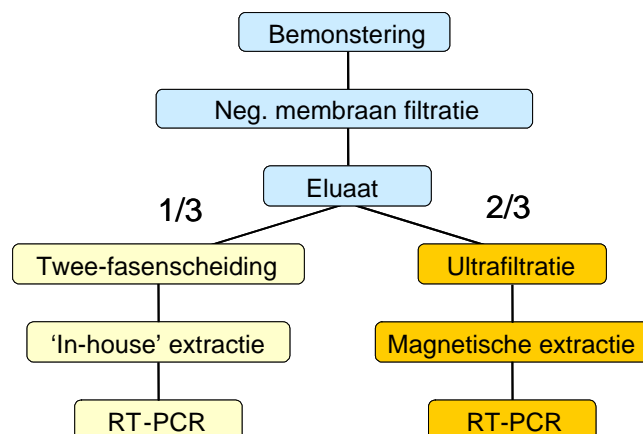
Figuur 7: Schematische weergave van de concentratie en zuiveringsstappen voor celkweek (donker geel) voor de detectie van infectieuze virusdeeltjes en voor moleculaire detectietechnieken (lichtgeel) voor de detectie van zowel infectieuze als niet-infectieuze virusdeeltjes.

Tijdens het optimaliseren van de DNA/RNA-isolatie uit ultrafiltraat bleek dat het volume van het te extraheren concentraat niet te groot moet zijn; een toename in de hoeveelheid onderzocht materiaal bleek te resulteren in een afname van het aantal positieve monsters (Rutjes et al., 2005). Het feit dat slechts een klein volume ultrafiltraat in de RNA/DNA-isolatie kan worden gebruikt heeft tot gevolg dat uiteindelijk tot 1000 keer kleinere volumina water worden geanalyseerd in de PCR dan wanneer het watermonster verder was opgewerkt door middel van de twee-fasenscheiding (Tabel 3).

Tabel 3: Verschillen in geanalyseerde volumina na twee-fasenscheiding en ultrafiltratie

<i>Teruggerekend geanalyseerd volume water</i>	<i>Twee-fasenscheiding</i>	<i>Ultrafiltratie</i>
in RNA/DNA-isolatie	100 - 200 liter	50 - 300 ml
in één PCR	7 - 15 liter	7 - 35 ml

Vergelijking van methoden



Figuur 8: Schematische weergave van de concentratie stappen en nucleïnezuur isolatiemethoden voor moleculaire detectie van virussen in water, zoals deze tot (lichtgeel) en vanaf 1 februari 2006 zijn uitgevoerd (donkergeel).

Om te bepalen of er verschillen zijn in detectie van virussen als met behulp van twee-fasenscheiding of met ultrafiltratie monsters voor (RT-)PCR worden opgewerkt is moleculaire virusdetectie na ultrafiltratie vergeleken met moleculaire detectie na twee-fasenscheiding in monsters van 600 liter oppervlaktewater en water dat gebruikt wordt als grondstof voor de productie van drinkwater. De monsters zijn onderzocht op de aanwezigheid van enterovirussen (Rutjes et al., 2005), norovirussen (Rutjes et al., 2006), adenovirussen en rotavirussen. Hiertoe is 1/3 van het eluaat opgewerkt met behulp van twee-fasenscheiding zoals tot nu toe voor moleculaire detectietechnieken gebruikelijk was (Rutjes en De Roda Husman, 2004) en is 2/3 van het eluaat geconcentreerd door middel van ultrafiltratie (Figuur 8). Een ander verschil tussen de twee methodes is dat voor de isolatie van viraal RNA of DNA geen gebruik meer wordt gemaakt van eigen gemaakte oplossingen maar van commerciële kits zodat een constante kwaliteit gegarandeerd kan worden. Er is gekozen voor een kit op basis van een magnetische matrix voor de binding van nucleïnezuuren. Bij de extractie methode na twee-fasenscheiding wordt de matrix (silica) met daaraan gebonden het geïsoleerde virale RNA of DNA gecentrifugeerd om supernatant (bijvoorbeeld wasbuffers) van de matrix te scheiden, waarbij ook grotere deeltjes worden afgedraaid die mogelijk een remmend effect op de PCR kunnen hebben. Voor de extractie die volgt op de ultrafiltratie is magnetische silica gebruikt met het idee dat deze matrix niet hoeft te worden gecentrifugeerd. Scheiding van matrix en supernatant gebeurt hier door middel van een magneet waarmee alleen de magnetische matrix en de hieraan gebonden stoffen worden geïsoleerd na het verwijderen van het supernatant, waardoor eventuele storende factoren voor de PCR mogelijk op een efficiëntere manier verwijderd worden.

Op deze manier is in vijf innamewaters voor de productie van drinkwater enterovirus gedetecteerd met RT-PCR primers entero 1 en entero 2 zoals staat beschreven in het rapport 'Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001' (Schwab et al., 1995; Rutjes et al., 2005) (Figuur 9A, Tabel 4 en bijlage 1). Monster 1, 2 en 3 zijn op locatie A genomen, monsters 4 en 5 op locatie B. Na twee-fasenscheiding zijn twee van de vijf onderzochte monsters positief gevonden voor enterovirus; in monster 1 is na twee-fasenscheiding een enterovirusconcentratie gevonden van 2,6 (0,2-11,6) PCR-detecteerbare eenheden per liter (PDU/L), in monster 2 een concentratie van 0,9 (0,2-2,5) PDU/L. Na ultrafiltratie is in vier van de vijf monsters enterovirus gedetecteerd, wat betekent dat het aantal

positieve monsters is verdubbeld (Figuur 9A, Tabel 5). Ook is de geschatte concentratie aan gedetecteerde enterovirussen 100 tot 500 keer zo hoog als na twee-fasenscheiding met de laagste virusconcentratie in monster 2 van 91,5 (19,5-358) PDU/L en de hoogste virusconcentratie in monster 1 van 1340 (308-5165) PDU/L. Een mogelijke verklaring voor deze grote verschillen in detectie-efficiëntie is dat na ultrafiltratie een relatief klein volume wordt onderzocht waardoor eventueel remmende factoren voor de PCR die geconcentreerd worden uit het water in veel lagere concentraties aanwezig zijn. Dat de PCR inderdaad geremd wordt na twee-fasenscheiding blijkt uit het feit dat enterovirus RNA in een onverdund monster niet gedetecteerd wordt maar wel na tien of honderd keer verdunnen (Rutjes et al., 2005). Hoewel de enterovirusconcentraties na ultrafiltratie op locatie A (monster 1 en 2) en locatie B (monster 4 en 5) vergelijkbaar zijn wordt na twee-fasenscheiding alleen op locatie A enterovirus RNA gedetecteerd. Deze data suggereren dat na twee-fasenscheiding uit het water op locatie B mogelijk remmende stoffen zijn geïsoleerd die tijdens de zuivering van het RNA niet zijn verwijderd. Met behulp van de ultrafiltratie methode zijn geen remmende stoffen in het RNA meer aanwezig, wat betekent dat de efficiëntie van detectie minder afhankelijk lijkt te zijn geworden van het watertype.

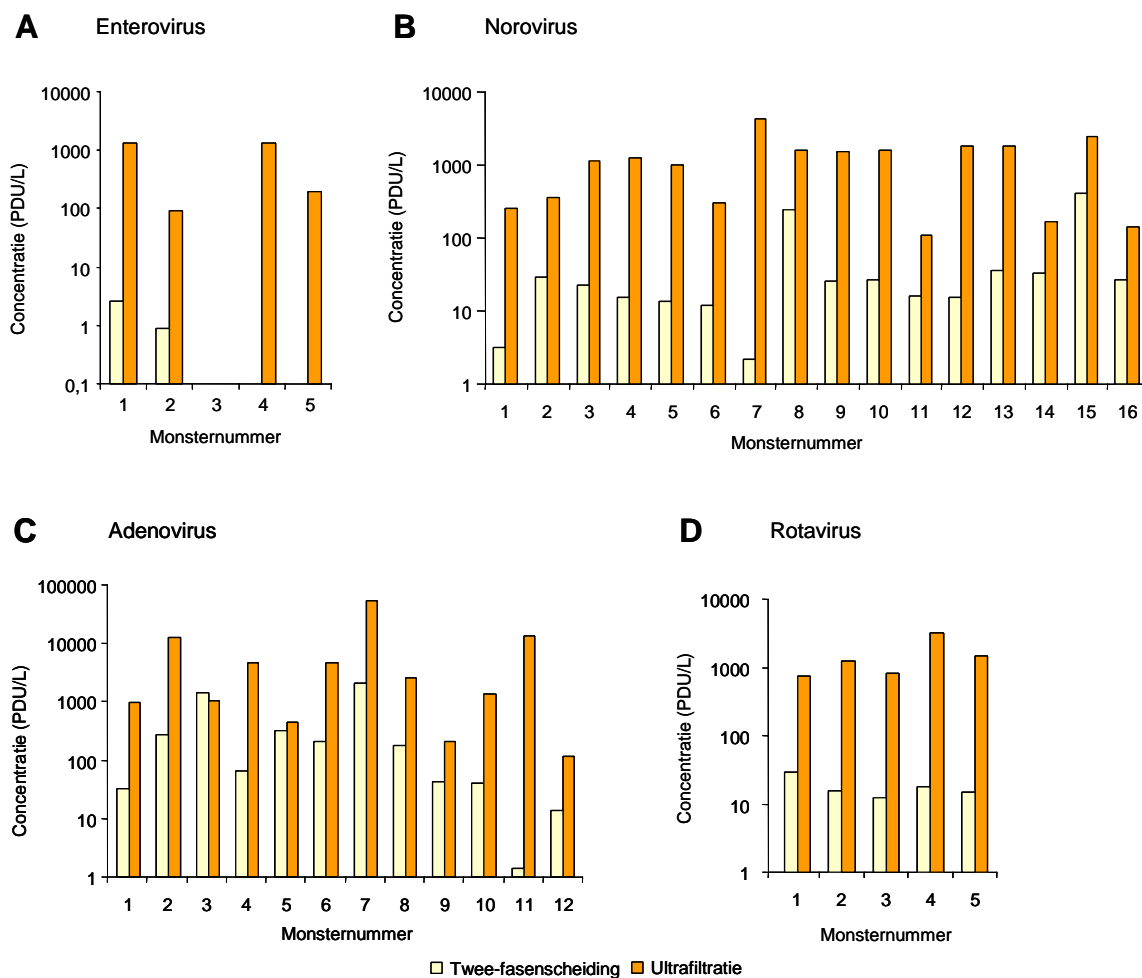
Op een vergelijkbare manier is de detectie van norovirus vergeleken in zestien monsters van 600 liter oppervlaktewater (Figuur 9B, Tabel 4, bijlage 1). In alle zestien monsters zijn met beide methoden norovirussen gedetecteerd. De virusconcentraties na twee-fasenscheiding varieerden van 2,2 (0,1-20,0) PDU/L in monster 7 tot 414 (59,8-2236) PDU/L in monster 15. Na ultrafiltratie waren de gevonden norovirusconcentraties aanzienlijk hoger; deze varieerden van 108 (6,1-500) PDU/L in monster 11 tot 4303 (271-38571) PDU/L in monster 7 (Tabel 5). Per monster was de detectie van norovirussen na ultrafiltratie 10 tot 1000 keer efficiënter dan na twee-fasenscheiding (Figuur 9B).

Ook zijn de concentraties aan humane adenovirussen in 600 liter oppervlaktewatermonsters bepaald. Hiertoe zijn twaalf monsters geconcentreerd met zowel de ultrafiltratie methode als met twee-fasenscheiding. Het eventueel aanwezige adenovirus DNA is gedetecteerd met behulp van een zogenaamde nested-PCR, waarbij op het PCR-product een tweede PCR wordt uitgevoerd (Bijlage 1) (Allard et al., 2001). Bij de tweede PCR is de locatie van de primers zo gekozen dat ze binnen het PCR product van de eerste ronde vallen. Het nested-PCR-product is dus kleiner dan het product van de eerste PCR-ronde. Hoewel nested-PCR gevoeliger kan zijn dan een PCR met één amplificatie ronde wordt niet voor alle virussen een nested-PCR gedaan omdat nested-PCR zeer gevoelig is voor contaminatie van genomisch materiaal met PCR-producten. Hierdoor kunnen virus-negatieve monsters vals positief worden.

De resultaten van de adenovirusanalyses van de twaalf oppervlaktewatermonsters na opwerking met beide methoden staan in Figuur 9C. De verschillen in virusdetectie tussen beide methoden lijken voor adenovirus minder groot dan voor enterovirus en norovirus. In elf van de twaalf monsters is na ultrafiltratie een hogere concentratie adenovirus gevonden dan na twee-fasenscheiding; alleen in monster 3 is de concentratie na twee-fasenscheiding 1,3 keer zo hoog als na ultrafiltratie. Gemiddeld over alle twaalf bepalingen is de concentratie na ultrafiltratie 750 keer zo hoog. Dit verschil wordt voornamelijk veroorzaakt door de grote verschillen tussen beide methoden in monster 11 (1,4 (0,07-12,9) PDU/L na twee-fasenscheiding (Tabel 4) en 12472 (770-117464) PDU/L na ultrafiltratie, Tabel 5). Wordt monster 11 als uitbijter geëlimineerd, dan is na ultrafiltratie gemiddeld over 11 bepalingen een twintig keer hogere adenovirusconcentratie gevonden dan na twee-fasenscheiding. Een mogelijke verklaring voor dit verschil met entero- en norovirus kan gevonden worden in het feit dat adenovirus een DNA-virus is wat de detectie wellicht minder gevoelig maakt voor remmende factoren omdat geen reverse transcriptase stap nodig is voor amplificatie.

