

The logo for RIVM (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu) is displayed in white lowercase letters on a yellow rectangular background. The letters are in a sans-serif font, with the 'i' and 'v' having a distinctive shape.

Rapport 330204003/2009

J.A.C. Schalk et al.

Detectie van infectieuze enterovirussen
met celkweek-PCR voor de in Nederland
wettelijk vereiste infectierisicoschatting
voor drinkwater

RIVM-rapport 330204003/2009

Detectie van infectieuze enterovirussen met celkweek-PCR voor de in Nederland wettelijk vereiste infectierisicoschatting voor drinkwater

J. A. C. Schalk
S. A. Rutjes
A. E. Docters van Leeuwen
A. M. de Roda Husman

Contact:
Marjolijn Schalk
Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie
marjolijn.schalk@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Waternet, in het kader van het Project Waterkwaliteit V/330204/01/WK

Dankwoord

Wij willen graag Harrie van de Avoort, Sabine van der Sanden, Edin Jusic en Erwin Duizer van het Laboratorium voor Infectieziekten en Screening (LIS) van het RIVM bedanken voor het ter beschikking stellen van enterovirus en parechovirus stocks en voor waardevolle suggesties. Tevens willen we graag Kim Benschop en Katja Wolthers van het AMC in Amsterdam bedanken voor hun bijdrage aan het ontwikkelen van een kwantitatieve enterovirus RT-PCR.

© RIVM 2008

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

Detectie van infectieuze enterovirussen met celweek-PCR voor de in Nederland wettelijk vereiste infectierisicoschatting voor drinkwater

Het RIVM heeft een snelle methode ontwikkeld waarmee lage concentraties levende enterovirussen in een relatief grote hoeveelheid water kunnen worden aangetoond. De verwachting is bovendien dat met deze nieuwe celweek-*polymerase chain reaction*-methode (*cel culture* PCR) veel verschillende typen enterovirus kunnen worden aangetoond. Hierdoor ontstaat een betrouwbaarder beeld van de in het water aanwezige enterovirussen. Dit rapport beschrijft hoe de nieuwe methode is ontwikkeld. Ze moet nog worden gevalideerd.

Enterovirussen komen via ontlasting in oppervlaktewater en kunnen onder andere bloedvergiftiging en hersenvliesontsteking veroorzaken. Enterovirusbepalingen worden gedaan op oppervlaktewater voor drinkwaterproductie. De bepalingen zijn in Nederland wettelijk vereist om het risico te kunnen schatten dat mensen met het virus geïnfecteerd raken nadat zij ongekookt drinkwater hebben geconsumeerd.

De cc-PCR combineert specifieke vormen van celweek met de PCR. Eerst wordt een watermonster aangebracht op een laag cellen. Hierna kunnen de eventueel aanwezige virussen de cellen infecteren en kan het virus zich in de cellen vermeerderen. Vervolgens worden deze vermeerderde virussen aangetoond met PCR.

De methode is uitgevoerd met verschillende soorten cellen om te achterhalen welke het beste in staat zijn om een breed scala aan enterovirussen aan te tonen. De menselijke darmkankercel HT-29 bleek het meest geschikt.

Trefwoorden:
enterovirus, celweek-PCR, infectierisicoschatting

Abstract

Detection of infectious enteroviruses by cell culture-PCR for the required infection risk assessment for drinking water in the Netherlands

The National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) has developed a fast method for detecting low concentrations of live enteroviruses in relatively large amounts of water. It is expected that many different types of enterovirus will be detected when this new cell culture-PCR (polymerase chain reaction) is used. This will enable accurate estimates of the enteroviruses present in water to be made. The current report describes how the method, which still needs to be validated, has been developed.

Enteroviruses find their way into surface water via faecal contamination and can cause septicaemia and meningitis. Testing for enteroviruses takes place on surface water collected for the production of drinking water. The measurements are required by law in order to estimate the risk of people becoming infected with a virus after consumption of unboiled drinking water.

The cell culture-PCR method combines specific forms of cell culture with PCR. First a water sample is applied to a layer of cells. Subsequently, any viruses present can infect the cells which leads to the viruses multiplying in the cells. These multiplied viruses can then be detected by PCR.

The method has been performed with different kinds of cells in order to detect which cells are more susceptible to harbouring a broad range of enteroviruses. The human cell for colon carcinoma HT-29 proved to be the best cell for this purpose.

Key words:

enterovirus, cell culture PCR, infection risk assessment

Inhoud

Samenvatting	6
1 Inleiding	7
1.1 Enterovirussen	7
1.2 Infectierisicoschatting voor enterovirussen in drinkwater	7
2 Kwantificering van enterovirussen in inname­water	9
2.1 Kwantificering met behulp van kweekmethoden	9
2.2 Kwantificering met behulp van moleculaire methoden	10
2.3 Celkweek-PCR voor kwantificering van enterovirus	11
2.4 Detectielimiet van kwantificeringsmethoden	12
2.5 Ontwikkeling van een cc-PCR-methode voor enterovirussen	13
3 Resultaten	15
3.1 Opzetten Enterovirus Real-Time RT-PCR-methode	15
3.2 RNA-extractiemethode	15
3.3 Optimalisatie kweekstap	16
3.4 Selectie van geschikte cellijn voor detectie van enterovirus	21
3.5 Vergelijking cc-PCR met BGM- of HT-29-cellen	23
4 Discussie	24
4.1 cc-PCR-methode voor enterovirussen	24
4.2 Detectielimiet	25
4.3 Vergelijking plaque-test, cc-PCR en RT-PCR	25
Literatuur	27
Bijlage 1	31
Bijlage 2	32
Bijlage 3	34

Samenvatting

Dit rapport beschrijft de ontwikkeling van een celkweek-PCR (cc-PCR)-methode voor de detectie van infectieuze enterovirussen in innamewater voor drinkwaterproductie ten behoeve van de infectierisicoschatting voor drinkwaterconsumptie, zoals is voorgeschreven in de VROM-Inspectierichtlijn Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater (Anoniem, 2006). Met de cc-PCR-methode wordt infectieus virus vermeerderd na incubatie op cellen die gevoelig zijn voor infectie met dit virus. Het gerepliceerde virus wordt vervolgens gedetecteerd door middel van RT-PCR. Met de cc-PCR-methode worden de voordelen van celkweek en PCR gecombineerd; het is een snelle methode waarmee een relatief groot volume aan innamewater kan worden onderzocht en waarmee infectieus virus wordt aangetoond. Met klassieke celkweekmethoden kunnen weliswaar ook grote volumes aan innamewater onderzocht worden, maar deze methoden zijn erg tijdrovend en daardoor erg kostbaar. PCR is een snelle methode, maar heeft als beperking dat geen onderscheid kan worden gemaakt tussen infectieuze en niet-infectieuze enterovirussen. Bovendien kan met PCR slechts een klein volume van het innamewater onderzocht worden, waardoor een relatief hoge detectielimiet wordt verkregen.

De cc-PCR-methode voor enterovirussen die bij het RIVM is ontwikkeld bestaat uit een incubatie van cellen in een well van een 12-wells-plaat met 100µl van het monster voor een periode van 2 uur, waarna het inoculum wordt aangevuld tot 2 ml met infectiemedium. Na een kweekstap van 7 dagen bij 37°C wordt gerepliceerd virus vrijgemaakt uit de cellen door middel van Tritonlysis en gedetecteerd via real-time RT-PCR. Kritische stappen die de gevoeligheid van de methode bepalen zijn het volume van het inoculum, het niet-verwijderen van het inoculum na een infectieperiode van 2 uur en een kweekstap die voldoende lang is om het aanwezige infectieuze virus te kunnen laten repliceren. Voor de ontwikkeling van een cc-PCR-methode zijn zes cellijnen onderzocht op hun gevoeligheid voor infectie door een breed scala aan enterovirustypen. De HT-29-cel lijn bleek het meest geschikt om vrijwel alle onderzochte enterovirustypen te detecteren, in tegenstelling tot de huidige gebruikte BGM-cellen, waarmee met name poliovirus, groep B Coxsackievirussen en een aantal echovirussen konden worden gedetecteerd. De verwachting is dat door het gebruik van de HT-29-cel lijn in een cc-PCR-methode meer enterovirustypen gedetecteerd zullen worden dan met de huidige plaque-test met BGM-cellen, waardoor een beter beeld verkregen kan worden van de in het water aanwezige enterovirussen. De schatting van het infectierisico zal door het gebruik van realistischere data betrouwbaarder worden.

1 Inleiding

1.1 Enterovirussen

Enterovirussen komen via de ontlasting in het rioolwater terecht en vervolgens via lozing van gezuiverd of ongezuiverd rioolwater in het oppervlaktewater. Traditionele zuiveringsprocessen voor rioolwater leiden tot ongeveer 2^{10} log reductie van de virusconcentratie, waardoor gezuiverd rioolwater dus nog hoge concentraties aan enterovirussen kan bevatten (Lodder en De Roda Husman, 2005). Inmiddels zijn 88 typen humane enterovirussen bekend. Deze kunnen bij de mens asymptomatisch verlopen of milde tot zeer ernstige ziektebeelden veroorzaken, variërend van diarree en koorts, tot hersenvliesontsteking en verlamming (Melnick en Wenner, 1969). Het meest bekende enterovirus is het poliovirus dat kinderverlamming kan veroorzaken en zelfs dodelijk kan zijn. Bij de laatste polio-uitbraak in Nederland in 1992/1993 werden 71 mensen ziek, waarvan 2 personen overleden. Bij 59 personen zijn verlamningsverschijnselen opgetreden (Oostvogel et al., 1994).

Enterovirussen zijn van oudsher geklassificeerd op basis van serotypering. Van poliovirus zijn 3 serotypen bekend. Verder zijn enterovirussen onder te verdelen in groep A Coxsackievirussen, waarvan 23 serotypen bekend zijn, groep B Coxsackievirussen met 6 serotypen en echovirussen met 28 serotypen. Sinds 1974 worden nieuwe serotypen niet meer onder deze klassificatie onderverdeeld, maar doorgenummerd als enterovirus 68, 69, 70 – 101 (Oberste et al., 2007). Uit het toenemende gebruik van moleculaire typeringsmethoden, is gebleken dat moleculaire typering voor enterovirussen niet volledig overeenkomt met serotypering. Moleculaire typering berust vooral op sequencing van het VP1-gen. Dit gen vertoont de grootste variatie tussen de verschillende typen. Op basis van deze moleculaire typering is een nieuwe indeling gemaakt voor enterovirussen die is weergegeven in Bijlage 1 (Stanway et al., 2005).

1.2 Infectierisicoschatting voor enterovirussen in drinkwater

In het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001 wordt gesteld dat drinkwater microbiologisch betrouwbaar dient te zijn en geen micro-organismen en parasieten mag bevatten in aantallen die nadelige gevolgen voor de volksgezondheid kunnen hebben (Anoniem, 2001). Hiertoe dient onder andere voor virussen een kwantitatieve risicoanalyse te worden uitgevoerd. In de Inspectierichtlijn Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater wordt concrete invulling gegeven aan de wijze waarop de risicoanalyse moet worden uitgevoerd (Anoniem, 2006). Uitgangspunt hierbij is dat bij consumptie van ongekookt drinkwater het infectierisico lager is dan 1 infectie per 10.000 personen per jaar. Hierbij wordt de aanwezigheid van enterovirussen in water gezien als indicatie voor de aanwezigheid van enterale virussen. Omdat de concentraties van deze enterovirussen in het drinkwater te laag zijn om te detecteren, dient de veiligheid van het drinkwater aantoonbaar te worden gemaakt met een kwantitatieve risicoanalyse aan de hand van gegevens over de kwaliteit van de bron en de effectiviteit van de zuivering. Om de hoeveelheid enterovirussen in de bron, het laatste open water, te bepalen, moet een volume van enkele honderden liters water worden onderzocht op de aanwezigheid van enterovirussen. Hiertoe moeten de enterovirussen in het water eerst geconcentreerd worden door middel van filtratiemethoden. De hoeveelheid enterovirus in het verkregen concentraat kan vervolgens bepaald worden, waaruit de hoeveelheid virus in het inname water berekend kan worden. Hierbij wordt

in de berekening ook de efficiëntie van de concentratiemethode meegenomen. In dit rapport worden de beschikbare methoden voor het kwantificeren van enterovirussen beschreven, evenals de ontwikkeling van een cc-PCR-methode, die belangrijke voordelen heeft ten opzichte van bestaande methoden.

2 Kwantificering van enterovirussen in innamewater

2.1 Kwantificering met behulp van kweekmethoden

Met kweekmethoden worden infectieuze virussen aangetoond, dat wil zeggen virussen die in staat zijn om cellen te infecteren. Bepalen van de hoeveelheid infectieus enterovirus in innamewater is nodig voor het kunnen maken van een infectierisicoschatting. Met het kennen van het infectierisico is niet bekend wat het ziekterisico is, want niet iedereen die een infectie oploopt zal ook daadwerkelijk ziek worden. Voor het aantonen van infectieuze enterovirussen in water concentraten zijn twee typen kweekmethoden gangbaar: de monolayer plaque-test en de cytopathisch effect (CPE)-methode. Bij de monolayer plaque-test wordt het monster gebracht op een monolayer van cellen. Na een korte infectiestap van ongeveer 2 uur wordt een agar-overlay op de cellen aangebracht. Als infectieus virus aanwezig is leidt dit tot infectie van cellen waarna het virus replicateert. De cel barst vervolgens open en het gerepliceerde virus komt vrij. Door de agar-overlay blijft het vrijgekomen virus op zijn plaats en infecteert alleen naburige cellen. Na verloop van tijd ontstaan door de dood van de cellen gaten in de cellaag, de zogenaamde plaques. Het aantal verkregen plaques is een maat voor de hoeveelheid infectieus enterovirus (Hsiung en Melnick, 1958; Cooper, 1961^a). Alternatieve methoden voor de plaque-test zijn de suspended assay (Cooper, 1961^b), waarbij een virussuspensie wordt gemengd met een celsuspensie alvorens een agar-overlay wordt aangebracht, de VIRADEN assay, waarbij virussen geadsorbeerd op een filter worden gedetecteerd met behulp van cellen die op het filter groeien (Papageorgiou et al., 2000) en de double-layer plaque-test (Mocé-Llivina et al., 2004), waarbij een monolayer plaque-test wordt gecombineerd met een suspensie plaque-test.

Bij de CPE-methode wordt ook een monolayer van cellen geïnfecteerd met enterovirus, maar hierbij wordt geen agar-overlay aangebracht. Virus dat vrijkomt in het medium kan nieuwe cellen infecteren door de hele plaat of fles heen. De plaat of fles wordt gescoord op het wel of niet voorkomen van CPE. Per test worden meerdere verdunningen van het monster met meerdere platen per verdunning ingezet. Aan de hand van de hoeveelheid positieve platen en de hoeveelheid monster gebruikt voor infectie wordt semi-kwantitatief de hoeveelheid virus geschat als most probable number (MPN) (Block en Schwartzbrod, 1982; Westrell et al., 2006).

Bij celkweekmethoden is de specificiteit van de methode afhankelijk van het type cellen dat gebruikt wordt. In de kliniek werden enterovirussen aangetoond via kweek op primaire apenier epitheelcellen (PMK) waarmee vrijwel alle enterovirustypen aangetoond kunnen worden. Wegens de onwenselijkheid om primaire dierlijke cellen te gebruiken, worden enterovirussen tegenwoordig vooral gekweekt op continue cellijnen. Er is echter geen enkele cellijn waarmee alle enterovirustypen kunnen worden aangetoond (Schmidt et al., 1978). Voor het onderzoek aan watermonsters met behulp van de plaque-test bleek met name de Buffalo Green Monkey (BGM)-cellijn zeer geschikt te zijn (Dahling et al., 1974; Dahling en Wright, 1986). Echter, BGM-cellen zijn vooral gevoelig voor poliovirus en groep B Coxsackievirussen, waardoor een deel van de enterovirussen bij het gebruik van BGM-cellen niet gedetecteerd wordt (Schmidt et al., 1978; Menegus en Hollick, 1982; Dagan en Menegus, 1986; She et al., 2006; Kok et al., 1998). BGM-cellen zijn niet zo gevoelig voor infectie met echovirussen (Dagan en Menegus, 1986) en groep A Coxsackievirussen (Schmidt et al., 1978).

Met name groep A Coxsackievirussen zijn moeilijk aan te tonen in celkweek. Schmidt et al. (1975) beschrijven dat in de spiertumor RD-cellijn de laboratoriumstammen van de typen Coxsackie A2, A3,

A4, A5, A6, A7, A8, A9, A10, A12, A14, A16, A17 en A21 wel groeien. Coxsackievirussen van het type A1, A11, A13, A15, A18, A19, A20, A22 en A24 groeien niet in RD-cellen (Schmidt et al., 1975; Lipson et al., 1988). Voor HeLa-cellen is beschreven dat Coxsackie A21 en A13 hierin groeien (Melnick en Wenner, 1969; O'Brien en Newman, 1977). Coxsackie B3, B5 en B6 groeien ook op RD-cellen, de overige groep B Coxsackievirussen niet (Schmidt et al., 1975). Tevens zijn RD-cellen redelijk geschikt voor het aantonen van echovirussen (Dagan en Menegus, 1986). MRC-5-cellen blijken met name geschikt voor het aantonen van de meeste echovirussen (Chonmaitree et al., 1988; She et al., 2006) met uitzondering van echovirus 9 (She et al., 2006). Om zoveel mogelijk verschillende typen enterovirussen aan te kunnen tonen is het dus noodzakelijk om een combinatie van verschillende cellijnen te gebruiken (Schmidt et al., 1978; She et al., 2006; Chonmaitree et al., 1988). Het gebruik van een mix van cellen in een monolayer is beschreven voor detectie van een breed scala aan enterovirussen (Huang et al., 2002; Buck et al., 2002).

Kweekmethoden zijn gevoelige methoden waarmee grote volumes van het inname water kunnen worden onderzocht op de aanwezigheid van infectieus enterovirus. Een nadeel van kweekmethoden is dat deze erg tijdrovend zijn en een lange doorlooptijd hebben.

2.2 Kwantificering met behulp van moleculaire methoden

De meest gebruikte moleculaire methode voor detectie van enterovirussen is gebaseerd op PCR (Polymerase Chain Reaction), waarbij het virale genoom wordt aangetoond door een deel van het genoom zo vaak te vermenigvuldigen dat een zichtbare hoeveelheid DNA wordt verkregen. Het virale genoom vormt de basis voor de PCR. Omdat enterovirus een RNA-genoom bezit, 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. Het principe van RT-PCR staat uitgebreid beschreven in het rapport 'Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001' (Rutjes en De Roda Husman, 2004).

Het geamplificeerde DNA kan op verschillende manieren zichtbaar gemaakt worden. Bij de conventionele (RT-) PCR worden de verkregen PCR-producten aan het eind van de reactie geanalyseerd door middel van agarose gel-electroforese (eindpunt detectie). Hierbij worden PCR fragmenten gescheiden op grootte. De producten kunnen vervolgens zichtbaar worden gemaakt door kleuring met bijvoorbeeld SYBR-gold. Door deze kleuring worden alle DNA-moleculen 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 PCR gevoelig is voor contaminatie.

Naast de eindpunt-detectiemethoden kunnen PCR-fragmenten ook 'real-time' gedetecteerd worden. Het principe van real-time PCR is dat in de PCR-mix, naast alle benodigde reagentia voor de PCR, ook een specifieke probe (TaqMan probe) aanwezig is die gelabeld is met een fluorochroom en een quencher. Door aanwezigheid van de quencher in nabijheid van het fluorochroom wordt de fluorescentie uitgedoofd. Tijdens het doorlopen van de PCR-cycli wordt PCR-product gevormd

waaraan de TaqMan probe zich kan hechten. Als gevolg daarvan wordt de probe afgebroken door het Taq-polymerase tijdens de vorming van het PCR-product. Hierdoor wordt de quencher gescheiden van het fluorochroom wat vervolgens kan fluoresceren. De mate van fluorescentie is een maat voor de hoeveelheid PCR-product en is te volgen tijdens de PCR-reactie. De PCR-cyclus waarop de hoeveelheid fluorescentie het threshold niveau bereikt waardoor het boven het achtergrondsignaal uitkomt wordt de threshold cycle (Ct) genoemd. Indien veel uitgangproduct in de PCR aanwezig is, zal dit niveau eerder bereikt worden dan wanneer slechts enkele moleculen aanwezig zijn. Er is een omgekeerd verband tussen de logaritme van de concentratie van het uitgangproduct en de Ct-waarde: hoe lager de Ct-waarde hoe hoger de concentratie van het te amplificeren target in het uitgangsmateriaal was en een hoge Ct-waarde duidt op weinig target in het uitgangsmateriaal. Het voordeel van real-time PCR is dat het een snelle methode is en beduidend minder arbeidsintensief dan de conventionele PCR-technieken.

Voor detectie van enterovirus via een RT-PCR-methode wordt uit het concentraat eerst RNA geïsoleerd waarna enterovirus RNA kan worden aangetoond met behulp van een enterovirus specifieke RT-PCR. Een positief PCR-sigitaal duidt op de aanwezigheid van enterovirus. Door ook verdunningen van dit monster op aanwezigheid van viraal RNA te onderzoeken kan de virusconcentratie semi-kwantitatief worden bepaald als MPN. De virusconcentratie wordt dan uitgedrukt als het aantal PCR-detecteerbare units (PDU) (Rutjes en De Roda Husman, 2004). RT-PCR is een erg gevoelige methode waarmee slechts enkele kopieën van het enterovirus RNA per RT-PCR reactie kunnen worden aangetoond. De primers zijn zo ontwikkeld dat alle enterovirustypen gedetecteerd kunnen worden met slechts één primer set.

Een andere moleculaire methode voor detectie van enterovirus RNA is Nucleic Acid Sequence-Based Amplification (NASBA). Het principe van NASBA berust op amplificatie van RNA via een isothermische reactie. Een enterovirus specifieke NASBA-kit is commercieel verkrijgbaar en is geschikt voor enterovirusbepalingen in watermonsters (Rutjes et al., 2005). Ook voor NASBA geldt dat alle typen enterovirussen gedetecteerd kunnen worden. Echter, zowel met NASBA als met RT-PCR wordt alleen informatie verkregen over de hoeveelheid virus. Er wordt geen onderscheid gemaakt tussen infectieus en niet-infectieus virus en deze methoden geven dus geen informatie over het risico voor de volksgezondheid (Sobsey et al., 1998; Shieh et al., 2008). Een ander belangrijk nadeel van moleculaire methoden is dat slechts een klein volume van het concentraat kan worden getest op de aanwezigheid van enterovirussen (Rutjes et al., 2005).

2.3 Celweek-PCR voor kwantificering van enterovirus

Een alternatieve methode voor de detectie van infectieuze enterovirussen is de zogenaamde celweek-PCR (cc-PCR). Deze methode werd voor enterovirussen voor het eerst beschreven door Reynolds et al. (1996) en combineert de voordelen van celweek en PCR; cellen in kweekflessen of platen worden geïnfecteerd met het concentraat en na een korte infectiestap van 1 tot 7 dagen wordt het enterovirus RNA vrijgemaakt uit de cellen met behulp van lysis of RNA-extractie en gedetecteerd via PCR (Reynolds et al., 1996, 2001; Chapron et al., 2000, Greening et al., 2002). Detectie van het gerepliceerde virus via PCR kan al gebeuren voordat het CPE zichtbaar is, waardoor de doorlooptijd van de methode aanzienlijk korter is dan van de klassieke kweekmethoden. Het voordeel van cc-PCR ten opzichte van PCR is dat alleen infectieus virus wordt gedetecteerd. Bovendien kan met behulp van celweek-PCR een relatief groot volume aan concentraat getest worden in vergelijking met moleculaire methoden, wat de gevoeligheid van de methode ten goede komt.

2.4 Detectielimiet van kwantificeringsmethoden

Bij de door het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) gehanteerde methode voor enterovirusbepaling in oppervlaktewater wordt uit een groot volume van het laatste open water (circa 600 liter) virus geïsoleerd met behulp van negatieve membraanfiltratie (Rutjes en De Roda Husman, 2004) gevolgd door ultrafiltratie. Het ruwe water wordt geconcentreerd tot grofweg 30 mL en er wordt dus een volumereductie van ongeveer een factor 20.000 bewerkstelligd.

Bij het RIVM wordt de hoeveelheid enterovirussen in het concentraat bepaald met behulp van de plaque-test waarbij gebruik wordt gemaakt van BGM-cellen in 75cm² kweekflessen (Rutjes en De Roda Husman, 2004). De plaque-test is een gevoelige methode waarmee in principe één infectieus deeltje per kweekfles kan worden aangetoond. De detectielimiet van de plaque-test wordt vooral bepaald door de hoeveelheid concentraat die wordt onderzocht. Per 75cm² kweekfles met BGM-cellen wordt 1,1 ml van het concentraat geënt en dus grofweg 22 liter van het ruwe water. Door al het verkregen concentraat te enten op 75cm² celkweekflessen kan in principe 600 liter ruw water onderzocht worden. Omdat 1 infectieus enterovirusdeeltje per kweekfles aantoonbaar is bedraagt de theoretische detectielimiet van de methode 1/600 liter = 0,0017 infectieuze enterovirussen per liter. Het blijkt dat de concentratie enterovirussen in relatieve schone innamewaters vaak beneden de detectielimiet van de plaque-test ligt (Rutjes et al., 2005; 2009). Omdat de plaque-test een tijdrovende, kostbare methode is zou het voor drinkwaterbedrijven wenselijk zijn om innamewater te kunnen onderzoeken op enterovirussen met een meer kosteneffectieve methode.

Een minder arbeidsintensief en dus goedkoper alternatief voor de plaque-test is RT-PCR. Bij het RIVM is een gevoelige RT-PCR-methode beschikbaar voor detectie van enterovirus (Rutjes en De Roda Husman, 2004). Deze PCR is gebaseerd op amplificatie van een deel van de 5'UTR-sequentie van het enterovirus RNA. De 5'UTR vertoont veel homologie tussen de verschillende enterovirustypen en de PCR is zo ontworpen dat alle enterovirustypen er mee worden aangetoond. De detectielimiet van PCR wordt vooral bepaald door de hoeveelheid volume die per PCR-reactie onderzocht kan worden en deze is erg klein. Dit komt onder andere doordat de hoeveelheid concentraat die gebruikt wordt voor de RNA-extractie niet te groot mag zijn: een toename in het onderzochte volume bleek te resulteren in een afname van het aantal positieve monsters (Rutjes et al., 2005). Dit komt doordat storende factoren uit het concentraat de PCR remmen. Voor optimale detectie van enterovirussen in oppervlaktewater kan slechts 12,5 µl van het concentraat gebruikt worden voor RNA-extractie. Na extractie van 12,5 µl concentraat wordt 50 µl RNA verkregen waarvan 5 µl gebruikt wordt voor detectie met RT-PCR. Dit komt overeen met 1,25 µl van het concentraat en ongeveer 25 ml van het ruwe water. Om 600 liter water te kunnen onderzoeken op de aanwezigheid van enterovirus zouden dus 24.000 RT-PCR's uitgevoerd moeten worden om eenzelfde volume te onderzoeken als met celkweek, waardoor RT-PCR in vergelijking met de plaque-test een erg kostbare methode is voor toepassing op watermonsters. Omdat de theoretische detectielimiet wordt bepaald door het onderzochte volume per test en het aantal replica's dat wordt uitgevoerd, is de detectielimiet voor RT-PCR veel hoger dan voor de plaque-test. In Tabel 1 wordt de theoretische detectielimiet van de plaque-test met die van de RT-PCR vergeleken.

Tabel 1 Theoretische detectielimiet voor de plaque-test en RT-PCR-methode

	Plaque	RT-PCR
Onderzocht volume concentraat per test	1,1 ml	1,25 µl
Onderzocht volume water per test	22 l	25 ml
Detectielimiet per test	1 pfu ¹	1 pdu ²
Detectielimiet per liter ruw water	≤ 0,045 pfu/ l	≤ 40 pdu/ l
Detectielimiet bij 10 replica's	≤ 0,0045 pfu/ l	≤ 4 pdu/ l

¹ plaque forming unit, ² PCR detectable unit

2.5 Ontwikkeling van een cc-PCR-methode voor enterovirussen

CC-PCR-methoden combineren de voordelen van celkweek en PCR. Met cc-PCR kunnen grotere volumes van het concentraat onderzocht worden dan met RT-PCR, waardoor een lagere theoretische detectielimiet kan worden verkregen dan met RT-PCR. Het aantonen van gerepliceerd virus is al mogelijk voordat CPE zichtbaar wordt, waardoor cc-PCR sneller kan zijn dan de standaard kweekmethoden. Bovendien kunnen ook infectieuze enterovirussen worden aangetoond die geen CPE geven. De cc-PCR is eenvoudiger uit te voeren dan de plaque-test en kost minder hands-on-time. Omdat het onderzocht volume waterconcentraat met de cc-PCR-methode kleiner is dan met de plaque-test zal de cc-PCR-methode niet gevoeliger zijn dan de plaque-test. De verwachting is dat met behulp van deze cc-PCR-methode, in tegenstelling tot de RT-PCR methode, wel een voldoende groot volume aan ruw water onderzocht kan worden om een uitspraak te kunnen doen over het al dan niet voldoen aan de eis voor het infectierisico (Rutjes en De Roda Husman, 2007). De cc-PCR-methode is bovendien voordeliger dan de huidige plaque-test. Een cc-PCR-methode is bij RIVM al opgezet voor rotavirus en adenovirus (Rutjes en De Roda Husman, 2007). Met behulp van deze methoden kan in één experiment circa 2,5 ml concentraat worden onderzocht wat overeenkomt met circa 50 l ruw water (Rutjes et al., 2009). Dit rapport beschrijft de ontwikkeling van een cc-PCR-methode voor enterovirussen. Hierbij is ook gekeken naar de selectie van een cellijn waarmee een bredere range aan enterovirussen gedetecteerd kan worden dan met de huidige plaque-test met behulp van BGM-cellen mogelijk is.

Een celkweek-PCR methode bestaat uit inoculatie van cellen in een monolayer met het te onderzoeken monster, waarbij eventueel aanwezige virussen de cellen infecteren en zich in de cellen vermeerderen. Vervolgens wordt het RNA van het gerepliceerde virus vrijgemaakt uit de cellen en wordt het virale RNA gedetecteerd met behulp van een enterovirus specifieke RT-PCR. Voor het ontwikkelen van een cc-PCR-methode voor enterovirussen zijn de volgende drie aspecten van de methode nader onderzocht en geoptimaliseerd:

1. replicatie van het virus met behulp van celkweek
2. isolatie van viraal RNA
3. detectie van viraal RNA met behulp van een enterovirus specifieke RT-PCR

De gevoeligheid van een cc-PCR-methode wordt onder andere bepaald door de efficiëntie van virusreplicatie in een geschikte cellijn. Voor het opzetten van de cc-PCR-methode zijn verschillende cellijnen onderzocht op gevoeligheid voor infectie door verschillende typen enterovirussen (zie paragraaf 3.4). Daarnaast zijn verschillende optimalisaties van de kweekstap onderzocht om een efficiënte replicatie van het virus te bewerkstelligen. Deze optimalisatie staat beschreven in

paragraaf 3.3. Voor de isolatie van het gerepliceerde virale RNA zijn zowel RNA-isolatie via een RNA extractie methode als het lyseren van de cellen via vries-dooi en Triton lysis (Wang et al., 2005) uitgetest en vergeleken (zie paragraaf 3.2). Vanwege de tijdsbesparing van een real-time PCR methode ten opzichte van een conventionele PCR is een enterovirusspecifieke real-time RT-PCR ontwikkeld om het RNA van het gerepliceerde virus te detecteren (zie paragraaf 3.1).

3 Resultaten

3.1 Opzetten Enterovirus Real-Time RT-PCR-methode

Ten behoeve van de enterovirus celkweek-PCR is een enterovirus specifieke real-time RT-PCR opgezet, gebaseerd op de TaqMan probe technologie. Hiertoe zijn verschillende PCR kits uitgetest en verschillende PCR primers en probe combinaties met elkaar vergeleken. Een real-time RT-PCR methode gebaseerd op de methode van Benschop et al. (2008) bleek qua gevoeligheid het meest geschikt. De methode bestaat uit een RT-stap met behulp van random primers waarmee al het aanwezige RNA wordt gekopieerd naar cDNA, gevolgd door een real-time PCR met enterovirus specifieke primers en detectie met een fluorescent gelabelde enterovirus specifieke probe. De gevoeligheid van deze real-time RT-PCR methode is vergelijkbaar met de gevoeligheid van de door het RIVM gebruikte conventionele RT-PCR methode. De real-time RT-PCR amplificeert, evenals de conventionele RT-PCR, een deel van de 5'UTR sequentie van het enterovirus RNA en detecteert alle enterovirustypen. De geoptimaliseerde methode staat beschreven in Bijlage 3.

3.2 RNA-extractiemethode

De enterovirus real-time RT-PCR wordt toegepast voor detectie van het gerepliceerde enterovirus na een korte celkweekstap. Om het RNA van het gerepliceerde virus te kunnen detecteren dient het eerst vrijgemaakt te worden uit de cellen. Hiertoe zijn drie verschillende extractiemethoden met elkaar vergeleken. Een RNA-extractie met behulp van een Qiagen extractiekit is vergeleken met het vries-dooien van de cellen, en met het lyseren van de cellen door toevoeging van Triton X-100, gevolgd door één vries-dooi stap (Wang et al., 2005). Voor de vergelijking van de verschillende methoden is uitgetest hoever het cellysaat na de vries-dooi stap of de Triton-lysis verdund moet worden in water opdat de PCR niet geremd wordt. Dit bleek voor vries-dooilysaat een factor 20 te zijn en voor Tritonmonsters een factor 40 (data niet getoond).

Om de verschillende RNA-extractiemethoden te kunnen vergelijken zijn BGM-cellen in een 12-wells-plaat gezaaid en geïnfecteerd met 1 en 3 plaque forming units (pfu) Coxsackievirus B4 (De Roda Husman et al., 2009) per well in infectiemedium (zie Bijlage 3), met 10 wells per concentratie. Twee uur na de infectie is het inoculum verwijderd en is 1 ml infectiemedium toegevoegd. Na 3 dagen kweken bij 37°C is vervolgens RNA geëxtraheerd uit de wells met behulp van een Qiagen extractiekit, of zijn de platen driemaal bij -70°C geplaatst en vervolgens weer ontdooid bij KT, óf is een 4,5% Triton X-100-oplossing toegevoegd gevolgd door één vries-dooi stap bij -70°C. Het RNA-extract of het lyaat is getest in een enterovirus real-time RT-PCR. Uit de resultaten bleek er weinig verschil te zijn tussen de drie extractiemethoden in gevoeligheid voor detectie van enterovirus. Voor alle drie de methoden werden bij infectie met 3 pfu Coxsackievirus B4 per well 1-3 van de 10 wells positief bevonden en bij infectie met 1 pfu 0-2 wells positief per 10 wells. Wel werden met de RNA-extractiemethode lagere Ct-waarden verkregen dan met de vries-dooimethode en de Tritonlysis. Dit is naar verwachting omdat, ervan uitgaande dat er geen RNA-verlies optreedt bij de methoden, bij de RNA-extractie het RNA een factor 160 tot 400 × geconcentreerder is dan bij respectievelijk de vries-dooistap en de Tritonlysis. Desondanks is een lage hoeveelheid virus met de vries-dooi en de

Tritonlysis goed te detecteren: de Ct-waarden voor de positieve wells liggen tussen de 20 en 30. Omdat Tritonlysis veruit het minst arbeidsintensief is, is gekozen om deze methode te gebruiken voor de cc-PCR-methode. Wel was voor alle drie de extractie methoden de hoeveelheid positieve wells erg laag, wat een indicatie is dat de kweek-stap niet optimaal verloopt. Deze stap is in vervolg onderzoek verder geoptimaliseerd.

3.3 Optimalisatie kweekstap

Voor het optimaliseren van de kweek stap in celkweek-PCR experimenten zijn een aantal variabelen onderzocht:

- inoculumvolume
- wel/niet verwijderen inoculum
- inoculatie tijd
- kweektijd

Voor de optimalisatie is gebruikgemaakt van BGM-cellen in combinatie met het Coxsackievirus B4. Voor ieder experiment zijn BGM-cellen gezaaid in een 12-wells-plaat en geïnfecteerd met 1, 3 of 10 pfu Coxsackievirus B4 virussen per well vanuit een voorverdunding van 25 pfu/ ml HBSP. Per concentratie zijn meerdere wells geïnfecteerd. Op basis van het aantal positieve en negatieve wells in de PCR is een MPN bepaald. In alle experimenten zijn T=0 controles en celcontroles meegenomen. Bij de T=0 controles zijn cellen wel geïnfecteerd met virus maar is virus RNA direct geïsoleerd, zodat geen virusreproductie heeft kunnen plaatsvinden. Positieve T=0 controles duiden op de aanwezigheid van veel enterovirus (al dan niet infectieus) in het test sample. Hierdoor kan geen onderscheid worden gemaakt tussen infectieus en niet-infectieus virus en zijn de resultaten alleen bruikbaar als na incubatie aanzienlijk meer virus aanwezig is dan op T=0. Bij de celcontroles is medium zonder virus op de cellen aangebracht en is verder de hele procedure doorlopen. De celcontroles dienen negatief te zijn. Als de celcontroles positief zijn duidt dit op contaminatie van een van de reagentia met enterovirus RNA.

In een eerste experiment is het effect van inoculumvolume op de berekende titer bepaald. Hiertoe is infectie in een inoculumvolume van 0,4 ml vergeleken met infectie in een inoculumvolume van 1 ml. Na 2 uur inoculatie is het inoculum verwijderd en is 1 ml infectie-medium toegevoegd. Na 3 dagen incubatie is Tritonlysis uitgevoerd en is het lysaat getest in een enterovirus real-time RT-PCR. Aan de hand van het aantal positieve wells en het aantal geteste wells is de concentratie van de Coxsackievirus B4 voorverdunding berekend met behulp van een MPN-methode en vergeleken met de theoretische waarde van 25 MPN/ml welke is gebaseerd op de plaque-test op BGM-cellen (zie Tabel 2).

Tabel 2 Optimaliseren kweekstap: inoculumvolume

Inoculumvolume	pfu/well	# positieve wells	Berekende conc. (MPN /ml; 95% BI)	Theoretische conc. (MPN/ml)
0,4 ml	1	8/10	4,8 (2,8-7,6)	25
	3	5/10		
	10	4/10		
1 ml	1	0/10	1,4 (0,54-2,8)	25
	3	3/10		
	10	3/10		

Een cc-PCR is uitgevoerd op BGM-cellen met 1, 3 of 10 pfu van het Coxsackievirus B4 in HBSP in een inoculumvolume van 0,4 ml of 1 ml per well. Het aantal positieve wells per aantal geteste wells is weergegeven en hieruit is de MPN berekend van de Coxsackievirus B4 voorverdunding (MPN/ml; BI: betrouwbaarheidsinterval). De theoretische waarde van de voorverdunding gebaseerd op de plaque-test op BGM-cellen is 25 MPN/ml.

Uit dit experiment blijkt dat een klein inoculumvolume iets betere resultaten geeft dan een groot inoculumvolume. De berekende concentratie van de voorverdunding komt echter voor beide volumes niet overeen met de theoretische waarde die gebaseerd is op de plaque-test op BGM-cellen. De gevoeligheid van de methode is dus lager dan de gevoeligheid van de plaque-test. In een vervolgonderzoek is het effect van het wel of niet verwijderen van het inoculum na 2 uur inoculatie vergeleken en het effect van 3 en 6 dagen kweken na de inoculatie. Resultaten staan weergegeven in Tabel 3.

Tabel 3 Wel versus niet verwijderen inoculum en variëren kweektijd

Variabele 1	Variabele 2	pfu/well	# positieve wells	Berekende conc. (MPN/ml; 95% BI)	Theoretische conc. (MPN/ml)
Niet verwijderen inoculum	3 dagen kweek	1	1/10	7,9 (4,2-14,1)	25
		3	6/10		
		10	9/10		
Niet verwijderen inoculum	6 dagen kweek	1	6/10	13,7 (7,6-23,5)	25
		3	6/10		
		10	10/10		
Wel verwijderen inoculum	3 dagen kweek	1	2/10	5,2 (2,5-9,8)	25
		3	3/10		
		10	5/6		
Wel verwijderen inoculum	6 dagen kweek	1	2/10	3,4 (1,7-6,1)	25
		3	2/10		
		10	7/10		

Een cc-PCR is uitgevoerd op BGM-cellen met 1, 3 of 10 pfu van het Coxsackievirus B4 in HBSP in een inoculumvolume van 0,4 ml per well. Twee uur na infectie is aan het inoculum 0,6 ml infectiemedium toegevoegd (niet verwijderen inoculum) óf is het inoculum verwijderd en is 1 ml infectiemedium toegevoegd (wel verwijderen inoculum). Na 3 of 6 dagen incubatie bij 37°C zijn de wells na Tritonlysis getest met behulp van een enterovirus real-time RT-PCR. Het aantal positieve wells per aantal geteste wells is weergegeven en hieruit is de MPN berekend van de Coxsackievirus B4 voorverdunding (MPN/ml; BI: betrouwbaarheidsinterval). De theoretische waarde van de voorverdunding gebaseerd op de plaque-test op BGM-cellen is 25 MPN/ml.

Uit de resultaten blijkt dat bij het niet verwijderen van het inoculum hogere MPN-waarden voor de Coxsackievirus B4 voorverdunding worden verkregen dan bij het wel verwijderen. Tevens werd na een kweekperiode van 6 dagen een hogere MPN-waarde verkregen dan na 3 dagen als het inoculum niet verwijderd wordt. Bij het verwijderen van het inoculum heeft langer kweken geen effect. Kennelijk is een inoculatieperiode van 2 uur niet voldoende om al het virus de kans te geven te hechten aan de cellen. Daaropvolgend is daarom een experiment ingezet waarbij het effect van een langere inoculatieperiode is onderzocht. Tevens is het effect van inoculatie temperatuur bekeken. In dit experiment is na de inoculatie wel het inoculum verwijderd. Resultaten staan vermeld in Tabel 4.

Tabel 4 Variëren inoculatieperiode en inoculatie temperatuur

Variabele 1	Variabele 2	pfu/well	# positieve wells
2 uur inoculatie	Infectie bij kT	10	15/22
2 uur inoculatie	Infectie bij 37°C	10	16/22
4 uur inoculatie	Infectie bij kT	10	16/22
4 uur inoculatie	Infectie bij 37°C	10	20/22

BGM-cellen in een 12-wells-plaat zijn geïnfecteerd met 10 pfu van het Coxsackievirus B4 in HBSP in een inoculatievolume van 0,4 ml. Twee uur of vier uur na infectie bij kT of 37°C is het inoculum verwijderd en is 1 ml infectie-medium toegevoegd. Na 3 dagen incubatie bij 37°C is een Tritonlysis uitgevoerd en zijn de lysaten getest met behulp van een enterovirus real-time RT-PCR. Het aantal positieve wells per aantal geteste wells is weergegeven.

Uit Tabel 4 blijkt dat het effect van inoculatie tijd en inoculatie temperatuur klein is. Een inoculatieperiode van 4 uur lijkt iets betere resultaten te geven dan een inoculatieperiode van 2 uur en inoculatie bij 37°C geeft iets beter resultaat dan inoculatie bij kamertemperatuur. Het effect van wel en niet verwijderen van het inoculumvolume is vervolgens nogmaals onderzocht bij een inoculatieperiode van 4 uur, en een kweekstap van 7 dagen. Resultaten staan weergegeven in Tabel 5.

Tabel 5 Wel versus niet verwijderen inoculumvolume na 4 uur inoculatie

Variabele	pfu/well	# positieve wells	Berekende conc. (MPN/ml; 95% BI)	Theoretische waarde (MPN/ml)
Niet verwijderen inoculumvolume	1	8/10	58,2 (27,7- 128,2)	25
	3	7/10		
	10	10/10		
Wel verwijderen inoculumvolume	1	3/10	8,6 (4,7-14,9)	25
	3	5/10		
	10	10/10		

Een cc-PCR is uitgevoerd op BGM-cellen met 1, 3 of 10 pfu van het Coxsackievirus B4 in HBSP in een inoculumvolume van 0,4 ml per well. Vier uur na infectie is aan het inoculum 0,6 ml infectie-medium toegevoegd (niet verwijderen inoculumvolume) óf is het inoculum verwijderd en is 1 ml infectie-medium toegevoegd (wel verwijderen inoculumvolume). Na 7 dagen incubatie bij 37°C zijn de wells na Tritonlysis getest met behulp van een enterovirus real-time RT-PCR. Het aantal positieve wells per aantal geteste wells is weergegeven en hieruit is de MPN berekend van de Coxsackievirus B4 voorverdunding (MPN/ml; BI: betrouwbaarheidsinterval). De theoretische waarde van de voorverdunding gebaseerd op de plaque-test op BGM-cellen is 25 MPN/ml.

Wederom geeft het niet verwijderen van het inoculum betere resultaten dan het wel verwijderen. Geconcludeerd kan worden dat het niet verwijderen van het inoculum en een voldoende lange incubatieperiode na inoculatie kritische condities zijn voor de kweekstap van een cc-PCR.

Bovenstaande experimenten zijn uitgevoerd met verdunningen van een Coxsackievirus B4 stock in HBSP. Bij het testen van watermonsters met behulp van cc-PCR zal concentraat met daaraan

toegevoegd antibioticum mix (AB-mix) op de cellen worden gebracht. Het is onbekend of onder de geoptimaliseerde condities, incubatie van de BGM-cellen met het concentraat een nadelig effect heeft op de cellen. Bij de plaque-test wordt weliswaar ook concentraat gedurende 2 uur geïncubeerd op de cellen alvorens het concentraat wordt verdund in de agar-overlay, maar hierbij wordt een relatief kleiner volume per cm² celdek aangebracht. Het effect van concentraat/AB-mix als inoculum op de gevoeligheid van de cc-PCR is uitgetest. Hiertoe is concentraat dat negatief was voor enterovirus in de plaque-test, gespiked met verschillende hoeveelheden Coxsackievirus B4 en getest in een cc-PCR. De resultaten zijn vergeleken met HBSP als inoculatiemedium (zie Tabel 6). Ongespiked concentraat is meegenomen als negatieve controle.

Tabel 6 Inoculatie met concentraat/AB-mix versus HBSP

Inoculatie medium	pfu/well	# positieve wells	Berekende conc. (MPN/ml; 95% BI)	Theoretische waarde (MPN/ml)
HBSP	0,1	0/10	17,7 (7,5- 34,7)	25
	0,3	2/10		
	1	5/10		
Concentraat/AB	0,1	0/10	3,3 (1,5-6,6)	25
	0,3	0/10		
	1	1/10		
	10	7/10		

Een cc-PCR is uitgevoerd op BGM-cellen met 0,1; 0,3; 1 of 10 pfu van het Coxsackievirus B4 virus in HBSP of concentraat/AB-mix in een inoculumvolume van 0,4 ml per well. Vier uur na infectie is aan het inoculum 0,6 ml infectiemedium toegevoegd. Na 7 dagen incubatie bij 37°C zijn de wells na Tritonlysis getest met behulp van een enterovirus real-time RT-PCR. Het aantal positieve wells per aantal geteste wells is weergegeven en hieruit is de MPN berekend van de Coxsackievirus B4 voorverdunding (MPN/ml; BI: betrouwbaarheidsinterval). De theoretische waarde van de voorverdunding gebaseerd op de plaque-test op BGM-cellen is 25 MPN/ml.

Uit de resultaten in Tabel 6 blijkt dat het concentraat een nadelig effect heeft op de detectie van Coxsackievirus B4; er wordt een veel lagere MPN gevonden dan wanneer HBSP als inoculatiemedium wordt gebruikt. In de negatieve controles, waarbij concentraat/AB-mix aan BGM-cellen was toegevoegd zonder Coxsackievirus B4 waren de BGM-cellen na 3 dagen losgelaten van de bodem van de 12-wells-plaat, terwijl in de negatieve controles met HBSP een intacte monolayer van cellen aanwezig was. In een groot volume heeft het concentraat/AB-mix dus een toxisch effect op de cellen, waardoor deze niet optimaal beschikbaar zijn voor replicatie van het virus. Daarom is vervolgens uitgetest of inoculatie met kleinere volumes concentraat/AB-mix, gecombineerd met verdunnen in grotere volumina infectiemedium na de inoculatie stap een gunstig effect heeft op de cellen. Hiertoe zijn BGM-cellen geïnoculeerd met 75 µl, 100 µl, 200 µl, 300 µl en 400 µl concentraat/AB-mix en is na 2 uur het inoculum verdund met infectiemedium tot een eindvolume van 1 ml of 2 ml. Na 3 dagen is de conditie van de cellen beoordeeld (zie Tabel 7).

Tabel 7 Effect inoculatie met verschillende volumes concentraat/AB op BGM-cellen

Inoculatie Volume	Volume medium in wells ná inoculatie	
	1 ml	2 ml
75 µl HBSP	++++	++++
400 µl HBSP	++++	++++
75 µl concentraat	+++	++++
100 µl concentraat	++	++++
200 µl concentraat	+	+++
300 µl concentraat	-	++
400 µl concentraat	-	+

Op BGM-cellen in een 12-wells-plaat zijn verschillende volumes HBSP of concentraat aangebracht en na 2 uur incubatie bij 37°C, 5% CO₂ is het volume met infectiemedium aangevuld tot 1 ml of 2 ml. Na 3 dagen incubatie bij 37°C, 5% CO₂ zijn de cellen bekeken en zijn de wells met HBSP (celcontrole) vergeleken met de wells met concentraat/AB-mix. De conditie van de cellen is als volgt aangegeven: +++++, cellen zien er goed uit, confluyente monolayer, vergelijkbaar met celcontrole. +++, cellen zien er goed uit, echter enkele losse cellen; ++, cellen zien er goed uit, maar toenemende mate van losse cellen; + voornamelijk losse cellen, -: alleen losse cellen.

Bij aanvullen met infectiemedium tot 1 ml is al bij 75 µl concentraat effect te zien op het celdek. Bij aanvullen tot 2 ml is bij 75 en 100 µl geen effect op de cellen te zien en is alleen bij de wells die geïnoculeerd waren met 200 µl concentraat of hoger toxische effecten op de cellen te zien. Er is gekozen om de cellen te inoculeren met 100 µl concentraat/AB-mix en dit na 2 uur aan te vullen tot 2 ml met infectiemedium. Onder deze condities is een cc-PCR experiment uitgevoerd waarbij concentraat of HBSP is gespiked met verschillende hoeveelheden Coxsackievirus B4 (Tabel 8).

Tabel 8 Gevoeligheid cc-PCR-methode bij inoculatie met 100 µl concentraat/AB-mix

Inoculatie medium	pfu/well	# positieve wells	Berekende conc. (MPN/ml; 95% BI)	Theoretische conc. (MPN/ml)
HBSP	0,3	0/10	14,4 (7,5-34,7)	25
	1	3/10		
	3	9/10		
	10	10/10		
Concentraat/AB-mix	0,3	1/10	22,3 (12,3- 39,0)	25
	1	5/10		
	3	10/10		
	10	10/10		

Op BGM-cellen in een 12-wells-plaat is 100µl HBSP of concentraat/AB-mix aangebracht, gespiked met 0,3; 1; 3 of 10 pfu Coxsackievirus B4. Na 2 uur incubatie bij 37°C, 5% CO₂ is 1,9 ml infectiemedium toegevoegd. Na 7 dagen incubatie bij 37°C zijn de wells na Tritonlysis getest met behulp van een enterovirus real-time RT-PCR. Het aantal positieve wells per aantal geteste wells is weergegeven en hieruit is de MPN berekend van de Coxsackievirus B4 voorverdunding (MPN/ml; BI: betrouwbaarheidsinterval). De theoretische waarde van de voorverdunding gebaseerd op de plaque-test met BGM-cellen is 25 MPN/ml.

Uit de resultaten blijkt dat 100 µl concentraat/AB-mix als inoculatiemedium geen nadelig effect heeft op replicatie van Coxsackievirus B4 in vergelijking met HBSP als inoculatiemedium. In de RT-PCR

werden voor alle positieve wells Ct-waarden verkregen tussen 18 en 24, zowel voor de wells met concentraat als de wells met HBSP. De replicatie van het virus is dus voldoende hoog om met de gebruikte cel-lysis en PCR-methode aan te kunnen tonen. Onder de gebruikte condities heeft de concentraat/AB-mix geen negatief effect op detectie van het virus. De berekende concentratie van de Coxsackievirus B4 voorverdunding komt overeen met de theoretische concentratie. Onder deze condities is de cc-PCR-methode dus even gevoelig als de plaque-test en is 1 pfu Coxsackievirus B4 per welletje detecteerbaar.

In alle bovenstaande experimenten gaven de T=0 controle en de celcontroles (zie Bijlage 3) geen PCR signaal, waaruit geconcludeerd kan worden dat overige positieve PCR signalen het resultaat waren van replicatie van infectieus Coxsackievirus B4.

3.4 Selectie van geschikte cellijn voor detectie van enterovirus

Omdat bekend is dat in BGM-cellen niet alle enterovirustypen repliceren is onderzocht of met een andere cellijn een breder scala aan enterovirustypen gedetecteerd kan worden. Hiertoe zijn 6 verschillende cellijnen geselecteerd die staan weergegeven in Tabel 9. Van de meeste van deze cellijnen is beschreven dat ze in staat zijn om bepaalde typen enterovirussen te detecteren.

Tabel 9 Selectie van cellijnen voor enterovirusdetectie

Naam	Herkomst	Type cellijn
MRC-5	Mens	Long fibroblasten
BGM	Buffalo Green Monkey	Niercellen
RD	Mens	Spier, rhabdomyosarcoma
HT-29	Mens	Darm, colorectaal adenocarcinoom
HeLa	Mens	Cervix epitheel, adenocarcinoom
Vero	African Green Monkey	Niercellen

Een panel van 17 verschillende enterovirussen en 3 parechovirussen is op de cellijnen BGM, MRC-5, RD, HT-29, Vero en HeLa getest op de mogelijkheid om CPE te vormen. Hiertoe zijn de cellen gezaaid in 96-wells-platen. Nadat de cellen een confluerende monolayer hadden gevormd zijn de cellen geïnfecteerd met 3 verschillende verdunningen van de 20 virussen, waarbij per verdunning 3 wells geïnoculeerd zijn. Na 3, 4 en 7 dagen is de vorming van CPE bekeken. In Bijlage 2 staat weergegeven welke enterovirustypen in welke verdunningen na 7 dagen positieve CPE gaven op welke cellijnen. In Tabel 10 is weergegeven welke cellijn het meest gevoelig is voor welk type enterovirus op basis van de data uit Bijlage 2.

Tabel 10 Gevoeligheid cellijnen voor detectie van enterovirussen

		RD	BGM	MRC-5	HT-29	HeLa	Vero
PV	PV2	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue
EV-A	CoxA5	Dark Blue	Light Blue	Dark Blue	Dark Blue	White	Light Blue
	CoxA8	Dark Blue	Light Blue	Dark Blue	Dark Blue	White	Light Blue
	CoxA14	Dark Blue	Light Blue	Dark Blue	Dark Blue	White	Light Blue
EV-B	Ent69	Dark Blue	White	White	Dark Blue	White	White
	Echo4	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	White	Dark Blue
	Echo12	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	White	Dark Blue
	Echo26	Dark Blue	Light Blue	Light Blue	Dark Blue	White	Light Blue
	Echo27	Dark Blue	Light Blue	Dark Blue	Dark Blue	White	White
	Echo29	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	White	White
	Echo33	Dark Blue	White	Dark Blue	Dark Blue	White	White
	CoxA9	Light Blue	Light Blue	Light Blue	Dark Blue	White	White
	CoxB3	White	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue
	CoxB4	White	Dark Blue	White	Dark Blue	White	Dark Blue
	EV-C	CoxA13	White	White	Dark Blue	Dark Blue	White
CoxA20		White	White	Dark Blue	Dark Blue	White	White
EV-D	Ent68	White	Dark Blue	Dark Blue	White	White	
HPeV	HPeV1	White	Light Blue	Dark Blue	Dark Blue	Light Blue	White
	HPeV2	White	Light Blue	Dark Blue	Dark Blue	White	Light Blue
	HPeV3	Light Blue	White	White	Dark Blue	White	Dark Blue

In blauw is aangegeven welke cellijnen gevoelig zijn voor detectie van welke virussen, waarbij de donkerblauwe vlakken aangeven welke cellijnen het meest gevoelig zijn voor detectie van een specifiek enterovirus of parechovirus type. Voor ruwe data zie Bijlage 2.

Uit Tabel 10 blijkt dat MRC-5, RD en HT-29 geschikt zijn voor detectie van veel enterovirustypen. Met Vero- en HeLa-cellen worden de minste enterovirustypen gedetecteerd. Met BGM-cellen worden vooral een aantal groep A Coxsackievirussen gemist. Geen enkele cellijn is in staat om alle enterovirustypen te detecteren en ook geen enkele combinatie van twee cellijnen detecteert alle geteste virussen. De BGM-celijn heeft de hoogste gevoeligheid voor 7 van de 20 geteste virussen, de RD-celijn voor 11 van de 20, de MRC-5-celijn voor 13 van de 20 en de HT-29-celijn voor 18 van de 20. Met de HT-29-celijn worden alle virussen gedetecteerd die door de BGM-celijn ook worden gedetecteerd in een vergelijkbare of hogere gevoeligheid en nog een aantal extra virussen, die met de BGM-celijn gemist worden. De HT-29-celijn is dus een goed alternatief voor de BGM-celijn. Met HT-29 worden echter Coxsackievirus A5 en enterovirus 68 gemist, die wel worden gedetecteerd met respectievelijk RD-cellen en MRC-5-cellen.

3.5 Vergelijking cc-PCR met BGM- of HT-29-cellen

Voor één type virus, namelijk echovirus 4, is de gevoeligheid van de cc-PCR op BGM-cellen vergeleken met de gevoeligheid op HT-29 cellen. De gebruikte echovirus 4 stock is ter vergelijking ook getest in een plaque-test op BGM-cellen. Resultaten staan weergegeven in Tabel 11.

Tabel 11 Vergelijking cc-PCR met HT-29 of BGM-cellen en plaque-test

	cc-PCR/BGM MPN/ml (95% BI)	cc-PCR/HT-29 MPN/ml (95% BI)	Plaque-test/BGM pfu/ml (95% BI)
Echovirus 4	9,6 (3,7-20,2)	86,1 (48,4-146,3)	7,3

Een stock van Echovirus 4 is getest in zowel een plaque-test op BGM-cellen als een cc-PCR assay op HT-29- en/of BGM-cellen.

De cc-PCR met BGM-cellen geeft voor een echovirus 4 vergelijkbare resultaten als de plaque-test op BGM-cellen. De cc-PCR met de HT-29-cellen is voor echovirus 4 een factor 10 gevoeliger dan de cc-PCR met BGM-cellen.

4 Discussie

4.1 cc-PCR-methode voor enterovirussen

Met de cc-PCR-methode voor enterovirussen zoals deze bij het RIVM is ontwikkeld kan 1 pfu Coxsackievirus B4 worden aangetoond per well in een 12-wells-plaat. De gevoeligheid van de cc-PCR-methode is dus vergelijkbaar met de plaque-test waarbij 1 pfu Coxsackievirus B4 wordt aangetoond per kweekfles. Kritische stappen die de gevoeligheid bepalen is het al dan niet verwijderen van het inoculum, het inoculumvolume en de kweektijd. De beste resultaten worden verkregen indien een monolayer van cellen in de wells van een 12-wells-plaat worden geïnoculeerd met maximaal 100 µl concentraat/AB-mix en indien het inoculum, na 2 uur infectie, niet wordt verwijderd, maar wordt aangevuld met 2 ml infectiemedium. Na een kweekstap van 7 dagen bij 37°C worden de cellen vervolgens gelyseerd met een Tritonoplossing en kan het RNA van het gerepliceerde virus worden aangetoond via real-time RT-PCR. De Ct-waarden die worden verkregen in de PCR zijn dusdanig laag dat meerdere wells gepooled zouden kunnen worden en getest in één PCR-reactie.

Bij de hier ontwikkelde methode is gebruik gemaakt van BGM- of HT-29-cellen. BGM-cellen zijn met name geschikt voor detectie van groep B Coxsackievirussen en poliovirussen. Uit dit onderzoek blijkt dat met HT-29-cellen meer verschillende enterovirustypen gedetecteerd kunnen worden in vergelijking met de BGM-cellen. HT-29-cellen zijn gevoelig voor infectie met de meeste enterovirustypen en bovendien ook voor parechovirussen waarvan het belang voor de volksgezondheid recent is gebleken: in jonge kinderen (<5 jaar) zijn humane parechovirussen in Nederland de tweede oorzaak van neonatale sepsis en meningitis (Wolthers et al., 2008). Voor het onderzoek van watermonsters worden meestal BGM-cellen gebruikt. Omdat met deze cellijn vooral poliovirussen en groep B Coxsackievirussen worden aangetoond (Schmidt et al., 1978), wordt het werkelijke aantal enterovirussen bij het gebruik van BGM-cellen dus waarschijnlijk onderschat. Voor onderzoek aan klinische monsters wordt vaak een panel van verschillende cellijnen gebruikt. Dit gebruik van verschillende methoden verklaart waarschijnlijk de discrepantie die nu bestaat tussen enterovirustypen die worden gevonden in watermonsters en de enterovirustypen die vooral worden gevonden in de kliniek. Zo wordt in Finse rioolwatermonsters Coxsackievirus A9 nauwelijks aangetroffen, terwijl dit in klinische monsters een van de vier meest voorkomende typen is (Hovi et al., 1996). Coxsackievirus B4 wordt het meest gevonden in watermonsters en komt juist nauwelijks voor in klinische monsters. Voor enterovirus 71, de veroorzaker van 'hand-foot-and mouth disease', is dezelfde discrepantie tussen klinische en milieumonsters geconstateerd (Hsu et al., 2007). Aangezien deze entero- en parechovirussen ernstige aandoeningen kunnen veroorzaken die mogelijk gerelateerd zijn aan water, is nader typerings- en fylogenetisch onderzoek nodig naar de Nederlandse situatie om water als eventuele transmissieroute nader te kunnen bevestigen. De verwachting is dat door het gebruik van een gevoeliger cellijn, zoals HT-29 meer enterovirustypen gedetecteerd zullen worden dan met de huidige plaque-test met BGM-cellen waardoor een beter beeld wordt verkregen van de in het water aanwezige enterovirussen en er dus een betrouwbaardere infectierisicoschatting kan worden uitgevoerd voor drinkwaterconsumptie. Een eerste aanzet voor een dergelijke infectierisicoschatting voor enterovirus 71 is inmiddels gedaan (Bouwknegt et al., 2009) en zal verder moeten worden uitgewerkt in samenwerking met klinische centra in Nederland.

4.2 Detectielimiet

In de hier beschreven methode kan 0,1 ml inoculumvolume getest worden per well in een 12-wells-plaat. Indien watermonsters getest worden, wordt het concentraat eerst geïncubeerd met een antibioticummix om eventueel aanwezige bacteriën en schimmels in het concentraat te doden. De verhouding concentraat: AB-mix is 3:1. Voor het testen van 0,1 ml inoculum betekent dit een verhouding van 0,025 ml AB-mix per 0,075 ml concentraat. Per well kan dus 0,075 ml concentraat getest worden. Dit komt overeen met grofweg 1,5 liter water. In één PCR-reactie kunnen een aantal wells uit de kweekplaat gepooled worden voor detectie van enterovirus RNA. Bij het poolen van 3 wells kan per PCR reactie 0,225 ml concentraat \approx 4,5 liter water getest worden. Per PCR reactie kan 1 infectious PCR detectable unit (ipdu) worden aangetoond. De detectielimiet van de methode bedraagt daarmee 0,22 (ipdu)/ liter water. Het aantal replica's dat wordt uitgevoerd bepaalt uiteindelijk het totaal onderzocht volume en daarmee de theoretische detectielimiet.

4.3 Vergelijking plaque-test, cc-PCR en RT-PCR

In Tabel 12 is de detectielimiet van de cc-PCR vergeleken met de plaque-test en de RT-PCR. Weergegeven is de hoeveelheid concentraat die per testeenheid getest kan worden. Een testeenheid is voor de plaque-test één 75cm²-kweekfles, voor de cc-PCR drie wells van een 12-wells-plaat en voor de RT-PCR één PCR-reactievaatje. De theoretische detectielimiet van de methode wordt bepaald door de hoeveelheid virus die per eenheid gedetecteerd kan worden in combinatie met de hoeveelheid concentraat dat per eenheid getest wordt en het aantal replica's dat per experiment wordt uitgevoerd. Qua detectielimiet zit de cc-PCR-methode tussen de plaque-test en RT-PCR in (zie Tabel 12). De hoeveelheid inname water die onderzocht dient te worden om in te kunnen schatten of wordt voldaan aan het 10⁻⁴-infectierisico hangt af van de verwijderingscapaciteit van het zuiveringsproces van het inname water. Bij een verwijderingscapaciteit van 4¹⁰log komt dit grofweg neer op 100 liter inname water. Dit is gebaseerd op een puntschatting waarbij ervan is uitgegaan dat een persoon gemiddeld 270 ml water per dag drinkt (Teunis et al., 1997) en dus 100 liter per jaar.

Tabel 12 Theoretische detectielimiet van plaque-test, cc-PCR en RT-PCR

	Plaque	cc-PCR	RT-PCR
Onderzocht volume concentraat per test	1,1 ml	0,225 ml	1,25 µl
Onderzocht volume water per test	22 l	4,5 l	25 ml
Gevoeligheid per eenheid	1 pfu ¹	1 ipdu ²	1 pdu ³
Detectielimiet per liter ruw water	$\leq 0,045$ pfu/ l	$\leq 0,22$ ipdu/ l	≤ 40 pdu/ l
Detectielimiet bij 10 replica's	$\leq 0,0045$ pfu/ l	$\leq 0,022$ ipdu/ l	≤ 4 pdu/ l

¹ plaque forming unit, ² Infectious PCR detectable unit, ³ PCR detectable unit

De totale doorlooptijd van de cc-PCR-methode is momenteel 8 dagen. Deze kan mogelijk verder gereduceerd worden door de kweekstap te verkorten. Belangrijke voordelen van de cc-PCR-methode met HT-29 cellen ten opzichte van de huidige plaque-test op BGM-cellen is dat:

1. een veel bredere range aan enterovirustypen kan worden aangetoond;
2. ook infectieuze virussen kunnen worden aangetoond die geen CPE geven;
3. de methode eenvoudiger is uit te voeren en een kortere doorlooptijd heeft.

Voordelen ten opzichte van de RT-PCR methode zijn dat:

1. een veel groter volume aan concentraat onderzocht kan worden per test, waardoor de theoretische detectielimiet aanzienlijk verlaagd wordt;
2. alleen infectieus virus wordt aangetoond.

Een vergelijking van de plaque-test met de cc-PCR-methode met zowel BGM- als HT-29-cellen op verschillende watermonsters wordt op dit moment uitgevoerd om de daadwerkelijke meerwaarde van de methode en de betekenis voor de wettelijk vereiste kwantitatieve risicoanalyse nader te bepalen.

Literatuur

Anoniem. 2001. Besluit van 9 januari 2001 tot wijziging van het waterleidingenluit in verband met de richtlijn betreffende de kwaliteit van voor menselijke consumptie bestemd water. Staatsblad van het Koninkrijk der Nederlanden.

Anoniem. 2006. Inspectierichtlijn Analyse microbiologische veiligheid drinkwater. Artikelcode 5318.

Benschop K, Molenkamp R, van der Ham A, Wolthers K, Beld M. 2008. Rapid detection of human parechoviruses in clinical samples by real-time PCR. *J. Clin. Virol.* 41: 69-74

Block JC, Schwartzbrod L 1982. Méthodes de quantification. In *Analyse virologique des eaux. Techniques et Documentation Lavoisier, Paris, France.* P. 115-142.

Bouwknegt M, Schijven JS, Teunis PFM, van der Avoort H en De Roda Husman AM. 2009. Verspreiding van Enterovirus 71 via drinkwater in Nederland? Manuscript aangeboden.

Buck GE, Wiesemann M, Stewart L. 2002. Comparison of mixed cell culture containing genetically engineered BGMK and CaCo-2 cells (Super E-Mix) with RT-PCR and conventional cell culture for the diagnosis of enterovirus meningitis. *J. Clin. Virol.* 25: S13-S18.

Chapron CD, Ballester NA, Fontaine JH, Frades CN, Margolin AB. 2000. Detection of astroviruses, enteroviruses and adenovirus types 40 and 41 in surface waters collected and evaluated by the information collection rule and an integrated cell culture-nested PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 2520-2525.

Chonmaitree T, Ford C, Sanders C, Lucia HL. 1988. Comparison of cell cultures for rapid isolation of enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 26: 2576-2580.

Cooper PD 1961^a. The plaque assay of animal viruses. *Adv. Virus Res.* 8: 319-378.

Cooper PD. 1961^b. An improved agar cell-suspension plaque assay for poliovirus: some factors affecting efficiency of plaquing. *Virology* 134: 153-157.

Dagan R, Menegus MA. 1986. A combination of four cell types for rapid detection of enteroviruses in clinical specimens. *J. Med. Virol.* 19: 219-228.

Dahling DR, Berg G, Berman D. 1974. BGM, a continuous cell line more sensitive than primary Rhesus and African green Kidney cells for the recovery of viruses from water. *Health Lab. Sci.* 11: 275-282.

Dahling DR, Wright BA. 1986. Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 790-812.

De Roda Husman AM, Lodder WJ, Rutjes SA, Schijven JF, Teunis PF. 2009. Long-term inactivation study of three enteroviruses in artificial surface and groundwaters, using PCR and cell culture. *Appl Environ Microbiol.* 75(4):1050-7.

- Greening GE, Hewitt J, Lewis GD. 2002. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *J. Appl. Microbiol.* 93: 745-750.
- Hovi T, Stenvik M, Rosenlew M. 1996. Relative abundance of enterovirus serotypes in sewage differs from that in patients: clinical and epidemiological implications. *Epidemiol. Infect.* 116: 91-97.
- Hsiung GD, Melnick JL. 1958. Adsorption, multiplier, and cytopathogenicity of enteroviruses (poliomyelitis, Coxsackie, and ECHO groups) in susceptible and resistant monkey kidney cells. *J. Immunol.* 80: 45-52.
- Hsu BM, Chen CH, Wan MT. 2007. Genetic diversity of epidemic enterovirus 71 strains recovered from clinical and environmental samples in Taiwan. *Virus Res.* 126(1-2):69-75.
- Huang YT, Yam P, Yan H, Sun Y. 2002. Engineered BGMK cells for sensitive and rapid detection of enteroviruses. *J. Clin. Microbiol.* 40: 366-371.
- Kok TW, Pryor T, Payne L. 1998. Comparison of rhabdomyosarcoma, buffalo green monkey kidney, A549 (human lung epithelial) cells and human lung fibroblasts for isolation of enteroviruses from clinical samples. *J. Clin. Virol.* 11: 61-65.
- Lipson SM, Walderman R, Costello P, Szabo K. 1988. Sensitivity of rhabdomyosarcoma and guinea pig embryo cell cultures to field isolates of difficult-to-cultivate Group A coxsackieviruses. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1298-1303.
- Lodder WJ, De Roda Husman AM. 2005. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1453-1461.
- Melnick JL, Wenner HA. 1969. Enteroviruses, p. 529-602. In Lennette EH and Schmidt NJ (ed.), *Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections*, 4th ed. American Public Health Association, Inc., New York.
- Menegus MA, Hollick GE. 1982. Increased efficiency of group B coxsackievirus isolation from clinical specimens by use of BGM cells. *J. Clin. Microbiol.* 15: 945-948.
- Mocé-Llivina L, Lucena F, Jofre J. 2004. Double-layer plaque assay for quantification of enteroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 70: 2801-2805.
- Oberste MS, Maher K, Nix WA, Michele SM, Uddin M, Schnurr D, al-Busaidy S, Akoua-Koffi C, Pallansch MA. 2007. Molecular identification of 13 new enterovirus types, EV79-88, EV97, and EV100-101, members of the species *Human Enterovirus B*. *Virus Research* 128: 34-42.
- O'Brien RT, Newman JS. 1977. Inactivation of polioviruses and coxsackieviruses in surface water. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 334-340.
- Oostvogel PM, van Wijngaarden JK, van der Avoort HGAM, Mulders MN, Conijn-van Spaendonck MAE, Rümke HC, van Steenis G, van Loon AM. 1994. Poliomyelitis outbreak in an unvaccinated community in The Netherlands. *Lancet* 344: 665-670.

Papageorgiou GT, Mocé-Llivina L, Christodoulou CG, Lucena F, Akkelidou D, Ioannou E, Jofre J. 2000. A simple methodological approach for counting and identifying culturable viruses adsorbed to cellulose nitrate membrane filters. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 194-198.

Reynolds KA, Gerba CP, Pepper IL. 1996. Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 1424-1427.

Reynolds KA, Gerba CP, Abbaszadegan M, Pepper IL. 2001. ICC/PCR detection of enteroviruses and hepatitis A virus in environmental samples. *Can. J. Microbiol.* 47: 153-157.

Rutjes SA, De Roda Husman AM. 2004. Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001. RIVM rapport no. 330000007/2004.

Rutjes SA, De Roda Husman AM. 2007. Optimalisatie van virusdetectie ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit. RIVM rapport no. 703719018/2007.

Rutjes SA, Italiaander R, van den berg HHJL, Lodder WJ, De Roda Husman AM. 2005. Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens miniMAG system and real-time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3734-3740.

Rutjes SA, Lodder WJ, Docters van Leeuwen A, De Roda Husman AM. 2009. Detection of infectious rotavirus in naturally contaminated source waters for drinking water production. *J. Appl. Microbiol.* doi:10.1111/j.1365-2672.2009.04184.x

Schmidt NJ, Ho HH, Lennette EH. 1975. Propagation and isolation of group A coxsackieviruses in RD cells. *J. Clin. Microbiol.* 2: 183-185.

Schmidt NJ, Ho HH, Riggs JL, Lennette EH. 1978. Comparative sensitivity of various cell culture systems for isolation of viruses from wastewater and fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 480-486.

She RC, Crist G, Billetdeaux E, Langer J, Petti CA. 2006. Comparison of multiple shell vial cell lines for isolation of enteroviruses: A national perspective. *J. Clin. Virol.* 37: 151-155.

Shieh YC, Wong CI, Krantz JA, Hsu FC. 2008. Detection of naturally occurring enteroviruses in waters using direct RT-PCR and integrated cell culture-RT-PCR. *J. Virol. Meth.* 149: 184-189.

Sobsey MD, Battigelli DA, Shin GA, Newland S. 1998. RT-PCR amplification detects inactivated viruses in water and wastewater. *Water Science and Technology*, 38: 91-94.

Stanway G, Brown F, Christian P, Hovi T, Hyypiä T, King AMQ, Knowles NJ, Lemon SM, Minor PD, Pallansch MA, Palmenberg AC, Skern T. 2005. Picornaviridae. P. 757-778. In: Fauquet CM, Mayo MA, Maniloff J, Desselberger U, Ball LA (ed.). *Virus Taxonomy: Classification and nomenclature of Viruses*. Eighth report of the International Committee on the taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, The Netherlands.

Teunis PFM, Medema GJ, Kruidenier L, Havelaar AH. 1997. Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* or *Giardia* in drinking water from a surface water source. *Water Res.* 31: 1333-1346.

Wang A, Salazar AM, Yates MV, Mulchandani A, Chen W. 2005. Visualization and detection of infectious coxsackievirus replication using a combined cell culture-molecular beacon assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8397-8401.

Westrell T, Teunis PF, van den Berg H, Lodder WJ, Ketelaars HAM, Stenstrom TA, De Roda Husman AM. 2006. Short- and long-term variations of norovirus concentrations in the Meuse river during a 2-year study period. *Water Res.* 40: 2613-2620.

Wolthers KC, Benschop KS, Schinkel J, Molenkamp R, Bergevoet RM, Spijkerman IJ, Kraakman HC, Pajkrt D. 2008. Human parechoviruses as an important viral cause of sepsislike illness and meningitis in young children. *Clin Infect Dis.* 47(3):358-63.

Bijlage 1

Moleculaire klassificatie van humane enterovirussen

Humaan enterovirus A	CV-A2 t/m CV-A8 CV-A10 CV-A12 CV-A14 CV-A16 EV-71 EV-76
Humaan enterovirus B	CV-B1 t/m CV-B6 E-1 t/m E-7 E-9 E-11 t/m E-21 E-24 t/m E-27 E-29 t/m E-33 EV-69 EV-73 t/m EV-75 EV-77 EV-78
Humaan enterovirus C	CV-A1 CV-A11 CV-A13 CV-A17 CV-A19 t/m CV-A22 CV-A24
Humaan enterovirus D	EV-68 EV-70
Poliovirus	PV-1 PV-2 PV-3

Moleculaire klassificatie van humane enterovirussen volgens Stanway et al. (2005). CV-A: coxsackievirus A, CV-B: coxsackievirus B, E: echovirus, EV: enterovirus, PV: poliovirus.

Bijlage 2

Gevoeligheid cellijnen voor enterovirus en parechovirus

			RD	BGM	MRC-5	HT-29	HeLa	Vero	
IU/well									
PV	PV-2	160.000	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	
		1600	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3	
		16	3/3	3/3	3/3	3/3	2/3	3/3	
EV-A	Cox A5	220.000	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
		2200	3/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
		22	1/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
	Cox A8	160	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	
		100	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	2/3	
		1	1/3	0/3	1/3	2/3	0/3	0/3	
	Cox A14	630	3/3	1/3	3/3	1/1	0/3	0/3	
		100	3/3	0/3	3/3	3/3	0/3	0/3	
		1	3/3	0/3	2/3	3/3	0/3	0/3	
	EV-B	Ent 69	15.000	3/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3
			150	3/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3
			1,5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
Echo 4		7500	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	
		75	3/3	1/3	3/3	3/3	0/3	1/3	
		0,8	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	
Echo 12		280.000	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	
		2800	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	
		28	3/3	2/3	1/3	2/3	0/3	1/3	
Echo 26			3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	
			3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	3/3	
			3/3	2/3	0/3	3/3	0/3	0/3	
Echo 27		112.000	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	
		1120	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	
		11	2/3	0/3	0/3	2/3	0/3	0/3	
Echo 29		790	3/3	3/3	3/3	2/2	0/3	0/3	
		100	1/3	2/3	3/3	3/3	0/3	0/3	
		1	1/3	0/3	0/3	1/1	0/3	0/3	
Echo 33		10.000	3/3	0/3	3/3	3/3	0/3	0/3	
		100	3/3	0/3	3/3	3/3	0/3	0/3	
		1	0/3	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	
Cox A9		10.000	3/3	3/3	3/3	3/3	0/3	0/3	
		100	0/3	1/3	2/3	3/3	0/3	0/3	
		1	0/3	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	
Cox B3	36.000	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3		
	360	0/3	3/3	3/3	3/3	3/3	3/3		
	3,6	0/3	3/3	1/3	3/3	1/3	0/3		
Cox B4	500	0/3	3/3	0/3	1/1	0/3	2/2		
	100	0/3	3/3	0/3	3/3	0/3	1/3		
	1	0/3	1/3	0/3	0/1	0/3	0/3		

		IU/well	RD	BGM	MRC-5	HT-29	HeLa	Vero
EV-C	Cox A13	395	0/3	0/3	3/3	1/1	0/3	0/3
		100	0/3	0/3	3/3	3/3	0/3	0/3
		1	0/3	0/3	2/3	2/3	0/3	0/3
	Cox A20	10.000	0/3	0/3	3/3	3/3	0/3	0/3
		100	0/3	0/3	1/3	3/3	0/3	0/3
		1	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
EV-D	Ent 68	25	0/3	0/3	3/3	0/3	0/3	0/3
		1	0/3	0/3	1/3	0/3	0/3	0/3
HPeV	HPeV1	10 ⁻¹ ×verd	0/2	2/2	2/2	2/2	2/2	0/2
		10 ⁻³ ×verd	0/3	0/3	3/3	3/3	0/3	0/3
		10 ⁻⁵ ×verd	0/3	0/3	1/3	3/3	0/3	0/3
	HPeV2	10 ⁻¹ ×verd	0/2	2/2	2/2	2/2	0/2	2/2
		10 ⁻³ ×verd	0/3	0/3	3/3	3/3	0/3	0/3
		10 ⁻⁵ ×verd	0/3	0/3	1/3	3/3	0/3	0/3
	HPeV3	10 ⁻¹ ×verd	1/2	0/2	0/2	2/2	0/2	2/2
		10 ⁻³ ×verd	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
		10 ⁻⁵ ×verd	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3

Cellen in een 96-wells-plaat zijn geïnoculeerd met verschillende verdunningen van 17 enterovirustypen en 3 parechovirus typen. In de tabel is aangegeven met hoeveel infectieuze units (IU) virus per well de cellen geïnoculeerd zijn. Na 7 dagen zijn de wells gescoord op het wel of niet aanwezig zijn van CPE. Het aantal CPE-positieve wells per aantal geteste wells is aangegeven. De geteste cellijnen zijn RD, BGM, MRC-5, HT-29, HeLa en Vero. De geteste virussen staan weergegeven in de tweede kolom en zijn op basis van moleculaire klassificatie onder te verdelen in poliovirus (PV), humaan enterovirus A (HEV-A), humaan enterovirus B (HEV-B), humaan enterovirus C (HEV-C) of humaan enterovirus D (HEV-D) (Stanway et al., 2005). Tevens zijn 3 typen parechovirussen (HPeV) getest. Verdunningen waarbij alle wells positief zijn, zijn aangegeven in donkerblauw. Verdunningen waarbij enkele wells positief zijn, zijn aangegeven in lichtblauw.

Bijlage 3

Materiaal en methoden

Virussen en cellijnen

Ten behoeve van de optimalisatie van een cc-PCR-methode is gebruikgemaakt van een Coxsackievirus B4-stock. Deze stock is getitreerd met behulp van de plaque-test op BGM-cellen. Dit virus wordt gebruikt als positieve controle in de enterovirus plaque-test. De stock is verder verdund in HBSP naar een concentratie van 1×10^4 pfu/ml en de concentratie van deze stock is bevestigd met behulp van een plaque-test. Stocks van overige enterovirustypen zijn verkregen via Harrie van de Avvoort van het Laboratorium voor Infectieziekten en Screening van het RIVM. Echovirus 4 is opgekweekt op RD-cellen en vervolgens getitreerd in zowel een plaque-test op BGM-cellen als een CCID50 assay op BGM-cellen en een CCID50 assay op RD cellen.

De cellijnen HeLa, RD, HT-29, Vero en MRC-5 zijn verkregen via de ATCC. De cellijn BGM is de cellijn die bij het RIVM wordt gebruikt voor de plaque-test. Cellen zijn gekweekt in celkweekmedium (1×MEM medium (Life Technologies, Breda) met 10% foetaal kalfserum (FCS), 1×penicilline/streptomycine en 1×non-essential amino acids (Life Technologies, Breda)) bij 37°C, 5% CO₂.

Plaque-test

De plaque-test is uitgevoerd zoals beschreven door Rutjes et al. (2005).

Celkweek-PCR

De celkweekstap van de cc-PCR-methode is uitgevoerd in 12-wells-platen (Costar). Cellen zijn gezaaid in 2×10^4 cellen/cm² voor BGM-cellen of 6×10^4 cellen/cm² voor HT-29-cellen in celkweekmedium. Vervolgens zijn cellen gedurende 3 dagen geïncubeerd bij 37°C, 5% CO₂. Vóór de inoculatie is het celkweekmedium verwijderd van de cellen en is 100µl inoculum op de cellen aangebracht. Inoculatie is uitgevoerd gedurende 2 uur bij 37°C, 5% CO₂. Vervolgens is 2 ml infectiemedium (1×MEM medium (Life Technologies, Breda) met 2% foetaal kalf serum (FCS), 1×penicilline/streptomycine en 1×non-essential amino acids (Life Technologies, Breda)) toegevoegd aan het inoculum. Na 7 dagen incubatie bij 37°C, 5% CO₂ is 500 µl Triton X-100 4,5 % (w/v) toegevoegd aan de wells. Platen zijn vervolgens minimaal 1 uur ingevroren bij -70°C. Na ontdooien is het cellysaat 1:40 verdund in water door 5µl van het cellysaat toe te voegen aan 195µl RNase-vrij water. Voor het poolen van 3 wells is 3×5µl cellysaat uit 3 verschillende wells toegevoegd aan 585µl RNase-vrij water. Op het verdunde lysaat is vervolgens een enterovirus real-time RT-PCR uitgevoerd zoals hieronder beschreven. In cc-PCR-experimenten worden meerdere welletjes van een T=0 controle meegenomen, waarbij cellen worden geïnfecteerd met het te testen monster, maar waarbij na de inoculatie en toevoegen van infectiemedium meteen een Tritonlysis wordt uitgevoerd. Tevens worden in ieder experiment 2 celcontroles meegenomen waarbij geen virus is toegevoegd aan de cellen, maar verder wel de hele cc-PCR-procedure is doorlopen.

Enterovirus real-time RT-PCR

Enterovirus real-time RT-PCR is uitgevoerd zoals beschreven door Benschop et al. (2008) met enkele aanpassingen aan het protocol. Aan 5µl van het verdunde cellysaat wordt 5µl random primers toegevoegd (1,5 µg/µl, Roche, Mannheim, Duitsland) en geïncubeerd gedurende 2 minuten bij 95°C.

Na afkoelen en afdraaien wordt hier vervolgens 10 µl RT-mix aan toegevoegd (2×first strand buffer, 0,02 M DTT, 1 mM dNTPs (Roche, Mannheim, Duitsland), 50 units Superscript II (Invitrogen, Breda), 4 units RNase-Out (Invitrogen, Breda) en wordt gedurende 60 minuten geïncubeerd bij 42°C. Het Superscript enzym wordt vervolgens geïnactiveerd door 2 minuten verhitten bij 95°C. De real-time PCR-reactie wordt uitgevoerd op 5µl van het RT-product in een reactievolume van 20µl met 0,9 µM forward primer (GGCCCTGAATGCGGCTAAT), 0,9 µM reverse primer (GGGATTGTCACCATAAGCAGCC) en 0,2 µM probe (GCGGAACCGACTACTTTGGGT) en 1×Taqman Universal PCR Master mix (Applied Biosystems, Nieuwerkerk aan den IJssel). De PCR reactie wordt uitgevoerd in een LightCycler 480 PCR apparaat (Roche, Mannheim, Duitsland) volgens het volgende programma: 2 minuten 50°C, 10 minuten 95°C, 45 cycli van 15 sec 95°C, 60 sec 60°C. In elke real-time RT-PCR-serie worden als positieve PCR-controles drie verdunningen van een Coxsackievirus B4 RNA stock meegenomen. Als negatieve RT-PCR controle wordt 5µl RNase-vrij water gebruikt.

RNA-extractie

RNA-extractie uit cellen is uitgevoerd met behulp van de Qiagen Viral RNA Mini kit (Qiagen, Venlo).



RIVM

Rijksinstituut
voor Volksgezondheid
en Milieu

Postbus 1
3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl