

RIVM rapport 289202 025

**Detectie van Norwalk-like calicivirussen en
rotavirussen in rioolwater in relatie tot
explosies van gastro-enteritis**

W.J. Lodder, J. Vinjé, R. van de Heide, A.M. de
Roda Husman, M.P.G. Koopmans, E.J.T.M.
Leenen

Augustus 2000

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van Directoraat Generaal Milieubeheer,
directie Drinkwater, Water, Landbouw en Kiwa NV, in het kader van project 289202,
watermicrobiologie

Abstract

In this report, we describe a molecular method for the detection of Norwalk-like calicivirus (NLV) and rotavirus RNA in sewage water concentrates and its application for monitoring of raw sewage in conjunction with confirmed outbreaks of viral gastro-enteritis. At one (Apeldoorn) of the three locations with a suspected NLV-outbreak, also a three-weekly follow-up survey was done for 4 months of sewage water at a downstream pumping-engine-station and a sewage treatment plant. Virus was concentrated from raw sewage by (conventional) filter adsorption-elution followed by two-phase separation. RNA was extracted from the final concentrate by binding to glassbeads. NLV was detected by reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) amplification in all sewage samples collected at the three locations with a reported outbreak of gastro-enteritis. Phylogenetic analyses of the nucleotide sequence of the PCR products revealed that the patient strains and the strains found in the sewage samples belonged to the same genetic cluster. At two of these locations also rotavirus was found in the sewage samples. In addition, NLV was detected by RT-PCR in 10 of the 11 follow-up samples, and rotavirus in 7 of these. After cloning of the 10 NLV RT-PCR products and nucleotide sequence analysis of 5 clones per sewage sample, 6 out of 10 specimens were found to contain multiple NLV-genotypes, indicating cocirculation of several types. The remaining 4 sewage extracts contained only one genetic type of NLV. The amount of virus in the samples was estimated by testing 10-fold serial dilutions using RT-PCR. Relatively high NLV concentrations were found with up to 10^7 dilution still positive for NLV RNA.

Our findings suggest that the burden of illness of NLV or rotavirus associated gastro-enteritis in the general population is higher than has been estimated from investigations of outbreaks. Our results also imply that there is a potential risk of waterborne transmission of NLV and rotavirus. Almost 6 months after the outbreak NLV could still be detected in sewage indicating that NLV in the environment may be a potential source of infection.

Voorwoord

A. Koks, A. Keja, and F. Slijkerman van de GGD uit respectievelijk Gouda, Apeldoorn en Hoorn willen we bedanken voor hun epidemiologisch onderzoek en het verzamelen van fecesmonsters. Verder bedanken we zowel de microbiologen betrokken bij de ‘laboratorium surveillance studies’, als de ‘Society for Clinical Virology’ voor de rotavirus data. Tevens bedanken we de medewerkers van de rioolwaterzuiveringsinrichting in Apeldoorn, Olaf E.M. Nijst en Petra M. de Bree voor hun technische ondersteuning. André Henken en Gertjan Medema worden bedankt voor het kritisch doorlezen van het manuscript.

Inhoud

Samenvatting	5
1. Inleiding	6
1.1 <i>Pathogenese en epidemiologie van Norwalk-like virussen (NLV) en rotavirussen</i>	6
1.2 <i>Voorgaand onderzoek</i>	8
1.3 <i>Doel van het onderzoek</i>	8
1.4 <i>Onderzoeksopzet</i>	8
2. Materiaal en Methoden	9
2.1 <i>Monstername</i>	9
2.2 <i>Beschrijving van de explosies</i>	9
2.3 <i>Rotavirus laboratoriumsurveillance</i>	9
2.4 <i>Concentratie en opwerkingsmethode voor rioolwater</i>	10
2.5 <i>RNA-extractie</i>	10
2.6 <i>NLV en rotavirus RT-PCR</i>	10
2.7 <i>Gel elektroforese, Southern blotting en hybridisatie</i>	11
2.8 <i>Klonering en sequentie analyse van de RT-PCR producten</i>	11
2.9 <i>Statistische en fylogenetische analyses</i>	11
3. Resultaten	12
3.1 <i>Gevoeligheid en specificiteit van de detectiemethode van NLV in rioolwater met behulp van RT-PCR</i>	12
3.2 <i>NLV en rotavirus bij NLV-verdachte explosies</i>	12
3.3 <i>NLV en rotavirus in rioolwater bij nabijgelegen gemaal en rioolwaterzuiveringsinrichting</i>	14
3.4 <i>Rotavirus laboratoriumsurveillance</i>	15
3.5 <i>Typering van de NLV stammen</i>	15
4. Conclusies en discussie	17
4.1 <i>Detectiemethoden</i>	17
4.2 <i>Detectie van rotavirus en NLV bij explosies</i>	17
4.3 <i>Detectie van rotavirus en NLV bij nabijgelegen gemaal en rwzi</i>	17
4.4 <i>Implicaties voor de bedrijfstak</i>	18
4.5 <i>Conclusies en aanbevelingen</i>	19
Literatuur	20
Bijlage 1 Verzendlijst	22
Bijlage 2. Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses and rotaviruses in sewage samples associated with outbreaks of gastro-enteritis	23

Samenvatting

In dit rapport worden moleculaire detectiemethoden beschreven voor het aantonen van Norwalk-like calicivirus (NLV) en rotavirus RNA in rioolwaterconcentraten, inclusief de toepassing bij het volgen van explosies van virale gastro-enteritis. Bij één van de drie locaties met een explosie, waarvan NLV de verdachte verwekker was, werd gedurende vier maanden een driewekelijkse vervolgstudie uitgevoerd bij een nabijgelegen gemaal en een rioolwaterzuiverings-inrichting (rwzi).

Het concentreren van de virussen werd uitgevoerd met behulp van een klassieke filter adsorptie-elutie methode gevolgd door een twee-fase-scheidingsmethode, waarna NLV en rotavirus met behulp van 'reverse transcriptase polymerase chain reaction' (RT-PCR) werden aangetoond. NLV werd aangetroffen in alle rioolwaters die nabij de explosie-locatie bemonsterd werden. Fylogenetische analyse van de nucleotide sequenties van de PCR producten toonde aan dat de in patiënten aangetroffen NLV-typen identiek waren aan de typen gevonden in het rioolwater. Bij twee van deze locaties werd ook rotavirus RNA in het rioolwater aangetroffen.

NLV werd aangetroffen in 10, en rotavirus in 7 van de 11 vervolgmongsters. Na klonering van de RT-PCR producten werden verschillende typen NLV aangetroffen in één monster, wat aangeeft dat er verschillende NLV-typen gelijktijdig kunnen circuleren in Nederland.

De hoeveelheid virus in de monsters werd geschat door 10-voudige verdunningen te testen met behulp van RT-PCR. Relatief hoge NLV concentraties werden aangetroffen met maximaal tot de 10^7 verdunning positief voor de aanwezigheid van NLV RNA.

Deze resultaten suggereren dat er een potentieel risico is voor wateroverdraagbare transmissie van NLV en rotavirus. Ongeveer 6 maanden na de explosie werd NLV nog steeds aangetroffen in het rioolwater, wat aangeeft dat NLV in het milieu een potentiële besmettingsbron kan zijn. Tevens suggereren deze resultaten dat de ziektelast van NLV en rotavirus in relatie tot gastro-enteritis wel eens hoger zou kunnen zijn in de algemene Nederlandse populatie dan tot nu toe werd aangenomen op basis van de gemelde explosies.

1. Inleiding

1.1 Pathogenese en epidemiologie van Norwalk-like virussen (NLV) en rotavirussen

Virale gastro-enteritis is een veel voorkomende ziekte onder mensen van alle leeftijdsklassen en omvat onder andere symptomen als diarree, braken en buikkrimp. De belangrijkste veroorzakers van deze ziekte zijn type A rotavirussen en Norwalk-like virussen (ook bekend als “small round structured viruses”). NLV, behorend tot de *Caliciviridae*, zijn vooral bekend als verwekkers van epidemische gastro-enteritis bij oudere kinderen en volwassenen. Groep A rotavirussen, geclassificeerd als *Reoviridae*, worden vooral geassocieerd met endemische gastro-enteritis bij zuigelingen en kleine kinderen. Rotavirus vertoont een duidelijke seizoensspecifieke distributie met de hoogste rotavirus prevalentie gedurende de winter en het vroege voorjaar terwijl NLV epidemisch voorkomt (Borgdorff, 1995). Beide RNA virussen worden wereldwijd aangetroffen (Fields *et al.*, 1996). Bij talrijke voedsel- en waterovergedragen explosies zijn NLV aangewezen als de ziekteverwekkers. Explosies van gastro-enteritis veroorzaakt door NLV zijn geassocieerd met het drinken van fecaal besmet water en met zwemmen in verontreinigd recreatiewater. Hoewel minder gebruikelijk zijn er ook explosies van via water overgedragen rotavirussen gerapporteerd. Transmissie van zowel NLV als rotavirussen kan plaatsvinden via verontreinigd water en voedsel. NLV kan ook worden overgedragen via aërosolen die fecaal materiaal, braaksel en/ of respiratoire secreties bevatten. Fecaal-orale besmetting is vaak oorzaak van besmettingen met rotavirus.

In Nederland kon in de afgelopen jaren bijna 90% van de gastro-enteritis explosies geassocieerd worden met NLV (Vinjé & Koopmans, 1996; Vinjé *et al.* 1997). Ditzelfde geldt voor Engeland en Japan waar NLV geassocieerde explosies van voedselvergiftiging vaak gerelateerd waren aan de consumptie van verontreinigde oesters (Okada *et al.*, 1990). In de Verenigde Staten komen voedselgerelateerde explosies die geassocieerd zijn met NLV vaker voor (35%) dan explosies van welke bacteriële pathogeen ook (Kuritsky *et al.*, 1985). Vaak zijn door vergelijking van klinische en epidemiologische data van onverklaarde explosies met die van bevestigde NLV explosies, deze onverklaarde explosies met grote waarschijnlijkheid toe te schrijven aan NLV. Het gaat hierbij vier keer zo vaak om watergerelateerde als om voedselgerelateerde explosies.

In Nederland komt 38% van de rotavirus-geassocieerde gastro-enteritisgevallen, waarvoor een huisarts geconsulteerd wordt, voor bij jonge kinderen (<5 jaar). Diarree wordt in 35% tot 50% van jonge kinderen in Europa, de Verenigde Staten en Japan veroorzaakt door rotavirus. Bij ernstige diarree, waarbij ziekenhuisopname nodig is, betreft dit in zelfs meer dan 60% van de gevallen een rotavirus infectie. In een studie werd aangetoond dat meer dan 50% van de verzorgers van deze kinderen een serologische respons vertoonden tegen

rotavirus. Bijna al deze kinderen kregen hoge koorts, uitdrogingsverschijnselen en moesten overgeven.

1.2 Voorgaand onderzoek

Verontreiniging van drinkwater en oppervlaktewater met rioolwatereffluent of andere fecale afvalbronnen is een potentieel risico voor de volksgezondheid. Fecale verontreiniging van water wordt momenteel vastgesteld door het aantal thermotolerante coliforme bacteriën te bepalen, hoewel is gebleken dat de aanwezigheid van zulke bacteriën geen absolute indicator is voor de aanwezigheid van virussen die waarschijnlijk het overgrote deel van gastro-enteritis veroorzaken.

De laatste jaren werd onderzoek gedaan naar de concentraties van enterovirussen in de inlaat van een drinkwaterleidingbedrijf. Enterovirussen waren de enige groep van aantoonbare kweekbare humane virussen (poliovirus, Coxsackie virus, ECHO virus en enterovirus).

