

RIVM rapport 330000007/2004

**Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve
van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001**

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

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van VROM-Inspectie, in het kader van project 703719, Monitoring en Handhaving Drinkwater, ten behoeve van intern project 330000, Watermicrobiologie, deelproject Operationalisering Infectierisico.

Abstract

This report describes the various methods available for detection of viruses in water in the Netherlands. Research data on viruses in water sources used for the production of drinking water and the removal of viruses through applied treatment processes are important to be able to assess the 10^{-4} infection risk allowed in Dutch drinking water guidelines. According to these guidelines *Cryptosporidium*, *Giardia* and (entero)viruses need to be assessed for infection risk, indicating that, besides enteroviruses, other pathogenic viruses of possible importance for the drinking-water supply will have to be included. Noro- and rotaviruses are examples of such important pathogenic viruses, considering that these are the most common viruses causing viral gastroenteritis in the Netherlands. By combining new molecular biological techniques and common methods for virus concentration and cell culture, we arrived at the procedure for detecting viruses in water samples proposed below. The individual techniques are explained in detail in the report.

- Viruses are filtered from water by negative membrane filtration.
- The eluate is further concentrated through two-phase separation for the reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) and ultrafiltration for cell culture.
- RT-PCR is performed to determine the presence of viruses in the water samples.
- Cell culture is performed for cases of positive enterovirus RT-PCR to determine the infectivity.
- Infectious viruses are typed to determine pathogenicity.

Bacteriophages are analysed in source waters and in different stages of the treatment process to be able to calculate the amount of virus in drinking water. Advantages and disadvantages of the present methods are explained and discussed in this report. For noro- and rotavirus, for example, the amount of viral genomes can be determined by the fast RT-PCR. The amount of infectious virus, however, which is needed for a risk assessment analysis, can not be determined. Infectivity of enterovirus can be analysed by cell culture, but this is an expensive and a time-consuming method. New developments in viral diagnostics, such as optimising RNA extraction or combining cell culture and molecular techniques, have been suggested as a possible means of optimising the procedure presented.

Voorwoord

Onderliggend rapport is tot stand gekomen door samenwerking van A.M. de Roda Husman, W.J. Lodder, H.H.J.L. van den Berg, H.A.M. de Bruin, J.F. Schijven, F.M. Schets en S.A. Rutjes van de projectgroep Watermicrobiologie van het Microbiologisch Laboratorium voor Gezondheidsbescherming.

Inhoud

Samenvatting	5
1. Inleiding	6
1.1 <i>Wetgeving</i>	6
1.2 <i>Schatting van het infectierisico</i>	7
1.3 <i>Wateroverdraagbare pathogene virussen</i>	8
1.4 <i>Doel</i>	9
2. Bepalingen	10
2.1 <i>Bacteriofagen</i>	10
2.1.1 <i>Somatische colifagen</i>	10
2.1.2 <i>F-specifieke bacteriofagen</i>	10
2.2 <i>Concentreren van bacteriofagen voor detectie</i>	11
2.3 <i>Aantonen van somatische en F-specifieke bacteriofagen</i>	13
2.4 <i>Berekening van het aantal bacteriofagen in het oorspronkelijke watermonster</i>	13
3. Enterovirus	15
3.1 <i>Aantonen van enterovirussen in water</i>	16
3.1.1 <i>RNA isolatie</i>	18
3.1.2 <i>Semi-kwantitatieve RT-PCR</i>	18
3.1.3 <i>Detectie van RT-PCR producten</i>	20
3.1.4 <i>Berekenen van enterovirusconcentraties in water</i>	20
3.1.5 <i>Bepalen van het aantal infectieuze virusdeeltjes</i>	21
3.1.6 <i>Typeren van enterovirussen</i>	23
4. Rotavirus en norovirus	24
4.1 <i>Rotavirus</i>	24
4.1.1 <i>Aantonen van rotavirussen</i>	25
4.2 <i>Norovirus</i>	26
4.2.1 <i>Aantonen van norovirus</i>	27
5. Discussie	29
5.1 <i>Voor- en nadelen van huidige detectie technieken</i>	30
5.1.1 <i>Viruskweek technieken</i>	30
5.1.2 <i>Moleculaire detectiemethoden</i>	32
6. Aanbevelingen	34
Literatuur	36

Samenvatting

In dit rapport wordt een overzicht gegeven van de detectiemethoden voor virussen in water in Nederland. In het Nederlandse Waterleidingbesluit is vastgelegd dat een kwantitatieve risicoanalyse moet worden opgesteld voor *Cryptosporidium*, *Giardia* en (entero)virussen in drinkwater. Voor het door middel van deze risicoanalyse berekende theoretische infectierisico geldt een voorlopige grenswaarde van één infectie per 10.000 personen per jaar. Of voldaan wordt aan de gestelde grenswaarde kan vanwege de lage aantallen in drinkwater niet direct bepaald worden. De aantallen virussen in drinkwater kunnen wel bepaald worden door de aantallen virussen in de grondstof te bepalen en de verwijdering door zuiveringsprocessen. De berekende virusconcentratie kan vervolgens gebruikt worden voor een schatting van het infectierisico. De virussen die zijn opgenomen in het Waterleidingbesluit staan omschreven als (entero)virussen, wat inhoudt dat enterovirussen, maar mogelijk ook andere virusgroepen die kritisch zijn voor de drinkwatervoorziening onder het Waterleidingbesluit vallen. Dergelijke virussen zijn rota- en norovirussen, omdat dit de belangrijkste veroorzakers zijn van virale gastro-enteritis in Nederland. In dit rapport worden daarom niet alleen detectiemethoden voor enterovirussen beschreven, maar ook die voor noro- en rotavirussen. De volgende procedure is beschreven voor virusdetectie in watermonsters.

- Virussen worden uit water geconcentreerd met behulp van filtratie door negatief geladen membranen.
 - Het eluaat wordt verder geconcentreerd met behulp van twee-fasenscheiding voor Reverse Transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) en door middel van ultrafiltratie voor celkweek.
 - RT-PCR wordt uitgevoerd om te bepalen of virus aanwezig is in het watermonster.
 - Indien de enterovirus RT-PCR positief is, wordt met behulp van celkweek bepaald of er ook infectieuze virus deeltjes aanwezig zijn.
 - Infectieuze virussen worden getypeerd om pathogeniciteit vast te stellen.
- Bacteriofagen worden bepaald in de grondstof en in verschillende stadia van het zuiveringsproces om zo de mate van zuivering te kunnen vaststellen.

Voor en nadelen van de beschreven detectiemethoden zullen worden bediscussieerd. Zo kunnen voor noro- en rotavirussen het aantal RNA-genomen vastgesteld worden met de zeer gevoelige RT-PCR, maar kan niet worden bepaald of de virussen infectieus zijn. Dit laatste is echter nodig om het infectierisico te kunnen schatten. Voor enterovirussen kan daarentegen wel het aantal infectieuze virusdeeltjes bepaald worden, maar de methode hiervoor duurt lang en is kostbaar. In dit rapport worden aanbevelingen gedaan om nieuwe methoden te ontwikkelen vanuit de virale diagnostiek die de beschreven procedure verder zouden kunnen optimaliseren.

1. Inleiding

1.1 Wetgeving

In de EU-richtlijn van 1998 (Richtlijn 98/83/EG pb L330, 32) betreffende de kwaliteit van voor menselijke consumptie bestemd water staat dat pathogene micro-organismen niet in zodanige hoeveelheden in het water mogen voorkomen dat een gevaar voor de volksgezondheid ontstaat. Om dit te waarborgen zijn microbiologische parameters geselecteerd die met een hogere, zogenaamde bewakingsfrequentie, of lagere auditfrequentie gemeten dienen te worden, zoals opgenomen in het Nederlandse Waterleidingbesluit (Staatsblad van het Koninkrijk der Nederlanden, 2001; 31). De Europese Drinkwaterrichtlijn is vertaald naar het op 9 februari 2001 in werking getreden Nederlandse Waterleidingbesluit. In grote lijnen komen de te meten microbiologische parameters overeen (Tabel 1). De te bepalen microbiologische parameters die door zowel de Europese als Nederlandse wet worden voorgeschreven zijn bacteriën. Het bepalen van de aantallen bacteriën geeft informatie over de bacteriologische kwaliteit van het drinkwater en het eventueel optreden van fecale verontreiniging.

In tegenstelling tot de Europese wetgeving zijn in de Nederlandse wet, naast bacteriën, tevens een aantal andere micro-organismen opgenomen, te weten (entero)virussen, *Cryptosporidium* en *Giardia*. Aangezien van deze micro-organismen bekend is dat ze relevant zijn voor de volksgezondheid dient volgens het Nederlandse Waterleidingbesluit hiervoor een schatting van het infectierisico te worden uitgevoerd.

Tabel 1 Microbiologische normen zoals voorgeschreven in Europese en Nederlandse wetgeving.

Microbiologische parameter	EG	NL
<i>Escherichia coli</i>	0/100 ml	0/100 ml
Enterococcen	0/100 ml	0/100 ml
Bacteriën van de coligroep	0/100 ml	0/100 ml
<i>Clostridium perfringens</i> incl. Sporen	0/100 ml	0/100 ml
Koloniegetal bij 22 °C	Geen abnormale verandering	100/ml geometrisch jaargemiddelde
Aeromonas bij 30 °C	-	1000/100 ml
Bacteriofagen	-	-

EG: Europese Gemeenschap, NL: Nederland

Wetstekst Nederlandse Waterleidingbesluit

Artikel 4

1. *Leidingwater dat de eigenaar aan derden ter beschikking stelt, bevat geen micro-organismen, parasieten of stoffen in aantallen per volume eenheid of concentraties die nadelige gevolgen voor de volksgezondheid kunnen hebben.*

Artikel 6

6. *Voor micro-organismen, parasieten of stoffen die niet zijn genoemd in de in bijlage A opgenomen tabellen I, II en III, verricht de eigenaar of de eigenaar van een collectief leidingnet metingen, indien er redenen zijn om aan te nemen dat deze aanwezig zijn in aantallen per volume-eenheid of concentraties die nadelige gevolgen voor de volksgezondheid kunnen hebben.*

Noot bij Tabel 1 van Bijlage A

Micro-organismen mogen krachtens artikel 4, eerste lid, niet in een zodanige concentratie in het leidingwater voorkomen dat gevaar voor de volksgezondheid kan ontstaan. Voor bepaalde micro-organismen, zoals virussen en protozoa (onder meer Cryptosporidium en Giardia), is het niet mogelijk om concentraties te meten op het zeer lage niveau, waarop blootstelling relevant is voor de gezondheid van de gebruiker. In plaats hiervan dient de eigenaar die gebruik maakt van oppervlaktewater als grondstof voor de bereiding van leidingwater op basis van metingen van de desbetreffende micro-organismen in het ruwe water en gegevens over de verwijderingscapaciteit bij de verschillende zuiveringsprocessen (inclusief eventuele bodempassages) in overleg met de toezichthouder een kwantitatieve risicoanalyse voor het betreffende leidingwater op te stellen.

Voor het door middel van deze risicoanalyse berekende theoretische infectierisico geldt een voorlopige grenswaarde van één infectie per 10.000 personen per jaar. De toetsing aan deze (voorlopige) grenswaarde voor het infectierisico dient in elk geval te worden uitgevoerd voor enterovirussen, Cryptosporidium en Giardia, maar geldt in principe ook voor andere pathogene micro-organismen. Indien het berekende infectierisico groter is dan de genoemde grenswaarde, dient de eigenaar met de toezichthouder te overleggen over te nemen maatregelen. De toezichthouder kan bepalen dat voor kwetsbare grondwaterwinningen eenzelfde risicoanalyse wordt uitgevoerd.

De term 'voorlopige grenswaarde' wordt gebruikt om aan te geven dat het hier om een toetsingswaarde gaat die in de praktijk nog nader wordt getoetst. Aanpassing van deze waarde is daarom niet uitgesloten.

1.2 Schatting van het infectierisico

Uitgangspunt van de schatting van het infectierisico die volgens het Nederlandse Waterleidingbesluit (zie tekstbox) voor (entero)virussen, *Cryptosporidium* en *Giardia* dient te worden uitgevoerd is dat bij consumptie van het betreffende water het risico lager is dan 1 infectie per 10.000 personen per jaar. Deze micro-organismen hebben echter dusdanige dosis-respons relaties, dat zeer lage aantallen relevant zijn voor de volksgezondheid

(Teunis *et al.*, 1996). De aantallen van deze micro-organismen in het drinkwater zijn echter zo laag dat zij hierin niet rechtstreeks kunnen worden aangetoond. Om toch virussen in drinkwater te kunnen bepalen meet de eigenaar die gebruik maakt van oppervlaktewater voor drinkwaterproductie de aantallen virussen in de grondstof waaruit drinkwater wordt gemaakt. Op basis van de gemeten aantallen in dit ruwe water en de verwijderingscapaciteit van de zuivering kunnen de virusconcentraties in het drinkwater worden berekend. De efficiëntie van de zuivering wordt bepaald met behulp van zogenaamde indicatororganismen. Een geschikte indicator heeft vergelijkbare reductie en overlevingseigenschappen als de pathogenen waarvoor ze als indicator dienen. Slechts van enkele humaan pathogene virussen zijn momenteel gegevens beschikbaar over hun gedrag in het milieu en in zuiveringsprocessen, wat de keuze voor een geschikt indicator organisme bemoeilijkt. Ondanks de beperkte kennis over het gedrag van virussen in zuiveringsprocessen worden momenteel bacterie-virussen (bacteriofagen) gezien als de meest geschikte indicatoren, omdat hun morfologische en fysisch-chemische eigenschappen, zoals grootte en isoelectrisch punt (pI), die bepalend zouden kunnen zijn voor hun gedrag bij zuiveringsprocessen, overeenkomen met die van humaan pathogene virussen. Ook zijn bacteriofagen gemakkelijk te detecteren en niet ziekteverwekkend voor de mens (Leclerc *et al.*, 2000) en worden daarom gebruikt als indicator organismen voor de verwijdering van humaan pathogene virussen door zuiveringsprocessen. Bacteriofagen zijn echter minder geschikt als indicator organisme voor de aanwezigheid van humane virussen in oppervlaktewater, aangezien bacteriofagen zich in tegenstelling tot humane virussen in bacteriën vermenigvuldigen. Door naast de virusconcentraties gegevens over de dosis-respons relaties en consumptie van het drinkwater te verzamelen kan een schatting van het infectierisico gemaakt worden. De afgelopen 10 jaar is veel ervaring opgedaan met het opzetten van een risicoanalyse voor de protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia* (Teunis *et al.*, 2002a; Teunis *et al.*, 2002b). Tot op heden is over de toetsing van (entero)virussen veel minder informatie beschikbaar. Aan de hand van dit rapport zullen de detectiemethoden beschreven worden voor virussen die van belang zijn voor veilig drinkwater uit de kraan.