Voor de detectie van rotavirus zijn eveneens beide methoden vergeleken (Figuur 9D). Hiertoe zijn vijf oppervlaktewatermonsters van ongeveer 600 liter geconcentreerd en grotendeels opgewerkt volgens de hierboven beschreven procedure, met het verschil dat voor de RNA-

extractie uit ultrafiltraat geen magnetische extractie maar een ‘in-house extractie’ is gedaan omdat dit voor rotavirus beduidend betere resultaten opleverde. In alle vijf geanalyseerde monsters is met beide methoden rotavirus gedetecteerd met een RT-PCR waarmee 185 nucleotiden van gensegment 6 (VP6) worden geamplificeerd (Bijlage 1) (Villena et al., 2003; Rutjes en De Roda Husman, 2004). De virusconcentraties na twee-fasenscheiding varieerden van 12,1 (0,7-113) PDU/L in monster 3 tot 29,0 (4,2-156) PDU/L in monster 1 (Tabel 4). Na ultrafiltratie waren de gevonden rotavirusconcentraties minimaal een factor 10 tot 100 hoger; deze varieerden van 759 (139-2504) PDU/L in monster 1 tot 3204 (589-13184) PDU/L in monster 5 (Tabel 5).



Figuur 9: Detectie van enterale virussen na ultrafiltratie en twee-fasenscheiding op watermonsters van 600 liter. (A) Detectie van enterovirus RNA in groot volumemonsters innamewater; monsters 1, 2 en 3 zijn genomen op locatie A, monsters 4 en 5 op locatie B. (B) Detectie van norovirus RNA in monsters van 600 liter oppervlaktewater op locatie C. (C) Detectie van adenovirus DNA in monsters van 600 liter oppervlaktewater op locatie C. (D) Detectie van rotavirus RNA in monsters van 600 liter oppervlaktewater op locatie C.

Dus ondanks het feit dat het volume dat in één PCR wordt onderzocht met de ultrafiltratiemethode gemiddeld genomen 1000 keer kleiner is dan het onderzochte volume na twee-fasenscheiding (Tabel 3) worden meer monsters positief gevonden en is de virusconcentratie per monster toegenomen in vergelijking met de concentraties gevonden na twee-fasenscheiding (Rutjes et al., 2005; Rutjes et al., 2006). RNA/DNA-isolatie na ultrafiltratie met de geoptimaliseerde methode kan dus leiden tot virusconcentraties die 25 tot 1000 keer zo hoog zijn, afhankelijk van het virus en het te onderzoeken water. Ook voor hepatitis A-en E-virus

Tabel 4: Concentraties virussen bepaald met (RT-)PCR na twee-fasenscheiding

	Enterovirus		Norovirus		Adenovirus		Rotavirus	
	Conc ¹	95% BI ²	Conc	95% BI	Conc	95% BI	Conc	95% BI
1	2,6	0,2-11,6	3,1	0,5-16,1	31,2	1,9-194	29,0	4,2-156
2	0,9	0,2-2,5	29,0	4,2-156	261	33,9-1892	15,3	0,9-144
3	0	0-0,05	22,8	3,3-123	1368	84,5-12872	12,1	0,7-113
4	0	0-0,08	15,3	0,9-144	63	7,1-292	17,8	1,1-167
5	0	0-0,04	13,7	0,8-129	310	40,7-2244	14,5	0,9-136
6			12,1	0,7-113	198	26,0-435		
7			2,2	0,1-20,0	1936	139-18210		
8			245	15,3-1872	170	22,0-1229		
9			25,2	1,6-137	41,3	4,7-191		
10			26,4	1,6-248	39	4,4-180		
11			16,1	0,8-151	1,4	0,07-12,9		
12			15,4	0,9-144	13,2	0,82-124		
13			36,1	5,2-195				
14			33,2	4,8-179				
15			414	59,8-2236				
16			27,1	3,9-146				

¹ Concentratie geschat als 'most probable number', ² 95% betrouwbaarheidsinterval

Tabel 5: Concentraties virussen bepaald met (RT-)PCR na ultrafiltratie

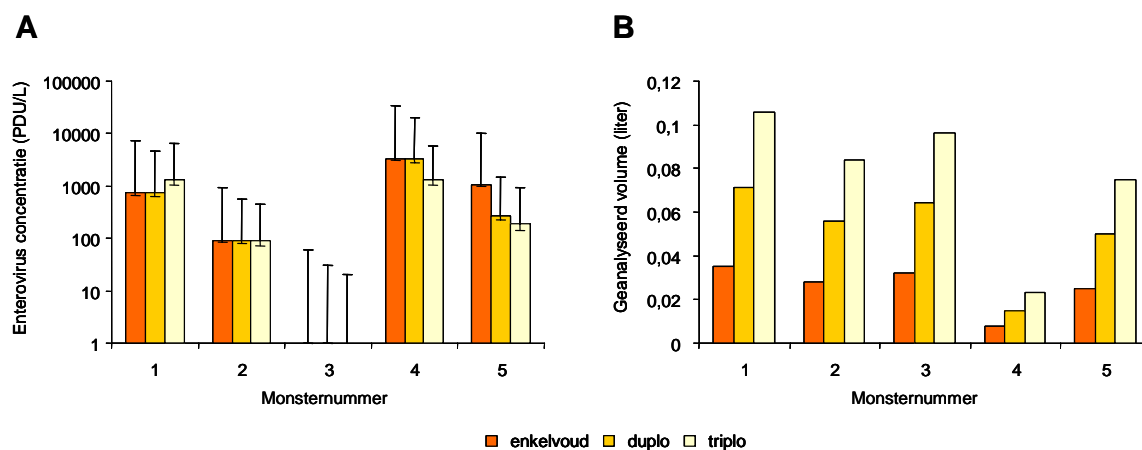
	Enterovirus		Norovirus		Adenovirus		Rotavirus ¹	
	Conc ²	95% BI ³	Conc	95% BI	Conc	95% BI	Conc	95% BI
1	1340	308-5165	254	40,0-1146	954	60,1-8550	759	139-2504
2	91,5	19,5-358	363	57,2-1640	11686	722-109939	1240	78,2-11116
3	0	0-20,0	1127	165-5844	1012	63,8-9072	799	92,5-3658
4	1317	282-4380	1240	181-6433	4303	271-38571	3204	589-13184
5	189	43,6-726	1012	63,8-9072	425	48-1969	1474	209-7964
6			299	14,2-2672	4330	267-40735		
7			4303	271-38571	49602	7539-227729		
8			1610	101-14428	2491	116-23430		
9			1505	94,9-13494	197	9,3-1755		
10			1597	100-14319	1313	81,1-12353		
11			108	6,1-500	12472	770-117464		
12			1840	116-16490	114	27-317		
13			1805	111-16985				
14			165	7,8-1482				
15			2491	154-23430				
16			142	6,7-1274				

¹ Extractie uitgevoerd met 'in-house' RNA isolatie methode, ² Concentratie geschat als 'most probable number', ³ 95% betrouwbaarheidsinterval

wordt een stijging gezien in de gedetecteerde virusconcentraties (ongepubliceerde data). Het is aannemelijk dat een dergelijke toename ook voor astrovirus wordt gevonden.

In Tabel 5 staan de resultaten van de virusdetectie na ultrafiltratie beschreven met het bijbehorende 95% betrouwbaarheidsinterval. De maximale waarden van het betrouwbaarheidsinterval variëren per bepaling van ongeveer drie keer (enterovirus) tot bijna tien keer (adenovirus) de geschatte virusconcentratie. De grootte van het betrouwbaarheidsinterval is afhankelijk van het aantal replica's van de bepaling en is dus te beïnvloeden door de detectie meerdere keren uit te voeren; dus hoe meer replica's des te kleiner het betrouwbaarheidsinterval. In bovenstaand voorbeeld is de bepaling van de enterovirusconcentratie en het betrouwbaarheids-

interval gebaseerd op meer replica's dan dat voor adenovirus is gedaan. Hoe het aantal replica's de berekende enterovirusconcentratie en het betrouwbaarheidsinterval beïnvloedt is afgebeeld in Figuur 10. Voor de bepaling van de concentratie in enkelvoud is een verdunningsreeks van het uit het monster geïsoleerde virus RNA geanalyseerd met RT-PCR. Hierbij is bepaald of enterovirus RNA aanwezig was in onverdund, 10x, 100x en 1000x verdund RNA. Als de detectie in duplo of in triplo is uitgevoerd is het geanalyseerde volume dus twee en drie keer zo groot (Figuur 10B). Als in een triplo analyse drie keer dezelfde resultaten worden gevonden neemt het betrouwbaarheidsinterval af ten opzichte van een duplo of enkelvoudige analyse (Figuur 10A); het geanalyseerde volume is groter dus de analyse is nauwkeuriger geweest. Dit is ook terug te zien in het betrouwbaarheidsinterval van de monsters waar niet drie keer dezelfde resultaten verkregen werden. Replica's kunnen echter wel de gedetecteerde virusconcentratie negatief of positief beïnvloeden (Figuur 10A).



Figuur 10: Enterovirusconcentraties in grootvolumemonsters oppervlaktewater. (A) De enterovirusconcentratie is bepaald aan de hand van een verdunningsreeks van onverdund, 10x, 100x en 1000 x verdund RNA, in enkelvoud, duplo of triplo. (B) Totale geanalyseerde volumina met een enkelvoudige, duplo of triplo bepaling.

Als er reden is aan te nemen dat pathogene virussen, anders dan enterovirus, in concentraties voor kunnen komen waarin zij mogelijk een gevaar voor de volksgezondheid opleveren moet volgens de VROM-Inspectierichtlijn ook voor deze virussen een infectierisicoschatting uitgevoerd worden. Als deze virussen niet kweekbaar zijn, kan de virusconcentratie bepaald worden met behulp van (RT-)PCR. Met de vernieuwde RNA/DNA-isolatiemethode worden de concentraties aan pathogene virussen 25 tot 1000 keer zo hoog in vergelijking met eerder toegepaste virusconcentratie en detectiemethoden, wat betekent dat de virusconcentraties in het ruwe water aanzienlijk hoger kunnen liggen dan aan de hand van oude metingen zou worden geschat. Hoewel van de virussen die met behulp van moleculair biologische detectietechnieken gedetecteerd zijn niet bekend is welk deel van deze virussen infectieus is, kan ook niet uitgesloten worden dat ze niet infectieus zijn en dus wel degelijk van belang voor het schatten van risico's voor de volksgezondheid (zie ook paragrafen 2.5 en 2.6).

2.5 Detectie van enterovirus met celkweek en met PCR

Enterovirussen kunnen zowel met celkweek (plaque assay) als met moleculaire technieken gedetecteerd worden. Met celkweek worden infectieuze enterovirussen gedetecteerd, met RT-PCR zowel infectieuze als niet infectieuze virusdeeltjes (Gantzer et al., 1998; Sobsey et al., 1998). Dit betekent dat met RT-PCR het aantal enterovirussen dat een menselijke cel kan

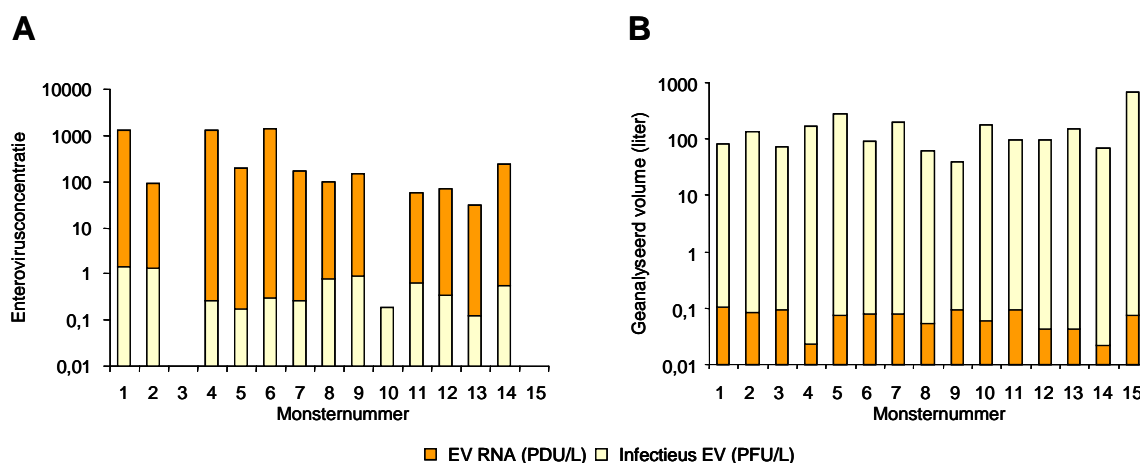
infecteren overschat wordt. Aan de andere kant wordt met celkweek het aantal infectieuze enterovirusdeeltjes en dus het gezondheidsrisico onderschat, omdat niet alle enterovirussen de in de norm NEN-EN 14486 voorgeschreven cellijn (BGM cellen) kunnen infecteren (Dahling en Wright 1986). Hoewel in de VROM-Inspectierichtlijn staat voorgeschreven dat de fractie infectieuze enterovirusdeeltjes moet worden bepaald om uiteindelijk het infectierisico te kunnen schatten, kan het voorkomen dat men (in eerste instantie) met behulp van de snelle en minder kostbare RT-PCR-methode wil vaststellen of enterovirussen aanwezig zijn in het te onderzoeken water. Hoewel met de vernieuwde DNA/RNA-isolatie uit ultrafiltraat detectie met celkweek en RT-PCR op hetzelfde materiaal uitgevoerd kunnen worden is directe extrapolatie van negatieve RT-PCR-resultaten naar infectieuze virusdeeltjes echter niet altijd gerechtvaardigd. Dit zal gedemonstreerd worden aan de hand van het volgende voorbeeld.

Van vijftien innamewaters voor de productie van drinkwater is een groot volume gefiltreerd (300-600 liter) en verder geconcentreerd met behulp van ultrafiltratie. Op de geconcentreerde monsters is vervolgens zowel een RNA isolatie gedaan als een plaque assay om de concentratie infectieuze en niet infectieuze enterovirusdeeltjes te bepalen. Uit Figuur 11A blijkt dat in twaalf van de vijftien monsters zowel met RT-PCR als met celkweek enterovirus kon worden aangetoond. In een van de vijftien monsters (monster 10) is alleen met celkweek enterovirus gedetecteerd en in twee monsters (monster 3 en 15) is met geen van de methodes enterovirus aangetoond. Het aantal PDU/L gedetecteerd met RT-PCR is 70 keer (monsters 2 en 11) tot 5000 (monsters 4 en 6) keer zo hoog als het aantal PFU/L dat met celkweek is gedetecteerd. Dit betekent dat slechts 1 op de 70 tot 1 op de 5000 enterovirusdeeltjes infectieus is. Deze ratio is afhankelijk van een groot aantal factoren zoals de verblijftijd van het virus in het water, de temperatuur van het water en de blootstelling aan ultraviolette straling van de zon. Gemiddeld is 1 op de 1000 enterovirusdeeltjes infectieus.

In monster 10 is met celkweek een enterovirusconcentratie gevonden van 0,19 PFU/L in een onderzocht volume van 177,4 liter (Figuur 11B). Met RT-PCR is in een volume van 61,0 ml geen enterovirus gevonden. In deze 61,0 ml was 0,01 infectieus enterovirusdeeltje aanwezig (0,19 PFU/L x 0,061 L). Stel dat in dit monster per 100 enterovirus RNA-deeltjes 1 enterovirusdeeltje infectieus was dan was in het onderzochte volume van 61,0 ml dus 1 enterovirus RNA-molecuul aanwezig, waarvan de kans groot is dat dit niet gedetecteerd zal worden. Dit betekent dat in dit monster de detectiegrens voor de RT-PCR boven de 0,19 PFU/L ligt. De detectiegrens zal per monster verschillen omdat ook de ratio infectieus virus / niet infectieus virus per monster verschillend is. Met celkweek is 177,4 liter water onderzocht, wat een detectiegrens voor celkweek oplevert van $1/177,4 = 0,006$ PFU/L.

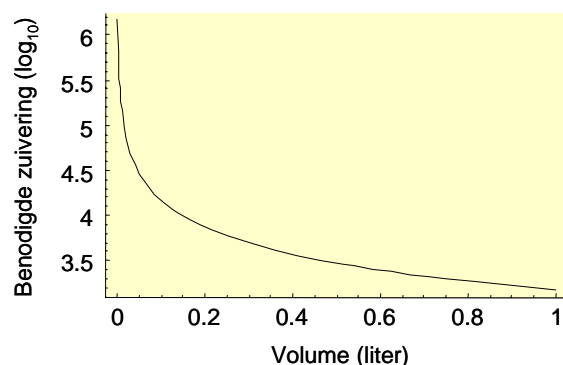
De hoeveelheid water die met celkweek wordt onderzocht is gemiddeld 1000 keer zo groot als het volume water dat met (RT-)PCR wordt onderzocht (Figuur 11B). Dit betekent dat bij detectie van 1 virusdeeltje in 100 liter de detectiegrens 0,01 deeltje/L is, detectie van 1 virus in 100 ml resulteert in een detectiegrens van 10 deeltjes/L. Met celkweek worden volumina van honderden liters water onderzocht op de aanwezigheid van infectieus virus, waardoor een lage detectiegrens wordt verkregen. Met moleculaire technieken worden volumina van enkele tientallen ml water onderzocht, wat de kans op detectie van een virusdeeltje kleiner maakt en dus de detectiegrens hoger. De grote verschillen in detectiegrens tussen beide methoden worden dus grotendeels veroorzaakt door de grote verschillen in onderzochte volumina.

Hoewel de detectiegrens van RT-PCR dus hoger ligt dan die van celkweek, werken de kleine volumina anderzijds in de hand dat als een monster positief is dit leidt tot hogere virusconcentraties. Bijvoorbeeld: als in het geanalyseerde volume van monster 15 (670 liter) met celkweek 1 infectieus enterovirus gedetecteerd wordt is de concentratie in het water $1/670 = 0,0015$ PFU/L. In het volume wat met RT-PCR is onderzocht (74,0 ml) zal met een ratio infectieus/niet-infectieus virus van 1/1000 slechts 0,1 enterovirus RNA-molecuul in het te onderzoeken volume aanwezig zijn, wat waarschijnlijk niet gedetecteerd zal worden. Als er echter virus gedetecteerd wordt in het kleine te onderzoeken volume werkt dit juist hoge virustiters in de hand. Detectie van een enterovirus RNA-deeltje in 74,0 ml geeft een concentratie van 13,5 PDU/L.



Figuur 11: Enterovirusdetectie in innamewaters met celweek (plaque assay) en moleculaire technieken (RT-PCR). (A) Enterovirusconcentraties gevonden met celweek op BGM cellen (PFU/L) en met RT-PCR (PDU/L). (B) Onderzochte volumina met celweek (Infectieus enterovirus) en RT-PCR (Enterovirus RNA).

Uit bovenstaande berekeningen zou kunnen worden geconcludeerd dat RT-PCR alleen voor sterk gecontamineerde monsters gebruikt zou kunnen worden, omdat een negatieve uitslag zeker niet hoeft te betekenen dat er ook geen virus in het monster aanwezig is doordat het geanalyseerde volume te klein is. Als echter bekend is wat de efficiëntie van de zuivering is vanaf het monsterpunt tot aan het drinkwater kan een grove schatting gedaan worden van het volume dat nodig is om de gevoeligheid te bereiken waarmee kan worden bepaald of aan het in Nederland geldende 10^{-4} infectierisico wordt voldaan. Zoals blijkt uit Figuur 12 moet voor volumina kleiner dan 200 ml door zuivering 4 \log_{10} eenheden aan virus verwijderd worden. Bij analyse van 500 ml water moet de reductie door zuivering minimaal 3,5 \log_{10} zijn, nog grotere volumina hebben nagenoeg geen invloed meer op de benodigde zuivering om een infectierisico van 10^{-4} niet te overschrijden. Let wel: dit soort berekeningen is slechts indicatief voor hoeveel zuivering nodig is, het is nog geen risicoanalyse. Hiertoe moet bekend zijn wat de variabiliteit en de onzekerheid is van de virusconcentratie in het watermonster en van de drinkwaterzuivering.



Figuur 12: Scenarioberekening voor de benodigde zuivering bij detectie van een virus in een bepaald volume van het ruwe water. De vermelde benodigde zuivering is slechts indicatief omdat de variabiliteit en de onzekerheid van de virusconcentratie in het watermonster en van de zuivering buiten beschouwing is gelaten.

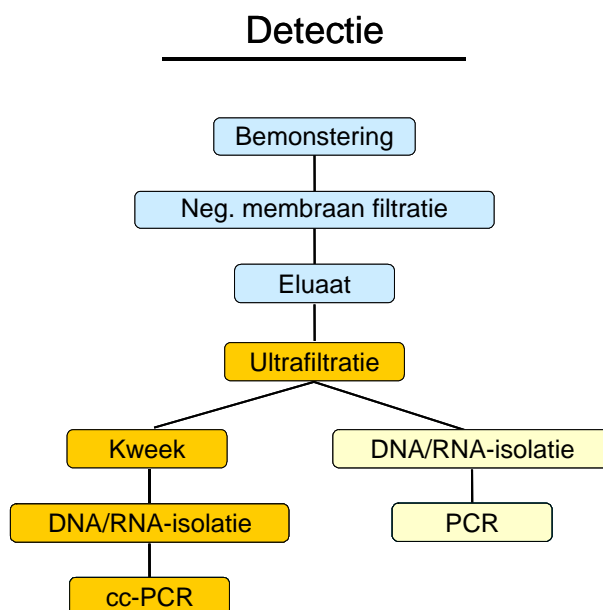
De relatief hoge detectiegrens die is gevonden voor detectie van enterovirussen met RT-PCR zal vergelijkbaar zijn voor andere pathogene virussen die volgens de VROM-inspectierichtlijn (Anoniem, 2006) gedetecteerd moeten worden als er reden is aan te nemen dat ze in concentraties voor kunnen komen waarin zij mogelijk een gevaar voor de volksgezondheid opleveren. Deze relatief hoge detectiegrens is inherent aan moleculaire detectiemethoden omdat hierbij reactievolumina gebruikt worden van slechts enkele tientallen microliters.

2.6 Detectie van virussen met behulp van celweek-PCR (cc-PCR)

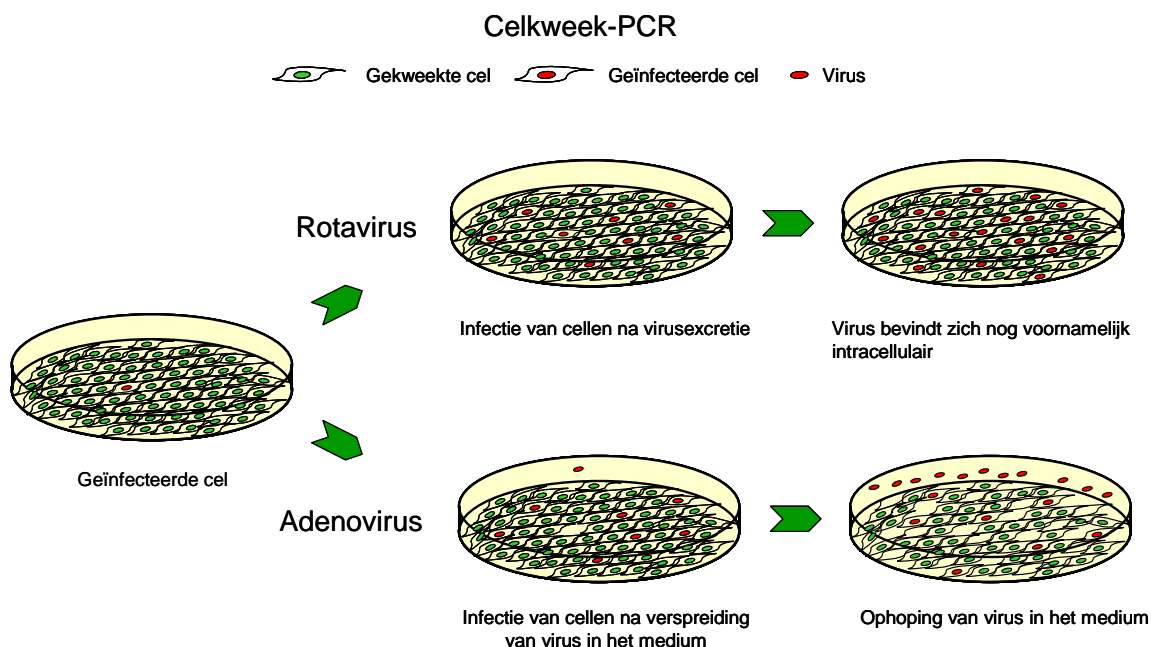
Om een infectierisicoschatting te kunnen uitvoeren zijn bij voorkeur gegevens nodig over het aantal infectieuze virusdeeltjes in het water. Helaas is niet voor alle kweekbare virussen een robuuste plaque assay voorhanden zoals wordt toegepast voor de detectie van infectieuze enterovirussen. Hiervoor zijn verschillende redenen te noemen. Zo is een voorwaarde voor detectie van een plaque dat het gerepliceerde virus vrijkomt uit de geïnfecteerde cel door lysis van de cel. Niet alle virussen zijn in staat om efficiënt hun gastheer cel te lyseren. Voor de enterale adenovirussen 40 en 41 is beschreven dat ze na infectie niet of moeilijk vrijkomen uit de geïnfecteerde cel (Brown et al., 1992). Een andere reden kan zijn dat virusrePLICATIE dusdanig traag is dat de kwaliteit van het celdek onder de plaque assay-kweekcondities niet meer optimaal is voor het aflezen van plaques, zoals is beschreven voor adenovirussen afkomstig uit natuurlijke monsters. Een in celweek gerepliceerd adenovirus type 2 is daarentegen wel in staat om duidelijk zichtbare plaques te vormen (Greening et al., 2002). Ditzelfde geldt voor rotavirus; een in celweek vermeerderd rotavirus resulteert in duidelijke plaques terwijl wild type rotavirussen niet of nauwelijks cytopathologisch effect (CPE) veroorzaken (O' Mahony et al., 2000). Ondanks het feit dat sommige virussen dus nauwelijks zichtbare veranderingen aan de geïnfecteerde cel veroorzaken kan het gerepliceerde virus wel gedetecteerd worden met moleculaire detectiemethoden (Figuur 13). Door celweek en moleculaire detectietechnieken met elkaar te combineren worden de goede eigenschappen van beide methoden benut; met celweek wordt alleen infectieus virus vermeerderd wat vervolgens met PCR veel sneller gedetecteerd kan worden dan wanneer detectie gecorreleerd is aan het ontstaan van CPE. Verder wordt bij de methode waarbij celweek en moleculaire detectie gecombineerd wordt het probleem omzeild dat mogelijke het aantal infectieuze virusdeeltjes onderschat wordt omdat bij de telling van de plaques het aantal onderschat kan worden omdat een plaque van een snel groeiend virus die van een minder snel replicerend virus kan overgroeien (Teunis et al., 2005). De methode waarbij celweek en moleculaire detectie gecombineerd wordt, ook wel 'cell culture-PCR' genoemd (cc-PCR), is beschreven voor verschillende enterale virussen, waaronder entero-, reo-, adeno-, astro, rotavirus en hepatitis A-virus (Ballester et al., 2005; Chapron et al., 2000; De Medici et al., 2001).

2.6.1 Detectie van infectieus rotavirus met cc-PCR

Rotavirus repliceert efficiënt in verschillende cellijnen (O' Mahony et al., 2000), maar omdat de humane colon carcinoom cellijn CaCo-2 ook gevoelig is voor infectie met andere wateroverdraagbare virussen (Pintó et al., 1994) is gekozen om deze cellijn te gebruiken voor cc-PCR. Als CaCo-2-cellen tot een confluent monolayer zijn gegroeid gaan ze spontaan differentiëren tot rijpe enterocyten (Pintó et al., 1983), de natuurlijke gastheer voor rotavirus replicatie in de dunne darm. Vierentwintig uur na infectie van CaCo-2-cellen met rotavirus is virusrePLICATIE in de cellen maximaal. Omdat na 24 uur nog geen virusdeeltjes zijn vrijgekomen in het bovenstaande kweekmedium is het voldoende om de geïnfecteerde cellen te onderzoeken op rotavirusrePLICATIE (Figuur 14). Om in celweek een efficiënte infectie te bewerkstelligen, is het voor de meeste rotavirustypes noodzakelijk om het virus vooraf te activeren door capside (=mantel) eiwitten te behandelen met een protease (Sato et al., 1981). Met deze kennis is de volgende methode tot stand gekomen.



Figuur 13: Schematische weergave van de te doorlopen concentratie en opzuiveringsmethoden voor de detectie van infectieuze virussen in water met behulp van celkweek-PCR (donkergeel) en detectie van zowel infectieuze als niet-infectieuze virusdeeltjes met behulp van moleculaire detectietechnieken (lichtgeel).



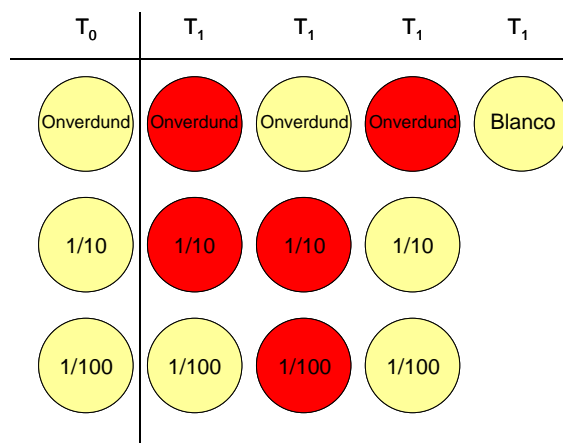
Figuur 14: Celkweek PCR-methoden. Afhankelijk van het te onderzoeken virus en gebruikte incubatietijden kan het gerepliceerde virus (nog) voornamelijk in de cellen aanwezig zijn zoals bij rotavirusreproductie, of het virus komt vrij in het bovenstaande medium, zoals bij adenovirusreproductie. Of virus al dan niet wordt uitgescheiden is van belang voor de isolatie van het virale RNA of DNA. Voor rotavirus wordt RNA geïsoleerd uit de cellen, adenovirus DNA voornamelijk uit de bovenstaande vloeistof.

De intestinale cellijn CaCo-2 wordt ingezaaid in 6 wells platen met een dichtheid van 8×10^4 cellen per cm^2 . Na 7 dagen incubatie bij 37°C en 5% CO_2 is een confluerende monolaag van gedifferentieerde CaCo-2 cellen ontstaan. Om deze cellen efficiënt te kunnen infecteren wordt het geconcentreerde watermonster een uur bij 37°C voorbehandeld met trypsine (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) om het virus te activeren (O' Mahony et al., 2000) en met een mix van antibiotica geïncubeerd om het concentraat zoveel mogelijk vrij te maken van bacteriën die kunnen storen in de celkweek. Van het behandelde concentraat wordt vervolgens 250 μl in verschillende verdunningen op de cellen gebracht en gedurende 1 uur geïncubeerd bij 37°C en 5% CO_2 . Na een uur wordt het concentraat van de cellen weggevoerd en nieuw medium op de cellen gebracht. Van elke onderzochte verdunning wordt nu een kweekfles verder opgewerkt voor RT-PCR, om het achtergrond signaal te kennen van niet-gerepliceerd rotavirus (T_0). De rest van de kweekflessen wordt teruggeplaatst bij 37°C en 5% CO_2 om na 24 uur verder opgewerkt te worden voor rotavirusdetectie met RT-PCR (T_1). Als op T_1 een toename is te zien van het rotavirus signaal met RT-PCR ten opzichte van T_0 heeft virusrepliatie plaatsgevonden en was dus infectieus rotavirus aanwezig in het onderzochte waterconcentraat.

Omdat het virus na 24 uur nog voornamelijk in de geïnfekteerde cellen aanwezig is, wordt het bovenstaande kweekmedium afgezogen om vervolgens de geïnfekteerde CaCo-2-cellen op te nemen in 1 ml TRIzol, een lysisbuffer waarin celmembranen oplossen en nucleïnezuren vrijgemaakt worden van cellulaire structuren. Na zuivering met chloroform wordt een ethanol precipitatie uitgevoerd om de totale hoeveelheid cellulair RNA en het virus RNA te concentreren. Uiteindelijk is al het RNA aanwezig in een volume van 30 μl . De T_0 -kweken zijn op dezelfde manier behandeld. Op het geïsoleerde RNA wordt een RT-PCR uitgevoerd voor de detectie van rotavirus. Eventuele geamplificeerde RT-PCR-producten worden vervolgens met behulp van gelelectrophorese en Southern blot hybridisatie zichtbaar gemaakt (Villena et al., 2003; Rutjes en De Roda Husman, 2004).

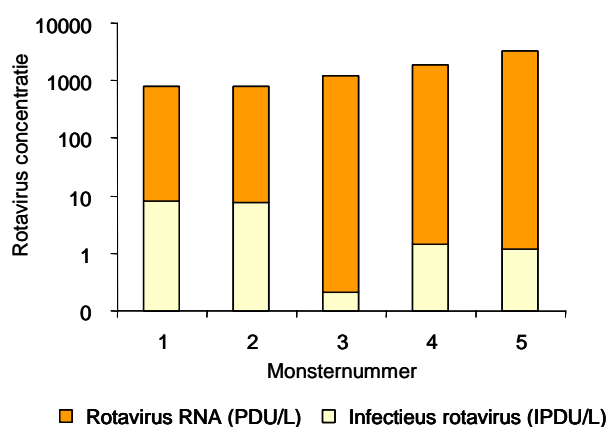
Om gegevens te verkrijgen over het aantal infectieuze virusdeeltjes wordt de celkweek zo vaak uitgevoerd dat virusconcentraties semi-kwantitatief bepaald kunnen worden als 'most probable number'. Hiertoe worden minimaal een drietal verdunningen in drievoud ingezet om na 24 uur te bepalen of rotavirus replicatie heeft plaatsgevonden (T_1), van elke verdunning minimaal een T_0 -monster en minimaal een negatieve controle. Voor elk te onderzoeken watermonster worden dus minimaal dertien analyses gedaan. Een voorbeeld van een experiment met het minimale aantal te analyseren verdunningen is afgebeeld in Figuur 15. In de rode wellen was in het onderzochte volume minimaal een infectieus rotavirusdeeltje aanwezig. Op dezelfde manier als waarmee bij (RT-)PCR semi-kwantitatief de MPN wordt bepaald, kan ook voor cc-PCR het aantal infectieuze PCR detecteerbare units per liter (IPDU/L) bepaald worden met het bijbehorende betrouwbaarheidsinterval. In dit voorbeeld is het totaal onderzochte volume ($(3 \times 250 \mu\text{l}) + (3 \times 25 \mu\text{l}) + (3 \times 2,5 \mu\text{l})$) = 832,5 μl concentraat. Afhankelijk van de concentratiefactoren van de negatieve membraanfiltratie en ultrafiltratie zal het geanalyseerde volume water ongeveer 10.000 keer zo groot zijn: 8,3 liter. Het onderzochte volume bij analyse met cc-PCR is dus aanzienlijk groter dan bij (RT-)PCR waar het geanalyseerde volume rond de 100 ml lag, maar weer beduidend kleiner dan het onderzochte volume van honderden liters bij de klassieke plaque assay voor de detectie van enterovirus (Figuur 11). De uiteindelijke concentratie infectieus rotavirus is in dit voorbeeld 1,2 (0,4-2,6) IPDU/L.

Om het verschil in rotavirusdetectie met PCR en cc-PCR te kunnen beoordelen zijn vijf oppervlaktewatermonsters van gemiddeld 600 liter geconcentreerd met behulp van negatieve membraanfiltratie en ultrafiltratie. Op een deel van dit ultrafiltraat is vervolgens een RNA extractie gedaan voor detectie van rotavirus RNA. Met een ander deel van dit ultrafiltraat is een infectie gedaan van CaCo-2-cellen voor de detectie van infectieuze rotavirussen. Na een incubatie van 24 uur bij 37°C en 5% CO_2 is op de geïnfekteerde cellen een RNA extractie gedaan. Beide



Figuur 15: Voorbeeld van het aantal in te zetten monsters voor het bepalen van het aantal infectieuze PCR-detecteerbare eenheden per liter (IPDU/L) met behulp van MPN.

RNA extracten zijn geanalyseerd met RT-PCR voor aanwezigheid van rotavirus RNA. Zoals staat weergegeven in Figuur 16 is in alle monsters infectieus rotavirus aanwezig variërend van een concentratie van 0,2 (0,03-0,7) tot 8,2 (3,3-17,2) IPDU/L. Totaal rotavirus RNA is in hogere concentraties gedetecteerd variërend van 759 (139-2504) tot 3204 (589-13184) PDU/L. De ratio infectieus rotavirus – totaal rotavirus RNA is per monster verschillend en varieert van 100 tot 6000. Voor enterovirus varieert deze verhouding van 70 tot 5000, en ligt dus in dezelfde orde van grootte (Figuur 11).



Figuur 16: Rotavirusdetectie in oppervlaktewater met de cell culture-PCR (cc-PCR) methode en moleculaire detectietechnieken (RT-PCR). Rotavirusconcentraties gevonden met cc-PCR op CaCo-2 cellen staan weergegeven in 'infectieuze PCR detecteerbare units' per liter (IPDU/L), concentraties gevonden met RT-PCR in PDU/L.