Echter deze virussen zijn niet allemaal pathogeen voor de mens. De enterovirus bepaling wordt gedaan, omdat aangenomen wordt dat de mate en de gevoeligheid van deze virussen voor desinfectie vergelijkbaar is met die van andere humaan pathogene virussen, zoals rotavirussen en NLV. Echter, of dit ook echt zo is, is onduidelijk, omdat er voor rotavirussen en NLV nog geen detectiemethode voor handen was.

Nu is er echter een methode voorhanden om specifiek rotavirus en NLV RNA te detecteren in water. Daarom is het momenteel mogelijk om te bepalen in welke mate humane pathogene virussen zoals rotavirussen en NLV aanwezig zijn en welke de beste indicatoren zijn voor deze virussen. Bovendien vereist het aantonen van virussen in water bijzonder gevoelige detectiemethoden waardoor niet iedere willekeurig ontwikkelde methode hiervoor gebruikt kan worden.

1.3 Doel van het onderzoek

Het doel van dit onderzoek is om de ontwikkelde detectiemethodes voor rotavirus en NLV in feces te evalueren voor detectie van deze virussen in water. Indien detectie in rioolwaterconcentraten mogelijk is, wordt bekeken in welke mate deze virussen voorkomen in Nederlands rioolwater en welke typen circuleren.

1.4 Onderzoeksopzet

In dit onderzoek is een rioolwaterconcentratiemethode ontwikkeld, ten behoeve van de moleculaire detectie van NLV en rotavirussen. Deze verbeterde methoden zijn toegepast voor het monitoren van water op de aanwezigheid van NLV en rotavirussen en het bepalen van de virusconcentraties.

Aangezien er nog weinig bekend is over de besmettingsgraad van milieumonsters met NLV en rotavirussen is er gekozen om rioolwatermonsters te monitoren na een explosie van virale gastro-enteritis (vermoedelijk NLV). De rioolwatermonsters werden nabij de bron van de explosie genomen, omdat daar hoge NLV-concentraties konden worden verwacht. Bij één locatie werden 3-wekelijks gedurende 4 maanden vervolgonsters genomen bij het nabijgelegen gemaal en de rwzi om te bekijken of deze virussen hier ook aangetoond konden worden. De gevonden NLV werden getypeerd met behulp van sequentieanalyse om de genetische variatie te kunnen bepalen.

Ook rotavirus werd bepaald, omdat er veel gevallen van rotavirusinfecties in laboratorium surveillance studies werden gemeld.

2. Materiaal en Methoden

2.1 Monstername

NLV-positieve fecesmonsters werden gebruikt om de analysemethode van NLV te optimaliseren. Deze monsters werden verkregen van patiënten met gastro-enteritis en waren van tevoren geanalyseerd met behulp van RT-PCR en elektronenmicroscopie (Vinjé & Koopmans, 1996). Tien liter watermonsters werden genomen bij een gemaal nabij een locatie waar een NLV-explosie (locaties zie Tabel 1) was gerapporteerd. Drie maanden later werd wederom een watermonster genomen. De locatie bij Apeldoorn werd nader onderzocht door gedurende 4 maanden en iedere 3 weken een monster te nemen van het nabijgelegen gemaal en de rioolwaterzuiveringsinrichting (rwzi; 140.000 inwoner equivalenten). Monsters voor analyse werden bewaard bij 4°C.

2.2 Beschrijving van de explosies

Drie explosies waarvan het RIVM op de hoogte was gesteld door de plaatselijke GGD werden bemonsterd, en wel in november 1997 (Reeuwijk), december 1997 (Apeldoorn) en maart 1998 (Enkhuizen; Tabel 1). Deze explosies werden op basis van de criteria van Kaplan *et al.* (1982) beoordeeld met als conclusie dat de explosie vermoedelijk veroorzaakt was door virussen. Alle explosies bleken inderdaad veroorzaakt te zijn door NLV (50% van feces van patiënten positief voor NLV) en waren negatief voor alle andere geteste pathogenen (Vinjé *et al.*, 1997).

Tabel 1. Beschrijving van de explosies

	Reeuwijk	Apeldoorn	Enkhuizen
Percentage zieke bewoners	67%	48%	45%
Aantal patiënten	40	46	40
Eerste dag van ziekte	13/11/1997	04/12/1997	22/03/1998
Laatste dag van ziekte	Onbekend	12/12/1997	30/03/1998
Eerste watermonsters	18/11/1997	10/12/1997	01/04/1998

2.3 Rotavirus laboratoriumsurveillance

In Nederland worden de virologische data (waaronder rotavirus) wekelijks gerapporteerd door 17 van de 22 virologische laboratoria (Infectieziekten Bulletin). Rotavirus data uit dit systeem werden gebruikt om de piekmaand van rotavirus activiteit gedurende deze studie te kunnen bepalen (Koopmans & van Asperen, 1999). Helaas zijn er geen nationale data beschikbaar over NLV-infecties of explosies. Gastro-enteritis explosies worden gerapporteerd aan de GGD-en, die deze doorgeven aan het RIVM bij vermoeden van virologische oorsprong.

2.4 Concentratie en opwerkingsmethode voor rioolwater

Rioolwater werd eerst geconcentreerd met behulp van een conventionele filter adsorptie-elutiemethode (Van Olphen *et al.*, 1984), waarbij magnesiumchloride gebruikt werd voor complexatie van het virus. Adsorberen van de viruscomplexen aan een negatief geladen filter gebeurde bij pH 3,8 en elutie met behulp van beefextract bij pH 9,0. Het uiteindelijke precipitaat werd opgelost en geneutraliseerd tot een uiteindelijke pH van 7,4 waarna dit eluaat verder werd geconcentreerd met behulp van de twee-fasen scheidingsmethode.

De twee-fasenmethode, gebaseerd op de selectieve verdeling van virussen tussen twee niet-mengbare fasen, is uitgevoerd als beschreven (Pöyry *et al.*, 1988) met kleine aanpassingen. Aan de waterfase werd toegevoegd 1% (w/v) Dextraan T40 (Pharmacia, Roosendaal, Nederland), 10% (w/v) PEG 6000 (Merck, Amsterdam, Nederland), 0,2 M NaCl en 10 mM fosfaatbuffer (pH 7,2) en dit mengsel werd 1 uur bij 4°C geschud. Het monster werd daarna overgebracht naar een scheidrecht, waarin het overnacht bleef staan bij 4°C. Na deze scheiding werden de onderste fase en interfase opgevangen. De monsters werden verder gezuiverd met spin-kolom-gel-chromatografie (Sephadex G200, ICN) en door ultrafiltratie (Centricon 100, Amicon, Dronten, Nederland). Deze methode had de hoogste en best reproduceerbare opbrengst van amplificeerbaar RNA van drie methodes die in een eerdere studie getest waren (Mulders *et al.*, 1997). De uiteindelijke retentaat volumina varieerden van 1,5 tot 2,5 ml.

2.5 RNA-extractie

Een deel van het retentaat werd bewerkt met behulp van de methode van Boom *et al.* (1990) welke gebaseerd is op binding van RNA aan silicabulletjes in aanwezigheid van guanidinium isothiocyanaat (GuSCN) waarbij de bulletjes direct aan het retentaat werden toegevoegd. Het uiteindelijk verkregen RNA werd geëluëerd met gedestilleerd water met 200 U/ml RNAGuard (Pharmacia) en direct gebruikt in de RT-PCR.

2.6 NLV en rotavirus RT-PCR

Een NLV RT-PCR-assay eerder ontwikkeld voor de specifieke detectie van NLV RNA in humane feces (Vinjé *et al.*, 1997), werd toegepast voor de detectie van NLV in rioolwatermonsters. Met behulp van deze methode kon meer dan 85% van de NLV-typen die bekend zijn aangetoond worden met een gevoeligheid van ongeveer 30 deeltjes na RNA extractie (Vinjé & Koopmans, 1996). NLV-specifieke primers voor het virale RNA polymerase gen (ORF1) werden gebruikt. De RT-PCR werd uitgevoerd, zoals eerder beschreven (Vinjé *et al.*, 1997).

Rotavirus RT-PCR werd uitgevoerd met primers tegen het VP7-gen zoals beschreven door Husain *et al.* (1995). De detectielimiet van deze RT-PCR is 3-30 TCID₅₀ van groep A rotavirus type WA per ml (persoonlijke mededeling, Reina van der Heide).

2.7 Gel elektroforese, Southern blotting en hybridisatie

De RT-PCR producten werden geanalyseerd door elektroforese op 2% agarose gels en gevisualiseerd onder UV na kleuring met ethidium bromide. Voor Southern blotting werden de PCR producten gedurende 30 min gedenuatureerd met behulp van 0,5 M NaOH en overgebracht op een positief geladen nylonmembraan door middel van vacuüm blotting. Hybridisatie van NLV is uitgevoerd, zoals eerder beschreven (Bergmans *et al.*, 1995). Hybridisatie van rotavirus gebeurde op dezelfde manier, behalve dat een hybridisatietemperatuur van 40°C en 20 pmol 5'-biotinylated rotavirus-specifieke probe (Rota VP7 5'-C(A/G) AA(C/T) AA(A/G) TGG ATA TC(A/G) ATG GG)-3') werden gebruikt.

2.8 Klonering en sequentie analyse van de RT-PCR producten

Na electroforese op een 2% agarose gel werden de NLV RT-PCR producten uitgesneden en gezuiverd met behulp van een Qiaquick gel extractie kit (Qiagen, Hilden, Duitsland). Na klonering in een TA-vector (Invitrogen) werden van minimaal 5 klonen de recombinante plasmiden gezuiverd. RT-PCR producten en recombinante plasmiden werden gesequenced met een BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer) en de DNA sequenties werden bewerkt met SeqEd (V1.03, Applied Biosystems).

2.9 Statistische en fylogenetische analyses

Nucleotide sequenties werden geanalyseerd met behulp van Geneworks (V2.5, Intelligenetics, CA) en het Treecon software pakket (Van der Peer & Wachter, 1994). Fylogenetische bomen werden geconstrueerd met de Neighbour-Joining methode en betrouwbaarheidsintervallen werden bepaald door middel van herhaalde analyses (100 rondes; Van der Peer & Wachter, 1994).

3. Resultaten

3.1 Gevoeligheid en specificiteit van de detectiemethode van NLV in rioolwater met behulp van RT-PCR

Tot op heden is er nog geen celkweek methode beschreven waarmee NLV kwantitatief kan worden gedetecteerd. In een vorige studie is daarom de concentratiemethode geëvalueerd met behulp van getitreerde standaardsuspensies van poliovirus (Mulders *et al.*, 1997). Op deze manier is de opbrengst van de concentratiemethode alsmede de levensvatbaarheid van het virus geanalyseerd. De detectielimiet is bepaald door te analyseren welke 10-voudige verdunningen nog zichtbare RT-PCR producten opleverden. De in dit onderzoek gebruikte methode maakte het mogelijk om 30 RNA-bevattende rotavirus of NLV deeltjes aan te tonen (Vinjé *et al.*, 1997).

Amplificatie van rioolwatermonsters produceerde soms niet-specifieke banden. Echter, na Southern hybridisatie werden alleen banden van de juiste grootte (327 bp voor NLV en 293 bp voor rotavirus) gedetecteerd, wat aangaf dat er specifieke hybridisatie had plaatsgevonden. Alle negatieve controles waren negatief. Positieve controles, besmet met een bekend NLV-type, vertoonden een enkele specifieke band van 327 bp na RT-PCR en Southern blot hybridisatie.

3.2 NLV en rotavirus bij NLV-verdachte explosies

(I) **Reeuwijk.** De rioolwatermonsters die 5 dagen na het eerste ziektegeval genomen waren, waren positief voor NLV tot en met de 10^4 verdunning (Tabel 2).

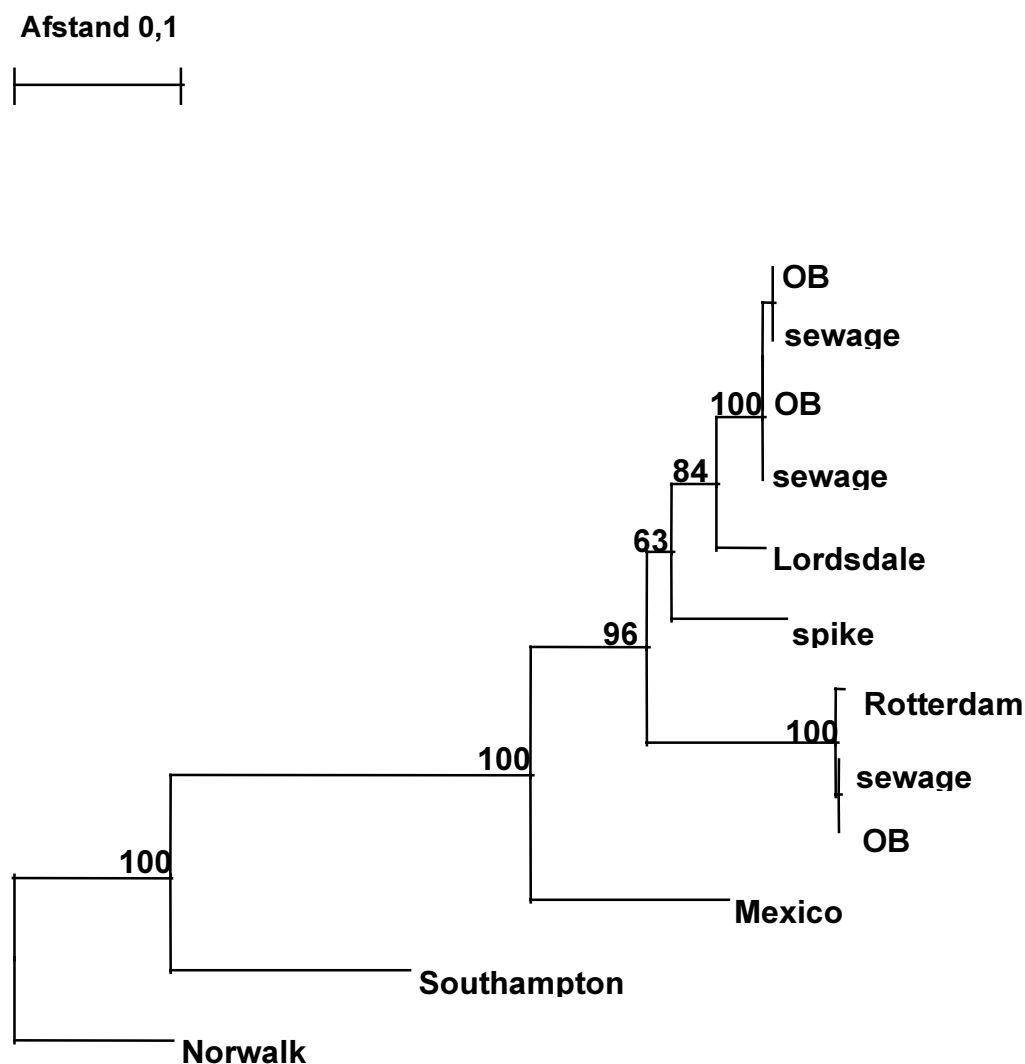
Tabel 2. Detectie van NLV en rotavirus RNA in rioolwatermonsters gedurende en na de explosies, zoals beschreven in Tabel 1.

Monstername		Aantal dagen na eerste ziektegeval	Positieve verdunningen	
Locatie	Datum		NLV	rotavirus
Reeuwijk	18/11/97	5	10^4	10^2
	11/02/98	90	- ^a	10^3
Apeldoorn	10/12/97	6	10^1	10^2
	11/12/97	7	10^0	10^1
	12/12/97	8	-	10^4
	16/12/97	12	10^0	10^1
	12/02/98	70	-	10^3
Enkhuizen	01/04/98	9	10^7	-
	02/04/98	10	10^6	-
	06/04/98	14	10^6	-

^a - niet aangetoond

De positieve controle bestond uit rioolwater ‘gespiked’ met een positief fecesmonster en rotavirus WA.

De nucleotide sequentie van het NLV product geamplificeerd uit de rioolwatermonsters was identiek aan de sequentie van het NLV product geamplificeerd uit de fecesmonsters van de patiënten van het verzorgingshuis (Figuur 1). De sequentie van het uit het rioolwater geamplificeerde NLV product was echter duidelijk verschillend van de sequentie van het NLV type welke gebruikt was voor spiking.



Figuur 1. Fylogenetische boom gebaseerd op een 145bp regio van het RNA polymerase gen van NLV. Deze toont de relaties tussen NLV van genogroep I (Norwalk virus en Desert Shield virus), genogroep II (Lordsdale- en Mexico virus) en explosie stammen (OB) gevonden in feces van patiënten en rioolwater. Genbank toegangsnummers van de prototype stammen waren als volgt: Norwalk (M87661), Southampton (L070418), Lordsdale (X86557), en Mexico (U22498). Het TREECON programma werd gebruikt voor het genereren van de dendrogram (Van der Peer & Wachter, 1994).

Dezelfde monsters van rioolwater werden getest op de aanwezigheid van rotavirus (Tabel 2). Rotavirus werd nog gevonden in het 100-maal verdunde RNA-extract. Na 3 maanden werden wederom monsters genomen, deze bleken negatief te zijn voor NLV en positief voor rotavirus.

(II) Apeldoorn. Rioolwatermonsters werden genomen 6, 7, 8, 12 dagen en 3 maanden nadat het eerste ziektegeval van de explosie was gemeld. Vijf µl RNA-extract komt overeen met ca. 0,5 liter rioolwater. NLV RNA werd aangetoond in 10 maal verdund extract na 6 dagen, in het pure extract na 7 en 12 dagen en niet in het extract na 8 dagen (Tabel 2). Al deze monsters waren positief voor rotavirus RNA.

Na 3 maanden werd opnieuw een monster genomen, wat negatief was in de NLV PCR en positief in de rotavirus PCR (5 µl extract komt overeen met ~0,5 l rioolwater).

(III) Enkhuizen. Rioolwatermonsters, genomen 10 (5 µl extract ~ 0,5 l), 11 (~ 0,33 l) en 15 dagen (~ 0,76 l) na het eerste gemelde ziektegeval, werden getest in de NLV RT-PCR procedure (Tabel 2). Alle monsters waren positief voor NLV en negatief voor rotavirus RNA.

3.3 NLV en rotavirus in rioolwater bij nabijgelegen gemaal en rioolwaterzuiveringsinrichting

In Apeldoorn werden iedere 3 weken gedurende 4 maanden monsters genomen in het rioolwatergemaal nabij de explosielocatie en de rioolwaterzuiveringsinrichting (rwzi). Deze werden getest op NLV en rotavirus RNA (Tabel 3). Op één na waren alle monsters positief voor NLV-RNA en 7 van de 11 waren positief voor rotavirus-RNA. In één monster was de titer voor rotavirus hoger dan voor NLV; bij alle andere monsters waren de NLV-titers één tot 3 log-eenheden hoger dan voor rotavirus.

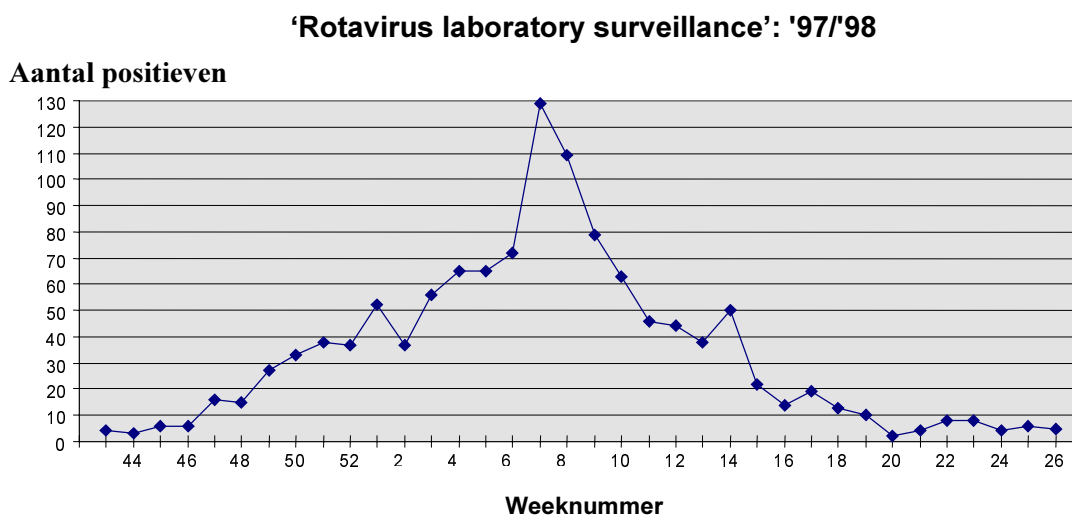
Tabel 3. Detectie van NLV en rotavirus RNA in rioolwatermonsters genomen tijdens de vervolgstudie in Apeldoorn.

Monstername		Aantal dagen na eerste ziektegeval	Positieve verdunningen	
Locatie	Datum		NLV	rotavirus
Gemaal	11/02/98	90	- ^a	10 ³
Gemaal	06/03/98	113	10 ³	10 ²
Gemaal	25/03/98	132	10 ⁴	10 ²
Gemaal	15/04/98	153	10 ³	-
Gemaal	06/05/98	174	10 ¹	10 ⁰
Gemaal	27/05/98	195	10 ¹	-
RWZI	06/03/98	113	10 ³	10 ²
RWZI	25/03/98	132	10 ²	-
RWZI	15/04/98	153	10 ³	10 ²
RWZI	06/05/98	174	10 ¹	10 ²
RWZI	27/05/98	195	10 ²	-