1.3 Wateroverdraagbare pathogene virussen

Een grote verscheidenheid aan virussen kan via water worden overgedragen (zie Tabel 2). Dergelijke virussen zijn goed bestand tegen variaties in de watertemperatuur en in pH (Schijven en Hassanizadeh, 2000), ze zijn over het algemeen klein (ongeveer 30 nanometer) en hebben geen envelop om hun capsid. Virussen die in feces worden uitgescheiden, de zogenaamde enterale virussen, bezitten deze eigenschappen waardoor ze goed kunnen overleven in water en op voedsel, vooral wanneer deze bij lage temperaturen en een gemiddelde luchtvochtigheid bewaard worden. Ze kunnen zich echter niet vermenigvuldigen in water, omdat virussen voor replicatie afhankelijk zijn van een gastheer. Enterale virussen zouden dus indirect via rioolwater en fecaal besmet oppervlaktewater kunnen worden overgedragen. In Nederland is vooralsnog onbekend welk deel van de explosies van gastro-enteritis wordt veroorzaakt door blootstelling aan humaan pathogene virussen in water. Wel is bekend dat in Nederland jaarlijks 4,5 miljoen gastro-enteritis episodes worden

doorgemaakt al dan niet veroorzaakt door contact met geïnfecteerde personen of dieren, besmet voedsel of water (de Wit *et al.*, 2001a). Dat is ongeveer één op drie tot vier personen en dus ruim 4 ordes van grootte hoger dan de voor drinkwater gehanteerde norm van 10^{-4} . Ongeveer 200.000 Nederlanders bezoeken jaarlijks voor hun gastro-enteritis klachten de huisarts (de Wit *et al.* B, 2001b). Onderzoek naar de verwekkers in feces van gastro-enteritis patiënten wees uit dat calicivirussen, zowel noro- als sapovirussen, en rotavirussen tot de belangrijkste gastro-enteritis verwekkers in Nederland behoren.

Tabel 2: Wateroverdraagbare virussen.

Familie	Genus	Virus
<i>Picornaviridae</i>	Enterovirus	Poliomyelitisvirus 1-3
		Coxsackievirus A/B
		ECHO-virus
		Enterovirus 70-71
		Humaan Enterovirus 68-71
<i>Reoviridae</i>	Hepatovirus	Hepatitis A-virus
	Orthoreovirus	Reovirus 1-3
	Rotavirus	Rotavirus A-C
<i>Caliciviridae</i>	Sapovirus	Prototype Sapporo
	Norovirus	Genogroep I prototype Norwalk
		Genogroep II prototype Lordsdale
Hepatitis E -achtige virussen		Hepatitis E virus
<i>Astroviridae</i>	Astrovirus	Humaan Astrovirus 1-5
<i>Adenoviridae</i>	Mastadenovirus	Humaan Adenovirus 1-47
<i>Nidoviridae</i>	Coronavirus	SARS*

* potentieel wateroverdraagbaar

1.4 Doel

In dit rapport wordt een overzicht gegeven van de detectiemethoden voor virussen in water. De gegevens over de aantallen virussen in drinkwater zijn van belang om te kunnen bepalen of het water voldoet aan het infectierisico van 10^{-4} , die is vastgelegd in het Nederlandse Waterleidingbesluit. Om aan- of afwezigheid van virussen te bepalen zal een eerste snelle screening worden uitgevoerd in de grondstof waaruit drinkwater wordt geproduceerd. Dit gebeurt met behulp van moleculair biologische detectiemethoden. Indien mogelijk zal bij een positief resultaat met celkweek worden bekeken of de gedetecteerde virussen daadwerkelijk infectieus zijn. Om de uiteindelijke hoeveelheid virus in het drinkwater te kunnen berekenen is het noodzakelijk dat ook de efficiëntie van de zuiveringsprocessen bepaald wordt, waartoe bacteriofaagbepalingen worden uitgevoerd in zowel de grondstof als het drinkwater. De detectiemethoden voor bacteriofagen en entero-, rota-, en norovirussen in water zullen in dit rapport beschreven worden. Hoewel de laatste twee niet met name genoemd zijn in het Waterleidingbesluit is de bepaling van de concentratie van deze virussen toch van belang, omdat dit de belangrijkste veroorzakers zijn van virale gastro-enteritis in Nederland. Detectie van de andere wateroverdraagbare virussen (zie Tabel 2) is wel mogelijk maar zal niet in dit rapport beschreven worden.

2. Bepalingen

2.1 Bacteriofagen

Bacteriofagen kunnen gebruikt worden als indicator organismen om de efficiëntie van de zuivering te bepalen. Verschillende groepen bacteriofagen kunnen dienen als indicator-virus. Dit is afhankelijk van hun morfologische en fysisch-chemische eigenschappen, zoals bijvoorbeeld structuur, grootte en pI. Bacteriofagen kunnen verdeeld worden in verschillende groepen met als voornaamste indicatoren de somatisch colifagen, de F-specifieke fagen en de Bacteroides fagen. De somatische colifagen komen in de hoogste aantallen voor in Nederlandse oppervlaktewateren (Havelaar *et al.*, 1986). De Bacteroides fagen zullen eerder een bacterie van humane dan van animale oorsprong als gastheer hebben, wat deze fagen tot een geschikte indicator maakt. Ze komen echter veelal in te lage aantallen voor om deze eenvoudig aan te tonen. De detectiemethoden voor somatische en F-specifieke bacteriofagen zullen hieronder besproken worden.

2.1.1 Somatische colifagen

Van de somatische colifagen zijn de *Microviridae* belangrijke indicator-organismen van humaan pathogene virussen (Tabel 3). Hun natuurlijke gastheren zijn onder andere *Escherichia coli* en andere gerelateerde bacterie species. Somatische colifagen komen frequent voor in humane en dierlijke feces (10^2 - 10^8 g⁻¹) en afvalwater (10^3 - 10^4 g⁻¹). Sommige van deze fagen kunnen zich onder specifieke omstandigheden vermenigvuldigen (Havelaar, 1993a). Ze kunnen overleven in water, maar worden in verschillende mate geïnactiveerd door waterzuiveringsprocessen (Sommer *et al.*, 2001).

Somatische colifagen van de *Microviridae* familie bestaan uit een capside van 30 nm en bezitten geen staart. De species ϕ X174 bestaat uit een enkelstrengs DNA genoom van 5 kilobaseparen (kbp) en heeft gemiddeld een isoelectrisch punt van 6,6 (Tabel 4). Deze eigenschappen maken het een goede indicator voor de kleine enterovirussen, die een isoelectrisch punt hebben tussen 5,3 en 8,2 (Dowd *et al.*, 1998; Mandel, 1971; McKenna *et al.*, 1992). Een van de uitzonderingen hierop is hepatitis A virus (HAV), dat een isoelectrisch punt heeft van 2,8 (Dowd *et al.*, 1998).

2.1.2 F-specifieke bacteriofagen

De F-specifieke bacteriofagen behoren tot de *Leviviridae* familie (Kastelein *et al.*, 1982), welke bestaat uit twee genera, levivirus en allolevivirus. Deze bacteriofagen zijn infectieus voor bacteriën die een F- of sexe pilli op hun oppervlak dragen, waar F-specifieke fagen aan kunnen binden en zo vervolgens de bacterie kunnen infecteren. Zo kan bijvoorbeeld de MS2 bacteriofaag de bacteriën *Pseudomonas*, *E.coli*, *Salmonella typhimurium* en *Vibrio cholerae* infecteren, afhankelijk van de aanwezigheid van de F-pilli op de gastheer. F-specifieke fagen komen frequent voor in afvoerwater in concentraties van 10^3 tot 10^4 ml⁻¹. Vermenigvuldiging vindt alleen plaats bij temperaturen boven de 30 °C en ze zijn relatief resistent in

Tabel 3: Indicator bacteriofagen.

Groep (Familie)	Type species	Natuurlijke bacteriele gastheer	<i>In vitro</i> gastheer	Op grond van grootte en pI potentiële indicator voor
Somatische colifagen (<i>Microviridae</i>)	φX174	Enterobacteriaceae	<i>E. coli</i> C	Polio, CA/B, ECHO, HAstV
F-spec. bacteriofagen (<i>Leviviridae</i>)	MS2	Enterobacteriaceae	<i>S. Typhimurium</i> 3	HAV, HEV, calici, HAstV

pI: isoelectrisch punt; CA/B: Cocksackie A/B; ECHO: Enteric Cytopathogenic Human Orphan; HAstV: humaan astrovirus; HAV: hepatitis A virus; HEV: hepatitis E virus

zuiveringsprocessen (Havelaar *et al.*, 1986). MS2 is een levivirus species van 26 nm met een enkelstrengs RNA genoom en heeft een isoelectrisch punt van 3,9 (Tabel 4). Deze eigenschappen maken hem een geschikte indicator voor HAV, wat eveneens klein is (27 nm) en een laag isoelectrisch punt heeft van 2,8 (Dowd *et al.*, 1998). Omdat MS2 bacteriofagen een vergelijkbare grootte en pI hebben als virussen van de *Caliciviridae* familie, zouden deze indicator fagen ook informatie kunnen verschaffen over transport, adsorptie en overleving van calicivirussen (Zerda en Gerba, 1984).

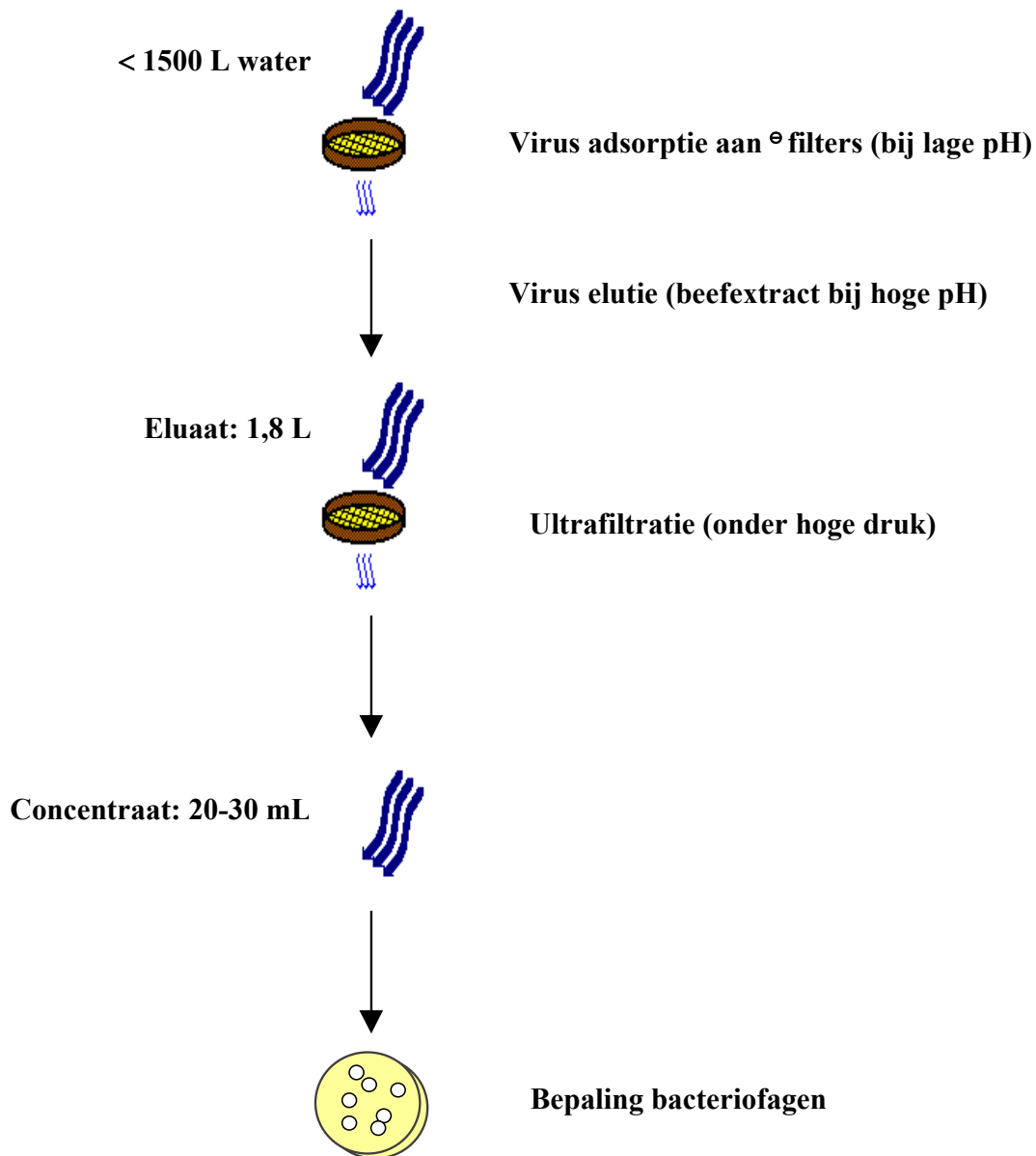
Tabel 4: Morfologie van bacteriofagen die gebruikt worden als indicator organismen.

Species	Grootte (nm)	M (x 10 ⁶)	Buoyant density (g/cm ³ in CsCl)	pI	Genoom	Genoom grootte (kbp)
φX174	26-32	6-7	1,36-1,41	6,6	ssDNA	5
MS2	26	3,6-4,2	1,46	3,9	ssRNA	3,6-4,2

Nm: nanometer; M: molecular weight; g: gram; cm: centimeter; CsCl: cesiumchloride; pI: isoelectrisch punt; kbp: kilobaseparen; ss: single stranded

2.2 Concentreren van bacteriofagen voor detectie

Afhankelijk van de aard van het te onderzoeken watermonster kunnen de concentraties van bacteriofagen in het water variëren van hoog tot laag. Monsters van ongezuiverd rioolwater zullen grote hoeveelheden bacteriofagen bevatten. In monsters genomen van oppervlaktewater of gezuiverd rioolwater zijn echter de aantallen fagen lager, zodat eerst een concentratiestap moet worden uitgevoerd om toch in dergelijke watermonsters bacteriofagen te kunnen detecteren. Reductie van omvangrijke volumes tot analyseerbare volumes water kan worden bewerkstelligd met behulp van filtratie door een negatief geladen membraan (zie Figuur 1). Afhankelijk van de zuiverheid van het water kan tot maximaal 1500 liter gefiltreerd worden. Hiertoe wordt MgCl₂ aan het watermonster toegevoegd zodat een



Figuur 1: Schematische weergave van de concentratie van bacteriofagen uit watermonsters.

