



Briefrapport 330371003/2009

S. Rutjes | F. Lodder-Verschoor | A. M. de. Roda Husman

# Harmonisatie van virusdiagnostiek in humane, voedsel- en omgevingsmonsters

Inventarisatie van methoden toegepast door VWA en RIVM

RIVM briefrapport 330371003/2009

## **Harmonisatie van virusdiagnostiek in humane, voedsel- en omgevingsmonsters**

Inventarisatie van methoden toegepast door VWA en RIVM

Saskia Rutjes  
Froukje Lodder-Verschoor  
Ana Maria de Roda Husman

Contact:  
Saskia Rutjes  
LZO  
saskia.rutjes@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Voedsel en Waren Autoriteit, in het kader van Project V/330701/01/VO 'Virussen in Voedsel'

© RIVM 2009

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: 'Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave'.

## Rapport in het kort

### **Harmonisatie van virusdiagnostiek in humane, voedsel- en omgevingsmonsters**

Inventarisatie van methoden toegepast door VWA en RIVM

Bronopsporing van voedsel- en wateroverdraagbare virusinfecties is mogelijk met de methoden die gebruikt worden voor het aantonen van norovirus, hepatitis E virus en adenovirus in bron en patiënt, zodat maatregelen genomen kunnen worden om verdere ziektegevallen te voorkomen.

Voor het opsporen van de besmettingsbron van voedsel- of wateroverdraagbare virusinfecties moet op zijn minst een deel van het virus in zowel de patiënt als de potentiële bron worden aangetoond. Een vergelijking tussen het virus in bron en patiënt is alleen mogelijk als methoden gebruikt worden, waarmee hetzelfde deel van het virus wordt aangetoond. Om te bepalen of dit het geval is, is voor zes virussen geïnventariseerd welke detectiemethoden momenteel gebruikt worden door de laboratoria die betrokken zijn bij virusonderzoek in patiënten, voedsel en omgeving.

Methoden voor detectie van norovirus, hepatitis E virus en adenovirus bleken voldoende vergelijkbaar te zijn voor tracersing van een potentiële bron. Voor enterovirus, hepatitis A virus en rotavirus is nadere afstemming noodzakelijk, omdat door de betrokken laboratoria een ander deel van het virus wordt aangetoond.

Trefwoorden: voedsel- en wateroverdraagbare virusinfectie, bronopsporing, harmonisatie, moleculaire tracersing, PCR

# Abstract

## **Harmonization of virus diagnostics in human, food and environmental samples**

Inventory of methods used by VWA and RIVM

Source tracking of food and waterborne virus infections is feasible using the current methods for detection of norovirus, hepatitis E virus and adenovirus in source and patient, enabling intervention measures to prevent similar diseases in the future.

To trace the source of a food or waterborne virus infection at least part of the virus has to be detected both in the patient and in the contaminated source. A comparison of the detected viruses in the source and the patient is only possible when methods are used, which detect the same part of the virus. To study this, the virus detection methods used by the laboratories which are involved in detection of viruses in patients, food and the environment have been compared for six different viruses.

Methods for detection of norovirus, hepatitis E virus and adenovirus showed to be sufficiently comparable for molecular source tracking. Detection methods for enterovirus, hepatitis A virus and rotavirus need harmonization, because the laboratories involved detect different parts of the virus.

Key words: food and waterborne, source tracking, harmonization, molecular tracing, PCR

## **Inhoud**

<b>Samenvatting</b>	<b>6</b>
<b>Inleiding</b>	<b>7</b>
<b>Moleulaire Detectiemethoden</b>	<b>9</b>
<b>Resultaten</b>	<b>12</b>
<b>Discussie</b>	<b>18</b>
<b>Aanbevelingen</b>	<b>20</b>
<b>Dankwoord</b>	<b>21</b>
<b>Literatuur</b>	<b>22</b>

## Samenvatting

Om moleculaire tracersing van bron naar patiënt mogelijk te maken is geïnventariseerd welke PCRs in Nederland worden uitgevoerd voor de detectie van enterale virussen in voedsel, omgevingsmonsters en patiënten. Hiertoe zijn de PCRs vergeleken die door de VWA worden gedaan voor de analyse van voedselmonsters, door RIVM-LIS voor de analyse van patiëntenmonsters en door RIVM-LZO voor de analyse van voedsel- en omgevingsmonsters. Primer en probe sequenties voor detectie van de volgende virussen zijn geïnventariseerd: NoV GGI en GGII, HAV, HEV, rota-, entero-, en adenovirus. Per virus is de ligging van de primers en probes ten opzichte van een referentiestam bepaald om na te gaan of en hoeveel overlap tussen de geamplificeerde PCR producten aanwezig is. Hoe groter de overlap tussen de PCR producten, hoe meer sequentie informatie gegenereerd kan worden voor moleculaire tracersing.

De PCRs zoals deze door de betrokken laboratoria worden uitgevoerd voor de detectie van NoV, HEV, en adenovirus leveren PCR producten op waarmee moleculaire tracersing mogelijk zou moeten zijn. De PCRs voor detectie van deze virussen behoeven momenteel dus geen verdere afstemming. Voor enterovirus kunnen sequenties afkomstig van patiënten vergeleken worden met virus sequenties afkomstig uit voedsel. Om echter ook een vergelijking te kunnen maken met omgevingsmonsters, dient verdere afstemming over de te gebruiken PCR plaats te vinden. Voor HAV en rotavirus is sequentievergelijking met de huidige PCRs niet mogelijk, omdat met de PCRs die worden uitgevoerd voor de humane diagnostiek andere delen van het genoom worden gedetecteerd dan met de PCRs die voor voedsel- en omgevingsonderzoek worden gedaan. Om moleculaire tracersing van bron naar patiënt mogelijk te maken dienen de PCRs voor detectie van HAV en rotavirus door de betrokken laboratoria te worden afgestemd.

Voor het vergelijken van sequenties die door de verschillende laboratoria verkregen zijn, is het van belang dat tenminste een groot deel van de geamplificeerde delen met elkaar overlappen. Hiervoor is het niet noodzakelijk dat dezelfde protocollen worden gebruikt. Ieder laboratorium kan de PCR op de betreffende matrix optimaliseren en de methode toepassen waarmee de beste resultaten verkregen worden.

Indien virussen in bron en patiënt overeenkomen is dit een reden om maatregelen te nemen om verdere ziektegevallen in de toekomst te voorkomen. Om echter te bewijzen of bron en patiënt direct geassocieerd zijn, is moleculaire tracersing niet voldoende, maar is altijd aanvullend onderzoek nodig, waarbij naast een moleculair biologische benadering ook een epidemiologische, virologische en/of modelmatige benadering betrokken moet worden.

## Inleiding

De meeste voedsel- en water overdraagbare virussen zijn humane, fecaal-oraal overdraagbare virussen. Deze virussen worden door geïnfecteerde personen met de feces uitgescheiden, waarna het na passage van een rioolwaterzuiveringsinstallatie geloosd wordt op het oppervlaktewater. Dit gezuiverde rioolwater bevat nog steeds aanzienlijke concentraties pathogene virussen (31;45). Ook lozing van ongezuiverd rioolwater komt voor als riooloverstorten plaatsvinden bijv. na hevige regenval. Blootstelling aan dit fecaal verontreinigde oppervlaktewater kan via verschillende routes weer leiden tot infectie, bijv. door consumptie van met dit water besproeide gewassen of door recreatie. Verder kunnen geïnfecteerde individuen een rol spelen bij directe besmetting van voedsel, bijv. bij het plukken van fruit of bij het prepareren van kant en klare voedselproducten, maar ook bij besmetting van persoon tot persoon, zonder tussenkomst van voedsel of omgeving. Ook zoönotische virussen kunnen voedsel- of wateroverdraagbaar zijn. Van hepatitis E virus (HEV) was bekend dat het in staat is om met name in ontwikkelingslanden grote watergerelateerde epidemieën te veroorzaken (35). Recentelijk bleek dat ook in geïndustrialiseerde landen een endemische HEV variant voorkomt, met prevalenties van meer dan 50% in de varkens populatie. De variant die bij varkens voorkomt is vergelijkbaar met de variant die bij hepatitis E patiënten wordt gevonden die voorafgaand aan de incubatieperiode niet in het buitenland zijn geweest (36). Consumptie van met HEV besmet wilde zwijnen- en hertenvlees heeft in Japan geleid tot hepatitis E bij patiënten (30;44). HEV is alom detecteerbaar in het milieu, maar welke rol het milieu speelt bij transmissie van deze variant van HEV naar de mens is onduidelijk (37).

Uit het toenemende aantal wetenschappelijke publicaties in internationale tijdschriften blijkt dat gezondheidsdiensten, wetenschappers en beleidsmakers zich steeds meer bewust zijn van het risico op voedsel- en watergerelateerde virusinfecties. Door WHO en FAO zijn als voedsel-overdraagbare virussen norovirus (NoV) en hepatitis A virus (HAV) verkozen tot virussen die geassocieerd worden met de hoogste ziektelast, met name in scheldieren, verse producten en kant en klare voedselproducten (4) en rotavirussen de virussen met de hoogste ziektelast in drinkwater (51). Ook de Nederlandse overheid probeert maatregelen te nemen om de kans op voedsel- en water gerelateerde virusinfecties in de toekomst te verminderen. Hiertoe heeft het RIVM in opdracht van de VWA criteria opgesteld waarmee voedselgerelateerde explosies kunnen worden onderscheiden van explosies met een andere bron, bijv. persoon-tot-persoon besmetting (48). De volgende vier criteria zijn aan de hand van berekeningen met gegevens over explosies uit het verleden geselecteerd; 1) De explosie moet traceerbaar zijn naar een restaurant of cateraar, 2) De explosie moet bestaan uit meer dan 24 gevallen, veroorzaakt door één bron, 3) Bij de explosie zijn meerdere gevallen binnen één huishouden betrokken, 4) De explosie moet veroorzaakt zijn door NoV stammen anders dan GGII.4. Een explosie is waarschijnlijk voedselgebonden als deze aan één of meer van deze criteria voldoet. De VWA kan vervolgens maatregelen nemen om vergelijkbare explosies in de toekomst te verminderen.