^a - niet aangetoond

3.4 Rotavirus laboratoriumsurveillance

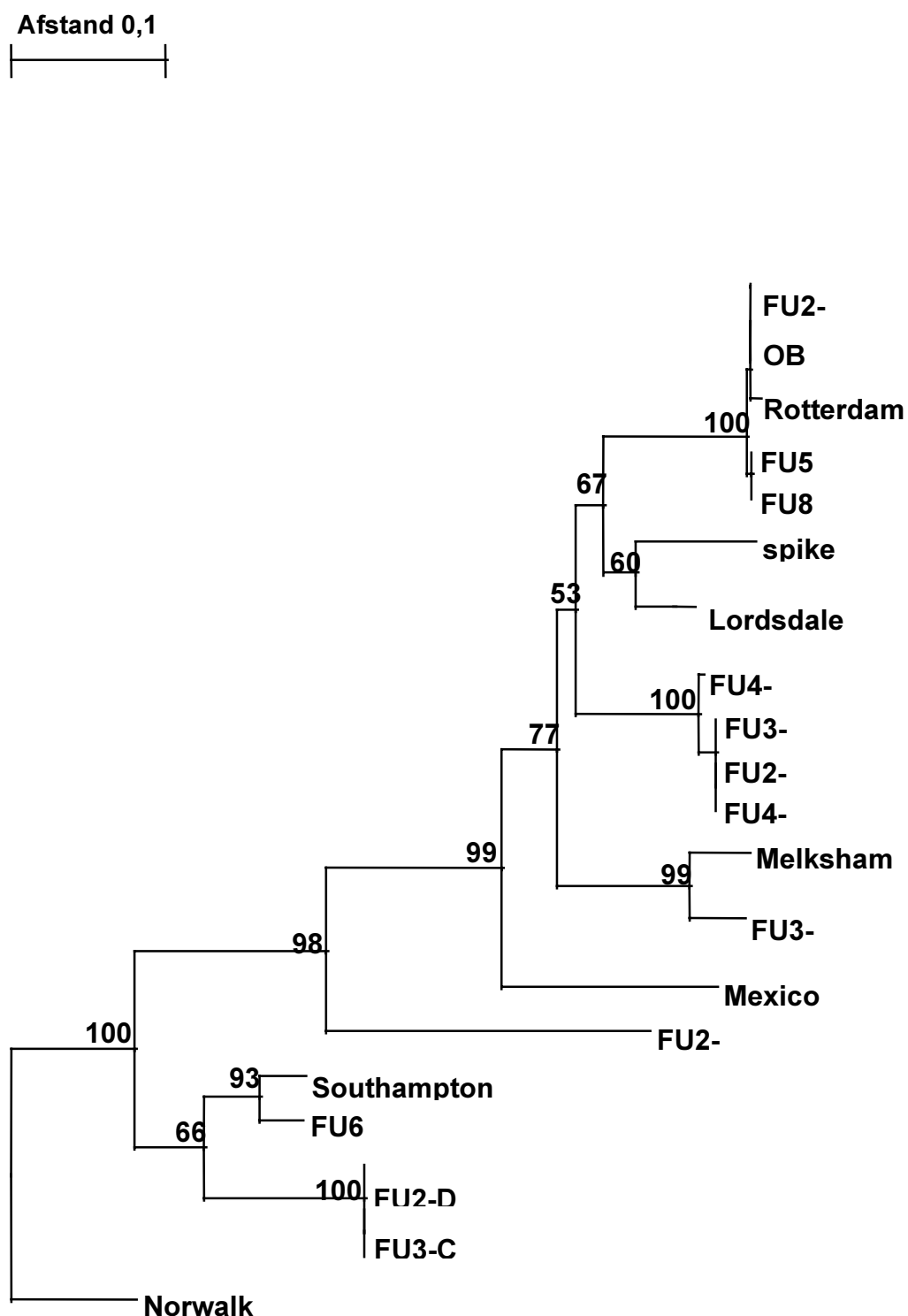
De data uit ‘rotavirus laboratorium surveillance’ vertoonden de typische seizoensverheffing van rotavirus-positieve monsters van december 1997 met een piek in februari 1998 (Figuur 2). In deze periode werden ook NLV-explosies aan het RIVM gemeld en wel in november (twee maal), december (twee), januari (drie), februari (één), maart (vier) en juni (twee). De vier rioolwatermonsters welke negatief waren voor rotavirus RNA werden genomen na de met behulp van laboratorium monitoring bepaalde seizoenspiek.



Figuur 2. Resultaten van de rotavirus laboratorium monitoring (1997/1998) in feces monsters.

3.5 Typering van de NLV stammen

De gevonden NLV werden getypeerd met behulp van sequentie analyse van RT-PCR producten. De gevonden NLV typen geamplificeerd uit fecesmonsters of geamplificeerd uit rioolwatermonsters waren identiek voor iedere individuele explosie (Figuur 1). Aangezien er sprake zou kunnen zijn dat er meerdere stammen tegelijkertijd circuleren, werden de PCR producten gekloneerd en de individuele klonen gesequenced. Op deze manier kon een aantal verschillende NLV genotypen worden aangetoond (Figuur 3). NLV's uit zowel genogroep I als II werden aangetroffen. De NLV's gevonden na de explosies in Reeuwijk en Enkhuizen waren verwant aan het Lordsdale-Bristol cluster in genogroep II van NLV (Vinjé & Koopmans, 1996). De NLV's gevonden in de explosie te Apeldoorn behoorden tot een andere groep in genogroep II, te weten Rotterdam virus. Deze stam kwam voor in elk van de drie na de explosie genomen monsters.



Figuur 3. Fylogenetische boom gebaseerd op een 145bp regio van het RNA-polymerase gen van NLV. Deze boom toont de relaties tussen de explosiestam van Apeldoorn (OB Apeldoorn), klonen van de vervolgonsters (FU2, FU3, FU4, FU5, FU6 and FU8), Rotterdam virus en prototype NLVs (Norwalk virus, Southamptton virus, Mexico virus, Melksham virus en Lordsdale virus). Zie figuur 1 voor Genbank nummers.

4. Conclusies en discussie

4.1 Detectiemethoden

In dit rapport worden moleculaire methoden beschreven voor de detectie van NLV en rotavirus RNA in rioolwaterconcentraten en de toepassing van deze methoden voor het volgen van explosies. De methode bestaat uit een klassieke concentratiemethode gevolgd door een twee-fase-scheidingsmethode waarna detectie van de virussen plaatsvindt met behulp van een RT-PCR assay.

RT-PCR kan helaas geen onderscheid maken tussen infectieuze en niet-infectieuze virussen, maar dit is wel een snelle methode om verschillende monsters te screenen op viraal RNA. Met deze verbeterde methoden voor detectie van NLV en rotavirussen in water kunnen 3 NLV-deeltjes per liter oppervlaktewater en 30 NLV-deeltjes per liter rioolwater worden aangetoond en vergelijkbare rotavirus concentraties. De NLV RT-PCR producten konden worden gebruikt voor typering met behulp van sequentieanalyse.

4.2 Detectie van rotavirus en NLV bij explosies

NLV konden worden aangetoond met RT-PCR in alle rioolwatermonsters die direct na het bekend worden van een gastro-enteritis explosie ter plaatse genomen werden. Typering van de NLV-varianten met behulp van sequentieanalyse wees uit dat identieke virustypen konden worden aangetoond in patiënten en rioolwatermonsters. Bij twee van de drie explosielocaties werd er ook rotavirus aangetroffen in de rioolwatermonsters. Bij één van de locaties werd in bijna alle opeenvolgende rioolwatermonsters in de periode na de explosie steeds weer NLV aangetoond. In meer dan de helft van de monsters werd ook rotavirus aangetroffen in de vervolgmonsters. Sequentie analyse van RT-PCR producten afkomstig van deze monsters liet zien dat er verschillende NLV genotypen tegelijkertijd circuleren, hoewel in sommige monsters maar één genotype kon worden aangetoond.

4.3 Detectie van rotavirus en NLV bij nabijgelegen gemaal en rwzi

Bij één van de explosielocaties werden driewekelijks monsters genomen bij het nabijgelegen gemaal en de rwzi gedurende een periode van vier maanden om NLV en rotavirus concentraties te kunnen bepalen. In op één na alle vervolg rioolwatermonsters kon NLV worden aangetoond en in het merendeel (7/ 11) van de monsters ook rotavirus. Daarbij was in nagenoeg alle rioolwatermonsters de NLV concentratie hoger dan de rotavirus concentratie. De laatste rioolwatermonsters waren nog positief, implicerend dat NLV ook onafhankelijk van de onderzochte explosies circuleert. Sequentieanalyse van RT-PCR producten afkomstig van alle positieve monsters liet zien dat er inderdaad verschillende NLV genotypen tegelijk circuleren, hoewel in sommige monsters maar één genotype kon worden aangetoond. Het endemisch voorkomen van rotavirussen gebaseerd op data afkomstig van een populatie studie en van laboratoriumsurveillance werd bevestigd doordat de vier rotavirus RNA negatieve rioolwatermonsters inderdaad na de rotavirus piek, zoals gezien in de laboratorium surveillance, genomen werden.

4.4 Implicaties voor de bedrijfstak

Zoals beschreven in deze studie zijn momenteel gevoelige detectiemethoden beschikbaar om de humane pathogene Norwalk-like en rotavirussen te meten in rioolwater. Bovendien is gebleken dat dezelfde virustypen die gastro-enteritis explosies kunnen veroorzaken, gedurende lange tijd konden worden aangetoond in rioolwater. Deze studie laat bovendien duidelijk zien dat er hoge concentraties NLV en rotavirus in rioolwater worden aangetroffen. Zelfs tot 4 maanden na een gastro-enteritis explosie, dus met grote waarschijnlijkheid niet gerelateerd aan de explosie, konden zowel rotavirussen als NLV worden aangetoond bij een rwzi en een rioolwatergemaal. Een rwzi zal maar deels deze virussen verwijderen en daardoor kunnen de concentraties NLV en rotavirus in oppervlaktewater mogelijk hoog zijn. Het is dus belangrijk om na te gaan wat de virusbelasting op verschillende rwzi's is en wat de capaciteit van deze installaties is met betrekking tot verwijdering van virustypen die in rioolwater circuleren zoals nu voor NLV en rotavirussen duidelijk is aangetoond. Hiertoe is bij één rwzi al een proef gestart waarbij NLV en rotavirus concentraties in zowel influent als effluent bepaald worden.

Deze studie geeft duidelijk aan dat de prevalentie van NLV en rotavirus hoger is dan berekend uit data van voorgaande explosies van gastro-enteritis. Vooral nog is het onduidelijk in welke mate deze virussen voorkomen in oppervlaktewater. Dit is van groot belang zowel voor het gezondheidsrisico van waterrecreatie als het innemen van oppervlaktewater ten behoeve van drinkwaterproductie. Momenteel is er een proef gestart waarbij oppervlaktewater van door rioolwater vervuilde rivieren zoals Maas en Waal bemonsterd worden. Ook wordt er gemeten bij een innamepunt in het Lekkanaal, maar er zullen meer van zulke metingen gedaan moeten worden om te weten te komen of en in welke concentraties NLV en rotavirussen voorkomen in recreatiewater en in oppervlaktewater bij innamepunten. Hiervoor is ook van belang te achterhalen in welke mate deze virussen verwijderd worden door de verschillende toegepaste drinkwaterzuiveringsprocessen.

Het is vooral nog onduidelijk of NLV en rotavirus concentraties overeenkomen met de mate waarin bacteriofagen en/ of enterovirussen voorkomen. Om dit te onderzoeken worden momenteel parallel entero-, reo-, rota- en Norwalk-like virusconcentraties bepaald alsmede concentraties van verschillende bacteriofagen. Tevens zal de gevoeligheid van al deze micro-organismen voor verwijdering in zuiveringsprocessen met elkaar vergeleken moeten worden. Als geen van deze kandidaten NLV en rotavirus concentraties kan voorspellen dan zullen deze humane pathogene virussen regelmatig apart geanalyseerd moeten worden bij drinkwater- en rioolwaterzuiveringsinstallaties om te kunnen beoordelen of er sprake is van voldoende verwijdering en dus van een acceptabel gezondheidsrisico.

4.5 Conclusies en aanbevelingen

1) Aangezien er bij een rioolwatergemaal en een rwzi hoge concentraties rotavirussen en NLV worden gevonden en vanwege de verwachte lage verwijderingscapaciteit van rwzi's, is het waarschijnlijk dat deze virussen ook aanwezig zullen zijn in effluent wat een belasting voor het milieu zou zijn. Dit zal onderzocht moeten worden door bij verschillende rwzi's NLV en rotavirus concentraties in zowel influent als effluent te bepalen.

2) Om het mogelijke gezondheidsrisico van de aanwezigheid van gastro-enteritis veroorzakende virussen zoals rotavirussen en NLV in oppervlaktewater zowel voor waterrecreatie als het innemen van oppervlaktewater ten behoeve van drinkwaterproductie te kunnen vaststellen, zullen metingen gedaan moeten worden in oppervlaktewateren, zowel bij recreatieplaatsen als bij drinkwater innamepunten.

3) Omdat humane pathogene virussen vaak lastig te meten zijn in water zou het meten van andere micro-organismen zoals bacteriofagen en enterovirussen een goed alternatief kunnen zijn. Daartoe moet eerst de relatie tussen het voorkomen van rotavirussen, NLV, bacteriofagen, reovirussen en enterovirussen bekend zijn. Dit kan onderzocht worden door zowel in rioolwater, influent en effluent, als in oppervlaktewater, recreatiewater en innamepunten voor drinkwaterproductie, de concentraties van de genoemde micro-organismen te meten.