Vóór filtratie van het watermonster wordt de pH verlaagd tot 3,8 met zoutzuur en MgCl_2 wordt toegevoegd tot aan een concentratie van 0,05M. Na filtratie wordt het monster geëluëerd met 3% beefextract en verder geconcentreerd door middel van ultrafiltratie onder hoge druk. Het resulterende concentraat wordt vervolgens gebruikt voor de analyse van bacteriofagen.

eindconcentratie van 0,05M ontstaat en wordt de pH verlaagd tot 3,8 met zoutzuur. De negatief geladen virusdeeltjes in het water vormen hierdoor positief geladen complexen. Door het watermonster vervolgens door een negatief geladen membraanfilter te pompen, worden de viruscomplexen geadsorbeerd aan het filter. Met een beefextract oplossing met een hoge pH (pH 9,0) wordt het geadsorbeerde virus geëluëerd in een totaal volume van 1,8 liter. Door de pH te neutraliseren met behulp van azijnzuur-acetaat buffer (pH 5,0), worden de gevormde magnesiumverbindingen in oplossing gebracht en zullen de virusdeeltjes disaggregeren. Met deze concentratie stap is een 100- tot 1000-voudige volumereductie opgetreden. Een

eventuele verdere concentratie van dit eluaat tot slechts enkele tientallen milliliters kan worden bereikt door een additionele ultrafiltratiestap onder druk. Hierbij wordt gebruik gemaakt van filters met een dusdanig kleine poriegrootte (10.000 Da) dat de virusdeeltjes deze filters niet kunnen passeren maar achterblijven in het concentraat. De totale volumereductie kan zo oplopen van 10.000 tot 100.000-voud.

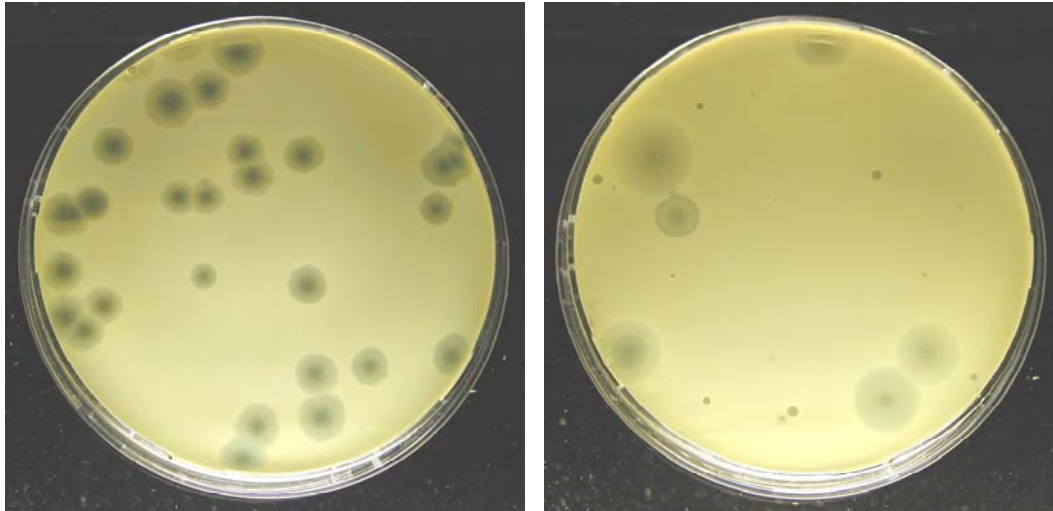
2.3 Aantonen van somatische en F-specifieke bacteriofagen

In monsters water waarin hoge concentraties bacteriofagen voorkomen, zoals rioolwater, kunnen bacteriofagen direct bepaald worden. Voor de watermonsters genomen van inname water of drinkwater wordt echter altijd concentraat gebruikt voor het bepalen van het aantal bacteriofagen. In beide gevallen wordt een geschikte gastheer bacterie gemengd met gesmolten voedingsbodem en een bepaalde hoeveelheid al dan niet geconcentreerd monster. Voor detectie van somatische fagen wordt de gastheer *Escherichia coli* CN (WG5) gebruikt volgens ISO 10705-2. Voor F specifieke fagen is de gebruikte gastheer een *Salmonella typhimurium* mutant met lage pathogeniciteit (WG49), waarin kunstmatig de F-pilli tot expressie wordt gebracht en die een lage somatische achtergrond telling geeft (Mooijman *et al.*, 2002). De bepaling wordt uitgevoerd volgens ISO 10705-1. Het mengsel van 1 ml gastheerbacterie, 1 ml monster of verdunningen van het monster en 2,5 ml gesmolten voedingsbodem wordt vervolgens over een vaste voedingsbodem in een petrischaal gegoten en overnacht geïncubeerd bij 37°C. Geïnfecteerde bacteriën zullen gelyseerd worden, waardoor bacteriofagen vrijkomen die nabijgelegen bacteriën kunnen infecteren. Op deze manier zal een groepje dode bacteriën ontstaan, die zichtbaar zijn als gaten in het bacteriedek, de zogeheten plaques (zie Figuur 2). Aan de hand van het getelde aantal plaques en het onderzochte volume kan de hoeveelheid fagen in het oorspronkelijke watermonster berekend worden. Deze bepalingen, en alle andere bepalingen beschreven in dit rapport, worden uitgevoerd volgens een kwaliteitssysteem gebaseerd op EN ISO/IEC 17025:2000.

2.4 Berekening van het aantal bacteriofagen in het oorspronkelijke watermonster

Afhankelijk van de verwachte virusconcentratie in water wordt het aantal bacteriofagen direct, in eluaat of in concentraat bepaald. De hoeveelheid fagen in het oorspronkelijke watermonster kan berekend worden door het aantal plaques op een plaat te tellen en, indien het monster is verdund, te vermenigvuldigen met de verdunningsfactor. Als 1 ml onverdund monster getest is, komt het aantal plaques op een plaat dus overeen met het aantal plaques per ml monster. Als het monster 100 keer verdund is, is het aantal plaques de hoeveelheid fagen per 0,01 ml monster. Als een verdunningsreeks is ingezet voor de bepaling van F-specifieke fagen, worden alleen de verdunningen geteld met minder dan 300 plaques per plaat. Voor de grotere somatische fagen is het maximaal aantal telbare plaques 150 per plaat. Bij grotere aantallen plaques komen ze over elkaar heen te liggen wat de telling onbetrouwbaar maakt. Indien de fagen zijn bepaald in eluaat of concentraat moet ook nog vermenigvuldigd worden met de concentratiefactor. Een bepaling wordt altijd minimaal in duplo uitgevoerd en indien

meerdere verdunningen zijn getest, worden alle verdunningen die een telbaar resultaat opleveren meegenomen in de berekening. De hoeveelheid plaques wordt dan berekend uit het gewogen gemiddelde van een aantal bepalingen.



ϕ X174

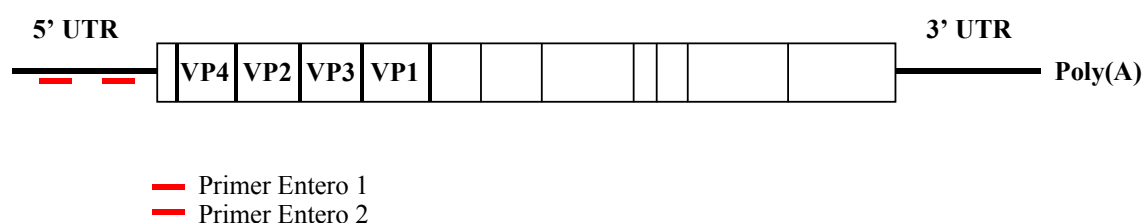
Watermonster

Figuur 2: Plaques gevormd door bacteriofagen.

Een mengsel van gastheerbacterie, monster en voedingsmedium wordt over een vaste voedingsbodem gegoten en overnacht geïncubeerd bij 37°C. Geïnfecteerde bacteriën worden gelyseerd, waardoor bacteriofagen vrijkomen die omliggende bacteriën kunnen infecteren.

3. Enterovirus

Enterovirussen kunnen reeds lange tijd kwantitatief bepaald worden in water. Ze behoren tot de familie van de *Picornaviridae* en zijn kleine enkelstrengse RNA virussen zonder envelop. De *Picornaviridae* zijn 27-29 nm in diameter en hebben een klein enkelstrengs positief RNA genoom (Stanway, 1990). Het capsid is opgebouwd uit vier structurele eiwitten: viral protein (VP)1, VP2, VP3 en VP4. Het genoom is opgebouwd uit een 5' niet-coderend gedeelte (UTR), het coderende gedeelte, een 3' UTR en een poly(A)-staart (zie Figuur 3). De lange, zeer gestructureerde 5' UTR bevat een 'Internal Ribosomal Entry Site' (IRES), die interne initiatie van translatie mogelijk maakt.



Figuur 3: Schematische weergave van het enterovirus genoom.

De locatie van de enterovirus primers, entero1 en entero2, in de 5' UTR is weergegeven in rood.

Van de 5 genera waaruit de familie van de *Picornaviridae* is opgebouwd zijn de enterovirus en hepatovirus genera pathogeen in mensen (Cooper *et al.*, 1978; Stanway, 1990; Gust *et al.*, 1983). Enterovirussen komen van alle picornavirus genera het meest voor in water. Tot de enterovirussen behoren de poliomyelitisvirus types 1, 2 en 3, de coxsackievirus types A1 tot-en-met A22, A24 en B1 tot-en-met B6, de enterale cytopathogene humana orphan (echo) virussen 1 tot-en-met 7, 9, 11 tot-en-met 27, 29 en 33 en de humane enterovirussen 68 tot-en-met 71. Tot het hepatovirus genus behoort het in water veel voorkomende Hepatitis A Virus (HAV) (zie Tabel 2).

Transmissie van enterovirus infecties vindt voornamelijk plaats van mens tot mens, via de lucht of via besmet voedsel en water. Virus replicatie vindt plaats in de keel en darmen en de virussen worden daarom ook uitgescheiden via speeksel en feces. Een geïnfecteerd persoon kan zelfs 3 maanden lang virus uitscheiden in feces (Chung *et al.*, 2001). Een picornavirus infectie kan zeer variërend verlopen van symptomeloos tot zeer ernstig (zie Tabel 5). Zo verloopt 90% van de poliovirusinfecties onopgemerkt, maar een infectie met poliovirus kan zich ook uiten in koorts, verlamming en hersenvliesontsteking. Groep A coxsackievirusinfecties kunnen naast hersenvliesontsteking ook oogontsteking, darm- en huidklachten veroorzaken. Groep B coxsackievirussen kunnen hersenvliesontsteking, koorts en luchtwegaandoeningen veroorzaken. Echovirus kan zeer uiteenlopende ziekteverschijnselen geven, variërend van diarree tot oog- en hersenvliesontsteking. Een HAV infectie kan leverontsteking en diarree veroorzaken, maar kan ook onopgemerkt

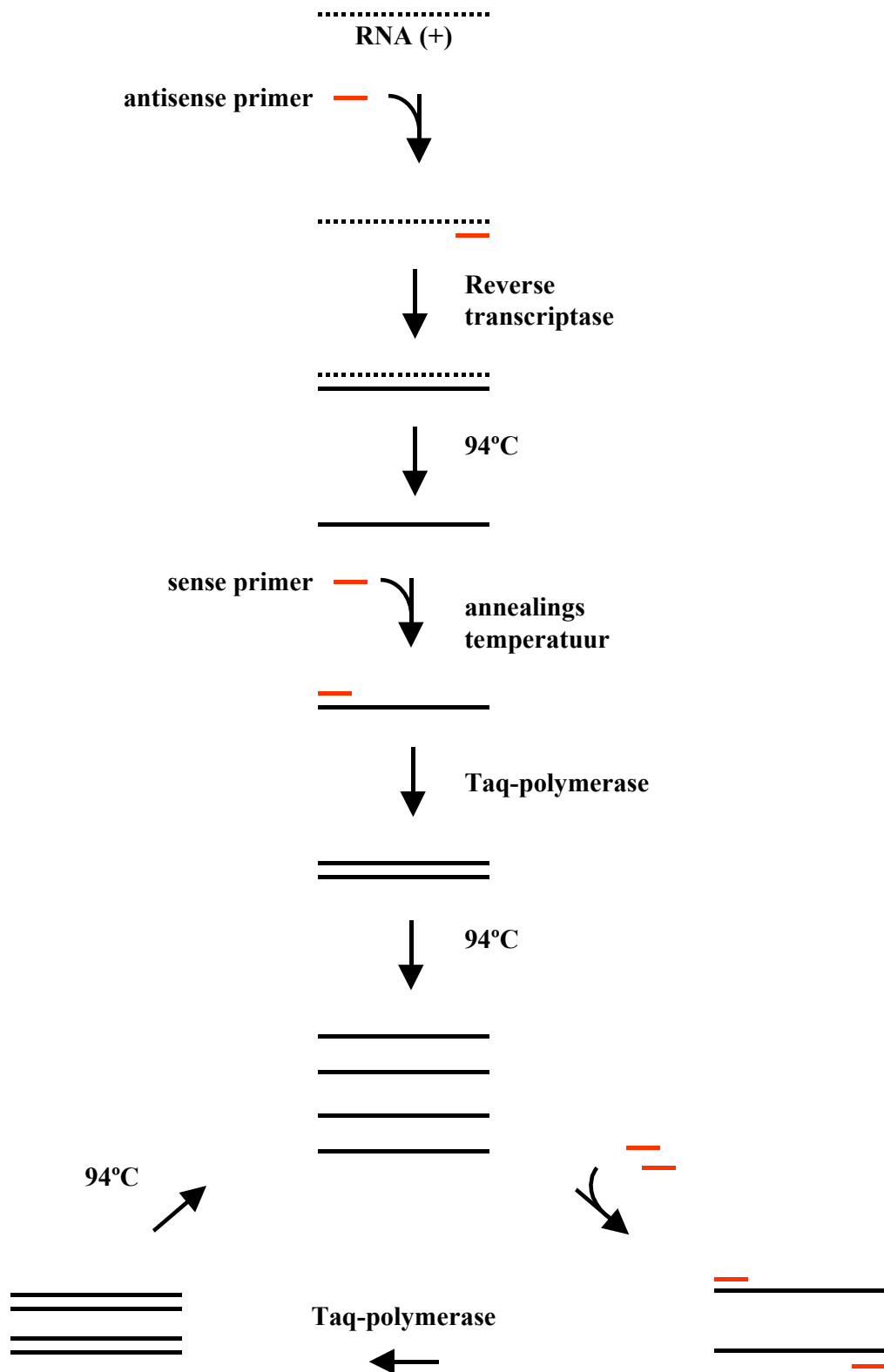
blijven. In Nederland circuleren het hele jaar door enterovirussen in de populatie met in de zomer pieken van ernstigere ziektegevallen (Havelaar *et al.*, 1993b). Toch worden in water juist in de winter hogere aantallen enterovirussen gevonden, doordat ze bij de lagere temperaturen en verminderd UV licht langer in leven blijven in water.

Tabel 5: Humaan pathogene virussen van de Picornaviridae familie.

<u>Diarree (gastro-enteritis)</u>	<u>Hersenvliesontsteking (meningitis)</u>
Coxsackievirus	Coxsackievirus
Echo-virus	Echo-virus
Poliovirus 1-3	Poliovirus 1-3
HAV	
	<u>Oogontsteking (conjunctivitis)</u>
<u>Verlamming (poliomyelitis)</u>	Echo-virus
Poliovirus 1-3	Coxsackievirus
<u>Geelzucht (hepatitis)</u>	<u>Huidaandoeningen (dermatitis)</u>
Hepatitis A-virus	Coxsackievirus

3.1 Aantonen van enterovirussen in water

Een eerste screening op aan- of afwezigheid van enterovirus in een watermonster wordt gedaan met behulp van de moleculair biologische techniek PCR (polymerase ketting reactie). Bij deze techniek wordt een specifiek stuk DNA geamplificeerd tot een detecteerbare hoeveelheid. Het virale genoom vormt de basis voor de PCR reactie. Omdat enterovirussen een RNA genoom bezitten, moet het RNA na isolatie eerst worden omgezet in een DNA kopie (cDNA). Hiervoor is het enzym reverse transcriptase (RT) nodig, dat vanaf een antisense primer een complementaire DNA kopie van het RNA maakt (zie Figuur 4). Het cDNA kan vervolgens worden vermenigvuldigd tot een detecteerbare hoeveelheid DNA met behulp van het enzym Taq-polymerase. Om het Taq-polymerase zijn werk te kunnen laten doen, moet de DNA-RNA duplex door verhitting tot 94 °C uitgesmolten worden, zodat enkelstrengs DNA ontstaat waarop een sense primer past. Om deze primer te laten binden dient de temperatuur verlaagd te worden tot een dusdanige temperatuur dat de primer specifiek aan zijn complementaire sequentie bindt. Dit is afhankelijk van de lengte van de primer en van de verhouding G, C en A, T nucleotiden. Vervolgens kan door het verhogen van de temperatuur tot 72 °C de Taq-polymerase vanaf de primer de DNA streng afmaken zodat dubbelstrengs DNA ontstaat. Door opnieuw te verhitten tot 94 °C kunnen de nieuw gevormde DNA strengen weer dienen als template voor een nieuwe amplificatieronde. Op deze manier worden miljoenen kopiën van het RNA gemaakt. Een schematische weergave van de RT-PCR reactie is te zien in Figuur 4.



Figuur 4: Schematische weergave van de RT-PCR reactie.

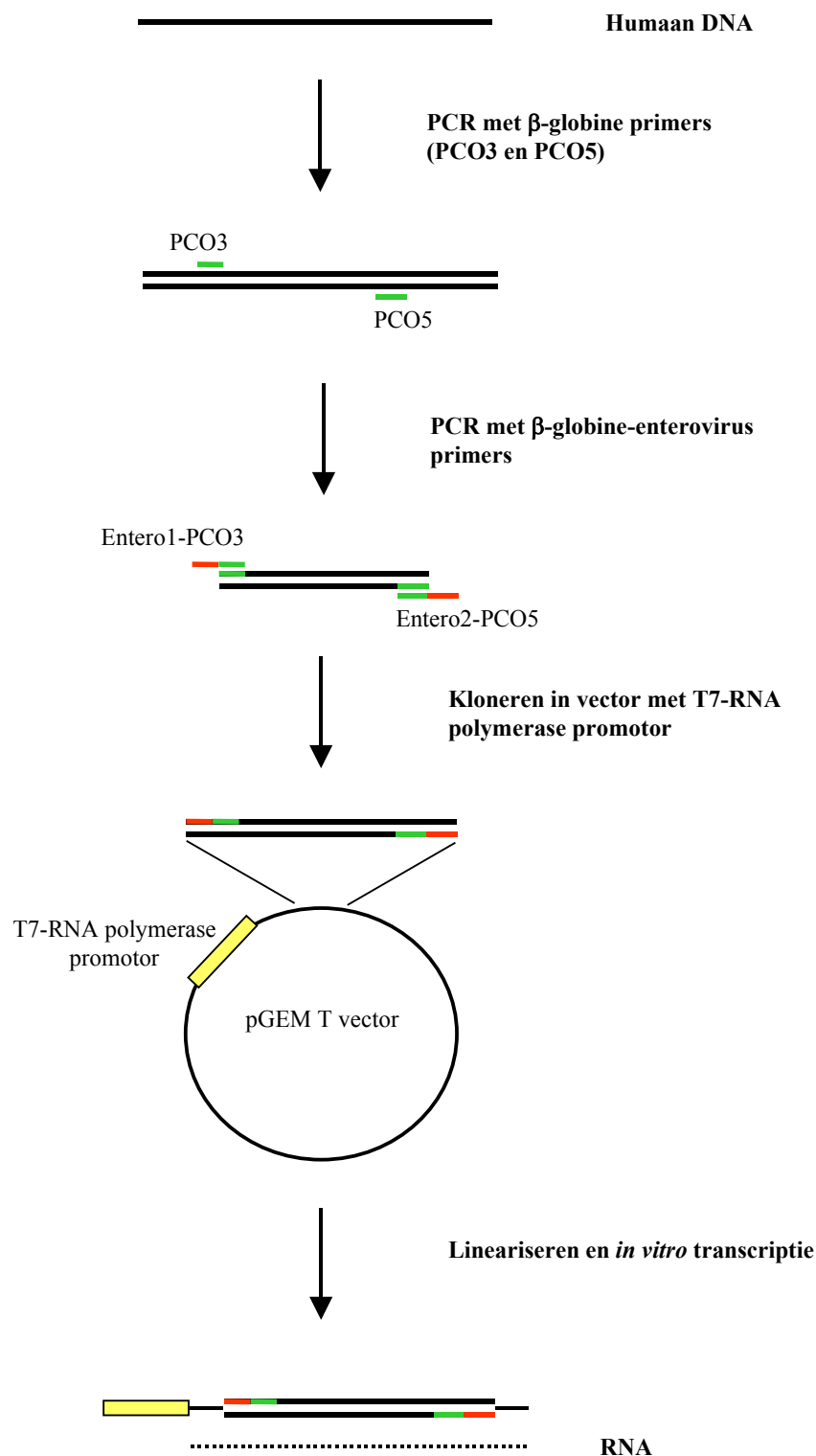
Na synthese van het cDNA in de RT-reactie wordt het cDNA geamplificeerd tot een detecteerbare hoeveelheid DNA in de PCR-reactie.

3.1.1 RNA isolatie

Om een RT-PCR te kunnen uitvoeren is het noodzakelijk om genomisch enterovirus RNA te isoleren. Voor de isolatie zou concentraat genomen kunnen worden, zoals dat verkregen is voor de detectie van bacteriofagen, maar omdat met de concentratie van het virus ook factoren worden geconcentreerd die remmend werken op de moleculaire detectietechnieken, is de ultrafiltratiestap vervangen door een gemodificeerde twee-fasenscheiding (Pöyry *et al.*, 1988; Lodder *et al.*, 1999) die gebaseerd is op de selectieve verdeling van virussen tussen twee niet-mengbare fasen. Hiertoe wordt aan het eluaat 1% (w/v) Dextraan T40 toegevoegd en 10% (w/v) polyethyleenglycol (PEG) 6000, 0,2 M NaCl en 10 mM fosfaatbuffer (pH 7,2) waarna dit mengsel een uur bij 4 °C wordt geschud. Vervolgens wordt het monster in een scheidtrechter overnacht bewaard bij 4 °C, zodat de scheiding in twee fasen op kan treden. Na deze scheiding bevinden de virusdeeltjes zich in de onderste fase en interfase, die verder geconcentreerd worden met behulp van spin-kolom-gel-chromatografie en centricon-ultrafiltratie. Uit dit ultrafiltraat wordt uiteindelijk het virale RNA geïsoleerd door middel van silica extractie. Per 1 ml monster wordt 0,56 g guanidinium isothiocyanaat (GuSCN), 92,8 µl 1M Tris (pH 6,4) en 81,6 µl 1 M EDTA toegevoegd, waarin de virusdeeltjes gelyseerd worden en het vrijgekomen virale RNA vervolgens kan binden aan de silica. Na verschillende wasstappen met lysis buffer, ethanol en aceton wordt het RNA geëluëerd en gebruikt voor verdere analyse in de RT-PCR (Boom *et al.*, 1990).

3.1.2 Semi-kwantitatieve RT-PCR

Voor de detectie van enterovirussen wordt een semi-kwantitatieve RT-PCR uitgevoerd. Hiertoe wordt het geïsoleerde RNA verdund in tienvoudige stappen tot 10^{-5} en wordt in elke verdunning bepaald of enterovirus RNA aangetoond kan worden. De RT-PCR wordt uitgevoerd met primers Entero1 en Entero2 (Tabel 6), waarmee een stuk RNA uit de geconserveerde 5'-UTR geamplificeerd wordt (Figuur 3). Met het concentreren van virussen in water kunnen tevens stoffen geconcentreerd worden die een remmende werking hebben op de RT-PCR. Dit heeft tot gevolg dat bij een negatief signaal geen onderscheid gemaakt kan worden tussen een echt negatief monster en een negatief signaal door de aanwezigheid van inhibitors. Daarom wordt een controle RNA toegevoegd aan elke RT-PCR reactie, die door dezelfde primers geamplificeerd wordt als het virale RNA. Vaak worden RNAs gebruikt die coderen voor veel voorkomende humane genen zoals β -globine, waaraan de primersequenties van het te detecteren RNA gezet worden met behulp van recombinant DNA technieken (Figuur 5) (De Roda Husman *et al.*, 1995). Met behulp van het enzym T7-RNA polymerase wordt RNA verkregen, wat aan de RT-PCR reactie kan worden toegevoegd. Op die manier wordt zowel een controle ingebouwd voor de RT-reactie als voor de PCR-reactie. Indien het controle RNA geen signaal geeft, kan hieruit geconcludeerd worden dat inhibitors van de RT-PCR aanwezig zijn in het monster. De remming op de RT-PCR reactie kan worden voorkomen door het RNA van het monster verder te verdunnen, zodat de concentratie van de inhibitors verlaagd wordt, maar daarmee ook de gevoeligheid van de reactie.



Figuur 5: Synthese van het interne controle RNA.

Een deel van het β -globine gen wordt geamplificeerd met behulp van 2 specifieke primers. Vervolgens wordt een tweede PCR uitgevoerd met gecombineerde β -globine primers en virusspecifieke primers. Het resulterende β -globine DNA, wat geflankeerd wordt door virusspecifieke primersequenties, kan nu gekloneerd worden in een vector met een T7-RNA polymerase promotor sequentie. Na linearisatie van het DNA kan met behulp van het enzym T7-RNA polymerase het interne controle RNA gesynthetiseerd worden.

Tabel 6: Primer sequenties Enterovirus PCR.

Primers en probes ¹	Sequentie	Locatie
Entero 1	CCTCCGGCCCCTGAATG	451-467
Entero 2	ACCGGATGGCCAATCCAA	629-646
Probe	TACTTTGGGTGTCCGTGTTTC	549-569
Entero1-PCO3	CCTCCGGCCCCTGAATGACACA ACTGTGTCTCACTA GC	
Entero2-PCO5	ACCGGATGGCCAATCCAAGAA ACCCAAGAGTCTT CTCT	

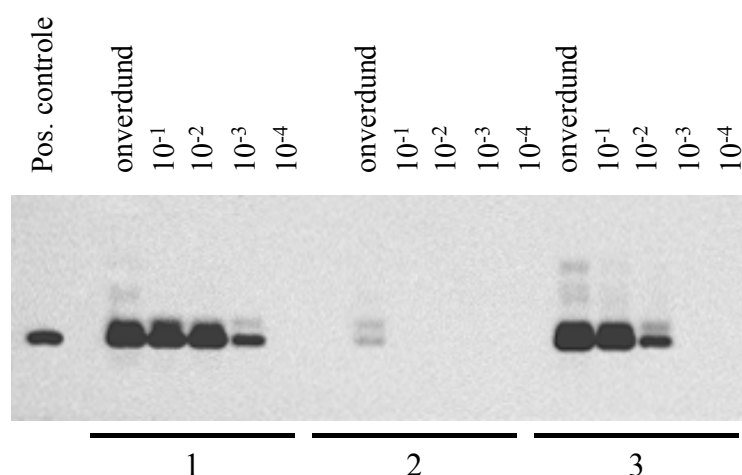
¹ Schwab *et al.*, 1995

3.1.3 Detectie van RT-PCR producten

De verkregen PCR producten worden geanalyseerd door middel van agarosegel-electroforese. Hierbij worden nucleïnezuren gescheiden op grootte, waarbij de kleinste DNA fragmenten het snelst door de gel bewegen en daarom gescheiden worden van de grotere producten die langzamer door de gel bewegen. De producten worden vervolgens zichtbaar gemaakt door kleuring met SYBR-gold. Een groot nadeel van deze methode is dat het geen specifieke enteroviruskleuring is, maar dat alle nucleïnezuren worden aangekleurd. Een specifiekere detectiemethode wordt verkregen door het DNA uit de gel over te brengen op een filter, waarna het DNA gedetecteerd kan worden door te hybridiseren met een specifieke probe (zie Tabel 6), die gelabeld is met een biotine-groep. De gehybridiseerde probe kan vervolgens zichtbaar gemaakt worden door het filter te incuberen met peroxidase-geconjugeerde streptavidine, wat aan de gebiotinileerde probe bindt. Door vervolgens de peroxidase gelabelde probe te incuberen met een geschikt substraat, zal een chemiluminescerend signaal ontstaan dat gedetecteerd kan worden (zie Figuur 6).