Ook op het gebied van drinkwater wordt door de overheid aandacht besteed aan wateroverdraagbare virussen. In het Waterleidingbesluit (2001) zijn nieuwe kwaliteitseisen opgenomen voor pathogene micro-organismen in drinkwater. Micro-organismen mogen niet in zodanige concentraties in het leidingwater voorkomen dat gevaar voor de volksgezondheid kan ontstaan. Voor bepaalde micro-organismen, waaronder (entero)virussen, moet op basis van metingen van deze micro-organismen in oppervlaktewater en gegevens over de verwijderingscapaciteit bij verschillende zuiveringsprocessen een kwantitatieve risicoanalyse voor het bereide leidingwater gedaan worden. Voor het berekende theoretische infectierisico geldt een voorlopige grenswaarde van één infectie per tienduizend personen per jaar. Indien het berekende infectierisico groter is dan de genoemde grenswaarde, dient de eigenaar met de toezichthouder te overleggen over te nemen maatregelen (38).

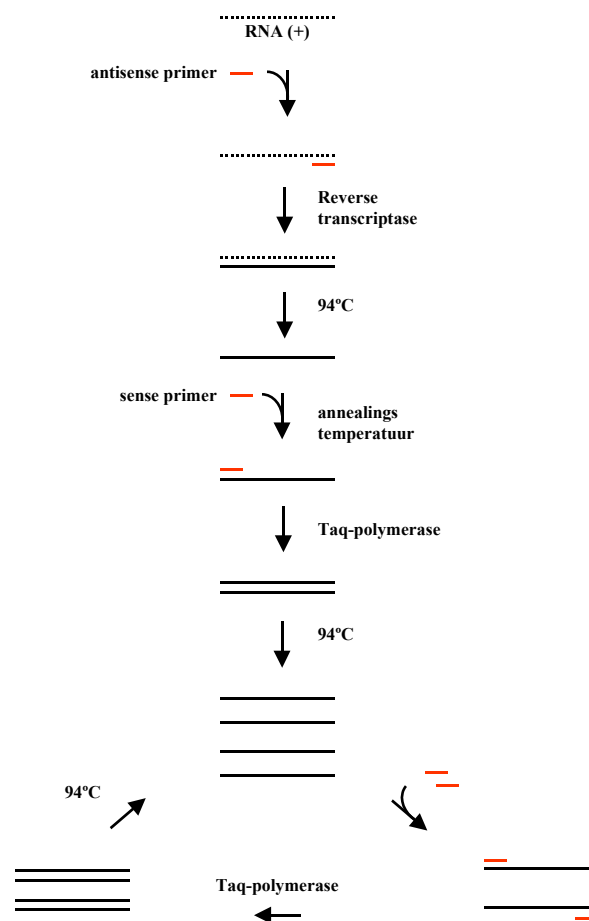


In Nederland wordt het aantal NoV gevallen per jaar geschat op 500.000. Naar schatting zijn 10 – 15% van deze gevallen toe te schrijven aan besmet voedsel (14), waarmee NoV van alle enterale virussen het vaakst betrokken is bij voedselgerelateerde explosies. HAV is veel minder vaak betrokken bij voedselexplosies, maar kan een ernstiger ziektebeeld geven, zeker bij volwassenen. De werkelijke betrokkenheid bij voedselexplosies is vermoedelijk meer dan gedacht, omdat door de incubatieperiode van 2 tot 6 weken onderrapportage waarschijnlijk is. Naast NoV (9;13;18;25) en HAV (7;15;16;40), kunnen ook andere gastroenterale virussen betrokken zijn bij voedsel- en watergerelateerde explosies, zoals enterovirus (2;23), HEV (30;44), rotavirus (3;16;19) en adenovirus (29).

Met behulp van moleculaire detectiemethoden kan de virus bron getraceerd worden. Het is dan essentieel dat zowel van patiëntenmonsters, als van voedsel en omgevingsmonsters sequenties worden verkregen van hetzelfde deel van het virus genoom. Deze rapportage beschrijft een inventarisatie van moleculaire detectie methoden die door de VWA (voedselmonsters), het Laboratorium voor Infectieziekten en Screening van het RIVM (RIVM-LIS) (patiëntenmonsters) en het Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie (RIVM-LZO) (voedsel- en omgevingsmonsters) gebruikt worden in uitbraakonderzoek voor detectie en typering van virussen, waarmee inzichtelijk wordt of detectiemethoden voldoende overeenkomen of nadere afstemming nodig is.

## Moleculaire Detectiemethoden

De meest gebruikte moleculaire methode voor detectie van virussen is gebaseerd op PCR (Polymerase Chain Reaction), waarmee het virale genoom wordt aangetoond door een deel van het genoom zo vaak te vermenigvuldigen dat een zichtbare hoeveelheid DNA wordt verkregen. Door het gebruik van twee selectieve primers, een sense en antisense primer, wordt specifiek het tussenliggende DNA fragment geamplificeerd. Het virale genoom vormt de basis voor de PCR. DNA virussen, zoals adenovirus, kunnen direct geamplificeerd worden. Omdat de meeste enterale virussen (NoV, HAV, HEV, entero- en rotavirus) 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 1). 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 worden gescheiden, 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 waaruit deze is opgebouwd.



Figuur 1: Schematische weergave van de RT-PCR reactie.

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 kopieën van het RNA gemaakt. Een schematische weergave van de RT-PCR reactie is te zien in Figuur 1.

De keuze van de primers bepaalt welk fragment van het genoom geamplificeerd wordt en uiteindelijk welke sequentie gegenereerd zal worden. Is de locatie van de primers gelegen in een geconserveerd fragment van het genoom dan zullen relatief veel virusvarianten kunnen worden gedetecteerd en zal de variabiliteit in de verkregen sequentie relatief klein zijn. Een dergelijke PCR is in de regel een gevoelige PCR, waarmee lage concentraties DNA of RNA kunnen worden gedetecteerd. Nadeel van een dergelijke detectie PCR is dat het onderscheidend vermogen van de resulterende sequentie meestal onvoldoende is voor moleculaire tracering. Als gekozen wordt voor primers die een variabel deel van het genoom amplificeren kunnen sequenties verkregen worden die geschikt zijn voor typering en moleculaire tracering. Nadeel van deze typeringsmethode is dat deze vaak ongevoeliger is dan een detectie PCR en dus niet altijd een sequentie kan worden verkregen. Verschillen zijn niet altijd zo extreem, bijv. voor HEV is de detectie PCR dusdanig onderscheidend dat van 46 HEV sequenties afkomstig van verschillende varkenshouderijen er slechts twee identiek zijn op een fragment van 148 nucleotiden (37). Voor moleculaire tracering is alleen het gedeelte van het PCR fragment bruikbaar dat gelegen is tussen de primers. De maximaal te gebruiken sequentie is dus de lengte van het PCR product min de lengte van de primers.

Het geamplificeerde DNA kan op verschillende manieren gedetecteerd worden. Bij de conventionele (RT-)PCR worden de verkregen PCR producten aan het eind van de reactie geanalyseerd door middel van agarosegel-electroforese (eindpunt detectie). Hierbij worden nucleïnezuren gescheiden op grootte. De producten kunnen vervolgens zichtbaar worden gemaakt door kleuring met bijv. SYBR-gold. Door deze kleuring worden alle nucleïnezuren aangekleurd, zowel de specifieke amplificaten als de bijproducten. Een specifieke detectiemethode wordt verkregen door het DNA uit de gel over te brengen op een filter (Southern blot), waarna het DNA gedetecteerd kan worden door te hybridiseren met een specifieke probe. De gehybridiseerde probe kan vervolgens zichtbaar gemaakt worden door de probe te incuberen met een geschikt substraat, waardoor een chemiluminescerend signaal ontstaat dat gedetecteerd kan worden.

Een alternatieve eindpunt detectiemethode is de nested PCR, waarbij op het PCR product met primers die tussen de eerder gebruikte primers gelokaliseerd zijn een tweede PCR wordt uitgevoerd. Nested PCR is meestal gevoeliger dan een PCR die uit één amplificatieronde bestaat, maar heeft als nadeel dat de methode gevoeliger is voor contaminatie.

Naast de eindpunt detectiemethoden kunnen PCR fragmenten ook 'real-time' gedetecteerd worden. Tijdens de amplificatiereactie wordt het DNA fluorescerend gelabeld. De fluorescentie wordt direct gemeten en uitgezet in een grafiek. Als voldoende fluorescerende kopieën zijn ontstaan zal een toename in fluorescentie zichtbaar worden, meestal vanaf ongeveer  $10^{11}$  kopieën. Ook bij real-time detectie kan gebruik gemaakt worden van kleurstoffen die nucleïnezuren aankleuren, bijv. SYBR-green, of van probes die gaan fluoresceren nadat ze gehybridiseerd zijn met een specifiek stuk DNA. Meestal kunnen met real-time PCR methoden minder lange fragmenten geamplificeerd worden dan met de conventionele PCR technieken, waardoor met real-time methoden dus ook minder sequentie informatie verkregen wordt. Voordeel is dat de methode snel is en beduidend minder arbeidsintensief dan de conventionele PCR technieken.