4) Een goed alternatief voor de drinkwatersector zou kunnen zijn dat de pathogenen (NLV/rotavirus) gemeten worden in het ruwe water (grondstof), waarna de verwijdering van deze pathogenen tijdens productie bepaald wordt met een alternatief micro-organisme (b.v. bacteriofaag).

Literatuur

- Bergmans, A.M.C., J.W. Groothedde, J.F.P. Schellekens, J.D.A. van Embden, J.A. Ossewaarde, and L.M. Schouls. 1995. Etiology of cat scratch disease: comparison of polymerase chain reaction detection of *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) and *Afipia felis* DNA with serology and skin tests. *J. Infect. Dis.* **171**:916-923.
- Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-van Dillen, and J. van der Noorda. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**:495-503.
- Borgdorff, M. W.; M.P.G. Koopmans, E.S.M. Goosen, and M.J. Sprenger. 1995. Surveillance of gastro-enteritis. *Lancet.* **346**(8978):842-843.
- Fields, B. N., D.M. Knipe, P.M. Howley, R.M. Chanock, J.L. Melnick, T.P. Monath, B. Roizman, and S.E. Straus, Editors. 1996. *Fields virology*. 3 ed. Philadelphia: Lippincott-Raven, pp. 783-810.
- Husain, M., P. Seth, and S. Broor. 1995. Detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reaction in feces from children with acute gastro-enteritis. *Arch. Virol.*
- Kaplan, J.E., R. Feldman, D.S. Campbell, C. Lookabaugh, and G.W. Gary. 1982. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastro-enteritis. *Am. J. Public Health* **72**:1329-1332.
- Koopmans, M.P.G, and I. van Asperen. 1999. Epidemiology of rotavirus in The Netherlands. *Acta Paediatrica Suppl* 426:31-37.
- Kuritsky J.N., M.T. Osterholm, J.A. Korlath, K.E. White, J.E. Kaplan 1985. *J. Infect. Dis.* **151**(3):568.
- Mulders, M.N., M.P.G. Koopmans, W. Lodder, H.G.A.M. van der Avoort, and A.M. van Loon. Molecular tools in support of the global Polio eradication campaign. Chapter 9: PhD thesis, University of Amsterdam: Studies on the development of improved methods for the detection of Poliovirus in environmental samples. December 12 1997.
- Okada S., S. Sekine, T. Ando, Y. Hayashi, M. Murau, K. Yabuuchi, T. Miki, M. Ohashi 1990 *J. Clin. Microbiol.* **28**(6):1244-1248.
- Pöyry, T., M. Stenvik, and T. Hovi. 1988. Viruses in sewage waters during and after poliomyelitis outbreak and subsequent nation-wide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:371-374.
- Van der Peer Y., De Wachter R. 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees fro the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* **10**, 569-570

- Van Olphen, M., J.G. Kapsenberg, E. van de Baan, and W.A. Kroon. 1984. Removal of enteric viruses from surface water at eight waterworks in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:927-932.
- Vinje, J., and M.P.G. Koopmans. 1996. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastro-enteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.* **174**:610-615.
- Vinje, J., S.A. Altena, and M.P.G. Koopmans. 1997. The incidence and genetic variability of Small Round-Structured Viruses in outbreaks of gastro-enteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.* **176**:1374-1378.

Bijlage 1 Verzendlijst

1. DGM, Directeur Drinkwater, Water, landbouw, Mr. A.B. Holtkamp
2. Hoofdinspecteur Milieuhygiëne, ir. P.J. Verkerk
3. Plaatsvervangend Directeur-Generaal milieubeheer, Dr. ir. B.C.J. Zoeteman
4. Ir. W. Cramer, DGM/DWL
5. Dr. B. Haring, DGM/DWL
6. Depot Nederlandse Publikaties en Nederlandse Bibliografie, Den Haag
7. Directie RIVM
8. Prof. dr. ir. D. Kromhout, Directeur Sector 2
9. Dr. G. Elzinga, Directeur Sector 5
10. Dr. ir. A.M. Henken, Hoofd MGB
11. Dr. A.H. Havelaar. plv. Hoofd MGB
12. Dr. T.G. Kimman, Hoofd LIO
12. Ir. A.H.M. Bresser, Hoofd LWD
13. Ir. J.F. Versteegh, LWD
14. W. van de Poel (MGB)
- 15-25 Kiwa werkgroep Microbiologische Methoden, prof. dr. ir. D. van der Kooij
26. G.J. Medema (Kiwa NV)
27. E. Duizer (LIO)
28. Y. van Duynhoven (CIE)
29. M. de Wit (CIE)
30. W. v. Pelt (CIE/MGB)
- 31-36 Auteurs
37. SBD/Voorlichting & Public Relations
38. Bureau Rapportenregistratie
39. Bibliotheek RIVM
- 40-55 Bureau Rapportenbeheer
- 56-70 Reserve exemplaren

Bijlage 2. Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses and rotaviruses in sewage samples associated with outbreaks of gastro-enteritis

W.J. LODDER¹, J. VINJÉ², R. VAN DE HEIDE¹, A.M. DE RODA HUSMAN¹, E.J.T.M. LEENEN¹, AND M.P.G. KOOPMANS^{2*}.

ABSTRACT

In this study, we describe a molecular method for the detection of Norwalk-like virus (NLV) and rotavirus RNA in sewage water concentrates including its application for monitoring of raw sewage in conjunction with confirmed outbreaks of viral gastro-enteritis. At one of the three locations with a suspected NLV-outbreak, a follow-up survey was done of a downstream pumping-engine-station and a sewage treatment plant, where samples were collected with intervals of approximately 3 weeks during 4 months. Virus was concentrated from the raw sewage by (conventional) filter adsorption-elution followed by two-phase separation. RNA was extracted from the final concentrate by binding to glassbeads.

NLV was detected by reverse-transcriptase chain reaction amplification (RT-PCR) in all initial sewage samples which were collected at locations where an outbreak of gastro-enteritis had been reported. Nucleotide sequence analysis of the PCR products revealed that the patient strains and the strains found in the initial sewage samples were identical. At two of these locations rotavirus was also found in the sewage samples. In addition, NLV was detected by RT-PCR in 10 of the 11 follow-up samples, and rotavirus in 7 of these. After cloning of 10 of the NLV-RT-PCR products and nucleotide sequence analysis of 5 clones per sample, 6 out of 10 specimens were found to contain multiple NLV-genotypes, indicating cocirculation of several types. The remaining four sewage extracts contained only one genetic type of NLV. The amount of virus in the samples was estimated by testing 10-fold serial dilutions by RT-PCR, and was found to be quite variable with maximum levels as high as 10^7 RNA containing particles per litre. Our findings imply that there is a potential risk of waterborne transmission of NLV and rotavirus. Our results also suggest that the burden of illness of NLV or rotavirus associated gastro-enteritis in the general population is higher than has been estimated from investigations of outbreaks.

INTRODUCTION

Viral gastro-enteritis is a common illness that can affect people of all age groups. The most common viral pathogens are the Norwalk-like caliciviruses (NLV), also known as small round structured viruses, which are associated with epidemic gastro-enteritis in people of all age groups, and group A rotaviruses, which are the most common cause of endemic gastro-enteritis in children. The Norwalk-like viruses are positive stranded RNA viruses, that have been classified as members of the family *Caliciviridae*, along with a second proposed genus of human enteric caliciviruses (Sapporo-like viruses) and two genera of animal calicivirus, designated vesivirus and lagovirus (12, 25). Rotaviruses are double stranded RNA viruses with a genome of 11 segments and have been classified as members of the family *Reoviridae* (13).

The NLV have been implicated in numerous foodborne and waterborne outbreaks (reviewed in ref. 14). Outbreaks of NLV gastro-enteritis have been associated with drinking of faecally contaminated water (15, 20, 33), and with swimming in contaminated recreational water (17). Although less common, waterborne outbreaks of rotavirus have also been reported (8).

Contamination of surface water by sewage or from other (human) faecal waste sources is a public health concern. Until now, routine microbiological quality control of such surface waters is performed by the enumeration of faecal coliform bacteria, and occasionally water samples are also screened for the presence of enteroviruses. However, it is clear that there is no correlation between the levels of faecal bacteria with those of viruses, which cause gastro-enteritis (21). Therefore, it would be better to screen waters also for specific, known pathogens. Based on such screening waters could be marked as being safe or not with respect to those pathogens tested.

A method with a low detection limit is required since in environmental samples virus concentrations are expected to be low. Detection and characterisation of NLVs has been hampered by the lack of an *in vitro* culture system or an animal model. However, the recent cloning and sequencing of the genome of two prototypes of NLV -Norwalk virus and Southampton virus (12, 19) has allowed the development of reverse-transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) based diagnostic assays, which are highly sensitive and specific, and have

a low detection limit (1, 11, 30). Detection of rotavirus in clinical specimens is generally done by immunoassays such as enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and Latex Agglutination assays. Several highly sensitive RT-PCR assays for the detection of group A rotaviruses in stools have been developed (10, 32).

Recently, RT-PCR based methods have been adapted for the detection of NLV or other enteric viruses in sewage/surface water (2, 6, 7, 9, 22, 26, 27). This enables studies of the role of different environmental reservoirs in transport and possible transmission of NLV and rotavirus. However, few groups (2, 6, 9, 27) have addressed the use of these assays in field surveys. In this study, we adapted a sewage concentration method (24) for the molecular detection of NLV and rotavirus, and used it to monitor viral presence and viral load at 3 different locations during one winter-season. In addition, sewage water samples were collected following outbreaks of gastro-enteritis of suspected viral origin. In addition, the genetic variation of outbreak and sewage NLV strains was analysed by sequence analysis. The data obtained were compared with data from laboratory surveillance for viral gastro-enteritis in humans.

MATERIALS AND METHODS

Stool specimens and water samples.

NLV positive stool specimens were used for the optimisation of the assays. These specimens were obtained from patients with gastro-enteritis and have been screened previously by RT-PCR and by electron microscopy (30). Sewage samples (10 litre) were collected at a pumping-engine-station, near the location where the previous week (NLV) outbreaks had been reported. This was repeated approximately 3 months later. On one location (Apeldoorn), sampling was repeated at 3- weekly intervals at the nearby pumping-engine station and sewage treatment plant (treating sewage from 140,000 inhabitant equivalents), in the period from February to May 1998. The specimens were stored at 4°C until further testing was done.

Description of outbreaks.

Sewage samples were collected during and after three outbreaks of gastro-enteritis that had been reported to the National Institute of Health and the Environment (RIVM) by municipal health services. The outbreaks occurred in November 1997, December 1997 and March 1998 in nursing homes in the cities of Reeuwijk, Apeldoorn and Enkhuisen (the Netherlands) (Table 1) respectively. Based on the epidemiological criteria described by Kaplan *et al.* (16) the outbreaks were suspected to be caused by viruses. Collection of sewage samples could be initiated within 48 hours after notification. Stool specimens were collected from persons with and without reported illness. They were tested for the presence of *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Shigella* spp. by routine culture, and for the presence of group A rotavirus, adenovirus types 40/41 and astrovirus by ELISA or NLV by RT-PCR (NLV) (30). Outbreaks were diagnosed as associated with NLV when a minimum of 50% of stool specimens from cases tested positive with a significantly lower percentage of positives in the controls (31). The three outbreaks tested positive for NLV and negative for the other pathogens.

Table 1. Description of the outbreaks

	Reeuwijk	Apeldoorn	Enkhuisen
attack rate	67%	48%	45%
number of people ill	40	46	40
first day of illness	1997 November 13	1997 December 4	1998 March 22
last day of illness	not known	1997 December 12	1998 March 30
first sewage sample	1997 November 18	1997 December 10	1998 April 1

Rotavirus laboratory surveillance.