3.1.4 Berekenen van enterovirusconcentraties in water

De virusconcentratie in het onverdunde monster kan nu als 'meest waarschijnlijke aantal' (MWA) berekend worden door gebruik te maken van aan- of afwezigheid van een positief signaal in de verschillende verdunningen van het RNA. Aangenomen wordt dat de monsters die negatief zijn geen RNA bevatten. Door aan te nemen dat het virale RNA random in de oplossing verdeeld is, wordt het gebruik van een Poisson verdeling gerechtvaardigd en kan met behulp van de maximum likelihood methode het aantal deeltjes in het onverdunde RNA monster geschat worden (Mood *et al.*, 1974). Het aantal PCR detecteerbare units (pdu's) in het oorspronkelijke watermonster kan vervolgens berekend worden door dit aantal te delen door het onderzochte volume. Met behulp van viruskweek kan bepaald worden of het RNA afkomstig is van infectieuze virusdeeltjes.



Figuur 6: Semi-kwantitatieve enterovirus RT-PCR.

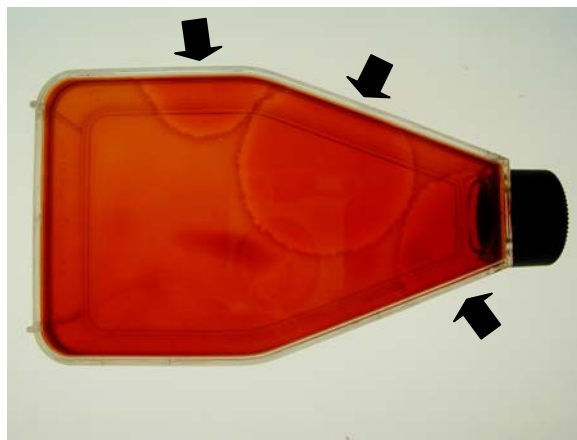
De RT-PCR is uitgevoerd op tienvoudige verdunningen van RNA, dat geïsoleerd is uit drie verschillende watermonsters. De RT-PCR producten zijn zichtbaar gemaakt door middel van filterhybridisatie met een specifieke probe.

3.1.5 Bepalen van het aantal infectieuze virusdeeltjes

Een aantal enterale virussen zijn kweekbaar doordat bepaalde cellijnen geïnfecteerd kunnen worden door deze virussen. Als het virus zich na infectie ook nog kan vermenigvuldigen in deze cellen, kan de cellijn gebruikt worden om aan te tonen of het RNA wat in de RT-PCR gedetecteerd is, afkomstig is van infectieus virus. Een geschikte cellijn voor het kweken van enterovirussen is de nierepitheel cellijn 'Buffalo Green Monkey' (BGM) (Dahling en Wright, 1986). Het concentraat, dat verkregen is na ultrafiltratie (zie § 2.2), wordt gebruikt om de hoeveelheid infectieus virus te bepalen. Per monster wordt in eerste instantie een proefenting gedaan om te beoordelen of het concentraat niet toxisch is voor de BGM cellen en of de hoeveelheid virus in het monster een telbaar resultaat oplevert. Voordat het concentraat van het monster geënt wordt, wordt geïncubeerd met een mix van antibiotica om eventueel aanwezige bacteriën, gisten en schimmels te inactiveren. Deze mix bestaat uit neomycine (10 mg/ml), penicilline (1675 U/mg), streptomycine (750 U/mg), kanamycine (748 µg/mg) en amphotericine B (250 µg/ml) en wordt een uur bij kamertemperatuur met het concentraat geïncubeerd. De proefenting houdt in dat drie kweekflessen van 75 cm² geënt worden met een totaal volume van 4,5 ml, wat bestaat uit 3,3 g concentraat en 1,2 ml antibiotica mix. De 4,5 ml wordt verdeeld over de drie kweekflessen met BGM cellen, die vier dagen voor de enting zijn ingezaaid met 2×10^4 cellen per cm². Nadat het concentraat en de mix van antibiotica twee uur bij kamertemperatuur op de cellen heeft gestaan, wordt 25 ml overlaymedium van 0,9% agar in Earle Medium 199 medium met 10% foetaal bovine serum op de cellen gegoten. Nadat de agar gestold is, worden de flesjes met de cellaag naar boven in een stoof van 37 °C gezet. Enterovirussen zullen zich na infectie van BGM cellen vermeerderen en de virussen die lytisch zijn zullen de cellen kapot maken. Door de agar

overlay worden alleen de buurcellen van een gelyseerde cel geïnfecteerd, die vervolgens na lysis ook weer hun buurcellen kunnen infecteren. De resulterende groep dode cellen kunnen vervolgens zichtbaar gemaakt worden door negen dagen na infectie de cellen te kleuren met 0,33 g/l neutraal rood in 15 ml gebufferde agar. Het neutraal rood wordt niet opgenomen door de dode cellen, zodat de plaatsen waar cellen gelyseerd zijn zichtbaar worden als lichte vlekken (plaques) in een rode achtergrond (zie Figuur 7). Bij elke enting worden standaard referentie virussen meegenomen om zo de gevoeligheid van de BGM cellen voor enterovirussen te kunnen beoordelen. Twee verschillende virusisolaten uit het ‘Voorns Kanaal’ in de provincie Zuid-Holland worden gebruikt als referentievirussen. Het eerste referentievirus is een enterovirus (Coxsackie B4) dat laat zien of de gevoeligheid

Enterovirus infectie



Negatieve controle



Figuur 7: Enterovirus plaque test.

Na incubatie van concentraat van watermonsters met antibioticamix is het mengsel geïncubeerd met BGM cellen in een 75cm² kweekfles en is de agar-overlay over de cellen gegoten. Nadat het geheel 9 dagen bij 37 °C heeft geïncubeerd is de tweede overlay met neutraal rood toegevoegd. De volgende dag zijn de plaques goed zichtbaar, doordat de levende cellen met neutraal rood zijn aangekleurd. De plaques met dode cellen zijn duidelijk zichtbaar als grote gaten in de monolayer van BGM cellen.

van de cellen voor enterovirussen constant blijft. Het tweede referentievirus is een Reovirus (type 3), dat erg kleine plaques geeft en bij een kleine verandering in gevoeligheid van de BGM cellen al snel een afwijkend aantal plaques zal geven. Beide referentievirussen worden wekelijks geënt op BGM cellen en de uitslagen worden bijgehouden op controle kaarten. Bij een eventuele afwijkende uitslag die buiten de toegestane grenzen valt, wordt de bepaling afgekeurd en moet de enting herhaald worden. Na een incubatie van tien dagen variëren de plaques in diameter van 1 tot circa 70 mm, waarbij plaques groter dan of gelijk aan 10 mm worden aangeduid als enterovirussen en plaques kleiner dan 10 mm als reovirussen. Aan de hand van het aantal virusplaques en het geanalyseerde volume kan de hoeveelheid infectieuze virusdeeltjes in het monster berekend worden. Afhankelijk van de resultaten van de proefenting wordt beoordeeld hoe de rest van het monster behandeld wordt. Als de proefenting een telbaar aantal plaques heeft opgeleverd binnen de grenzen van de test zullen de resultaten van de proefenting meegenomen worden in de berekening. Om een betrouwbare berekening te kunnen maken van het aantal virussen in het oorspronkelijke monster moet een hoeveelheid concentraat geënt worden, die minimaal 15 à 20 enterovirus plaques oplevert. Door het totale aantal plaques te delen door het aantal gram geënt concentraat wordt het aantal infectieuze virusdeeltjes per gram concentraat bepaald. Als dit getal gedeeld wordt door de concentratiefactor, levert dit het aantal infectieuze virusdeeltjes per liter oorspronkelijk watermonster op.

3.1.6 Typeren van enterovirussen

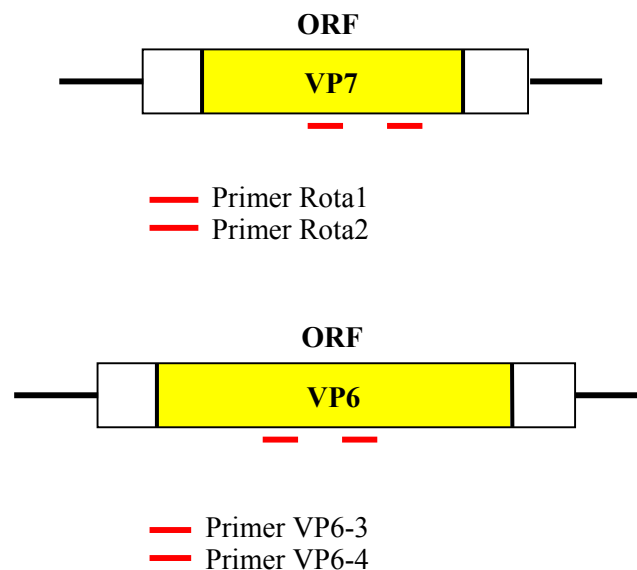
Uiteindelijk kunnen de plaque-vormende virussen op verschillende manieren getypeerd worden. Ten eerste kan een virus-neutralisatie assay worden uitgevoerd, waarbij serum van geïmmuniseerde paarden of apen wordt geïncubeerd met het virus. Als het virus vervolgens niet meer infectieus is, waren de antistoffen in het serum reactief met het virus, wat betekent dat neutraliserende antistoffen in het serum aanwezig waren. Omdat van elk serum bekend is tegen welk virustype het neutraliserende antistoffen bezit, kan zo worden afgeleid welk virus type aanwezig was (Van Olphen *et al.*, 1984). Een methode die we tegenwoordig gebruiken voor het typeren van virussen is het bepalen van de basevolgorde van het RNA (sequenzen). Hiervoor zal een RT-PCR product gekloneerd moeten worden om zo van een kloon de sequentie te kunnen bepalen. Direct sequenzen van het PCR product uit watermonsters zal niet altijd goed gaan, omdat in tegenstelling tot wat vaak het geval is bij de mens in water meerdere stammen naast elkaar kunnen voorkomen vanuit verschillende gastheren. Als verschillende DNAs in een monster gesequenced worden zullen dus meerdere sequentie-reacties door elkaar heen lopen, wat een niet-leesbaar resultaat oplevert.

4. Rotavirus en norovirus

Uit onderzoek naar de verwekkers van gastro-enteritis in feces van patiënten blijkt dat calicivirussen en rotavirussen tot de belangrijkste gastro-enteritis verwekkers in Nederland behoren. Calicivirussen komen epidemisch voor door het optreden van explosies als gevolg van persoon-tot-persoon transmissie of via besmet voedsel. In tegenstelling tot enterovirus laat rotavirus juist een duidelijke winterpiek zien.

4.1 Rotavirus

Rotavirus behoort tot de familie van de *Reoviridae*. Het virus heeft geen envelop en is 70 nm in diameter. Het capsid is opgebouwd uit een dubbele eiwit mantel, waarbij de buitenste laag is samengesteld uit de structurele eiwitten VP4 en VP7 en de binnenste laag voornamelijk uit VP6. Het rotavirus genoom is opgebouwd uit 11 segmenten van dubbelstrengs RNA en is in totaal 16 tot 21 kbp. Elk gensegment codeert voor één van de structurele of niet-structurele eiwitten (Estes en Cohen, 1989) (zie Figuur 8).



Figuur 8: Schematische weergave van twee rotavirusgenoom segmenten, 9 en 6.

De andere 9 genoomsegmenten zijn opgebouwd op dezelfde wijze, maar hebben een ander coderend gedeelte. De locatie van de rotavirus primers, Rota1 en Rota2 op VP7, en VP6-3 en VP6-4 op VP6, is weergegeven in rood.

De familie van de *Reoviridae* bestaat uit verschillende genera, waarvan van twee typen bekend is dat ze wateroverdraagbaar zijn; orthoreovirus en rotavirus. Hoewel de meeste infecties met wateroverdraagbare reovirussen asymptomatisch verlopen, kan type 1 pathogeen zijn voor de mens (Johansson *et al.*, 1996). Rotavirus wordt geclassificeerd in groepen, subgroepen en serotypes overeenkomend met antigene eigenschappen van de

capside eiwitten. Het VP6 eiwit bepaalt de indeling in groepen. Momenteel bestaan er zeven groepen, A tot-en-met G genaamd, en twee subgroepen, I en II (Estes en Cohen, 1989). Groep A, B en C zijn infectieus in mensen. Classificatie in serotypes is gebaseerd op antigenen verschillen tussen de capsid eiwitten VP4 en VP7. Reactiviteit met VP4 leidt tot serotype P classificatie en reactiviteit met VP7 tot serotype G classificatie (Estes en Cohen, 1989). Momenteel zijn er 15 G-types bekend, waarvan G1, G2, G3 en G4 wereldwijd het meest voorkomen.

4.1.1 Aantonen van rotavirussen

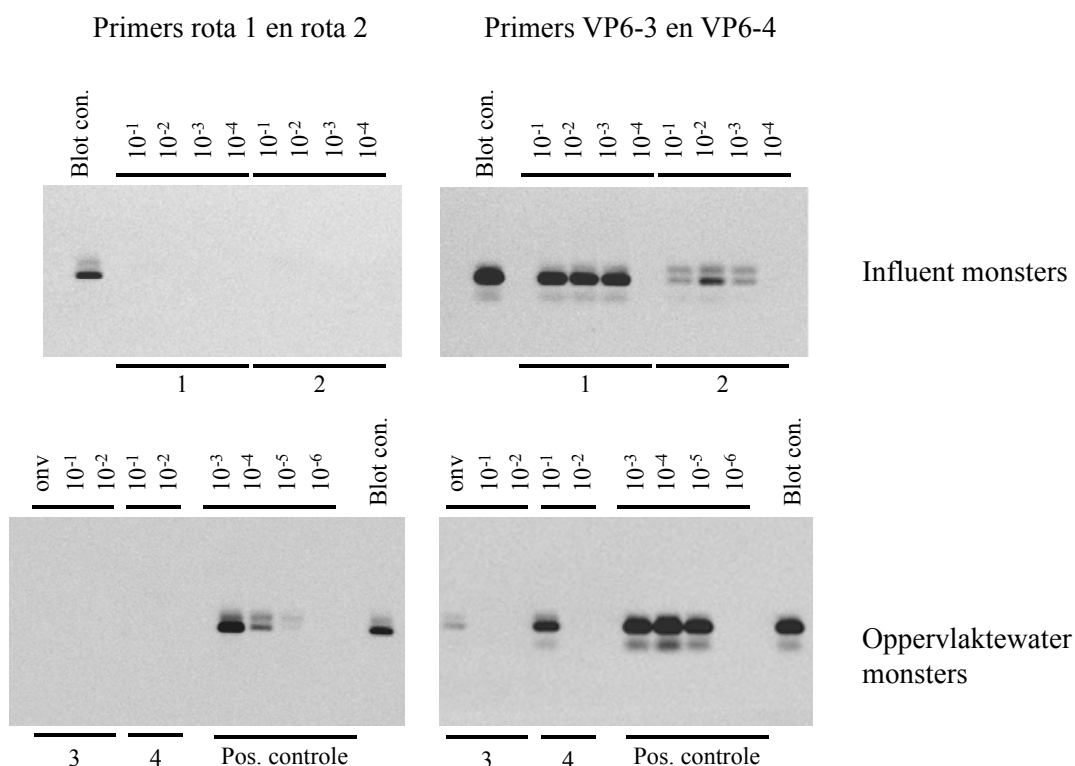
Rotavirussen kunnen gedetecteerd worden met behulp van immunoassay methoden, zoals ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) of latex agglutinaties (Mathewson *et al.*, 1989), met behulp van elektronenmicroscopie (EM) of door middel van moleculair biologische technieken. Omdat met behulp van laatstgenoemde techniek de lage virusconcentraties in water aangetoond kunnen worden en rotavirussen moeilijk te kweken zijn, gebruiken wij de semi-kwantitatieve RT-PCR om rotavirus te detecteren. Hiertoe wordt op dezelfde manier RNA geïsoleerd als is beschreven voor enterovirus. Voor de semi-kwantitatieve methode worden weer tienvoudige verdunningsstappen gemaakt tot 10^{-5} en wordt tevens een interne RNA controle toegevoegd vergelijkbaar met de interne controle voor de enterovirus RT-PCR. Nu wordt echter een deel van het β -globine gen geamplificeerd met rotavirus specifieke primers (Tabel 7). In eerste instantie is een RT-PCR protocol gebruikt zoals is beschreven door Husain *et al.* (1995) (Tabel 7). In deze PCR zijn primers Rota 1 en Rota 2 (Husain *et al.*, 1995) gebruikt, waarmee een stuk DNA van 293 nucleotiden uit gensegment 9 (VP7) geamplificeerd werd. De RT-PCR producten zijn geanalyseerd door middel van agarosegel-electroforese gevolgd door hybridisatie met een gelabelde, specifieke

Tabel 7: Primer sequenties Rotavirus PCR.

Primers en probes	Sequentie	Locatie
Rota 1 ¹	GATCCGAATGGTTGTGTAATCCAAT	531-550
Rota 2 ¹	AATTCGCTACGTTTTCTCTTGG	824-808
Probe VP7 ^{1,*}	CRAAYAARTGGATATCRATGGG	590-611
VP6-3 ²	GCTTTAAAACGAAGTCTTCAAC	2-23
VP6-4 ²	GGTAAATTACCAATTCCTCCAG	166-187
Probe ²	CAATGATAGTTACTATGAATGG	129-151
VP6-3-PCO3	GCTTTAAAACGAAGTCTTCAACACACAACTGTGTTC ACTAGC	
VP6-4-PCO5	GGTAAATTACCAATTCCTCCAGGAAACCCAAGAGT CTTCTCT	

¹Husain *et al.*, 1995, ²Villena *et al.*, 2003, * Y = C of T, R = A of G

probe (Tabel 7). Omdat deze primerset niet altijd even goede resultaten opleverde voor rotavirusdetectie in water, zijn deze primers vergeleken met een nieuw beschreven set primers, VP6-3 en VP6-4 (Villena *et al.*, 2003), waarmee 185 nucleotiden uit gensegment 6 (VP6) geamplificeerd worden. Primers VP6-3 en VP6-4 lijken inderdaad beter geschikt voor rotavirus bepaling in watermonsters (Figuur 9), zodat per april 2002 de keuze gemaakt is om deze primers te gaan gebruiken. De virusconcentraties kunnen weer berekend worden door aan- of afwezigheid van signaal in een bepaalde verdunning van de verdunningsreeks van het RNA.



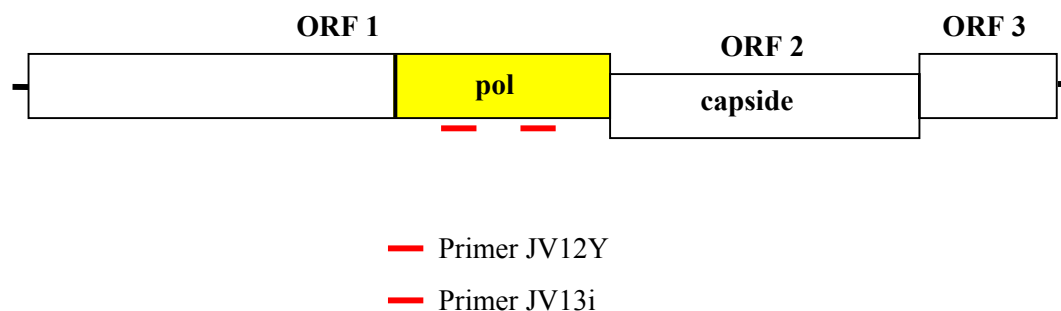
Figuur 9: Semi-kwantitatieve rotavirus RT-PCR.

Vergelijking van de RT-PCR met Rota1 en Rota2 primers (Husain *et al.* 1995) en VP6-3 en VP6-4 (Villena *et al.* 2003). De RT-PCR is uitgevoerd op tienvoudige verdunningen van het uit influent monsters (nummer 1 en 2) of oppervlaktewater monsters (nummer 3 en 4) geïsoleerd RNA. Ook is een positieve controle meegenomen voor de RT-PCR (pos. controle) en zijn blot controles meegenomen. De RT-PCR producten zijn zichtbaar gemaakt door middel van filterhybridisatie met een specifieke probe.

4.2 Norovirus

Norovirussen behoren tot de familie van de *Caliciviridae*. Het virusdeeltje is opgebouwd uit een enkel structureel capsid eiwit. De partikels variëren in grootte van 30 tot 38 nm in

diameter. Het genoom bestaat uit een enkelstrengs, positief strengig RNA van 7,3 tot 7,7 kbp en is voor norovirussen opgebouwd uit drie 'open reading frames' (ORFs). ORF 1 codeert voor de niet-structurele eiwitten, zoals het RNA afhankelijke RNA polymerase en helicase, ORF 2 codeert voor het structurele capsid eiwit en ORF 3 codeert voor een klein eiwit waarvan de functie onbekend is (Redman *et al.*, 1997) (zie Figuur 10).



Figuur 10: Schematische weergave van het NLV-genoom.

De locatie van de norovirus primers JV12 en JV13, waarmee een deel van het polymerase gen geamplificeerd wordt, is weergegeven in rood.

Op grond van genetische variaties kunnen de humane norovirussen onderverdeeld worden in twee verschillende genogroepen, GGI en GGII. Genogroepen zijn weer onderverdeeld in genotypen. Tot genogroep GGI behoren zeven genotypen, waaronder het originele Norwalk virus (genotype I.1) (Kapikian *et al.*, 1972), genoemd naar de plaats waar de eerste *Calicivirus* uitbraak plaatsvond. Ook het Southampton virus type behoort tot genogroep I (genotype I.2) (Lambden *et al.*, 1993; Wang *et al.*, 1994). Tot genogroep II behoren onder andere de genotypen Hawaii (GGII.1) (Thornhill *et al.*, 1977; Wyatt *et al.*, 1974) en Toronto (GGII.3) (Lew *et al.*, 1994).

4.2.1 Aantonen van norovirus

Net als entero- en rotavirus wordt ook norovirus met een semi-kwantitatieve RT-PCR aangetoond. RNA wordt op dezelfde manier geïsoleerd als is beschreven voor enterovirus. Voor norovirusdetectie zijn in eerste instantie primers JV12a en JV13b gebruikt (Tabel 8), maar uit een vergelijking van een aantal norovirussequenties bleek dat door kleine modificaties van deze primersequenties de gevoeligheid verhoogd zou kunnen worden (Vennema *et al.*, 2002). Daarom is de JV12 primer op positie 19 veranderd, wat resulteert in primer JV12Y met een C of een T op deze positie (Tabel 8). In primer JV13b is de A op positie 18 vervangen door I (Inosine), wat niet alleen een basepaar kan vormen met T maar met alle vier de nucleotiden. Met deze gemodificeerde primersets worden inderdaad meer feces samples positief getest voor norovirus (Vennema *et al.*, 2002), zodat voor norovirusdetectie in water per februari 2002 eveneens deze gemodificeerde primers worden gebruikt. Voor de semi-kwantitatieve bepaling van het aantal norovirus RNA deeltjes wordt het geïsoleerde RNA verdund tot 10^{-5} in tienvoudige verdunningsstappen en wordt aan elke

verdunding weer een interne controle toegevoegd, vergelijkbaar met de interne controle voor de enterovirus RT-PCR. Nu wordt echter een deel van het β -globine gen geamplificeerd met norovirus specifieke primers (Tabel 8). De uiteindelijke RT-PCR producten worden weer geblot en gehybridiseerd. Om zoveel mogelijk verschillende subtypes te detecteren wordt voor de hybridisatie gebruik gemaakt van een hybridisatiemix met vier verschillende detectie probes (Tabel 8). Uiteindelijk kunnen de virusconcentraties berekend worden zoals dit ook voor entero- en rotavirus gedaan wordt.

Naast het aantonen van de hoeveelheid viraal RNA is het ook mogelijk om norovirussen te typeren. Hiertoe worden de RT-PCR producten gekloneerd en vervolgens gesequenced. Het kloneren van norovirus DNA voor het bepalen van de sequentie is noodzakelijk omdat in watermonsters verschillende stammen naast elkaar kunnen voorkomen, wat een onleesbaar resultaat van de sequentiereactie kan opleveren. Door meerdere klonen van een watermonster te sequencen kan bepaald worden welke stammen zich in het watermonster bevinden (Lodder *et al.*, 1999).

Tabel 8: Primer sequenties norovirus PCR.

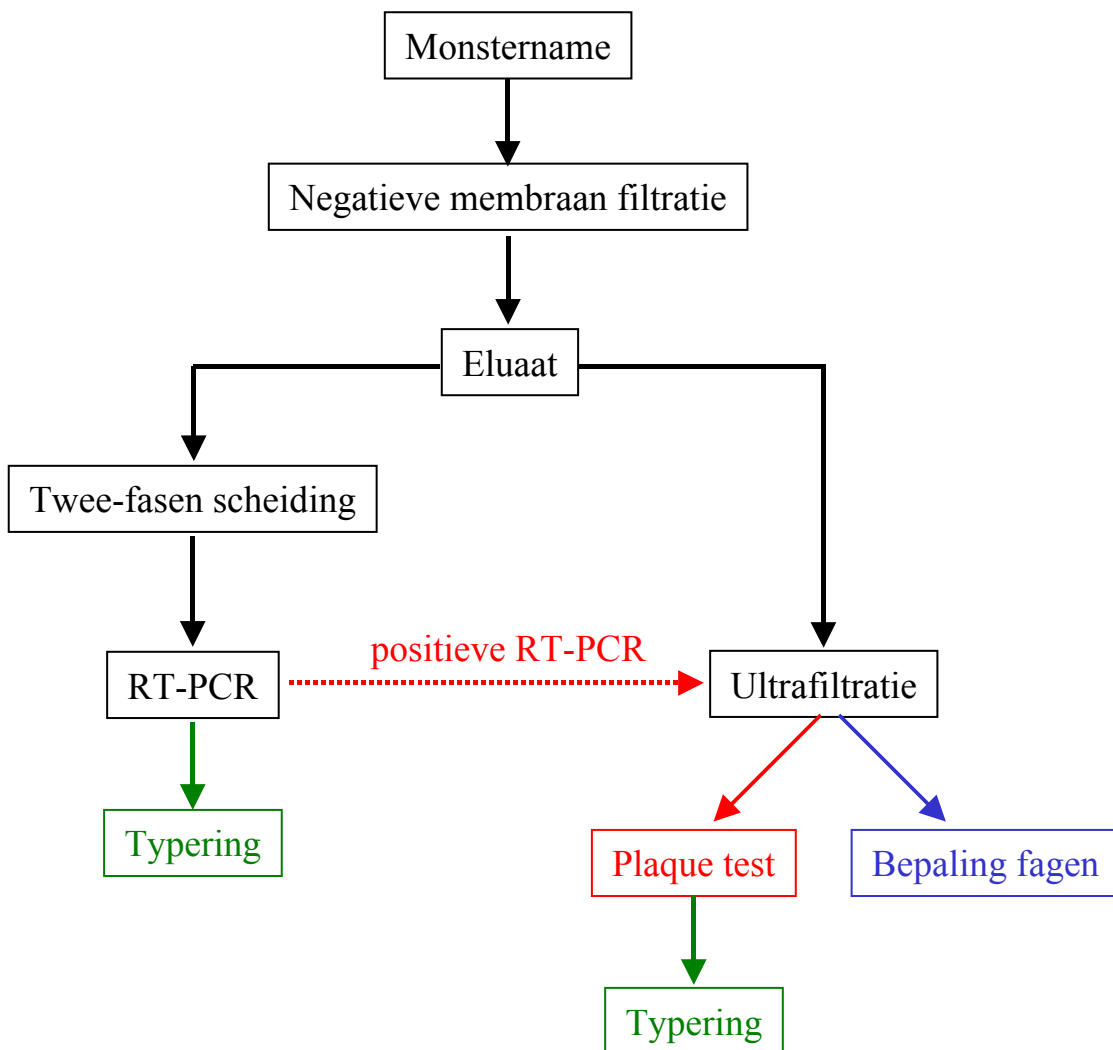
Primers en probes	Sequentie	Locatie
JV12a ¹	ATACCACTATGATGCAGATTA	4279-4299
JV13b ¹	TCATCATCACCATAGAAAGAG	4585-4605
JV12Y* ²	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4279-4299
JV13i ^{§,2}	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4585-4605
Probe UK-3	GTCCCCTGACATCATAACAGGCT	4552-4573
Probe JV-5	CTCACCAGAGGTTGTCCAAGC	4344-4365
Probe GG-I*	ATGGAYGTTGGYGAYTATGT	4424-4443
Probe GG-II* [#]	GAAYTCCATCRCCCAYTG	4495-4512
JV12-PCO3	ATACCACTATGATGCAGATTAACACA ACTGTGTT CACTAGC	
JV13-PCO6	TCATCATCACCATAGAAAGAGGAA ACCCAAGAG TCTTCTCT	

¹ Vinje *et al.*, 1997, ² Vennema *et al.*, 2002, * Y = C of T, [§] I = Inosine, [#] R = A of G

5. Discussie

Infectieziekten zoals gastro-enteritis komen veelvuldig voor (de Wit *et al.*, 2001a) en kunnen veroorzaakt worden door verschillende micro-organismen, waaronder virussen. Wat het aandeel is van wateroverdraagbare virussen in het veroorzaken van gastro-enteritis is niet bekend, maar een recente uitbraak van norovirus in een speelfontein in Bokrijk (Hoebe *et al.*, 2002; Hoebe *et al.*, 2003) en een besmetting met verscheidene virussen in met huishoudwater verontreinigd drinkwater in de Utrechtse wijk Leidse Rijn (Fernandes *et al.*, 2003) bevestigen dat overdracht via water inderdaad ziekte veroorzaakt. Het is daarom van belang te testen op een aantal in Nederland veel voorkomende humaan pathogene virussen. In dit rapport is beschreven welke virussen bepaald kunnen worden in watermonsters en welke methoden hiervoor gebruikt worden binnen het Microbiologisch Laboratorium voor Gezondheidsbescherming (MGB) van het RIVM.

Om een schatting van het infectierisico uit te kunnen voeren, moet de microbiologische kwaliteit van het drinkwater worden vastgesteld. Vanwege de lage concentraties virussen in het drinkwater worden virussen aangetoond in de grondstof waaruit drinkwater geproduceerd wordt. Vervolgens wordt de efficiëntie van de zuivering bepaald door van verschillende stadia in het zuiveringsproces monsters te nemen en het aantal bacteriofagen hierin te bepalen als indicator voor virussen. Uit deze gegevens kan vervolgens berekend worden hoeveel virus uiteindelijk in het drinkwater aanwezig is. Een schematische weergave van de procedure staat weergegeven in Figuur 11. Om virussen te kunnen detecteren in de watermonsters is het nodig de virussen in het water te concentreren. Dit gebeurt door middel van filtratie door negatief geladen membranen. Het virus dat aan het membraan gebonden is wordt geëluëerd. Een derde deel van het eluaat wordt opgewerkt door middel van de twee fasen scheidingsmethode om met behulp van RT-PCR virussen te kunnen detecteren. De rest van het eluaat wordt door middel van ultrafiltratie verder geconcentreerd, waarna in het concentraat het aantal fagen bepaald wordt om uiteindelijk de zuiveringsefficiëntie te kunnen berekenen. Indien de enterovirus RT-PCR een positief signaal geeft kan met behulp van viruskweek op BGM cellen het aantal infectieuze virusdeeltjes bepaald worden in het concentraat met behulp van een plaquetest. De detectie van rota- en norovirus is nog te prematuur om deze virussen in een schatting van het infectierisico mee te nemen, omdat het aantal infectieuze virusdeeltjes nog niet bepaald kan worden. Het aantal RNA deeltjes kan voor deze virussen wel bepaald worden door middel van de semi-kwantitatieve RT-PCR. De behoefte aan een bepaling waarin het aantal infectieuze virusdeeltjes bepaald kan worden blijkt uit het feit dat het aantal PCR-bare norovirusdeeltjes regelmatig een factor 1.000 tot 10.000 hoger is in oppervlakte water dan het aantal infectieuze enterovirusdeeltjes. Als een groot deel van de met RT-PCR gedetecteerde norovirussen infectieus blijkt te zijn, heeft dit grote gevolgen voor het infectierisico, waardoor hogere eisen aan de drinkwaterzuiveringsprocessen moeten worden gesteld.



Figuur 11: Overzicht van de virus- en bacteriofaagbepalingen die uitgevoerd worden op watermonsters.

Bacteriofaagbepalingen worden uitgevoerd om hiermee de efficiëntie van de zuivering te bepalen. De RT-PCR wordt gedaan om aan- of afwezigheid van virus in het watermonster te bepalen.

Enteroviruskweek op BGM cellen wordt alleen gedaan in het geval van een positieve RT-PCR, om te bepalen of het gedetecteerde RNA afkomstig is van infectieus virus.

5.1 Voor- en nadelen van huidige detectie technieken

5.1.1 Viruskweek technieken

Moleculaire methoden zijn door vermeerdering van het aan te tonen virus-RNA erg gevoelig en specifiek. Met behulp van moleculaire detectie is echter onduidelijk of de aangetoonde virusdeeltjes infectieus zijn en dus mogelijk ziekteverwekkend voor de mens. In

verschillende publicaties is aangetoond dat virusdeeltjes die niet meer infectieus zijn, nog steeds aantoonbaar zijn met RT-PCR (Gantzer *et al.*, 1998; Enriquez *et al.*, 1993; Sobsey *et al.*, 1998). Om de RT-PCR gegevens te kunnen gebruiken voor de schatting van een infectierisico zou de verhouding tussen het aantal infectieuze virusdeeltjes en het aantal genomen bepaald moeten worden. Dit wordt momenteel onderzocht voor verschillende enterovirussen onder verschillende condities. Ook is van belang of deze verhouding constant of variabel is en van welke factoren dit afhankelijk is. Aangezien voor humane calicivirussen, zoals norovirussen (Duizer *et al.*, 2004), geen celkweektechnieken beschreven zijn, kan deze ratio niet bepaald worden voor deze virussen. Het kweken van animale calicivirussen is echter wel mogelijk en kan gebruikt worden als indicator voor de levensvatbaarheid van humane calicivirussen. Voor rotavirussen zouden dergelijke kweekmethoden kunnen worden ontwikkeld, aangezien publicaties over gevoelige cellijnen inmiddels verschenen zijn. Of dit tot betrouwbare plaque methoden zal kunnen leiden zoals voor enterovirussen met BGM cellen het geval is, zal nog moeten blijken, aangezien niet elke cellijn geschikt is om in het strikte monolayer plaque assay regime te passen. Een goed alternatief is de zogenaamde celkweek-PCR methode waarbij na één of twee replicatiecycli in infecteerbare cellen een PCR wordt uitgevoerd voor snelle en gevoelige detectie van infectieuze virussen in water (Greening *et al.*, 2002). De kans is echter aanwezig dat naast gerepliceerd viraal RNA ook RNA gedetecteerd wordt van aan het celoppervlak gebonden niet-infectieus virus, dat wordt meegeïsoleerd. Om deze mogelijke detectie van niet-infectieus virus te omzeilen, zou een RT-PCR ontwikkeld kunnen worden waarmee niet het genomisch RNA van bijvoorbeeld enterovirus geamplificeerd wordt, maar de negatieve RNA streng die alleen tijdens een replicatiecyclus van het virus in de cel aanwezig is. Een soortgelijk principe is reeds beschreven voor adenovirus, waarbij mRNA geamplificeerd wordt dat alleen in geïnfecteerde cellen aanwezig is (Ko *et al.*, 2003). Een nadeel van de celkweek-PCR is dat het geen kwantitatieve gegevens opleverd, wat voor een plaquetest wel het geval is.

Een ander nadeel van viruskweekmethodes is dat niet alle virussen even goed een bepaalde cellijn kunnen infecteren. Van de gebruikte cellijn moet daarom nauwkeurig beschreven zijn welke virussen de cellen kunnen infecteren. Voor de BGM cellijn is beschreven dat deze geïnfecteerd kan worden met verschillende enterovirussen, te weten coxsackievirustypen A7, A9, A16 en B1-5, echovirustypen 2, 4, 5, 7, 11-15, 17, 19, 21, 24, 25, 27 en poliovirussen 1-3, en reovirussen 1-3 (Dahling and Wright, 1986). Voor rotavirus wordt momenteel door ons een dergelijke assay ontwikkeld met een cellijn die gevoelig is voor rotavirusinfectie. Voor elke cellijn die gebruikt gaat worden om het aantal RNA virusdeeltjes uit de PCR te vertalen naar de hoeveelheid infectieus virus zou zo nauwkeurig mogelijk moeten worden uitgezocht welke verschillende virussen die cellijnen kunnen infecteren, zodat precies bekend is welke virussen gedetecteerd kunnen worden in het kweekstelsel en welke virussen gemist zullen worden in de analyse. Door de gekweekte virussen te typeren kan uiteindelijk bepaald worden welke virussen kunnen groeien op de gebruikte cellijn.

Zowel het virus in een plaque na het uitvoeren van een plaque assay als het DNA wat in een RT-PCR gemaakt is kan gebruikt worden om virus te typeren. In het eerste geval kan bijvoorbeeld een neutralisatietest uitgevoerd worden om zo te bepalen welk virus type er in de oorspronkelijke plaque aanwezig was (Van Olphen *et al.*, 1984). In het tweede geval kan

het PCR product gekloneerd worden, waarna van de resulterende klonen uiteindelijk de basevolgorde bepaald kan worden door te sequencen (Lodder *et al.*, 1999). Virustypering kan van belang zijn bij het maken van een schatting van het infectierisico. De dosis-respons relaties van verschillende enterovirussen vertonen grote variatie, wat inhoudt dat niet elke enterovirusinfectie hetzelfde infectierisico met zich mee brengt (De Roda Husman *et al.*, 2004). Een andere reden om te typeren is het verschil in ziekteverloop. Infectie met bijvoorbeeld Coxsackievirus B6 verloopt symptomeloos, terwijl infectie met poliovirus zelfs verlamingsverschijnselen tot gevolg kan hebben (Pallansch en Roos, 2001). Infectie met een poliovirus zou daarom zwaarder moeten wegen bij de normstelling dan infectie met Coxsackievirus B6. Hiertoe zou de basis voor normstelling niet het infectierisico maar de ziektelast moeten zijn. Binnenkort verschijnt een nieuwe editie van de WHO guidelines for Drinking-Water Quality waarin deze benadering wordt voorgesteld (Havelaar en Melse, 2003).

5.1.2 Moleculaire detectiemethoden

Hoewel moleculaire detectiemethoden erg gevoelig zijn, zien we dat er bij de eerder beschreven RNA isolatiemethoden remmende factoren mee geïsoleerd worden, die een nadelig effect hebben op de gevoeligheid van de bepaling. Met name RNA dat geïsoleerd is uit een groot volume monster (600 liter en meer) moet soms zelfs 10^2 of 10^3 keer verdund worden om te kunnen worden geamplificeerd in een RT-PCR reactie. De aanwezigheid van dergelijke remmende factoren komt de gevoeligheid van de RT-PCR niet ten goede. Verdere optimalisatie van RNA isolatiemethoden uit watermonsters, waarbij minder remmende factoren worden geïsoleerd, zou een gunstig effect kunnen hebben op de gevoeligheid van de reactie.

Om te controleren op de aanwezigheid van remmende factoren in de RT-PCR wordt een interne controle aan het te analyseren RNA toegevoegd. De in dit rapport beschreven interne controle is een deel van het β -globine mRNA, wat geflankeerd wordt door de primers waarmee amplificatie van het virale RNA plaatsvindt (zie Figuur 5). De interne controle wordt geamplificeerd met dezelfde primerset als het te analyseren virale RNA. Het interne controle RNA wordt in een zodanige hoeveelheid toegevoegd, dat de amplificatie van dit controle RNA niet ten koste gaat van het amplificatie signaal van het virale RNA. Het RNA van de interne controle wordt momenteel toegevoegd aan het te analyseren RNA, zodat zowel de RT-reactie als de PCR-reactie gecontroleerd worden. Het is echter ook mogelijk om een bepaalde hoeveelheid interne controle RNA toe te voegen aan het monster vóór RNA extractie. Op deze manier wordt tevens de efficiëntie van de RNA extractie inzichtelijker gemaakt. Ook de recovery van de totale procedure, inclusief filtratie door het negatief geladen membraan en de ultrafiltratie, is van belang voor de uiteindelijke omrekeningsfactor naar de virusconcentratie in het oorspronkelijke monster, en zou eigenlijk meegenomen moeten worden in de berekening.

Naast RT-PCR's voor entero-, rota- en calicivirussen zijn inmiddels ook RT-PCR's ontwikkeld om andere in water voorkomende humaan pathogene virussen te detecteren, zoals humane astrovirussen, adenovirussen, HAV en HEV. Deze virussen zouden, als er aanleiding

voor is, ook door ons bepaald kunnen worden in watermonsters, zoals bijvoorbeeld bij explosies van virale gastro-enteritis of hepatitis. Ook voor nieuw onderzoek is het van belang dat dergelijke RT-PCR's voorhanden zijn. Zo is gevonden dat 22% van de landbouwhuisdieren in Nederland positief is voor HEV bij analyse met RT-PCR. Aangezien de gevonden HEV klonen genetisch sterk gerelateerd zijn aan humane varianten, zou dit kunnen wijzen op gevaar voor transmissie van dier op mens (Van der Poel *et al.*, 2001). Virussen hebben een hoge mutatiefrequentie, waardoor de mogelijkheid bestaat dat nieuwe varianten niet meer worden gedetecteerd met bestaande primersets of probes. Om deze nieuwe varianten toch te kunnen bepalen, moeten de primers en probes worden aangepast. Hiervoor kan het beste gebruik gemaakt worden van viraal RNA dat geïsoleerd is uit fecesmonsters, omdat hierin een relatief grote hoeveelheid van hetzelfde virustype voorkomt. Binnen het RIVM kunnen wij beschikken over dergelijke fecesmonsters, waarna de kwaliteit van de aangepaste primers en probes op opgewerkte watermonsters kunnen worden geverifieerd. Monsters water kunnen zeer heterogeen zijn omdat er veel verschillende virustypen in voor kunnen komen en zijn daarom niet geschikt voor de ontwikkeling van een nieuwe RT-PCR of het aanpassen van een bestaande RT-PCR.

De RT-PCR zoals die momenteel wordt uitgevoerd is semi-kwantitatief. De analysemethode is gebaseerd op eindpuntdetectie. Een kwantitatieve detectiemethode is de zogenaamde real-time detectie, waarbij tijdens de PCR nieuw gevormde producten direct gedetecteerd worden. Hiervoor zijn verschillende fluorescerende detectiemethoden mogelijk. De minst specifieke detectie wordt verkregen door binding van SYBR-Green aan dsDNA, vergelijkbaar met de kleuring door SYBR-Gold (zie detectie van PCR producten, paragraaf 3.1.3). Een specifiekere detectie kan worden verkregen door te hybridiseren met fluorescerende probes. Na binding aan een specifieke DNA sequentie gaan deze probes licht uitstralen van een bepaalde golflengte, dat vervolgens gedetecteerd kan worden. De sterkte van het signaal komt overeen met een bepaalde hoeveelheid PCR product dat gedetecteerd wordt. Als tijdens de RT-PCR reactie een aantal standaarden worden meegenomen, waarvan het aantal RNA kopieën precies bekend is, kan een ijklijn gemaakt worden. Aan de hand van de ijklijn kan het aantal kopieën van het te analyseren RNA monster bepaald worden. Deze methode moet verder ontwikkeld worden om zo entero-, rota- en norovirussen kwantitatief te kunnen detecteren.