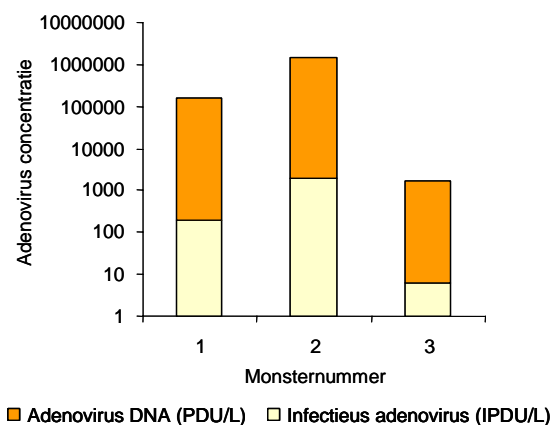
2.6.2 Detectie van infectieus adenovirus met cc-PCR

Ook voor de detectie van infectieus adenovirus zijn verschillende cellijnen beschreven (Brown et al., 1992; Heerden, van et al., 2003; Greening et al., 2002; Lee en Jeong 2004; Ko et al., 2003), waaronder de humane longcarcinoom cellijn A549 die door ons voor cc-PCR gebruikt zal gaan worden. De procedure voor infectie met adenovirus is vergelijkbaar maar eenvoudiger dan die voor infectie met rotavirus. Zodra de A549-cellen een monolaag hebben gevormd kunnen ze geïnfecteerd worden met adenovirus, differentiatie van de cellen is dus niet nodig voor een efficiënte infectie. Verder hoeft adenovirus niet geactiveerd te worden

voor infectie maar kan het geconcentreerde watermonster direct met de cellen geïncubeerd worden. Virusreplicatie duurt langer dan bij rotavirus; vijf dagen na infectie kan met PCR virusreplicatie worden aangetoond. Hoewel de meeste adenovirus types in het bovenstaande kweekmedium zullen vrijkomen na lysis van de geïnficeerde cel, zal een deel van het virus nog aanwezig zijn in (nog) niet gelyseerde cellen. Om de virusopbrengst in het kweekmedium zo hoog mogelijk te maken worden de cellen eerst drie keer ingevroren en ontdooid, waardoor virus vrij komt in het medium uit nog intacte geïnficeerde cellen (Figuur 17). Vervolgens wordt op een deel van dit kweekmedium een standaard DNA isolatie gedaan waarna met behulp van PCR adenovirus replicatie gedetecteerd kan worden.

De A549-cellen worden ingezaaid in kweekflesjes van 25 cm² met een dichtheid van 5×10^5 cellen per kweekfles, waarna ze na drie dagen incuberen bij 37°C en 5% CO₂ een confluerende monolaag gevormd hebben. Om het te onderzoeken water concentraat zoveel mogelijk vrij te maken van storende bacteriën wordt het monster een uur geïncubeerd met een antibiotica mix. Van het concentraat of verdunningen van het concentraat wordt vervolgens 1 ml op de cellen gebracht en gedurende een uur geïncubeerd bij 37°C en 5% CO₂. Net als voor rotavirus wordt na een uur het concentraat van de cellen weggewassen en nieuw medium op de cellen gebracht. De T₀-analyses van elke onderzochte verdunning kunnen nu worden ingevroren om later opgewerkt te worden voor de PCR. Het signaal wat met de T₀-analyse gevonden wordt is het achtergrond signaal van niet-gerepliceerd adenovirus in het monster. De rest van de kweekflessen wordt teruggeplaatst bij 37°C en 5% CO₂ en na vijf dagen verder opgewerkt voor adenovirusdetectie met PCR (T₅). Hiertoe worden alle kweekflessen drie keer ingevroren en ontdooid waarna op een deel van het supernatant een DNA extractie wordt uitgevoerd gevolgd door detectie met de eerder beschreven nested-PCR. Als op T₅ een toename te zien is in het adenovirus PCR-sigitaal ten opzichte van T₀ heeft virusreplicatie plaatsgevonden. Kwantificering van het aantal infectieuze adenovirus deeltjes is identiek aan de MPN-methode zoals deze is beschreven voor de kwantificering van het aantal infectieuze rotavirusdeeltjes met cc-PCR (Figuur 15). Welke verdunningen gekweekt moeten worden is afhankelijk van het watertype en de mate van contaminatie.

Om gegevens te verkrijgen over de verhouding infectieuze en PCR-detecteerbare virusdeeltjes zijn twee monsters van 10 liter rioolwater en een monster van 600 liter oppervlaktewater geconcentreerd met behulp van negatieve membraanfiltratie en ultrafiltratie. Op een deel van het concentraat is een DNA-extractie gedaan voor detectie van adenovirus DNA en een deel van het concentraat is gekweekt op A549-cellen voor de detectie van infectieuze adenovirussen. Na vijf dagen zijn de cellen drie keer bevroren en ontdooid en is een DNA-extractie gedaan. Beide soorten extracten zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van adenovirus DNA met nested-PCR. De concentraties infectieuze adenovirussen in rioolwater waren 200 (50,5-568) en 2024 (517-5860) IPDU/L, ongeveer een factor 30 tot 300 hoger dan in oppervlaktewater (6,1 (0,9-28,5) IPDU/L) (Figuur 17). Totaal adenovirus DNA is in beide rioolwatermonsters ongeveer 750 keer meer aanwezig dan infectieuze virusdeeltjes; $1,6 \times 10^5$ ($7,7 \times 10^3$ - $1,5 \times 10^6$) en $1,5 \times 10^6$ ($9,4 \times 10^4$ - $1,3 \times 10^7$) PDU/L. In oppervlaktewater is de concentratie aan totaal adenovirus DNA ongeveer 250 keer zo hoog als de concentratie infectieuze virusdeeltjes ($1,6 \times 10^3$ ($1,0 \times 10^2$ - $1,4 \times 10^4$) PDU/L). Hoewel meer monsters onderzocht zouden moeten worden om de werkelijke verhouding infectieus virus ten opzichte van totaal adenovirus DNA in oppervlaktewater te bepalen is het opmerkelijk dat de verhouding in oppervlaktewater hoger lijkt dan in rioolwater, omdat virussen waarschijnlijk langere tijd aanwezig zijn in oppervlaktewater en dus meer tijd hebben om af te sterven.



Figuur 17: Adenovirusdetectie in rioolwater (monster 1 en 2) en oppervlaktewater (monster 3) met de cc-PCR-methode en moleculaire detectietechnieken (PCR). Adenovirusconcentraties gevonden met cc-PCR op A549 cellen staan weergegeven in 'infectieuze PCR-detecteerbare units' per liter (IPDU/L), concentraties gevonden met PCR in PDU/L.

Zowel rotavirussen als adenovirussen kunnen mogelijk een gevaar voor de volksgezondheid opleveren als ze in voldoende hoge concentraties in het water aanwezig zijn en infectieus zijn. Als aannemelijk is dat dit het geval zou kunnen zijn moet volgens de inspectierichtlijn een infectierisicoschatting gedaan worden. Hiertoe dienen infectieuze adenovirussen en rotavirussen gedetecteerd te worden, wat met de ontwikkeling van de cc-PCR-methode voor beide virussen mogelijk is geworden. Dit heeft tot gevolg dat niet alleen voor enterovirus een infectierisicoschatting met een daadwerkelijk gemeten concentratie aan infectieuze virussen gedaan kan worden maar ook voor rota- en adenovirussen. Door de grote verschillen in de verhouding van infectieuze en niet-infectieuze virusdeeltjes zal het gebruik van data over infectieuze virussen een nauwkeuriger schatting van het infectierisico opleveren dan wanneer (RT-)PCR-gegevens worden gebruikt.

2.7 Real-time detectiemethoden

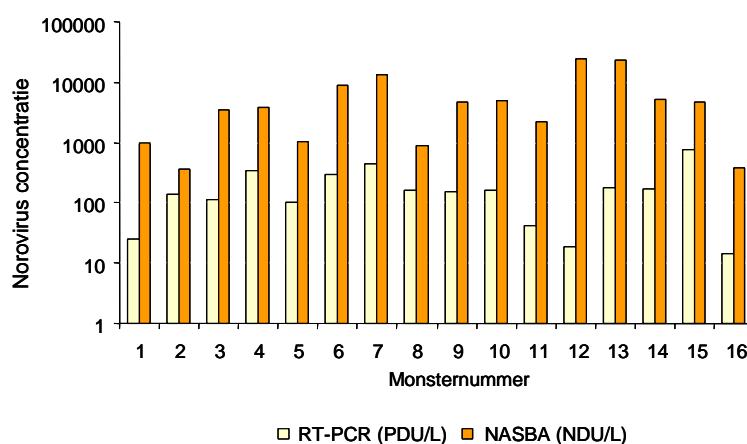
2.7.1 Real-time PCR

Bij de PCR technieken zoals hierboven beschreven wordt eerst een volledige (RT-)PCR doorlopen, eventueel gevolgd door een tweede amplificatie ronde zoals bij de nested-PCR voor adenovirus, alvorens de gegenereerde PCR-producten gedetecteerd kunnen worden met behulp van gelelectroforese en Southern blotting. Tegenwoordig zijn er echter ook zogenaamde real-time detectietechnieken beschikbaar waarbij gevormde PCR producten direct gedetecteerd kunnen worden, dus nog tijdens het verloop van de amplificatiereactie. Bij deze detectiemethode bevindt zich in de mix van PCR reagentia naast de benodigde nucleotiden, primers en enzymen tevens een probe die kan binden aan het gevormde PCR product. Na binding van de probe aan het gevormde PCR product zal de probe gaan fluoresceren. Dit fluorescerende signaal kan vervolgens gemeten worden. Bij een toename van het aantal PCR producten zal ook het fluorescerende signaal toenemen. De mate van fluorescentie is dus een maat voor de virusconcentratie. Als naast de te onderzoeken monsters ook standaarden worden geanalyseerd waarvan de concentraties bepaald zijn met behulp van een fotospectrometer, kan aan de hand van een hieruit gevormde ijklijn de virusconcentratie in het monster kwantitatief bepaald worden. Momenteel wordt een dergelijke real-time PCR voor adeno- en norovirus op het RIVM geïmplementeerd.

2.7.2 Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA)

Een alternatieve techniek voor moleculaire detectie is de zogenaamde Nucleic Acid Sequence Based Amplification (NASBA). Bij deze methode wordt RNA, in tegenstelling tot DNA bij PCR, geamplificeerd bij een isotherme temperatuur van 41°C (Compton 1991). Het te detecteren amplificatieproduct is RNA. De gevormde NASBA-amplificatieproducten kunnen net als bij real-time PCR direct gedetecteerd worden met fluorescerende probes. Bij een NASBA-reactie wordt gebruik gemaakt van andere enzymen dan bij PCR. Omdat bekend is dat de enzymen die bij PCR betrokken zijn, met name *Taq*-polymerasen, zeer gevoelig zijn voor remmende factoren uit het milieu (Tebbe en Vahjen 1993) hebben we de gevoeligheid voor remming van beide methoden onderzocht door de conventionele norovirus RT-PCR te vergelijken met een real-time norovirus NASBA. Hiertoe is een norovirus NASBA uitgevoerd op het RNA geïsoleerd uit zestien oppervlaktewatermonsters en zijn de virusconcentraties vergeleken met de concentraties die zijn gevonden met RT-PCR (Figuur 9B). De concentraties die gevonden zijn met NASBA varieerden van 27 (2-122) NASBA detecteerbare eenheden per liter (NDU/L) tot 5498 (714-39810) NDU/L (Rutjes et al., 2006). De gemiddelde virusconcentratie was vergelijkbaar met de concentraties gevonden met RT-PCR; 1405 NDU/L versus 1241 PDU/L Tabel 5).

De hoeveelheid waterconcentraat waarop de RNA isolatie is uitgevoerd was in dit geval geoptimaliseerd voor RT-PCR. Het opwerken van meer concentraat leidde niet tot de detectie van meer virus omdat ook meer remmende factoren voor de RT-PCR in het te onderzoeken RNA aanwezig waren (Rutjes et al., 2005). Om te onderzoeken of NASBA geremd wordt door de factoren die RT-PCR remmen is RNA geïsoleerd van de zestien oppervlaktewatermonsters uit een tien keer zo groot volume concentraat en is op het RNA zowel een RT-PCR als een real-time NASBA uitgevoerd. Zoals verwacht verliep de RT-PCR minder efficiënt dan wanneer kleinere volumina concentraat werden geanalyseerd. Met het vergroten van het onderzochte volume met een factor 10 is de gemiddelde gedetecteerde virusconcentratie verlaagd met bijna een factor 10 van 1241 PDU/L naar 193 PDU/L (Figuur 9B en Figuur 18). Het vergroten van de onderzochte volumina had juist een gunstig effect op het verlopen van de NASBA-reactie. Hier is de gemiddelde gedetecteerde virusconcentratie juist toegenomen van 1405 NDU/L naar 6345 NDU/L (Figuur 18), wat betekent dat remmende factoren voor RT-PCR weinig tot geen effect hebben op de efficiëntie van de NASBA-reactie (Rutjes et al., 2006). NASBA lijkt dus een goed alternatief te zijn voor moleculaire detectie van virussen in watermonsters omdat deze detectiemethode minder gevoelig is voor allerlei remmende stoffen uit het milieu.



Figuur 18: Real-time detectie van norovirus RNA uit groot volume watermonsters door middel van RT-PCR en NASBA.

2.8 De betekenis van normoverschrijdingen voor de aanwezigheid van pathogene virussen

In 2001 is een nieuwe versie van het Waterleidingbesluit gepubliceerd waarin staat dat, in tegenstelling tot het vorige Waterleidingbesluit, melding van *E.coli*, enterococci en *Clostridium perfringens* (of, indien van toepassing, sporen van sulfietreducerende Clostridia) plaats dient te vinden na aantreffen in het eerste monster, dus voordat een herhalingsonderzoek is uitgevoerd. Dit maakte het noodzakelijk om de VROM-Inspectierichtlijn voor de Melding van Normoverschrijdingen (Anoniem, 2005) aan te passen. In deze herziene versie van de richtlijn staat onder andere de meldingsprocedure beschreven voor de microbiologische parameters en definities. Als uit een periodiek onderzoek blijkt dat een parameter niet aan de eisen van het Waterleidingbesluit voldoet dient opnieuw bemonsterd te worden. Dit herhalingsmonster dient direct te worden genomen na het aantreffen van *E.coli*, enterococci (Tabel I van Bijlage A uit het Waterleidingbesluit) of een indicator voor fecale verontreiniging (bacteriën van de coligroep, *C. perfringens* en bacteriofagen, Tabel III van Bijlage A uit het Waterleidingbesluit). Herhalingsmonsters moeten in de regel worden genomen voordat corrigerende acties worden genomen om een zo goed mogelijk beeld te krijgen van de omvang van de (fecale) verontreiniging. Alleen na het aantreffen van *E.coli* en enterococci dienen direct corrigerende maatregelen te worden genomen.

Het feit dat na geconstateerde normoverschrijdingen van fecale indicatoren geen directe corrigerende maatregelen nodig worden geacht is in tegenstrijd met de in de VROM-Inspectierichtlijn gestelde definitie voor indicatorbacteriën voor (mogelijke) (fecale) verontreinigingen (Anoniem, 2005). In de definitie staat terecht dat de aanwezigheid van onder andere de fecale indicator *C. perfringens* duidt op een fecale verontreiniging, waarbij de aanwezigheid van pathogene micro-organismen niet is uit te sluiten en de microbiologische veiligheid van het drinkwater dus in gevaar is. Dit gegeven wordt genegeerd als niet direct actie wordt ondernomen na een normoverschrijding maar eerst de resultaten van herhalingsmonsters worden afgewacht. Verder kan volgens de definitie de aanwezigheid van uitsluitend bacteriën van de coligroep duiden op een verontreiniging, maar zou ook kunnen betekenen dat onder bijzondere omstandigheden vermeerdering heeft plaatsgevonden van vertegenwoordigers van deze groep in drinkwatersystemen. Hieruit wordt de conclusie getrokken dat de aanwezigheid van pathogene micro-organismen op grond van alleen deze indicator (in afwezigheid van *E. coli*, enterococci of *C. perfringens*) onwaarschijnlijk is en de microbiologische veiligheid van het drinkwater niet aantoonbaar direct in gevaar is. Bij aanwezigheid van bacteriën van de coligroep kan echter niet worden uitgesloten dat fecale verontreiniging wel degelijk aanwezig is, met name voor monsters genomen na ingrepen of reparaties of naar aanleiding van kwaliteitsklachten van afnemers. Dit betekent dat ten behoeve van de bescherming van de volksgezondheid ook normoverschrijdingen van fecale indicatoren zouden moeten leiden tot directe corrigerende maatregelen zonder de uitkomst van het herhalingsonderzoek af te wachten, tenzij uitgesloten kan worden dat er sprake is van fecale verontreiniging.

2.9 Virusmetingen in grondwater

Omdat bij kwetsbare grondwaterwinningen pathogenen meestal afwezig zijn in het gewonnen grondwater is een meetprogramma van pathogenen in ruw grondwater zoals wordt voorgeschreven voor oppervlaktewater niet aan de orde, maar dient voor kwetsbare grondwaterwinningen een onderzoeksplan opgesteld te worden. Zoals in de VROM-Inspectierichtlijn 'Analyse microbiologische veiligheid drinkwater' staat voorgeschreven moet op basis van een locatiespecifieke inventarisatie van de meest kwetsbare momenten (bijvoorbeeld na hevige regenval, of tijdens het uitrijden van mest) een meetprogramma worden opgesteld waarmee gedurende tenminste drie kwetsbaar geachte momenten het gehalte *E. coli* en F-specifieke en somatische colifagen in minimaal drie monsters van minimaal 10 liter grondwater wordt bepaald (Anoniem, 2006).

Uit wetenschappelijk onderzoek naar virussen in grondwater blijkt echter dat de frequentie van metingen van somatische colifagen op zijn minst tweewekelijks zou moeten zijn om iets te kunnen zeggen over de aanwezigheid van humane pathogene virussen in grondwaterwinningen (Karim et al., 2004). Verder geldt dat een groter volume voor elke indicator beter aangeeft wat de kans op fecale besmetting is, wat betekent dat tien liter monsters een betere voorspellende waarde hebben voor de aanwezigheid van humane pathogene virussen dan 1 liter monsters. Ook de gecombineerde toepassing van analyses van verschillende indicatoren levert betrouwbaardere gegevens dan metingen van een enkele indicator om besmetting van een winning met humaan pathogene virussen te kunnen aangeven. Behalve het meten van somatische en F-specifieke fagen wordt dus aangeraden om een combinatie van vereiste bacteriële indicatoren te bepalen (Karim et al., 2004).

2.10 Kwaliteitsborging voor de detectie van infectieuze enterovirussen

In de VROM-Inspectierichtlijn 'Analyse microbiologische veiligheid drinkwater' staat vermeld dat het waterleidingbedrijf zich dient te vergewissen van de kwaliteitsborging van de methoden voor de bepaling van de diverse micro-organismen. Alle bepalingen voor de detectie van bacteriofagen en pathogene virussen kunnen worden uitgevoerd door het Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie (LZO), waar gewerkt wordt onder een kwaliteitssysteem volgens EN ISO/IEC 17025:2000 'Algemene eisen voor de competentie van beproevings- en kalibratielaboratoria'. LZO is geaccrediteerd voor de bepaling van *E.coli*, somatische colifagen en F-specifieke RNA fagen in water. Detectie van de humaan pathogene infectieuze enterovirussen met behulp van celkweek gebeurt volgens NEN-EN 14486 (Water quality – Detection of human enteroviruses by monolayer plaque assay; juni 2005). Zoals aanbevolen in NEN-EN 14486 worden per experiment zowel positieve als negatieve controles meegenomen (Rutjes en De Roda Husman, 2004). Resultaten van de positieve controles worden geïnterpreteerd aan de hand van controlekaarten, waaruit blijkt of een experiment goed verlopen is. Gegevens over de reproduceerbaarheid, herhaalbaarheid en onderste detectielimiet van de meetmethode moeten in het kader van de VROM-Inspectierichtlijn nader bepaald worden, wat tevens kan leiden tot accreditatie van de meetmethode. Verder neemt het RIVM deel aan ringonderzoeken, welke op dit gebied georganiseerd worden door de Health Protection Agency (HPA). Tijdens deze ringonderzoeken vindt toetsing plaats voor zowel de concentratiemethode voor enterovirussen in 10 liter water als voor de detectie van enterovirussen met behulp van celkweek. LZO scoort bij deze ringonderzoeken in het algemeen boven gemiddeld. Zoals is vereist door de Raad van Accreditatie zijn de prestatiekenmerken en telgrens informatie van geaccrediteerde verrichtingen bij LZO op te vragen. Ook van de nog niet geaccrediteerde verrichtingen zijn deze gegevens opvraagbaar.

3 Discussie

Voor de detectie van virussen in water worden over het algemeen grote volumina geconcentreerd, variërend van een paar honderd liter voor oppervlaktewater tot duizend liter voor verder gezuiverd (drink)water. Dit was voor de klassieke detectie van enterovirussen met celkweek een volume wat indien nodig geheel onderzocht kon worden op de aanwezigheid van enterovirussen. Met de opkomst van de moleculaire detectietechnieken waarmee volumina onderzocht kunnen worden, die corresponderen met gemiddeld 100 ml water (Figuur 11), rijst de vraag of de concentratie van dergelijk grote volumina nog wel noodzakelijk is of dat volstaan kan worden met het concentreren van volumina van 10 liter. Zoals op zich is te beredeneren, maar ook blijkt uit de literatuur (Westrell et al., 2006), zijn virussen niet homogeen verdeeld over een watermonster maar komen in 'wolken' langs gestroomd. Dat houdt in dat bij het nemen van een klein volume monster de hoeveelheid virus die in dat kleine volume aanwezig is niet representatief hoeft te zijn voor de gemiddelde hoeveelheid virus die in een bepaalde tijd voorbij stroomt. Het bemonsteren van een paar honderd liter water duurt enkele uren, wat betekent dat de gevonden virusconcentratie het gemiddelde is voor de virusconcentratie in het water over een periode van een paar uur. Indien toch een klein volumemonster genomen wordt, heeft het de voorkeur om hiervoor een 24-uurs bemonsteringstechniek te gebruiken, waarbij gedurende 24 uur steeds kleine volumina water worden verzameld. Wat het daadwerkelijke effect is van het bemonsteringsvolume op virusconcentraties zal experimenteel moeten worden vastgesteld.

Bij de huidige door ons gebruikte methode voor de concentratie van virussen in water bindt het virus onder toevoeging van magnesiumchloride en het verlagen van de pH aan het negatief geladen filter. Na elutie met een buffer met hoge pH wordt het monster geneutraliseerd en verder geconcentreerd door middel van ultrafiltratie. Met deze concentratiemethode worden alleen virussen geconcentreerd. Recentelijk is beschreven dat zowel virussen en bacteriën als parasieten met een behoorlijk rendement kunnen worden geconcentreerd met behulp van een zogenaamd hemoflowfilter (Morales-Morales et al., 2003). Deze filtratiemethode is gebaseerd op scheiding door grootte. Het watermonster wordt door een groot aantal holle vezels geleid waarbij de kleinste deeltjes de wand van de vezel passeren en de grotere deeltjes, waaronder alle micro-organismen, achterblijven in het concentraat. Dit concentraat moet een aantal keren door de holle vezel worden geleid voordat het voldoende geconcentreerd is. Deze methode wordt met name toegepast voor schoon water. Of hij ook toepasbaar is voor oppervlaktewater en innamewater zal moeten worden onderzocht. Ook het effect van deze methode op de isolatie van remmende factoren voor de moleculaire detectietechnieken zal moeten blijken.

De virusconcentraties die met behulp van moleculaire technieken na ultrafiltratie gedetecteerd worden blijken 25 tot 1000 keer zo hoog te zijn als na twee-fasenscheiding. De virusconcentratie van entero-, noro-, adeno- en rotavirus die met (RT-)PCR in oppervlaktewater is bepaald ligt gemiddeld rond de 1000 PDU/L. Dergelijke hoge concentraties aan viraal RNA of DNA in oppervlaktewater zijn ook beschreven in de internationale literatuur (Donaldson et al., 2002; He en Jiang 2005; Choi en Jiang 2005; Haramoto et al., 2005b), maar ook virusconcentraties die vele malen lager zijn dan de waarden die zijn gevonden na twee-fasenscheiding (Heerden, van et al., 2005). Omdat zowel het water, de opwerkingsmethode als de detectietechniek invloed hebben op de uiteindelijke virusconcentratie in het watermonster is het moeilijk om gegevens uit de literatuur met elkaar te vergelijken. Voor correcte interpretatie van (RT-)PCR-data zijn een aantal controles onontbeerlijk. Vanzelfsprekend wordt een aantal positieve en negatieve controles meegenomen tijdens de isolatie van het virale RNA of DNA uit water. Tijdens de (RT-)PCR worden positieve controles uitgevoerd waarvan bekend is welke verdunningen nog net een positief signaal geven. Dit is een belangrijke maat voor het verloop van de (RT-)PCR reactie. Verder dient ter controle voor het verloop van elke individuele (RT-)PCR-reactie een intern controle RNA/DNA toegevoegd te worden. Idealiter is dit een RNA of DNA dat met dezelfde

primers als het target RNA/DNA kan worden geamplificeerd, maar een product van een andere lengte oplevert. Dit RNA/DNA moet in elk geval bij afwezigheid van een target signaal een (RT-)PCR-product genereren. Als ook het signaal van de interne controle ontbreekt is de (RT-)PCR niet goed verlopen en kan een monster noch negatief noch positief genoemd worden. Als in dezelfde PCR-run een goed signaal aanwezig was van de positieve controle was waarschijnlijk alleen de (RT-)PCR van het bewuste monster niet optimaal verlopen, mogelijk door de aanwezigheid van remmende factoren van de (RT-)PCR. Door het te analyseren monster en dus ook de remmende stoffen tien of honderd keer te verdunnen, afhankelijk van de mate van remming, kan de inhibitie in de meeste gevallen verholpen worden. Hoe een interne controle gemaakt kan worden staat beschreven in het rapport 'Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit' (Rutjes en De Roda Husman, 2004).

De gemiddelde concentratie adenovirus in oppervlaktewater is met 8500 PDU/L bijna tien keer zo hoog als de gemiddelde concentratie van de andere virussen. De hoogste virusconcentratie die gedetecteerd is, was 49602 PDU/L. Adenovirus is zeer stabiel in waterige milieus en het meest resistent voor UV-desinfectie en andere waterzuiveringsprocessen (Enriquez et al., 1995; Ko et al., 2003). Adenovirus is het virus dat het meest frequent wordt gedetecteerd in watermonsters. Uit de internationale literatuur blijkt dat als adenovirus niet te detecteren is ook geen andere gastro-enterale virussen te detecteren zijn. Daarom is gesuggereerd dat adenovirus zou kunnen dienen als virale indicator voor fecale verontreiniging (Formiga-Cruz et al., 2003; Pina et al., 1998). Andere virussen die veelvuldig voorkomen in rioolwater zijn humane circovirussen (huCV), een groep kleine DNA virussen die persistent voorkomen bij een groot deel van de bevolking (Myrmel et al., 2004; Haramoto et al., 2005a). Of een van beide virussen geschikt is als indicator voor humane virale verontreiniging is tot op heden onduidelijk (Myrmel et al., 2004).

Zoals is beschreven in paragraaf 2.3 en 2.4 is detectie van enterovirus mogelijk met zowel de klassieke plaque assay op BGM-cellen als met RT-PCR. Beide methoden hebben zo hun voor- en nadelen. Hoewel de plaque assay een gevoelige methode is voor de detectie van infectieuze enterovirussen laten de resultaten door lange incubatietijden wekenlang op zich wachten. Ook is het een erg kostbare methode. RT-PCR is een veel snellere detectiemethode maar er kan geen onderscheid gemaakt worden tussen infectieuze en niet-infectieuze virusdeeltjes. De detectielimiet van RT-PCR ligt hoger dan met kweek, met name omdat het geanalyseerde volume met RT-PCR vele malen kleiner is dan met de plaque assay (Figuur 11). Omdat het te analyseren volume met cc-PCR al snel een factor 100 groter is dan met RT-PCR zou de cc-PCR-methode een relatief gevoelig, snel en financieel aantrekkelijk alternatief kunnen zijn voor de detectie van infectieuze enterovirussen in watermonsters. Hoewel beschreven is dat cc-PCR gevoeliger kan zijn voor de detectie van een aantal enterovirus types omdat cc-PCR onafhankelijk is van CPE (Grabow et al., 1999; Reynolds et al., 2001), zal nader moeten worden uitgezocht hoe de detectielimiet en gevoeligheid zich daadwerkelijk verhouden tussen de verschillende methoden voor de detectie van enterovirus. Ook voor een aantal andere wateroverdraagbare virussen is in de literatuur beschreven dat ze met behulp van cc-PCR gedetecteerd kunnen worden, zoals astrovirus (Pintó et al., 1996) en hepatitis A virus (De Medici et al., 2001; Reynolds et al., 2001). In de toekomst zullen ook voor deze virussen cc-PCR-methoden binnen het RIVM geïmplementeerd gaan worden, naast de reeds geïmplementeerde rota- en adenovirus cc-PCR-kweekmethoden.

Hoewel de conventionele (RT-)PCR-technieken geen kwantitatieve detectiemethoden zijn kan de virusconcentratie semi-kwantitatief bepaald worden als MPN, zoals gebruikelijk is voor bacteriën. Door aan- of afwezigheid van het virus in tienvoudige verdunningen kan aan de hand van het volume van het inoculum en het aantal replica's het aantal RNA/DNA bevattende virusdeeltjes berekend worden met het bijbehorende 95% betrouwbaarheidsinterval. Bij de nieuwe real-time PCR-detectietechnieken wordt gekwantificeerd met een externe standaard. Als

externe standaard wordt vaak een plasmide DNA gebruikt waarin het PCR product gekloneerd is. Een nadeel van het gebruik van een dergelijk 'schone' externe standaard is dat de PCR reactie optimaal verloopt omdat remmende stoffen uit het milieu volledig ontbreken. In watermonsters verloopt de PCR-reactie meestal suboptimaal, met name in weinig of niet-verdunde monsters, wat betekent dat het fluorescerende signaal lager is dan als de PCR-reactie optimaal zou verlopen. Het fluorescentiesignaal van de externe standaard en van het monster zijn dus onder verschillende omstandigheden verkregen. Ideaal gezien zou de concentratie van het monster dus niet afgelezen kunnen worden aan de hand van de externe standaard, omdat zo de werkelijke virusconcentratie onderschat wordt. Om nauwkeuriger de virusconcentratie te kunnen bepalen zou de externe standaard gegenereerd kunnen worden in een concentraat van een watermonster. Dit heeft echter weer als nadeel dat remming in elk monster anders is en dus voor elk monster een externe standaard nodig is om correct te kwantificeren. Een andere mogelijkheid is dat het watermonster zodanig verdund wordt dat geen remming meer optreedt en de PCR voor het monster dus ook optimaal verloopt. Dit heeft echter weer als risico dat bij een lage mate van contaminatie het virus in het verdunde monster niet meer kan worden gedetecteerd. De meest betrouwbare manier van kwantificeren is aan de hand van een interne standaard, zoals is beschreven voor HIV met real-time NASBA (Weusten et al., 2002).

Met het optimaliseren van de concentratie- en detectiemethoden voor virussen in water is de virusconcentratie gemeten in het ruwe water hoger dan voorheen. Afhankelijk van de detectiemethode varieert de toename van een factor 2, zoals de enterovirusconcentraties die gecorrigeerd zijn voor het verlies aan virus tijdens de concentratiemethode, tot een factor 1000 voor een aantal (RT-)PCRs. De virusconcentraties in de grondstof zijn dus ook een factor 2 tot 1000 hoger, waardoor het geschatte infectierisico hoger wordt en de eis van 10^{-4} mogelijk overschreden.

4 Aanbevelingen

- 1) Tot nu toe werd met het bepalen van de virusconcentraties in watermonsters geen rekening gehouden met het verlies van virus tijdens het filtratieproces. In dit rapport hebben we laten zien dat het verlies van bacteriofagen per monster op één locatie van keer tot keer sterk kan verschillen. Daarom bevelen we aan om bij elke bemonstering het rendement van de concentratiemethode te bepalen aan de hand van de concentratie aan bacteriofagen in het water en in het concentraat. Met het rendement van somatische bacteriofagen kan de gemeten enterovirusconcentratie in het water gecorrigeerd worden zoals staat voorgeschreven in de VROM-Inspectierichtlijn (Anoniem, 2006), met het rendement van F-specifieke bacteriofagen de norovirus en hepatitis A en E virus concentratie.
- 2) Voor de virusconcentraties die met (RT)-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) semi-kwantitatief als ‘most probable number’ (MPN) bepaald zijn is tevens een 95% betrouwbaarheidsinterval gegenereerd (Tabel 4 en 5). Voor enterovirus hebben we laten zien dat hoe meer replica’s getest worden des te kleiner het betrouwbaarheidsinterval wordt (Figuur 10). Deze concentraties zijn bepaald door één RNA-extractie te doen, één tienvoudige verdunningsreeks te maken en op de verdunningen een, twee of drie keer een RT-PCR uit te voeren. Wellicht is een concentratiebepaling die gebaseerd is op drie extracties representatiever voor de werkelijke concentratie en zal het betrouwbaarheidsinterval kleiner worden als de RT-PCR in triplo wordt uitgevoerd. Experimenteel zal moeten worden bepaald op welke manier het meest betrouwbaar de virusconcentratie met (RT-)PCR bepaald kan worden.
- 3) Bij de bepaling van het aantal infectieuze enterovirussen met de plaque assay wordt het aantal virusdeeltjes onderschat omdat niet alle enterovirussen ‘Buffalo Green Monkey’ (BGM)-cellen kunnen infecteren of geen cytopathologisch effect (CPE) veroorzaken. Met RT-PCR wordt het aantal infectieuze virusdeeltjes overschat omdat zowel infectieus als niet-infectieus virus wordt gedetecteerd. Omdat bij moleculaire detectietechnieken slechts een klein volume kan worden onderzocht is er in vergelijking met celkweek een hoge detectielimiet. Omdat de cc-PCR-methode onafhankelijk is van CPE zou deze methode gevoeliger kunnen zijn dan de plaque assay methode. Verder is het geanalyseerde volume al snel 100 keer groter dan met RT-PCR, waardoor de detectielimiet 100 keer lager wordt. Hoe detectielimiet en gevoeligheid zich daadwerkelijk verhouden tussen de verschillende methoden moet nader worden uitgezocht.
- 4) Naast de in dit rapport beschreven cc-PCR voor rotavirus en adenovirus zijn in de literatuur ook cc-PCR-methoden beschreven voor de detectie van infectieus hepatitis A-virus en astrovirus. Om de infectierisicoanalyse voor meer wateroverdraagbare virussen te kunnen uitvoeren is implementatie van een cc-PCR-methode voor laatstgenoemde virussen wenselijk.
- 5) In het Waterleidingbesluit staat dat bij normoverschrijdingen van fecale indicatoren geen directe corrigerende maatregelen nodig worden geacht. Echter, bij de aanwezigheid van fecale indicatoren kan de aanwezigheid van pathogene micro-organismen niet uitgesloten worden en kan de microbiologische veiligheid van het drinkwater dus in gevaar zijn. Met name wanneer dit het geval is na ingrepen of reparaties of naar aanleiding van kwaliteitsklachten van afnemers is onze aanbeveling om niet de uitslag van het herhalingsmonster af te wachten maar direct corrigerende maatregelen te nemen.
- 6) Zoals staat voorgeschreven in de VROM-Inspectierichtlijn ‘Analyse microbiologische veiligheid drinkwater’ moet voor kwetsbare grondwaterwinningen een meetprogramma worden opgesteld waarmee gedurende drie kwetsbaar geachte momenten het gehalte *E.coli* en F-specifieke en somatische colifagen in minimaal drie monsters van minimaal tien liter grondwater wordt bepaald. Op grond van de internationale literatuur blijkt dat de

frequentie van metingen van somatische fagen op zijn minst tweewekelijks zou moeten zijn om iets te kunnen zeggen over de aanwezigheid van humane pathogene virussen in grondwaterwinningen. De bepaling van meerdere indicatoren in een monster levert betrouwbaardere informatie op over mogelijke besmetting van een winning met humane pathogene virussen.

Dankwoord

De auteurs danken de medewerkers van de projectgroep Water- en Voedselgerelateerde gezondheidsrisico's voor de tot stand koming van voorliggend rapport, met name Arieke Docters van Leeuwen, Harold van den Berg, Willemijn Lodder, Ronald Italiaander, Ciska Schets en Jack Schijven, en Trudy Suylen voor het kritisch doorlezen van het manuscript.

Literatuur

- Allard, A., Albinsson, B., en Wadell, G. (2001). Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 498-505.
- Anoniem. (2001). Besluit van 9 januari 2001 tot wijziging van het waterleidingbesluit in verband met de richtlijn betreffende de kwaliteit van voor menselijke consumptie bestemd water. *Staatsblad van het Koninkrijk de Nederlanden*.
- Anoniem. (2005). Inspectierichtlijn voor de melding van normoverschrijdingen drinkwaterkwaliteit.
- Anoniem. (2006). Inspectierichtlijn Analyse microbiologische veiligheid drinkwater.
- Ballester, N. A., Fontaine, J. H., en Margolin, A. B. (2005). Occurrence and correlations between coliphages and anthropogenic viruses in the Massachusetts Bay using enrichment and ICC-nPCR. *Journal of Water and Health*, 3, 59-68.
- Berg, van den, H. H. J. L., Lodder, W. J., van der Poel, W., Vennema, H., en De Roda Husman, A. M. (2005). Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Research in Microbiology*, 156, 532-540.
- Brown, M., Wilson-Friesen, H. L., en Doane, F. (1992). A block in release of progeny virus and a high particle-to-infectious unit ratio contribute to poor growth of enteric adenovirus types 40 and 41 cell culture. *Journal of Virology*, 66, 3198-3205.
- Carter, M. J. (2005). Enterically infecting viruses: pathogenicity, transmission and significance for food and waterborne infection. *Journal of Applied Microbiology* 98, 1354-1380.
- Chapron, C. D., Ballester, N. A., Fontaine, J. H., Frades, C. N., en Margolin, A. B. (2000). Detection of astroviruses, enteroviruses, and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and integrated cell culture-nested PCR procedure. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 2520-2525.
- Choi, S. en Jiang, S. C. (2005). Real-time PCR quantification of human adenoviruses in urban rivers indicates genome prevalence but low infectivity. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 7426-7433.
- Compton, J. (1991). Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*, 350, 91-92.
- Dahling, D. R. en Wright, B. A. (1986). Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environment. *Applied and Environmental Microbiology*, 51, 790-812.
- De Medici, D., Croci, L., Di Pasquale, S., Fiore, A., en Toti, L. (2001). Detecting the presence of infectious hepatitis A virus in molluscs positive to RT-nested-PCR. *Letters in Applied Microbiology*, 33, 362-366.
- Donaldson, K. A., Griffin, D. W., en Paul, J. H. (2002). Detection, quantitation and identification of enteroviruses from surface waters and sponge tissue from the Florida Keys using real-time RT-PCR. *Water Research*, 36, 2505-2514.
- Dowd, S. E., Pillai, S. D., Wang, S., en Corapcioglu, M. Y. (1998). Delineating the specific influence of virus isoelectric point and size on virus adsorption and transport through sandy soils. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 405-410.
- Duizer, E., Schwab, K. J., Neill, F. H., Atmar, R. L., Koopmans, M. P. G., en Estes, M. K. (2004). Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology*, 85, 79-87.
- Enriquez, E. E., Hurst, C. J., en Gerba, P. G. (1995). Survival of the enteric adenoviruses 40 and 41 in tap, sea, and waste water. *Water Research*, 29, 2548-2553.
- Ferguson, C. M., De Roda Husman, A. M., Altavilla, N., Deere, D. A., en Ashbolt, N. A. (2003). Fate and

