



Kennisnotitie

Whole Genome Sequencing van hepatitis E virus: Optimalisatie van virus RNA extractie en WGS methodiek

Samenvatting

Door middel van genotypering kan meer inzicht worden verkregen in de rol van hepatitis E virus (HEV) bij vleesvarkens voor HEV infecties bij mensen. Voorliggende rapportage beschrijft de verschillende stappen in de optimalisatie van een methode voor het verkrijgen van de sequentie voor het hele HEV genoom. De activiteiten in 2022 hebben zich met name gefocust op de RNA extractie en het vergelijken van verschillende Whole Genome Sequencing (WGS) methoden. In 2023 is verder gewerkt aan de vergelijking van de geoptimaliseerde RIVM WGS methoden. Hieruit bleek de Shotgun Nextera methode betrouwbaarder tot het juiste subtype te komen, terwijl de amplicon-nanopore-based methoden bij lagere virusconcentraties een grotere kans gaven op een sequencing-resultaat. In 2024 zijn HEV positieve varkensmestmonsters uit 2019 gesequenced met een aangepaste RIVM amplicon-based WGS methode. Vergelijking met de gangbare typering op basis van één gen laat zien dat de WGS resultaten een hogere resolutie en sterkere clustering opleveren. Aangezien het voor alle monsters om HEV subtype 3c ging, is vervolgonderzoek nodig om te bepalen in hoeverre de amplicon-based methode ook geschikt is voor andere HEV subtypen. In de toekomst verwachten we met WGS methoden beter duiding te kunnen geven in situaties waarbij nauwe verwantschap wordt gevonden tussen HEV sequenties afkomstig van humane monsters en varkensmonsters.

Inleiding

Het doel van opdracht 9.2.06.N HEV bij vleesvarkens is inzicht verkrijgen op welke manier HEV bij vleesvarkens een rol speelt bij HEV infecties bij mensen. In 2019 was deze opdracht gericht op bepalen of, en zo ja welke, veranderingen in de epidemiologie van HEV bij vleesvarkens hebben plaatsgevonden in de periode dat de HEV incidentie bij de mens onverwacht steeg. Daarbij richtte het project zich op actuele prevalentie in slachtvarkens bij slachthuizen, en in varkensmest bij varkensbedrijven in verschillende jaren. In 2020 werd de focus verlegd naar identificeren of, en zo ja welke, typen HEV zowel bij mensen als varkens voorkomen. Daarnaast is in 2020 een start gemaakt met onderzoeken van de gevoeligheid van HEV voor omstandigheden en verwerkingsstappen die in de voedselketen kunnen vóórkomen (zoals vriezen, drogen, roken, verhitten, marinieren (pH), ontsmetten, vetrijke omgeving etc.). Dit vond o.a. plaats in combinatie met de kennisopdracht 9.2.08.D 'Viability HEV' en de kennisopdracht 9.5.1 Keten risicobeoordelingen. Ook is in 2020 een begin gemaakt met het sequencen door middel van WGS op gearcheiverde mestmonsters. Om bij het RIVM tot een geharmoniseerde methode te komen is gewerkt aan het optimaliseren van zowel de WGS voorbereidingsmethode als de sequencingmethode zelf, met als doel complete HEV genomen zo efficiënt mogelijk te kunnen sequencen in verschillende complexe matrices. Uiteindelijk blijft het waarschijnlijk nodig om voor verschillende matrices verschillende

RIVM

A. van Leeuwenhoeklaan 9
3721 MA Bilthoven
Postbus 1
3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl

T 088 689 89 89

Auteurs:

Rozemarijn van der Plaats,
Chesley van Buuren,
Saskia Rutjes,
Marieke Opsteegh

Centrum:

Cib-Z&O

Contact:

marieke.opsteegh@rivm.nl

Kenmerk:

KN-2025-0006

DOI:

10.21945/RIVM-KN-2025-0006

Datum:

27 januari 2025

voorbewerkingen en WGS methodes in te zetten en is het van belang te weten in hoeverre de verkregen sequenties (RIVM, WFSR e.a.) vergelijkbaar zijn. In voorliggende rapportage worden de verschillende stappen beschreven. De ontwikkelingen binnen WGS methodes gaan snel en om tot het beste protocol te komen, is gedurende de looptijd van dit project steeds rekening gehouden met nieuwe mogelijkheden (o.a. beschikbaarheid van nieuwe kits, selectie nieuwe primerpools IDS). Echter, dit betekent dat bijvoorbeeld niet alle stappen in het uiteindelijke protocol zijn meegenomen in de eerste vergelijkingen.

Vooropwerking en RNA extractie

De eerste fase van de optimalisatie van de WGS methode heeft zich gericht op het ontwikkelen van een efficiënte voorbereidingsmethode voor de typering van RNA-virussen met behulp van Next Generation Sequencing (NGS). Hiervoor zijn verschillende vergelijkingsexperimenten uitgevoerd waarin het effect van verschillende RNA-extractiemethoden, verschillende opzuiveringsstappen, en verschillende methoden om cDNA te synthetiseren werden vergeleken.

Voor de experimenten is gebruik gemaakt van afvalwatermonsters afkomstig van varkensboerderijen. Deze monsters werden voor ander onderzoek in 2019 genomen en positief getest voor HEV. Deze monsters zijn bewaard bij 4°C.

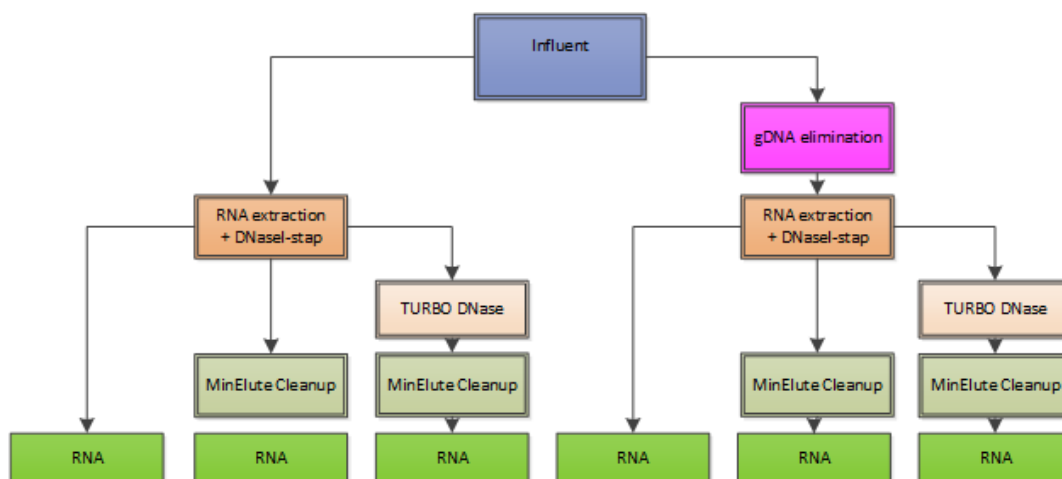
De volgende voorbereidingen zijn onderzocht en vergeleken:

- gDNA eliminatie kolommen
- RNA extractie kits
- DNase stap
- Opzuiveringskolommen
- Doormeten dsDNA
- RT-stap
- HEV qPCR om opbrengst HEV RNA te vergelijken o.b.v. Ct

In Figuur 1 is schematisch de vergelijking weergegeven die is gedaan voor de verschillende HEV RNA-extracties. De RNA-extractie werd uitgevoerd met en zonder gDNA eliminatie en met en zonder DNase behandeling op de kolom bij de Direct-zol RNA MiniPrep kit. Voor de eliminatie van gDNA werden twee verschillende gDNA eliminatiekolommen vergeleken, namelijk een gDNA kolom van New England Biolabs en een gDNA eliminatiekolom die aanwezig is in de RNeasy Plus Mini kit van Qiagen. Daarnaast werd het effect van de toevoeging van de zuivering met behulp van de MinElute Cleanup en de combinatie van de DNase-behandeling en de zuivering met behulp van de MinElute Cleanup vergeleken met een RNA-extractie zonder extra zuiveringsstappen.

Op basis van detectie van HEV RNA in het uiteindelijke extract met qPCR is het effect van de verschillende opzuiveringsstappen geëvalueerd, met de aanname dat de efficiëntie van de qPCR representatief is voor de efficiëntie van de WGS. Hieruit bleek dat de verschillen in Ct-waarden tussen het gebruik van de gDNA eliminatiekolom en het niet gebruiken van de gDNA eliminatiekolom klein is op basis van detectie met qPCR.

Figuur 1 Schematische weergave van de vergelijkingsexperimenten vooropwerking en RNA extractie HEV.



Om het effect van de DNase behandeling te bepalen zijn QuantiFluor dsDNA bepalingen uitgevoerd na de RNA-extractie en vóór de cDNA synthese. De resultaten van de QuantiFluor dsDNA bepaling laten zien dat wanneer er gebruik wordt gemaakt van de Direct-zol RNA MiniPrep (RNA extractie in Figuur 1) in combinatie met de DNaseI-behandeling de hoogste concentratie dsDNA in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ wordt gedetecteerd. Wanneer de MinElute Cleanup kit wordt toegevoegd aan de RNA-extractie wordt er een verlaging van de concentratie dsDNA gedetecteerd. Wanneer ook de TURBO-DNase-behandeling wordt toegevoegd aan de RNA-extractie wordt de laagste concentratie dsDNA in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ waargenomen.

Op de verschillende RNA extracten is een cDNA-synthese uitgevoerd met random hexameer primers, één specifieke primer of vijf specifieke primers. De resultaten van de qPCR laten zien dat wanneer er bij de cDNA-synthese gebruik is gemaakt van de random hexameer oligo de laagste Ct-waarden worden gedetecteerd, tot wel 4 - 6 Ct waardes lager. Het effect van de verschillende gDNA elimatiekolommen op de detectie van HEV cDNA met PCR was verwaarloosbaar. Echter, later verkregen resultaten met WGS laten toch een positief effect zien van de gDNA elimatiekolommen, dus is toch besloten deze in de procedure op te nemen.

Samenvattend kan gesteld worden dat de RNA-extractiemethode bestaande uit de gDNA-elimatiekolom van Qiagen of New England Biolabs, Direct-zol RNA MiniPrep met DNaseI-behandeling in combinatie met de TURBO-DNase en MinElute Cleanup het beste resultaat geeft. Door deze methodecombinatie uit te voeren wordt de grootste afname van de dubbelstrengs DNA-concentratie bereikt met een minimaal effect op de Ct-waarde voor detectie van HEV. Hierbij is nog niet getest of deze qPCR resultaten representatief zijn voor WGS.

Whole Genome Sequencing (WGS)

Onderstaand overzicht geeft weer wat er aan informatie over WGS voor HEV beschikbaar is:

- 1) HEV Nanopore amplicon-gebaseerde WGS (RIVM_IDS methode), waarbij primers zo ontwikkeld zijn dat met 10 overlappende primersets het genoom gedekt kan worden. Primers zijn ontwikkeld voor detectie van HEV3c.
- 2) HEV Long amplicons (Nicot et al, Diversity of hepatitis E virus genotype 3. 2018), amplicon gebaseerde WGS voor HEV, waarbij 2 lange deels overlappende fragmenten worden gegenereerd, van 4200 en 4500 nt. Analyse gebeurt op een PacBio.
- 3) Sequence Independent Single Primer Amplification (SISPA), resulterend in gefragmenteerde amplicons van RNA virussen met een lengte van 500 – 1000 nt (Djikeng et al, Viral genome sequencing by random priming methods. 2008).
- 4) Nextera XT Illumina Sequencing, resulterend in shot-gun sequencing van DNA. In combinatie met de boven beschreven opwerking inclusief DNase stap en met random hexameer primers voor cDNA synthese komt dat neer op shot-gun sequencing van ds-cDNA voor alle aanwezige RNA virussen. De sequentie analyse wordt hiervoor uitgevoerd op de MiSeq van Illumina.
- 5) HEV Nanopore amplicon-gebaseerde WGS (een van de WFSR_methoden), waarbij op basis van 9 primersets het hele genoom gedekt kan worden (obv HEV3 referentiegenomen (Smith et al. 2016)).

Ter vergelijking, het hele genoom van HEV is ± 7250 bp terwijl het ORF2 fragment dat wordt gebruikt voor HEV typering op basis van Sanger sequencing een lengte heeft van 493 bp (primer positie forward "6,298–6,321" en reverse "6,494–6,470").

De verschillende WGS methoden zijn uitgevoerd om een voorselectie te kunnen maken van geschikte methoden voor de vergelijking. Hieronder volgen de resultaten van deze experimenten.

De enige methode waar een vergelijkbare aanpak was tussen RIVM en WFSR zijn de methoden genoemd onder 1) en 5).

- 1) Specifieke primers zijn ontwikkeld voor detectie van HEV-3c, wat voor het doel van typering van HEV uit varkens minder ideaal is, omdat varkens ook andere strains bij zich dragen dan HEV-3c. Om de verwante subtypes ook te kunnen sequencen zijn extra primers ontwikkeld, waardoor ook varianten anders dan 3c gesequenced kunnen worden.
Tijdens het uitvoeren van het experiment bleken naast de 10 te verwachten producten op basis van de 10 primersets ook andere producten te ontstaan, zowel grotere als kleinere fragmenten. Hoewel niet ideaal, voor een deel van deze andere fragmenten gaat het nog steeds om HEV amplicons die gebruikt kunnen worden in de data analyse. De methode moet nog verder gevalideerd worden om de gevoeligheid te bepalen. In deze eerste experimenten is de methode getest met kweeksup, een makkelijke matrix met relatief hoge concentraties HEV. Verder is niet duidelijk of alle subtypes (ook binnen 3c) gesequenced kunnen worden met de ontworpen primersets, of dat verdere aanpassing nodig is.
- 2) Met de HEV Long amplicon WGS (Nicot et al., Diversity of hepatitis E virus genotype 3. 2018) is een experiment uitgevoerd, waarbij twee lange fragmenten geamplificeerd zouden moeten worden van 4500 nt en 4200 nt. Er werden echter enkel diverse kleinere fragmenten van <1000 nt geamplificeerd. Deze methode is op kweeksup getest, gaf niet het gewenste resultaat en is niet verder meegenomen in de vergelijking.

- 3) De Sequence Independent Single Primer Amplification (SISPA) methode (Djikeng et al., Viral genome sequencing by random priming methods. 2008), resulteerde niet in de gewenste fragment grootte. In plaats van de PacBio is de sequencing methode uitgevoerd op de MiSeq van Illumina. Bij de data analyse werd geen volledig HEV genoom waargenomen. Mogelijk dat een optimalisatie bij de cDNA opwerking de resultaten kan verbeteren, want deze resultaten zijn verkregen uit een eenmalige test. Echter, deze methode is niet meegenomen in de verdere vergelijking.
- 4) De shot-gun Nextera XT methode wordt al langer gebruikt voor andere metagenomic projecten. De methode is getest op drie verschillende kweeksup (3c/3c/3f-like). Bij de uitvoering wordt al het aanwezige RNA gesequenced en een bepaald percentage resulteerde in een volledige dekking van het HEV genoom. Deze methode is daarom veelbelovend en meegenomen in de vergelijking.
- 5) De WFSR methode met overlappende amplicon PCR fragmenten bestaat uit 9 stuk fragmenten die gezamenlijk het HEV-3 genoom dekken, die na amplificatie afgelezen worden m.b.v. Minlon en geanalyseerd in een in-house ontwikkelde pipeline. QIAamp viral RNA kit (Qiagen) wordt gebruikt om RNA te extraheren uit supernatant van 10% (w/v) varkensmest. Hexameren worden gebruikt voor de cDNA synthese.

Vergelijking van de verschillende WGS methoden

Uit de initiële experimenten met de WGS methoden kwam de shot-gun Nextera XT methode als beste naar voren. Ook de amplicon-gebaseerde methode voor HEV-3c lijkt veelbelovend. Hiervoor moet echter nog wel worden vastgesteld in hoeverre de andere HEV-3 varianten worden gedetecteerd. De WFSR methode is ontwikkeld voor detectie van alle HEV-3 varianten, waarmee ook deze methode een goed alternatief zou kunnen zijn voor WGS van HEV in varkensmest en varkensvleesproducten. Om verder te komen met de selectie van de beste WGS-methode zijn de volgende stappen uitgevoerd:

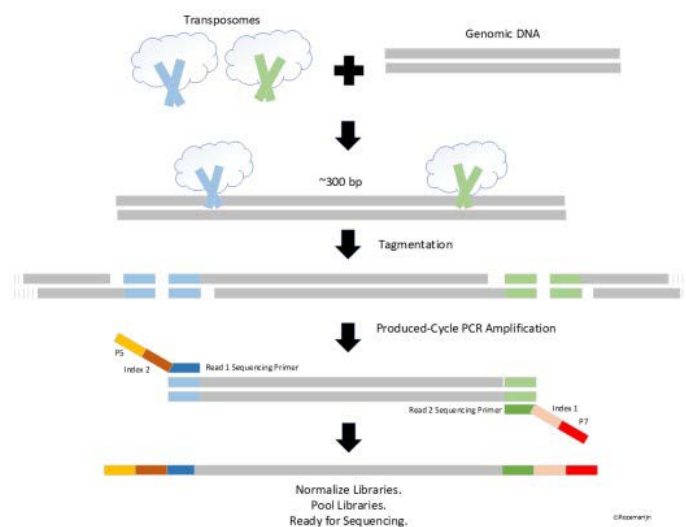
- 1) In silico analyse van de HEV-3c primers (IDS_2023) heeft ertoe geleid dat er een tweede primerpool is ontworpen. De amplicon-gebaseerde IDS_2022 en IDS_2023 HEV-3c WGS methode verschillen in gebruikte primerpools. Beide methoden zijn vergeleken om te zien welke primerpools tot de beste subtypering van HEV-3 varianten leidde.
- 2) De Nextera XT WGS methode is vergeleken met de twee amplicon based HEV WGS methoden (ontwikkeld bij WFSR en ontwikkeld bij IDS). De vergelijking is gedaan met kweeksup van drie verschillende HEV varianten in verschillende concentraties.

Met deze vergelijking is dus een Illumina-gebaseerde methode vergeleken met twee Nanopore-gebaseerde methoden. Nanopore sequencing heeft een hogere fouten marge dan Illumina waardoor de data analyse van verschillende subtypes lastiger kan zijn.

Figuur 2 Schematische weergave van de HEV WGS vergelijking die is uitgevoerd om te bepalen welke methode het meest geschikt is voor WGS van HEV-3. Hierbij is de RIVM_IDS methode uitgevoerd met 2 verschillende primer pools (IDS_2022 en IDS_2023). Voor primersequenties, zie bijlage 2.

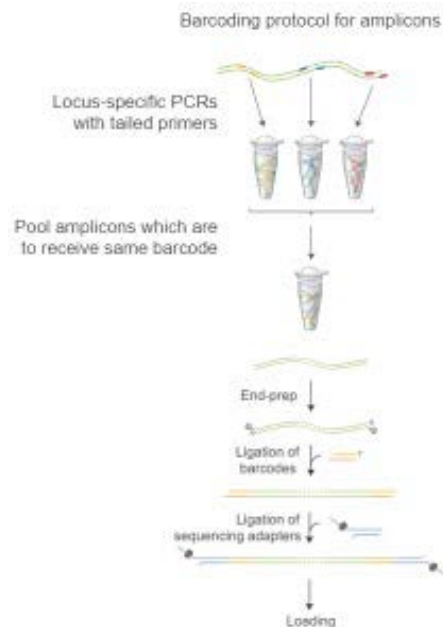
Shotgun WGS

NexteraXT

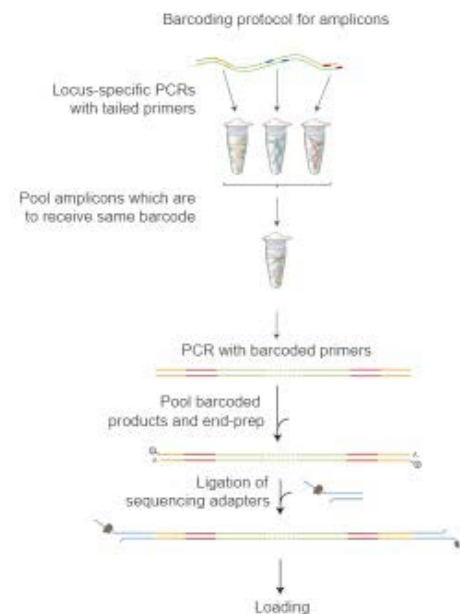


Amplicon WGS

RIVM - IDS



WFSR



Resultaten van de vergelijking

Voor de vergelijking zijn een HEV-positief mestmonster (3c) en drie kweeksupps gekozen, een 3c, 3e en een 3f-like variant. Om een goede vergelijking mogelijk te maken zijn zowel hoge als lage concentraties meegenomen, variërend van Ct 24 tot Ct 41, zodat niet alleen een vergelijking kon worden gedaan op specificiteit, maar ook op gevoeligheid van de methode.

Uit de analyse van de gegenereerde Nextera XT WGS data bleek dat betrouwbaar een subtype bepaald kon worden. Hierbij was een detectielimiet van rond Ct 28 waar te nemen. Bij een input met een Ct waarde hoger dan 28 was de coverage van het HEV genoom niet altijd voldoende om een typering te kunnen doen. Doordat de Nextera XT een WGS methode zonder specifieke amplificatie is, kwam slechts een klein percentage reads van het totale aantal reads overeen met het HEV genoom.

Voor het IDS WGS protocol zijn twee verschillende primerpool combinaties ontwikkeld, HEV-3c IDS_2022 en HEV-3c IDS_2023, die onderling vergeleken zijn. Bij de IDS_2023 primerpools is bij het eerste en het laatste amplicon een aantal nucleotiden aan de primers aangepast ten opzichte van de IDS_2022 primers (zie Bijlage 1). Uit deze vergelijking bleek dat de resultaten verkregen met de beide primerpools nauwelijks van elkaar verschilden. De typering van de 3e en 3f-like samples kwam niet overeen met de verwachte referentie genomen. De methode lijkt dus HEV-3c goed te kunnen typeren, maar lijkt niet geschikt voor 3e en 3f-like. Omdat de primerpools zijn ontworpen voor HEV-3c, is dit resultaat niet onverwacht. De detectie is gevoeliger (Ct 33-34) dan die gevonden met de Nextera XT WGS (Ct 28). Toch kon niet voor alle HEV-3c concentraties een subtype bepaald worden.

De amplicon HEV WGS gebaseerde methode van WFSR, die ontworpen is om alle HEV-3 varianten te kunnen detecteren is net als de amplicon RIVM-IDS_2022 en 2023 WGS methode een goede methode voor HEV-3c, maar minder goed voor subtypes 3e en 3f-like. In onze vergelijking is de detectie gevoeliger ($\leq$ Ct 37) dan de RIVM-IDS amplicon gebaseerde methode, maar kunnen verschillende subtypes niet goed worden onderscheiden.

De Nextera XT WGS methode is ondanks de slechtere detectie ($\leq$ Ct 28) een betrouwbare typeringsmethode. Als typeringsresultaten worden verkregen dan zijn deze vrijwel altijd van het juiste subtype.

Uit een vergelijking van de coverage van het HEV genoom bij de drie verschillende methoden bleek dat de coverage bij de Nextera XT WGS methode hoger was dan bij de amplicon gebaseerde Nanopore methoden van IDS en WFSR. Hoewel vanwege de amplificatiestap, en daarmee theoretisch hogere gevoeligheid, een hogere coverage werd verwacht, bleek dit dus niet het geval.

Sequenzen van mestmonsters

Vanwege de verwachting dat Ct waarden vaak hoog zijn in te onderzoeken mestmonsters, en de nieuwste ontwikkelingen in de amplicon gebaseerde IDS WGS methode, is gekozen om de mestmonsters te sequencen met de amplicon gebaseerde HEV-3c IDS WGS methode. Voortschrijdend inzicht heeft geleid tot opnieuw een aantal aanpassingen in de HEV-3c IDS primerpools, deze zijn getest en doorgevoerd in het protocol (HEV-3c IDS_2024, zie bijlage 1).

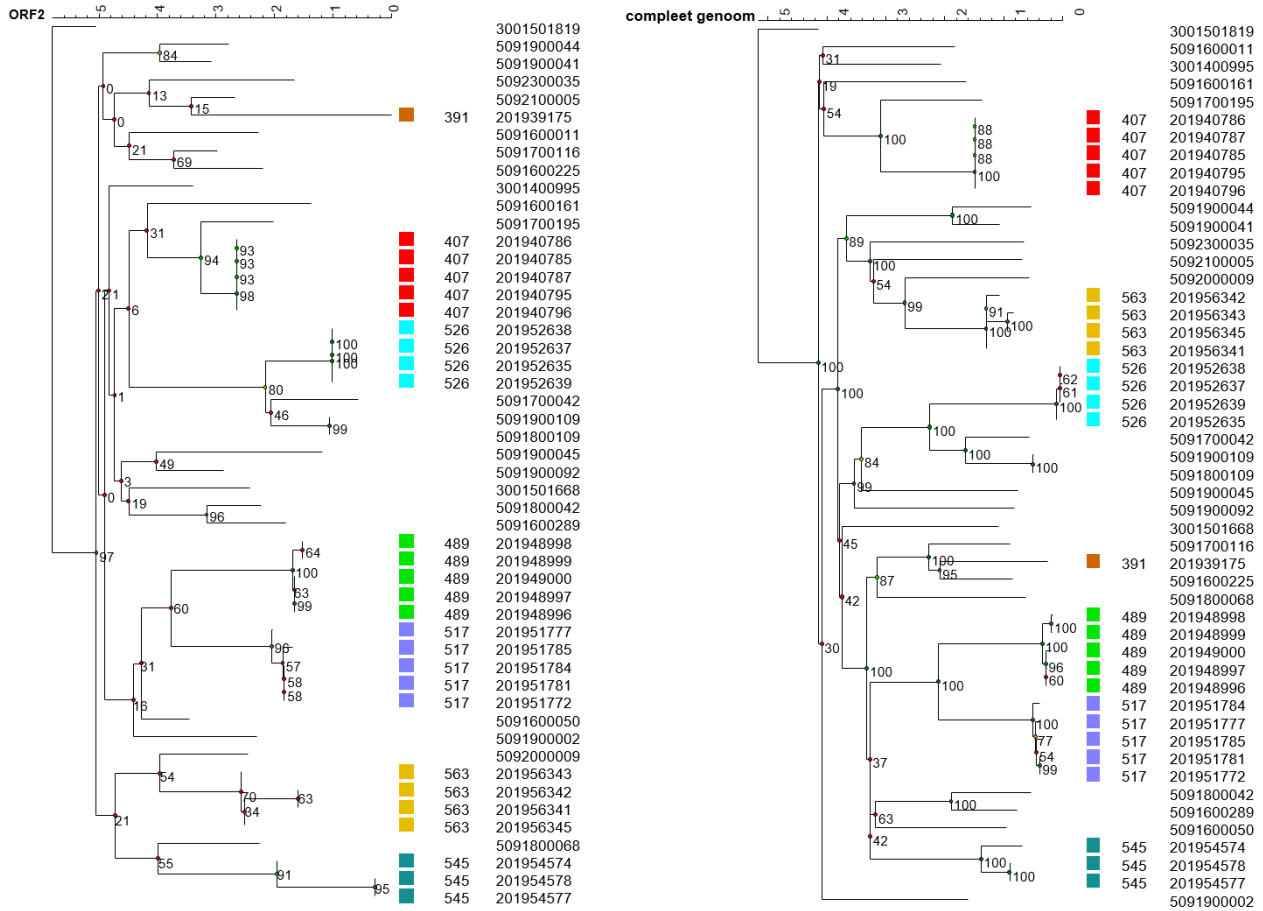
Vervolgens zijn eerst 7 gepoolde mestmonsters met de laagste Ct geselecteerd, en daarvoor zijn de bijbehorende 35 mestmonsters (5 per bedrijf) met HEV qPCR getest

(bijlage 2). De RNA extractie is uitgevoerd zoals in Fig. 1 zonder gDNA eliminatie en zonder TURBO DNase stap. Van deze 35 mestmonsters waren er 27 positief in de HEV RT-qPCR. Alle 27 positieve mest samples zijn geselecteerd voor sequencing, ongeacht de gedetecteerde Ct waarden (range 29-37). Voorafgaande aan het sequencen is een extra clean-up van het RNA extract uitgevoerd met de RNA Clean & Concentrator kit (Zymo Research) en zijn de samples geconcentreerd door te elueren in een lager volume (8 µl). Hierna is het gehele volume gebruikt voor de cDNA reactie en het inzetten van de amplicon sequencing methode.

Uit de resultaten bleek dat de coverage van het HEV genoom een stuk beter was dan de eerdere verkregen resultaten met de oude primerpools, waardoor voor de meeste mestmonsters het subtype bepaald kon worden. Bij twee van de 27 samples kon geen subtype bepaald worden doordat de coverage van het HEV genoom te laag is. Hoewel deze resultaten veelbelovend zijn, is van de IDS_2024 amplicon gebaseerde methode niet bekend wat de detectielimiet is. Daarbij is de methode ontwikkeld voor HEV-3c waardoor andere subtypes nog steeds gemist kunnen worden in samples met meerdere of andere HEV varianten. Ook is niet bekend of met de nieuwe amplicon gebaseerde WGS methode ander subtypes onterecht als 3c kunnen worden getypeerd. Hiervoor zal de eerder gedane vergelijking met kweeksup's van verschillende HEV-3 varianten in verschillende concentraties herhaald moeten worden met de HEV-3c IDS 2024 WGS methode.

Om te bepalen wat de toegevoegde waarde is van WGS ten opzichte van ORF2 sequencing zijn de isolaten vergeleken op basis van de complete data en wanneer alleen de ORF2 sequentie hieruit werd geselecteerd (Fig. 3). De bootstrap waardes per aftakking zijn berekend door 100x een willekeurige steekproef uit de data te nemen en te kijken hoe vaak in alle steekproeven dezelfde vertakking gevonden wordt. Dat de waarden i.h.a. hoger zijn op basis van complete genomen laat zien dat deze clustering een betere significantie heeft dan met alleen ORF2. Bijvoorbeeld voor het groene en het paarse cluster, daarbij is de laatste vertakking voor de clusters voor ORF2 slechts 60% terwijl dit bij compleet genoom 100% is. De onderlinge afstanden zijn vergelijkbaar maar de clustering is sterker, zelfs als door de hogere resolutie de verschillen binnen een cluster groter zijn. Ondanks dat er nu geen gevallen zijn waarbij je tot een andere clustering komt met beide methoden, verwachten we dat dit relevant is wanneer de afstanden tussen clusters kleiner zijn. In het vervolg verwachten we dat dit ook betere duiding zal geven van situaties waarbij nauwe verwantschap wordt gevonden tussen HEV sequenties afkomstig van humane monsters aan de ene kant en varkensmonsters aan de andere kant.

Figuur 3 Vergelijking van HEV sequenties uit varkensmest o.b.v. ORF2 (selectie uit WGS data) en compleet genoom (neighbour joining trees met bootstrapwaardes). Isolaten met hetzelfde kleurlabel komen van hetzelfde varkensbedrijf.



Dankwoord

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit in het kader van opdracht 9.2.06.N HEV bij vleesvarkens.

De vergelijking van de verschillende methoden was niet mogelijk geweest zonder de hulp van onze collega's bij RIVM-IDS en WFSR. Wij danken Harry Vennema (RIVM), Bas van der Veer (RIVM), Ingeborg Boxman (WFSR) en René Dirks (WFSR) voor het delen van informatie en de nuttige discussies. Daarnaast bedanken we Bas van der Veer (RIVM) voor de ondersteuning bij de werkzaamheden.

Bijlage 1: Primersequenties amplicon-gebaseerde WGS methoden*Tabel 1 RIVM primersequenties voor de amplicon-gebaseerde HEV WGS-methode in 2022*

Set	Forward primer name	Forward primer seq.	Reverse primer name	Reverse primer seq.	Amplicon length (~bp)
1	hev3ciqtruv_01_LEFT_1_0032	atgtggtcgaatgccatggag	hev3ciqtruv_01_RIGHT_1_0927	gagcaagctgacgggaaca	~907 - 908
			hev3ciqtruv_01_RIGHT_1a_0928	gtagagcaagctgacgggaa	
2	hev3ciqtruv_02_LEFT_2_0796	tggtgatagagcgtgtgag	hev3ciqtruv_02_RIGHT_2_1623	tgtgggatgttaagcgccc	~827
	hev3ciqtruv_02_LEFT_2a_0796	tggtgatagagcgtgtacg	hev3ciqtruv_02_RIGHT_2a_1623	tgtgggatgttaagtgcgc	
3	hev3ciqtruv_03_LEFT_1_1396	ttgatgagtcagtgccctgc	hev3ciqtruv_03_RIGHT_1_2221	tcactaacagggggtgtggg	~825 - 830
	hev3ciqtruv_03_LEFT_1a_1395	ctttgatgagtcagtgccctg	hev3ciqtruv_03_RIGHT_1a_2225	aacgtcactaacagggggtgt	
	hev3ciqtruv_03_LEFT_1b_1395	ctttgatgagtcagtgccctg	hev3ciqtruv_03_RIGHT_1b_2225	gacgtcactagcggggggcgt	
4	hev3ciqtruv_04_LEFT_2_1989	tgcagcgccctttacaggta	hev3ciqtruv_04_RIGHT_2_2858	gtgcgggctgtatcctcagt	~869
	hev3ciqtruv_04_LEFT_2a_1989	ctgcagcgccctttataggta	hev3ciqtruv_04_RIGHT_2a_2858	gtgcgggctgtgtcctctgt	
5	hev3ciqtruv_05_LEFT_1_2709	accgccgcctatccact	hev3ciqtruv_05_RIGHT_1_3578	acttctctgtgtggcggt	~869
	hev3ciqtruv_05_LEFT_1a_2709	accgccgcttacccact	hev3ciqtruv_05_RIGHT_1a_3578	acttctccgtgtggcgagt	
	hev3ciqtruv_05_LEFT_1b_2709	accgccgcttacccgct	hev3ciqtruv_07_RIGHT_1_5151	gtgatcccatgggcaatgca	
6	hev3ciqtruv_06_LEFT_2_3488	acagtccatgaggccagg	hev3ciqtruv_06_RIGHT_2_4361	gactcctcatatgcgtcgcc	~873 - 902
	hev3ciqtruv_06_LEFT_2a_3488	acagtccatgaggccaag	hev3ciqtruv_06_RIGHT_2a_4361	agactcctcatatgcgtcacc	
	hev3ciqtruv_06_LEFT_2b_3459	cgctaaggccgccaaccc	hev3ciqtruv_06_RIGHT_2b_4361	agactcctcataagcatcgcc	
	hev3ciqtruv_06_LEFT_2c_3459	cgctaaggctgctaaccc			
7	hev3ciqtruv_07_LEFT_1_4290	tggagcaagaccttctgtgc	hev3ciqtruv_07_RIGHT_1a_5151	gtgatcccaggggcaatgca	~861
	hev3ciqtruv_07_LEFT_1a_4290	tggagcaagaccttttgtgc			
8	hev3ciqtruv_08_LEFT_2_5088	gccactttacagagactgt	hev3ciqtruv_08_RIGHT_2_5913	cgatagtggaggcgctcact	~825
	hev3ciqtruv_08_LEFT_2a_5088	gccatttcacagagactgt	hev3ciqtruv_08_RIGHT_2a_5913	cgatagtggagacgctcact	
			hev3ciqtruv_08_RIGHT_2b_5913	cgatagtggaggcgctcgct	
9	hev3ciqtruv_09_LEFT_1_5779	tggtgccgaatgctgtcgg	hev3ciqtruv_09_RIGHT_1_6630	tacatcgggttggtggacga	~851 - 854
	hev3ciqtruv_09_LEFT_1a_5776	cgttggtgccgaatgctgt	hev3ciqtruv_09_RIGHT_1a_6630	tacatcgggttggtggatga	
			hev3ciqtruv_09_RIGHT_1b_6630	tacatcgggttggttagacga	

Set	Forward primer name	Forward primer seq.	Reverse primer name	Reverse primer seq.	Amplicon length (~bp)
10	hev3ciqtruv_10_LEFT_2_6211	cttaccaccacagcagccac	hev3ciqtruv_10_RIGHT_2_7104	ttaaggcgctgaagctctgc	~893 - 1002
	hev3ciqtruv_10_LEFT_2a_6211	cttaccaccacagcggccac	hev3ciqtruv_10_RIGHT_2a_7104	tttaagacgctgaagctcagc	
	hev3ciqtruv_10_LEFT_2b_6211	cttaccaccacagctgccac			
	hev3ciqtruv_10_LEFT_2c_6211	cttaccaccacagctgctac			

Tabel 2 RIVM primersequenties voor de amplicon-gebaseerde HEV WGS-methode in 2023

Set	Forward primer name	Forward primer seq.	Reverse primer name	Reverse primer seq.	Amplicon length (~bp)
1	hev3ciqtruv_01_LEFT_1a_0020	gcagaccacgtatgtggtcg	hev3ciqtruv_01_RIGHT_1a_0928	gtagagcaagctgacgggaa	~907 - 908
	hev3ciqtruv_01_RIGHT_1_0927	gagcaagctgacgggaaca			
2	hev3ciqtruv_02_LEFT_2_0796	tggatgatagagcgtgtgcg	hev3ciqtruv_02_RIGHT_2_1623	tgtgggatgttaagcgccc	~827
	hev3ciqtruv_02_LEFT_2a_0796	tggatgatagagcgtgtacg	hev3ciqtruv_02_RIGHT_2a_1623	tgtgggatgttaagtgcc	
3	hev3ciqtruv_03_LEFT_1_1396	ttgatgagtcagtgccctgc	hev3ciqtruv_03_RIGHT_1_2221	tcactaacaggggtgtggg	~825 - 830
	hev3ciqtruv_03_LEFT_1a_1395	ctttgatgagtcagtgccctg	hev3ciqtruv_03_RIGHT_1a_2225	aacgtcactaacaggggtgt	
	hev3ciqtruv_03_LEFT_1b_1395	ctttgatgagtcagtgccctg	hev3ciqtruv_03_RIGHT_1b_2225	gacgtcactagcggggggcgt	
4	hev3ciqtruv_04_LEFT_2_1989	tgcagcgccctttacaggta	hev3ciqtruv_04_RIGHT_2_2858	gtgcgggctgtatcctcagt	~869
	hev3ciqtruv_04_LEFT_2a_1989	ctgcagcgccctttataggta	hev3ciqtruv_04_RIGHT_2a_2858	gtgcgggctgtgtcctctgt	
5	hev3ciqtruv_05_LEFT_1_2709	accgccgcctatccact	hev3ciqtruv_05_RIGHT_1_3578	acttctctgtgtggcggt	~869
	hev3ciqtruv_05_LEFT_1a_2709	accgccgcttaccact	hev3ciqtruv_05_RIGHT_1a_3578	acttctccgtgtggcgagt	
	hev3ciqtruv_05_LEFT_1b_2709	accgccgcttaccgct			
6	hev3ciqtruv_06_LEFT_2_3488	acagtccatgaggccagg	hev3ciqtruv_06_RIGHT_2_4361	gactcctcatatgcgtcgcc	~873 - 902
	hev3ciqtruv_06_LEFT_2a_3488	acagtccatgaggccaag	hev3ciqtruv_06_RIGHT_2a_4361	agactcctcatatgcgtcacc	
	hev3ciqtruv_06_LEFT_2b_3459	cgctaaggccgccaaccc	hev3ciqtruv_06_RIGHT_2b_4361	agactcctcataagcatcgcc	
	hev3ciqtruv_06_LEFT_2c_3459	cgctaaggctgctaaccc			
7	hev3ciqtruv_07_LEFT_1_4290	tggagcaagaccttctgtgc	hev3ciqtruv_07_RIGHT_1_5151	gtgatcccatgggcaatgca	~861
	hev3ciqtruv_07_LEFT_1a_4290	tggagcaagaccttttgtgc	hev3ciqtruv_07_RIGHT_1a_5151	gtgatcccaggggcaatgca	
8	hev3ciqtruv_08_LEFT_2_5088	gccactttacagagactgt	hev3ciqtruv_08_RIGHT_2_5913	cgatagtggaggcgctcact	~825

Set	Forward primer name	Forward primer seq.	Reverse primer name	Reverse primer seq.	Amplicon length (~bp)
	hev3ciqtruv_08_LEFT_2a_5088	gcccatttcacagagactgt	hev3ciqtruv_08_RIGHT_2a_5913	cgatagtggagacgctcact	
			hev3ciqtruv_08_RIGHT_2b_5913	cgatagtggaggcgctcgct	
9	hev3ciqtruv_09_LEFT_1_5779	tggtgccgaatgctgtcgg	hev3ciqtruv_09_RIGHT_1_6630	tacatcgggttggtggacga	~851 - 854
	hev3ciqtruv_09_LEFT_1a_5776	cgttggtgccgaatgctgt	hev3ciqtruv_09_RIGHT_1a_6630	tacatcgggttggtggatga	
			hev3ciqtruv_09_RIGHT_1b_6630	tacatcgggttggttagacga	
10	hev3ciqtruv_10_LEFT_2_6211	cttaccaccacagcagccac	hev3ciqtruv_10_RIGHT_2_7104	ttaaggcgctgaagctctgc	~893 - 1002
	hev3ciqtruv_10_LEFT_2a_6211	cttaccaccacagcgccac	hev3ciqtruv_10_RIGHT_2c_7213	tccagggagcgcgaaaccgcag	
	hev3ciqtruv_10_LEFT_2b_6211	cttaccaccacagctgccac	hev3ciqtruv_10_RIGHT_2d_7213	tccagggagcgcgaaacgcag	
	hev3ciqtruv_10_LEFT_2c_6211	cttaccaccacagctgctac	hev3ciqtruv_10_RIGHT_2e_7213	tccagggagcgcgagagcag	

Tabel 3 RIVM primersequenties voor de amplicon-gebaseerde HEV WGS-methode in 2024

Primer name	Primer sequence	Amplicon length (~bp)
HEV3c 36-30_1_L_1	cacgtatgtggtcgatgcca	~795
HEV3c 36-30_2_R_2	cagactcatcaaaaacaagcaccc	~803
HEV3c 36-30_3_L_1	aggacgctcttaccgctgt	~804
HEV3c 36-30_4_R_2	cgcataatgaactcagttgggtg	~818
HEV3c 36-30_5_L_1	gcgggggtcactgtttgagtc	~793
HEV3c 36-30_6_R_2	tgtcgcgaggttctggtca	~795
HEV3c 36-30_7_L_1	agggcgccactttcacg	~778
HEV3c 36-30_8_R_2	cagggccccagttcttctca	~798
HEV3c 36-30_9_L_1	gtttggaatatggcgatcatagcac	~799
HEV3c 36-30_10_R_2	cacgggtgttggtgttccc	~819
HEV3c 36-30_11_L_1	gctacgatccgttacaggcc	~830
HEV3c 36-30_12_R_2	gcaaagctatgaagggggca	~818

Bijlage 2: Geselecteerde mestmonsters varkensbedrijven

Voor de validatie zijn varkensmestmonsters uit de HEV bedrijvenstudie in 2019 geselecteerd. Door de NVWA werden 5 gepoolde mestmonsters van 12 schepjes mest per bedrijf genomen en bij WFSR is 1 mengmonster van deze 5 monsters per bedrijf met HEV RT-qPCR getest. Hieruit zijn de monsters met Ct < 28 geselecteerd en de vijf individuele mestmonsters opgezocht.

Tabel 4 Ct-waarden in HEV RT-qPCR en WGS typeringsresultaat voor geselecteerde mestmonsters van vleesvarkensbedrijven in 2019

Mengmest	Ct	Samples	Ct onverdund	Ct 10x verdund	Typering
201939178	26,81/26,53	201939173			
		201939174			
		201939175	33,28	35,24	3c
		201939176			
		201939177			
201940788	24,38/24,43	201940785	31,49	34,64	3c
		201940786	32,43	34,68	3c
		201940787	37,74	39,09	NT
		201940795	29,89	33,19	3c
		201940796	29,67	33,36	3c
201949001	24,28/23,79	201948996	30,75	33,00	3c
		201948997	32,20	34,84	3c
		201948998	32,31	34,18	3c
		201948999	30,67	33,49	3c
		201949000	29,17	31,73	3c
201951786	25,78/25,06	201951772	28,58	31,13	3c
		201951777	28,03	30,71	3c
		201951781	28,26	31,70	3c
		201951784	34,31		3c
		201951785	30,58	33,26	3c
201952640	26,38/26,29	201952635	28,96	32,30	3c
		201952636			
		201952637	32,95	36,30	NT
		201952638	28,67	32,67	3c
		201952639	29,64	32,69	3c
201954579	27,75/28,03	201954574	25,75	28,55	3c
		201954575			
		201954576			
		201954577	33,73		3c
		201954578	29,69	31,85	3c
201956346	24,35/24,31	201956341	35,03	37,72	3c
		201956342	35,25	42,44	3c
		201956343	33,97	39,17	3c
		201956344			
		201956345	27,71	30,57	3c