In the Netherlands, a passive reporting system of laboratory data has been in place since 1976. The 17 participating virological laboratories report test results for a list of viruses, including rotavirus, on a weekly basis, as well as patient characteristics such as age and sex of the patient. The data on rotavirus were extracted from the database to determine the peak month of rotavirus activity during the study period (18). There is no national database on NLV infections or outbreaks in the Netherlands. Outbreaks of gastroenteritis are reported to regional health inspection services, who refer specimens to the RIVM when a viral cause is suspected.

Concentration of 10 litre sewage water samples.

Sewage water was first concentrated by a conventional filter adsorption-elution method (29). Briefly, magnesiumchloride was added to 10 litres of sewage water to a final concentration of 0.05 M, to enable formation of a virus-magnesium complex. By reducing the pH to 3.8 these complexes adsorb to a negatively charged cartridge filter (1.2 µm Nominal; Millipore, Etten-Leur, the Netherlands). Viruses were eluted from the filter with a 3% beef extract (Difco, Amsterdam, the Netherlands) solution, to which TRIS was added, to a final concentration of 0.05 M to set the pH at 9.0. The typical retentate volume is approximately 600 ml. The precipitate was dissolved and neutralised with a concentrated acetic acid buffer (pH 5.0) to a final pH of approximately 7.4. The resulting eluate was used in the two-phase separation method.

Concentration and purification of virus from the eluate by the two-phase separation-method.

This method is based on the selective distribution of viruses in two incompatible phases, and was done as described (24), with slight modifications. We chose this method based on comparative evaluation of three sample processing methods because yields of amplifiable RNA were reproducibly highest with this method (23). Briefly, 600 ml eluate, supplemented with 1% (w/v) Dextran T40 (Pharmacia, Roosendaal, the Netherlands), 10% (w/v) PEG 6000 (Merck, Amsterdam, the Netherlands), 0.2 M NaCl (Merck), and 10 mM phosphate buffer (pH 7.2) were mixed for 1 h at 4°C on a horizontal shaker. Subsequently, the suspension was transferred to a separation funnel and left overnight at 4°C. After separation, the bottom phase and the interphase were harvested. Further purification was done by spin-column gel chromatography using Sephadex G200 (ICN, Zoetermeer, the Netherlands), and by ultrafiltration in a Centricon 100 microconcentrator with a 100,000 MW cut off level (Amicon, Dronten, the Netherlands). The average retentate volumes were 1.5-2.5 ml.

RNA extraction.

Part of the retentate volume obtained from the two-phase separation method was further processed in a modified method of Boom (4). This method is based on binding of RNA to silica beads in the presence of a high molarity solution of guanidinium isothiocyanate (GuSCN; Fluka, Zwijndrecht, the Netherlands). We increased the volume that can readily be extracted by adding the solid reagents to the sewage concentrate instead of using lysis buffer as prescribed in the original protocol. Briefly, 0.35% (w/v) solid GuSCN, 25 mM EDTA (pH 8.0; ICN), 55 mM Tris-HCl (pH 6.4; Biosolve, Valkenswaard, the Netherlands), and 15 µl silica bead suspension were added per ml sewage concentrate, resulting in a final volume of 1.7 ml. The sample was mixed on a horizontal shaker, and subsequently centrifuged at 13,000 x g for 30 sec. to pellet the silica particles. The pellet was washed twice with a GuSCN containing washing buffer L2 (4), twice with ethanol 70% (v/v), and once with acetone. After removal of the acetone by evaporation, the RNA was eluted in distilled water with 200 U/ml RNAGuard (Pharmacia), and was used directly in the RT-PCR.

NLV RT-PCR.

We used a single round RT-PCR assay that had been developed for the specific detection of NLV in stool specimens from humans (31). The assay detects over 85% of a panel of different antigenic types of NLV, and gives a visible PCR product following amplification of an estimated 30 genomic copies after RNA extraction from feces (30). NLV-specific primers were used which anneal to a part of the NLV genome coding for the viral RNA polymerase gene (ORF1). The RT-PCR was done as described earlier (31) with slight modifications. Briefly, 5 µl RNA was added to a mixture containing 50 pmol specific primer JV13, 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 1 mM deoxynucleoside triphosphates (dNTPs), and 5 U of avian myeloblastoma virus (AMV) RT (Boehringer Mannheim, Almere, the Netherlands) in a final reaction volume of 15 µl. The mixture was incubated at 42°C for 1 h, heated 5 min at 94°C to denature the enzyme and then placed on ice. Five µl of the RT mixture was added to the PCR mix, containing 10 mM Tris-HCl (pH 9.2), 75 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 2.5 U AmpliTaq (Perkin Elmer, Nieuwerkerk a/d IJssel, The Netherlands), and 15 pmol primer JV12. Mineral oil was added and 40 amplification cycles, each of 1 min at 94°C, 1 min 30 s at 37°C, and 1 min at 74°C, were performed.

Rotavirus RT-PCR.

RT-PCR was done with primers directed to the VP7 gene, as described by Husain *et al.* (10), with slight modifications. Briefly, 10 µl RNA was added to a mixture containing 75 pmol of both specific rotavirus primers (10). The mixture was denatured at 95°C for 5 min and immediately placed on ice to prevent renaturation. The

reverse transcriptase reaction was performed in a 25 µl reaction volume consisting of 10 mM TRIS-HCl (pH 8.3), 75 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 250 µM dNTPs, 1 mM DTT, and 2.5 U of avian myeloblastoma virus (AMV) RT (Boehringer Mannheim, Almere, the Netherlands). The mixture was incubated at 42°C for 1 h, heated 5 min at 95°C to denature the enzyme and then placed on ice. Ten µl of the RT mixture was added to the PCR mix, containing 10 mM TRIS-HCl (pH 9.2), 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTPs, 1.5 U AmpliTaq (Perkin Elmer). Mineral oil was added and 40 amplification cycles, each of 1 min at 94°C, 1 min at 55°C, and 30 sec at 72°C, were performed. The last cycle included an elongation step of 7 min at 74°C followed by cooling at 4°C. The detection limit of the assay was determined to be 3-30 TCID₅₀ of group A rotavirus strain WA per ml.

Gel electrophoresis, Southern blotting and hybridisation.

The amplification products were analysed by electrophoresis in 2% agarose gels and visualised under UV illumination after staining with ethidium bromide. For Southern blotting, the PCR products were denatured in 0.5 M NaOH for 30 min and transferred to a positively charged nylon membrane (Amersham, 's Hertogenbosch, the Netherlands) by vacuum blotting (Millipore).

Hybridisation of NLV was done as described (3), with slight modifications. Briefly, the nylon membranes were prehybridised for 30 min at 42°C in 10 ml 2X SSPE with 0.1% SDS. Twenty pmol of each of the 5'-biotinylated probes (31) were added and the membranes were left for 45 min at 42°C to allow hybridisation. The membranes were washed 3 times for 10 min at 42°C with 2X SSPE and 0.1% SDS, and subsequently incubated with 1:4000 diluted streptavidin-peroxidase conjugate (Boehringer Mannheim) for 45 min at 42°C in 10 ml of 2X SSPE and 0.5% SDS. After washing three times with 2X SSPE containing 0.5%, 0.1%, and no SDS, respectively, for 10 min, the membranes were incubated for 2 min with the ECL detection reagents (Amersham), and then were exposed to an ECL hyperfilm (Amersham) for 30 min to visualise bound probe.

Hybridisation of rotavirus was done as described for the NLV-specific hybridisation except that the hybridisation temperature for rotavirus was 40°C, and 20 pmol of the 5'-biotinylated rotavirus-specific probe, VP7 (CRA AAY AAR TGG ATA TCR ATG GG) was used.

Cloning and sequencing of PCR products.

NLV hybridisation positive products were excised from a 2% agarose gel and purified using a Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Hilden, Germany). After cloning into a TA-vector (Invitrogen, Leek, the Netherlands), from at least 5 clones the recombinant plasmids were purified (5).

PCR products and recombinant plasmids were sequenced using a BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer). DNA sequences were edited using SeqEd (V1.03, Applied Biosystems).

Phylogenetic and statistical analysis.

Nucleotide sequences were analysed using Geneworks (V2.5, Intelligenetics, Mountain View, CA) and imported into the Treecon software package (28) for distance calculation using the Jukes and Cantor correction for evolutionary rate. Trees were constructed using the Neighbor-Joining method and the confidence values of the internal lineages within the dendrogram were assessed by repeating the analysis after resampling of the data to reduce the influence of input order of sequences (bootstrapping, 100 rounds) (28).

RESULTS

Sensitivity and specificity of the method for detection of NLV in sewage by RT-PCR.

Quantitative enumeration of NLV can not be conducted due to the absence of a tissue culture system. Therefore, in a previous study we have evaluated the concentration method by using titrated stock suspensions of poliovirus strains in spike experiments, to test for virus viability and to determine the recovery of the methods (details published elsewhere (23)). To obtain an indication of the amount of NLV present in the samples, the detection limit has been based on the greatest 10-fold serial dilution, giving a visible RT-PCR product (data not shown). In its present format we were able to detect 30 RNA containing rotavirus or NLV particles (31).

Amplification of sewage samples sometimes produced non-specific bands. However, after Southern hybridisation only bands of the expected size (327 bp for NLV and 293 bp for rotavirus) were observed indicating specific hybridisation and presence of the specific virus. All negative control samples, that had been tested in parallel to monitor for contamination, remained negative. Positive control samples, artificially seeded with NLV of a known genetic cluster, showed a single, specific 327-bp fragment after both RT-PCR and Southern hybridisation.

GuSCN extraction.

The extraction method described by Boom *et al.* (4) allows for input of small volumes (100-200 µl) only. To enable higher input volumes, we modified the procedure by adding solid GuSCN and the other components of the lysis buffer to the sample. The PCR results of testing serial dilutions of RNA extracted with this method were compared with those obtained with the conventional GuSCN extraction procedure but no significant difference was observed, based on the intensity of the bands of the amplified DNA on an agarose gel (data not shown). Therefore, the modified procedure was used throughout the study.

Table 2. Detection of NLV and rotavirus RNA in sewage samples collected during and after the outbreaks described in Table 1.

Location and sampling date		Period of illness	Positive dilutions	
Date	Week number		NLV	rotavirus
Reeuwijk		13-Nov-97 → ?		
18-Nov-97	47		10 ⁴	10 ²
11-Feb-98	7		- ^a	10 ³
Apeldoorn		04-Dec-97 → 12-Dec-97		
10-Dec-97	50		10 ¹	10 ²
11-Dec-97	50		10 ⁰	10 ¹
12-Dec-97	50		-	10 ⁴
16-Dec-97	51		10 ⁰	10 ¹
12-Feb-98	7		-	10 ³
Enkhuizen		22-Mar-98 → 30-Mar-98		
01-Apr-98	15		10 ⁷	-
02-Apr-98	15		10 ⁶	-
06-Apr-98	16		10 ⁶	-

^a - not detected

Detection of NLV and rotavirus at field locations of suspected NLV outbreaks.

(i) Reeuwijk. The extract from the sewage sample collected 5 days after the first day of illness at the location of the reported outbreak, tested positive in the NLV RT-PCR procedure at dilutions 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, and 10⁻⁴ (Table 2). Five µl of undiluted RNA extract, used in the RT-PCR, corresponds with ca. 0.78 litre initial sewage sample, and NLV RNA was still detected in the 10,000-fold-diluted RNA extract, indicating the presence of at least 10⁴ RNA-containing NLV particles per litre. As a positive control for the concentration method we had seeded a sewage sample with a positive stool sample and rotavirus WA, but the spiked virus was not recovered because of the high titre of NLV that already was present in the sewage sample. The nucleotide sequence obtained from the PCR products from the sewage samples was identical to the sequence obtained from the stool samples of the patients in the nursing home, and was clearly different from that of the NLV strain that had been used for spiking (Figure 1).

These sewage extracts were also tested in the rotavirus RT-PCR. Rotavirus RNA was still detected in the 100-fold diluted RNA extract. After 3 months a follow-up sample was collected at the same location. This sample

was negative in the NLV RT-PCR but gave a positive signal in the rotavirus RT-PCR (Table 2) in a volume corresponding with 0.59 litre of the initial sample (5 µl of undiluted RNA-extract). Rotavirus RNA was still detected in the 1,000-fold diluted RNA extract.

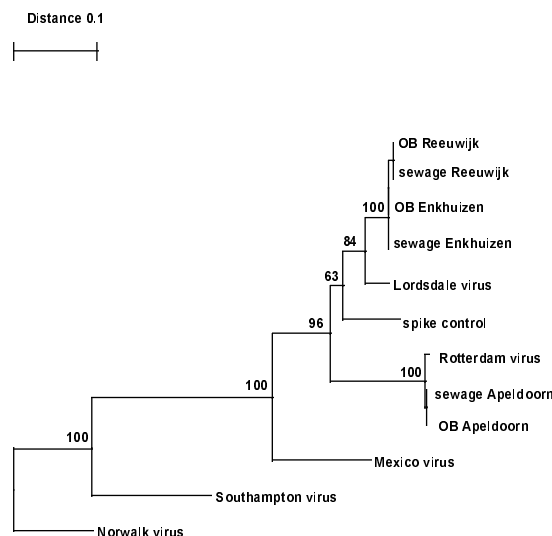


Figure 1. Phylogenetic tree based on a 145bp region of the RNA polymerase gene showing the relationships among NLV from genogroup I (Norwalk virus and Southampton virus), genogroup II (Lordsdale- and Mexico virus) and outbreak strains (OB) detected in stool specimens of patients and in sewage samples collected shortly after notification of the outbreaks. Genbank accession numbers of the prototype strains were as follows: Norwalk (M87661), Southampton (L070418), Lordsdale (X86557), and Mexico (U22498). The TREECON program was used to generate the dendrogram. (26a)

(ii) Apeldoorn. The sewage samples were collected 6, 7, 8, 12 days and 3 months after first day of illness at the location of the reported outbreak. Five µl undiluted RNA extract, used in the RT-PCR, corresponded with ca. 0.5 litre initial sewage sample. NLV RNA was detected in the 10-fold diluted RNA extract from the sewage sample obtained after 6 days, and in the undiluted RNA extract from the sewage samples from 7, and 12 days. The sewage sample obtained after 8 days gave no positive RT-PCR signal. All these samples were positive in the rotavirus RT-PCR. Rotavirus RNA was still detected in the 100-fold diluted RNA extract from the sewage samples obtained after 6 days, 10-fold diluted from the sewage samples after 7, and 12 days, and 10,000-fold diluted from the sewage sample after 8 days. In the seeded sewage sample, Rotavirus RNA was still detected in the 1,000-fold diluted RNA extract. After approximately 3 months a follow-up sample was taken. This sample was negative in the NLV RT-PCR but gave a positive signal in the rotavirus RT-PCR in a volume corresponding with 0.53 litre of the initial sample (5 µl of undiluted RNA-extract). Rotavirus RNA was still detected in the 1,000-fold diluted RNA extract.

(iii) Enkhuizen. Sewage samples, collected 10, 11, and 15 days after the first day of illness at the location of the reported outbreak, were tested using the NLV RT-PCR procedure (Table 2). Five µl undiluted RNA extract correspond with 0.53, 0.33, or 0.76 litre initial sewage sample. NLV RNA was still detected in the 10⁷-fold diluted RNA extract from the sewage sample obtained after 10 days, and still in the 10⁶-fold diluted RNA extract from the sewage samples obtained 11, and 15 days. These sewage samples were also tested with the rotavirus RT-PCR, but yielded no positive RT-PCR signal.

Detection of NLV and rotavirus in a follow-up field study at 2 locations in Apeldoorn.

Additional sewage samples were collected near the outbreak location in the city of Apeldoorn at the pumping-engine-station and at the sewage treatment plant with an interval of approximately 3 weeks during approximately 4 months. These samples were tested both with the NLV and rotavirus RT-PCR (Table 3). With one exception, all samples contained NLV, and 7 out of 11 samples contained rotavirus RNA. In one specimen, the titre of rotavirus exceeded that of NLV. In the other specimens, titres of NLV were between 1 and 3¹⁰ log steps higher than those of rotavirus.

Table 3. Detection of NLV and rotavirus RNA in sewage samples collected during the follow-up study in Apeldoorn

Location	Date of sampling		Positive dilution	
	Date	Week number	NLV	rotavirus
Pumping-engine-station	11-Feb-98	7	- ^a	10 ³
Pumping-engine-station	06-Mar-98	10	10 ³	10 ²
Sewage treatment plant	06-Mar-98	10	10 ³	10 ²
Pumping-engine-station	25-Mar-98	13	10 ⁴	10 ²
Sewage treatment plant	25-Mar-98	13	10 ²	-
Pumping-engine-station	15-Apr-98	16	10 ³	-
Sewage treatment plant	15-Apr-98	16	10 ³	10 ²
Pumping-engine-station	06-May-98	19	10 ¹	10 ⁰
Sewage treatment plant	06-May-98	19	10 ¹	10 ²
Pumping-engine-station	27-May-98	22	10 ¹	-
Sewage treatment plant	27-May-98	22	10 ²	-

^a - not detected

Rotavirus laboratory surveillance.

The laboratory surveillance network showed a rise in the weekly number of rotavirus positive test results starting in December with a peak end of February (Figure 2). This is the typical pattern of rotavirus seasonality in the Netherlands, although the 1997/1998 winter peak was a little earlier than usually. In the same period, NLV outbreaks were reported to the RIVM in November (2 outbreaks), December (2), January (3), February (1), March (4), and June (2). The 4 rotavirus negative sewage samples were collected in the months after the rotavirus peak was observed from laboratory surveillance.

Rotavirus laboratory surveillance: '97/'98

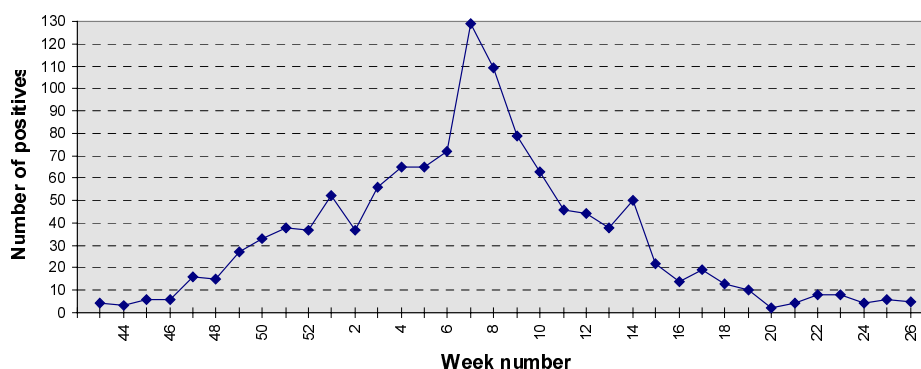


Figure 2. Results from rotavirus laboratory surveillance data (1997/1998) received from stool samples.

Genetic variability of NLV strains.

To investigate the genetic variability of NLV strains from stool and sewage samples, a 145-nucleotide stretch of the RNA polymerase gene was sequenced. Strains from stool and initial sewage sample were identical for each outbreak (Figure 1). The viruses found in the Reeuwijk and Enkhuizen outbreak were closely related to the Lordsdale-Bristol cluster within genogroup II of NLV (30). The viruses found in the Apeldoorn outbreak belong to a different genotype within genogroup II, first detected in the Netherlands in stool samples from an outbreak that occurred in Rotterdam early in 1997 (Figure 1). This Rotterdam genotype was detected in all 3 sewage samples collected during the Apeldoorn outbreak. However, since most PCR products could not be sequenced directly, we assumed that more strains may cocirculate and therefore be present in a single sewage sample. Therefore, we cloned the PCR products and sequenced individual clones. By this approach, several additional genotypes were detected in 6 of the 11 specimens for which individual clones were obtained (Figure 3). Both genogroup I and genogroup II NLV were found.

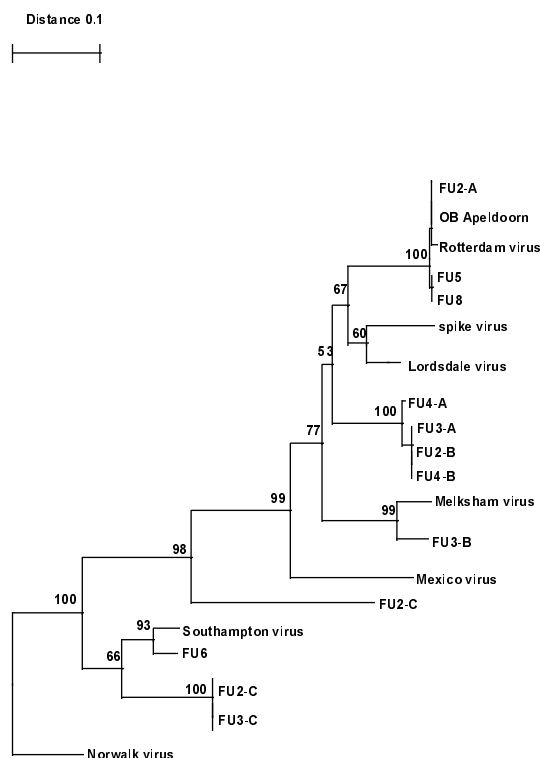


Figure 3. Phylogenetic tree based on a 145bp region of the polymerase gene showing the relationships among the initial Apeldoorn outbreak strain (OB Apeldoorn), clones of follow-up sewage samples (FU2, FU3, FU4, FU5, FU6 and FU8), Rotterdam virus, and prototype NLVs (Norwalk virus, Southampton virus, Mexico virus, Melksham virus and Lordsdale virus).

DISCUSSION

In this study, we describe a molecular method for the detection of NLV and rotavirus RNA in sewage water concentrates and its application for monitoring outbreaks during a winter season. The method encompasses a classical sample concentration step by adsorption and elution of viruses using a membrane filter, followed by further purification and concentration by a two-phase separation method, a Sephadex G200 column, ultrafiltration, and a GuSCN extraction step. The resulting RNA extracts were subjected to RT-PCR assays that had been optimised for diagnostic purposes. Although RT-PCR assays can not discriminate between infectious and non-infectious viruses, it offers a rapid way for screening different kinds of samples for viral RNA. In its present format, we were able to detect an estimated 30 RNA-containing rotavirus and NLV particles (31). Since little is known about the level of contamination in environmental samples with viruses other than enteroviruses, we chose to start monitoring sewage samples in conjunction with outbreaks of viral gastro-enteritis, presumed to be associated with NLV. The sewage samples were taken close to the source of the outbreak, because viral shedding is then in progress and high concentrations of NLV are expected. At one of the locations, a follow-up survey was done at the pumping-engine-station and the nearby sewage treatment plant with an interval of approximately 3 weeks during 4 months.

For reference, we also screened for rotaviruses, as the incidence of rotavirus infection in the general population in the Netherlands has been estimated from a population-based survey and from laboratory surveillance data.

NLV could be detected in all first sewage samples at locations where an outbreak of gastro-enteritis, diagnosed as an NLV outbreak, was reported. The viral nucleotide sequences obtained from the PCR products from these initial sewage samples corresponded with the viral sequences found in stool specimen of the patients. As expected, the nucleotide sequence of the positive virus controls (spiked samples) was different. NLV RNA was found in highly diluted RNA extracts, corresponding with initial sample volumes between 1 and 500 ml. In the samples taken three months after the outbreak in Apeldoorn the NLV PCR was negative, further confirming that the positive samples found earlier were outbreak-related. The results obtained may demonstrate the sensitivity of the method used and/or that high numbers of viruses were present in the sewage.