- transport of pathogens into surface waters of watersheds. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 33, 299-361.
- Fleischer, J., Schlafmann, K., Otchwemah, R., en Botzenhart, K. (2000). Elimination of enteroviruses, other enteric viruses, F-specific coliphages, somatic coliphages and *E. coli* in four sewage treatment plants of Southern Germany. *Journal of Water Supply: Research and Technology*, 49, 127-137.
- Formiga-Cruz, M., Allard, A. K., Conden-Hansson, A. C., Henshilwood, K., Hernroth, B. E., Jofre, J., Lees, D. N., Lucena, F., Papapetropoulou, R. E., Vantarakis, A., en Girones, R. (2003). Evaluation of potential indicators of viral contamination in shellfish and their applicability to diverse geographical areas. *Applied Environmental Microbiology* , 69, 1556-1563.
- Gantzer, C., Maul, A., Levi, Y., en Schwartzbrod, L. (1998). Fate of the genome and infectious units of coxsackie B3 virus in phosphate buffered saline. *Virus Research*, 32, 1329-1333.
- Grabow, W. O. K., Botma, K. L., de Villiers, J. C., Clay, C. G., en Erasmus, B. (1999). Assessment of cell culture and polymerase chain reaction procedures for the detection of polioviruses in wastewater. *Bulletin of the World Health Organization* 77, 973-980.
- Green, J., Gallimore, C. I., Norcott, J. P., Lewis, D., en Brown, D. W. G. (1995). Broadly reactive reverse transcriptase polymerase chain reaction for the diagnosis of SRSV-associated gastroenteritis. *Journal of Medical Virology*, 47, 392-398.
- Greening, G. E., Hewitt, J., en Lewis, G. D. (2002). Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *Journal of Applied Microbiology*, 93, 745-750.
- Haramoto, E., Katayama, H., Kumiko, O., Yamashita, H., Nakajima, E., en Ohgaki, S. (2005a). One-year monthly monitoring of Torque teno virus (TTV) in wastewater treatment plants in Japan. *Water Research*, 39, 2008-2013.
- Haramoto, E., Katayama, H., Oguma, K., en Ohgaki, S. (2005b). Application of cation-coated filter method to detection of noroviruses, enteroviruses, adenoviruses and torque tenoviruses in the Tamagawa river in Japan. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2403-2411.
- Havelaar, A. H. (1993). Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment. Although imperfect, phages can act as sentinels for a safer water supply. *American Society for Microbiology News*, 59, 614-619.
- He, J. W. en Jiang, S. (2005). Quantification of enterococci and human adenoviruses in environmental samples by real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 2250-2255.
- Heerden, van, J., Ehlers, M. M., Heim, A., en Grabow, W. O. K. (2005). Prevalence, quantification and typing of adenoviruses detected in river and treated drinking water in South Africa. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 234-242.
- Heerden, van, J., Ehlers, M. M., Van Zyl, W. B., en Grabow, W. O. (2003). Incidence of adenoviruses in raw and treated water. *Water Res*, 37, 3704-8.
- Karim, M. R., LeChevallier, M. W., Abbaszadegan, M., Alum, A., Sobrino, J., en Rosen, J. (2004). Field testing of USEPA methods 1601 and 1602 for coliphage in groundwater. Report of Awwa Research Foundation and American Water Works Association.
- Ko, G., Cromeans, T. L., en Sobsey, M. D. (2003). UV inactivation of adenovirus type 41 measured by cell culture mRNA RT-PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 69, 7377-7384.
- Koopmans, M. en Duizer, E. (2004). Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology*, 90, 23-41.
- Lee, H. K. en Jeong, Y. S. (2004). Comparison of total culturable virus assay and multiplex intergated cell culture-PCR for reliability of waterborne virus detection. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 3632-3636.

- Lindesmith, L., Moe, C., Marionneau, S., Ruvoen, N., Jiang, X., Lindblad, L., Stewart, P., Lependu, J., en Baric, R. (2003). Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nature Medicine*, 9, 548-553.
- Lodder, W. J. en De Roda Husman, A. M. (2005). Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1453-1461.
- Lodder, W. J., Vinje, J., van de Heide, R., De Roda Husman, A. M., Leenen, E. J. T. M., en Koopmans, M. P. G. (1999). Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. *Applied and Environmental Microbiology*, 65, 5624-5627.
- Loisy, F., Atmar, R. L., Guillon, P., Le Cann, P., Pommepuy, M., en Le Guyader, F. S. (2005). Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods*, 123, 1-7.
- Mandel, B. (1971). Characterization of type 1 Poliovirus by electrophoretic analysis. *Virology* 44, 554-568.
- McKenna, R., Xia, D., Willingmann, P., Ilag, L. L., Krishnaswamy, S., Rossmann, M. G., Olson, N. H., Baker, T. S., en Incardona, N. L. (1992). Atomic structure of single-stranded DNA bacteriophage X174 and its functional implications. *Nature* 355, 137-143.
- Morales-Morales, H., Vidal, G., Olszewski, J., Rock, C. M., Dasgupta, D., Oshima, K., en Smith, G. B. (2003). Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 4098-4102.
- Myrmel, M., Berg, E. M., Rimstad, E., en Grinde, B. (2004). Detection of enteric viruses in shellfish from the Norwegian coast. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 2678-2684.
- O' Mahony, J., O' Donoghue, M. M. J. G., en Hill, C. (2000). Rotavirus survival and stability in foods as determined by an optimised plaque assay procedure. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 177-185.
- Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., en Girones, R. (1998). Viral pollution in the environment and in shellfish: Human Adenovirus detection by PCR as an index of human viruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3376-3382.
- Pintó, M., Robine-Leon, S., Appay, M., Kedinger, M., Triadou, N., Dussaulx, E., Lacroix, B., Simon-Assmann, P., Haffen, K., Fogh, J., en Zweibaum, A. (1983). Enterocyte-like differentiation and polarization of the human colon carcinoma cell line Caco-2 in culture. *Biology of the Cell*, 47, 323-330.
- Pintó, R. M., Diez, J. M., en Bosch, A. (1994). Use of the colonic carcinoma cell line CaCo-2 for in vivo amplification and detection of enteric viruses. *Journal of Medical Virology*, 44, 310-315.
- Pintó, R. M., Abad, F. X., Gajardo, R., en Bosch, A. (1996). Detection of infectious astroviruses in water. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 1811-1813.
- Pöyry, T., Stenvik, M., en Hovi, T. (1988). Viruses in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. *Applied and Environmental Microbiology*, 54, 371-374.
- Pusch, D., Oh, D. Y., Wolf, S., Dumke, R., Schroter-Bobsin, U., Hohne, M., Roske, I., en Schreier, E. (2005). Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of Virology*, 150, 929-947.
- Reynolds, K. A., Gerba, C. P., Abbaszadegan, M., en Pepper, I. L. (2001). ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Canadian Journal of Microbiology*, 47, 153-157.
- Rutjes, S. A. en De Roda Husman, A. M. (2004). Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001. RIVM Rapport No. 330000 007.
- Rutjes, S. A., Italiaander, R., van den Berg, H. H. J. L., Lodder, W. J., en De Roda Husman, A. M. (2005). Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens

- miniMAG system and real-time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 3734-3740.
- Rutjes, S. A., van den Berg, H. H. J. L., Lodder, W. J., en De Roda Husman, A. M. (2006). Real-time detection of noroviruses in surface water by a broadly reactive Nucleic Acid Based Amplification assay. *Applied Environmental Microbiology*, 72, 5349-5358.
- Sato, K., Inaba, Y., Shinozaki, T., Fujii, R., en Matumoto, M. (1981). Isolation of human rotavirus in cell cultures. *Archives of Virology*, 69, 155-160.
- Schvoerer, E., Ventura, M., Dubos, O., Cazaux, G., Serceau, R., Gournier, N., Dubois, V., Caminade, P., Fleury, H. J., en Lafon, M. E. (2001). Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Research in Microbiology*, 152, 179-186.
- Schwab, K. J., De Leon, R., en Sobsey, M. D. (1995). Concentration and purification of beef extract mock eluted from water samples for the detection of Enteroviruses, Hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 531-537.
- Sedmak, G., Bina, D., MacDonald, J., en Couillard, L. (2005). Nine-year study of the occurrence of culturable viruses in source water for two drinking water treatment plants and the influent and effluent of a wastewater treatment plant in Milwaukee, Wisconsin (August 1994 through July 2003). *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1042-1050.
- Sobsey, M. D., Battigelli, D. A., Shin, G. A., en Newland, S. (1998). RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. *Water Science and Technology*, 38, 91-94.
- Tebbe, C. C. en Vahjen, W. (1993). Interference of humic acids and DNA extracted directly from soil in detection and transformation from bacteria and yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2657-2665.
- Teunis, P. F. M., Lodder, W. J., Heisterkamp, S. H., en De Roda Husman, A. M. (2005). Mixed plaques: Statistical evidence how plaque assays may underestimate virus virus concentrations. *Water Research*, 39, 4240-4250.
- Vennema, H., de Bruin, E., en Koopmans, M. (2002). Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Virology*, 25, 233-235.
- Villena, C., El-Senousy, W. M., Abad, F. X., Pintó, R. M., en Bosch, A. (2003). Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: Emergence of unusual genotypes. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 3919-3923.
- Vinje, J. en Koopmans, M. P. G. (2000). Simultaneous detection and genotyping of "Norwalk-like viruses" by oligonucleotide array in a reverse line blot hybridization format. *Journal of Clinical Microbiology*, 38, 2595-2601.
- Westrell, T., Teunis, P. F., van den Berg, H., Lodder, W. J., Ketelaars, H. A. M., Stenstrom, T. A., en Roda Husman, A. M. d. (2006). Short- and long-term variations of norovirus concentrations in the Meuse river during a 2-year study period. *Water Research*, 40, 2613-2620.
- Weusten, J. J. A. M., Wouters, P. A. W. M., van Zuijlen, M. C. A., en van der Wiel, P. A. (2002). Stochastic processes defining sensitivity and variability of internally calibrated quantitative NASBA-based viral load assays. *Nucleic Acids Research*, 30, e137.
- Zerda, K. S. en Gerba, C. P. (1984). Agarose isoelectrofocusing of intact virions. *Journal of Virological Methods* 9, 1-6.

Bijlage 1

Primers en probes voor de detectie van wateroverdraagbare virussen met RT-PCR

Primer/Probe	Sequentie		Virus
Entero 1 ¹	5' CCTCCGGCCCCTGAATG 3'	Primer	Enterovirus
Entero 2 ¹	5' ACCGGATGGCCAATCCAA 3'	Primer	
Entero probe ¹	5' TACTTTGGGTGTCCGTGTTTC 3'	Probe	
JV12Y ²	5' ATACCACTATGATGCAGAYTA 3'	Primer	Norovirus
JV13i ²	5' TCATCATCACCATAGAAIGAG 3'	Primer	
GGIi ³	5' ATGGAYGTTGGYGAYTATGT 3'	Probe	
GGIi ³	5' GAAYTCCATCRCCCAYTG 3'	Probe	
UK3 ^{3,4}	5' GTCCCCTGACATCATAACAGGCT 3'	Probe	
JV5 ³	5' CTCACCAGAGGTTGTCCAAGC 3'	Probe	
Hex1deg ⁵	5' GCCSCARTGGKWCWTACATGCACATC 3'	Primer	Adenovirus
Hex2deg ⁵	5' CAGCACSCCICGRATGTCAAA 3'	Primer	
Nehex3deg ⁵	5' GCCCGYGCMAICIGAIACSTACTTC 3'	Nested primer	
Nehex4deg ⁵	5' CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA 3'	Nested primer	
VP6-3 ⁶	5' GCTTTAAAACGAAGTCTTCAAG 3'	Primer	Rotavirus
VP6-4 ⁶	5' GGTAATTACCAATTCTCCAG 3'	Primer	
Rota probe ⁶	5' CAAATGATAGTTACTATGAATGG 3'	Probe	

¹ Schwab et al., 1995, ² Vennema et al., 2002, ³ Berg, van den et al., 2005, ⁴ Green et al., 1995, ⁵ Allard et al., 2001, ⁶ Villena et al., 2003