6. Aanbevelingen

Uit de discussie kunnen de volgende aanbevelingen voor vervolgonderzoek worden geëxtraheerd.

- 1) Met moleculaire detectiemethoden wordt zowel infectieus als niet-infectieus virus aangetoond. Omdat alleen de infectieuze virusdeeltjes een gevaar voor de volksgezondheid kunnen opleveren is het van belang dat de ratio tussen infectieus en niet-infectieus virus bepaald wordt. Hiertoe zouden voor verschillende virussen kweeksystemen moeten worden ontwikkeld. Door de resultaten van de RT-PCR te combineren met die van de kweek methode zal de ratio tussen infectieus kweekbaar virus en viraal RNA berekend kunnen worden.
- 2) Aangezien de efficiëntie van de huidige RNA isolatie ten behoeve van de moleculaire detectie onbekend is worden de berekende virusconcentraties mogelijk onderschat. Derhalve moet de efficiëntie van de RNA isolatie bepaald worden, waarbij rekening gehouden moet worden met mee geïsoleerde remmende factoren.
- 3) Voor humane calicivirussen, zoals norovirussen, zijn geen celkweek technieken beschreven, waardoor de ratio tussen infectieus kweekbaar virus en viraal RNA niet bepaald kan worden. Het kweken van animale calicivirussen is wel mogelijk. Onderzocht moet worden of kweekbare animale calicivirussen gebruikt kunnen worden als indicator voor de infectiviteit van humane calicivirussen.
- 4) De huidige enteroviruskweekmethode, de BGM-plaquetest, is een langdurige, arbeidsintensieve en kostbare methode. Een goed alternatief zou de zogenaamde celkweek-PCR methode zijn, waarbij na één of twee replicatiecycli in infecteerbare cellen een PCR wordt uitgevoerd voor snelle en gevoelige detectie van infectieuze virussen, die ontwikkeld moet worden voor entero-, rota- en andere pathogene virussen.
- 5) Het ontwikkelen van kwantitatieve PCR-methoden voor entero-, noro- en rotavirussen zal een betrouwbaarder beeld geven van de hoeveelheden RNA-bevattende virusdeeltjes. Bovendien zal dit leiden tot een snellere en meer kosten-effectieve methode voor de detectie van virussen in water.
- 6) De dosis-respons relaties zoals gehanteerd in de infectierisicoschatting vertonen grote variatie tussen de verschillende enterovirustypen, wat inhoudt dat de kans op een virusinfectie afhankelijk is van het type. Voor de berekening van het infectierisico moet dus rekening gehouden worden met het betreffende virustype en de bijbehorende dosis-respons relatie. Hiervoor is het van belang dat typeringsmethoden ontwikkeld worden voor enterovirussen en andere pathogene virussen.

- 7) Niet alleen het infectierisico verschilt per virustype, ook het gevolg van een infectie is virustype afhankelijk, variërend van asymptomatisch tot ernstig. Een risicoschatting waarin de ziektelast als basis voor normstelling genomen wordt zal een gevaar voor de volksgezondheid beter weergeven dan een risicoschatting op basis van infectie, wat nu is voorgeschreven in het huidige Waterleidingbesluit.

Literatuur

- Bitton, G. (1980) Introduction to environmental virology. New York, John Wiley & sons.
- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim van Dillen, P.M. and van der Noordaa, J.S.O. (1990) Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *Journal of Clinical Microbiology* 28, 495-503.
- Chung, P.W., Huang, Y.C., Chang, L.Y., Lin, T.Y. and Ning, H. (2001) Duration of enterovirus shedding in stool. *J Microbiol Immunol Infect* 34, 167-70.
- Cooper, P. D., Agol, V. I., Bachrach, H. L., Brown, F., Ghendon, Y., Gibbs, A. J., Gillespie, J. H., Lonberg-Holm, K., Mandel, B., Melnick, J. L., Mohanty, S. B., Povey, R. C., Rueckert, R. R., Schaffer, F. L. and Tyrrell, D. A. J. (1978) Picornaviridae: Second report. *Intervirology* 10, 165-180.
- Dahling, D. R. and 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 Roda Husman, A.M., Schijven, J.F., Lodder, W.J., van den Berg, H.H.J.L., de Bruin, H.A.M., Rutjes, S.A., Schets, F.M., Teunis, P.F. (2004) Rolling Revision infectierisico: Toekomstige herziening van het Nederlands Waterleidingbesluit 2001. RIVM rapport 330000002.
- De Roda Husman, A.M., Snijders, P.J., Stel, H.V., van den Brule, A.J., Meijer, C.J. and Walboomers, J.M. (1995) Processing of long-stored archival cervical smears for human papillomavirus detection by polymerase chain reaction. *British Journal of Cancer* 72, 412-417.
- De Wit, M.A.S., Koopmans, M.P.G., Kortbeek, L.M., Wannet, W.J.B., Vinje, J., van Leusden, F., Bartelds, A.I.M. and van Duynhoven, Y.T.H.P. (2001a) Sensor, a population-based cohort study on gastro-enteritis in the Netherlands, incidence and etiology. *American Journal of Epidemiology* 154, 666-674.
- De Wit, M. A. S., Koopmans, M. P. G., Kortbeek, L. M., van Leeuwen, W. J., Bartelds, A. I. M. and van Duynhoven, Y. T. H. P. (2001b) Gastroenteritis in sentinel general practices in the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 1, 82-91.
- Dowd, S. E., Pillai, S. D., Wang, S. and 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. and Estes, M.K. (2004) Laboratory efforts to cultivate noroviruses. *Journal of General Virology* 85, 79-85.
- Enriquez, C.E., Abbaszadegan, M., Pepper, I.L., Richardson, K.J. and Gerba, C.P. (1993) Poliovirus detection in water by cell culture and nucleic acid hybridization. *Virus Research* 27, 1113-1118.
- Estes, M. K. and Cohen, J. (1989) Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews* 53, 410-449.
- Fernandes, T.M.A., Schout, C., de Roda Husman, A.M., Eilander, A., Vennema, H. and van Duynhoven, Y.T.H.P. (2003) Accidental contamination of drinking water with partially treated water associated with gastroenteritis in the Netherlands. Aangeboden ter publicatie.
- Gantzer, C., Maul, A., Levi, Y. and Schwartzbrod, L. (1998) Fate of the genome and infectious units of coxsackie B3 virus in phosphate buffered saline . *Virus Research* 32, 1329-1333.
- Greening, G.E., Hewitt, J. and 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.
- Gust, I. D., Coulepis, A. G., Feinstone, S. M., Locarnini, S. A., Moritsugu, Y., Najera, R. and Siegl, G. (1983) Taxonomic classification of Hepatitis A virus. *Intervirology* 20, 1-7.
- Havelaar, A.H., Furuse, K. and Hogeboom, W.M. (1986) Bacteriophages and indicator bacteria in human and animal faeces. *Journal of applied bacteriology* 60, 255-262.
- Havelaar, A. H. (1993a) 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.
- Havelaar, A. H., van Olphen, M. and Drost, Y. C. (1993b) F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Applied and Environmental Microbiology* 59, 2956-2962.
- Havelaar, A. H., Melse, J. M. (2003) Quantifying public health risks in the WHO Guidelines for Drinking Water Quality.
- Hoebe, C.J.P.A., Vennema, H., de Roda Husman, A.M. and van Duynhoven, Y.T.H.P. (2002) Unieke watergerelateerde Norwalk-outbreak. *Infectieziekten Bulletin* 13, 432-433.
- Hoebe, C.J.P.A., Vennema, H., de Roda Husman, A.M. and van Duynhoven, Y.T.H.P. (2003) Norovirus outbreak among primary school children who had played in a recreational

- water fountain. *Journal of Infectious Diseases*. Geaccepteerd voor publicatie.
- Husain, M., Seth, P. and Broor, S. (1995) Detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reaction in faeces from children with acute gastroenteritis. *Archives of Virology* 140, 1225-1233.
- Johansson, P.J., Sveger, T., Ahlfors, K., Ekstrand, J. and Svensson, L. (1996) Reovirus type 1 associated with meningitis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 28, 117-120.
- Kapikian, A. Z., Wyatt, R. G., Dolin, R., Thornhill, T. S., Kalica, A. R. and Chanock, R. M. (1972) Visualization by immune electron microscopy of a 27 nm particle associated with acute infectious nonbacterial gastroenteritis. *Journal of Virology* 10, 1075-1081.
- Kastelein, R. A., Remaut, E., Fiers, W. and van Duin, J. (1982) Lysis gene expression of RNA phage MS2 depends on a frameshift during translation of the overlapping coat protein gene. *Nature* 295, 35-41.
- Ko, G., Cromeans, T. L. and Sobsey, M. D. (2003) UV inactivation of adenovirus type 41 measured by cell culture mRNA RT-PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 7377-7384.
- Lambden, P. R., Caul, E. O., Ashley, C. R. and Clarke, I. A. (1993) Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science* 259, 516-518.
- Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V. and Delattre, J.M. (2000) Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters. *Journal of Applied Microbiology* 88, 5-21.
- Lew, J. F., Petric, M., Kapikian, A. Z., Jiang, X., Estes, M. K. and Green, K. Y. (1994) Identification of minireovirus as a Norwalk-like virus in pediatric patients with gastroenteritis. *Journal of Virology* 68, 3391-3396.
- Lodder, W. J., Vinje, J., van de Heide, R., de Roda Husman, A. M., Leenen, E. J. T. M. and Koopmans, M. P. G. (1999) Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 5624-5627.
- Mandel, B. (1971) Characterization of type 1 Poliovirus by electrophoretic analysis. *Virology* 44, 554-568.
- Mathewson, J.J., Winsor, D.K.J., DuPont, H.L. and Secor, S.L. (1989) Evaluation of assay systems for the detection of rotavirus in stool specimens. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 12, 139-141.
- McKenna, R., Xia, D., Willingmann, P., Ilag, L. L., Krishnaswamy, S., Rossmann, M. G., Olson, N. H., Baker, T. S. and Incardona, N. L. (1992) Atomic structure of single-

- stranded DNA bacteriophage X174 and its functional implications. *Nature* 355, 137-143.
- Mood, M., Graybill, F. A., and Boes, D. C. *Introduction to the theory of statistics*. 1974. Singapore, McGraw-Hill Book Company.
- Mooijman, K.A., Bahar, M., Muniesa, M. and Havelaar, A.H. (2002) Optimisation of ISO 10705-1 on enumeration of F-specific bacteriophages. *Journal of Virological Methods* 103, 129-136.
- Pallansch, M. A. and Roos, R. P. (2001) Enteroviruses: Polioviruses, Coxsackieviruses, Echoviruses, and Newer Enteroviruses. *Fields Virology*. Hoofdstuk 24.
- Pöyry, T., Stenvik, M. and 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.
- Redman, J. A., Grant, S. B., Olson, T. M., Hardy, M. E. and Estes, M. K. (1997) Filtration of recombinant Norwalk virus particles and bacteriophage MS-2 in quartz sand: Importance of electrostatic interactions. *Environmental Science & Technology* 31, 3378-3383.
- Schijven, J. F. and Hassanizadeh, S. M. (2000) Removal of viruses by soil passage: Overview of modeling, processes, and parameters. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology* 30, 49-127.
- Schwab, K.J., De Leon, R. and 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.
- Sobsey, M.D., Battigelli, D.A., Shin, G.A. and Newland, S. (1998) RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. *Water Science and Technology* 38, 91-94.
- Sommer, R., Pribil, W., Appelt, S., Gehringer, P., Eschweiler, H., Leth, H., Cabaj, A. and Haider, T. (2001) Inactivation of bacteriophages in water by means of non-ionizing (UV-253.7 nm) and ionizing (gamma) radiation: A comparative approach. *Water Research* 35, 3109-3116.
- Stanway, G. (1990) Structure, function and evolution of Picornaviruses. *Journal of General Virology* 71, 2483-2501.
- Teunis, P. F. M., Van der Heijden, O. G., Van der Giessen, J. W. B. and Havelaar, A. H. (1996) The dose-response relation in human volunteers for gastro-intestinal pathogens. RIVM rapport 284550002.

- Teunis, P.F.M., Chappell, C.L. and Okhuysen, P.C. (2002a) *Cryptosporidium* dose-response studies: Variation between isolates. *Risk analysis* 22, 175-183.
- Teunis, P.F.M., Chappell, C.L. and Okhuysen, P.C. (2002b) *Cryptosporidium* dose-response studies: Variation between hosts. *Risk analysis* 22, 475-485.
- Thornhill, T. S., Wyatt, R. G., Kalica, A. R., Dolin, R., Chanock, R. M. and Kapikian, A. Z. (1977) Detection by immune electron microscopy of 26- to 27-nm viruslike particles associated with two family outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Infectious Diseases* 135, 20-27.
- Van der Poel, W.H.M., Verschoor, F., van de Heide, R., Herrera, M.I., Vivo, A., Kooreman, M. and de Roda Husman, A.M. (2001) Hepatitis E Virus Sequences in Swine Related to Sequences in Humans, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 7, 970-976.
- Van Olphen, M., Kapsenberg, J. G., van de Baan, E. and Kroon, W. A. (1984) Removal of enteric viruses from surface water at eight waterworks in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 47, 927-932.
- Vennema, H., de Bruin, E. and 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., Pinto, R.M. and 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., Altena, S. A. and Koopmans, M. P. G. (1997) The incidence and genetic variability of Small Round-Structured Viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *Journal of Infectious Diseases* 176, 1374-1378.
- Wang, J., Jiang, X., Madore, H. P., Gray, J., Desselberger, U., Ando, T., Seto, Y., Oishi, I., Lew, J. F., Green, K. Y. and Estes, M. K. (1994) Sequence diversity of small, round-structured viruses in the Norwalk virus group. *Journal of Virology* 68, 5982-5990.
- Wyatt, R. G., Dolin, R., Blacklow, N. R., DuPont, H. L., Buscho, R. F., Thornhill, T. S., Kapikian, A. Z. and Chanock, R. M. (1974) Comparison of three agents of acute infectious nonbacterial gastroenteritis by cross-challenge in volunteers. *Journal of Infectious Diseases* 129, 709-714.
- Zerda, K. S. and Gerba, C. P. (1984) Agarose isoelectrofocusing of intact virions. *Journal of Virological Methods* 9, 1-6.