Door het RIVM-LZO, RIVM-LIS en de VWA worden alle hierboven beschreven methoden toegepast en zijn daarom meegenomen in de inventarisatie.

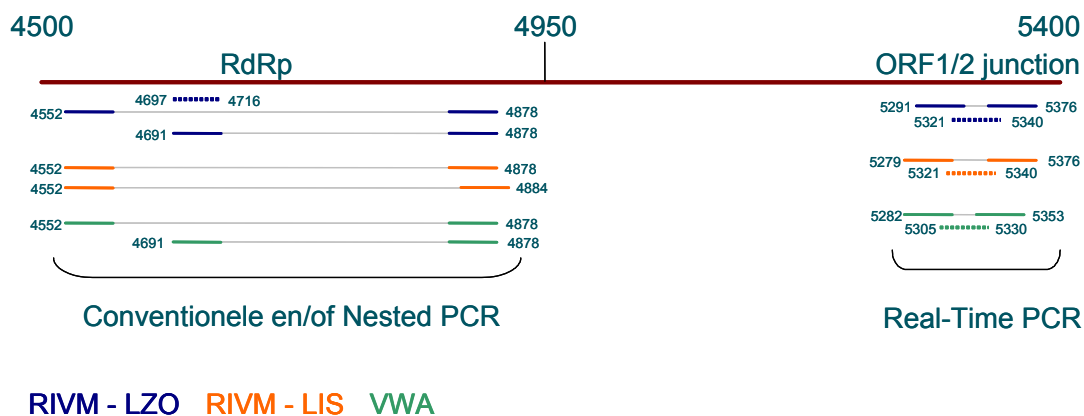


# Resultaten

Om de behoefte aan afstemming te peilen is geïnventariseerd welke PCRs gebruikt worden door de VWA voor de analyse van voedselmonsters, door RIVM-LIS voor de analyse van patiëntenmonsters en door RIVM-LZO voor de analyse van voedsel- en omgevingsmonsters. De sequenties van primers en probes die gebruikt worden voor detectie van NoV GGI en GGII, HAV, HEV, rota-, entero-, en adenovirus zijn vergeleken met de sequentie van een referentie stam om inzichtelijk te maken of en hoeveel overlap tussen de geamplificeerde PCR fragmenten aanwezig is. De ligging van de primers en probes ten opzichte van elkaar is hieronder per virus schematisch weergegeven. Details over de conventionele, nested en real-time PCRs, zoals de locatie van primers en probes op het genoom, functie van het geamplificeerde deel van het genoom, fragment lengte en referenties zijn te vinden in Bijlage 1.

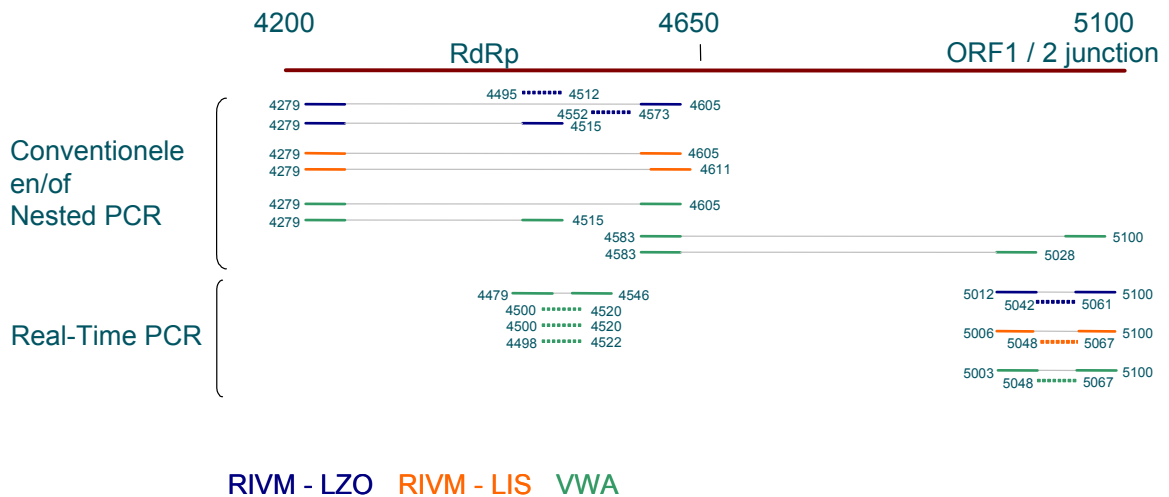
## Norovirus (NoV)

De sequenties van NoV GGI en GGII zijn dermate verschillend dat voor detectie van virussen in deze twee genogroepen verschillende primers moeten worden gebruikt. Zowel RIVM-LIS, RIVM-LZO als VWA hebben gekozen voor primers in dezelfde regio's: het RNA afhankelijke RNA polymerase (RdRp) voor detectie met de conventionele en nested PCR en de overgang tussen ORF1 en ORF2 (ORF1/2 junction) voor detectie met de real-time PCR (Fig 2, 3). De drie laboratoria gebruiken voor de conventionele PCR en de nested PCR dezelfde primers, zowel voor NoV GGI als GGII. De VWA heeft voor de detectie van GGII virussen nog een additionele nested PCR, waarbij gebruik wordt gemaakt van een primer set waarmee een lang fragment vanaf het RdRp tot aan de ORF1/2 junction geamplificeerd kan worden (Fig 3). De probes die gebruikt worden door RIVM-LIS en RIVM-LZO voor bevestiging van het PCR signaal zijn wel verschillend. Dit heeft echter geen effect op de gegenereerde sequenties. De real-time PCR fragmenten die met de verschillende PCRs verkregen worden hebben een overlap van maximaal 62 nt voor GGI (24 nt zonder primers) en 88 nt voor GGII



Figuur 2: Schematische weergave van de ligging van gebruikte primers en probe combinaties voor detectie van NoV GGI RNA. De gebruikte referentie stam is Norwalk (GenBank accession no. M87661). Van de sequentie van 7654 nt zijn nt 4500 - 5400 weergegeven. RdRp: RNA afhankelijke RNA polymerase.

(41 nt zonder primers). De lengtes van deze sequenties maakt ze te weinig informatief voor moleculaire tracersing. Ook het geconserveerde karakter van de ORF1/2 junction maakt dat deze NoV real-time PCRs beter geschikt zijn voor detectie dan typering of moleculaire tracersing. Omdat de drie laboratoria identieke primers in de RdRp regio gebruiken, is verdere afstemming voor detectie van NoV momenteel niet noodzakelijk.



Figuur 3: Schematische weergave van de ligging van gebruikte primers en probe combinaties voor detectie van NoV GGII RNA. De gebruikte referentie stam is Lordsdale (GenBank accession no. X86557). Van de sequentie van 7555 nt zijn nt 4200 - 5100 weergegeven. RdRp: RNA afhankelijke RNA polymerase.

### Hepatitis A virus (HAV)

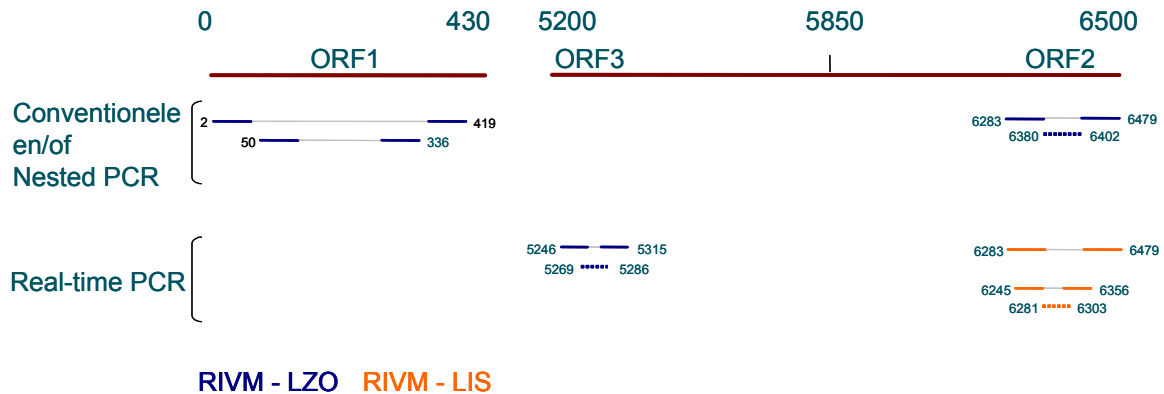
Voor detectie van HAV met conventionele PCR en/of nested PCR worden door RIVM-LIS, RIVM-LZO en VWA drie verschillende PCRs uitgevoerd, met primers gericht tegen verschillende delen van het genoom. RIVM LZO amplificeert een deel van de 5' non coding region (5' NCR), RIVM-LIS een deel coderend voor VP1/2a en VWA een deel coderend voor VP3-VP1 (Fig 4). Real-time PCR wordt door de drie laboratoria uitgevoerd op de 5' NCR, waarbij RIVM-LZO en VWA dezelfde primers gebruiken, RIVM-LIS amplificeert een meer downstream gelegen deel van de 5' NCR. VWA en RIVM-LZO verkrijgen met deze real-time PCR sequenties van 174 nt (137 nt zonder primers), wat betekent dat HAV sequenties verkregen uit voedsel- en omgevingsmonsters met elkaar vergeleken kunnen worden. Om een vergelijking van deze sequenties met HAV sequenties uit patiëntenmonsters mogelijk te maken is verdere afstemming noodzakelijk.



*Figuur 4: Schematische weergave van de ligging van gebruikte primers en probe combinaties voor detectie van HAV RNA. De gebruikte referentie stam is strain HM-175 (GenBank accession no. M14707). Van de sequentie van 7478 nt zijn de eerste 3450 nt weergegeven.*

### Hepatitis E virus (HEV)

PCRs voor detectie van HEV worden uitgevoerd door RIVM-LIS en RIVM-LZO, niet door VWA. RIVM-LZO amplificeert voor detectie van HEV RNA een fragment van 197 bp van ORF2, waarmee een bruikbare sequentie van 148 nt wordt verkregen (Fig 5). Als door amplificatie van 418 nt van ORF1 een zichtbaar PCR product wordt verkregen levert dit een bruikbare sequentie van 371 nt op. Meestal zal echter door de lagere gevoeligheid van deze PCR een tweede ronde van amplificatie nodig zijn (nested PCR) om voldoende PCR product te krijgen voor sequentie analyse. Het nested PCR product van 287 bp levert een sequentie op van 242 nt. RIVM-LIS voert voor detectie van HEV geen conventionele of nested PCRs uit, maar gebruikt voor de real-time PCR de primers voor amplificatie van een fragment van ORF2, die ook door RIVM-LZO gebruikt worden. Omdat het onderscheidend vermogen van dit fragment groot is, betekent dit dat door beide laboratoria een sequentie van 148 nt wordt gegenereerd die bruikbaar is voor typering. Verdere afstemming voor het verkrijgen van meer sequentie informatie, bijv. door amplificatie van een groter fragment van ORF2, zou wenselijk zijn voor een betrouwbaardere moleculaire tracement. Verder wordt bij RIVM-LZO een real-time PCR gedaan waarmee een fragment van 70 nt van ORF3 wordt geamplificeerd, wat betekent dat een bruikbare sequentie met een lengte van 34 nt wordt verkregen. Een dergelijk kleine sequentie in het geconserveerde ORF3 is te weinig informatief om te gebruiken voor typering. Deze real-time ORF3 PCR is echter erg gevoelig, wat hem zeer geschikt maakt als detectie PCR.



*Figuur 5: Schematische weergave van de ligging van gebruikte primers en probe combinaties voor detectie van HEV RNA. De gebruikte referentie stam is HEV-US1 (GenBank accession no. AF060668). Van de sequentie van 7202 nt zijn de eerste 6500 nt weergegeven.*

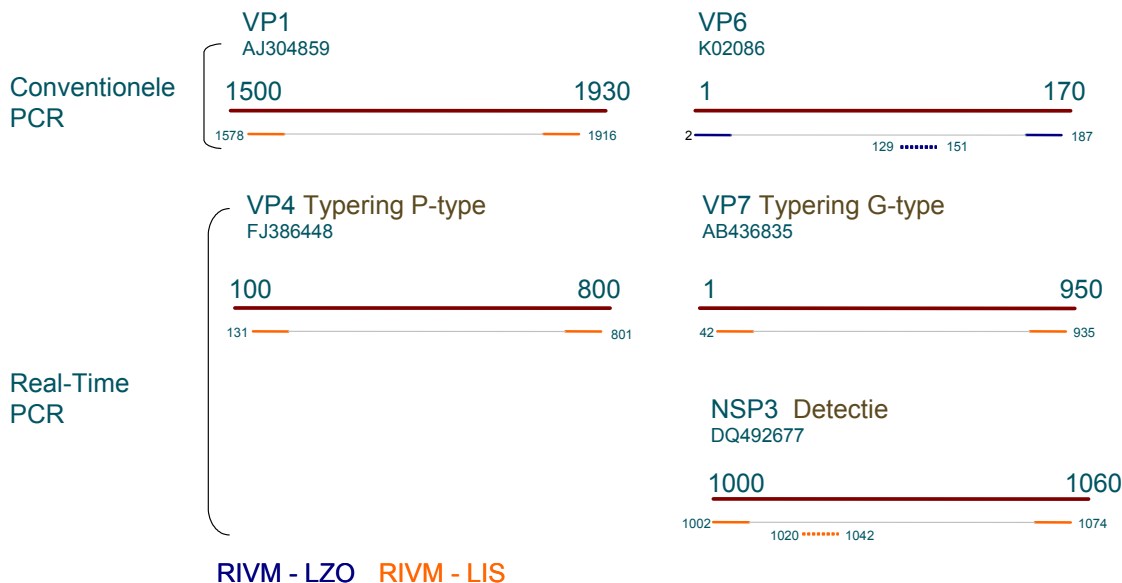
## Rotavirus

PCRs voor detectie van rotavirus worden uitgevoerd door RIVM-LIS en RIVM-LZO. Het rotavirus genoom is opgebouwd uit 11 segmenten van dubbelstrengs RNA. Elk segment codeert voor één van de structurele of niet-structurele eiwitten (17). RIVM-LIS heeft vier verschillende PCR's lopen voor detectie en typering van rotavirus, waarvan één conventioneel en drie real-time (Fig 6). Voor detectie van rotavirus worden de gensegmenten coderend voor VP1 en NSP3 geamplificeerd, voor typering de gensegmenten coderend voor VP4 en VP7. RIVM-LZO gebruikt een conventionele PCR voor detectie van VP6. Alle PCR's worden dus op verschillende gensegmenten uitgevoerd, wat betekent dat afstemming tussen RIVM-LIS en RIVM-LZO noodzakelijk is om moleculaire tracering van rotavirus afkomstig van patiënten en virussen afkomstig uit voedsel en water mogelijk te maken.

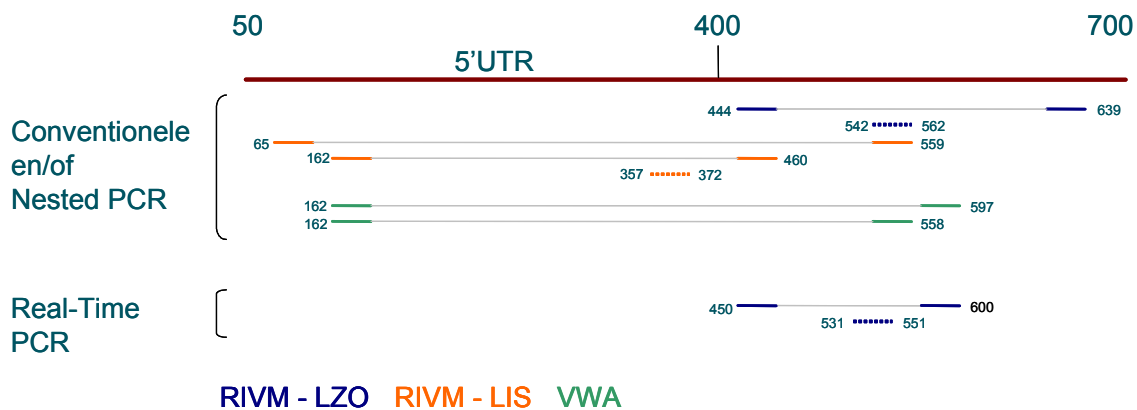
## Enterovirus

Enterovirus PCR's worden door de drie betreffende laboratoria uitgevoerd. Met alle PCR's wordt een deel van de 5' untranslated region (5' UTR) geamplificeerd (Fig 7). Door zowel RIVM-LIS als VWA wordt een nested PCR uitgevoerd. De PCR fragmenten van de eerste ronde van amplificatie hebben een overlap van 398 bp (359 zonder primers), maar meestal zal een tweede ronde van amplificatie nodig zijn om een PCR signaal te krijgen en daarmee voldoende DNA voor sequentieanalyse. De sequenties verkregen met deze nested PCR zijn voor 299 nt overlappend, waarvan 260 nt (zonder primers) bruikbaar zijn voor typering of moleculaire tracering. RIVM-LZO heeft zowel een conventionele PCR als een real-time PCR lopen op een meer downstream gelegen deel van de 5' UTR. De overlap met het tweede ronde PCR product van VWA is 114 nt (80 zonder primers), met RIVM-LIS is alleen de primer overlappend, wat betekent dat met de huidige PCR's geen moleculaire tracering kan gebeuren van sequenties afkomstig uit patiënten en omgevingsmonsters en op een fragment van 114 nt van sequenties afkomstig uit voedsel en omgeving. De PCR methoden voor detectie van enterovirussen behoeven daarom afstemming.





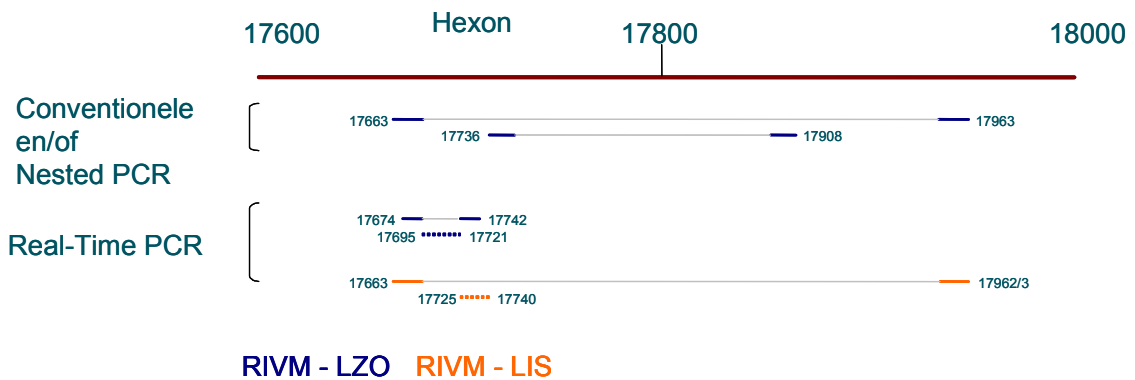
Figuur 6: Schematische weergave van de ligging van gebruikte primers en probe combinaties voor detectie van rotavirus RNA. De gebruikte referentie stammen zijn (GenBank accession no. AJ304859 (3309 nt), K02086 (1356 nt), FJ386448 (876 nt), AB436835 (1061 nt), DQ492677 (1071 nt)).



