



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Vergelijking van methoden voor detectie en typering van virussen in voedsel

Hepatitis A-virus en rotavirus

RIVM rapport 330371006/2012

S.A. Rutjes | F. Lodder-Verschoor |

A.M. de Roda Husman



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Vergelijking van methoden voor detectie en typering van virussen in voedsel

Hepatitis A-virus en rotavirus

RIVM Rapport 330371006/2012

Colofon

© RIVM 2012

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'.

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

Contact:
Saskia Rutjes
Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie
saskia.rutjes@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit, in het kader van Project V/330371/01/VV 'Virussen in voedsel'

Rapport in het kort

Vergelijking van methoden voor detectie en typering van virussen in voedsel

Hepatitis A-virus en rotavirus

Voedseloverdraagbare virussen kunnen vooral worden overgedragen via voedsel dat niet of nauwelijks is verhit. Voorbeelden zijn schelpdieren, verse groente en fruit en kant-en-klare producten, zoals belegde broodjes en salades. Om de bron van een voedselinfectie te kunnen achterhalen wordt onderzocht of op het voedsel en in de patiënt hetzelfde virus aanwezig is. Tot nu toe werd hiervoor bij de patiënt een ander stukje van het genetisch materiaal van het virus aangetoond dan bij het virus dat aanwezig is op voedsel of in water. Door deze werkwijze was het niet mogelijk om de aangetroffen virussen te vergelijken, waardoor de besmettingsbron niet kon worden vastgesteld. Uit onderzoek van het RIVM blijkt nu dat zowel voor hepatitis A-virus als voor rotavirus één stukje genetisch materiaal kan worden aangetoond in de drie soorten monsters. Dit maakt het eenvoudiger om de bronnen van voedselgerelateerde virusinfecties te achterhalen.

Voor het onderzoek zijn de verschillende methoden vergeleken die momenteel worden gebruikt om de bronnen van voedseloverdraagbare virusinfecties op te sporen. Virusonderzoek wordt vaak gedaan met de moleculaire techniek PCR (polymerase chain reaction), waarmee een deel van het genetisch materiaal van een virus wordt aangetoond. Er zijn verschillende PCR's beschikbaar waarmee verschillende delen van het genetisch materiaal worden gedetecteerd. Vaak wordt eerst aangetoond of en welk virus aanwezig is (detectie). Vervolgens wordt bepaald om welk type virus het gaat (typering). Voor het onderliggende onderzoek zijn van twee virussen, hepatitis A-virus en rotavirus, meerdere detectie- en typerings-PCR's vergeleken. Voor beide virussen is bepaald welk stukje genetisch materiaal het best met PCR kan worden aangetoond om het in de mens, op voedsel en in water te kunnen detecteren. Daarnaast is bekeken welk stukje genetisch materiaal het meest geschikt is om het type virus vast te stellen (typerings-PCR).

Voor beide virussen bleek dat de detectie-PCR kleinere hoeveelheden virus kan aantonen dan de typerings-PCR. Hierdoor is het mogelijk dat bij een 'lage' besmetting van het voedsel wel kan worden aangetoond dat een bepaald virus aanwezig is, maar niet kan worden bepaald om welk type virus het gaat. Dit betekent dat mogelijk niet zeker kan worden gesteld of het virus in de patiënt identiek is aan het virus op het voedsel. Dan blijft het onduidelijk of het verdachte voedsel ook daadwerkelijk de bron is. Aanbevolen wordt de methoden om virussen in voedsel aan te tonen en te typeren, te verbeteren.

Trefwoorden

Hepatitis A-virus, Rotavirus, Voedseloverdraagbare virusinfecties, Bronopsporing, Harmonisatie

Abstract

Comparison of methods for detection and typing of viruses in food

Hepatitis A virus and rotavirus

Foodborne viruses can be transmitted through the consumption of food that has had little or no treatment, such as shellfish, fresh produce and ready-to-eat food products. To be able to trace the source of a foodborne virus infection, viruses present in the food and in the patient have to be compared. Currently, a different part of the viral genome is detected in patients than in food and water samples, indicating that viruses cannot be compared and the source not established. Research by the National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) has now determined which part of the viral genome of hepatitis A virus and rotavirus can be detected in all three sample types. This will facilitate the tracing of the source of foodborne virus infections.

Several methods that are currently used for the tracing of viruses involved in foodborne infections were compared. Virus research is often done by the molecular technique PCR (polymerase chain reaction), which detects part of the genetic material of the virus. Several PCRs are available that target different parts of the viral genome. Generally, the presence of a virus in a suspected food item is determined by a detection PCR, after which the identity of the virus is established by a typing PCR. In the present study, several detection and typing PCRs specific for hepatitis A virus and rotavirus were compared. For both viruses it was determined which part of the viral genome was most efficiently detected in patients, food and water samples. Furthermore, the study showed which part of the viral genome was most suitable for typing the virus in the three different sample types.

For both viruses, the detection PCR appeared to be more sensitive than the typing PCR, indicating that at low levels of contamination viruses may be detected, but cannot be typed. This means that viruses detected in the patient and in a suspected food product cannot always be conclusively determined as identical. If this is the case, then it remains unclear whether the patient contracted the infection through consumption of the suspected food product. It is recommended to optimize virus detection and typing methods in food.

Keywords

Hepatitis A virus, Rotavirus, Foodborne virus infections, Source tracking, Harmonization

Inhoud

Samenvatting—7

1 Inleiding—9

2 Materiaal en methoden—13

- 2.1 Virus en matrices—13
- 2.2 Detectie van HAV—13
- 2.3 Typering van HAV—13
- 2.4 Detectie van RV—13
- 2.5 Typering van RV—15
- 2.6 RNA-isolatie uit verschillende artificieel besmette matrices—15
- 2.7 RNA-isolatie uit natuurlijk besmette monsters—17
- 2.8 Data-analyse—17

3 Resultaten—21

- 3.1 Vaststellen van de artificiële besmettingsniveaus—21
- 3.2 Hepatitis A-virus—21
 - 3.2.1 Detectie van hepatitis A-virus op verschillende voedselsoorten—21
 - 3.2.2 HAV-typering op verschillende voedselsoorten—22
 - 3.2.3 Rendement en detectielimiet van detectie- en typerings-PCR's—23
- 3.3 Rotavirus—24
 - 3.3.1 Detectie van rotavirus op verschillende voedselsoorten—24
 - 3.3.2 RV-typering op verschillende voedselsoorten—26
 - 3.3.3 Rendement en detectielimiet van detectie- en typerings-PCR's—26
- 3.4 Virusspecifieke remming—28
- 3.5 Detectie van HAV en RV in natuurlijk besmet rivierwater—29

4 Discussie—31

- 4.1 Efficiëntie van de detectie- en typerings-RT-PCR's—31
- 4.2 Artificieel versus natuurlijk besmette monsters—32
- 4.3 Bruikbaarheid voor moleculaire tracement van bron naar patiënt—33
- 4.4 Urgentie van optimale virusdetectie in voedsel—34

5 Aanbevelingen—35

6 Dankwoord—37

7 Literatuur—39

Samenvatting

De afgelopen jaren is steeds duidelijker geworden dat met name voedsel dat voor consumptie niet of nauwelijks behandeld wordt een risico vormt voor de volksgezondheid vanwege besmetting met voedseloverdraagbare virussen. Schelpdieren, (verse) groente en fruit en kant-en-klare voedselproducten zijn voorbeelden van dergelijk niet of nauwelijks behandeld voedsel. Maar ook eerder niet als risicovol beschouwde producten zoals gedroogde groente en fruit kunnen virussen overdragen. Een van de manieren waarop de betrokkenheid van een bepaald virus bij een voedselgerelateerde uitbraak kan worden aangetoond, is dit virus zowel in de patiënt als in of op het betreffende soort voedsel te detecteren. Uit een inventarisatie die is uitgevoerd in 2008 bleek dat voor hepatitis A-virus (HAV) en rotavirus (RV) afstemming tussen de humane diagnostiek en de diagnostiek in voedsel- en omgevingsmonsters noodzakelijk is om voor deze virussen tracering naar een besmettingsbron met behulp van moleculaire technieken mogelijk te maken.

Drie verschillende detectie- en typerings-PCR's voor HAV en twee voor RV zijn vergeleken op artificieel besmette voedsels, die rauw of nauwelijks behandeld geconsumeerd worden, namelijk frambozen, sla, zongedroogde tomaten en oesters. Verder is de detectie van HAV en RV in artificieel besmet kraanwater onderzocht.

Voor HAV bleek detectie van de 5'NCR (PCR D2) het meest efficiënt te zijn. Deze detectie-PCR is een factor 1,8 – 120 gevoeliger dan de meest gevoelige typerings-PCR (HAV regio VP1-2A). Voor RV bleek detectie van het NSP3 segment (PCR D3) de meest efficiënte detectie-PCR te zijn. Deze PCR is een factor 1,2 – 10 gevoeliger dan typerings-PCR T1 (RV segment 3, P-type). Het feit dat voor beide virussen de typerings-PCR minder gevoelig is dan de detectie-PCR kan de moleculaire tracering van het virus van patiënt naar de bron bemoeilijken, omdat het niveau van besmetting in voedsel en omgeving vaak laag zijn. In de praktijk kan dit betekenen dat kan worden aangetoond dat HAV- of RV-RNA aanwezig is in een te onderzoeken voedsel- of omgevingsmonster, maar dat het type virus niet kan worden vastgesteld, wat bronopsporing met behulp van moleculaire tracering bemoeilijkt. Verdere optimalisatie van een typerings-PCR voor HAV en RV is daarom wenselijk, zeker in het licht van de recente ontwikkelingen waarbij meer en andere voedingsmiddelen geassocieerd worden met voedselgerelateerde virusuitbraken.

1 Inleiding

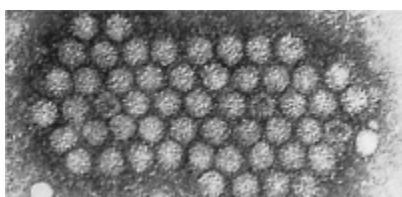
De afgelopen jaren is steeds duidelijker geworden dat virussen een belangrijke rol spelen bij voedseloverdraagbare infectieziekten (Anonymous, 2008; EFSA, 2011). Met name de voedsels die voor consumptie niet of nauwelijks behandeld worden, zoals schelpdieren, verse groente en fruit en kant-en-klare voedselproducten vormen een risico. In de EU worden virussen verantwoordelijk gehouden voor 15% van de voedselgerelateerde uitbraken zoals is gerapporteerd aan de Europese Autoriteit Voedselveiligheid (EFSA) en het Europese centrum voor infectieziektebestrijding (ECDC) in 2007 (EFSA, 2009). In Nederland wordt het aantal gevallen van norovirus (NoV) per jaar geschat op 500.000. Naar schatting is 10 – 15% van deze gevallen toe te schrijven aan besmet voedsel (De Wit et al., 2003), waarmee NoV van alle enterale virussen het vaakst betrokken is bij voedselgerelateerde uitbraken. HAV is veel minder vaak betrokken bij voedselgerelateerde uitbraken, maar kan een ernstiger ziektebeeld geven, zeker bij volwassenen (Petrignani et al., 2010a; Petrignani et al., 2010b). De werkelijke betrokkenheid van HAV bij voedselgerelateerde uitbraken is vermoedelijk meer dan gedacht, omdat door de incubatieperiode van 2 tot 6 weken onderrapportage waarschijnlijk is.

Wereldwijd wordt het aandeel van voedselgerelateerde virusinfecties geschat op 5% voor HAV en 12 – 47% voor NoV (Anonymous, 2008). Echter, alle schattingen tot nu toe zijn gebaseerd op aannames en extrapolaties van verschillende bronnen. Hoewel de percentages variëren tussen de verschillende studies, is de conclusie van alle studies dat virussen een belangrijke oorzaak zijn van voedselgerelateerde ziekte (Anonymous, 2008). Naast NoV (Boxman et al., 2007; De Roda Husman et al., 2007; Falkenhorst et al., 2005; Hoebe et al., 2004) en HAV (Bosch et al., 2001; Dentinger et al., 2001; Divizia et al., 2004; Petrignani et al., 2010b; Schmid et al., 2008), kunnen ook andere gastro-enterale virussen betrokken zijn bij voedsel- en watergerelateerde uitbraken, zoals rotavirus (Anonymous, 2000; Divizia et al., 2004; Gallay et al., 2006), enterovirus (Amvrosieva et al., 2006; Hauri et al., 2005), hepatitis E-virus (HEV) (Li et al., 2005; Tei et al., 2003) en adenovirus (Kukkula et al., 1997).

Naast of aanvullend op epidemiologisch onderzoek kan door middel van moleculaire tracers de betrokkenheid van een bepaald virus bij een voedselgerelateerde uitbraak worden aangetoond. Hiervoor dient het virus zowel in de patiënt als in of op het betreffende soort voedsel gedetecteerd te worden. De enorme toename van methoden die de afgelopen jaren zijn ontwikkeld om virussen in voedsel aan te tonen, zoals schelpdieren en verse groente en fruit, reflecteren (gedeeltelijk) de toegenomen bewustwording van de bijdrage van virussen aan voedselgerelateerde uitbraken. Ook maakt de grote variëteit aan methoden duidelijk dat geen methoden beschikbaar zijn waarmee het virus met grote efficiëntie gedetecteerd kan worden. Detectie van virussen in voedsel wordt bemoeilijkt door het feit dat voedsel vaak met lage aantallen virussen besmet is, waardoor het virus, na elutie van het voedsel, verder geconcentreerd moet worden om aangetoond te kunnen worden. Met deze concentratiestap worden ook bestanddelen uit voedsel geïsoleerd die storend zijn voor detectie, wat de detectie bemoeilijkt. Het Europese standaardisatie-instituut CEN heeft een werkgroep bijeengeroepen (TAG4) die zich wijdt aan de ontwikkeling van een gestandaardiseerde methode voor virusdetectie in voedsel (Lees en TAG4,

2010). Standaardisatie van virusdetectie is essentieel om (inter)nationaal onderzoek te kunnen vergelijken en eventueel in de toekomst viruscontaminatie van voedsel in de wetgeving op te kunnen nemen. De methode vormt de basis voor het door de EFSA uitgebrachte wetenschappelijk advies betreffende norovirus-normering voor oesters (EFSA, 2012). De gestandaardiseerde methode bevindt zich in de fase van validatie. In afwachting van de validatie zal waarschijnlijk de methode in 2013 door het CEN worden uitgebracht als Technical Specification.

Dat virus moeilijk aantoonbaar is in of op een specifiek soort voedsel in een voedselgerelateerde uitbraaksituatie is gebleken bij een uitbraak van HAV, begin 2010 (Petrignani et al., 2010b). In maart 2010 waren 11 primaire Nederlandse ziektegevallen van hepatitis A geïdentificeerd met een identieke HAV-genotype IB-variant. Virussen lijkend op deze variant zijn ook aangetoond in reizigers die terugkeerden uit Turkije. Omdat geen andere epidemiologische connectie tussen de Nederlandse patiënten gemaakt kon worden, is een oorsprong in een gemeenschappelijke voedselbron aannemelijk. Tien van de 11 primaire gevallen hadden aangegeven (semi-)gedroogde tomaten geconsumeerd te hebben (Petrignani et al., 2010b). Omdat monsters van de geconsumeerde tomaten niet meer onderzocht konden worden, zijn 81 monsters onderzocht van vergelijkbare producten, zoals (semi-)gedroogde tomaten, al dan niet gemarineerd, verwerkt of in olie, gekocht in de winkels van de patiënten in Nederland. Een vijftal monsters was afkomstig van geopende producten bij patiënten thuis. In geen van de onderzochte tomaten kon HAV-RNA worden aangetoond (Petrignani et al., 2010a). Omdat eind 2009 een identieke HAV-variant is aangetroffen in een voedselgerelateerde uitbraak in Australië, waarbij ook semi-gedroogde tomaten als potentiële bron waren aangemerkt, is het aannemelijk dat de tomaten de gemeenschappelijke bron zijn geweest van deze internationale uitbraak. Inderdaad is in Australië HAV-RNA daadwerkelijk op zongedroogde tomaten aangetroffen en kon van één van de HAV-positieve tomaten een HAV-sequentie worden gegenereerd die identiek was aan HAV gevonden in patiënten (Donnan et al., 2012).



Figuur 1: Hepatitis A-virus

Humaan rotavirus (RV) is de grootste veroorzaker van acute gastro-enteritis in zuigelingen en jonge kinderen wereldwijd. In ontwikkelingslanden is RV verantwoordelijk voor een derde van de gastro-enteritis geassocieerde ziekenhuisopnamen (Parashar et al., 2006). In Nederland is RV een van de meest voorkomende gastro-enteritisverwekkers. De mens is het meest frequent geïnfecteerd met rotavirus A, maar B en C kunnen ook ziekte bij de mens veroorzaken. RV-A wordt in hoge concentraties uitgescheiden in feces en kan door niet of onvoldoende zuivering in het oppervlaktewater terecht komen. De hoge stabiliteit van RV in waterige milieus en de slechte verwijdering in zuiveringsprocessen kan water- en voedselgerelateerde transmissie ten goede komen (Ferreira et al., 2009). Het is onduidelijk welk deel van de RV-infecties water- of voedselgerelateerd zijn. Verschillende rotavirus-gerelateerde uitbraken

zijn beschreven in de literatuur (Anonymous, 2000; Di Bartolo et al., 2011; Gallay et al., 2006; Mayr et al., 2009).



Figuur 2: Rotavirus

Voor moleculaire tracersing van voedsel naar patiënt dient uit zowel de patiënt als het betreffende voedsel een identiek virus te worden geïsoleerd. Omdat het ondoenlijk is het gehele virusgenoom te sequencen is het voor het traceren van bron naar patiënt essentieel dat zowel van patiëntenmonsters als van voedsel- en omgevingsmonsters sequenties worden verkregen van hetzelfde deel van het genoom.

In 2008 is een inventarisatie gedaan naar de detectie- en typeringsmethoden voor verschillende enterale virussen zoals deze uitgevoerd worden door de Nederlandse Voedsel- en Warenautoriteit (NVWA) (voedselmonsters), en de laboratoria van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), het Laboratorium voor Infectieziekten en Screening (LIS) (patiëntenmonsters) en het Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie (LZO) (voedsel- en omgevingsmonsters) (Rutjes en De Roda Husman, 2009). Hieruit bleek dat afstemming noodzakelijk is om voor HAV en rotavirus moleculaire tracersing naar een besmettingsbron mogelijk te maken. Ook enterovirus behoeft aandacht, omdat het deel van het genoom dat door de betreffende laboratoria wordt geamplificeerd niet geschikt is voor moleculaire tracersing. Wellicht dat een andere regio op het genoom geschikter is. Detectie van NoV, adenovirus en hepatitis E-virus (de laatste twee alleen RIVM) behoeft in eerste instantie geen verdere afstemming omdat overlappende delen van het virusgenoom worden gedetecteerd. Wel kunnen detectiemethoden mogelijk geschikter gemaakt worden voor moleculaire tracersing.

Dit rapport beschrijft de vergelijking van detectie en typering van HAV en RV in verschillende matrices, namelijk sla, frambozen, zongedroogde tomaten, schelpdieren en (drink)water. Omdat de primers die het RIVM-LIS gebruikt voor detectie en typering van HAV en RV in feces in Europese samenwerkingsverbanden worden toegepast – waarmee dus ook sequentievergelijkingen op Europees niveau kunnen worden uitgevoerd –, is in eerste instantie onderzocht wat de gevoeligheid van deze PCR's is voor voedsel- en watermonsters. Dit is vergeleken met de methoden die nu door het RIVM-LZO en de NVWA gebruikt worden voor detectie in voedsel en water.

2 Materiaal en methoden

2.1 Virus en matrices

Kweeksupernatant van hepatitis A-virus (HAV) met een titer van 1×10^7 TCID₅₀/ml is verkregen van het LIS, evenals HAV-positieve feces. Verder is kweeksupernatant van rotavirus WA (Type G1P1A) (Desselberger et al., 2006) met een titer van $10^{5,8}$ TCID₅₀/ml gebruikt als controle en recombinant mengovirus MC₀, zoals eerder is beschreven (Costafreda et al., 2006; Rutjes et al., 2009). Sla, frambozen en zongedroogde tomaten zijn afkomstig uit een lokale supermarkt en schelpdieren zijn afkomstig uit klasse A kweekgebieden in de Oosterschelde. Verder is RIVM-kraanwater gebruikt voor onderzoek van drinkwater, en concentraat van oppervlaktewatermonsters genomen van de Maas in 2004 (04-182 en 04-196) die eerder positief bleken te zijn voor HAV (ongepubliceerde data) en RV (Costafreda et al., 2006; Rutjes et al., 2009).

2.2 Detectie van HAV

Zoals in Figuur 3 staat weergegeven, wordt met de Reverse Transcriptase-PCR's (RT-PCR) die door het LIS, het LZO en de NVWA worden uitgevoerd voor detectie van HAV-RNA een deel van de 5' Non Coding Regio (5'NCR) geamplificeerd. De real-time PCR's die door het LZO en de NVWA worden uitgevoerd zijn identiek en amplificeren een fragment van 174 nt (D2). Voor detectie van hetzelfde fragment van de 5'NCR heeft het LZO tevens een conventionele PCR in gebruik (D1). cDNA-synthese is gedaan met specifieke primer HAV240. Het LIS detecteert een fragment van 71 nt in de 5'NCR, na een random primed cDNA-synthese (D3). Bij elk van deze PCR's worden producten gedetecteerd met een specifieke probe (Tabel 1).

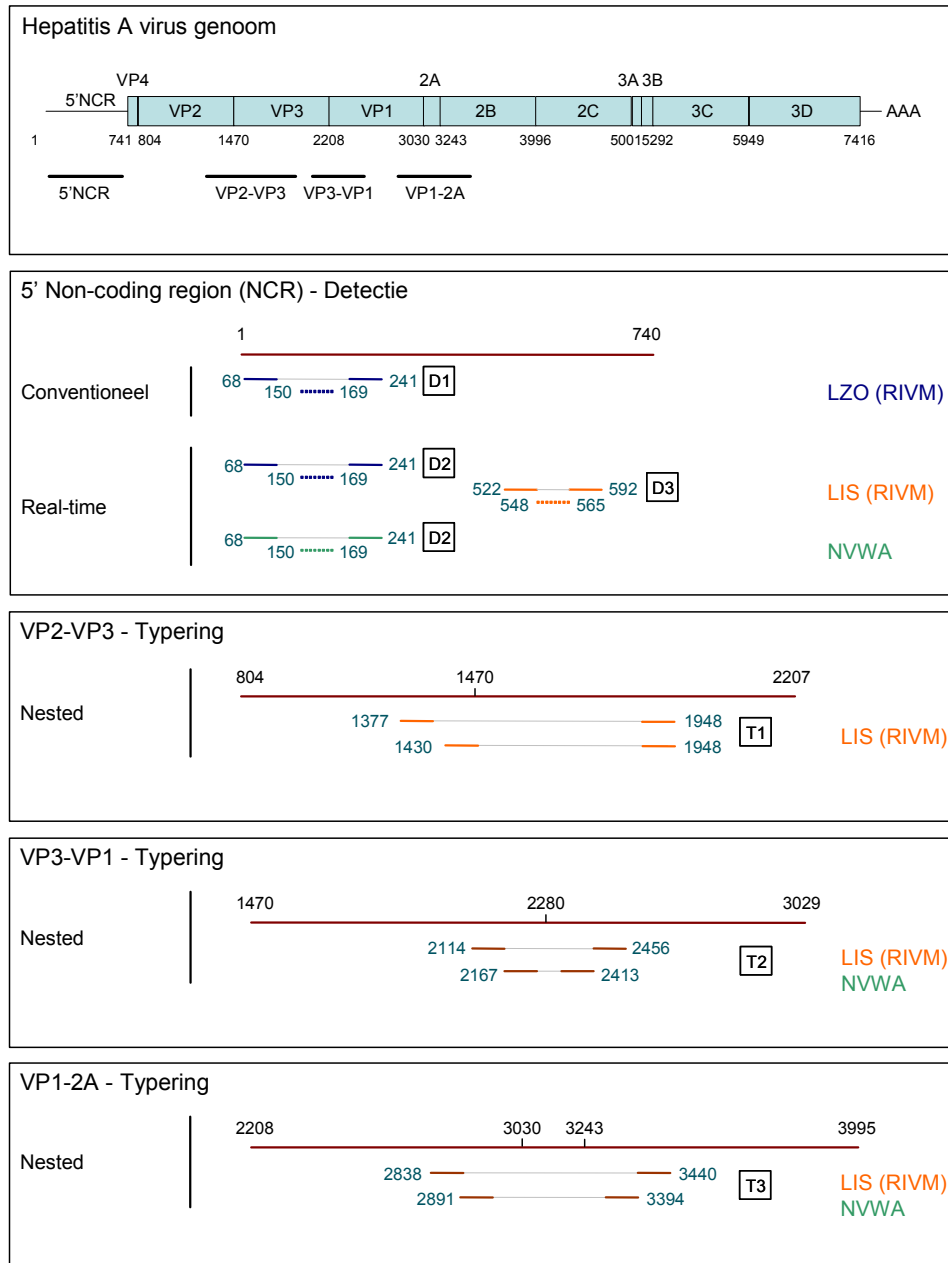
2.3 Typering van HAV

Het LIS en de NVWA hebben één RT-PCR-protocol voor typering van HAV in gebruik (T3). Verder zijn twee PCR's getest die in het verleden door het LIS en/of de NVWA zijn uitgevoerd (T1 en T2). Het LZO heeft geen typerings-PCR voor HAV in gebruik. Met de drie protocollen worden verschillende fragmenten van het HAV-genoom geamplificeerd (Figuur 3), namelijk een fragment van 519 nt van VP2-VP3 (T1), een fragment van 247 nt van VP3-VP1 (T2) en een fragment van 504 nt van VP1-2A (T3). De typerings-PCR's zijn nested PCR's met een cDNA-synthese met de betreffende specifieke antisense primers (Tabel 1). Na het aantonen van HAV met een van de typerings-PCR's kan het PCR-product worden gesequenced, waarna het type kan worden vastgesteld aan de hand van fylogenetische analyse. Sequentieanalyse en fylogenie maken geen deel uit van deze harmonisatiestudie.

2.4 Detectie van RV

Zoals in Figuur 4 staat weergegeven, bestaat het rotavirusgenoom uit 11 segmenten, waarbij elk segment coderend is voor één eiwit, behalve segment 9 en 11, die ieder coderend zijn voor twee eiwitten. Voor detectie van RV maken het LIS en het LZO gebruik van verschillende protocollen, waarbij het LIS een deel van gensegment 1 detecteert (D1) en het LZO een deel van segment 6 (D2). Beide RT-PCR's worden conventioneel uitgevoerd. Verder wordt door het

LIS nog een two-step real-time PCR toegepast voor detectie van gensegment 7 (D3). De gevoeligheid van de verschillende PCR's is vergeleken. Voor optimalisatie van de gevoeligheid is van PCR D3 tevens een one-step PCR uitgetest (D4). cDNA's zijn zowel met specifieke als random primed primers geproduceerd. Bij de real-time PCR's zijn producten gedetecteerd met een specifieke probe (Tabel 2).



Figuur 3: Overzicht van de Reverse Transcriptase-PCR's die door de verschillende laboratoria worden uitgevoerd op het genoom van HAV (M14707)

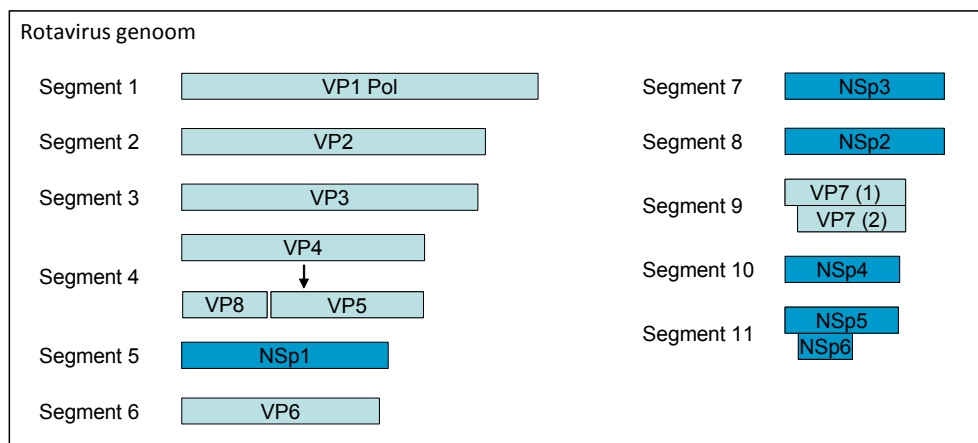
blauw = LZO (RIVM)

oranje = LIS (RIVM)

groen = NVWA

doorgetrokken lijn = PCR-primer

stippellijn = probe



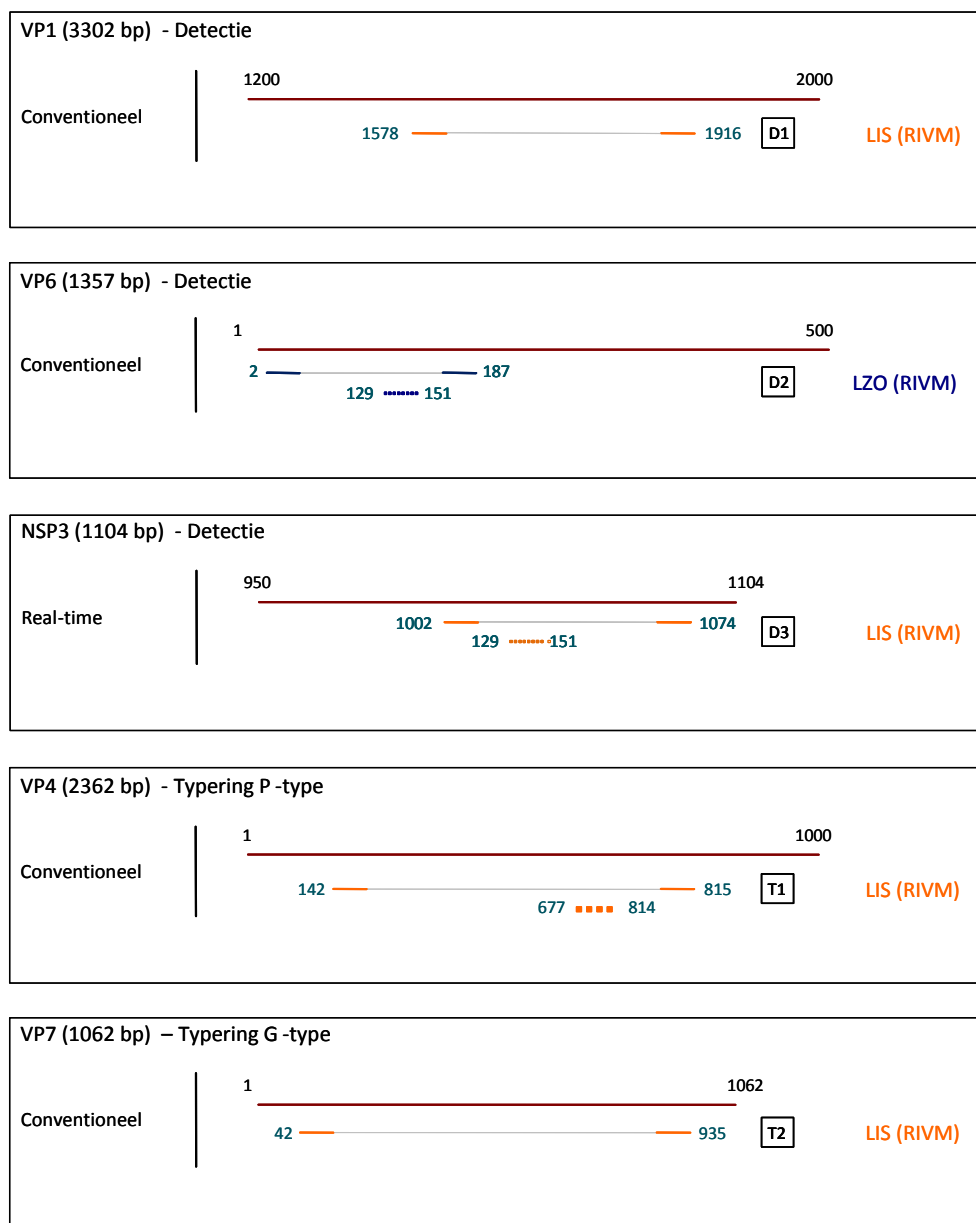
Figuur 4: Overzicht van de verschillende segmenten waaruit het rotavirusgenoom is opgebouwd

2.5 Typering van RV

Het LIS heeft twee RT-PCR protocollen voor typering van RV in gebruik. Voor typering van het P-type wordt een fragment van 671 bp geamplificeerd van gensegment 4 (VP4) (T1), voor typering van het G-type wordt een fragment van 894 bp geamplificeerd van gensegment 9 (VP7) (T2) (Figuur 5). Na amplificatie worden de specifieke PCR-producten getypeerd door middel van hybridisatie op een zogenaamde Reverse Line Blot (RLB). Omdat met deze techniek geen sequentie-informatie wordt verkregen is dit geen ideale methode voor het traceren van een virus naar een besmettingsbron. Daarom zijn voor beide typerings-PCR's één of meerdere probes ontwikkeld waarmee de specificiteit van een gegenereerd PCR-sigitaal kan worden bevestigd. De gebruikte probes staan vermeld in Tabel 2. Na het aantonen van RV met een van de typerings-PCR's kan het PCR-product worden gesequenced, waarna het type kan worden vastgesteld aan de hand van fylogenetische analyse. Sequentie-analyse en fylogenie maken geen deel uit van deze harmonisatiestudie.

2.6 RNA-isolatie uit verschillende artificieel besmette matrices

Uit frambozen, sla, zongedroogde tomaten, oesters en kraanwater is viraal RNA geïsoleerd volgens het gestandaardiseerde protocol dat is ontwikkeld door de EU-werkgroep CEN-TAG4 (Lees en TAG4, 2010). De procedures worden hierna kort beschreven.



Figuur 5: Overzicht van de Reverse Transcriptase-PCR's die door de verschillende laboratoria worden uitgevoerd op het genoom van RV

De gebruikte referentiestammen zijn GenBank accession no. AJ304859 (3309 nt) voor D1, K02086 (1356 nt) voor D2, DQ492677 (1071 nt) voor D3, FJ423138 (876 nt) voor T1 en AB436835 (1061 nt) voor T2.

blauw = LZO (RIVM)
 oranje = LIS (RIVM)
 doorgetrokken lijn = PCR-primer
 stippellijn = probe

Frambozen, zongedroogde tomaten – Een gewicht van 5 gram is geïncubeerd met Tris-Glycine-Beefextract (TGBE)-buffer, waarna het geïsoleerde virus verder wordt geconcentreerd door middel van PEG-precipitatie, chloroform/butanolextractie en RNA-extractie met behulp van magnetische silica. Voor de extractie van RNA uit frambozen zijn 30 units pectinase toegevoegd aan de TGBE-buffer. *Sla* – Een gewicht van 5 gram is geïncubeerd met TGBE-buffer, waarna het geïsoleerde virus verder wordt geconcentreerd door middel van PEG-precipitatie en RNA-extractie met behulp van magnetische silica.

Oesters – Na isolatie van het maagdarmkanaal wordt een pool van de maagdarmkanalen gemaakt van 55 oesters. Van de pool worden porties uitgevuld van 250 mg (gemiddeld gewicht van het maagdarmkanaal van een individuele oester) en 2 gram (gewicht van de maagdarmkanalen van minimaal 10 oesters). Met behulp van proteinase K wordt het maagdarmkanaal enzymatisch gedigesteerd. Vervolgens is RNA geïsoleerd met behulp van magnetische silica.

Kraanwater – Een halve liter kraanwater is gefiltreerd over een positief geladen 0,22 µm filter van 47 mm, waarna het virus van het filter is geëluëerd met behulp van TGBE-buffer. Vervolgens is RNA geïsoleerd met behulp van magnetische silica.

2.7 RNA-isolatie uit natuurlijk besmette monsters

Rivierwater – Concentraat van rivierwater is eerder verkregen zoals is beschreven door Rutjes et al. (Rutjes et al., 2009). RNA is geïsoleerd uit 12,5 µl concentraat met behulp van magnetische silica.

2.8 Data-analyse

Rendementsberekening – Het rendement van de detectiemethoden is berekend op basis van de Ct-waarden verkregen na RNA-extractie en RT-PCR direct op het virus dat is gebruikt voor de artificiële contaminatie en de Ct-waarden verkregen met de artificieel besmette monsters. Het verschil in Ct-waarden (ΔCt) is gebruikt om het rendement (in procenten) te berekenen, met het gegeven dat met een afname van 3,3 Ct-waarden 1 \log_{10} -eenheden reductie wordt aangetoond, volgens de volgende formule:

$$Eff = \frac{1}{e^{0.693\Delta Ct}}$$

Omdat Ct-waarden ongeveer 3,3 eenheden toenamen in tienvoudige verdunningsreeksen is bovenstaande methode gerechtvaardigd.

Vaststellen detectielimiet – De detectielimiet is bepaald op basis van de aantallen virussen (TCID₅₀) die aan de te onderzoeken monsters zijn toegevoegd en de laatste verdunning die positief was in de betreffende RT-PCR, aannemende dat als hoog besmettingsniveau 2×10^5 TCID₅₀ was toegevoegd en 1/20 deel van het nucleïnezuurelutaat in de RT-PCR is geanalyseerd. Bij het lage besmettingsniveau was 50 keer minder virus toegevoegd. De detectielimiet is een gemiddelde van de analyses die zijn uitgevoerd met het hoge besmettingsniveau en met het lage besmettingsniveau.

Correlatie TCID₅₀, PFU en genoomkopieën – De virusconcentratie in TCID₅₀ is omgerekend naar PFU door te vermenigvuldigen met een factor 0,7. Dit is als volgt wiskundig beredeneerd. Aangenomen is dat virussen in het te analyseren monster Poisson verdeeld zijn. Als $P(o)$ de proportie negatieve wells is en m het gemiddelde aantal infectieuze virussen in PFU per volume (PFU/ml), dan is $P(o) = e(-m)$. Bij een titer in TCID₅₀ is $P(o) = 0.5$. Dus $e(-m) = 0,5$ en $m = -\ln 0,5$ wat 0,7 is. Verder is aangenomen dat het aantal plaque forming units (PFU) met een factor 60 vermenigvuldigd kan worden om een redelijke schatting te hebben van het aantal virale genomen, zoals is beschreven voor HAV door Costafreda et al. (Costafreda et al., 2006). Eén TCID₅₀ kan daarom geschat worden als 40 kopieën van het virale genoom.

Tabel 1: RT-PCR primers en probes voor detectie van Hepatitis A-virus (Reference strain M14707)

Methode	Lab	Target	Primers / Probe	Sequentie	Locatie	Fragment lengte	Referentie
Conventioneel (Detectie)	LZO	5'NCR (D1)	HAV68	TCACCGCCGTTTGCCTAG	68 – 85	174	Bosch et al, 2001
			HAV240	GGAGAGCCCTGGAAGAAAGA	222 – 241		
			HAV-probe 150	TTAATTCCTGCAGGTTTCAGG	150 – 169		
Real-time PCR (Detectie)	LZO/ NVWA	5'NCR (D2)	HAV68	TCACCGCCGTTTGCCTAG	68 – 85	174	Costafreda et al, 2006
			HAV240	GGAGAGCCCTGGAAGAAAG	222 – 241		
			probe HAV150	CCTGAACCTGCAGGAATTAA	150 – 169		
	LIS	5'NCR (D3)	HAV 5'F	CAGTGGATGCATTGAGTG	522 – 539	71	Niet gepubliceerd
			HAV 5'R	CTAAGCACAGAGAGGTC	576 – 592		
			HAV 5'P	CCTARAGACAGCCCTGAC	548 – 565		
Nested (Typering)	LIS	VP2-VP3 (T1)	HA 1865 AS	ACCADGCCATDCCATCHACATC	1926 – 1948	572	Niet gepubliceerd
			HA 2112 S	AAYGTTGCTTCYCATGTYAGRGT	1377 – 1400		
			HA 1369 S	ATGYTTTGCWCCHCTHTATCAT	1430 - 1452		
	LIS/ NVWA	VP3-VP1 (T2)	VP1-4	YGTTGCTTCYCATGTYAGAGT	2114 – 2134	343	Van Steenbergen et al, 2004
			VP1-6	CATATGATCTGATGTATGTCT	2436 – 2456		
			Nested VP1-2	GTTTTGCTCCTCTTTATCATGCTATG	2167 – 2192	247	
			Nested VP1-1	GGAAATGTCTCAGGTACTTTCTTTG	2389 – 2413		
	LIS/ NVWA	VP1-2A (T3)	HAV6.1	GTSTCWGGRGCACTGGATGG	2838 – 2857	603	Stene-Johansen et al, 2007 (met modificaties)
			HAV10	CATTTCTGTCCATTTYTCATCATT	3417 – 3440		
			Nested HAV8.2	KGTTTCYATTGARATTGCAAATTA	2891 – 2914	504	
Nested HAV11			ARAACYCCAGCATCCATYTC	3375 – 3394			

Tabel 2: RT-PCR primers en probes voor detectie van rotavirus

Methode	Lab	Target	Primer / Probe	Sequentie	Locatie	Fragment lengte	Referentie
Conventioneel (Detectie)	LIS	VP1 (D1)	Rota ABCF	TAYACIGAYGTITCICARTGGGA	1578 – 1600	339	Svraka et al, 2007
			Rota ABCR	GTAGTTGTCGTCICCRTCIAC	1896 – 1916	(AJ304859)	
	LZO	VP6 (D2)	VP6-3	GCTTTAAAACGAAGTCTTCAAC	2 – 23	186	Villena et al, 2003
			VP6-4 Probe	GGTAAATTACCAATTCCTCCAG CAAATGATAGTTACTATGAATGG	166 – 187 129 – 151	(K02086)	
Real-time (Detectie)	LIS	NSP3 (D3/D4)	RVNSP3F	ACCCTCTATGAGCACAATA	1002 – 1020	73	Pang et al, 2004 (met modificaties)
			RVNSP3R	GGTCACATAACGCCCTA	1057 – 1074	(DQ492677)	
			RVNSP3P1 probe	CTAACACTGTCAAAAACCTAA	1029 – 1049		
Real-time (Typering)	LIS	VP4 (P-type) (T1)	VP4F	TATGCTCCAGTIAATTGG	142 – 159	671	Gentsch et al, 1992
			RVPR	CTRTTATATTGCATYTCYTTCC	791 – 812	(FJ423138)	
			VP4 RDH probe	TRCCACCAATKCAAAATACHAG	677 – 698		
	LIS	VP7 (G-type) (T2)	VP7F	CCTTTTTRATGTATGGTATTGA	42 – 62	894	Gentsch et al, 1992
			VP7R	AAIACTTGCCACCAYTTYTTCC	914 – 935	(AB436835)	
			VP7FA	TAATGTATGGTATTGAATATACC	47 – 69		
			VP7RA	AAIACTTGCCACCAYTTYTTCC	914 – 935		

3 Resultaten

3.1 Vaststellen van de artificiële besmettingsniveaus

Om te bepalen hoeveel hepatitis A-virus (HAV) en rotavirus (RV) moest worden toegevoegd aan de verschillende matrices om gedetecteerd te kunnen worden is RNA geïsoleerd uit 10, 20 en 35 µl HAV-kweeksupernatant (1×10^7 TCID₅₀/ml) en rotavirus WA ($10^{5,8}$ TCID₅₀/ml). Voor HAV was 20 µl kweeksupernatant met de conventionele PCR (D1) goed detecteerbaar en met de real-time PCR's D2 en D3 werden Ct-waarden verkregen van rond de 25 en de 30. Daarom is deze hoeveelheid HAV gekozen om als spike-concentratie te gebruiken met hoog besmettingsniveau. Als spike-concentratie met een laag besmettingsniveau is gekozen voor 50 keer minder virus. Dit betekent dat als hoog besmettingsniveau 2×10^5 TCID₅₀ HAV is toegevoegd aan de te onderzoeken matrices en als laag besmettingsniveau 4×10^3 TCID₅₀. Voor RV was 10 µl kweeksupernatant goed detecteerbaar met zowel de conventionele PCR D2 als real-time PCR D3, waarmee Ct-waarden van rond de 25 werden verkregen. Dit betekent dat als hoog besmettingsniveau 2×10^4 TCID₅₀ RV is toegevoegd aan de te onderzoeken matrices en als laag besmettingsniveau 4×10^2 TCID₅₀.

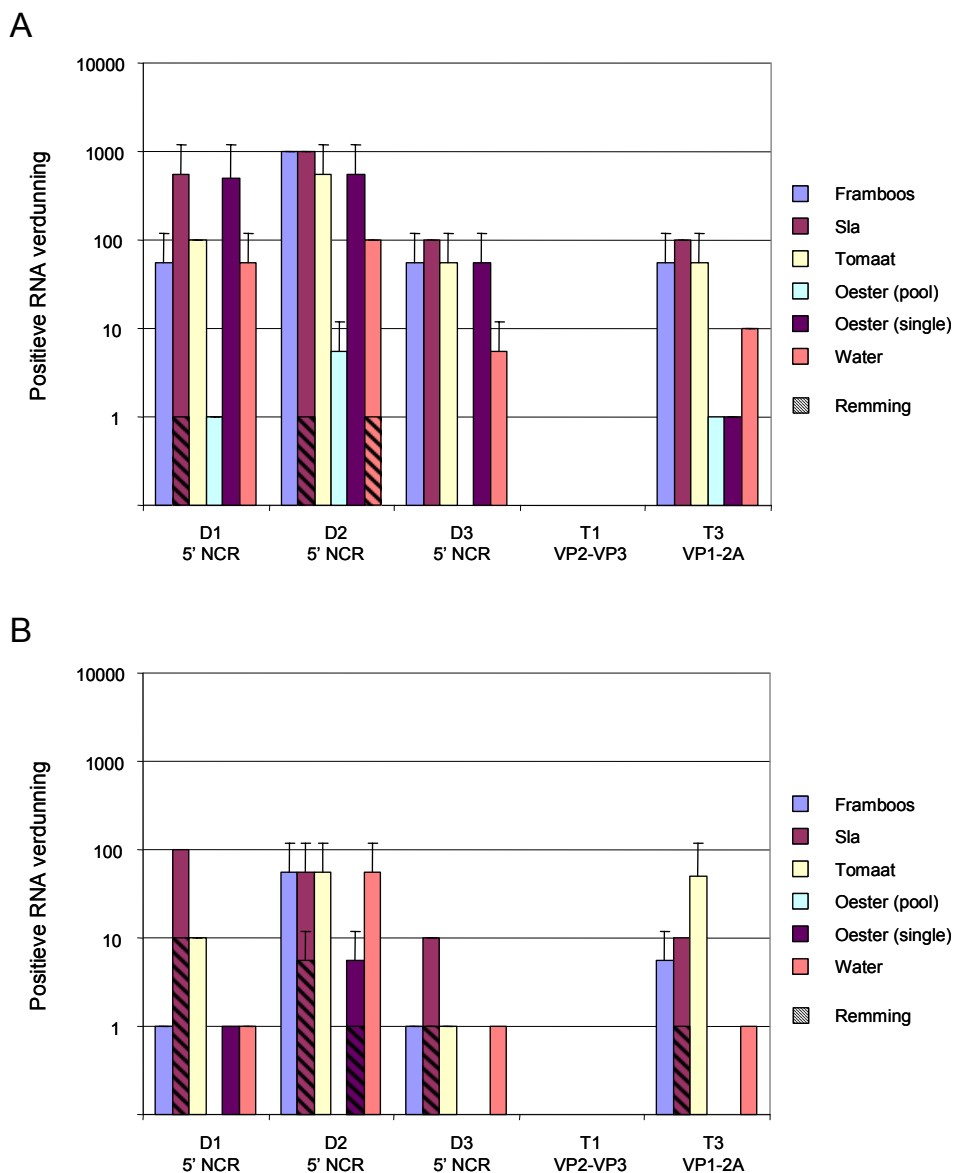
3.2 Hepatitis A-virus

3.2.1 Detectie van hepatitis A-virus op verschillende voedselsoorten

Hepatitis A-virus voor zowel het hoge als het lage besmettingsniveau is toegevoegd aan 5 gram frambozen, sla en zongedroogde tomaten, aan het maagdarkanaalgewicht van een enkele oester (250 mg) of aan het maagdarkanaalgewicht van een pool van oesters (2 gram) en aan 0,5 liter kraanwater. Na isolatie van het RNA uit de verschillende soorten voedsel zijn 10-voudige verdunningsreeksen gemaakt van het RNA. Onverdund RNA en verdunningen van het RNA werden vervolgens geanalyseerd met behulp van drie verschillende detectie-RT-PCR's die alle een deel van de 5'NCR amplificeren (Figuur 3). D1 is een conventionele RT-PCR, D2 en D3 zijn real-time RT-PCR's. Zoals in Figuur 6A is weergegeven, werd het RNA van het hoogste besmettingsniveau in alle soorten voedsel teruggevonden, behalve met D3 in de gepoolde oesters. PCR D2 bleek de meest gevoelige PCR van de drie, aangezien de hoogste verdunning van het RNA vaker gedetecteerd werd in zes matrices met het hogere en het lagere besmettingsniveau.

PCR D1 bleek daarna de gevoeligste PCR, aangezien vaker de hoogste verdunning van het RNA positief werd gevonden in beide besmettingsniveaus dan met D3. Tevens was het RNA detecteerbaar met D1 in de matrix individuele oesters in het lagere besmettingsniveau, en niet met D3.

Over het geheel werd de meeste remming (gearceerde balken in Figuur 6) waargenomen in de matrix 'sla' op beide besmettingsniveaus. Met twee van de drie detectie-PCR's in het hoge besmettingsniveau en drie van de drie detectie-PCR's in het lagere besmettingsniveau werd remming waargenomen. Op het lage besmettingsniveau blijkt dat zelfs 10-voudige verdunning van het RNA niet altijd voldoende is om de remmende stoffen voldoende kwijt te raken, waardoor de 10-voudige verdunning ook nog negatief kan zijn. Ook in water met het hoge besmettingsniveau en in individueel geanalyseerde oesters met het lage besmettingsniveau werd in het onverdunde RNA eenmalig remming waargenomen met PCR D2.



Figuur 6: Detectie van hepatitis A-virus in verschillende artificieel besmette matrices op (A) een hoog besmettingsniveau (1×10^5 TCID₅₀) en (B) een laag besmettingsniveau (2×10^3 TCID₅₀)

Aangegeven is het gemiddelde van de hoogst positieve verdunning van de duplo's waarin een HAV-PCR-sigitaal werd verkregen. Drie detectie-PCR's zijn vergeleken (D1, D2 en D3) en twee typerings-PCR's (T1 en T3). De gearceerde balken geven de remming aan in de betreffende matrix.

3.2.2 HAV-typering op verschillende voedselsoorten

Op hetzelfde geïsoleerde RNA als waarop de detectie-RT-PCR's zijn uitgevoerd, zijn ook de twee verschillende RT-PCR's uitgevoerd voor de typering (Figuur 3). De beste resultaten werden verkregen met typerings-PCR T3, waarmee VP1-2A van het HAV-genoom gedetecteerd werd. Met uitzondering van de zongedroogde tomaten bleek de detectie van HAV met T3 in alle matrices minder efficiënt te zijn dan de gevoeligste detectie-PCR D2 op beide besmettingsniveaus. HAV op

zongedroogde tomaten werd op het lage besmettingsniveau met T3 even efficiënt gedetecteerd als met D2.

De typerings-PCR T1 bleek niet gevoelig genoeg om HAV op voedsel te kunnen detecteren en kan dus ook niet gebruikt worden voor typering (Figuur 6A). Wel kon HAV-RNA in de spike zelf aangetoond worden, op het hoge besmettingsniveau kon HAV in het onverdunde en het 10 keer verdunde RNA gedetecteerd worden, op het lage besmettingsniveau kon HAV alleen aangetoond worden in het onverdunde RNA. Uit onze eigen ervaring en eerdere ervaringen van het LIS en de NVWA was gebleken dat T2 minder gevoelig is dan T1 en daarom niet geschikt voor typering van HAV in voedsel. Met T2 zijn daarom geen verdere vergelijkingen uitgevoerd.

3.2.3 Rendement en detectielimiet van detectie- en typerings-PCR's

De detectie-efficiëntie van de detectie- en typerings-PCR-methoden is bepaald aan de hand van de efficiëntie van de RNA-isolatie en de efficiëntie van detectie van het geïsoleerde RNA met RT-PCR. Op basis van de Ct-waarden verkregen met het RNA geïsoleerd uit kweeksupernatant (spike) en uit de gespikete onderzochte monsters, is het rendement van de RNA-isolatie bepaald aan de hand van de Ct-waarden van detectie-PCR D2 en D3 (Tabel 3). Omdat D1 en de typerings-PCR's conventionele RT-PCR's zijn en er dus geen Ct-waarden verkregen worden, is van deze PCR's geen rendement bepaald. De hoogste rendementen zijn verkregen voor frambozen, sla en zongedroogde tomaat; deze varieerden van 6 tot 10%. De laagste rendementen zijn verkregen met de gepoolde oesters (gemiddeld 0,08%).

De detectielimiet van de drie detectie-PCR's en de typerings-PCR voor HAV is bepaald aan de hand van de gemiddelde detectie van HAV-RNA op het hoge en lage besmettingsniveau (Tabel 4). De detectielimiet van de meest gevoelige detectie-PCR D2 varieerde van 11 TCID₅₀ voor frambozen en sla tot 5500 TCID₅₀ voor oesters (pool) als 5 gram frambozen en sla is onderzocht of 2 gram oestermateriaal (Tabel 4). De detectielimieten van D1 en D3 waren vergelijkbaar en een factor 2 tot 70 hoger dan die van D2.

Tabel 3: Rendement van de RNA-isolatie van de real-time detectie-PCR's voor HAV op artificieel besmette monsters

Matrix	Rendement RNA-isolatie (%)		
	Detectie-PCR 5'NCR		Gemiddelde D2 – D3
	D2	D3	
Frambozen	10	6	8
Sla	6	7	7
Zongedroogde tomaat	7	10	8
Oesters (pool)	0,02	0,15	0,08
Oesters (single)	0,9	0,8	0,8
Water	3	7	5

Tabel 4: Detectielimiet van de detectie- en typerings-RT-PCR's voor HAV op artificieel besmette monsters

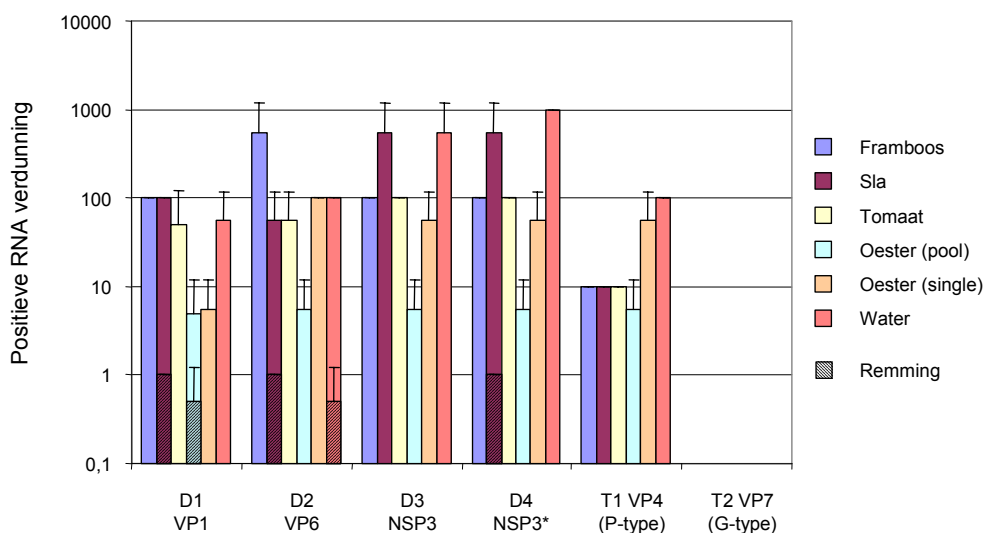
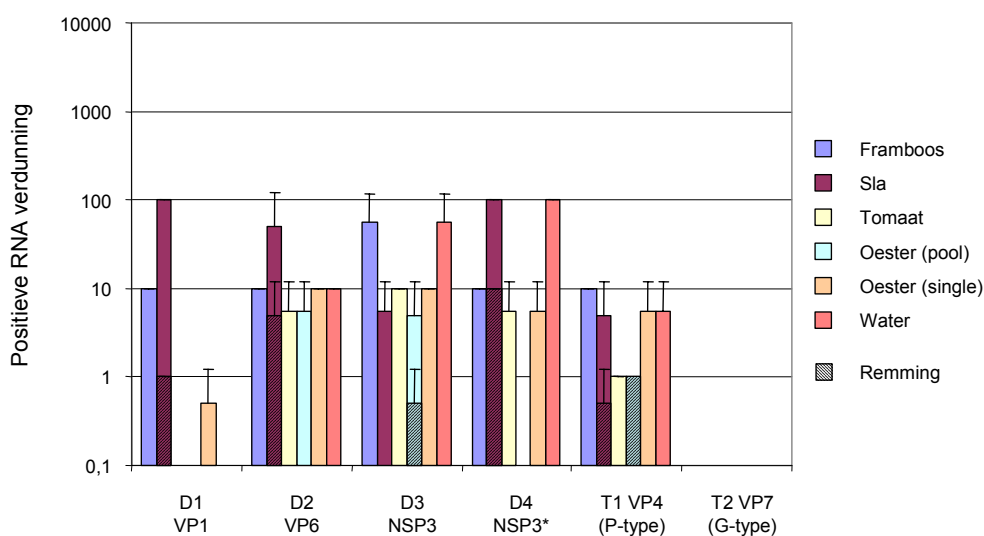
Matrix	Detectielimiet (TCID ₅₀)			
	Detectie-PCR 5'NCR			Typerings-PCR VP3-2A
	D1	D2	D3	T3
Frambozen	375	11	375	330
Sla	37	11	60	73
Zongedroogde tomaat	60	33	375	326
Oesters (pool)	10.000	5500	10.000	10.000
Oesters (single)	403	83	550	10.000
Water	375	56	3733	733

Voor typerings-PCR T3 varieerde de detectielimiet van 73 voor 5 gram sla tot 10.000 voor oesters (2 gram gepoold en 250 mg single) en verschilde van de gevoeligste PCR D2 met een factor 2 bij oesters (pool) tot een factor 120 bij individuele oesters. Hiermee liggen de detectielimieten voor de typerings-PCR in het algemeen boven de detectielimieten van de drie detectie-PCR's, wat betekent dat typerings-PCR T3 in laag besmette monsters vaak geen PCR-sigitaal zal opleveren en HAV in deze monsters niet getypeerd kan worden.

3.3 Rotavirus

3.3.1 Detectie van rotavirus op verschillende voedselsoorten

Zoals HAV op verschillende besmettingsniveaus is onderzocht is ook rotavirus-detectie onderzocht op frambozen, sla, zongedroogde tomaten, oesters (zowel individueel als gepoold) en in 0,5 liter kraanwater. Na isolatie van het RNA uit de verschillende soorten voedsel zijn 10-voudige verdunningsreeksen gemaakt van het RNA. Onverdund RNA en verdunningen van het RNA zijn vervolgens geanalyseerd met behulp van vier verschillende detectie-RT-PCR's (Figuur 7). D1 en D2 zijn conventionele RT-PCR's, D3 is een real-time RT-PCR en D4 is een geoptimaliseerde PCR-versie van D3. De optimalisatie van PCR D3 betrof het omzetten van de two-step PCR naar een one-step procedure met het voordeel dat de one-step procedure sneller is en minder kans geeft op contaminatie. Op het hoge besmettingsniveau is RV-RNA met de vier detectie-PCR's in alle matrices teruggevonden (Figuur 7A). PCR D3 en D4 bleken het meest gevoelig, omdat met deze PCR's de hoogste verdunningen het vaakst werden gedetecteerd. Van de andere twee PCR's was D2 in vier van de zes matrices gevoeliger dan D1.

A**B**

Figuur 7: Detectie van rotavirus in verschillende artificieel besmette matrices op (A) een hoog besmettingsniveau (1×10^5 TCID₅₀) en (B) een laag besmettingsniveau (2×10^3 TCID₅₀)

Aangegeven is het gemiddelde van de hoogst positieve verdunning van de duplo's waarin een RV-PCR-sigitaal werd verkregen. Vier detectie-PCR's zijn vergeleken (D1, D2, D3 en D4) en twee typerings-PCR's (T1 en T3). De gearceerde balken geven de remming aan in de betreffende matrix.

Op het lagere besmettingsniveau werd alleen met PCR D2 en D3 in alle matrices RV-RNA gedetecteerd (Figuur 7B), waarvan met D3 vaker de hoogste verdunning positief bleek en daarmee het gevoeligste over het geheel. Met PCR D4 was het niet mogelijk om in de oesters (pool) RNA terug te vinden en PCR D4 lijkt daarmee minder gevoelig te zijn dan op het hogere besmettingsniveau. In

D1 werd slechts in drie matrices RV-RNA gedetecteerd, waardoor deze het minst gevoelig is van de vier. In geval van laag besmette matrices kan de voorkeur voor PCR D3 ten opzichte van de geoptimaliseerde versie D4 worden bediscussieerd.

Zowel de detectie van HAV als RV, maar ook mengovirus (zie paragraaf 3.4) blijkt in de matrix 'sla' het meest gevoelig voor remming (gearceerde balken in Figuur 7A en 7B). Wat opvallend is, is dat PCR D3 in sla geen hinder leek te ondervinden van de remmende factoren. Dit suggereert dat voor sommige PCR's de huidige RNA-extractieprocedure uit sla nog niet optimaal is, maar dat niet alle PCR-methoden negatief beïnvloed worden door de aanwezige remmende factoren.

3.3.2 *RV-typering op verschillende voedselsoorten*

Op hetzelfde geïsoleerde RNA als waarop de detectie-RT-PCR's zijn uitgevoerd, zijn ook de twee verschillende RT-PCR's gedaan voor typing (Figuur 5). Ter bevestiging van de specificiteit van het verkregen product is voor typerings-PCR T1 een probe ontwikkeld die past op het geamplificeerde RV-RNA van type VP4 (Tabel 2). Op het hoge besmettingsniveau werd met typerings-PCR T1 in alle matrices RV-RNA gedetecteerd. De detectie van RV-RNA in de oesters (pool en individueel) bleek vergelijkbaar met de gevoeligste detectie-PCR D4. Detectie in de overige matrices was over het geheel minder gevoelig dan PCR's D2, D3 en D4 (frambozen, sla, tomaten) of vergelijkbaar met PCR's D2, D3 en D4 (water). Op het lagere besmettingsniveau blijkt voor de meeste matrices T1 minder gevoelig dan de detectie-PCR's. Verder kon het RV-RNA in gepoolde oesters niet worden aangetoond met T1.

Bij typerings-PCR T2 is gebruikgemaakt van twee primer-sets VP7F/R (set 1) en een geoptimaliseerde set VP7FA/RA (set 2) (Tabel 2). Set 1 produceerde veel niet-specifieke bijproducten (bepaald aan de hand van visualisatie met gel-electroforese). Met set 2 was het specifieke RV-fragment beter te onderscheiden, maar nog steeds moeilijk detecteerbaar. Daarom is ter bevestiging een probe noodzakelijk, waarmee alleen het RV-specifieke amplicaat wordt gedetecteerd. Voor PCR T2 zijn een aantal probes ontwikkeld en getest, maar geen van de probes was in staat om een voldoende sterk specifiek signaal te geven.

3.3.3 *Rendement en detectielimiet van detectie- en typerings-PCR's*

De detectie-efficiëntie van de detectie- en typerings-PCR-methode is, net als voor HAV, bepaald op basis van de Ct-waarden verkregen met het RNA geïsoleerd uit kweeksupernatant (spike) en uit de gespikete onderzochte monsters. Omdat D1, D2 en de typerings-PCR's conventionele RT-PCR's zijn en er dus geen Ct-waarden verkregen worden, is alleen het rendement bepaald van detectie-PCR's D3 en D4 (Tabel 2). De hoogste rendementen met D3 en D4 werden verkregen met sla (gemiddeld 6%), gevolgd door water (2,2%) en frambozen (1,7%) (Tabel 5).

Tabel 5: Rendement van de RNA-isolatie van de real-time detectie-PCR's voor RV op artificieel besmette monsters

Matrix	Rendement RNA-isolatie (%)		
	Detectie-PCR NSP3		Gemiddelde D2 – D3
	D3	D4	
Frambozen	1,6	1,8	1,7
Sla	3	9	6
Zongedroogde tomaat	0,3	1,6	0,9
Oesters (pool)	0,7	0,01	0,3
Oesters (single)	1,0	0,4	0,7
Water	1,8	2,7	2,2

Tabel 6: Detectielimiet van de detectie- en typerings-RT-PCR's voor RV op artificieel besmette monsters

Matrix	Detectielimiet (TCID ₅₀)				
	Detectie-PCR				Typerings-PCR VP4
	D1	D2	D3	D4	T1
Frambozen	30	19	28	30	255
Sla	26	184	41	14	337
Zongedroogde tomaat	2525	165	30	53	300
Oesters (pool)	500	1403	1837	2750	2750
Oesters (single)	1867	30	143	165	165
Water	275	30	17	3	53

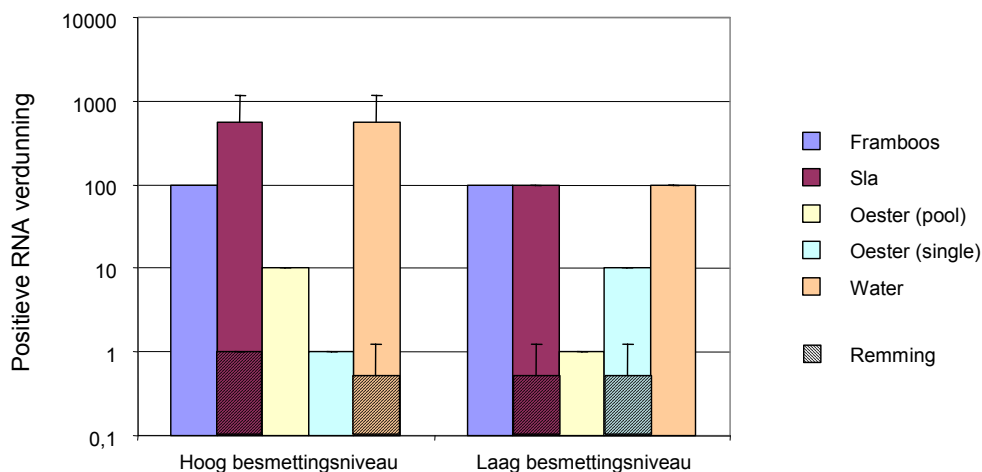
Behalve voor oesters liggen de rendementen die verkregen zijn met D4 wat hoger dan die verkregen met D3. Omdat de rendementen zijn bepaald op RNA uit dezelfde RNA-isolatie zou het rendement van de isolatie gelijk moeten zijn. De hier beschreven verschillen zijn mogelijk veroorzaakt doordat met D3 de detectie van RNA geïsoleerd uit de onderzochte matrices minder efficiënt is verlopen dan de detectie van RNA in het kweeksupernatant dat is gebruikt om artificiële besmettingen aan te brengen. Dit effect werd bij D4 minder gezien. Opvallend is dat in beide PCR's het rendement in de matrix 'sla' ondanks de remming hoger is dan uit de overige matrices. In vergelijking met de rendementen die verkregen zijn met de PCR's voor detectie van HAV-RNA zijn de rendementen voor RV-RNA voor de meeste matrices een stuk lager. Dit geeft aan dat de extractie van RV-RNA minder efficiënt is verlopen op de geteste matrices.

De detectielimiet van de detectie-PCR's en typerings-PCR voor RV werd bepaald aan de hand van de gemiddelde detectie van RV-RNA op het hoge en lage

besmettingsniveau (Tabel 6). De detectielimieten van de verschillende detectie-PCR's verschilden met ongeveer een factor 2 voor 5 gram frambozen tot een factor 80 voor 5 gram zongedroogde tomaten. Lage detectielimieten in sommige matrices geven aan dat de detectie van RV-RNA niet wordt bemoeilijkt door eventueel aanwezige remmende factoren. Zongedroogde tomaat gaf het grootste verschil in detectielimiet tussen PCR D1 (2525) en D3 (30). Daarnaast laat PCR D1 hoge detectielimieten zien in gepoolde en individueel onderzochte oesters en water, wat detectie van RV bij een laag besmettingsniveau in deze matrices bemoeilijkt. Voor typerings-PCR T1 varieerde de detectielimiet van 53 voor 0,5 liter kraanwater tot 2750 voor gepoolde oesters (2 g). Hiermee zijn de detectielimieten van de typerings-PCR T1 hoger dan de detectielimieten van de gevoeligste detectie-PCR's D3 en D4. Dit betekent dat in laag besmette monsters mogelijk geen RV-RNA gedetecteerd kan worden, waardoor typering niet mogelijk is.

3.4 Virusspecifieke remming

Om te onderzoeken of de remming van de RT-PCR specifiek is voor HAV en RV of dat ook remming optreedt bij detectie van andere virussen is naast HAV en RV ook de detectie van een recombinant mengovirus onderzocht (Figuur 8). Ook de mengovirus-PCR liet in de matrix 'sla' de meeste remming zien; drie van de vier replica's waren geremd, twee met een hoog en één met een laag besmettingsniveau. Verder was voor de mengovirus-RT-PCR één onverdund watermonster en één onverdund oestermonster geremd. Uit het feit dat de amplificatie van mengovirus het meest geremd wordt in slamonsters blijkt dat met de RNA-extractie factoren worden geïsoleerd die remmend werken op het verloop van RT-PCR's in het algemeen, en dus niet specifiek op de PCR's voor detectie en typering van HAV en RV.



Figuur 8: Detectie van mengovirus in verschillende artificiële besmette matrices op een hoog besmettingsniveau (1×10^5 TCID₅₀) en een laag besmettingsniveau (2×10^3 TCID₅₀)

Aangegeven is het gemiddelde van de hoogst positieve verdunning waarin een mengovirus PCR-sigitaal werd verkregen. De gearceerde balken geven de remming aan in de betreffende matrix.

3.5 Detectie van HAV en RV in natuurlijk besmet rivierwater

Om te zien hoe de verschillende detectie-RT-PCR's presteren op natuurlijk besmette monsters zijn twee watermonsters uit de Maas, die in 2004 positief bleken te zijn voor HAV en RV, opnieuw geanalyseerd op de aanwezigheid van HAV- en RV-RNA met de verschillende detectie-PCR's. Hoewel voor HAV in de gespikete monsters D2 het best presteerde, werd HAV-RNA in de rivierwatermonsters slechts in één van de twee monsters aangetoond met de conventionele PCR D1 in het onverdunde RNA (Tabel 7). Rotavirus, dat in 2004 ook in beide monsters detecteerbaar was, kon met geen van de detectie-PCR's worden aangetoond.

Tabel 7: Detectie van HAV-RNA in natuurlijk besmet rivierwater

Monster	Onderzochte verdunningen	D1	D2	D3
Positieve verdunning				
04-183	onv – 10x – 100x	onv	-	-
04-196	onv – 10x – 100x	-	-	-

4 Discussie

4.1 Efficiëntie van de detectie- en typerings-RT-PCR's

Met een detectielimiet van RT-PCR D2 die varieert van 11 TCID₅₀ voor frambozen en sla tot 83 TCID₅₀ voor oesters (individueel) is een efficiënte detectie-RT-PCR voor detectie van HAV in voedsel en water voorhanden. Een detectielimiet van 11 TCID₅₀ voor HAV komt ongeveer overeen met een detectielimiet van 440 genoomkopieën, waarbij gerekend wordt met een verhouding van 1 infectieus virus per 60 HAV-deeltjes (Costafreda et al., 2006). De detectielimiet van de detectie-PCR D2 is aanzienlijk lager dan die van de meest gevoelige typerings-PCR T3 (Tabel 4). Gekeken naar RV liggen de gemiddelde detectielimieten van de twee gevoeligste RT-PCR's D3 en D4 voor RV dicht bij elkaar. Met een variatie van 3 TCID₅₀ voor 0,5 liter water tot 165 TCID₅₀ voor oesters (individueel; 250 mg) zijn een tweetal efficiënte detectie-RT-PCR's voor detectie van RV in voedsel en water voorhanden. De detectielimiet van de twee gevoeligste PCR's D3 en D4 zijn aanzienlijk lager dan die van de meest gevoelige typerings-PCR T1 (Tabel 6) zoals ook te zien bij HAV. Dit kan de moleculaire tracerings van het virus van patiënt naar de bron (voedsel) bemoeilijken, omdat besmettingsniveaus vaak laag zijn. Virussen die aanwezig zijn in of op voedsel kunnen zich niet repliceren, omdat ze levende gastheercellen nodig hebben voor hun replicatie, en zullen daarom op het voedsel in aantal alleen maar afnemen onder invloed van milieufactoren zoals temperatuur (Bertrand et al., 2012). In schelpdieren die een uitbraak van hepatitis A hebben veroorzaakt zijn de aantallen HAV-genoomkopieën ongecorrigeerd geschat op 10 tot 100 per gram (Pintó et al., 2009). Dat zijn aantallen die mogelijk met de detectie-PCR nog wel gedetecteerd kunnen worden, maar met de typerings-PCR mogelijk niet.

De detectielimieten van de meest gevoelige PCR's voor detectie van HAV (D2) en RV (D3 en D4) zijn van vergelijkbare grootte en liggen, behalve voor oesters, tussen 3 en 56 infectieuze virusdeeltjes per 5 gram voedsel of 0,5 liter water. Voor individueel onderzochte oesters was de detectielimiet 83 virusdeeltjes per 250 mg voor detectie van HAV en 143 en 165 per 250 mg voor detectie van RV. De detectielimiet van HAV en RV in gepoolde oesters was met respectievelijk 1837 en 2750 en 5500 virusdeeltjes per 2 gram een factor 10 tot 100 hoger dan die van individuele oesters. Voor zover bekend is RV met een ID₅₀ (de dosis waarbij de helft van de blootgestelde personen een infectie oploopt) tussen 1 en 10 een virus met een van de laagste dosis-responsrelaties (Teunis en Havelaar, 2000; Todd et al., 2008). Dit betekent dat als met de meest optimale detectie-PCR voor RV geen RV-RNA kan worden aangetoond, toch voldoende virus op de betreffende voedselmatrix aanwezig kan zijn om een infectie te geven. Over dosis-responsrelaties voor HAV zijn nagenoeg geen kwantitatieve gegevens beschikbaar (Teunis en Havelaar, 2000; Todd et al., 2008; Ward et al., 1958). Voor HAV zijn nog minder gegevens gepubliceerd over dosis-responsrelaties. Met het gegeven dat de infectieuze dosis laag is, is deze geschat op 10 – 100 (Teunis en Havelaar, 2000; Todd et al., 2008). Verder bleek uit een risicoschatting die is uitgevoerd naar aanleiding van een uitbraak van HAV door consumptie van coquinkokkels (Pintó et al., 2009) dat inname van 72 infectieuze HAV-virusdeeltjes resulteerde in een geschatte infectiekans van 11%, en een dosis van 420 infectieuze virusdeeltjes in een infectiekans van 36%. Aannemende dat de infectiekans proportioneel is aan de dosis, betekent

dit dat consumptie van schelpdieren met een virusconcentratie rond de detectielimiet een infectiekans van een paar procent met zich meebrengt.

Hoewel detectie van HAV en RV in sla vrij efficiënt is, is dit tevens het type voedsel waarin de meeste remming van de RT-PCR is gevonden (Figuur 6 en 7). Aangezien voor zowel HAV en rotavirus als de mengovirus RT-PCR een vergelijkbare remming werd gezien, lijkt dit niet een probleem specifiek voor HAV of RV te zijn maar van de RNA-isolatie van sla in het algemeen waarbij remmende stoffen worden meegeïsoleerd. Verdere optimalisatie van de RNA-isolatiemethode op deze matrix zal helpen virusdetectie verder te verbeteren. Zo zou de extra zuiveringsstap die ook bij frambozen en zongedroogde tomaten is uitgevoerd, een extractie met chloroform/butanol, kunnen bijdragen aan een betere verwijdering van stoffen die zorgen voor een inefficiënt verloop van de PCR. Uit de resultaten met frambozen en zongedroogde tomaten bleek dat het verlies van RNA met deze extra zuiveringsstap gering is.

Bij veel in de literatuur beschreven protocollen voor virusdetectie in schelpdieren worden schelpdieren per pool onderzocht op de aanwezigheid van virus. Ook de in ontwikkeling zijnde internationale standaard voor virusdetectie in voedsel schrijft voor om schelpdieren in een pool van tenminste 10 schelpdieren te onderzoeken (Lees en TAG4, 2010). Zeker bij lage besmettingsniveaus zou dit wel eens een negatief effect kunnen hebben op het aantonen van virus, omdat in een pool verdunning optreedt van het aanwezige RNA als slechts een deel van de schelpdieren positief is. Dit blijkt ook uit het feit dat in de individueel onderzochte oesters vaker viraal RNA is aangetoond en in verdere verdunningen dan in oesters die gepoold zijn (Figuur 6 en 7). Dit is ook gebleken uit een onderzoek waarin dit voor zowel natuurlijk besmette oesters als mosselen is onderzocht voor verschillende enterale virussen (Rutjes et al., In preparation). Om in geval van een uitbraaksituatie een grotere kans te hebben om viraal RNA te detecteren en/of te typeren is het daarom aan te raden schelpdieren individueel te onderzoeken in plaats van in een pool.

4.2 **Artificieel versus natuurlijk besmette monsters**

Het in dit rapport beschreven onderzoek naar de meest efficiënte methode voor detectie van virussen in moeilijke matrices, zoals voedsel en water, is gebaseerd op artificieel besmette monsters omdat natuurlijk besmette voedselproducten met HAV en RV nauwelijks of niet te verkrijgen zijn in Nederland. Wel zijn een tweetal archiefmonsters van rivierwater uit 2004, die destijds positief bleken te zijn voor HAV en RV, geanalyseerd met de verschillende detectie- en typerings-PCR's. Hoewel voor HAV de real-time detectie-PCR D2 in de artificieel besmette monsters voor alle matrices het beste bleek te werken, kon HAV-RNA alleen gedetecteerd worden met de conventionele RT-PCR D1 in slechts één van de twee monsters. In 2004 waren beide monsters met PCR D1 positief gevonden en is het PCR-product ter bevestiging gesequenced. Typering was toen op beide monsters niet mogelijk in verband met het ontbreken van een signaal in de toen uitgevoerde typerings-PCR's T2 en T3. Hoewel bij de spike-experimenten de detectie-PCR D2 in alle gevallen het meest gevoelig was, blijkt uit dit onderzoek van natuurlijk besmette watermonsters dat resultaten niet één op één zijn te vertalen. RV-RNA kon destijds worden aangetoond met detectie-PCR D2. In de nieuwe RNA-extracten kon zowel met PCR D2 als met de gevoeligere PCR's D3 en D4 geen RV-RNA worden aangetoond. Mogelijk heeft het langdurig bewaren van het monster bij -80 °C geleid tot afbraak van HAV- en RV-RNA.

Van 84 oesters en 84 mosselen die zijn verzameld in klasse A kweekgebieden in de Oosterschelde in 2007-2008 is onderzocht met detectiemethode D2 of HAV-RNA kon worden aangetoond in individuele maagdarmkanalen van deze schelpdieren. In geen van de onderzochte monsters kon HAV-RNA worden aangetoond. Wel is RNA aangetroffen van hepatitis E-virus, NoVII en parechovirus en DNA van adenovirus in prevalenties variërend van 1 tot 5% (Rutjes et al., In preparation). Hoewel duidelijk zal zijn dat HAV-RNA beneden het detectieniveau aanwezig was, is met een detectielimiet van ongeveer 3300 genoomkopieën (29 PFU / 83 TCID₅₀) van HAV niet uit te sluiten dat consumptie van deze schelpdieren gezondheidsrisico's, zo ook het krijgen van een HAV-infectie, met zich meebrengt.

Zoals uit de rendementsberekeningen is gebleken (Tabel 3), is het rendement van de RNA-isolatie van HAV in laag besmette zongedroogde tomaten relatief hoog (7 – 10%), wat betekent dat RNA efficiënt kon worden geïsoleerd en dat de aanwezigheid van storende componenten van de RT-PCR beperkt was. In de voedselgerelateerde uitbraak van hepatitis A in 2010 zijn 81 monsters onderzocht van verschillende producten, zoals (semi-)gedroogde tomaten, al dan niet gemarineerd, verwerkt of in olie. In geen van de onderzochte tomaten kon HAV-RNA worden aangetoond (Petrignani et al., 2010b). Welk protocol gebruikt is voor de RNA-isolatie en detectie van HAV staat niet beschreven, zodat niet duidelijk is of de methode die in dit rapport staat beschreven efficiënter is dan de methode die gebruikt is voor het uitbraakonderzoek. Hoe de hier beschreven methode presteert als natuurlijk besmette monsters worden geanalyseerd is niet onderzocht omdat dergelijke monsters niet beschikbaar waren.

4.3 **Bruikbaarheid voor moleculaire tracerings van bron naar patiënt**

Voor moleculaire tracerings naar de oorspronkelijke besmettingsbron van een uitbraak van hepatitis A-virus en rotavirus is het noodzakelijk dat virus geïsoleerd uit de patiënt en virus geïsoleerd uit de bron met elkaar vergeleken kunnen worden om vast te stellen of ze volledig identiek zijn. Alleen dan kan, in samenhang met epidemiologisch onderzoek, met meer zekerheid worden vastgesteld of de verdachte bron waarschijnlijk ook de uitbraak heeft veroorzaakt. Niet elk deel van het virusgenoom is geschikt voor deze vergelijking. Sommige delen van het virale genoom zijn te geconserveerd, wat betekent dat dit deel in verschillende typen virussen identiek kan zijn, zoals de 5'NCR bij HAV en in geval van RV delen van segment 1 (VP1), segment 6 (VP6) en segment 7 (NSP3) – die daarom juist uiterst geschikt zijn voor een detectie-RT-PCR (Figuur 1 en 2). Andere delen bevatten meer variatie en zijn daarom uitermate geschikt voor zogenaamde typering, bijvoorbeeld VP1, VP2, VP3 en 2A en 2B voor HAV (Figuur 3) en VP4 (P-type) en VP7 (g-type) voor RV (Figuur 4 en 5). In de huidige studie zijn voor HAV drie verschillende RT-PCR's met elkaar vergeleken, VP2-VP3 (T1), VP3-VP1 (T2) en VP1-2A (T3). De beste resultaten voor alle geteste matrices werden verkregen met VP1-2A (T3), de typerings-RT-PCR die door het LIS en de NVWA momenteel voor de humane diagnostiek wordt gebruikt. Hoewel deze VP1-2A PCR een factor 2 – 120 minder gevoelig bleek te zijn dan de detectie-PCR D2, lijkt deze RT-PCR op dit moment het meest geschikt voor de typering van HAV in uitbraaksituaties. Voor RV zijn twee verschillende RT-PCR's met elkaar vergeleken, VP4 (T1) en VP7 (T2). Op dit moment kunnen de resultaten van deze PCR's niet worden vergeleken door het ontbreken van een specifieke probe op VP7. Vooralsnog werden de beste resultaten verkregen met VP4, die door het LIS op dit moment gebruikt wordt

om in de humane diagnostiek het RV P-type aan te tonen. De typerings-PCR is een factor 1 – 10 minder gevoelig dan de detectie-PCR D3, maar het verschil in gevoeligheid tussen detectie- en typerings-PCR is minder groot dan bij HAV. Typering van RV zou in de praktijk daarom minder vaak een probleem moeten zijn dan typering van HAV. Het feit dat typerings-PCR's minder gevoelig zijn dan detectie-PCR's is niet beperkt tot HAV en RV. Ook voor enterovirussen zijn de bij ons bekende typerings-PCR's vaak beduidend minder gevoelig dan de detectie-PCR's, zoals bijvoorbeeld is gebleken bij detectie en typering van enterovirus en parechovirus in rioolwaters (ongepubliceerde data).

4.4 Urgentie van optimale virusdetectie in voedsel

Het risico op een HAV-infectie is op dit moment in Nederland voornamelijk reis-gerelateerd, maar het virus kan vanwege de globalisering van de voedselmarkt ook via voedsel geïntroduceerd worden (Boxman et al., 2012; Ercsey-Ravasz et al., 2012; Verhoef et al., 2011). Gezien de veranderingen in de voedselmarkt kunnen HAV-besmettingen van voedsel leiden tot internationale uitbraken met internationale consequenties, zoals is gebleken bij de recente uitbraak veroorzaakt door semi-gedroogde tomaten (Petrignani et al., 2010a). Verder blijkt uit recent onderzoek dat de Nederlandse populatie die gevoelig is voor een infectie met HAV steeds ouder wordt. De populatie geboren na de Tweede Wereldoorlog heeft een significant lagere HAV-seroprevalentie dan de populatie die geboren is in of voor de Tweede Wereldoorlog (Verhoef et al., 2011). Uit deze ontwikkelingen, samen met feit dat hepatitis A ernstiger verloopt bij ouderen, blijkt de urgentie van het vroegtijdig opsporen van een (internationale) uitbraak van hepatitis A-virus. Om vroegtijdige opsporing mogelijk te maken zijn gevoelige detectie- en typeringsmethoden onmisbaar.

5 Aanbevelingen

1. Vergelijking van verschillende detectie- en typerings-PCR's op natuurlijk besmette HAV- en RV-positieve voedsel- en omgevingsmonsters, al dan niet in relatie tot hepatitis A- en rotavirus-geïnfecteerde patiënten, is wenselijk. De isolatie van viraal RNA uit artificieel besmette monsters is anders dan die uit natuurlijk besmette monsters, zoals is gebleken uit het onderzoek naar HAV-positieve rivierwatermonsters.
2. Om bronopsporing bij (internationale) voedselgerelateerde virusuitbraken vaker te laten slagen is verdere optimalisering van HAV-typering op fragment VP3-2A en van RV-typering op VP4 (segment 3) en VP7 (segment 9) aan te bevelen. Deze typerings-PCR's zijn minder gevoelig dan de meest gevoelige detectie-PCR's, waardoor met deze PCR's typing en daardoor bronopsporing vaak niet mogelijk zal zijn.
3. Verdere optimalisatie van de isolatiemethode uit sla is nodig om de efficiëntie van de detectie- en typerings-RT-PCR's van HAV en RV te verbeteren. Dit kan bijvoorbeeld door een extra zuiveringsstap toe te passen. Hoewel zowel de detectie- als de typerings-PCR voor HAV op sla relatief efficiënt verliep, werd in deze matrix ook de meeste remming van de RT-PCR gevonden.
4. Om te bepalen of de horizontale CEN-TAG4-methode ook toepasbaar is voor voedselmatrices die niet in de standaard beschreven staan, maar die mogelijk wel bij een voedselgerelateerde uitbraak betrokken zouden kunnen zijn, zouden deze voedsels met de CEN-methode getest moeten worden. Zo bleek dat HAV-RNA uit zongedroogde tomaten in olie efficiënt geïsoleerd kon worden met de opwerkingsmethode voor frambozen. Dit zou voor andere voedselmatrices die mogelijk een rol zouden kunnen spelen ook onderzocht moeten worden.

6 Dankwoord

De auteurs danken Erwin Duizer, Bas van der Veer (RIVM-LIS) en Ingeborg Boxman (NVWA Zutphen) voor de medewerking aan deze vergelijkingsstudie en het kritisch doorlezen van het manuscript. Zonder de door hen aangeleverde informatie over gebruikte primers en probes zou deze vergelijking niet mogelijk zijn geweest.

7 Literatuur

Amvrosieva TV, Paklonskaya NV, Biazruchka AA, Kazinets ON, Bohush ZF, Fisenko EG (2006) Enteroviral infection outbreak in the Republic of Belarus: principal characteristics and phylogenetic analysis of etiological agents. *Central European Journal of Public Health* 14: 67-73

Anonymous (2000) Foodborne outbreak of Group A rotavirus gastroenteritis among college students--District of Columbia, March-April 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 49: 1131-1133

Anonymous (2008) *Viruses in Food: Scientific advice to support risk management activities*. World Health Organization//Food and Agriculture Organization of the United Nations

Bertrand I, Schijven JF, Sanchez G, Wyn-Jones P, Ottoson J, Morin T, Muscillo M, Verani M, Nasser A, de Roda Husman AM, Myrmel M, Sellwood J, Cook N, Gantzer C (2012) The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *J Appl Microbiol* 112: 1059-1074

Bosch A, Sanchez G, LeGuyader F, Vanaclocha H, Haugarreau L, Pinto RM (2001) Human enteric viruses in Coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Water Science and Technology* 43: 61-65

Boxman IL, te Loeke NA, Klunder K, Hagele G, Jansen CC (2012) Surveillance study of hepatitis A virus RNA on fig and date samples. *Appl Environ Microbiol* 78: 878-879

Boxman IL, Tilburg JJHC, te Loeke NAJM, Vennema H, de Boer E, Koopmans M (2007) An efficient and rapid method for recovery of norovirus from food associated with outbreaks of gastroenteritis. *Journal of Food Protection* 70: 504-508

Costafreda MI, Bosch A, Pinto RM (2006) Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 72: 3846-3855

De Roda Husman AM, Lodder-Verschoor F, van den Berg H, Le Guyader F, van Pelt H, van der Poel W, Rutjes SA (2007) Rapid virus detection procedure for molecular tracing of shellfish associated with disease outbreaks. *Journal of Food Protection* 70: 967-974

De Wit MA, Koopmans MP, van Duynhoven YT (2003) Risk factors for norovirus, Sapporo-like virus, and group A rotavirus gastroenteritis. *Emerging Infectious Diseases* 9: 1563-1570

Dentinger CM, Bower WA, Nainan OV, Cotter SM, Myers G, Dubusky LM, Fowler S, Salehi ED, Bell BP (2001) An outbreak of hepatitis A associated with green onions. *The Journal of Infectious Diseases* 183: 1273-1276

Desselberger U, Wolleswinkel-van den Bosch J, Mrukowicz J, Rodrigo C, Giaquinto C, Vesikari T (2006) Rotavirus types in Europe and their significance for vaccination. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 25: S30-S41

Di Bartolo I, Monini M, Losio MN, Pavoni E, Lavazza A, Ruggeri FM (2011) Molecular characterization of noroviruses and rotaviruses involved in a large outbreak of gastroenteritis in Northern Italy. *Applied and Environmental Microbiology* 77: 5545-5548

Divizia M, Gabrieli R, Donia D, Maculuso A, Bosch A, Guix S, Sánchez G, Villena C, Pintó RM, Palombi L, Buonomo E, Cenko F, Leno L, Bebeci D, Bino S (2004) Waterborne gastroenteritis outbreak in Albania. *Water Science and Technology* 50: 57-61

Donnan EJ, Fielding JE, Gregory JE, Lalor K, Rowe S, Goldsmith P, Antoniou M, Fullerton KE, Knope K, Copland JG, Bowden DS, Tracy SL, Hogg GG, Tan A, Adamopoulos J, Gaston J, Vally H (2012) A multistate outbreak of hepatitis A associated with semidried tomatoes in Australia, 2009. *Clin Infect Dis* 54: 775-781

EFSA (2009) The Community Summary Report on Food-borne Outbreaks in the European Union in 2007. *EFSA Journal*: 271

EFSA (2011) Scientific Opinion on An update on the present knowledge on the occurrence and control of foodborne viruses. *EFSA Journal* 9: 2190

EFSA (2012) Norovirus (NoV) in oysters: methods, limits and control options. *EFSA Journal* 10: 2500

Ercsey-Ravasz M, Toroczkai Z, Lakner Z, Baranyi J (2012) Complexity of the international agro-food trade network and its impact on food safety. *PLoS One* 7: e37810

Falkenhorst G, Krusell L, Lisby M, Madsen SB, Böttiger BE, Molbak K (2005) Imported frozen raspberries cause a series of norovirus outbreaks in Denmark, 2005. *Euro Surveillance* 10: pii=2795

Ferreira FF, Guimaraes FR, Fumian TM, Victoria M, Vieira CB, Luz S, Shubo T, Leite JP, Miagostovich MP (2009) Environmental dissemination of group A rotavirus: P-type, G-type and subgroup characterization. *Water Sci Technol* 60: 633-642

Gallay A, De Valk H, Cournot M, Ladeuil B, Hemery C, Castor C, Bon F, Mégraud F, Le Cann P, Desenclos JC (2006) A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, Fance, 2000. *Clinical Microbiology and Infection* 12: 561-570

Hauri AM, Schimmelpfennig M, Walter-Domes M, Letz A, Diedrich S, Lopez-Pila J, Schreier E (2005) An outbreak of viral meningitis associated with a public swimming pond. *Epidemiology and Infection* 133: 291-298

Hoebe CJP, Vennema H, de Roda Husman AM, van Duynhoven YTHP (2004) Norovirus outbreak among primary school children who had played in a recreational water fountain. *Journal of Infectious Diseases* 189: 699-705

Kukkula M, Arstila P, Klossner ML, Maunula L, Bonsdorff CH, Jaatinen P (1997) Waterborne outbreak of viral gastroenteritis. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases* 29: 415-418

Lees D, TAG4 CW (2010) International standardisation of a method for detection of human pathogenic viruses in molluscan shellfish. *Food and Environmental Virology* 2: 146-155

Li TC, Chijiwa K, Sera N, Ishibashi T, Etoh Y, Shinohara Y, Kurata Y, Ishida M, Sakamoto S, Takeda N, Miyamura T (2005) Hepatitis E virus transmission from wild boar meat. *Emerging Infectious Diseases* 11: 1958-1960

Mayr C, Strohe G, Contzen M (2009) Detection of rotavirus in food associated with a gastroenteritis outbreak in a mother and child sanatorium. *International Journal of Food Microbiology* 135: 179-182

Parashar UD, Gibson CJ, Bresee JS, Glass RI (2006) Rotavirus and severe childhood diarrhea. *Emerg Infect Dis* 12: 304-306

Petrignani M, Harms M, Verhoef L, van Hunen R, Swaan C, van Steenberg J, Boxman I, Peran i Sala RO, H.J., Vennema H, Koopmans M, van Pelt W (2010a) Update: a food-borne outbreak of hepatitis A in the Netherlands related to semi-dried tomatoes in oil, January-February 2010. *Euro Surveillance* 15: :pii=19572

Petrignani M, Verhoef L, van Hunen R, Swaan C, van Steenberg J, Boxman I, Ober HJ, Vennema H, Koopmans M (2010b) A possible foodborne outbreak of hepatitis A in the Netherlands, January-February 2010. *Euro Surveillance* 15: (11):pii=19512

Pintó RM, Costafreda MI, Bosch A (2009) Risk assessment in shellfish-borne outbreaks of hepatitis A virus. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 7350-7355

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. *Journal of Applied Microbiology* 107: 97-105

Rutjes SA, van den Berg HHJL, Lodder-Verschoor F, de Roda Husman AM (In preparation) Presence of human pathogenic viruses in shellfish.

Rutjes SA, Lodder-Verschoor F, de Roda Husman AM (2009) Harmonisatie van virusdiagnostiek in humane, voedsel- en omgevingsmonsters: Inventarisatie van methoden toegepast door VWA en RIVM. RIVM Briefrapport 330371003

Schmid D, Fretz R, Buchner G, König C, Perner H, Sollak R, Tratter A, Hell M, Maass M, Strasser M, Allerberger F (2008) Foodborne outbreak of hepatitis A, November 2007-January 2008, Austria. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 27: DOI 10.1007/s10096-10008-10633-10090

Tei S, Kitajima N, Takakashi K, Mishiro S (2003) Zoonotic transmission of hepatitis E virus from deer to human beings. *Lancet* 362: 371-373

Teunis PF, Havelaar AH (2000) The Beta Poisson dose-response model is not a single-hit model. *Risk Anal* 20: 513-520

Todd EC, Greig JD, Bartleson CA, Michaels BS (2008) Outbreaks where food workers have been implicated in the spread of foodborne disease. Part 4. Infective doses and pathogen carriage. J Food Prot 71: 2339-2373

Verhoef L, Boot HJ, Koopmans M, Mollema L, van der Klis F, Reimerink J, van Pelt W (2011) Changing risk profile of hepatitis A in The Netherlands: a comparison of seroprevalence in 1995-1996 and 2006-2007. Epidemiology and Infection: doi:10.1017/S0950268810003043

Ward R, Krugman S, Giles JP, Jacobs AM, Bodansky O (1958) Infectious hepatitis; studies of its natural history and prevention. N Engl J Med 258: 407-416

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl