

RIJKSINSTITUUT VOOR VOLKSGEZONDHEID EN MILIEUHYGIENE
BILTHOVEN

Rapport nr. 118102 001

Diagnostiek en epidemiologie van rotavirusinfecties in Nederland

J. Vinjé ¹, H.G.A.M. van der Avoort ¹, J.A. Kaan ² en A.M. van Loon ¹

augustus 1992

1. Laboratorium voor Virologie, RIVM
2. Streeklaboratorium Enschede

Dit onderzoek werd uitgevoerd in opdracht en ten laste van de Geneeskundige
Hoofdinspectie van de Volksgezondheid (GHI) en is beschreven in project 118102
getiteld: "*Virale verwekkers van gastroenteritis*"

VERZENDLIJST

- 1 Geneeskundige Hoofdinspectie van de Volksgezondheid
- 2 Directeur-Generaal van de Volksgezondheid
- 3 Plv. directeur-generaal van de Volksgezondheid tevens hoofddirecteur Financiering en Planning
- 4 Hoofddirecteur Gezondheidszorg
- 5 Hoofddirecteur Gezondheidsbescherming
- 6 Dr. C. Bruggeman, Academisch Ziekenhuis, Maastricht
- 7 Dr. Ir. W. Crombach, St. Maartens Gasthuis, Venlo
- 8 Dr. G. van Doornum, Streeklab. voor de Volksgezondheid, Amsterdam
- 9 Dr. J. Galema, Lab. voor Medische Microbiologie, KUN, Nijmegen
- 10 Dr. A.M. Dumas, Streeklab. voor de Volksgezondheid, Rotterdam
- 11 Dr. B.G.A. Hendrickx, Streeklaboratorium Zeeland, Terneuzen
- 12 Dr. M.F. Peeters, Streeklab. voor de Volksgezondheid, Tilburg
- 13 Dr. B. Postma, Streeklab. voor de Volksgezondheid, Veldhoven
- 14 Dr. J. Schirm, Streeklab. voor de Volksgezondheid, Groningen
- 15 Dr. H.T. Weiland, Centraal Klinisch Virologisch Lab. Leiden
- 16 Dr. P.M.E. Wertheim-van Dillen, Lab. voor Medische Microbiologie, AMC, Amsterdam
- 17 Dr. B.J. van Dijke, St. Laurentiusziekenhuis, Roermond
- 18 Mw. Drs. H. Schreuder, Ziekenhuis "de Lichtenberg", Amersfoort
- 19 Drs. F. Heilman, Streeklab. voor de Volksgezondheid, Deventer
- 20 Dr. C. Roggeveen, Streeklab. voor Volksgezondheid, Haarlem
- 21 Dr. G. Weers-Pothoff, Lab. voor Medische Microbiologie, 's-Hertogenbosch
- 22 Drs. E. van Kregten, Ziekenhuis Eemland, Amersfoort
- 23 Prof. Dr. D.M. Maclaren, Academisch Ziekenhuis VU, Amsterdam
- 24 Dr. W. Pauw, Slotervaartziekenhuis, Amsterdam
- 25 Drs. H.A. Bijlmer, St. Juliana Kinderziekenhuis, Den Haag
- 26 Dr. F. Vlasplolder, Westeinde Ziekenhuis, Den Haag
- 27 Dr. A.S. Lampe, Ziekenhuis Leijenburg, Den Haag
- 28 Dr. M.H. Haverkorn, Catharina Ziekenhuis, Eindhoven
- 29 Mw. Dr. E.A.P.M. Thewessen, Blueland Ziekenhuis, Den Haag
- 30 Dr. E.E.J. Ligtvoet, GG en GD, Haarlem
- 31 Dr. B.I. Davies, De Wever Ziekenhuis, Heerlen
- 32 Dr. J. Rechsteiner, Ziekenhuis Hilversum, Hilversum
- 33 Dr. C. Walig, Westfries Gasthuis, Hoorn
- 34 Dr. R.J. Diepersloot, Anthonius Ziekenhuis, Nieuwegein
- 35 Dr. B.J. Knapen-van Dijke, St. Laurentius Ziekenhuis, Roermond
- 36 Dr. A. Fleer, Wilhelmina Kinderziekenhuis, Utrecht
- 37 Dr. M.R. Visser, Medische Microbiologie, AZU, Utrecht
- 38 Dr. J.G.E.M. Lindner, Overvecht Ziekenhuis, Utrecht
- 39 Dr. J.J. Habova, Sophia Academisch Kinderziekenhuis, Rotterdam
- 40 Dr. F. Rotbarth, Klinisch Virologisch Lab., Dijkzigt Ziekenhuis, Rotterdam
- 41 Dr. R. Vreede, Stichting Samenwerking Delfse Ziekenhuizen, Delft
- 42 Dr. G.L. Smit, Diaconessenhuis, Leiden
- 43 Dr. H.A. Verbrugh, Diaconessenhuis, Utrecht
- 44 Dr. T.H. Siem, Streeklab. voor de Volksgezondheid, Arnhem
- 45 Nederlands Instituut voor onderzoek van de Eerstelijnsgezondheidszorg (NIVEL)

46	Hoofdinspecteur van de Geestelijke Volksgezondheid
47	Depot van Nederlandse publikaties van Nederlandse Bibliografie
48	Directie RIVM
49	Prof. Dr. Ir. D. Kromhout
50	Dr. Ir. A.H. Havelaar
51	Drs. A.M.M. Hoogenboom-Verdegaal
52	Dr. M.A.E. Conijn- van Spaendonck
53	Centrum voor Infectieziekten en Epidemiologie
54	Hoofd Voorlichting & Public Relations
55-58	Auteurs
59	Bibliotheek RIVM
60	Bureau Projecten- en rapportenregistratie
61 -80	Reserve

INHOUDSOPGAVE	blz
VERZENDLIJST	ii
INHOUDSOPGAVE	iv
ABSTRACT	v
SAMENVATTING	1
1. INLEIDING	
1.1. Rotavirussen als ziekteverwekker	2
1.2. Biologische en biochemische eigenschappen van rotavirus	4
1.3. Diagnostiek van rotavirus	6
1.4. Typering van rotavirus groep A	7
1.5. Behandeling en preventie	8
1.6. Doel van het onderzoek	9
2. RESULTATEN	
2.1. Leeftijdsverdeling en seizoenincidentie	10
2.2. Rotavirusdetektie in Nederland	12
2.3. Vergelijkend onderzoek naar verschillende detektiemethoden	12
2.4. Typering	15
3. CONCLUSIE EN DISCUSSIE	
3.1. Incidentie en diagnostiek	17
3.2. Typering	18
4. MATERIAAL EN METHODEN	
4.1. Diagnostiek	20
4.2. Typering	21
LITERATUUR	24
DANKBETUIGING	27

ABSTRACT

This report describes some aspects of the diagnosis and epidemiology of rotavirus-infections in the Netherlands. The infection occurs predominantly during the first four years of life and the seasonal activity is highest during early spring. The diagnosis is made more frequently in boys than in girls (56% vs 44%). Most virological laboratories in the Netherlands use latex agglutination (LA) tests for the diagnosis of rotavirus.

A total of 205 human faecal specimens were examined for the presence of rotavirus by four different detection methods: latex agglutination (LA) test, a 'home-made' enzyme immuno-assay (EIA), polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and agarose gel electrophoresis (AGE). Identical results in all four tests were found in 188 (92%) of the stool specimens. Using the results of a newly defined golden standard: TRUE, we found the specificities of the LA, EIA, PAGE and AGE to be 97.9, 98.6, 100, and 100%, respectively. The sensitivities of these four methods were 98.4, 98.4, 88.7, and 88.7%, respectively.

Early diagnosis of rotavirus infection is essential for effective patient management and infection control. LA and AGE are both rapid screening tests for the diagnosis of rotavirus infection. AGE is also an inexpensive test with an added advantage that this method can detect non-group A rotaviruses. During our survey, we could not identify non-group A rotaviruses.

The epidemiology of rotavirus gastroenteritis in the Netherlands was investigated by serotyping. We compared two different methods for serotyping 84 faecal rotavirusstrains from patients with gastroenteritis: serotyping by an enzyme immunoassay with serotype-specific monoclonal antibodies and gene amplification with type-specific oligonucleotide primers. With the PCR typing method we could type 96% , and with the EIA MAb 82% of the 84 faecal strains. 100% agreement of the result was observed with all the samples that were typed by both assays. Serotype 1 rotavirus was predominant in The Netherlands in 1990 with a prevalence of 77%. The prevalence of serotype 2, 3 and 4 was 3, 3 and 17%, respectively.

SAMENVATTING

Dit rapport beschrijft aspecten van de diagnostiek en epidemiologie van groep A rotavirusinfecties in Nederland. In Nederland zijn infecties met groep A rotavirus seizoensgebonden en komen voornamelijk voor bij kinderen tot 4 jaar. De piek in de incidentie valt in het vroege voorjaar. De diagnose wordt vaker bij jongens dan bij meisjes gesteld (56% vs 44%). Het merendeel van de diagnostische laboratoria maakt gebruik van een latexagglutinatiereactie voor het aantonen van rotavirusinfecties.

In dit onderzoek hebben we een viertal methoden voor het aantonen van rotavirusinfecties met elkaar vergeleken: latexagglutinatie, een in eigen beheer ontwikkelde enzym immunoassay, polyacrylamide gel elektroforese en agarose gel elektroforese. In totaal werden 205 faeces van kinderen met gastroenteritis onderzocht op de aanwezigheid van rotavirus. Met de vier methoden werden identieke resultaten verkregen in 188 (92%) van de faecesmonsters. Tussen de vier de methoden bestaat weinig verschil in de specificiteit en gevoeligheid voor het aantonen van rotavirus.

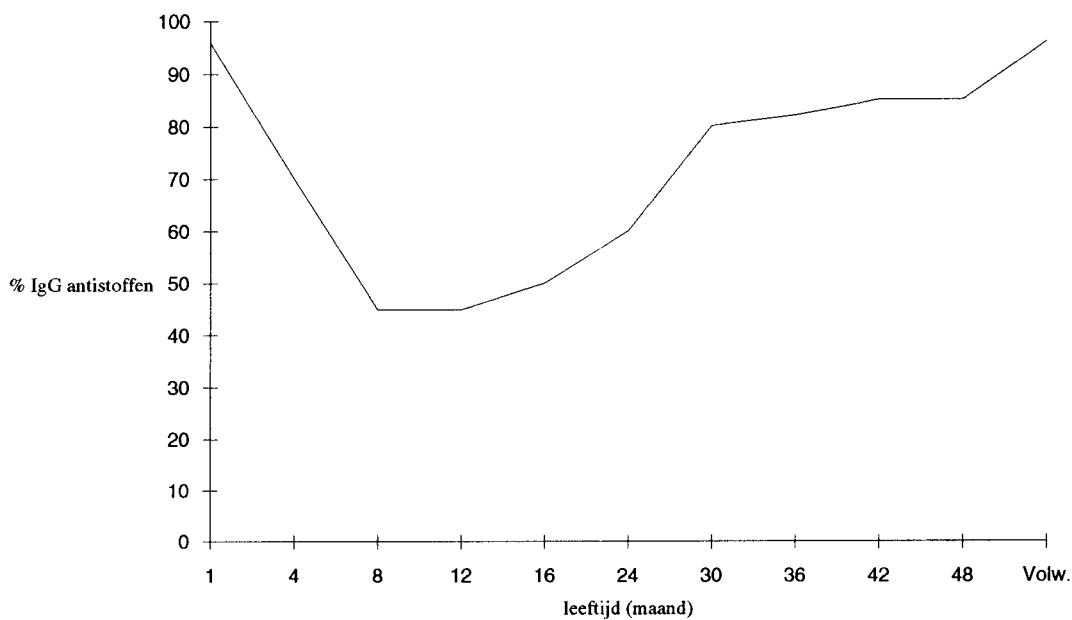
In de meeste gevallen is een snelle diagnose van rotavirus essentieel voor een effectief patiënt- en infectiecontrolebeleid. Naast de latexagglutinatie komt hiervoor ook de agarose gel elektroforese in aanmerking. Deze laatste methode is snel, specifiek en geschikt voor gebruik in laboratoria die kostenbesparend willen werken en biedt de mogelijkheid ook groep B en C rotavirussen aan te tonen. Infecties met groepen B en C werden in ons onderzoek overigens niet aangetroffen.

Het voorkomen van verschillende serotypen in Nederland geeft inzicht in de epidemiologie van het rotavirus. In een studie van 84 patiënten met een rotavirus gastroenteritis hebben we twee methoden voor het typeren van rotavirus met elkaar vergeleken. Een serologische typering die gebruik maakt van serotype-specifieke monoclonale antistoffen en een moleculaire typering met behulp van een type-specifieke polymerase keten reactie (PCR). Met deze laatste methode konden we 96% van de stammen typeren, met de eerste slechts 82%. De verdeling van de serotypen 1, 2, 3 en 4 in Nederland in 1990 was respectievelijk 77%, 3%, 3% en 17%. Dit komt overeen met de verdeling van serotypen in andere geïndustrialiseerde landen.

1. INLEIDING

1.1 Rotavirussen als ziekteverwekker

Rotavirus is de meest voorkomende verwekker van virale gastro-enteritis bij de mens. De incubatieperiode van het virus is kort (1 tot 2 dagen). De symptomen zijn braken, koorts en diarree welke een aantal dagen kan aanhouden. Infecties met het virus komen wereldwijd voor. In landen met een gematigd klimaat heeft de infectie een duidelijke verheffing gedurende de wintermaanden (5). In deze periode is vaak 20-50% van de onderzochte faecesmonsters van patiënten met gastroenteritis positief. De transmissie van het virus vindt plaats via de faecaal-orale route. Virusuitscheiding is maximaal gedurende de eerste tot de vierde dag na het begin van de symptomen. In sommige gevallen blijft het virus tot 3 weken na de ziekteverschijnselen in de faeces aantoonbaar. De lichamelijke conditie bepaalt sterk de ziekteverschijnselen bij een rotavirus-infectie. Bij volwassenen verloopt het ziektebeeld gemitigeerd of zelfs symptoomloos maar vooral bij kinderen en bejaarden kan het virus vrij ernstige diarree veroorzaken, met dehydratie als meest gevreesde complicatie. Rotavirus-infecties bij neonaten verschillen van die bij iets oudere kinderen. De meeste infecties bij neonaten hebben een mild of zelfs asymptomatisch verloop en slechts 30% van hen ontwikkelen gastro-enteritis (22). In een aantal studies (8, 29) naar de leeftijdsverdeling van rotavirusantistoffen blijkt dat direct na de geboorte meer dan 90% van neonaten maternale antistoffen heeft.



Figuur 1 Leeftijdsverdeling van rotavirus-specifieke IgG-antistoffen (8).

Deze nemen in de eerste maanden van het leven af tot een minimum percentage tijdens de leeftijd van 8 tot 12 maanden. Vervolgens stijgt de antistofprevalentie als gevolg van het doormaken van een infectie met het virus (figuur 1). Op 4-jarige leeftijd heeft het merendeel van de populatie de infectie doorgemaakt. Ondanks deze hoge prevalentie van rotavirus-antistoffen in de populatie (> 90%), vinden er bij volwassenen regelmatig herinfecties met het virus plaats. De meeste van deze infecties verlopen subklinisch. Tijdens deze subklinische infecties zijn de personen wel drager van het virus en kunnen zo een bron zijn voor een mogelijke epidemie. Bij personen met verminderde weerstand zoals patiënten met immuunstoornissen en bij ouderen, bij wie de afweer ten opzichte van rotavirus is verminderd, worden regelmatig symptomatische infecties gezien. Deze hebben soms een fataal verloop. In verpleeghuizen leiden infecties met rotavirus regelmatig tot uitbraken van gastro-enteritis (13, 23, 31).

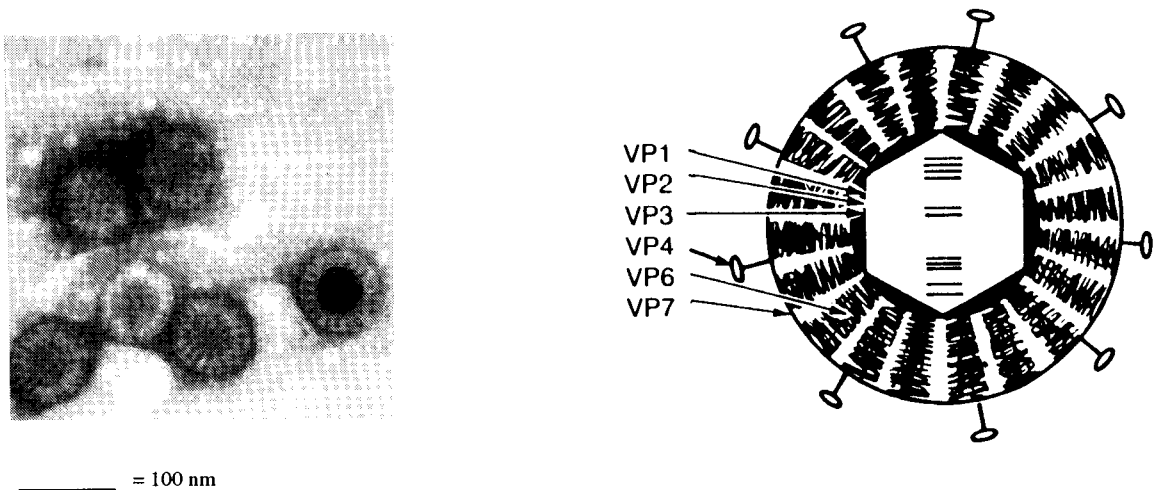
Rotavirussen komen voor in een aantal verschillende groepen waarvan drie bij de mens (A, B en C). Van deze drie is groep A tot nu toe de belangrijkste gebleken bij de etiologie van acute virale gastroenteritis.

In China vond in 1983 een ernstige epidemie van gastroenteritis plaats bij volwassenen. De epidemie werd veroorzaakt door groep B rotavirus. Zeker 12.000 mensen waren hierbij betrokken en een aantal oudere mensen overleden als gevolg van de epidemie (27). De incidentie van infecties met dit type rotavirus is in landen buiten China erg laag (28, 35, 46). In Nederland is de prevalentie van dit virus onbekend en daarom is surveillance van groep B rotavirussen in Nederland belangrijk

Groep C rotavirussen worden sporadisch aangetroffen in de faeces van kinderen met diarree. In een aantal studies blijkt dat het meestal slechts enkele gevallen betreft waarbij meestal oudere kinderen betrokken zijn (7, 33, 32). Volgens Bryden (8) kunnen groep C rotavirussen oorzaak zijn van 5% van alle rotavirusinfecties terwijl in een Engelse studie (2) is gerapporteerd dat 30% van de volwassenen antistoffen tegen dit virus heeft. Dit impliceert een flinke onderdiagnostiek van groep C rotavirussen. Belangrijkste reden hiervoor zou kunnen zijn dat de methoden om dit virus aan te tonen beperkt zijn tot de in weinig laboratoria gebruikelijke elektronenmicroscopie en gel elektroforese.

1.2. Biologische en biochemische eigenschappen van rotavirus

Rotavirussen behoren tot de familie van de reoviridae en worden morfologisch gekenmerkt door een karakteristieke wielstructuur (figuur 2^a).



Figuur 2 a) EM-opname van rotavirus (RIVM, 123.000 x vergroot)

b) Schematische weergave van een rotavirus-deeltje met de lokalisatie van de viruseiwitten (VP's)

Complete virusdeeltjes hebben een diameter van 70 nm en bezitten een binnen- en buiten-eiwitcapside. De virusdeeltjes bevatten elk hun eigen RNA-afhankelijke RNA polymerase voor transcriptie van het genoom dat uit 11 segmenten dubbelstrengs RNA (dsRNA) bestaat. Deze segmenten coderen zowel voor zes structurele (figuur 2^b) als voor een aantal niet-structurele eiwitten. De structurele eiwitten maken deel uit van het virusdeeltje, de niet-structurele zijn niet in complete virusdeeltjes aanwezig maar worden wel in de virusgeïnfekteerde cellen gevonden. De replicatie van het virus vindt plaats in het cytoplasma van geïnfekteerde cellen. Rotavirus kan *in vitro* onder zeer speciale kweekcondities worden gekweekt op een beperkt aantal celsoorten. Hierbij is voorbehandeling van het virus met proteolytische enzymen essentieel. Deze enzymen verhogen de infectiositeit van het virus door de splitsing van een viruseiwit (VP4) dat op het buiteneiwitcapside is gelokaliseerd. Serologisch worden de virussen in serogroepen en serotypen ingedeeld. Op basis van een op het VP6 gelegen groepsantigeen kunnen zes verschillende serogroepen (A t/m F) worden onderscheiden. Serogroep A, B en C vinden we zowel bij mens als dier terwijl de serogroepen D, E en F alleen bij dieren voorkomen.

De meeste groep A rotavirussen kunnen tevens nog in twee verschillende subgroepen worden ingedeeld, I of II. Op enkele uitzonderingen na, hebben alle humane subgroep I rotavirussen een zogenaamd 'kort' electroferotype (figuur 3). Dit maakt het mogelijk om subgroep I

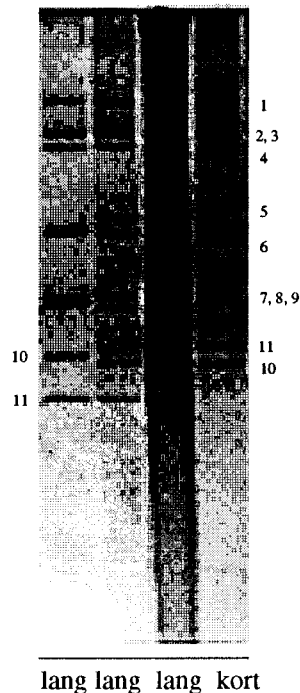
virussen met behulp van polyacrylamide gel elektroforese (PAGE) te identificeren. Zowel de groep als de subgroep-specifieke epitopen zijn gelegen op het VP6, een eiwit dat deel uitmaakt van het binnencapside van het virus.

Binnen groep A kunnen de rotavirussen in serotypen worden ingedeeld op basis van hun reactiviteit in neutralisatieproeven met serotype-specifieke hyperimmuunsera (26). Deze neutralisatieproeven meten hoofdzakelijk de antistofreactiviteit met het op het buitencapside gelegen VP7. De indeling in serotypen berust dan ook op verschil in de antigene samenstelling van dit VP7 (tabel 1). Tot nu toe zijn er 11 verschillende serotypen geïdentificeerd waarvan zes bij de mens. Hiervan zijn, epidemiologisch gezien, met name de serotypen 1, 2, 3 en 4 van belang. Naast het VP7 kan ook het op het buitencapside gelegen VP4 neutraliserende antistoffen opwekken. Tevens speelt dit VP4-eiwit een belangrijke rol bij de virulentie van een rotavirus-stam (37).

Tabel 1 Indeling van groep A rotavirussen in serotypen (VP7-type)

VP7 serotype	referentiestammen geïsoleerd uit:	
	mens	dier
1	WA, K8, KU, D, M37	
2	DS-1, S2, KUN, RV5	
3	Ito, P, M, YO, RV3	SA-11 (aap), MDR (varken) H2 (paard), EDIM (muis)
4	St-3, Hochi, VA-70	SB-2 (varken)
5		OSU (varken)
6		NCDV, UK (rund)
7		Ch2 (kip)
8	69 M, B37	
9	WI-61, F45	
10		223 (rund)
11		YM (varken)

Het genoom van rotavirussen bestaat uit gesegmenteerd dubbelstrengs-RNA dat is opgebouwd uit 11 segmenten van in totaal 18500 baseparen (bp). Op basis van verschillen in mobiliteit van segment 10 en 11 zijn humane rotavirussen in twee genogroepen in te delen.



Figuur 3 Electroferogram van groep-A rotavirus RNA-segmenten. De RNA-profielen van 3 rotavirusstammen met een lang en één met een kort patroon zijn zichtbaar.

Stammen met een "kort" patroon hebben een 11^e segment dat een lagere mobiliteit heeft dan hetzelfde gensegment in stammen met een "lang" patroon (figuur 3). In het algemeen bestaat er een korrelatie tussen stammen met een "kort" RNA-patroon en serotype 2 specificiteit en tussen stammen met een "lang" RNA-patroon en serotype 1, 3 of 4 specificiteit. Voorts kan de de grootte van elk van de 11 segmenten per virusstam variëren. Deze variatie is de basis voor electroferotypering met behulp waarvan op moleculair niveau verwantschap tussen verschillende rotavirussen onderzocht kan worden. Op deze wijze kunnen relaties en verschillen aangetoond worden tussen verschillende rotavirus-'outbreaks'.

1.3. Diagnostiek van rotavirus

Omdat rotavirussen in tegenstelling tot de vele andere virussen niet op de klassieke wijze te kweken zijn, wordt het laboratoriumdiagnostisch onderzoek uitgevoerd door het aantonen van het virus of van virusantigeen. Het virus wordt meestal in grote aantallen in de faeces uitgescheiden. Hierdoor en door de karakteristieke morfologie is het virus gemakkelijk in de faeces herkenbaar met behulp van elektronenmicroscopie (EM). Deze techniek staat ook detektie van andere virussen toe; de detektiEGrens ligt echter bij ongeveer 10^5 à 10^6 virusdeeltjes per ml. Door de grote specificiteit van deze techniek wordt ze vaak als gouden

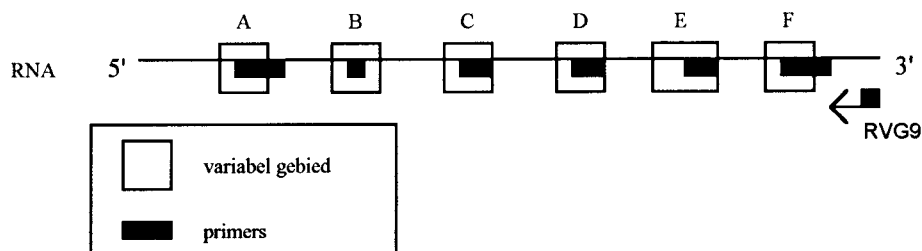
standaard gebruikt. In de dagelijkse routine is het echter een omslachtige en tijdrovende techniek waarbij kostbare apparatuur en goed getraind laboratoriumpersoneel vereist zijn. Deze techniek wordt dan ook slechts op enkele laboratoria in Nederland uitgevoerd. Meestal wordt gekozen voor een methode waarbij het virusantigeen kan worden aangetoond zoals door middel van een immunofluorescentiereactie of (commercieel verkrijgbare) latexagglutinatiereacties en enzym immunoassay's (EIA). Op het laboratorium voor Virologie van het RIVM werd een eigen EIA ontwikkeld, waarin monoclonale antistoffen zijn ontwikkeld en toegepast voor het aantonen van rotavirus groep A antigeen in faeces van patiënten met gastroenteritis. Al deze diagnostische testen maken gebruik van antistoffen gericht tegen het op het VP6 gelegen groepsantigeen van groep A rotavirussen.

Naast deze immunologische detectiemethoden kan het virus ook worden aangetoond door de detectie van het gesegmenteerde rotavirus-RNA dat door middel van gelelektroforese op grootte is te scheiden. Naast de grote specificiteit is een voordeel van deze techniek dat ook groep B en C rotavirussen kunnen worden aangetoond. Deze techniek geeft bovendien nog aanvullende epidemiologische informatie omdat de RNA-profielen van de individuele isolaten na rotavirusuitbraken met elkaar vergeleken kunnen worden.

1.4. Typering van rotavirus groep A

Rotavirussen kunnen met een aantal methoden geserotypeerd worden. Omdat de indeling in serotype gebaseerd is op neutralisatie van virale infectiositeit werden hiervoor oorspronkelijk plaque reductie of fluorescentie focus neutralisatie testen gebruikt. Omdat elk virus bij deze methode in kweek gebracht moet worden, wat nogal bewerkelijk is, werden al snel andere typeringsmethoden ontwikkeld. De laatste jaren hebben een aantal onderzoeksgroepen VP7 serotype-specifieke monoclonale antistoffen (MoAb's) tegen serotypen 1, 2, 3 en 4 ontwikkeld (12, 24, 42, 44). Het gebruik van deze reagentia in een EIA waarbij de rotavirussen rechtstreeks vanuit de faeces getypeerd kunnen worden (21), levert door de relatieve eenvoud van de test en het grote aantal faecesmonsters dat tegelijkertijd geanalyseerd kan worden een groot voordeel op.

Recentelijk is een typeringsmethode door middel van de polymerase ketting reactie (PCR) beschreven (18). De serotype-specifieke epitopen op het VP-7 glycoproteïne worden gecodeerd door een aantal gebieden op gensegment 9 (of 8, afhankelijk van de virusstam) waarvan de nucleotiden binnen één serotype constant maar tussen de serotypen verschillend zijn (20).



Figuur 4 Rotavirus gen 9 (of gen 8) RNA welke codeert voor het VP7 en de lokatie's van de 6 variabele gebieden (A/t/m F) en de PCR-primers. RVG9 is de groepspecifieke primer

Voor elk serotype is een serotype-specifieke primer gekozen corresponderend met één van de zes variabele gebieden (figuur 4). Tezamen met de groepspecifieke primer RVG9 kan op deze wijze met een PCR iedere rotavirusstam getypeerd worden. Doordat de variabele gebieden, A t/m F, zich op verschillende afstanden van het 3'-eind van het 9^e genoomsegment bevinden, is de lengte van het gevormde ampliconaat karakteristiek voor een bepaald rotavirus serotype, zodat typering mogelijk is.

1.5. Behandeling en preventie

De door rotavirus geïnduceerde gastroenteritis is zelf-limiterend. Daarom is de behandeling van patiënten met ernstige rotavirusdiarree uitsluitend symptomgericht. Hierbij staat de toediening van vocht en electrolyten, oraal of intraveneus, voorop. Omdat voorzieningen om parenteraal vocht en electrolyten toe te dienen op veel plaatsen in de wereld niet aanwezig zijn, is de effectiviteit van een oraal rehydratie zout (ORS) intensief geëvalueerd. Dit ORS is goedkoop en eenvoudig van samenstelling (per liter water: 20 g glucose, 3.5 g natriumchloride, 2.5 g natriumbicarbonaat en 1.5 g kaliumchloride) en is zeer geschikt gebleken om binnen zeer korte tijd de vocht en electrolytenbalans te herstellen (40).

Vanwege de noodzaak tot herhaaldelijk toedienen is passieve immunisatie via moedermelk geen praktische methode voor bescherming tegen rotavirusdiarree en daarom alleen toepasbaar in speciale gevallen zoals bij de behandeling van immunodeficiënte personen met een chronische rotavirusinfectie.

De mortaliteit als gevolg van rotavirusdiarree is hoog in gebieden waar rehydratiebehandeling niet beschikbaar is. Een effectief, veilig vaccin zal waarschijnlijk het aantal kinderen dat als gevolg van ernstige rotavirusdiarree overlijdt sterk verminderen. Hieraan gekoppeld zal tevens het aantal ziekenhuisopname's van deze kinderen afnemen. Een aantal vaccins zijn in ontwikkeling en worden uitgetest. De effectiviteit van deze vaccins hangt in belangrijke mate af van de inductie van de lokale darmimmunitet met de daarbij horende stimulatie van rotavirus-specifieke IgA-antistoffen. De samenstelling van een quadrivalent rotavirusvaccin

(serotype 1, 2, 3 en 4) lijkt noodzakelijk omdat bescherming na vaccinatie met één serotype, serotype-specifiek lijkt te zijn (39).

Rotavirussen worden via de faecaal-orale route verspreid. Daarom is een goede handenhygiëne, desinfectie en verwijderen van geïnfecteerd materiaal noodzakelijk om in zieken- en verpleeghuizen verspreiding van dit virus te voorkomen. Het virus is extreem resistent voor een groot aantal commercieel verkrijgbare desinfectantia zoals hypochloriet-oplossingen en in een studie van Lloyd-Evans (30) is zelfs 70% alcohol niet werkzaam. Voor de desinfectie van oppervlakten is bleekwater met >20.000 ppm vrij chloor bruikbaar voor de inaktivatie van humaan rotavirus terwijl voor huiddesinfectie een jodofoor (bijv. Betadinezeep) effectief is.

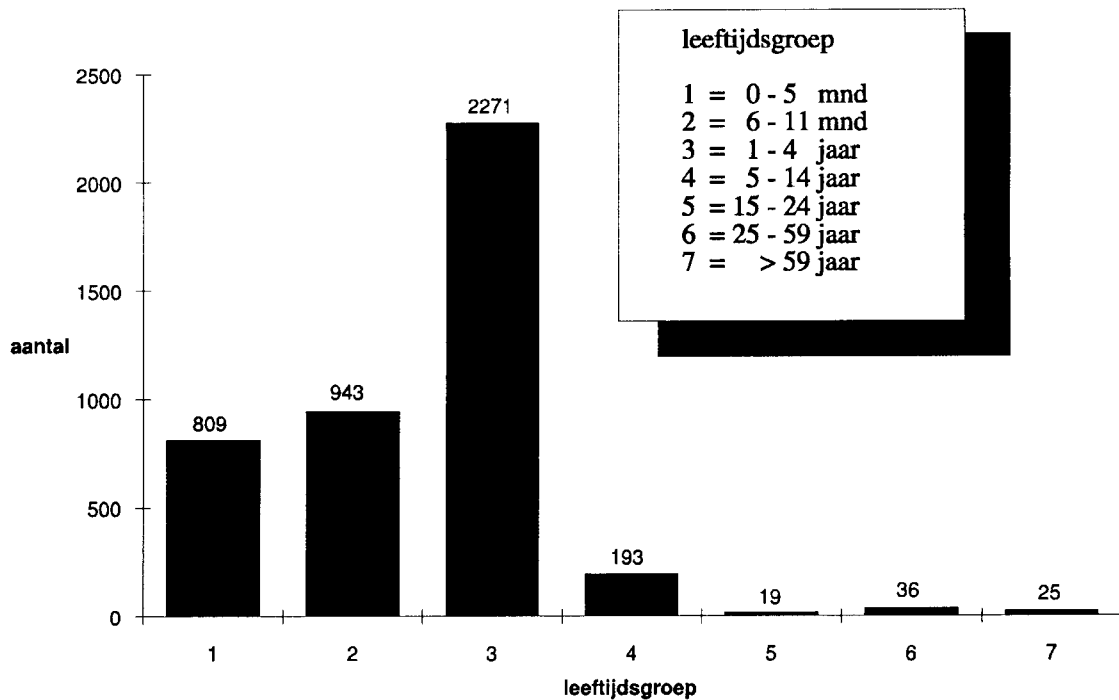
1.6. Doel van het onderzoek

Met dit onderzoek wordt beoogd enig inzicht te verschaffen in de verspreiding van rotavirussen in Nederland. Het onderzoek richt zich op twee deelgebieden: diagnostiek en epidemiologie. Een aantal van de in Nederland gebruikte methoden voor de diagnostiek van een rotavirusinfectie (latexagglutinatie (LA), enzyme immunoassay (EIA)) worden in een vergelijkend onderzoek met twee elektroforese methoden (polyacryl-amide gel elektroforese (PAGE) en agarose gel elektroforese (AGE) geëvalueerd. Met deze laatste twee methoden kan tevens inzicht verkregen worden in het voorkomen van andere dan groep A rotavirussen. Naast de seizoenincidentie van rotavirussen in Nederland en de prevalentie bij bepaalde leeftijdsgroepen levert de verdeling van de verschillende rotavirus-serotypen epidemiologisch belangrijke informatie op. Op zoek naar een geschikte methode voor de serotypering van groep A rotavirussen hebben wij twee verschillende methoden met elkaar vergeleken: een typering met een panel serotype-specifieke monoclonale antistoffen en een PCR-typering met serotype-specifieke primers.

2 RESULTATEN

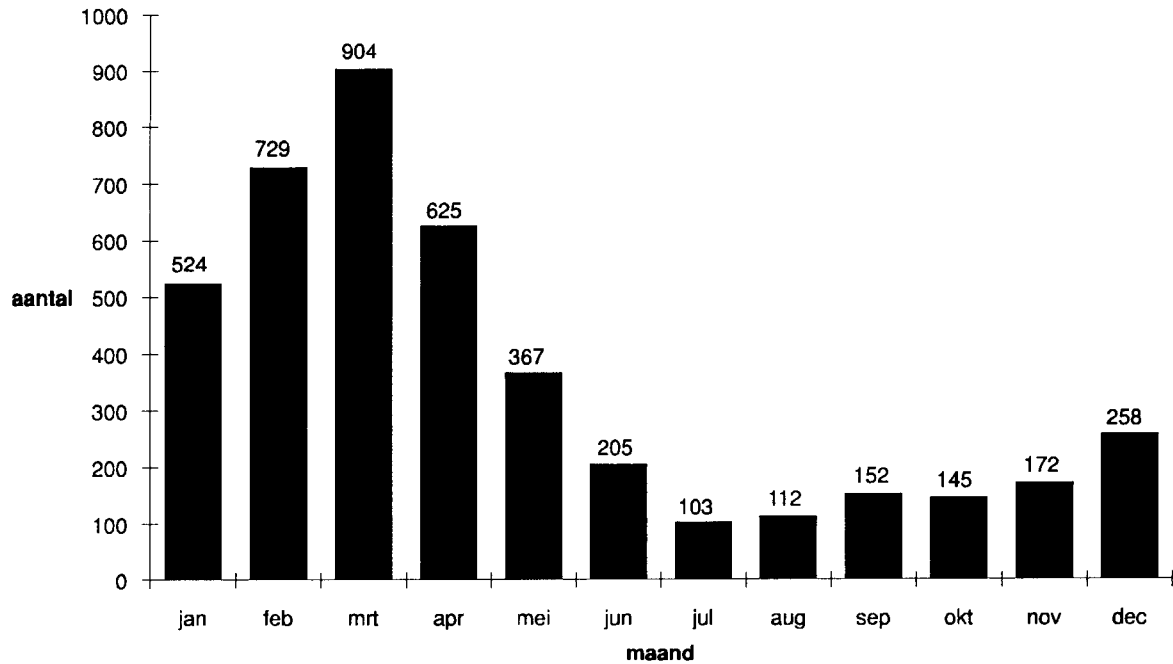
2.1. Leeftijdverdeling en seizoensincidentie

Uit de gegevens in de virologische maandstaten blijkt dat in de periode 1984-1988 in Nederland vooral kinderen onder de leeftijd van vier jaar een rotavirusinfectie doormaakten welke tot huisartsenbezoek of ziekenhuisopname leidde (figuur 5). De diagnose wordt vaker bij jongens (56%) dan bij meisjes (44%) gesteld.



Figuur 5 Leeftijdverdeling van rotavirusinfecties bij personen met gastro-enteritis in Nederland. (Virologische maandstaten 1984 - 1988)

Infecties met rotavirus zijn in de landen met een gematigd klimaat zoals Nederland seizoensgebonden zoals blijkt uit figuur 6. In deze figuur zijn cumulatief de gegevens van het aantal rotavirusinfecties gedurende vijf seizoenen verwerkt zoals die in de periode 1984-1988 in de 15 virologische laboratoria in Nederland zijn gediagnostiseerd en gerapporteerd in de virologische maandstaten. De seizoenpiek ligt in de maanden februari, maart en april van elk jaar. Gedurende deze periode is vaak 30-50% van de onderzochte faeces van kinderen met gastro-enteritis positief voor rotavirus. De gegevens van figuur 6 bestaan betreffen voor het merendeel diagnoses van patiënten die in een ziekenhuis zijn opgenomen. De feitelijke incidentie van rotavirus-infecties in de populatie ligt veel hoger.



Figuur 5 Seizoensincidentie van rotavirusinfecties in Nederland (Virologische maandstaten 1984 - 1988)

Uit de gegevens van epidemiologisch onderzoek (25) gedurende de jaren 1988, 1989 en 1990, bij personen met gastro-enteritis die de huisarts bezochten, bleek dat rotavirus na Campylobacter het meest gevonden micro-organismen was. In totaal werden 2437 faeces onderzocht op de aanwezigheid van rotavirus met behulp van de RIVM antigeen-EIA. De incidentie van rotavirusinfecties bij patiënten met gastroenteritis die de huisarts bezochten lag in deze periode van drie jaar gemiddeld 6.3%. Hierbij was ook weer duidelijk een seizoenpiek in het vroege voorjaar waarneembaar. Een duidelijk verschil met de gegevens in de virologische maandstaten is dat in dit epidemiologisch onderzoek de helft van het aantal rotavirus-infecties bij personen ouder dan vijf jaar voorkwam.

2.2. Rotavirus detektie in Nederland

In 1991 is onder Streeklaboratoria en virologische laboratoria een enquête gehouden naar de gebruikte methoden voor het aantonen van rotavirusinfecties. Door 29 (75%) van de aangeschreven laboratoria werd hierop gereageerd. Uit de resultaten van deze enquête (tabel 3) blijkt dat de meeste diagnostische laboratoria in Nederland voor de detektie van rotavirus de commercieel beschikbare en snelle antigeen-detektie kits zoals latexagglutinaties en enzym immunoassay's gebruiken.

Tabel 3 Inventarisatie van de in 1991 in Nederlandse laboratoria gebruikte rotavirus-testen.

naam	type	leverancier	aantal
Rotascreen	latexagglutinaties	Mercia	6
Wellcozyme	latexagglutinaties	Wellcome	4
Slidex Rota.2	latexagglutinaties	Biomerieux	5
Diarlex (Rotalex)	latexagglutinaties	Orion	5
RIVM-EIA	enzym immunoassay	RIVM	4
Testpack/Rotazyme II	enzym immunoassay	Abbott	3
Elektronenmicroscopie	negatief contrast		2
		totaal	29

De meerderheid (70%) van de laboratoria maakt gebruik van een latexagglutinatieresactie. Slechts twee laboratoria maken gebruik van EM, in principe een "catch-all" techniek waarmee ook andere gastroenteritis virussen kunnen worden aangetoond.

Opvallend is dat er geen enkel laboratorium gebruik maakt van een methode om rotavirus-RNA aan te tonen. Bekend is dat tijdens een infectie het virus in zodanig grote hoeveelheden in de faeces wordt uitgescheiden dat het virale RNA na extractie en elektroforese op een gel (PAGE of AGE) zichtbaar gemaakt kan worden. De 11 genoomsegmenten van het virale RNA migreren in een karakteristiek patroon wat deze techniek tegelijkertijd diagnostisch en specifiek maakt. Bijkomend voordeel is dat naast de groep A rotavirussen ook rotavirus groep B en C kunnen worden aangetoond. De actuele incidentie van deze serogroepen in Nederland is onbekend wat met name wordt veroorzaakt doordat in de diagnostische laboratoria methoden worden toegepast die slechts detectie van groep A rotavirussen toelaten (tabel 3).

2.3. Vergelijkend onderzoek naar verschillende detektiemethoden

In een vergelijkend onderzoek naar verschillende detektiemethoden voor het aantonen van rotavirus hebben we vier methoden met elkaar vergeleken: latexagglutinaties (Rotascreen), een in eigen beheer ontwikkelde enzym immunoassay (RIVM-EIA), polyacrylamide gel elektroforese (PAGE) en agarose gel elektroforese (AGE).

Van 205 kinderen (92 meisjes en 113 jongens) met klachten van acute gastroenteritis werd faecesmonsters verzameld. De leeftijd van de kinderen varieerde tussen 1 en 178 maanden (mediaan 26 maanden). Éénentwintig percent van de kinderen was niet ouder dan één jaar terwijl 41% niet ouder dan twee jaar was. Op honderd van deze 205 faeces werd een virusisolatie uitgevoerd. In geen van deze faeces kon een ander virus worden aangetoond. De resultaten van de vier verschillende methoden staan vermeld in tabel 4.

Tabel 4 Detectie van rotavirus in 205 faecesmonsters door middel van agarose gel elektroforese (AGE), polyacrylamide gel elektroforese (PAGE), enzyme immunoassay (EIA) en latexagglutinatie (LA)

	methode				TRUE	konfirmatie		aantal monsters
	AGE	PAGE	EIA	LA		EIA	EM	
-	-	-	-	-	-	nd	nd	138
+	+	+	+	+	+	nd	nd	50
+	-	+	+	+	+	pos	nd	4
-	+	+	+	+	+	pos	nd	4
-	-	+	-	-	-	nd	neg	2
+	-	-	+	+	+	nd	nd*	1
-	+	+	-	+	+	pos	nd	1
-	-	-	+	-	-	nd	neg (2x) nd (1x)	3
-	-	+	+	+	+	pos (1x) neg (1x)	nd	2
<hr/>								
totaal (%):	55 (26.8)	55 (26.8)	63 (30.7)	64 (31.2)				

* Te weinig materiaal beschikbaar om EM-onderzoek uit te voeren.
nd Niet uitgevoerd

Bij 188 (92%) van de 205 monsters gaven de verschillende methoden identieke resultaten te zien. Vijftig monsters waren positief en 138 waren negatief met alle vier methoden. Van de 17 discrepante monsters werden er 15 nader onderzocht. Elf met een confirmatie-EIA en de vier EIA-negatieve faeces met behulp van elektronenmicroscopie (EM). Van twee faecesmonsters kon geen aanvullend onderzoek worden uitgevoerd omdat geen faeces meer beschikbaar was. In geen van de vier met EM onderzochte faeces kon rotavirus worden aangetoond. Bij 10 van de 11 monsters kon in de confirmatie-EIA de diagnose rotavirus worden bevestigd.

Om de gevoeligheid en met name de specificiteit van de vier verschillende methoden beter uit te drukken werd er een gouden standaard vastgesteld: TRUE. Deze werd positief gedefinieerd als AGE, PAGE of de combinatie EIA én LA positief waren. Slechts twee monsters waren

positief in EIA én LA terwijl ze negatief waren met beide elektroforese-technieken. Alle resultaten van de monsters die geconfirmeerd werden, kwamen overeen met deze TRUE-parameter.

Tabel 5^a Gevoeligheid en specificiteit ten opzichte van TRUE als gouden standaard

test	referentie	gevoeligheid	specificiteit
AGE	TRUE	88.7	100.0
PAGE	TRUE	88.7	100.0
EIA	TRUE	98.4	98.6
LA	TRUE	98.4	97.9

Ten opzichte van TRUE zijn de EIA en de LA de technieken met de hoogste gevoeligheid, beide 98.4%, en de AGE en PAGE de technieken met de grootste specificiteit, 100% (zie tabel 5^a).

Omdat slechts 100 faecesmonsters aselekt waren gekozen, kon slechts voor deze deelpopulatie de positieve en negatieve voorspellende waarde berekend worden (tabel 5^b).

Tabel 5^b Gevoeligheid, specificiteit en voorspellende waarden van vier methoden voor het aantonen van rotavirus ten opzichte van TRUE als gouden standaard

methode	specificiteit	gevoeligheid	voorspellende waarde	
			positief	negatief
EIA	63/63 (100)	36/37 (97.3)	36/36 (100)	63/64 (98.4)
PAGE	63/63 (100)	34/37 (91.2)	34/34 (100)	63/66 (95.4)
LA	62/63 (98.4)	36/37 (97.3)	36/37 (97.3)	62/63 (98.4)
AGE	63/63 (100)	31/37 (83.8)	31/31 (100)	63/69 (91.3)

Met de beide elektroforese-technieken kunnen in principe ook groep B en C rotavirussen worden aangetoond. Deze virussen, met een duidelijk van groep A rotavirussen verschillend genoomprofiel, werden in de 205 onderzochte faeces niet aangetroffen.

De gemiddelde tijd die noodzakelijk is voor het uitvoeren van elk van de vier methoden werd berekend. Hierbij werd onderscheid gemaakt tussen de werkelijke 'hands-on' tijd, dus exclusief de incubatietijden, en de doorloop tijd vanaf de binnenkomst van een faecesmonster tot het verkrijgen van een uitslag. Ook werden de materiële kosten en de totale kosten, dus inclusief de op de 'hands-on' tijd gebaseerde personele kosten per monster berekend. Bij zowel EIA als LA werd voor de materiële kosten een gemiddelde genomen van de prijs van drie verschillende leveranciers. De berekening van de totale kosten is gebaseerd op een uurtarief van fl 35,- exclusief overheadkosten. Er werd van 10 faecesmonsters per analyse

uitgegaan. De resultaten zijn vermeld in tabel 6. De LA is de snelste methode voor het aantonen van rotavirus (doorlooptijd 1 uur). Van de vier methoden zijn de materiële kosten van AGE het laagst (fl 1.50 per geanalyseerd monster). Ook wanneer de totale kosten per geanalyseerd monster berekend worden, is AGE de goedkoopste methode (fl 4.10) gevolgd door de LA (fl 7.75).

Tabel 6 Tijdsduur en kosten per monster van de verschillende methoden voor het aantonen van rotavirus

		LA	AGE	EIA	PAGE
Tijd	'hands-on' tijd (uren)	0.50	0.75	1.00	3.00
	doorloop tijd (uren)	1.00	3.00	4.00	28.00
Kosten	materiële kosten (fl)	6,00	1.50	7.25	3.50
	uitvoeringskosten (fl)	1.75	2.60	3.50	10.50
	totale kosten (fl)	7.75	4.10	10.75	14.00

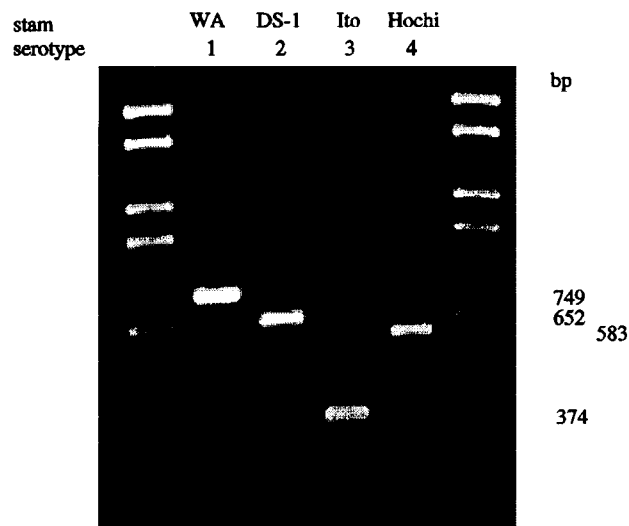
Bij de berekening van tijd en prijs per geanalyseerd monster werd uitgegaan van een gelijktijdige analyse van 10 monsters.

2.4. Typering

De resultaten van de typering van 84 rotavirus faecesstammen zijn weergegeven in tabel 7. Met behulp van de serologische techniek (MoAb's) konden 69 (82%) stammen worden getypeerd en met de PCR 81 (96%).

Tabel 7 Vergelijking tussen een ELISA en een PCR voor de typering van 84 rotavirusstammen.

type (EIA)	type (PCR)				ontypeerbaar	aantal
	1	2	3	4		
1	53					53
2		1			1	2
3			2			2
4				12		12
ontypeerbaar	11			2	2	15
totaal	64	1	2	14		84



Figuur 6 PCR-typing van humane rotavirus referentiestammen. De geamplificeerde DNA-segmenten werden op een 1.2% agarosegel gescheiden en met ethidium bromide aangekleurd

Één van de drie stammen die met de amplificatie typeringsmethode (PCR) niet typeerbaar waren, kon met de EIA als serotype 2 worden getypeerd. De overige twee bleken met deze methode niet te typeren. Met de amplificatie typeringsmethode konden 13 faeces worden getypeerd (11 serotype 1 en 2 serotype 4) die met de EIA niet typeerbaar waren. Van deze 13 faeces reageerden er vijf met meerdere serotypespecifieke monoclonale antistoffen en reageerden de overige acht met geen enkele monoclonale antistof. De resultaten van beide typering met de andere 68 rotavirus faecesstammen (81%) waren volledig met elkaar in overeenstemming: 53 serotypen 1, 1 serotype 2, 2 serotypen 3 en 12 serotypen 4. Alle serotype 2 stammen hadden met behulp van PAGE een zogenaamd kort RNA-patroon.

3. CONCLUSIE EN DISCUSSIE

3.1. Incidentie en diagnostiek

Zoals in andere landen met een gematigd klimaat, is ook in Nederland infectie met rotavirussen van groep A, seizoensgebonden (5). De piek ligt elk jaar in de late wintermaanden; februari, maart en april. Ook blijkt dat de meeste infecties die aanleiding geven tot ziekenhuisopname bij kinderen tot 4 jaar voorkomen wat overeen komt met de ontwikkeling van specifieke antistoffen tegen dit virus (8).

Opvallend is het verschil met de leeftijdsverdeling van patiënten met een rotavirus-infectie die de huisarts bezoeken (25). In deze studie blijkt dat de helft van het aantal infecties voorkomt bij personen ouder dan 5 jaar. Mogelijk zijn dit personen die een herinfectie met een ander rotavirus-serotype doormaken. De gemiddelde incidentie van personen met acute gastroenteritis die de huisarts hiervoor bezoeken ligt op 15 episodes per 1000 personen per jaar. Wanneer 6.3% van deze episodes door rotavirus veroorzaakt wordt, dan leidt extrapolatie naar de totale Nederlandse bevolking (ca. 15 miljoen) tot een schatting dat ongeveer 15.000 personen jaarlijks naar de huisarts gaan met klachten veroorzaakt door een rotavirus-infectie.

Voor het aantonen van rotavirus wordt door de meeste diagnostische laboratoria in Nederland gebruik gemaakt van een latexagglutinatie reactie. Deze methode is snel, waardoor eventuele epidemieën op couveuse- of kinderafdelingen vroegtijdig kunnen worden herkend en snel passende, preventieve maatregelen genomen kunnen worden. Opvallend is dat er geen enkel laboratorium gebruik maakt van een methode om het rotavirus-RNA aan te tonen. Bijkomend voordeel is dat naast de groep A rotavirussen ook rotavirus groep B en C kunnen worden aangetoond. De actuele incidentie van deze serogroepen in Nederland is onbekend wat wordt verklaard doordat in de diagnostische laboratoria methoden worden toegepast die slechts detectie van groep A rotavirussen toelaten en omdat de meeste faecesmonsters die voor rotavirusdiagnostiek worden aangeboden, afkomstig zijn van kinderen jonger dan vijf jaar. Een aantal studies naar aanleiding van gastroenteritis-uitbraken bij een gezin (33) en bij schoolkinderen (7, 32, 47), suggereren dat groep C rotavirussen veel meer dan groep A rotavirussen bij een oudere leeftijdsgroep voorkomen. Infecties met dit virus komen daarom waarschijnlijk vaker voor dan dat ze aangetoond worden. Serologische studies in Engeland, waarin men antistofprevalenties van 27% rapporteert, bevestigen dit (6, 10).

Bij ons vergelijkend onderzoek naar vier verschillende detektiemethoden voor het aantonen van rotavirus hebben we gekozen voor twee immunologische detektiemethoden en twee fysisch-chemische detektiemethoden. Naast de, in veel van de Nederlandse laboratoria gebruikte, latexagglutinatie-methode en een in eigen beheer ontwikkelde EIA hebben we gekozen voor de standaardmethode voor het aantonen van het rotavirus-RNA (PAGE) en voor een variant hiervan (AGE). De doorlooptijd van de standaard-PAGE is meer dan 24 uur en dat is te lang voor toepassing in een diagnostisch laboratorium. De techniek kan versneld worden door kortere extractieprocedures (17, 38) en duurt dan 9 uur zodat er binnen één werkdag resultaat verkregen kan worden. Als alternatief kan een snelle extractieprocedure gevolgd worden door AGE en aankleuring van het rotavirus-RNA met ethidiumbromide (9).

Deze methode duurt slechts 3 uur en uit ons vergelijkend onderzoek blijkt dat de gevoeligheid ervan met die van PAGE te vergelijken is.

Essentieel bij een vergelijkend onderzoek is de keuze van de referentiemethode, een zogenaamde gouden standaard. Meestal wordt hiervoor de EM-methode gebruikt. Wij hebben gekozen voor een zogenaamde TRUE-parameter. Vijf faecesmonsters die slechts met één methode positief waren (3 x LA, 2 x EIA), konden hierdoor als vals positief worden bestempeld. Ook met aanvullend onderzoek kon geen rotavirus in deze monsters worden aangetoond. Bij 10 faeces was slechts één van de elektroforese-methoden positief. Bij acht van deze waren zowel EIA als LA beide positief. Met deze TRUE-parameter kan een eventueel gebrek aan gevoeligheid van de elektroforese-methoden worden aangetoond. Dit kon bij twee faecesmonsters die zowel in de EIA als LA een positieve uitslag hadden, worden vastgesteld. Bij alle 15 faecesmonsters waarbij discrepanties tussen de vier detektiemethoden waren en er konformatietesten uitgevoerd zijn, bleken de resultaten hiervan met de TRUE-parameter overeen te komen. Bij alle vier methoden was de specificiteit ten opzichte van de TRUE-parameter goed (hoger dan 97.5%).

De keuze welke methode voor het aantonen van rotavirus gebruikt zal worden hangt af van een aantal zaken. Naast het soort laboratorium en het aantal monsters dat per dag voor rotavirusdiagnostiek wordt aangeboden, kan ook de prijs per geanalyseerd monster een rol bij deze keuze spelen. Zo zal een ziekenhuislaboratorium vaak kiezen voor een snelle test (LA) terwijl een referentielaboratorium eerder zal kiezen voor een EIA omdat hiermee grotere aantallen monsters tegelijkertijd getest kunnen worden. In vergelijking met de PAGE en AGE methode zijn de materiële kosten van deze methoden per geanalyseerd faecesmonster hoog omdat in de regel gebruik wordt gemaakt van kant en klare, commerciële technieken. Uit ons onderzoek blijkt dat de AGE-methode een specifieke, snelle methode is voor het aantonen van rotavirus en zeker geschikt voor gebruik in diagnostische laboratoria. Daarnaast is deze elektroforese-methode zeer geschikt voor surveillance-activiteiten omdat daarmee informatie kan worden verkregen over verwantschap tussen rotavirussen in verschillende patiëntemonsters, bijvoorbeeld bij ziekenhuisinfecties, epidemieën in kinderdagverblijven of verpleeghuizen (31) en over het eventuele voorkomen van groep B en C rotavirus in Nederland.

3.2. Typering

Met de door Coulson (12) ontwikkelde monoclonale antistoffen kon 82% van de monsters getypeerd worden. Dit is in overeenstemming met de resultaten van andere onderzoeksgroepen die met deze techniek eveneens 20-30% van de monsters niet kunnen typeren (1, 4, 18, 34, 45). Met een modificatie van de onlangs door Gouvea (18) beschreven amplificatie typeringsmethode kon 96% van de rotavirus faecesstammen getypeerd worden. In de 68 faecesstammen die met beide methoden konden worden getypeerd, werd volledige overeenstemming gevonden. Hieruit blijkt dat met de amplificatie-typeringsmethode zeer specifiek de serotypen bepaald kunnen worden. Tevens blijkt deze methode veel gevoeliger te zijn dan de antigene typering met monoclonalen. Dit is toe te schrijven aan het feit dat deze amplificatie typeringsmethode niet, zoals de antigene typering, afhankelijk is van het aantal

complete rotavirusdeeltjes. Deze methode is echter erg gevoelig voor mogelijk in de faeces aanwezige factoren die de enzymatische amplificatie remmen. Daarom werd de monstervoorbereiding aangepast. Het virale RNA wordt na fenol/chloroform extractie uit de faeces verder opgewerkt door binding aan CF-11 cellulose zoals door Wilde beschreven (48). Deze relatief eenvoudige wijze van monstervoorbereiding maakt de typering van rotavirus middels deze methode zeer geschikt voor gebruik in epidemiologische studies van rotavirus gastroenteritis. Omdat getypeerd werd met reagentia specifiek voor de serotypen 1, 2, 3 en 4, is het mogelijk dat de 2, door beide methoden niet getypeerde monsters, nieuwe nog niet geïdentificeerde serotypen vertegenwoordigen. Serotype 8 of 9, de andere twee serotypen bij de mens, zijn uit te sluiten omdat deze typen een duidelijk afwijkend RNA-profiel bezitten en deze profielen bij de 84 faecesstammen niet werden gevonden. Daarnaast blijkt uit een aantal epidemiologische studies naar de prevalentie van verschillende rotavirusserotypen dat binnen één seizoen en binnen een beperkt geografisch gebied alle stammen met een identiek electroferotype tot hetzelfde serotype behoren zodat op deze wijze aan rotavirussen met een duidelijk RNA-profiel toch een serotype toe te kennen is (17).

Voor de epidemiologie en de surveillance van de in Nederland circulerende rotavirussen is het noodzakelijk dat deze geserotypeerd worden. Vergelijking met de verdeling van de serotypen in verschillende andere geïndustrialiseerde landen is dan mogelijk. De verdeling van de serotypen 1, 2, 3 en 4 in Nederland in 1990 was respectievelijk 77%, 3%, 3% en 17%. Deze frequentieverdeling is vergelijkbaar met die in andere geïndustrialiseerde landen (3, 4, 14, 15, 18, 34) waar serotype 1 rotavirussen domineren. Serotype 4 is daarna het type dat het meest voorkomt terwijl de serotypen 2 en 3 gedurende de meeste jaren wel circuleren maar slechts sporadisch voorkomen. Dat er duidelijke 'shifts' optreden blijkt uit een studie in Engeland in de seizoenen 1989 en 1990 waar een duidelijke verschuiving van type 1 naar type 4 werd waargenomen (36).

Omdat de bescherming na vaccinatie serotypespecifiek lijkt te zijn, is onderzoek naar verschillen in serotype tussen virulente en asymptomatische virusstammen belangrijk voor het ontwikkelen van een effectief vaccin (39). Om na te gaan of er een jaarlijkse verschuiving in de verdeling van de verschillende serotypen optreedt, is het noodzakelijk om retrospectief rotavirus faecesstammen van een aantal achtereenvolgende jaren te serotyperen. Het onderkennen van de variabiliteit van verschillende serotypen is belangrijk omdat dit de wisselende successen van een aantal vaccintrais zou kunnen verklaren. Naast het VP7 is ook het VP4 een belangrijk rotavirus-eiwit dat neutraliserende en dus beschermende antistoffen kan opwekken. Het lijkt daarom noodzakelijk om naast een serotype (VP7) indeling ook een VP4 indeling voor rotavirus groep A te maken. Sinds kort is het mogelijk om met een PCR een VP4 typering uit te voeren (16). De moleculaire epidemiologie van genen die coderen voor neutraliserende antigenen van epidemiologisch belangrijke rotavirussen kunnen dus met PCR-typeringmethoden in kaart worden gebracht.

4. MATERIAAL EN METHODEN

4.1. Diagnostiek

4.1.1. Patiëntematerialen:

Er werden in totaal 205 faecesmonsters onderzocht op de aanwezigheid van rotavirus door middel van EIA, LA, PAGE en AGE. Hiervan waren 100 opéénvolgende monsters afkomstig van kinderen met acute gastroenteritis die naar het laboratorium voor Virologie van het RIVM werden opgestuurd. Dit aantal werd aangevuld met 105 faecesmonsters afkomstig van het streeklaboratorium in Enschede.

Voor EIA en PAGE werden er 10% faecessuspensies in 0.01 M fosfaat gebufferde zoutoplossing (PBS) pH 7.2 gemaakt. Na 30 minuten schudden met glaspereels en 30 minuten centrifugeren bij 1800 x g werden de supernatanten bij -20 °C opgeslagen. Elk monster werd gecodeerd en onderzocht zonder voorafgaande kennis van de uitslag van de andere testen.

4.1.2. Agarose gel elektroforese (AGE)

De door Chudzio en anderen (11) beschreven techniek werd toegepast. Aan een 20% faecessuspensie in extractiebuffer (0.02 M Tris-HCl pH 7.4, 0.3 M NaCl, 0.01 M MgCl₂, 0.1% SDS, 0.005 M EDTA, 4% sucrose, 0.04% broomfenolblauw) werd eenzelfde volume fenol/chloroform (1:1) toegevoegd en vervolgens 30 seconden grondig gemengd door middel van vortexen. Na 10 minuten centrifugeren bij 10.000 x g werd 0.040 ml van het supernatant op een 1% agarose gel (Pharmacia agarose NA) gebracht waaraan 0.5 mg/l ethidiumbromide was toegevoegd. Vervolgens werd er gedurende 2 uur horizontaal bij kamertemperatuur geëlectroforeerd met 4 V/cm. Van de gels werden foto's gemaakt op een UV-transilluminator bij 300 nm.

4.1.3. Polyacrylamide gel elektroforese (PAGE)

De procedure van Sanders *et al* (41), werd gevolgd. Aan 0.5 ml faecessupernatant werd 0.5 ml van een oplossing met 0.2 M natriumacetaat pH 5.2 en 2% SDS toegevoegd. Het virale RNA werd geëxtraheerd door toevoeging van een gelijk volume fenol / chloroform (1:1), 1 minuut vortexen en 2 minuten centrifugeren bij 10.000 x g. Aan 0.4 ml van de waterfase werd vervolgens 1 ml 100% ethanol en 0.040 ml 3 M natriumacetaat pH 5.3 toegevoegd. Na minstens 2 uur incubatie bij -20°C gevolgd door centrifugatie gedurende 30 minuten bij 10.000 x g, werd het RNA-pellet onder vacuum gedroogd en opgenomen in 0.025 ml elektroforesebuffer (60 mM Tris-HCl pH 6.8 waarin 10% (v/v) glycerol en 0.001% broomfenolblauw). De monsters werden op een 10% polyacrylamide gel gebracht en gedurende 18 uur bij 4°C en 20 mA geëlectroforeerd. Het RNA werd zichtbaar gemaakt door zilverkleuring (Biorad).

4.1.4. Latex agglutinatie (LA)

Een commercieel verkrijgbare test gebaseerd op de agglutinatie van met antistof gecoate latexbolletjes werd gebruikt (Rotascreen, Mercia). Van elk faecesmonster werd een 10% suspensie gemaakt door ongeveer 0.2 g faeces toe te voegen aan 2 ml van de meegeleverde suspensie-buffer, 30 seconden te vortexen en 10 minuten bij 1800 x g te centrifugeren. Van het supernatant werd op een testkaart zowel 0.050 ml gemengd met de latexsuspensie als met de controle latexsuspensie. Agglutinatie die binnen 2 minuten zichtbaar werd, werd als positief beoordeeld.

4.1.5. Enzym immunoassay (EIA)

Wells van polystyreen microtiter strips (NUNC, Immunolon, Roskilde, Denemarken) werden gecoat met 0.15 ml van de IgG-fractie van konijneserum tegen rotavirus, stam SA-11 in een concentratie van 0.006 mg/ml in 0.05 M carbonaatbuffer van pH 9.6 gedurende minimaal vier uur bij 37°C. De wells werden vervolgens vier keer gewassen met PBS-Tween (0.01 M PBS pH 7.2 met 0.05% Tween-20). Vervolgens werd 0.1 ml van de faecessuspensie (1:1) verdund in 0.01 M PBS pH 7.2 met 0.5% Tween-20 en 5% bovine serum albumine (PBS-T-BSA) toegevoegd en werd gedurende één uur geïncubeerd bij 37°C. Na opnieuw vier keer wassen werd er één uur geïncubeerd met een in PBS-T-BSA verdunde peroxidase gelabelde monoclonale antistof gericht tegen het rotavirus groep A antigeen. Deze monoclonale antistof, op het RIVM ontwikkeld, behoort tot het IgG_{2a} isotype en werd met peroxidase-gelabeld volgens Wilson en Nakane (49). Na weer vier keer wassen met PBS-Tween werd er 20 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd met 0.1 ml substraatoplossing. Deze oplossing werd direct voor gebruik gemaakt door per ml 0.1 mg 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine en 0.12 mg ureum peroxide in 0.11 M natriumacetaat pH 5.5 op te lossen. Na 20 minuten werd de reactie gestopt door toevoeging van 0.1 ml 2 M H₂SO₄ en de optische dichtheid werd vervolgens bij 450 nm gemeten in een spectrofometer (Titertek Multiskan, Flow Laboratories, Irvine, UK) met de substraatbuffer als blanco.

Op EIA-positieve monsters die negatief waren in de andere testen, werd een EIA-blockingtest uitgevoerd. Alvorens de hierboven beschreven EIA-reactie uit te voeren werden de betreffende faecesmonsters eerst één uur met konijn antirotavirus of met preimmuun serum (1:50 verdund) geïncubeerd. Bij een extinctieafname van minstens 50% ten opzichte van incubatie met het preimmuunserum werd het faecesmonster als daadwerkelijk rotavirus positief beschouwd.

4.2. Typering

4.2.1. Patiëntemateriaal

Voor de rotavirus-serotypering in faeces werden 84 rotavirus positieve faecesmonsters onderzocht. Deze faeces, afkomstig van patiënten met gastroenteritis in 1990, waren voor virologische diagnostiek naar het laboratorium voor Virologie van het RIVM gezonden. De monsters werden voorbereid en opgeslagen zoals beschreven onder 4.1.1. Van alle faeces werd de aanwezigheid van rotavirus-RNA bevestigd met behulp van PAGE.

4.2.2. RIVM rotavirus serotype specifieke hyperimmuunsera

De rotavirus prototypestammen WA, DS-1, SA-11 en Hocht (tabel 8) werden gebruikt om hyperimmuun antisera in konijnen te produceren.

Tabel 8 Rotavirus prototype stammen gebruikt voor immunisatie

virusstam	serotype	herkomst
WA	1	ATCC (USA)
DS-1	2	Dr. Desselberger (UK)
SA-11	3	Dr. Malherbe (USA)
Hocht	4	Dr. Gerna (Italië)

Het virus voor immunisatie werd opgekweekt op MA-104 cellen en gezuiverd uit het supernatant door middel van metrizamide-gradiënt centrifugatie (43). Na 24 uur dialyse tegen 0.01 M Tris-HCl pH 8.0 en 0.01 M

CaCl₂ werd het gezuiverde rotavirus bij -70 °C bewaard. Voor elk virus werden twee SPF-konijnen op dag 0 met 1 ml gezuiverd virus (10⁷ fluorescentie focus units) gemengd met compleet Freund adjuvans subcutaan geïmmuniseerd. Na 28 dagen werd intramusculair een tweede dosis gemengd met Freund incompleet adjuvans gegeven waarna op dag 35 met 5 ml virussuspensie intraperitoneaal werd geboosterd. Tien dagen na de laatste immunisatie werd serum gewonnen en hiervan werd de neutralisatietiter ten op zichte van de verschillende prototypestammen bepaald. De IgG-fracties van de konijnesera (anti-WA, DS-1, SA-11 en Hocht) werden gezuiverd met behulp van proteïne A affiniteitschromatografie .

4.2.3. *Monoclonale antistoffen voor serotypering*

De Coulson MoAb's (RV-4:1, RV-5:2, RV-3:3 en ST-4:4), gericht tegen het VP7 en specifiek voor respectievelijk serotype 1, 2, 3 of 4 rotavirus, waren afkomstig van Silenus laboratories, Hawthorn, Australië (Lot no. MD27, MD28, MD29 en MD30, respectievelijk).

4.2.4. *Serotype-EIA* .

Deze serotype-EIA werd uitgevoerd zoals beschreven door Coulson en medewerkers (12). De optimale verdunningen van coat-antistoffen en conjugaat werden met behulp van schaakbordtitraties bepaald. Het volume tijdens elke incubatiestap was 100 µl per well.

Voor iedere te typeren rotavirussuspensie werden vier wells van microtiterstrips (NUNC, Immunolon, Roskilde, Denemarken) elk afzonderlijk gecoat met één van de serotype-specifieke konijn-IgG fracties die 1/2000 verdund waren in 40 mM carbonaatbuffer, pH 9.6. Na twee uur incubatie bij 37°C en vier keer wassen met PBS-Tween (0.01 M PBS pH 7.2 met 0.05% Tween-20) werden de wells nagecoat gedurende twee uur bij 37°C met PBS waaraan 10% taptmelk was toegevoegd. Rotavirus-positieve faecessuspensies en positieve serotype-controles werden toegevoegd (1:1 verdund in PBS pH 7.2 waaraan 0.5% Tween-20 en 10% taptmelk was toegevoegd (PBSTT)) en gedurende 16-18 uur bij 4°C geïncubeerd. Na vier keer wassen met PBS-Tween werden vervolgens de serotype-specifieke MoAb's, elk qua serotype homoloog aan de coat-antistoffen, 1/200 verdund in PBSTT toegevoegd en gedurende 2½ uur bij 37°C geïncubeerd. Na vier keer wassen met PBS-Tween werd gedurende één uur bij 37°C geïncubeerd met een peroxidase-geconjugeerd geit-anti-muis antiserum (Cappel) 1/10.000 verdund in PBSTT. Na opnieuw vier keer wassen met PBS-Tween werd er 20 minuten bij kamertemperatuur geïncubeerd met substraatoplossing. Deze oplossing werd direct voor gebruik gemaakt door per ml 0.1 mg 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine en 0.12 mg ureum peroxide in 0.11 M natriumacetaat pH 5.5 op te lossen. De reactie werd gestopt door toevoeging van 0.1 ml 2 M H₂SO₄ en de optische dichtheid werd vervolgens bij 450 nm gemeten in een spectrofometer (Titertek Multiskan, Flow Laboratories, Irvine, UK) met de substraatbuffer als blanco. De cut-off waarde was 0.300 en waarden hierboven met een P/N ratio > 3 werden als positief beoordeeld.

4.2.5. *PCR-amplificatie en typering van rotavirus*

De recent door Gouvea (18) beschreven amplificatie typeringsmethode werd toegepast. Deze methode maakt gebruik van een PCR met serotype-specifieke primers. Deze zijn complementair aan één van de zes variabele gebieden van de negatieve RNA-keten van gensegment 9 en zijn zo gekozen dat ze een blauwdruk voor elk serotype zijn. In ons onderzoek hebben we slechts gebruik gemaakt van 4 primers specifiek voor de epidemiologisch meest belangrijke serotypen 1, 2, 3 en 4. De sequentie en de lengte van de primers, het variabel gebied waar ze complementair aan zijn, en hun positie binnen het genoomsegment staan weergegeven in tabel 6.

Tabel 6 Oligonucleotide primers gebruikt voor rotavirus typering

Primer	Sequentie	nucleotiden	positie	gebied	type
RVG 9	GGTCACATCATAACAATTCT	19	1062 - 1044		alle
aBT1	CAAGTACTCAAATCAATGATGG	22	314 - 335	B	1
aCT2	CAATGATATTAACACATTTTCTGTG	25	411 - 435	C	2
aDT4	CGTTTCTTGGTGAGGAGTTG	19	480 - 498	D	4
aET3	CGTTTGAAGAAGTTGCAACAG	21	689 - 709	E	3

Deze primers zijn geselecteerd om als primer-mix te kunnen worden gebruikt tezamen met de gemeenschappelijke upstreamprimer RVG9. De primers werden gesynthetiseerd volgens de fosfo-diester-methode (Applied Biosystems).

Voor de isolatie van rotavirus-RNA werd de procedure, van Wilde *et al* (48) gevolgd. Het RNA werd uit 0.2 ml faecessuspensie geëxtraheerd met fenol/chloroform. De waterfase werd vervolgens overgebracht naar een reactievatje met 30 mg CF-11 cellulose. De suspensie werd met ethanol verdund tot 15% (v/v) en gedurende 90 minuten bij 4°C op een schudmachine geïncubeerd waarna de CF-11 cellulose gepelleteerd werd door 1 minuut centrifugeren bij 10.000 x g. Na drie keer wassen met 0.5 ml STE (0.1 M NaCl, 0.001 M EDTA, 0.01 M Tris-HCl pH 7.0) waaraan 15% ethanol was toegevoegd, werd het RNA met 0.1 ml STE geëluëerd. Vervolgens werd het RNA geprecipiteerd met 0.01 ml 3M natriumacetaat pH 5.5 en 0.3 ml 100% ethanol gedurende 16 uur bij -20°C. Het geprecipiteerde RNA werd verzameld door 30 minuten centrifugatie bij 10.000 x g en 4°C waarna het RNA-pellet in 0.025 ml TE (0.01 M Tris-HCl pH 7.5, 0.001 M EDTA) werd opgenomen.

De RT-PCR reacties werden uitgevoerd in 0.6 ml PCR-reactievatjes en in een reactievolume van 25 µl. Van het geëxtraheerde RNA werd 1 µl toegevoegd aan 19 µl van het volgende reactiemengsel: 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 40 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 7% DMSO en 25 pmol van elk in tabel 6 beschreven primers. Na toevoeging van 50 µl minerale olie, werd het ds-RNA gedendureerd door 5 minuten bij 100°C te verwarmen en vervolgens snel te koelen in een ethanol-droogijs bad. Vervolgens werd er aan elk monster 1 unit AMV-reverse transcriptase (Boehringer Mannheim, Almere) en 1.25 unit Ampli-Taq (Perkin Elmer Cetus, Gouda) toegevoegd. De vaatjes werden vervolgens in een thermocycler (Perkin Elmer Cetus, Thermo DNA cycler) geplaatst en 30 minuten bij 42°C geïncubeerd, gevolgd door 32 PCR-cycli (94°C gedurende 1 minuut, 42°C gedurende 2 minuten, en 72°C gedurende 1 minuut) en een laatste incubatie van 7 minuten bij 72°C.

Na de PCR werden de amplificaten geanalyseerd op een 1.2% agarose gel door electroforese gedurende één uur bij 150 V waarna de gels onder UV-licht werden gefotografeerd.

5. LITERATUUR

1. Ahmed M.U., Taniguchi K., Kobayashi N., Urasawa T., Wakasugi F., Islam M., Shaikh H., and Urasawa S. (1989) Characterization by enzyme-linked immunosorbent assay using subgroup- and serotype-specific monoclonal antibodies of human rotavirus obtained from diarrheic patients in Bangladesh, *J.Clin.Microbiol.*, 27, 1678-1681.
2. Appleton H. (1990) Laboratory investigation of viral gastro-enteritis, *Communic. dis. report.*, 43, 5.
3. Arista S., Giovannelli L., Pistoia D., Cascio A., Parea M., and Gerna G. (1990) Electropherotypes, subgroups and serotypes of human rotavirusstrains causing gastro-enteritis in infants and young children in Palermo, Italy, from 1985 to 1989, *Res. Virol.*, 141, 435-448.
4. Bishop R.F., Unicom L.E. and Barnes G.L. (1991) Epidemiology of Rotavirus Serotypes in Melbourne from 1973 to 1989, *J. Clin.Microbiol.*, 29, 862-868.
5. Brandt C.D., Kim H.W., Chanock R.M., Kapikian A.Z. and Parrott R.H. (1983) Pediatric viral gastro-enteritis during eight years of study, *J.Clin.Microbiol.*, 18, 71-78.
6. Bridger J.C., Pedley S., McCrae M.A. (1986) Group C rotaviruses in humans, *J. Clin. Microbiol.* 23, 760-763.
7. Brown D.W., Campbell L., Tomkins D.S., Hambling M,H. (1989) School outbreak of gastro-enteritis due to atypical rotavirus, *Lancett* ii, 737-738
8. Brussow H., Werchau H, Liedtke N. *et al* (1988) Prevalence of antibodies to rotavirus in different age-groups of infants in Bochum, West Germany, *J. Infect. Dis.*, 157, 1014-1022.
9. Bryden A.S. (1990) The immunological diagnosis of rotavirus, *Serodiagnosis and immunotherapy in infectious diseases*, 4, 407-411.
10. Caul E.O., Ashley C.R., Darville J.M. and Bridger J.C. (1990) Group C rotavirus associated with fatal enteritis in a family outbreak, *J. Med. Virol.* 30 201-205.
11. Chudzio T, Kasatiya S, Sankar-Mistry P (1989) Rapid screeningtest for the diagnosis of rotavirus infection, *J. Clin. Microbiol.*, 27, 2394-2396.
12. Coulson B.S., Fowler K.J., Bishop R.F. and Cotton R.G.H. (1985) Neutralizing monoclonal antibodies to human rotavirus and indications of antigenic drift among strains from neonates, *J Virol.*, 54, 14-20.
13. Cubitt W.D. and Holzel H. (1980) An outbreak of rotavirus infection in a long-stay ward of a geriatric hospital, *J.Clin.Pathol.*, 33, 306-308.
14. De Champs C., Laveran H., *et al*, (1991) Sequential rotavirus infections: characterization of serotypes and electropherotypes, *Res. Virol.*, 142, 39-45
15. Flores J., Taniguchi K., Green K., *et al*, (1988) Relative frequency of rotavirus serotypes 1, 2, 3 and 4 in Venezuelan infants with gastro-enteritis, *J.Clin.Microbiol.* 26, 2092-2095.
16. Gentsch J.R., Glass R.I., Woods P., Gouvea V., Gorziglia M., Flores J., Das B.K. and Bhan M.K. (1992) Identification of group A rotavirus gene 4 types by polymerase chain reaction, *J. Clin. Microbiol.* 30, 1365-1373.
17. Giordano M.O., Basnec S. N., Nates S.,V., Bennun F. and Depetris A.R. (1991) Rapid techniques for diagnostic and epidemiological studies of rotavirus infection, *J. of Vir. Methods* 35, 59-63.
18. Gouvea V., Glass R.I., Woods P., Taniguchi K., Clark H.F., Forrester B. and Zhao-Yin Fang (1990) Polymerase chain reaction amplification and typing of rotavirus nucleic acid from stools specimens, *J. Clin. Microbiol.*, 28, 276-282.
19. Gouvea V., Ho M-S., Glass R., Woods P. *et al* (1990) Serotypes and electropherotypes of human rotavirus in the USA: 1987-1989, *J.Infect. Dis.*, 162, 362-367.
20. Green K. Y., Sears J.F., Taniguchi K., Midthun K., Hoshino Y., Gorziglia M., Nishikawa K., Urasawa S., Kapikian A.Z., Chanock R.M. and Flores J. (1988) Prediction of human rotavirus serotype by nucleotide sequence analysis of the VP7 protein gene, *J. Virol.*, 62, 1819-1823.
21. Green K.Y., James H.D. and Kapikian A.Z. (1990) Evaluation of three panels of monoclonal antibodies for the identification of human rotavirus VP7 serotype by ELISA, *Bull. W.H.O.*, 68, 601-610.
22. Haffeejee I.E. (1991) Neonatal rotavirus infections, *Reviews of infectious diseases*, 13, 957-962

23. Halvosrud J., and Ostravik I., (1980) An epidemic of rotavirus-associated gastro-enteritis in a nursing home for the elderly, *Scand. J. Infect. Dis.*, 12, 161-164.
24. Heath R., Birch C. and Gust I. (1986) Antigenic analysis of rotavirus isolates using monoclonal antibodies specific for human serotypes 1, 2, 3, and 4, and SA-11, *J. Gen. Virol.* 67, 2455-2466.
25. Hoogenboom-Verdegaal A.M.M., During M., Engels G.B., Hoekstra J.A., Leentvaar-Kuypers A., Peerbooms P.G.H., Kooij W.C.M., Vlerken van R. en Sobczak H. (1990) Rapport nr 148612 002 Epidemiologisch microbiologisch onderzoek m.b.t. gastro-enteritis bij de mens in de regio's Amsterdam en Helmond, in 1987 en 1988.
26. Hoshino Y., Wyatt R.G., Greenberg H.B., Flores J., and Kapikian A.Z. (1984) Serotypic similarity and diversity of rotaviruses of mammalian and avian origin as studied by plaque-reduction neutralization, *J. Infect. Dis.*, 149, 694-702.
27. Hung T., Wang C., Fang Z., Chou Z., Chen G. *et al.* (1984) Waterborne outbreak of rotavirus diarrhea in adults in China caused by a novel rotavirus, *Lancet*, 1, 1139-1142.
28. Hung T., Chen G., Wang C. *et al.* (1987) Seroepidemiology and molecular biology of the Chinese rotavirus, *Chiba Found. Symp.* 128, 49-62.
29. Jesudoss E.S, John T.J, Mathan M., and Spence L. (1978) Prevalence of rotavirus antibody in infants and children, *Indian. J. Med. Res.*, 68, 383-386.
30. Lloyd-Evans N., Springthorpe V.S. and Sattar S.A. (1986) Chemical disinfection of human rotavirus-contaminated inanimate surfaces, *J. Hyg. Camb.* 97 163-173.
31. Marcelis J.H., Vinjé J., Smeets V.J.P. en Dijk van W.C. (1992) Een rotavirus epidemie in een tehuis voor demente bejaarden. *Ned. Tijdschrift voor Geneesk.* , aangeboden voor publicatie.
32. Matsumoto K., Hatano M., Kobayashi K *et al* (1989) An outbreak of gastro-enteritis associated with acute rotaviral infection in schoolchildren, *J. Infect. diseases* , 160, 611-6151
33. Maunula L., Svensson L. and Bonsdorff C.H. (1992) A family outbreak of gastroenteritis caused by group C rotavirus, *Arch. Virol.* 124 269-278.
34. Nakagomi T., Abatani K., Ikegami N., Katsushima N., and Nakagomi N. (1988) Occurrence of changes in human rotavirus serotypes with concurrent changes in genomic RNA electropherotypes, *J. Clin. Microbiol.*, 26, 2586-2592.
35. Nakata S., Estes M.K., Graham D.Y., Wang S. and Gary G.W. (1987) Detection of antibody to group B adult diarrhea rotaviruses in humans, *J. of Clin. Microbiol.*, 25, 812-818.
36. Noel J.S., Beards G.M. and Cubitt W.D (1991) Epidemiological survey of HRV serotypes and electropherotypes in young children admitted to two children's hospitals in northeast London from 1984 - 1990. *J. Clin. Microbiol.* 29, 2213-2219.
37. Offit P.A., Blavat G., Greenberg H.B. and Clark H.F. (1986) Molecular basis of rotavirus virulence: role of gene segment 4, *J. Virol.* 57, 46-49.
38. Pyndiah N., Bégun R., Richard J., Charles M., Rey A., and Bonifas A. (1988) Accuracy of rotavirus diagnosis: modified genome electrophoresis versus electron microscopy, *J. Vir. Methods* 20, 39-44
39. Rennels, M.B., Losonsky G.A., Young A.E., Shindlecker C.L., Kapikian A.Z., and Levine M.M. (1990) An efficacy trial of the rhesus rotavirus vaccine in Maryland, *Am. J. Dis. Child.*, 144, 601-604.
40. Sack, D.A. (1982) Treatment of acute diarrhoea with oral rehydration solution. *Drugs*, 23, 280-283.
41. Sanders R.C., Campbell A.D. and Jenkins M.F. (1986) Routine detection of human rotavirus by latex-agglutination comparison with ELISA, EM and PAGE, *J. Virol. Meth.*, 13, 285-290.
42. Shaw R.D., Stoner-Ma D.L., Estes M.K. and Greenberg H.B. (1985) Specific Enzyme-Linked Immunoassay for Rotavirus Serotypes 1 and 3, *J. Clin. Microbiol.*, 22, 286-291.
43. Taniguchi K., Urasawa S. and Urasawa T. (1985) Preparation and characterization of neutralizing monoclonal antibodies with different reactivity patterns to human rotaviruses, *J. Gen. Virol.*, 66, 1045-1053.
44. Taniguchi K., Urasawa T., Morita Y., Greenberg H.B. and Urasawa S (1987) Direct Serotyping of Human Rotavirus in Stools by an Enzyme-linked Immunosorbent Assay Using Serotype 1-, 2-, 3-, en 4-Specific Monoclonal Antibodies to VP7, *J. Infect. Dis.*, 155, 1159-1166.

45. Urasawa T., Urasawa S., Ciba Y., Taniguchi K. *et al* (1989) Survey of human rotavirus serotypes in different locales in Japan by ELISA with monoclonal antibodies, *J. Infect. Dis.*, 160, 44-51.
46. Ushijima H., Shinozaki T., Fang Z-Y. and Glass R.I. (1992) Group B rotavirus antibody in japanese children, *J. Diarrhoeal Dis.* 10, 41.
47. Von Bonsdorf C.H., Svennson L (1988) Human serogroup C rotavirus in Finland, *Scand. J. Infect. Dis.* 20, 475-478.
48. Wilde J., Eiden J. and Yolken R. (1990) Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions, *J. of Clin. Microbiol.*, 28, 1300-1307.
49. Wilson M. B., Nakane P. K. (1978) Developments in the periodate method of conjugating horse radish peroxidase to antibodies. In: W. Knapp (Ed) *Immunofluorescence and related staining techniques*. Elsevier, Amsterdam. 215-225.

DANKBETUIGING

De auteurs willen Hans Wilke (Streeklaboratorium Enschede), Marina Burger (Laboratorium voor Pathologie, RIVM), Forien Geluk (HLO-stagiaire) en Jan-Willem de Jager (HLO-stagiair) bedanken voor hun bijdrage aan de uitvoering van de experimenten beschreven in dit rapport.