NLV could also be detected in the follow-up samples taken at the pumping-engine station and the sewage treatment plant. In Apeldoorn ten of 11 samples taken were found positive for NLV (even in highly diluted RNA extracts). Since the nucleotide sequences of the strains found varied within and between samples, this could not

be attributed to a specific outbreak or to carry-over contamination during the RT-PCR. Our data show that different strains of NLV can be found in water samples independent of an outbreak and thus that transmission of NLV may be waterborne. The results also suggest that the burden of illness of NLV-associated gastro-enteritis in the general population is far greater than can be estimated from investigation of outbreaks, since NLV were found more often and at higher concentrations than rotavirus. This can not be explained by differences in the detection limit of the RT-PCR assays, as they both were within the same range. Taking into account that NLV are generally shed to lower maximal titres than rotavirus, our data suggest that NLV may exceed the importance of rotaviruses as a cause of illness in the general population. We are currently planning a population-based survey to address this issue. In addition, future research will focus on monitoring surface and recreational waters to investigate the presence of these viruses and evaluate the hypothesis that NLV outbreaks in the Netherlands may be waterborne.

Rotavirus was detected in 7 of the 10 first sewage samples at locations where an outbreak of gastro-enteritis, diagnosed as an NLV outbreak, was reported. In the samples taken in Enkhuizen no rotavirus could be detected. Seven of the follow-up samples collected at the pumping-engine station and the sewage treatment plant in Apeldoorn were positive for rotavirus. During the peak shedding of rotavirus (between week 4 and 12), all sewage samples were found positive for rotavirus.

Detection of NLV (2, 9) and rotavirus RNA (27, 6, 9) in water samples has been described previously, but generally only a few samples were analysed. Gilgen *et al.* (9) analysed 6 river samples for NLV and rotavirus RNA, which were all positive for both NLV and rotavirus. However, the authors did not sequence the PCR products to rule out possible contamination. The additional value of the results obtained in this study is that a correlation between the nucleotide sequences of the NLV PCR products from the stool specimens of patients, and the sequences of the viral RNA from the sewage samples was found, an approach which has been used to confirm common-source outbreaks (2). The positive NLV signal in the sewage samples could be associated with the outbreak. At later time points in sewage samples taken at the pumping-engine station and at the sewage treatment plant, a great diversity of NLV strains was found. The results found at the sewage treatment plant reflects a large population that was covered.

In conclusion, this study shows that the concentration and purification method described is applicable for detection of NLV and rotavirus by RT-PCR in water samples. We showed that during the study period the viral load in sewage was high for NLV and for rotavirus. We conclude that water may be an important transmission route for NLV and rotavirus infection in the Netherlands. In future research, the presence of NLV and rotaviruses in surface, recreational and drinking water will have to be determined to evaluate this hypothesis.

ACKNOWLEDGEMENTS

This research was funded by the Ministry of Housing, Physical Planning and the Environment (The Netherlands) and KIWA Research and Consultancy (project nr. 289202 Water Microbiology). We would like to thank A. Koks, A. Keja, and F. Slijkerman, from the regional health services Gouda, Apeldoorn, and Hoorn, respectively, for epidemiological investigations and collection of stool specimens. We also thank the microbiologists participating in the laboratory surveillance network, as well as the Society for Clinical Virology for supplying data on rotavirus detection. Furthermore, we thank the employees of the sewage treatment plant in Apeldoorn, and Olaf E.M. Nijst and Petra M. de Bree for technical assistance.

REFERENCES

- 1: Ando T., S.S. Monroe, J.R. Gentsch, Q. Jin, D.C. Lewis, and R.I. Glass. 1995. Detection and differentiation of antigenically distinct small round-structured viruses (Norwalk-like viruses) by reverse transcription-PCR and southern hybridization. *J Clin. Microbiol.* **33**:64-71.
- 2: Beller, M., A. Ellis, S.H. Lee, M.A. Drobot, S.A. Jenkerson, E. Funk, M.D. Sobsey, O.D. Simmons, S.S. Monroe, T. Ando, J. Noel, M. Petric, J.P. Middaugh, and J.S. Spika. 1997. Outbreak of viral gastro-enteritis due to a contaminated well. *JAMA.* **278**:563-568.
- 3: Bergmans, A.M.C., J.W. Groothedde, J.F.P. Schellekens, J.D.A. van Embden, J.A. Ossewaarde, and L.M. Schouls. 1995. Etiology of cat scratch disease: comparison of polymerase chain reaction detection of *Bartonella* (formerly *Rochalimaea*) and *Afipia felis* DNA with serology and skin tests. *J. Infect. Dis.* **171**:916-923.
- 4: Boom, R., C.J.A. Sol, M.M.M. Salimans, C.L. Jansen, P.M.E. Wertheim-van Dillen, and J. van der Noorda. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J. Clin. Microbiol.* **28**:495-503.
- 5: Del Sal, G., G. Manfioletti, and C. Schneider. 1989. The CTAB-DNA precipitation method: a common mini-scale preparation of template DNA from phagemids, phages or plasmids suitable for sequencing. *Biotechniques.* **7**:514-520.
- 6: Dubois, E., F. Le Guyader, L. Haugarreau, H. Kopecka, M. Cormier, and M. Pommepuy. 1997. Molecular epidemiological survey of rotaviruses in sewage by reverse transcriptase seminested PCR and restriction fragment length polymorphism assay. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**:1-7.
- 7: Gajardo, R., M. Pintó, and A. Bosch. 1995. Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus in environmental samples. *Wat. Sci. Tech.* **31**:371-374.

- 8: **Gerba, C.P., J.B. Rose, C.N. Haas, and K.D. Crabtree.** 1996. Waterborne rotavirus: A risk assessment. *Water Res.* **30**:2929-2940.
- 9: **Gilgen, M., D. Germann, J. Lüthy, and Ph. Hübner.** 1997. Three-step isolation method for sensitive detection of enterovirus, rotavirus, hepatitis A virus, and small round structured viruses in water samples. *Int. J. Food Microbiol.* **37**:189-199.
- 10: **Husain, M., P. Seth, and S. Broor.** 1995. Detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reaction in faeces from children with acute gastro-enteritis. *Arch. Virol.* **140**:1225-1233.
- 11: **Jiang, X., J. Wang, D.Y. Graham, and M.K. Estes.** 1992. Detection of Norwalk virus in stool by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **30**:2529-2534.
- 12: **Jiang, X.I., M. Wang, K. Wang, and M.K. Estes.** 1993. Sequence and genomic organization of Norwalk virus. *Virology.* **195**:51-61.
- 13: **Kapikian, A.Z., and Chanock, R.M.** 1996. Rotaviruses p. 1657-1708. *In: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, R.M. Chanock, J.L. Melnick, T.P. Monath, B. Roizman, and S.E. Straus (ed.), Fields virology, 3rd ed., vol 1.* Lippincott-Raven, Philadelphia.
- 14: **Kapikian, A.Z., M.K. Estes, and R.M. Chanock.** 1996. Norwalk group of viruses, p. 783-810. *In: B.N. Fields, D.M. Knipe, P.M. Howley, R.M. Chanock, J.L. Melnick, T.P. Monath, B. Roizman, and S.E. Straus (ed.), Fields virology, 3rd ed., vol 1.* Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
- 15: **Kaplan, J.E., R.A. Goodman, L.B. Schonberger, E.C. Lippy, and G.W. Gary.** 1982. Gastro-enteritis due to Norwalk virus: an outbreak associated with municipal water system. *J. Infect. Dis.* **146**:190-197.
- 16: **Kaplan, J.E., R. Feldman, D.S. Campbell, C. Lookabaugh, and G.W. Gary.** 1982. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastro-enteritis. *Am. J. Public Health* **72**:1329-1332.
- 17: **Kappus, K.D., J.S. Marks, R.C. Holman, J.K. Bryant, C. Baker, G.W. Gary, and H.B. Greenberg.** 1982. An outbreak of Norwalk gastro-enteritis associated with swimming in a pool and secondary person-to-person transmission. *Am. J. Epidemiol.* **116**:834-839.
- 18: **Koopmans, M.P.G., and I. van Asperen.** 1999. Epidemiology of rotavirus in The Netherlands. *Acta Paediatrica Suppl* **426**:31-37.
- 19: **Lambden, P.R., E.O. Caul, C.R. Ashley, and I.N. Clarke.** 1993. Sequence and genome organization of a human small round-structured (Norwalk-like) virus. *Science.* **259**:516-519.
- 20: **Lawson, H.W., M.M. Braun, R.I.M. Glass, S.W. Stine, S.S. Monroe, H.K. Atrash, L.E. Lee, and S.J. Englander.** 1991. Waterborne outbreak of Norwalk virus gastro-enteritis at a Southwest US resort: role of geological formations in contamination of well water. *Lancet* **337**:1200-1204.
- 21: **Le Guyader, F., Dubois, E., Menard, D., Pommepuy, M.** 1994. Detection of hepatitis A virus, rotavirus, and enterovirus in naturally contaminated shellfish and sediment by reverse transcription-semi-nested PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **1994**:60:3665-71.
- 22: **Mehnert, D.U., K.E. Stewien, C.M. Hársi, A.P.S. Queiroz, J.M.G. Candeias, and J.A.N. Candeias.** 1997. Detection of rotavirus in sewage and creek water: efficiency of the concentration method. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **92**:97-100.
- 23: **Mulders, M.N., M.P.G. Koopmans, W. Lodder, H.G.A.M. van der Avoort, and A.M. van Loon.** Molecular tools in support of the global Polio eradication campaign. Chapter 9: PhD thesis, University of Amsterdam: Studies on the development of improved methods for the detection of Poliovirus in environmental samples. December 12 1997.
- 24: **Pöyry, T., M. Stenvik, and T. Hovi.** 1988. Viruses in sewage waters during and after poliomyelitis outbreak and subsequent nation-wide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**:371-374.
- 25: **Pringle, C.R.** 1998. Virus Taxonomy - San Diego 1998. *Arch. Virol.* **143**:1449-1459.
- 26: **Schwab, K.J., R. de Leon, and M.D. Sobsey.** 1995. Concentration and purification of beef extract mock eluates from water samples for the detection of enteroviruses, hepatitis A virus, and Norwalk virus by reverse transcription-PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**:531-537.
- 27: **Tsai, Y.-L., B. Tran, L.R. Sangermano, and C.J. Palmer.** 1994. Detection of poliovirus, hepatitis A virus, and rotavirus from sewage and ocean water by triplex reverse transcriptase PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**:2400-2407.
- 28: **Van der Peer Y., De Wachter R.** 1994. TREECON for Windows: a software package for the construction and drawing of evolutionary trees from the Microsoft Windows environment. *Comput. Applic. Biosci.* **10**, 569-570
- 29: **Van Olphen, M., J.G. Kapsenberg, E. van de Baan, and W.A. Kroon.** 1984. Removal of enteric viruses from surface water at eight waterworks in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**:927-932.
- 30: **Vinje, J., and M.P.G. Koopmans.** 1996. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastro-enteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.* **174**:610-615.
- 31: **Vinje, J., S.A. Altena, and M.P.G. Koopmans.** 1997. The incidence and genetic variability of Small Round-Structured Viruses in outbreaks of gastro-enteritis in the Netherlands. *J. Infect. Dis.* **176**:1374-1378.
- 32: **Wilde, J., J. Eiden, and R. Yolken.** 1990. Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* **28**:1300-1307.
- 33: **Wilson, R., L.J. Anderson, R.C. Holman, G.W. Gary, and H.B. Greenberg.** 1982. Waterborne gastro-enteritis due to the Norwalk agent: clinical epidemiologic investigation. *Am. J. Public Health* **72**:72-74.