Figuur 7: Schematische weergave van de ligging van gebruikte primers en probe combinaties voor detectie van enterovirus RNA. De gebruikte referentie stam is strain Sabin 2 (GenBank accession no. X00595). Van de sequentie van 7439 nt zijn nt 50 - 700 weergegeven.

**Adenovirus**

Door RIVM-LIS en RIVM-LZO worden PCRs voor de detectie van adenovirus gedaan. Beide laboratoria amplificeren delen van het hexon gen (Fig 8). Door RIVM-LZO wordt een real-time PCR gedaan, waarmee een klein fragment wordt geamplificeerd, en is daarom meer geschikt voor detectie dan voor moleculaire tracering. Verder voert RIVM-LZO een nested PCR uit, waarvan de primers van de eerste ronde PCR door RIVM-LIS gebruikt worden in een real-time PCR. Bij een voldoende sterk PCR signaal van de eerste ronde PCR wordt hiermee een sequentie verkregen van 301 nt (255 zonder primers) die te gebruiken is voor typering en moleculaire tracering. Bij zwakkere PCR signalen wordt door RIVM-LZO een nested PCR uitgevoerd, waarmee een sequentie verkregen wordt van 173 nt (120 nt zonder primers) die overlappend is met de sequentie verkregen door RIVM-LIS. Afstemming van de te gebruiken PCRs lijkt hiervoor op dit moment niet direct noodzakelijk.



*Figuur 8: Schematische weergave van de ligging van gebruikte primers en probe combinaties voor detectie van adenovirus DNA. De gebruikte referentie stam is human adenovirus F (GenBank accession no. L19443). Van de sequentie van 34214 nt zijn nt 17600 - 18000 weergegeven.*

## Discussie

Om moleculaire tracersing van bron naar patiënt mogelijk te maken is een inventarisatie gedaan van de PCRs die worden uitgevoerd voor detectie van voedsel- en wateroverdraagbare virussen in voedsel- en omgevingsmonsters en patiënten. De PCRs zoals deze door RIVM-LIS, RIVM-LZO en VWA voor de detectie van NoV, HEV, en adenovirus worden uitgevoerd leveren bruikbare PCR producten op voor het vergelijken van sequenties, waarmee moleculaire tracersing mogelijk zou moeten zijn. De PCRs voor detectie van deze virussen behoeven dus momenteel geen verdere afstemming. Voor enterovirus worden door VWA en RIVM-LIS vergelijkbare delen van het genoom geamplificeerd, waardoor sequenties afkomstig van patiënten vergeleken kunnen worden met die afkomstig uit voedsel. Om echter ook een vergelijking te kunnen maken met omgevingsmonsters, dient afstemming van de PCR, met name tussen RIVM-LZO en RIVM-LIS plaats te vinden. Voor HAV en rotavirus is sequentievergelijking met de huidige PCRs niet mogelijk, omdat met de PCRs die worden uitgevoerd voor de humane diagnostiek andere delen van het genoom worden gedetecteerd dan met de PCRs die voor voedsel- en omgevingsonderzoek worden gedaan. Om moleculaire tracersing van bron naar patiënt mogelijk te maken dienen de PCRs voor detectie van HAV en rotavirus door de betrokken laboratoria te worden afgestemd.

Omdat in voedsel- en omgevingsmonsters het contaminerende virus vaak in lage concentraties aanwezig is, of omdat de contaminatie niet homogeen over het te onderzoeken monster verdeeld is, is detectie in dit type monsters vaak gecompliceerder dan detectie van het virus in patiënten materiaal. Ook zijn in omgevingsmonsters vaak stoffen aanwezig die een negatief effect hebben op de PCR, en zijn vaak hoge concentraties andere micro-organismen aanwezig, wat detectie van de lage concentraties virussen in deze monsters bemoeilijkt. In klinische monsters zijn vaak hogere concentraties van slechts één pathogeen aanwezig, waardoor remming van de PCR minder effect heeft op de uitslag. Een PCR waarmee virus in patiëntenmonsters goed gedetecteerd kan worden, zal daarom niet altijd geschikt zijn voor detectie in voedsel- of omgevingsmonsters. Om een uniforme PCR te krijgen waarmee de verschillende laboratoria in de te onderzoeken matrixen goede resultaten verkrijgen, dient in overleg gekozen te worden voor een specifieke primer set om daarna de PCR op de betreffende matrix te optimaliseren. Zo bleek een rotavirus PCR die is toegepast voor detectie van VP7 rotavirus RNA in klinische samples (26) te weinig efficiënt voor detectie van rotavirus in watermonsters. Na hertesten van deze watermonsters met een PCR waarmee rotavirus VP6 RNA werd aangetoond (49), bleek dat een groot aantal monsters die eerder met de VP7 PCR negatief waren, toch rotavirus RNA bevatten (ongepubliceerde data). Ook detectie van HAV in watermonsters met een PCR gericht tegen de VP1-P2a regio als de VP3-VP1 regio, die vaak gebruikt worden in de humane diagnostiek (46), bleek veel minder efficiënt dan detectie van de 5' NCR, die beschreven is voor de detectie in schelpdieren (7). In twee van 12 onderzochte rivierwatermonsters werd HAV gedetecteerd met de PCR gericht tegen de 5' NCR, met de PCRs uit de humane diagnostiek werd in geen van de 12 watermonsters HAV gedetecteerd.

Voor het vergelijken van sequenties die door de verschillende laboratoria verkregen zijn, is het van belang dat hetzelfde deel van het genoom gesequenced wordt, of dat tenminste een groot deel van de geamplificeerde delen met elkaar overlappen. Hiervoor is het niet noodzakelijk dat dezelfde protocollen worden gebruikt. Ieder laboratorium kan de PCR op de te onderzoeken matrix optimaliseren en de methode gebruiken waarmee de beste resultaten verkregen worden. Zo kan het ene laboratorium een nested PCR doen, en het andere laboratorium een real-time PCR voor amplificatie van hetzelfde fragment. Voor voedsel- en omgevingsmonsters zal vaak een interne controle RNA/DNA worden toegevoegd om de efficiëntie van de PCR te controleren. Als de interne controle niet gedetecteerd

wordt, is de PCR niet goed verlopen en kan dus geen uitspraak gedaan worden over de aan- of afwezigheid van target RNA/DNA. Door het toevoegen van zo'n interne controle worden in een positief monster twee PCR signalen gegenereerd; één van de interne controle en één van het te onderzoeken virus. Deze monsters kunnen daarom niet direct gesequenced worden, maar moeten eerst gekloneerd worden om de individuele PCR producten te kunnen sequencen. Bovendien zijn in omgevingsmonsters, zoals watermonsters, vaak meerdere varianten van een virus in lage concentraties aanwezig, waardoor sequentie analyse ook zonder de aanwezigheid van een interne controle onvermijdelijk is. In klinische monsters zijn virus concentraties vaak hoger en is vaak één virus variant aanwezig, wat zorgt dat kloneren van de PCR producten niet nodig is voor het verkrijgen van een sequentie. Met het afstemmen van de PCRs voor moleculaire tracersing zullen laboratoria dus nog steeds hun eigen protocollen hebben, omdat door elke matrix andere specifieke eisen aan een PCR gesteld worden.

Voor NoV, HEV en adenovirus worden door de betreffende laboratoria PCRs uitgevoerd op hetzelfde deel van het genoom, waarmee een eerste link kan worden gelegd tussen patiënt en bron door middel van moleculaire tracersing. Indien een identieke sequentie gevonden wordt in patiënt en bron is dit een eerste aanwijzing dat de bron de veroorzaker is van de infectie. Er is echter meer informatie nodig om transmissie van bron naar patiënt te bewijzen. Met aanvullend epidemiologisch onderzoek kan bijv. worden aangetoond of de patiënt het besmette voedsel daadwerkelijk heeft geconsumeerd of door recreatie aan het gecontamineerde oppervlaktewater is blootgesteld. Ook kan een groter deel van het genoom gesequenced worden, want hoe groter de sequentie die identiek is hoe waarschijnlijker dat het om hetzelfde virus gaat. Zo is in 2005 een HEV sequentie van 148 nt van ORF2 die bij varkens gevonden is ook bij een hepatitis E patiënt aangetroffen (37). Epidemiologisch kon geen connectie tussen patiënt en varken worden gelegd. Door verdere analyse van het HEV genoom op ORF1 is uit het varkensmonster een HEV sequentie verkregen. Helaas is met de ORF1 PCR geen sequentie verkregen van het HEV van de patiënt, waardoor onvoldoende bewijs is geleverd voor transmissie van varken naar patiënt. Voor het bewijzen van een directe associatie tussen bron en patiënt zal dus altijd aanvullend onderzoek nodig zijn, zowel epidemiologisch als moleculair biologisch.

## Aanbevelingen

- 1) Verdere afstemming voor met name de typering van HAV en rotavirus is noodzakelijk tussen RIVM-LIS, RIVM-LZO en VWA om moleculaire tracersing van bron naar patiënt mogelijk te maken. Dit kan worden gefaciliteerd in de coördinatiegroep 'Alimentaire Infecties'.
- 2) Het is van belang om sequenties van voedsel- en wateroverdraagbare virussen, zoals enterovirussen, zowel in patiënten, voedsel als omgevingsmonsters te kunnen vergelijken aangezien transmissieroutes complex en gekoppeld kunnen zijn. Harmonisatie dient dus tussen alle betrokken partijen te gebeuren.
- 3) Optimalisatie van PCR voor moleculaire tracersing dient te worden vervolgd voor de specifieke matrices en virussen. Hiertoe is uitwisseling van kennis en expertise door cursussen, bijeenkomsten en congressen onontbeerlijk.
- 4) Voor bronopsporing is een multidisciplinaire aanpak van belang, waarbij naast een moleculair biologische benadering ook een epidemiologische, virologische en modelmatige benadering betrokken moet worden.

## **Dankwoord**

De auteurs danken Erwin Duizer (RIVM-LIS) en Ingeborg Boxman (VWA Zutphen) voor de medewerking aan deze inventarisatie. Zonder de door hun aangeleverde informatie over gebruikte primers en probes zou deze inventarisatie niet mogelijk zijn geweest.

# Literatuur

1. **Allard, A., B. Albinsson, and G. Wadell.** 2001. Rapid typing of human adenoviruses by a general PCR combined with restriction endonuclease analysis. *Journal of Clinical Microbiology* **39**:498-505.
2. **Amvrosieva, T. V., N. V. Paklonskaya, A. A. Biazruchka, O. N. Kazinets, Z. F. Bohush, and E. G. Fisenko.** 2006. Enteroviral infection outbreak in the Republic of Belarus: principal characteristics and phylogenetic analysis of etiological agents. *Central European Journal of Public Health* **14**:67-73.
3. **Anonymous.** 2000. Foodborne outbreak of Group A rotavirus gastroenteritis among college students - District of Columbia, March-April 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report* **49**:1131-1133.
4. **Anonymous, World Health Organization, and Food and Agriculture Organization .** 2008. *Viruses in Food: Scientific advice to support risk management activities.*
5. **Beld, M., R. Minnaar, J. Weel, C. Sol, M. Damen, H. van der Avoort, P. Wertheim-van Dillen, A. van Breda, and R. Boom.** 2004. Highly sensitive assay for detection of enterovirus in clinical specimens by reverse transcription-PCR with an armored RNA internal control. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:3059-3064.
6. **Benschop, K., R. Molenkamp, A. van der Ham, K. Wolthers, and M. Beld.** 2008. Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *Journal of Clinical Virology* **41**:69-74.
7. **Bosch, A. , G. Sanchez, F. LeGuyader, H. Vanaclocha, L. Haugarreau, and R. M. Pinto.** 2001. Human enteric viruses in Coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Science and Technology* **43**:61-65.
8. **Boxman, I. L. A., R. Dijkman, N. A. J. M. Te Loeke, G. Hägele, J. J. H. C. Tilburg, H. Vennema, and M. Koopmans.** 2009. Environmental swabs as a tool in norovirus outbreak investigation, including outbreaks on cruise ships. *Journal of Food Protection* **72**:111-119.
9. **Boxman I.L.A., J. J. H. C. Tilburg, N. A. J. M. te Loeke, H. Vennema, E. de Boer, and M. Koopmans.** 2007. An efficient and rapid method for recovery of norovirus from food associated with outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Food Protection* **70**:504-508.
10. **Boxman, I. L. A., J. J. H. C. Tilburg, N. A. J. M. te Loeke, H. Vennema, K. Jonker, E. de Boer, and M. Koopmans.** 2006. Detection of noroviruses in shellfish in the Netherlands. *International Journal of Food Microbiology* **108**:391-396.
11. **Costafreda, M. I., A. Bosch, and R. M. Pinto.** 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* **72**:3846-3855.
12. **Da Silva, A. K., J. C. Le Saux, S. Parnaudeau, M. Pommepuy, M. Elimelech, and F. S. Le Guyader.** 2007. Evaluation of removal of noroviruses during wastewater treatment, using real-time reverse transcription-PCR: different behaviors of genogroups I and II. *Applied and Environmental Microbiology* **73**:7891-7897.
13. **De Roda Husman, A. M., F. Lodder-Verschoor, H. van den Berg, F. Le Guyader, H. van Pelt,**

- W. van der Poel, and S. A. Rutjes.** 2007. Rapid virus detection procedure for molecular tracing of shellfish associated with disease outbreaks. *Journal of Food Protection* **70**:967-974.
14. **De Wit, M. A., M. P. Koopmans, and Y. T. van Duynhoven.** 2003. Risk factors for norovirus, Sapporo-like virus, and group A rotavirus gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases* **9**:1563-1570.
  15. **Dentinger, C. M., W. A. Bower, O. V. Nainan, S. M. Cotter, G. Myers, L. M. Dubusky, S. Fowler, E. D. Salehi, and B. P. Bell.** 2001. An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *The Journal of Infectious Diseases* **183**:1273-1276.
  16. **Divizia, M., R. Gabrieli, D. Donia, A. Maculoso, A. Bosch, S. Guix, G. Sánchez, C. Villena, R. M. Pintó, L. Palombi, E. Buonomo, F. Cenko, L. Leno, D. Bebeci, and S. Bino.** 2004. Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Science and Technology* **50**:57-61.
  17. **Estes, M. K. and J. Cohen.** 1989. Rotavirus gene structure and function. *Microbiological Reviews* **53**:410-449.
  18. **Falkenhorst, G., L. Krusell, M. Lisby, S. B. Madsen, B. E. Böttiger, and K. Molbak.** 2005. Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005. *Euro Surveillance* **10**:pii=2795.
  19. **Gallay, A., H. De Valk, M. Cournot, B. Ladeuil, C. Hemery, C. Castor, F. Bon, F. Mégraud, P. Le Cann, and J. C. Desenclos.** 2006. A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000. *Clinical Microbiology and Infection* **12**:561-570.
  20. **Gentsch, J. R., R. I. Glass, P. Woods, V. Gouvea, M. Gorziglia, J. Flores, B. K. Das, and M. K. Bhan.** 1992. Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **30**:1365-1373.
  21. **Green, J., K. Henshilwood, C. I. Gallimore, D. W. G. Brown, and D. N. Lees.** 1998. A nested reverse transcriptase PCR assay for detection of small round-structured viruses in environmentally contaminated molluscan shellfish. *Applied and Environmental Microbiology* **64**:858-863.
  22. **Gyarmati, P., N. Mohammed, H. Norder, J. Blomberg, S. Belák, and F. Widén.** 2007. Universal detection of hepatitis E virus by two real-time PCR assays: TaqMan and primer-probe energy transfer. *Journal of Virological Methods* **146**:226-235.
  23. **Hauri, A. M., M. Schimmelpfennig, M. Walter-Domes, A. Letz, S. Diedrich, J. Lopez-Pila, and E. Schreier.** 2005. An outbreak of viral meningitis associated with a public swimming pond. *Epidemiology and Infection* **133**:291-298.
  24. **Hernroth, B. E., A. C. Conden-Hansson, A. S. Rehnstam-Holm, R. Girones, and A. K. Allard.** 2002. Environmental factors influencing human viral pathogens and their potential indicator organisms in the blue mussel, *Mytilus edulis*: the first Scandinavian report. *Applied and Environmental Microbiology* **68**:4523-4533.
  25. **Hoebe, C. J. P. A., H. Vennema, A. M. de Roda Husman, and Y. T. H. P. van Duynhoven.** 2004. Norovirus outbreak among primary school children who had played in a recreational water fountain. *Journal of Infectious Diseases* **189**:699-705.



26. **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 gastroenteritis. *Archives of Virology* **140**:1225-1233.
27. **Jothikumar, N., T. L. Cromeans, B. H. Robertson, X. J. Meng, and V. R. Hill.** 2006. A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *Journal of Virological Methods* **131**:65-71.
28. **Kageyama, T., S. Kojima, M. Shinohara, K. Uchida, S. Fukushi, F. B. Hoshino, N. Takeda, and K. Katayama.** 2003. Broadly reactive and highly sensitive assay for Norwalk-viruses based on real-time quantitative reverse transcription-PCR. *Journal of Clinical Microbiology* **41**:1548-1557.
29. **Kukkula, M., P. Arstila, M. L. Klossner, L. Maunula, C. H. Bonsdorff, and P. Jaatinen.** 1997. Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* **29**:415-418.
30. **Li, T. C., K. Chijiwa, N. Sera, T. Ishibashi, Y. Etoh, Y. Shinohara, Y. Kurata, M. Ishida, S. Sakamoto, N. Takeda, and T. Miyamura.** 2005. Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerging Infectious Diseases* **11**:1958-1960.
31. **Lodder, W. J. and A. M. de Roda Husman.** 2005. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* **71**:1453-1461.
32. **Loisy, F., R. L. Atmar, P. Guillon, P. Le Cann, M. Pommepeuy, and F. S. Le Guyader.** 2005. Real-time RT-PCR for norovirus screening in shellfish. *Journal of Virological Methods* **123**:1-7.
33. **Moore, C., E. M. Clark, C. I. Gallimore, S. A. Corden, J. J. Gray, and D. Westmoreland.** 2004. Evaluation of a broadly reactive nucleic acid sequence based amplification assay for the detection of noroviruses in faecal material. *Journal of Clinical Virology* **29**:290-296.
34. **Pang, X. L., B. Lee, N. Boroumand, B. Leblanc, J. K. Preiksaitis, and C. Yu Ip.** 2004. Increased detection of rotavirus using a real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) assay in stool specimens from children with diarrhea. *Journal of Medical Virology* **72**:496-501.
35. **Rab, M. A., M. K. Bile, M. M. Mubarik, H. Ashgar, Z. Sami, S. Siddiqi, A. S. Sil, M. A. Barzgar, M. A. Chaundry, and M. I. Burney.** 1997. Water-borne hepatitis E virus epidemic in Islamabad, Pakistan: a common source outbreak traced to the malfunction of a modern water treatment plant. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **57**:151-157.
36. **Rutjes, S. A., W. J. Lodder, M. Bouwknegt, and A. M. de Roda Husman.** 2007. Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33% to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *Journal of Virological Methods* **143**:112-116.
37. **Rutjes, S. A., W. J. Lodder, F. Lodder-Verschoor, H. H. J. L. van den Berg, H. Vennema, E. Duizer, M. Koopmans, and A. M. de Roda Husman.** 2009. Hepatitis E virus genotype 3 sources in the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* **Accepted for Publication**.
38. **Schijven, J. and A. M. de Roda Husman.** 2009. Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater: Ervaringen dossierbehandeling 2006/7. **RIVM Rapport:703719038**.

39. **Schlauder, G. G., S. M. Desai, A. R. Zanetti, N. C. Tassopoulos, and I. K. Mushahwar.** 1999. Novel hepatitis E virus (HEV) isolates from Europe: Evidence for additional genotypes of HEV. *Journal of Medical Virology* **57**:243-251.
40. **Schmid, D., R. Fretz, G. Buchner, C. König, H. Perner, R. Sollak, A. Tratter, M. Hell, M. Maass, M. Strasser, and F. Allerberger.** 2008. Foodborne outbreak of hepatitis A, November 2007-January 2008, Austria. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* **27**:DOI 10.1007/s10096-008-0633-0.
41. **Schwab, K. J., R. De Leon, and M. D. Sobsey.** 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.
42. **Stene-Johansen, K., G. Tjon, E. Schreier, V. Bremer, S. Bruisten, S. Ngui, M. King, R. M. Pinto, L. Aragonés, A. Mazick, S. Corbet, L. Sundqvist, H. Blystad, H. Norder, and K. Skaug.** 2007. Molecular epidemiological studies show that hepatitis A virus is endemic among active homosexual men in Europe. *Journal of Medical Virology* **79**:356-365.
43. **Svraka, S., E. Duizer, H. Vennema, E. de Bruin, B. van der Veer, B. Dorresteijn, and M. Koopmans.** 2007. Etiological role of viruses in outbreaks of acute gastroenteritis in the Netherlands from 1994 through 2005. *Journal of Clinical Microbiology* **45**:1389-1394.
44. **Tei S., N. Kitajima, S. Ohara, Y. Inoue, M. Miki, T. Yamatani, H. Yamabe, S. Mishiro, and Y. Kinoshita.** 2004. Consumption of uncooked deer meat as a risk factor for hepatitis E virus infection: An age- and sex-matched case-control study. *Journal of Medical Virology* **74**:67-70.
45. **Van den Berg, H. H. J. L., W. J. Lodder, W. van der Poel, H. Vennema, and A. M. de Roda Husman.** 2005. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Research in Microbiology* **156**:532-540.
46. **van Steenberghe, J. E., G. Tjon, A. van den Hoek, A. Koek, R. A. Coutinho, and S. M. Bruisten.** 2004. Two years' prospective collection of molecular and epidemiological data shows limited spread of hepatitis A virus outside risk groups in Amsterdam, 2000-2002. *The Journal of Infectious Diseases* **189**:471-482.
47. **Vennema, H., E. de Bruin, and M. Koopmans.** 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.
48. **Verhoef, L. P. B., A. Kroneman, Y. van Duynhoven, H. Boshuizen, W. van Pelt, and M. Koopmans.** 2009. Selection tool for foodborne norovirus outbreaks. *Emerging Infectious Diseases* **15**:31-38.
49. **Villena, C., W. M. El-Senousy, F. X. Abad, R. M. Pinto, and A. Bosch.** 2003. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: Emergence of unusual genotypes. *Applied and Environmental Microbiology* **69**:3919-3923.
50. **Wang, Y., R. Ling, J. C. Erker, H. Zhang, H. Li, S. Desai, I. K. Mushahwar, and T. J. Harrison.** 1999. A divergent genotype of hepatitis E virus in Chinese patients with acute hepatitis. *Journal of General Virology* **80**:169-177.

51. **WHO/WSH (World Health Organization/Water Sanitation and Health)** . 2004. Guidelines for Drinking Water Quality 3rd edition, Geneva.

# Bijlage 1

## NoV GGI Reference strain Norwalk M87661

Method	Lab	Target	Primer / Probe	Sequentie	Locatie	Fragment lengte	Referentie	
Conventioneel	RIVM LZO	RdRp ORF1	JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4552 – 4572	327	(47)	
			JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4858 – 4878			
			Probe GGII	ATGGAYGTTGGYGAYTATGT	4697 – 4716			
	RIVM LIS	RdRp ORF1 Typering	JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4552 – 4572	327	(47)	
			JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4858 – 4878			
	VWA	RdRp ORF1		NVp110	ACDATYTCATCATCACCATA	4865 – 4884	333	
JV12Y				ATACCACTATGATGCAGAYTA	4552 – 4572	327	(47)	
			JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4858 – 4878			
Nested	RIVM LZO	RdRp ORF1	JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4552 – 4572	327	(21;47)	
			JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4858 – 4878			
			Nested G1	TCNGAAATGGATGTTGG	4691 – 4707			188
	VWA	RdRp ORF1		Nested JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4858 – 4878	327	(10;47)
				JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4552 – 4572		
				JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4858 – 4878		
			Nested G1	TCNGAAATGGATGTTGG	4691 – 4707	188		
			Nested JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4858 – 4878			
Real-time PCR	RIVM LZO	Junction ORF1/2	QNIF4	CGCTGGATGCGNTTCCAT	5291 – 5308	86	(12)	
			NV1LCR	CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	5354 – 5376		(43)	
			Probe NVGG1P	TGGACAGGAGAYCGCRATCT	5321 – 5340			
	RIVM LIS	Junction ORF1/2		NV1LCF	CARGCCATGTTYCGYTGGATG	5279 – 5299	98	(43)
				NV1LCR	CCTTAGACGCCATCATCATTTAC	5354 – 5376		
	VWA	Detectie Junction ORF1/2		Probe Nv1LCpr	TGGACAGGAGAYCGCRATCT	5321 – 5340	72	(8)
				JV1F	GCCATGTTCCGITGGATG	5282 – 5299		
				JT1R	GAATTCCGGGCAGNAGATTGC	5334 – 5353		

Probe JT1P CTCCTGTCCACAAWCCGAGRTCATGG 5305 – 5330

---

**NoV GGII Reference strain Lordsdale X86557 (1)**

Method	Lab	Target	Primer / Probe	Sequentie	Locatie	Fragment lengte	Referentie
Conventioneel	RIVM LZO	RdRp ORF1	JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4279 – 4299	327	(47)
			JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4585 – 4605		(45)
			Probe GGIIi	GAAYTCCATCRCCCAYTG	4495 – 4512		
			Probe UK3	GTCCCCTGACATCATAACAGGCT	4552 – 4573		
			Probe JV5	CTCACCAGAGGTTGTCCAAGC			
	RIVM LIS	RdRp ORF1 Typing	JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4279 – 4299	327	(47)
			JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4585 – 4605		
	VWA	RdRp ORF1	NVp110	ACDATYTCATCATCACCATA	4592 – 4611	333	
			JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4279 – 4299	327	(47)
			JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4585 – 4605		
Nested	RIVM LZO	RdRp ORF1	JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4279 – 4299	327	(33;47)
			JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4585 – 4605		
			Nested JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4279 – 4299	237	
			Nested Ni-R	AGCCAGTGGGCGATGGAATTC	4495 – 4515		
	VWA	RdRp ORF1	JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4279 – 4299	327	(10;47)
			JV13i	TCATCATCACCATAGAAIGAG	4585 – 4605		
			Nested JV12Y	ATACCACTATGATGCAGAYTA	4279 – 4299	237	
			Nested noroII-R	AGCCAGTGGGCGATGGAATTC	4495 – 4515		
	VWA	Capside	SR2-2F	TWCTCYTTYTATGGTGATGATGA	4583 – 4605	518	(8)
			JT2R	TCGACGCCATCTTCATTCAC	5081 – 5100		
			Nested SR2-2F	TWCTCYTTYTATGGTGATGATGA	4583 – 4605	446	
			Nested JJV2Frev	CTCATCCACCTAAACATTGACTCTTG	5003 – 5028		

**NoV GGII Reference strain Lordsdale X86557 (2)**

Method	Lab	Target	Primer / Probe	Sequentie	Locatie	Fragment lengte	Referentie	
Real-time PCR	RIVM LZO	Junction	QNIF2	ATG TTCAGRTGGATGAGRTTCTCWGA	5012 – 5037	89	(28;32)	
		ORF1/2	COG2R Probe QNIFS	TCGACGCCATCTTCATTCACA AGCACGTGGGAGGGCGATCG	5080 – 5100 5042 – 5061			
	RIVM LIS	Junction	NV2LCF	GARYCIATGTTYAGRTGGATG	5006 – 5026	95	(43)	
		ORF1/2	NV2LCR Probe NV2LCpr	TCGACGCCATCTTCATTCAC TGGGAGGGSGATCGCRATCT	5081 – 5100 5048 – 5067			
	VWA	Junction	JJV2F	CAAGAGTCAATGTTTAGGTGGATGAG	5003 – 5028	98	(8)	
		ORF1/2	COG2R Probe RING2-TP	TCGACGCCATCTTCATTCACA TGGGAGGGCGATCGCAATCT	5080 – 5100 5048 – 5067			
	VWA	RdRp ORF1		NoroGIIFA	CYTGCACCTCMCAATGGA	4479 – 4496	68	(9)
				NoroGIIFB	CKTGCACCTCRCAATGGA	4479 – 4496		
				NoroGII-Rb	TGTRACTTCAGAGAGYGACAKA	4524 – 4546		
				NoroGIIA-P	CYATCGCCCACTGGCTYCTCA	4500 – 4520		
				NoroGIIB-P	CCATYRCCCACTGGCTCCTCA	4500 – 4520		
				NoroGIIC-P	CTCCATTGCTCATTGGCTTCTCACG	4498 – 4522		

**Hepatitis A virus Reference strain M14707**

Method	Lab	Target	Primer / Probe	Sequentie	Locatie	Fragment lengte	Referentie
Conventioneel	RIVM LZO	5'NCR	HAV68	TCACCGCCGTTTGCCTAG	68 – 85	174	(7)
			HAV240	GGAGAGCCCTGGAAGAAAGA	222 – 241		
			HAV-probe 150	TTAATTCCTGCAGGTTTCAGG	150 – 169		
Nested	RIVM LIS	VP1-2a Typering	HAV6.1	GTSTCWGGRGCACTGGATGG	2838 – 2857	603	(42)*
			HAV10	CATTTCTGTCCATTTYTCATCATT	3417 – 3440		
			Nested HAV8.2	KGTTTTCYATTCARATTGCAAATTA	2891 – 2914		
	VWA	VP3-VP1	Nested HAV11	ARAACYCCAGCATCCATYTC	3375 – 3394	504	(46)
			VP1-4	YGTTGCTTCYCATGTYAGAGT	2114 – 2134		
			VP1-6	CATATGATCTGATGTATGTCT	2436 – 2456		
		Nested VP1-2	GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG	2167 – 2192	247		
		Nested VP1-1	GGAAATGTCTCAGGTACTTTCTTTG	2389 – 2413			
Real-time PCR	RIVM LZO	5'NCR	HAV68	TCACCGCCGTTTGCCTAG	68 – 85	174	(11)
			HAV240	GGAGAGCCCTGGAAGAAAG	222 – 241		
			probe HAV150 (-)	CCTGAACCTGCAGGAATTAA	150 – 169		
	RIVM LIS	5'NCR Detectie	HAV 5'F	CAGTGGATGCATTGAGTG	522 – 539	71	(11)
			HAV 5'R	CTAAGCACAGAGAGGTC	576 – 592		
			HAV 5'P	CCTARAGACAGCCCTGAC	548 – 565		
	VWA	5'NCR	HAV68	TCACCGCCGTTTGCCTAG	68 – 85	174	(11)
			HAV240	GGAGAGCCCTGGAAGAAAG	222 – 241		
			probe HAV150 (-)	CCTGAACCTGCAGGAATTAA	150 – 169		

\* Met modificaties



### Hepatitis E virus Reference strain AF060668

Method	Lab	Target	Primer / Probe	Sequentie	Locatie	Fragment lengte	Referentie
Conventioneel	RIVM	ORF2	HEVORF2con-s1	GACAGAATTRATTTTCGTCGGCTGG	6283 – 6306	197	(39)
	LZO	Detectie	HEVORF2con-a1	CTTGTTTCRTGYTGGTTRTCATAATC	6455 – 6479		(7)
			HEV-probe	GAGAATGCDGAGCAGGAYAAGGG	6380 – 6402		
Nested	RIVM	ORF1	HEVConsORF1-s1	CTGGCATYACTSCTGCIYATTGAGC	2 – 25	418	(39)
	LZO	Typing	HEVConsORF1-a1	CCATCRARRCAGTAAGTGCGGTC	397 – 419		(50)
			N HEVConsORF1-s2	CTGCCYTKGCGAATGCTGTGG	50 – 70	287	
			N HEVConsORF1-a2	GGCAGWRTACCARCGCTGAACATC	313 – 336		
Real-time PCR	RIVM	ORF3	JVHEVF	GGTGGTTTCTGGGGTGAC	5246 – 5263	70	(27)
	LZO		JVHEVR	AGGGGTTGGTTGGATGAA	5298 – 5315		
			JVHEVP	TGATTCTCAGCCCTTCGC	5269 – 5286		
	RIVM	ORF 2	TqFwd-N	CTGTTYAAAYCTTGCTGAYAC	6245 – 6264	112	(22)*
	LIS		Detectie	TqRev-N	TCGGCTCGCCATTGGCYGAGAC	6335 – 6356	
		ORF2		Typing	TqProbe	CCGACAGAATTGATTTTCGTCGGC	6281 – 6303
HEVORF2con-s1	GACAGAATTRATTTTCGTCGGCTGG		6283 – 6306		197	(39)	
HEVORF2con-a1	CTTGTTTCRTGYTGGTTRTCATAATC	6455 – 6479					

\* Met modificaties

**Rotavirus Reference strains (zie tabel)**

Method	Lab	Target	Primer / Probe	Sequentie	Locatie	Fragment lengte	Referentie
Conventioneel	RIVM LZO	VP6	VP6-3	GCTTTAAAACGAAGTCTTCAAC	2 – 23	186	(49)
			VP6-4 Probe	GGTAAATTACCAATTCCTCCAG CAAATGATAGTTACTATGAATGG	166 – 187 129 – 151	(K02086)	
	RIVM LIS	VP1	Rota ABCF	TAYACIGAYGTITCICARTGGGA	1578 – 1600	339	(43)
			Rota ABCR	GTAGTTGTCGTCICCRTCIAC	1896 – 1916	(AJ304859)	
Real-time PCR	RIVM LIS	VP4 (P-type)	VP4F	TATGCTCCAGTIAATTGG	131 – 148	671	(20)
		Typing	RVPR	CTRTTATATTGCATYTCYTTCC	780 – 801	(FJ386448)	
		VP7 (G-type)	VP7F	CCTTTTRATGTATGGTATTGA	42 – 62	894	
	RIVM LIS	Typing	VP7R	AAIACCTTGCCACCAYYTYTTCC	914 – 935	(AB436835)	(34)*
		NSP3	RVNSP3F	ACCCTCTATGAGCACAATA	1002 – 1020	73	
		Detectie	RVNSP3R	GGTCACATAACGCCCTA	1057 – 1074	(DQ492677)	
			RotaNSP3PQ probe	AGTTAAAAGCTAACACTGTCAAA	1020 – 1042		

\* Met modificaties

**Enterovirus Reference strain X00595**

Method	Lab	Target	Primer / Probe	Sequentie	Locatie	Fragment lengte	Referentie
Conventioneel	RIVM LZO	5' UTR	Entero1	CCTCCGGCCCCTGAATG	444 – 460	196	(41)
			Entero2	ACCGGATGGCCAATCCAA	622 – 639		
			Entero-probe	TACTTTGGGTGTCCGTGTTTC	542 – 562		
Nested	RIVM LIS	5' UTR	sense 21A	CGGTAAAYTTTGTACGCCAGTT	65 – 85	495	(10)
			antisense 22	ACACGGACACCCAAAGTA	542 – 559	299	
			Nested sense 23	CAAGCACTTCTCTTTCCCCGG	162 – 182		
			Nested antisense 24	CATTCAGGGCCGGAGGA	443 – 460		
	VWA	5' UTR	Probe	GGCTGCGTTGGCGGCC	357 – 372	436	
			EV06	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	162 – 182		
			EV03	ATTGTCACCATAAGCAGCCA	578 – 597		
			Nested EV06	CAAGCACTTCTGTTTCCCCGG	162 – 182		
Real-time PCR	RIVM LZO	5'UTR	Entero-1-TM	ggCCCTGAATGCGGCTAAT	450 – 468	151	(5;6)
			Entero-2-TM	gggATTGTCACCATAAGCAGCC	579 – 600		
			TBR-entero-1	GCGGAACCGACTACTTTGGGT	531 – 551		

**Adenovirus Reference strain L19443**

Method	Lab	Target	Primer / Probe	Sequentie	Locatie	Fragment lengte	Referentie
Nested	RIVM LZO	Hexon	Hex1deg	GCCSCARTGGKCWTACATGCACATC	17663 – 17687	301	(1)
			Hex2deg	CAGCACSCCICGRATGTCAA	17943 – 17963		
			nehex3deg	GCCCGYGCMACIGAIACSTACTTC	17736 – 17759	173	
			nehex4deg	CCYACRGCCAGIGTRWAICGMRCYTTGTA	17880 – 17908		
Real-time PCR	RIVM LZO	Hexon	AdF	CWTACATGCACATCKCSGG	17674 – 17692	69	(24)
			AdR	CRCGGGCTAAYTGCACCAG	17724 – 17742		
			AdP	CCGGGCTCAGGTACTCCGAGGCGTCCT	17695 – 17721		
	RIVM LIS	Hexon Typering	HEXAA 1885	GCCGCAGTGGTCTTACATGCACAT	17663 – 17686	301	(43)
			HEXAA 1885a	GCCCCARTGGGCRTACATGCACAT	17663 – 17686		
			neHEXAA 1913	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT	17941 – 17963		
			neHEXAA 1913a	ARCACICCICGRATGTCAAAG	17942 – 17962		
	RIVM LIS	Hexon Detectie	HEXAA 1885	GCCGCAGTGGTCTTACATGCACAT	17663 – 17686	301	(43)
			HEXAA 1885a	GCCCCARTGGGCRTACATGCACAT	17663 – 17686		
			neHEXAA 1913	CAGCACGCCGCGGATGTCAAAGT	17941 – 17963		
			neHEXAA 1913a	ARCACICCICGRATGTCAAAG	17942 – 17962		
			HEXAA LCpr	TGGTGCAGTTYGCCCG	17725 – 17740		

**RIVM**

Rijksinstituut  
voor Volksgezondheid  
en Milieu

Postbus 1  
3720 BA Bilthoven  
[www.rivm.nl](http://www.rivm.nl)