



# Het "Nieuwe Influenzavirus A (H1N1) 2009" in riool- en oppervlaktewater

**BTO 2011.004**  
**Februari 2011**

# Het “Nieuwe Influenzavirus A (H1N1) 2009” in riool- en oppervlaktewater

**BTO 2011.004**  
**Februari 2011**

© 2010 KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.



# Colofon

**Titel**

Het “Nieuwe Influenzavirus A (H1N1) 2009” in riool- en oppervlaktewater

**Projectnummer**

B111571-109

**Onderzoeksprogramma**

Vrije ruimte BTO, programma Microbiologie: verspreiding van influenzavirus H1N1

**Projectmanager**

Niels Dammers

**Opdrachtgever**

BTO

**Kwaliteitsborger**

Gertjan Medema

**Auteur**

Leo Heijnen

**Verzonden aan**

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar



# Voorwoord

Hoogheemraadschap “De Stichtse Rijnlanden” wordt bedankt voor het faciliteren van het nemen van monsters bij RWZI Utrecht en Prof. Dr. R.A.M. Fouchier (afdeling virologie Erasmus Medisch Centrum, Rotterdam) wordt bedankt voor het ter beschikking stellen van geïnactiveerd influenza A (H1N1) 2009 virus t.b.v. dit onderzoek.



# Samenvatting

Besmetting met influenzavirussen geschiedt vooral via rechtstreeks contact en via de lucht. Tijdens de influenzapandemie in 2009, die werd veroorzaakt door het nieuwe influenza A (H1N1) 2009 virus, hadden ongewoon veel mensen (25%) ook diarree en maag-darmklachten. Naar verwachting kon dit virus zich vermeerderen in het maag-darmkanaal, via de feces het lichaam verlaten en in rioolwater terecht komen. In principe zou zo via de RWZI ook het oppervlaktewater kunnen worden besmet. Tijdens de epidemie konden snel PCR methoden worden ontwikkeld en ingezet om deze virussen in riool- en oppervlaktewater te detecteren. Daardoor kon inzicht worden verkregen in de verspreiding van influenzavirussen via deze waterroute. Tijdens de epidemie van 2009 bleek deze route niet relevant: het nieuwe influenza A (H1N1) 2009 virus werd niet aangetoond in riool- en oppervlaktewater.

## **Belang: kennis over verspreiding versterkt veiligheid drinkwater**

Voor drinkwaterbedrijven die oppervlaktewater gebruiken als grondstof is het belangrijk te weten welke ziekteverwekkende micro-organismen in het oppervlaktewater voorkomen en de productie van veilig drinkwater kunnen bedreigen. Over de mogelijke verspreiding van influenzavirussen via de waterketen was nog zeer weinig bekend.

## **Aanpak: nieuwe detectiemethoden ontwikkeld en toegepast**

De influenzapandemie van 2009 werd veroorzaakt door een virus dat het lichaam via de fecale route kan verlaten. De verwachting bestond dat een zeer groot deel van de bevolking geïnfecteerd zou raken, dit maakte het mogelijk verspreiding via de waterketen te bestuderen. Om influenzavirussen in water te kunnen aantonen, zijn eerder in het BTO ontwikkelde methoden toegepast om micro-organismen uit grote volumes water te concentreren (Hemoflow en Centricon). Voor de specifieke detectie van influenzavirussen zijn methoden ontwikkeld voor extractie van het erfelijk materiaal (RNA) van influenzavirussen uit geconcentreerde watermonsters, gebaseerd op de aanwezige ervaring met andere micro-organismen. Er zijn RT-PCR (*reverse transcriptase polymerase chain reaction*)-methoden toegepast op basis van materiaal van de Erasmus Universiteit. Bij RT-PCR-methoden wordt het RNA van het virus eerst omgezet in DNA, waarna met een polymerase ketting reactie (PCR) een kenmerkend deel van het virus-RNA wordt vermenigvuldigd en gedetecteerd. Er zijn twee RT-PCR methoden toegepast: één methode specifieke detectie van "alle" influenza-A-virussen en één voor exclusieve detectie van het op dat moment pandemische influenza A (H1N1) 2009 virus. De methoden zijn tijdens de epidemie toegepast op monsters van rioolwater-influent, -effluent en rivierwater. Op tien tijdstippen verdeeld over vier maanden zijn monsters genomen bij rioolwaterzuiveringsinstallatie RWZI Utrecht, die belast wordt met rioolwater van een groot aantal huishoudens, en van oppervlaktewater uit de rivier de Vecht, waarop deze RWZI zijn gezuiverde water loost. Om te bepalen of de methoden geschikt waren voor analyse van riool- en oppervlaktewater zijn ook monsters geanalyseerd waaraan influenza A (H1N1) 2009 virus was toegevoegd (*spike-monsters*).

## **Resultaten: wel influenza A, geen pandemische influenza A (H1N1) 2009 in riool- en oppervlaktewater**

De analyse van *spike-monsters* toonde aan dat de toegepaste methoden geschikt waren voor de analyse van rioolwater. Analyse van oppervlaktewater werd vaak gehinderd door componenten uit de monstermatrix die RT-PCR-reacties remmen.

Influenza A virus werd gevonden in vier monsters uit de rivier de Vecht en in één RWZI influentmonster. Het pandemische influenza A (H1N1) 2009 virus werd niet aangetoond in riool- of rivierwater. De detectie van influenza A bevestigt dat de gehanteerde methoden geschikt zijn om influenzavirussen aan te tonen in watermonsters. Het is bekend dat watervogels een reservoir vormen voor influenza A virussen in het milieu. Mogelijk vormen watervogels ook de bron voor de in dit onderzoek aangetoonde influenza A virussen. Dat het pandemische influenza A (H1N1) 2009 virus niet is aangetoond, wijst erop dat verspreiding van dit virus via de waterketen geen relevante route vormde tijdens de epidemie van 2009.



### **Implementatie: verspreiding pandemische influenza A (H1N1) via waterketen niet relevant**

Met de in dit onderzoek ontwikkelde methoden om influenza-A-virussen in watermonsters aan te tonen is geen pandemische influenza A (H1N1) 2009 virus gedetecteerd in riool- of oppervlaktewater. Naar verwachting waren de concentraties van dit virus in riool- en oppervlaktewater tijdens de (milde) epidemie van 2009 dus zeer laag, zodat het niet aannemelijk is dat relevante concentraties van dit virus de innamepunten van waterbedrijven hebben bereikt.

Dit onderzoek illustreert de kracht van moleculair-biologische technieken: het was mogelijk om zeer snel methoden te ontwikkelen om zeer specifiek bepaalde (nieuwe) ziekteverwekkende micro-organismen aan te tonen. Zo was het mogelijk snel inzicht te krijgen in de betekenis van zulke nieuwe micro-organismen voor de waterindustrie.

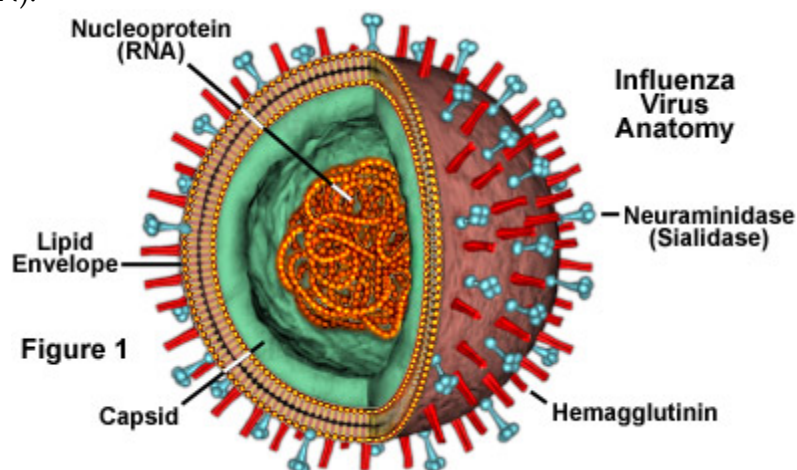
# Inhoud

<b>Voorwoord</b>	<b>1</b>
<b>Samenvatting</b>	<b>3</b>
<b>Inhoud</b>	<b>5</b>
<b>1 Inleiding</b>	<b>7</b>
<b>2 Materiaal en methoden</b>	<b>11</b>
2.1 Watermonsters	11
2.2 Extractie van RNA	12
2.2.1 Nuclisens kit van Biomerieux	12
2.2.2 "Nucleospin RNA virus F Kit" van Macherey-Nagel	12
2.2.3 RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit van MoBio	12
2.3 Kwantitatieve RT-PCR	13
2.3.1 Primers en probes	14
2.3.2 Kalibratielijn	15
2.3.3 Controles	15
2.4 Klonering van RT-PCR producten en sequentie analyse	16
<b>3 Resultaten</b>	<b>17</b>
3.1 Ontwikkeling van methoden voor detectie van influenzavirus in watermonsters met kwantitatieve RT-PCR methoden	17
3.1.1 RT-PCR methoden	17
3.1.2 Extractie van RNA	17
3.1.3 Analyse van Spike monsters	18
3.2 Verloop van de epidemie in Nederland en monstername data	20
3.3 Resultaten van de influenzavirus metingen	22
3.3.1 Influenza A en "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" in riool- en rivierwater	22
3.4 Sequentie analyse van RT-PCR fragmenten	22
3.4.1 RT-PCR A sequenties	22
<b>4 Discussie</b>	<b>27</b>
4.1 Methoden	27
4.1.1 Detectiegrens van de methoden	28
4.2 Monstername data	29
4.3 Aanwezigheid van Influenza A virus in oppervlakte- en rioolwater	29
4.4 Aanwezigheid van het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus in oppervlakte- en rioolwater	29

<b>5</b>	<b>Literatuur</b>	<b>31</b>
I	Bijlage: opbrengsten bij spike monsters	1
II	Bijlage: influenzavirus metingen	3

# 1 Inleiding

Influenzavirussen (figuur 1) behoren tot de Orthomyxovirussen. Deze virussen bezitten RNA als erfelijk materiaal, dit RNA codeert voor 11 eiwitten. Het virale RNA is verpakt in een capsid-eiwit, de samenstelling van dit capsid-eiwit bepaald het type: A, B of C. Het capsid wordt omsloten door een lipide-membraan met hierin de spike-eiwitten hemagglutinine (H) en neuraminidase (N).



Figuur 1. Schematische weergave van een influenza virusdeeltje.

Overgenomen van: <http://micro.magnet.fsu.edu/cells/viruses/influenzavirus.html>

Type A influenzavirussen zijn van oorsprong virussen die vooral bij (water)vogels voorkomen, deze virussen lijken de bron te vormen voor influenza-A virussen die bij verschillende zoogdieren (o.a. mens, paard, varken) tot infectie kunnen leiden. Waarschijnlijk is het influenza-B virus tijdens de evolutie bij de mens gevormd vanuit een circulerend influenza-A virus. Influenza-B virussen komen vrijwel alleen bij de mens voor. Influenza-C virussen komen eveneens vooral bij mensen voor en zijn klinisch gezien van zeer beperkt belang. Door variaties in de samenstelling van de hemagglutinine (H) en neuraminidase (N) eiwitten van influenza-A virussen kunnen momenteel 16 verschillende H subtypen en 7 verschillende N subtypen worden onderscheiden. Verschillende combinaties van H- en N-eiwitten zijn mogelijk waarvan slechts een beperkt aantal combinaties circuleert in de menselijke populatie (o.a. H1N1, H1N2 en H3N2).

Influenzavirussen veroorzaken luchtweginfecties bij de mens, infecties die kunnen resulteren in hoesten, neusverkoudheid, hoofdpijn, malaise en koorts met soms ernstige complicaties. Overdracht van infecties ten gevolge van influenzavirussen vinden bij mensen vooral plaats via de respiratoire route door overdracht van besmette waterdruppeltjes die worden afgescheiden uit de luchtwegen van een besmette persoon. Verspreiding van deze waterdruppels kan vooral plaats vinden door hoesten, niezen of praten door een besmette persoon (bron voor bovenstaande informatie: [http://www.rivm.nl/cib/infectieziekten-A-Z/infectieziekten/Influenza/index.jsp#index\\_14](http://www.rivm.nl/cib/infectieziekten-A-Z/infectieziekten/Influenza/index.jsp#index_14)).

Over de mogelijke verspreiding van influenzavirussen via de waterketen is weinig bekend. Er zijn geen ziektegevallen bekend van mensen die via de consumptie van drinkwater zijn besmet met influenzavirussen. Van influenza-A virussen die voorkomen bij (water)vogels en laag-pathogeen zijn voor mensen (H5N1) is bekend dat deze vogels influenzavirus via de feces uitscheiden en daardoor zorgen voor belasting van het oppervlaktewater met deze virussen.

Uit onderzoek van het RIVM (Schijven and De Roda Husman, 2005) kon geconcludeerd worden dat het risico op infectie via drinkwater, dat wordt bereid uit oppervlaktewater dat belast is met influenzavirus H5N1 uit watervogels ("vogelgriep"), bij een goed werkende zuivering verwaarloosbaar klein is. Ook het risico van recreatief gebruik van oppervlaktewater waarin besmette watervogels verblijven bleek verwaarloosbaar klein.

Van influenzavirussen die circuleren in de menselijke populatie is niet bekend of- en in welke mate deze virussen in het oppervlaktewater terecht komen. Hoewel influenzavirussen, bij de mens, over het algemeen vooral luchtweginfecties veroorzaken blijkt uit recente studies dat influenzavirussen ook darminfecties kunnen veroorzaken en dat virusdeeltjes via de feces kunnen worden uitgescheiden. Echter, de hoeveelheid onderzoeksgegevens over de aanwezigheid en concentratie influenzavirussen in feces zijn zeer beperkt. Bij autopsie van een patiënt die was overleden aan een influenzavirus-A (H5N1) infectie bleek dat influenzavirus ook detecteerbaar was in de darmen (Uiprasertkul et al., 2005). Bij onderzoek van vier kinderen die geïnfecteerd waren met influenzavirus was het virus detecteerbaar in de feces (Wootton et al., 2006) van twee kinderen (één met influenza-A en één met influenza-B). Bij onderzoek van kinderen die zijn geïnfecteerd met influenzavirus-A bleek het virus aantoonbaar in de feces van 2,8% van de geïnfecteerde kinderen (Dilantika et al., 2010). Met een studie waarbij de feces van patiënten met diarree en luchtweginfecties (n=651) is onderzocht werd influenzavirus (H3N2 subtypen) aangetoond in de feces van zes patiënten (Chan et al., 2009).

Bij de recente pandemie die veroorzaakt werd door het "Nieuwe Influenza A (H1N1)" virus (voorheen Mexicaanse griepvirus of varkens griepvirus) die plaats vond in de tweede helft van 2009 werden verschillende meldingen gemaakt van een vrij hoog aantal gevallen van diarree ten gevolge van infectie met dit virus. Uit onderzoek van geïnfecteerde patiënten in Amerika (n=642) bleek dat 25%, naast de standaard griepverschijnselen (koorts en luchtwegklachten), last had van diarree (Dawood et al., 2009). Ook bij onderzoek van patiënten in Chili die in 2009 geïnfecteerd waren met het "Nieuwe Influenza A (H1N1)" virus bleek een ongewoon groot deel van de patiënten (29,4%) diarree te hebben (Riquelme et al., 2009). Deze onderzoeken geven aan dat influenzavirussen de mogelijkheid hebben om via de feces het lichaam van geïnfecteerde personen te verlaten waardoor besmetting via de fecaal orale route mogelijk lijkt (Girard et al. 2010). Dit betekent dat humane influenzavirussen via het riool en de rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI) het oppervlaktewater kunnen bereiken en mogelijk een bedreiging vormen voor de productie van veilig drinkwater door drinkwaterbedrijven die oppervlaktewater als grondstof gebruiken. De pandemie van het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus gaf de mogelijkheid om de relevantie van deze verspreidingsroute te bestuderen. Voorspeld werd dat een zeer groot aantal mensen tijdens deze pandemie geïnfecteerd zou raken. Daardoor was te verwachten dat de concentraties influenzavirus in het riool- en oppervlaktewater hoog zouden zijn in het geval dat de fecale verspreidingsroute relevant zou zijn. Om dit te onderzoeken zijn methoden ontwikkeld voor specifieke detectie van influenzavirussen in riool- en oppervlaktewatermonsters d.m.v. kwantitatieve real-time RT-PCR. Met kwantitatieve real-time RT-PCR is het mogelijk om een, voor influenzavirussen, kenmerkend RNA fragment te detecteren en kwantificeren. Vervolgens zijn deze nieuwe methoden toegepast voor detectie van influenzavirussen in rioolwater-influent en -effluent en op oppervlaktewatermonsters die periodiek zijn genomen ten tijde van de pandemie veroorzaakt door het "Nieuwe Influenza A (H1N1)" 2009 virus.

De doelstellingen van dit project waren:

- Ontwikkeling van een kwantitatieve real-time RT-PCR voor detectie van influenza-A virussen in riool- en oppervlaktewater.

- Ontwikkeling van een kwantitatieve real-time RT-PCR voor specifieke detectie van alleen het pandemische "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus in riool- en oppervlaktewater.
- Toepassen van de ontwikkelde methoden voor detectie van influenza-A en het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus in riool- en oppervlaktewater.
- Op basis van de metingen een indruk krijgen over de relevantie van de verspreiding van influenzavirussen via riool- en oppervlaktewater.



## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Watermonsters

#### *Rioolwater*

In de periode tussen 15 oktober 2009 en 17 februari 2010 zijn periodiek monsters van ca. 1 L (zie tabel 1 voor exacte volumes) rioolwaterinfluent en -effluent genomen uit de RWZI Utrecht. Deze grote RWZI verwerkt het afvalwater van de stad Utrecht en kan het afvalwater van maximaal 529.000 mensen verwerken. Bij droog weer stroomt er ca. 2,8 miljoen liter water per uur de installatie binnen, bij hevige regenval kan dit oplopen tot ca. 15 miljoen liter. De RWZI zuivert het rioolwater met bezinking en actief-slib. RWZI Utrecht lost het gezuiverde water in de Vecht. Monsters zijn genomen op de data zoals vermeld in tabel 1.

#### *Concentreren van rioolwater*

Uit het rioolwater zijn eerst de grotere deeltjes verwijderd door het water te centrifugeren waardoor de grotere deeltjes (o.a. bacteriën, slib, zand, organische deeltjes) als pellet op de bodem van de centrifugebuis terecht komen. De kleine deeltjes (waaronder de virusdeeltjes) uit het supernatant van de centrifugatiestap zijn vervolgens verder geconcentreerd door gebruik te maken van Centricon® filters. Dit is uitgevoerd zoals eerder beschreven (Veenendaal, 2007). De Centricon® filters zijn voorzien van een ultrafiltratie membraan die in staat is om o.a. de virusdeeltjes tegen te houden. Water en andere kleine moleculen worden middels centrifugatie door de membraan gedraaid. Aansluitend wordt het filter omgekeerd en opnieuw gecentrifugeerd. Het water dat in de membraan is achtergebleven wordt door de centrifugatiekracht het filter uitgedraaid en neemt daarbij de deeltjes (waaronder de virusdeeltjes) mee. De Centricon® concentratiemethode zorgt ervoor dat de deeltjes uit het water kunnen worden geconcentreerd tot een volume van ca. 5-30 ml zonder dat daarbij grote verliezen optreden (Veenendaal, 2007).

De geconcentreerde monsters zijn, totdat RNA werd geëxtraheerd, bewaard bij -80°C.

#### *Oppervlaktewater*

Oppervlaktewatermonsters van ca. 60 L zijn periodiek genomen (zie tabel 1 voor data en exacte volumes) uit de rivier de Vecht op een afstand van ca. 5 km stroomafwaarts van RWZI Utrecht. De monsters zijn getransporteerd naar het microbiologisch laboratorium van KWR en daar geconcentreerd.

#### *Concentreren van oppervlaktewater*

Voor het concentreren van de virussen uit de grote volumes oppervlaktewater is gebruik gemaakt van de eerder ontwikkelde hemoflow methode (Veenendaal, 2007). Bij deze hemoflow methode wordt cross-flow ultrafiltratie gebruikt om deeltjes, waaronder de virusdeeltjes, uit het water te concentreren. Een monstervolume van ca. 60 L is in een eerste concentratiestap m.b.v. het Hemoflow polysulfone® filter (Fresenius) teruggebracht tot een volume van ca. 1 L. Na deze concentratiestap met het Hemoflow filter worden de grotere deeltjes uit het monster verwijderd door centrifugatie en worden de virussen verder geconcentreerd door gebruik van Centricon® filters (beide zoals hierboven beschreven).

De geconcentreerde monsters zijn, totdat RNA werd geëxtraheerd, bewaard bij -80°C



Tabel 1. Data waarop monsters zijn genomen en de volumes van de monsters.

Datum	Volume (L)		
	Influent RWZI Utrecht	Effluent RWZI Utrecht	Rivier De Vecht
15 okt. 2009	0,94	0,94	63,6
26 okt. 2009	0,95	0,96	62,0
9 nov. 2009	0,92	0,94	62,8
2 dec. 2009	0,94	0,94	61,8
7 dec. 2009	0,95	0,95	61,0
23 dec. 2009	0,94	0,94	58,9
7 jan. 2010	0,93	0,94	62,1
18 jan. 2010	0,94	0,95	63,9
2 feb. 2010	0,92	0,94	62,6
17 feb. 2010	0,97	0,97	61,3

## 2.2 Extractie van RNA

Voor extractie van RNA uit de virusdeeltjes die aanwezig zijn in de geconcentreerde watermonsters zijn verschillende methoden getest.

### 2.2.1 Nuclisens kit van Biomerieux

Bij het gebruik van deze kit wordt een volume van 1 ml concentraat (na Centricon) toegevoegd aan lysis buffer van de Nuclisens kit. Door de lysis buffer zullen de virusmembranen oplossen en zullen de nucleïne-zuren (RNA) uit de gelyseerde virusdeeltjes vrijkomen. Vervolgens wordt een suspensie van magnetische silicadeeltjes (beads) toegevoegd. De silicabeads hebben, in een oplossing met een hoge concentratie zout, een hoge affiniteit voor binding van nucleïne-zuren. Hierdoor zullen de nucleïne-zuren uit het lysaat binden aan deze silicabeads (Boom et al., 1990). Een protocol is ontwikkeld waar de KingFisher ml (Thermo) wordt toegepast om "semi-automatisch" wasstappen uit te voeren waarmee vervuilende stoffen zoveel mogelijk worden weggewassen en de gezuiverde nucleïne-zuren aan de silicabeads gebonden blijven. Vervolgens worden de silicabeads in een oplossing gebracht (van 100 µl) met een lage zoutconcentratie en een temperatuur van 60 °C waardoor de nucleïne-zuren loskomen van de silicabeads. Ten slotte worden de silicabeads uit de suspensie verwijderd en blijft er een suspensie met gezuiverde nucleïne-zuren over.

### 2.2.2 "Nucleospin RNA virus F Kit" van Macherey-Nagel

Bij het gebruik van deze kit wordt 1 ml concentraat (na centricon) toegevoegd aan lysis buffer. Het gelyseerde materiaal wordt vervolgens op een kolom gebracht. Deze kolom bevat silica waaraan nucleïne-zuren binden. Door centrifugatie wordt de vloeistof verwijderd, nucleïne-zuren blijven (gebonden aan silica) in de kolom achter. De, aan silica gebonden, nucleïne-zuren worden een aantal gezuiverd door een aantal wasstappen waarbij achtereenvolgens wasbuffers aan de kolom worden toegevoegd gevolgd door centrifugatie van de kolom. Ten slotte worden nucleïne-zuren van de silica losgemaakt door toevoeging van gedestilleerd (RNase en DNase vrij, PCR-grade).

### 2.2.3 RNA PowerSoil® Total RNA Isolation Kit van MoBio

Bij deze kit wordt 1 ml concentraat (na centricon) toegevoegd aan lysis buffer en vervolgens zeer krachtig geschud in aanwezigheid van glasparels van verschillende grootte (bead-beaten). Door deze combinatie van chemische (lysis buffer) en mechanische lysis worden nucleïne-zuren vrijgemaakt. De nucleïne-zuren in het monster worden gezuiverd door extractie met een

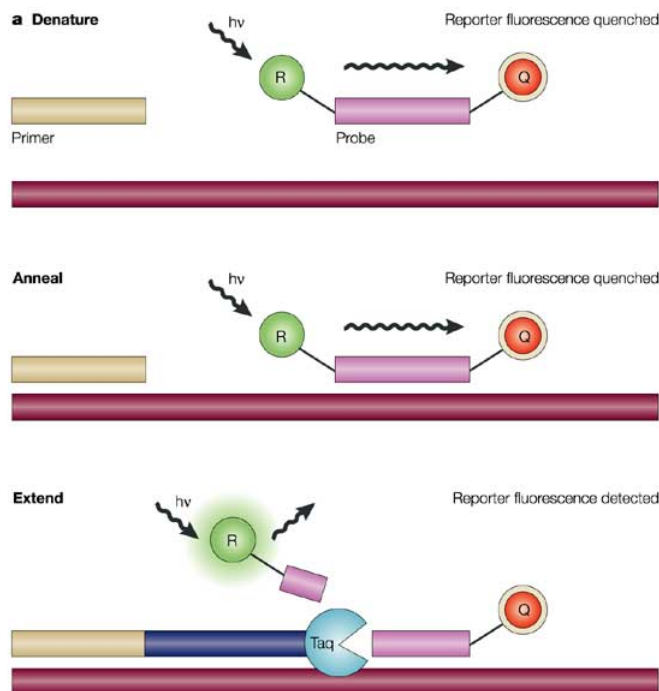
mengsel van phenol en chloroform. Aansluitend worden de nucleïnezuren verder gezuiverd (zoals beschreven in 2.2.2) in een kolom met hierin silica.

### 2.3 Kwantitatieve RT-PCR

Influenzavirussen bevatten RNA als erfelijk materiaal. Voor detectie van RNA moleculen met PCR-methoden wordt een deel van het virus-RNA eerst gekopieerd naar DNA (copy-DNA of cDNA) middels een Reverse-Transcriptase (RT) reactie. Vervolgens wordt een kenmerkend fragment van het cDNA vermenigvuldigd middels Q-PCR (Quantitative Polymerase Chain Reaction). Tijdens de PCR reactie wordt de vorming van het specifieke PCR-fragment (real-time) gevolgd door het gebruik van synthetische DNA moleculen waar aan het ene uiteinde een fluorescente groep gekoppeld is en aan het andere uiteinde een groep die de energie van de fluorescente groep absorbeert (Quencher). Deze “dubbel gelabelde” probe gaat pas fluoresceren na binding van de probe aan de gevormde PCR-fragmenten, hierbij wordt het DNA deel van de probe afgebroken en worden fluorescente groep en quencher van elkaar gescheiden waardoor fluorescentie licht wordt geproduceerd (zie figuur 2). Doordat er een verband is tussen het reactietijdstip waarop voldoende fluorescentie licht is gevormd om te kunnen detecteren met het optisch systeem van de Q-PCR apparatuur en de hoeveelheid specifiek RNA aan het begin van de Q-PCR reactie is kwantificatie mogelijk.

Voor het uitvoeren van kwantitatieve RT-PCR reacties is in dit onderzoek gebruik gemaakt van een reactiemengsel (BioRad “One-step RT-PCR kit) waarin de componenten die nodig zijn voor de RT-reactie en voor de PCR-reactie al door de fabrikant van de kit zijn gemengd. Aan het mengsel van de kit wordt RNA toegevoegd, specifieke primers en een specifieke fluorescente probe waarna de RT-reactie wordt uitgevoerd (10 min 50 °C). Aansluitend wordt de PCR reactie uitgevoerd (5 min at 95°C gevolgd door 40 cycli waarbij de temperatuur steeds wisselt van 15 sec. bij 95°C naar 1 min. bij 60°C).

Een volume van 10 µl van deze gezuiverde nucleïnezuersuspensie wordt gebruikt voor elke RT-PCR reactie. Daarnaast is een RT-PCR reactie uitgevoerd op 10 µl van een 10 keer verdunde suspensie van gezuiverde nucleïnezuren.



Figuur 2. Schematische weergave van de werking van dubbel gelabelde probes voor Real-time detectie van PCR fragmenten . Overgenomen van: [http://www.nature.com/nrd/journal/v3/n9/fig\\_tab/nrd1496\\_F1.html](http://www.nature.com/nrd/journal/v3/n9/fig_tab/nrd1496_F1.html)

### **2.3.1 Primers en probes**

De gebruikte primers en probes bepalen in belangrijke mate de specificiteit van de RT-PCR reacties. Verschillende PCR methoden die gebruik maken van primers met verschillende sequenties zijn in de literatuur beschreven, deze methoden zijn ontwikkeld voor toepassing op klinische monsters. Een aantal van deze methoden zijn in deze studie getest voor detectie van influenzavirussen in geconcentreerde watermonsters.

Tabel 2. DNA-sequenties van de gebruikte primers en probes. Alle probes zijn aan het 5' uiteinde voorzien van een FAM label en aan het 3' uiteinde van een BHQ1 zijn quencher.

Naam	Gen	Specificiteit	Sequentie	Referentie
A. InfAMAF InfAMAR InfAMA- Probe	Matrix	Influenza-A	5' -AAGACCAATCYTGTACCTCTGA-3' 5' -CAAAGCGTCTACGCTGCAGTCC-3' 5' -TTTGTGTTACAGCTCACCGTGCC-3'	(Ward et al., 2004)
B. MexFluF MexFluR MexFlu- Probe	Neuraminidase	Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009	5' -ACATGTGTGTGCAGGGATAACTG-3' 5' -TCCGAAAATCCCACTGCATAT-3' 5' -ATCGACCGTGGGTGTCTTTCAACCA-3'	(Meijer et al., 2009)
C. H1SWS H1SWAs H1SWP- Probe	Haemagglutinine	Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009	5' -CATTGAAAGGTTGAGATATTCCC-3' 5' -ATGCTGCCGTTACACCTTTGT-3' 5' -ACAAGTTCATGGCCAATCATGACTCG-3'	(van der Vries et al., 2010)

De RT-PCR methode A voor detectie van influenzavirus A is een methode die algemeen wordt toegepast voor detectie van dit virus (van der Vries et al., 2010, Ward et al., 2004) in klinische monsters en wordt ook bij de diagnostiek van influenzavirussen in Nederland toegepast bij het Nederlands influenzacentrum (Guldemeester et al., 2009) en het RIVM (Overduin et al., 2009). Ook de RT-PCR methode B voor detectie van het "Nieuwe Influenzavirus (H1N1) 2009" wordt door het RIVM en Nederlands influenzacentrum toegepast (Guldemeester et al., 2009, Meijer et al., 2009, Overduin et al., 2009) voor de diagnostiek van dit virus.

### 2.3.2 Kalibratielijn

Voor kwantificeren van influenzavirus-RNA zijn kalibratielijnen gebruikt die bestaan uit verdunningsreeksen van synthetische RNA-fragmenten met bekende concentratie. De sequenties van de RNA fragmenten in de kalibratielijnen komt overeen met de sequenties zoals die in de influenzavirussen voorkomen. De synthetische RNA-fragmenten zijn, na fluorescente kleuring, met de Qubit fluorometer gekwantificeerd.

### 2.3.3 Controles

Bij alle experimenten zijn positieve- en negatieve controles meegenomen voor het controleren van de kwaliteit van de analyses.

#### *Negatieve controle: monster blanco*

Door de grote gevoeligheid van RT-PCR technieken zijn contaminatieproblemen een groot gevaar en kunnen leiden tot vals-positieve resultaten. Om zicht te krijgen op eventuele contaminatieproblemen is bij elke monsterserie een RNA extractie uitgevoerd op 1 ml gedestilleerd steriel water. Aansluitend is op dit materiaal een kwantitatieve RT-PCR reactie uitgevoerd. Deze RT-PCR reactie hoort een negatief resultaat te geven, een positief resultaat geeft aan dat er contaminatieproblemen zijn opgetreden in het traject tussen RNA-extractie en het uitvoeren van de RT-PCR reactie.

#### *Negatieve controle: RT-PCR blanco*

Per monsterserie is een RT-PCR reactie uitgevoerd op een monster van gedestilleerd steriel water om inzicht te verkrijgen in eventuele contaminatieproblemen bij het uitvoeren van de RT-PCR reacties.

### ***Positieve controle: spike monster***

Voor RNA-extractie en RT-PCR analyses dient een groot aantal handelingen te worden uitgevoerd. Door het onjuist uitvoeren van handelingen is het mogelijk dat vals-negatieve resultaten worden verkregen. Het is ook mogelijk dat er bij extractie van RNA uit geconcentreerde watermonsters stoffen worden geëxtraheerd die RT-PCR reacties kunnen remmen. Daarom is bij dit onderzoek elk geconcentreerd watermonster in 2-voud geanalyseerd: één monster na toevoeging van ca. 2000 RNA-kopieën (bepaald m.b.v. kwantitatieve RT-PCR) influenza-A virus (spikemonster) en één monster zonder toevoeging van influenza-A virus. Daarnaast is bij elk experiment een extractie en RT-PCR analyse uitgevoerd op de spikesuspensie, in afwezigheid van de monstermatrix. Het verschil tussen de aantallen die gevonden worden in de spikesuspensie en de aantallen in het spikemonster geeft inzicht in de eventuele effecten t.g.v. de matrix zoals aanwezigheid van stoffen die worden geëxtraheerd uit de monstermatrix en de RT-PCR reacties remmen.

De spikesuspensie bestaat uit geïnactiveerd virus van een isolaat (type: A/NL/602/09) van het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus. Dit virus is geïsoleerd door het Erasmus Medisch Centrum in Rotterdam en verkregen via Prof. Dr. Fouchier (Erasmus MC).

### ***Interne controle***

Om de uitvoering van de procedure voor extractie van RNA en het uitvoeren van kwantitatieve RT-PCR analyses te controleren en om een indruk te krijgen over de aanwezigheid van stoffen die kwantitatieve RT-PCR reacties remmen is aan elk geconcentreerd monster ook een synthetische RNA fragment met een bekende sequentie toegevoegd. Dit fragment is bij alle monsters net voor de lysis-stap toegevoegd. Na extractie van RNA is op elk monster een specifieke RT-PCR waarmee dit synthetische RNA fragment kan worden gedetecteerd. Als de interne controle niet kan worden aangetoond dan is dat een aanwijzing voor experimentele problemen of remming van de RT-PCR reactie.

## **2.4 Klonering van RT-PCR producten en sequentie analyse**

Voor klonering wordt van RT-PCR fragmenten is gebruik gemaakt van de pGEM-Teasy Kit van Promega (Promega, Madison, USA). De RT-PCR fragmenten worden hierbij gekloneerd in een bacterieel plasmide, door elk plasmide wordt één PCR molecuul ingesloten in de circulaire structuur van het plasmide. Aansluitend worden de plasmiden in *E. coli* cellen gebracht (transformatie), hierbij wordt door een deel van de *E. coli* cellen één plasmide opgenomen (met hierin één RT-PCR molecuul). De getransformeerde *E. coli* cellen worden uitgespateld op een vaste voedingsbodem. Na incubatie bij 37°C groeien deze cellen uit tot individuele kolonies met hierin plasmiden die afkomstig zijn van één RT-PCR molecuul. Van elk gekloneerd RT-PCR fragment zijn van acht klonen (afkomstig van acht individuele RT-PCR moleculen) de sequentie bepaald.

## 3 Resultaten

### 3.1 Ontwikkeling van methoden voor detectie van influenzavirus in watermonsters met kwantitatieve RT-PCR methoden

Voor detectie van influenzavirussen in geconcentreerde oppervlakte- en rivierwater waren geen bruikbare methoden in de wetenschappelijke literatuur beschreven. Daarom zijn methoden ontwikkeld voor:

- Extractie van RNA uit geconcentreerde watermonsters
- Specifieke detectie van influenzavirussen met RT-PCR
  - o Specifieke detectie van Influenza A virus
  - o Specifieke detectie van het "Nieuwe Influenzavirus A (H1N1) 2009"

#### 3.1.1 RT-PCR methoden

In de beginfase van het onderzoek zijn de drie de PCR methoden met de primersets A, B en C (tabel 2) uitgevoerd op monsters waaraan het "Nieuwe Influenzavirus (H1N1) 2009" was toegevoegd (Spike-monsters) en op negatieve controlemonsters (steriel water en geconcentreerd drinkwater). Hieruit bleek dat met primerset C bij een vrij groot aantal negatieve controles toch een positieve reactie werd verkregen. Er is niet uitvoerig onderzocht wat de reden was voor deze "vals-positieve" reacties maar er is besloten om primerset C niet verder toe te passen voor specifieke detectie van het "Nieuwe Influenzavirus (H1N1) 2009" maar analyses te beperken door toepassing van de volgende primersets:

- A: voor detectie van influenza A virussen
- B: voor detectie van "Nieuwe Influenzavirus A (H1N1) 2009"

Na de ontwikkeling van de methoden zijn deze toegepast voor de detectie van influenza A virussen in oppervlaktewater van de rivier de Vecht en in rioolwater van RWZI Utrecht. Het functioneren van de ontwikkelde methoden is gecontroleerde door elk monster ook te analyseren na toevoeging van het "Nieuwe Influenzavirus A (H1N1) 2009" aan het geconcentreerde water (spikemonster).

#### 3.1.2 Extractie van RNA

Bij KWR was bij het begin van dit project geen ervaring met methoden voor extractie van virus-RNA uit geconcentreerde watermonsters. Daarom zijn er, op basis van literatuuronderzoek, drie methoden geselecteerd die bij andere laboratoria gebruikt worden voor de analyse van RNA-virussen in oppervlaktewater.

Voor extractie van RNA zijn drie verschillende methoden getest:

- De Nuclisens kit van Biomerieux (extractie door gebruik te maken van "magnetische beads")
- Nucleospin RNA virus F Kit" van Macherey-Nagel (affiniteitskolom)
- RNA Powersoil Total RNA isolation Kit van MoBio (phenol-extractie en affiniteitskolom)

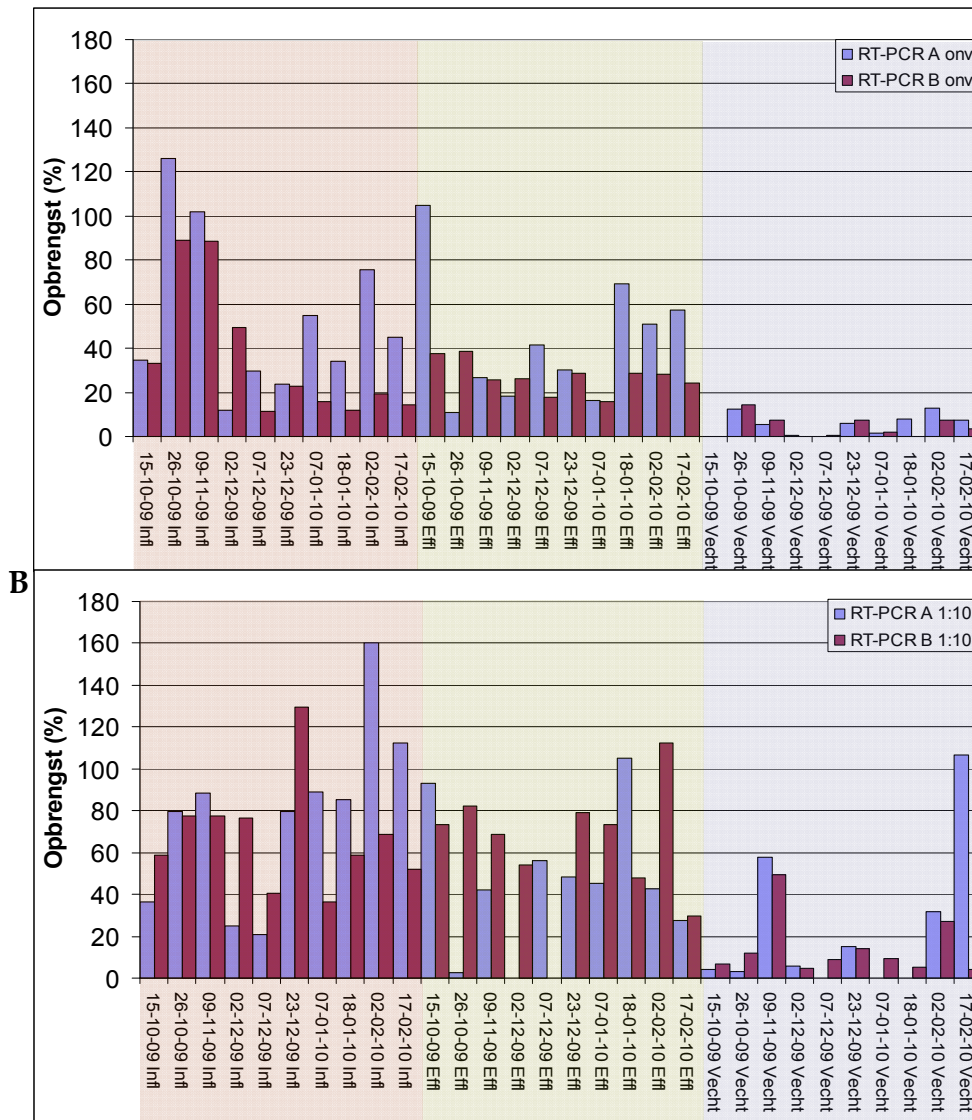
De verschillende extractiemethoden zijn uitgevoerd op een aantal geconcentreerde rioolwater influent monsters waaraan het "Nieuwe Influenzavirus A (H1N1) 2009" was toegevoegd (Spike monsters). Met kwantitatieve RT-PCR is vervolgens onderzocht welke methode de hoogste opbrengst gaf. Hieruit bleek dat de hoogste opbrengsten werden verkregen met de Nuclisens kit van Biomerieux. De uitvoering van de "Nucleospin" en vooral de "Powersoil" methoden bleek zeer arbeidsintensief. Bovendien was het, bij gebruik van de Nuclisens kit, mogelijk om een groot deel van de handelingen te automatiseren door gebruik te maken van een semi-automatisch systeem om magnetische beads de KingFisher ml. Door deze resultaten

is er gekozen om de Nuclisens kit van Biomerieux toe te passen voor analyse van de riool- en oppervlaktewater monsters.

### **3.1.3 Analyse van Spike monsters**

Om te onderzoeken of het met de ontwikkelde RNA-extractie- en RT-PCR-methoden mogelijk was om het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus aan te tonen in rioolwaterinfluent, -effluent en rivierwater zijn op alle monsters analyses uitgevoerd na toevoeging van een spike-suspensie. Deze spike-suspensie bestond uit een verdund preparaat van geïnactiveerd virus van het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus afkomstig van het Erasmus Medisch Centrum (Rotterdam). Met de beide kwantitatieve RT-PCR methoden (A en B) is de concentratie influenza A virus bepaald in RNA-extracten van de spike-suspensie (zonder de matrix van de geconcentreerde watermonsters). Daarnaast zijn de RT-PCR methoden toegepast voor het bepalen van de Influenza A virus concentratie in extracten van geconcentreerde watermonsters waaraan de spike-suspensie is toegevoegd. Het procentuele verschil tussen de metingen van de spike-suspensie (zonder matrix) en metingen in aanwezigheid van de matrix geeft de opbrengst van de spike weer. De opbrengsten van de spike-suspensie bij analyse van verschillende monsters geven een indruk over de invloed van de matrix op de meetwaarden en zijn daarmee een maat voor de kwaliteit van de toegepaste extractie- en RT-PCR methoden. De opbrengsten zijn bepaald door RT-PCR analyses op onverdunde- en op 10X verdunde RNA-extracten uit te voeren. Bijlage I geeft een uitgebreid overzicht van de meetwaarden die zijn gebruikt voor het berekenen van de opbrengsten in de verschillende monsters, figuur 4 geeft een overzicht van de opbrengsten in de verschillende monsters grafisch weer. In tabel 3 zijn de gemiddelde opbrengsten (en de range) van de influenzavirus spike in de verschillende matrices weergegeven. Het influenza RNA van de spike suspensie was met beide RT-PCR methoden (A en B) detecteerbaar in onverdund RNA-extract van alle rioolwatermonsters. Bij analyse van onverdund RNA-extract van oppervlaktewater uit de Vecht was de spike suspensie niet detecteerbaar in 4 (van de 10) monsters met RT-PCR A en in 1 monster met RT-PCR B (en in 3 andere monsters was de opbrengst van de spike lager dan 1%).

**A**



Figuur 3: De procentuele opbrengsten van de influenzavirus spike-suspensie door RT-PCR metingen van extracten van de spike-suspensie (zonder matrix) te vergelijken met de RT-PCR metingen van de spike in aanwezigheid van de matrix van de geconcentreerde watermonsters. A: metingen op basis van analyse van onverdund RNA-extract. B: metingen op basis van een 10-voudige verduning van het RNA-extract.

De resultaten laten zien dat de opbrengsten variëren per monster maar ook per matrix. Vooral de opbrengsten van de spike in de monsters van geconcentreerd oppervlaktewater zijn lager dan de opbrengsten in rioolwatereffluent of -influent. De opbrengsten van de spike in rioolwatereffluent en -influent zijn vergelijkbaar. Na verduning (10X) van de RNA-extracten worden hogere opbrengsten verkregen (Figuur 3 a en b) als gevolg van verduning van stoffen die de RT-PCR reacties kunnen remmen. Als gemeten wordt met RT-PCR A (influenza A) dan zijn de opbrengsten in de rioolwatermonsters hoger dan wanneer de opbrengsten worden bepaald door te meten met RT-PCR B ("Nieuwe Influenzavirus A (H1N1) 2009").



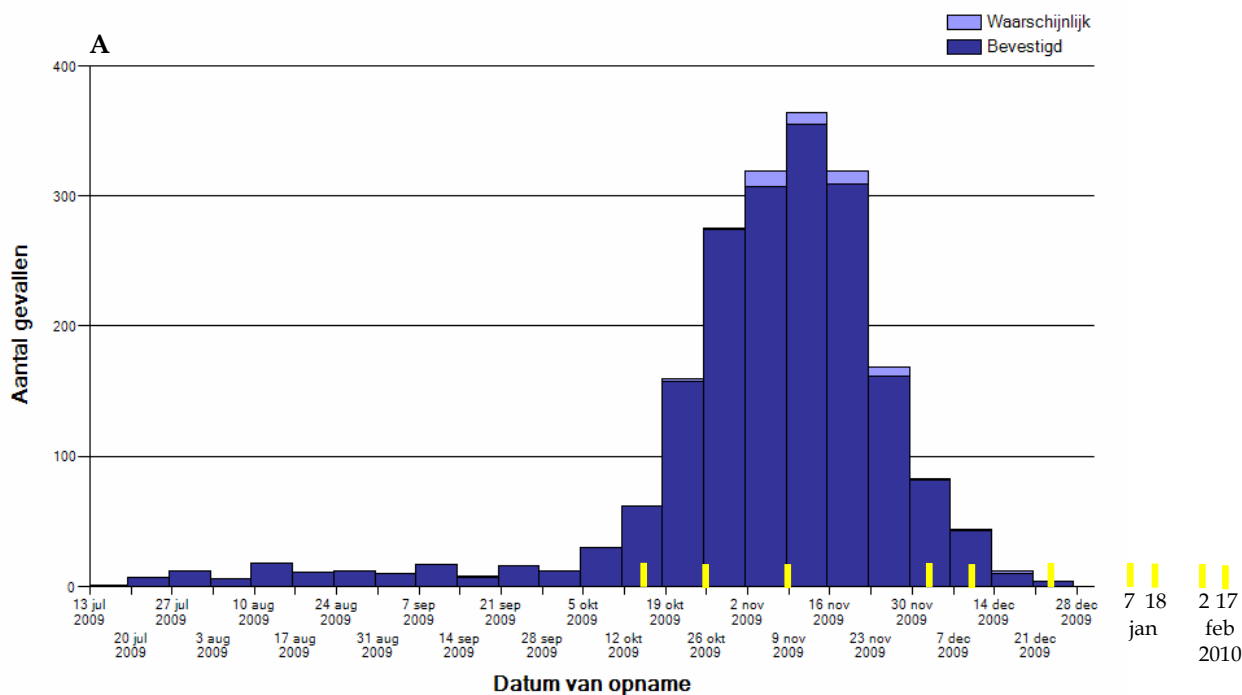
Tabel 3. Gemiddelde opbrengst van de influenzavirus spike suspensie in de verschillende matrices.

Matrix	Gemiddelde opbrengst							
	RT-PCR A (Influenza A)				RT-PCR B (influenza A (H1N1))			
	Onverdund		10X verdund		Onverdund		10X verdund	
	RNA-extract		RNA extract		RNA-extract		RNA extract	
	Range (%)		Range (%)		Range (%)		Range (%)	
	%		%	%		%		%
Riool influent (RWZI Utrecht)	53,8	30-126	77,6	36-160	35,5	12-89	67,7	40-130
Riool effluent (RWZI Utrecht)	42,7	11-105	46,3	0-105	27,2	16-39	62,1	0-113
Rivierwater (Vecht)	5,4	0-13	22,4	0-107	4,3	0-14	14,2	4-49

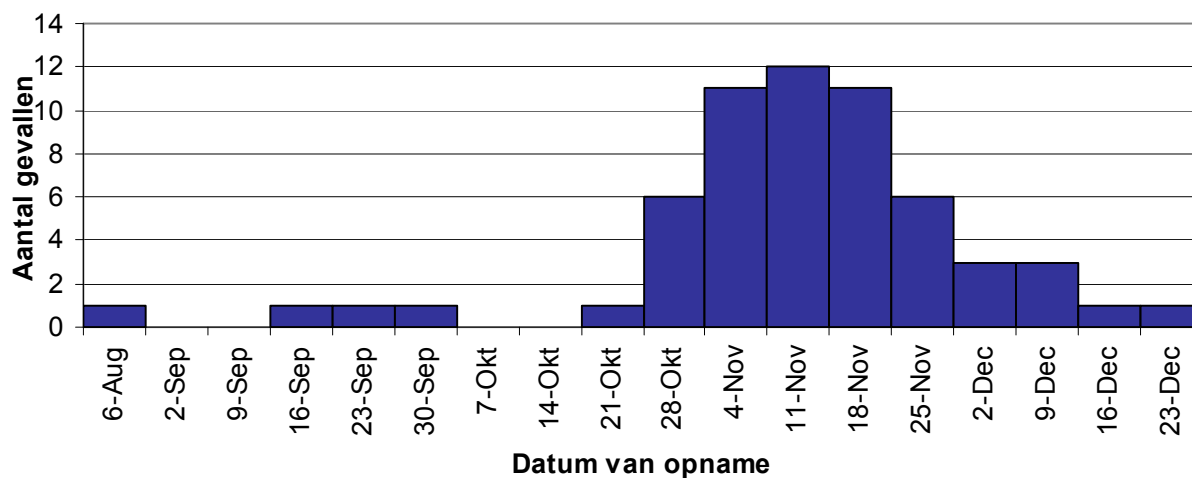
### 3.2 Verloop van de epidemie in Nederland en monsternamen data

Bij de start van het project was niet duidelijk hoe de epidemie van het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus zich zou ontwikkelen. Daarom is er gekozen om te starten met het nemen van monsters op het moment dat het aantal gevallen van ziekte t.g.v. infectie met het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus duidelijk begon te stijgen. Daarna zijn ongeveer tweewekelijks op 10 tijdstippen in de periode van 15 oktober tot 17 februari monsters genomen (tabel 1) en geanalyseerd. Figuur 4 laat het verloop van de epidemie in Nederland (A) en in het gebied van de GG en GD regio Utrecht (B) zien op basis van het aantal ziekenhuisopnames t.g.v. infectie met het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus. De figuur van het landelijk verloop (A) laat enkele ziekenhuisopnames zien in de periode juli, augustus en september t.g.v. infectie met het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus. Deze opnames zijn vooral het gevolg zijn van mensen die in het buitenland een besmetting hebben opgelopen. In oktober en de eerste helft van november stijgt het aantal ziekenhuisopnames sterk tot een maximum van ca. 330 personen tijdens de 2 week van november, vervolgens daalt het aantal opnames na half november sterk. Op 24 december 2010 daalt het aantal patiënten met verschijnselen van griep tot beneden de 50 per 100.000 personen waarmee de epidemie ten einde was. Het verloop van de epidemie in het gebied van de GG en GD regio Utrecht (de regio waarin de bemonsterde RWZI zich bevindt) is vergelijkbaar met het landelijk verloop. In de figuur zijn ook de tijdstippen weergegeven waarop riool- en oppervlaktewatermonsters zijn genomen voor analyse op de aanwezigheid van het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus met kwantitatieve RT-PCR. De figuur laat zien dat er op twee tijdstippen (riool)watermonsters zijn genomen op momenten dat het aantal ziekenhuisopnames toenam, één monster is tijdens het hoogtepunt van de epidemie genomen, drie van de monsters zijn genomen op momenten dat het aantal ziekenhuisopnames duidelijk afnam en vijf monsters zijn genomen op momenten na de epidemie.

## Ziekenhuisopnames in Nederland



## B Ziekenhuisopnames regio GG en GD Utrecht



Figuur 4: Aantal ziekenhuisopnamen wegens laboratoriumbevestigde of waarschijnlijke "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" per week van opname t/m 23 december 2009. A. De aantallen voor heel Nederland. Deze figuur is overgenomen van de informatie die is weergegeven op de website van het RIVM ([http://www.rivm.nl/cib/binaries/H1N1overzicht\\_tcm92-61018.pdf](http://www.rivm.nl/cib/binaries/H1N1overzicht_tcm92-61018.pdf)). Met gele balkjes zijn de tijdstippen weergegeven waarop riool- en oppervlaktewater monsters zijn genomen. B. De gegevens voor de regio Utrecht van de GG en GD (<http://www.zorgatlas.nl/gezondheid-en-ziekte/ziekten-en-aandoeningen/infectieziekten/ziekenhuisopnamen-nieuwe-influenza-a-h1n1-mexicaanse-griep-tot-en-met-23-december-2009>).

### 3.3 Resultaten van de influenzavirus metingen

#### 3.3.1 Influenza A en "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" in riool- en rivierwater

Influenza A en "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" metingen zijn uitgevoerd op RNA-extracten van waterconcentraten afkomstig van RWZI Utrecht (influent en effluent) en uit de rivier "De Vecht", de rivier waarop RWZI Utrecht het gezuiverde water loost. Monsters zijn periodiek genomen in de periode tussen 15 oktober 2009 en 17 februari 2010 (tabel 1). De resultaten van de metingen zijn weergegeven in bijlage 2 en samengevat in tabel 4.

Tabel 4. De resultaten van de RT-PCR analyses voor detectie van influenzavirus A (PCR A) en het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus (PCR B) in rioolwaterinfluent, -effluent en rivierwater. De meting die gelabeld is met een \* is uitgevoerd op 10X verdund extract van het RNA vanwege een lage opbrengst van het spike monster. NA: niet aangetoond

Datum	Influent RWZI Utrecht		Effluent RWZI Utrecht		Rivier De Vecht	
	RT-PCR A RNA kopieën/L	RT-PCR B RNA kopieën/L	RT-PCR A RNA kopieën/L	RT-PCR B RNA kopieën/L	RT-PCR A RNA kopieën/L	RT-PCR B RNA kopieën/L
15-10-09	NA	NA	NA	NA	NA	NA
26-10-09	NA	NA	NA	NA	NA	NA
09-11-09	2,56E+05	NA	NA	NA	NA	NA
02-12-09	NA	NA	NA	NA	2,75E+03*	NA
07-12-09	NA	NA	NA	NA	NA	NA
23-12-09	NA	NA	NA	NA	1,96E+03	NA
07-01-10	NA	NA	NA	NA	NA	NA
18-01-10	NA	NA	NA	NA	1,62E+03	NA
02-02-10	NA	NA	NA	NA	NA	NA
17-02-10	NA	NA	NA	NA	2,84E+02	NA

In één rioolwaterinfluent monster is influenza A virus aangetoond en influenza A virus is aangetoond in vier monsters welke zijn genomen uit de rivier "de Vecht". Het pandemische "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" is niet aangetoond in rioolwater of water uit de rivier "de Vecht".

### 3.4 Sequentie analyse van RT-PCR fragmenten

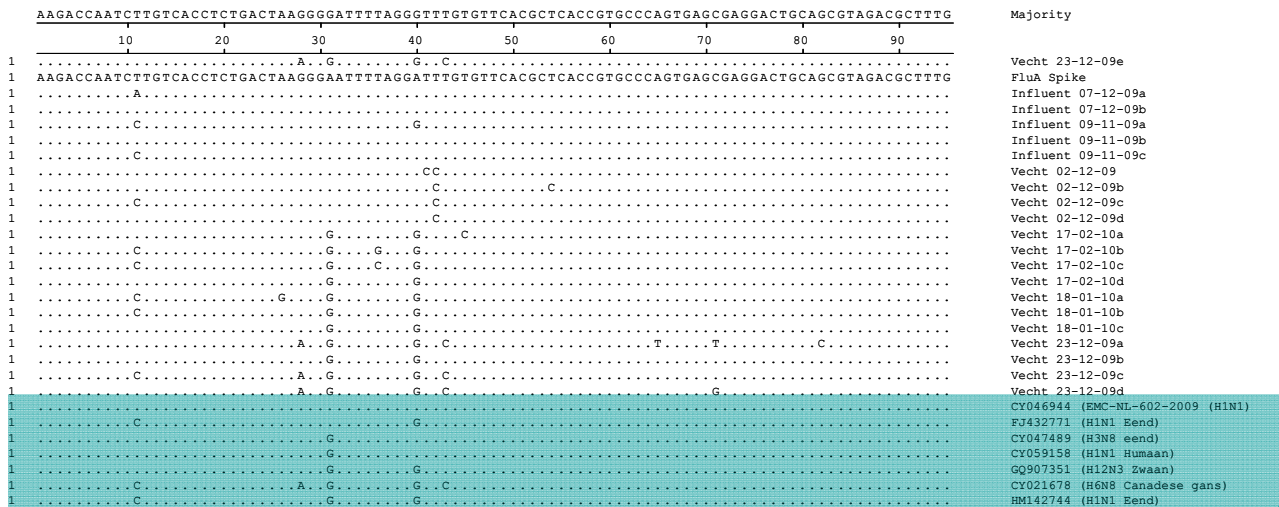
Om aan te tonen dat de positieve RT-PCR reacties werkelijk het gevolg zijn van de aanwezigheid van influenzavirus, en niet zijn veroorzaakt door eventuele artefacten die tijdens de RT-PCR reactie zijn gevormd, zijn de sequenties van de RT-PCR fragmenten bepaald. Dit is gedaan door deze fragmenten eerst in een plasmide te brengen en vervolgens in *E. coli* cellen te kloneren. Van het DNA van het RT-PCR fragment uit plasmiden van verschillende *E. coli* kolonies is de sequentie bepaald en vergeleken met referentiesequenties uit de sequentiedatabases. Dit is uitgevoerd voor de RT-PCR fragmenten die zijn verkregen bij de monsters die positief zijn met RT-PCR A en het monster dat positief was met RT-PCR B.

#### 3.4.1 RT-PCR A sequenties

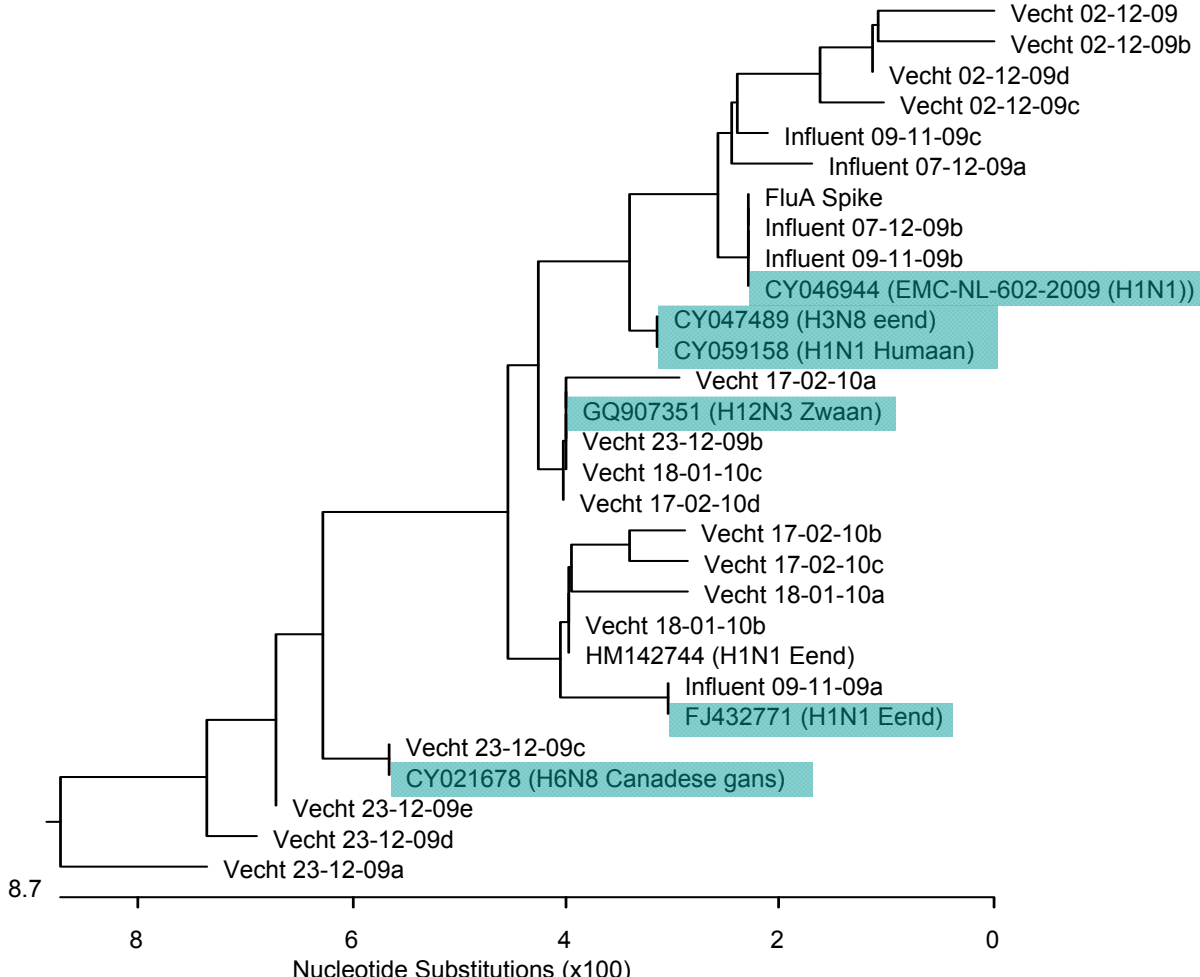
Van de gekloneerde fragmenten van RT-PCR A waarmee influenza A is aangetoond in watermonsters zijn de sequenties bepaald, ter controle is ook de sequentie bepaald van een spike monster waaraan het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus is toegevoegd. De sequenties van de RT-PCR fragmenten met een lengte van 95 nucleotiden zijn weergegeven in de sequentie-vergelijking van figuur 5A. De vergelijking van de sequenties is ook weergegeven grafisch weergegeven in de "verwantschapsboom" van figuur 5B. In deze vergelijkingen zijn de sequenties van de RT-PCR fragmenten die zijn gegenereerd door amplificatie van RNA uit

de monsters vergeleken met referentie-sequenties van Influenzavirussen van verschillende bronnen. Deze referentiesequenties zijn afkomstig uit de sequentie-database van NCBI (National Center for Biotechnology Information). De vergelijking toont aan dat de sequenties die worden gevonden in de watermonsters zeer veel gelijkenis vertonen en in een aantal gevallen identiek zijn aan influenzavirus referentiesequenties.

A



B



Figuur 5: Vergelijking van de sequenties van de fragmenten die zijn verkregen met RT-PCR A en referentiesequenties. Figuur A geeft de sequenties van de fragmenten weer waarbij overeenkomsten ten opzichte van de consensus zijn weergegeven met stippen (.), verschillen zijn weergegeven met letters. De referentiesequenties zijn geaccentueerd met gekleurde balken. Figuur B geeft grafisch de mate van overeenkomst tussen de verschillende sequenties weer.

Met de resultaten van deze sequentieanalyse wordt het volgende aangetoond:

De positieve reacties die worden verkregen met RT-PCR A in rioolwaterinfluent, -effluent en het water van de rivier de vecht zijn het gevolg van de aanwezigheid van Influenza A virussen. De aangetoonde influenzavirussen vertonen genetische variatie in het RNA fragment dat verkregen wordt met RT-PCR A. Veel van deze sequentievariatie is ook gevonden in andere studies waarbij Influenza A virussen bij mensen en dieren zijn onderzocht.

Hiermee is aangetoond dat de virussen die gevonden zijn met RT-PCR het gevolg zijn van de aanwezigheid van influenza A virussen in de monsters en niet het gevolg van besmetting van de monsters met influenza A stam die gebruikt is om monsters te spiken.

De sequentie van het RT-PCR fragment monsters die zijn gespiked met het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus dat afkomstig is van Erasmus MC (type: A/NL/602/09) komt overeen met de sequentie zoals die door het Erasmus MC toegevoegd is aan de sequentiedatabase van NCBI.



## 4 Discussie

### 4.1 Methoden

Van de drie RT-PCR methoden die zijn onderzocht waren er twee bruikbaar voor detectie van influenzavirussen in geconcentreerde watermonsters (RT-PCR A en -B) waardoor het mogelijk was om “alle” influenza A virussen en het “Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009” te detecteren met twee RT-PCR methoden.

Door alle monsters te analyseren na toevoeging van een spike suspensie en deze analyses te vergelijken met de analyse van de spikesuspensie (zonder monstermatrix) was het mogelijk om inzicht te krijgen in de invloed van de monstermatrix op de RT-PCR analyses. De analyses van de spike monsters lieten zien dat de spike suspensie in alle rioolwatermonsters aantoonbaar was met gemiddeld hoge opbrengsten (tabel 3). Echter, de opbrengsten van de spike-metingen waren in de rioolwatermonsters wel zeer wisselend waardoor te verwachten is dat kwantitatieve metingen in rioolwater met deze methoden zeer variable zullen zijn. Toevoegen van een RNA-molecuul aan het monsterconcentraat dat met RT-PCR kan worden gedetecteerd (rendementscontrole) in combinatie met een verbeterde RNA-extractie methode kan hierbij uitkomst bieden. Mogelijk kunnen dan de virusconcentraties die worden gemeten met de RT-PCR gecorrigeerd worden voor verliezen die tijdens het extractieproces optreden en remming van de RT-PCR reacties t.g.v. extractie van stoffen die de RT-PCR reacties remmen. Voorwaarde is dan wel dat de extractie-efficiëntie van dit toegevoegde RNA vergelijkbaar is met de extractie-efficiëntie van het virus-RNA.

Uit analyse van spikemonsters van geconcentreerd water van de rivier de Vecht bleek dat de opbrengsten van de spike suspensie in deze monsters laag waren (gemiddeld 5% voor RT-PCR A en 4% voor RT-PCR B). Bij RNA-extracten van vier Vecht-monsters was het spike-RNA niet detecteerbaar met RT-PCR A en bij deze vier monsters was de opbrengst met RT-PCR-B lager dan 1%. Hogere opbrengsten worden gemeten na verdunning van de RNA-extracten. Dit suggereert dat de lage opbrengsten vooral het gevolg zijn van de aanwezigheid van stoffen in de RNA-extracten die zorgen voor remming van de RT-PCR reacties. Door verdunning van de RNA-extracten zullen deze remmende stoffen ook verdund worden waardoor de RT-PCR reacties beter zullen verlopen en er hogere aantallen worden gemeten. De opbrengsten van de Spike zijn in geconcentreerd water van de Vecht duidelijk lager dan in geconcentreerd rioolwater. Het is waarschijnlijk dat in het geconcentreerde rivierwater meer stoffen aanwezig zijn die een remmende invloed hebben op de RT-PCR reacties. Hierbij spelen waarschijnlijk de toegepaste concentratiestappen een rol, de deeltjes uit rioolwater zijn geconcentreerd door toepassing van Centricon filters op 1 L rioolwater terwijl de deeltjes uit het water van de Vecht (een beginvolume van ca. 60 L) eerst zijn geconcentreerd met Hemoflow filters en vervolgens ook nog met Centricon filters. Hierdoor zijn, per RT-PCR analyse, kleinere volumes rioolwater (gemiddeld 4,6 ml influent en 28,9 ml effluent) geanalyseerd dan rivierwater (gemiddeld 282,4 ml). De analyse van de grotere volumes rivierwater zorgt blijkbaar voor grotere problemen met stoffen die worden geëxtraheerd uit de matrix.

Om betere analyses van geconcentreerde watermonsters mogelijk te maken zullen verbeterde RNA-extractiemethoden ontwikkeld moeten worden waarmee met het mogelijk is om RNA te extraheren met hoge opbrengst en hoge zuiverheid (weinig remmende stoffen). Als alternatief kan overwogen worden om kleinere volumes water te analyseren, dit zal dan wel resulteren in een hogere detectielimiet waardoor minder gevoelig gemeten kan worden.



#### **4.1.1 Detectiegrens van de methoden**

De detectiegrens van deze RT-PCR methoden is van een aantal factoren afhankelijk: het onderzochte monstervolume; de opbrengst van de concentratiestappen; de opbrengst van de RNA-concentratie methode; de gevoeligheid van de methode voor remmende effecten uit de matrix en de gevoeligheid van de RT-PCR reactie. Een aantal van deze aspecten zijn is nog niet uitvoerig onderzocht waardoor het niet mogelijk is om de detectiegrenzen van de methoden exact te bepalen. Daarom is op basis van de beschikbare kennis een schatting gemaakt van de detectiegrenzen.

##### *A. Het onderzochte monstervolume*

Door toepassing van Hemoflow- en centricon-concentratiemethoden zijn de virusdeeltjes uit de monsters geconcentreerd. Na extractie van het RNA is een deel van het RNA-monster met RT-PCR geanalyseerd. Hierdoor zijn van de verschillende matrices (rioolwaterinfluent, -effluent en rivierwater) verschillende volumes geanalyseerd. De geanalyseerde volumes zijn weergegeven in bijlage I. De gemiddelde analysevolumes zijn voor de verschillende matrices:

- Riolwaterinfluent: 5 ml
- Riolwatereffluent: 28 ml
- Oppervlaktewater (rivier "De Vecht"): 292 ml

##### *B. De opbrengst van de concentratiestappen*

In dit project was het niet mogelijk om onderzoek te doen naar de opbrengst van influenzavirussen bij het toepassen van de hemoflow- en centricon-concentratiestappen. Uit eerder onderzoek (Veenendaal, 2007) is gebleken dat de opbrengst van bacterievirussen (F-specifieke- en somatische fagen) na concentratie van oppervlaktewater met hemoflow- en centriconfilters ca. 60% was waarbij er vrijwel geen verliezen optraden t.g.v. concentreren met centricon-filters.

##### *C. De opbrengst van de RNA-extractiemethode*

Over het rendement van de RNA-extractiemethode zijn in dit onderzoek geen gegevens verkregen. In toekomstige onderzoeksprojecten, waarbij RNA-virussen worden bestudeerd, zou een toegevoegd RNA-molecuul, welke met RT-PCR gekwantificeerd kan worden, gebruikt kunnen worden om het rendement van de extractiemethode te kunnen bepalen. In een eenmalig experiment is geconstateerd dat het rendement van de toegepaste extractiemethode voor het extraheren van RNA ongeveer 50% was. Uitgebreider onderzoek is noodzakelijk om het rendement van de extractie-methode nauwkeuriger te bepalen

##### *D. De gevoeligheid van de RT-PCR methode voor remmende effecten uit de matrix*

De gevoeligheid van de RT-PCR methode voor remmende effecten van de matrix is onderzocht door waterconcentraten te analyseren waaraan het "Nieuwe influenza A (H1N1) 2009" virus is toegevoegd (Spike) en de meting te vergelijken met een meting van alleen de Spike-suspensie. Het effect van de matrix op de meting van de spike zijn weergegeven in tabel 3.

##### *E. De gevoeligheid van de RT-PCR reactie*

De gevoeligheid van de RT-PCR methode is niet uitvoerig onderzocht. Door verdunningen van de RNA-suspensie die wordt gebruikt voor het genereren van de kalibratielijne door te verdunnen tot een concentratie die 1 RNA-kopie per RT-PCR reactie benaderd zijn er aanwijzingen verkregen dat de RT-PCR methode een gevoeligheid van 1 RNA-kopie per RT-PCR reactie benaderd.

Op basis van bovenstaande gegevens is de detectiegrens als volgt te berekenen:  
 $(1000/A) \times (100/B) \times (100/C) \times (100/D) \times E = n \text{ RNA kopieën/L.}$

Op basis van bovenstaande kennis over de verschillende factoren van de methode die de detectiegrens beïnvloeden zijn de gemiddelde detectiegrenzen berekend en in tabel 5 weergegeven.

Tabel 5. Detectiegrenzen van de gebruikte methoden

Matrix	Detectiegrens			
	RT-PCR A Influenza A		RT-PCR B Nieuw Influenza A (H1N1) 2009	
	Oncverdund RNA	1:10 verdund RNA	Onverdund RNA	1:10 verdund RNA
	RNA kopieën/L			
Riool influent (RWZI Utrecht)	1240	8608	1882	9867
Riool effluent (RWZI Utrecht)	280	2575	438	1920
Rivierwater (Vecht)	210	510	266	804

## 4.2 Monsternamen data

Tijdens de start van dit project werd het hoogtepunt van de epidemie met het “Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009” virus in januari 2010 verwacht. Op basis van deze verwachting zijn toen data geselecteerd waarop monsters zouden worden genomen. Achteraf bleek de epidemie al in november 2009 zijn hoogtepunt te hebben bereikt en bleek ook het aantal geïnfecteerde personen tijdens de epidemie lager dan verwacht. Vandaar dat meer monsters zijn geanalyseerd welke pas na de epidemie zijn genomen en minder (5) monsters zijn genomen tijdens de epidemie dan de opzet was.

## 4.3 Aanwezigheid van Influenza A virus in oppervlakte- en rioolwater

Met RT-PCR A werd influenza A virus aangetoond in vier rivierwatermonsters, één monster van rioolwaterinfluent en één rioolwatereffluent. De aantallen die tijdens de RT-PCR reacties zijn gemeten waren laag (variërend van ca. 19 tot 119 RNA-kopieën). In een relatief groot aantal monsters (4 van de 10) van het water van de Vecht is influenzavirus A aangetoond. Dit is opvallend aangezien de opbrengst van de spikesuspensie in deze monsters erg laag was en de detectiemethode voor het Vechtwater dus niet optimaal was. Het is daarom te verwachten dat met een betere RNA-extractie methode (minder remming van RT-PCR reacties) het aantal positieve monsters van het Vechtwater hoger zou zijn geweest en dat ook de gemeten virusconcentraties hoger zouden zijn. Deze waarneming, in combinatie met slechts één positief monster van rioolwater effluent, impliceert dat de influenza A virussen die in de Vecht worden aangetroffen niet het gevolg zijn van lozing door RWZI Utrecht. Het is dus zeer onwaarschijnlijk dat humaan fecaal afval de bron vormt voor deze influenzavirussen. Het is waarschijnlijker dat deze influenzavirussen in het rivierwater terecht zijn gekomen door overdracht via dieren. Het is bekend dat watervogels het belangrijkste reservoir vormen voor verschillende influenza A virussen (Fouchier et al., 2003, Olsen et al., 2006, Stallknecht and Shane, 1988). Mogelijk dat vogels de bron vormen voor deze influenzavirussen. Met sequentieanalyse van de gevormde RT-PCR fragmenten kon aangetoond worden dat deze fragmenten werkelijk afkomstig waren van influenza A virussen. De sequenties van deze korte RNA-fragmenten laten ook zien dat er verschillende sequentie-typen met de gebruikte RT-PCR methode gedetecteerd worden. In de sequentiedatabase van NCBI komt een aantal van deze sequentievarianten voor. Veel van de gedetecteerde sequenties vertoont sterke overeenkomst met sequenties van influenza A stammen die gevonden zijn bij watervogels. Het RT-PCR fragment is echter te klein om de gedetecteerde influenzavirussen goed te kunnen typeren. Het is dan ook zeer speculatief om de sequentiegegevens te gebruiken om de bron van deze influenzavirussen op te sporen. Voor bronopsporing is het noodzakelijk om meer sequentiedata te genereren van bij voorkeur meerdere genen

## 4.4 Aanwezigheid van het “Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009” virus in oppervlakte- en rioolwater

Met RT-PCR B werd het “Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009” niet aangetoond in rioolwater en in water van de rivier “de Vecht.

Bij het begin van de epidemie was de verwachting dat een groot deel van de Nederlandse bevolking een infectie zou doormaken. De epidemie bleek uiteindelijk minder ernstig, het ziektebeeld was milder en het aantal mensen met verschijnselen van griep was beduidend lager dan verwacht.

De incidentie, zoals die is gemeten door gegevens van vrijwilligers te verzamelen (grotegriepmeting.nl), was op het hoogtepunt van de epidemie (begin november 2010) ca 0,1%. Voor RWZI Utrecht zou het betekenen dat het afvalwater van ca. 500, met griep besmette mensen, bij de RWZI terecht komt. Als diarree, net als bij de studies in Amerika (Dawood et al., 2009) en Chili (Riquelme et al., 2009), zich manifesteert bij ca 25% van de griep gevallen dan zou dat betekenen dat, in Utrecht, ca. 125 grieppatiënten zorgden voor belasting van het rioolwater met het "Nieuwe influenza A (H1N1) 2009" virus. Er zijn geen gegevens over de concentratie van het "Nieuwe influenza A (H1N1) 2009" virus die aanwezig kunnen zijn in de feces. Bij een (beperkte) studie naar het voorkomen van een ander influenzavirus (H3N2) in de feces van grieppatiënten met diarree (Chan et al., 2009) werd een gemiddelde concentratie van  $1,4 \times 10^7$  RNA kopieën per gram in feces aangetoond (range:  $1,7 \times 10^4$  tot  $8,0 \times 10^7$ ). Als aangenomen wordt dat de concentratie van het "Nieuwe influenza A (H1N1) 2009" virus bij patiënten met diarree vergelijkbaar is met de concentratie influenza (H3N2) virus uit de studie van Chan (Chan et al., 2009) dan zou dat betekenen dat per grieppatiënt met diarree, bij 150 gram ontlasting per dag,  $2 \times 10^9$  RNA kopieën per dag in het riool terecht komen. Bij 125 grieppatiënten met diarree, op het hoogtepunt van de epidemie, zou dat neerkomen op  $3 \times 10^{11}$  RNA kopieën per dag. Als aangenomen wordt dat alle virusdeeltjes de RWZI bereiken dan zou de concentratie in het influent kunnen variëren van  $2 \times 10^4$  tot  $8 \times 10^4$  PCR kopieën per liter (afhankelijk van de hoeveelheid water die door de RWZI verwerkt wordt).

Dit zou betekenen dat de concentratie van het "Nieuwe influenza A (H1N1) 2009" virus in het rioolwaterinfluent boven de geschatte detectiegrens van de methode zou liggen. Toch is het "Nieuwe influenza A (H1N1) 2009" virus niet aangetoond.

Dit kan betekenen dat de concentraties van het "Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009" virus dat via de feces het lichaam verlaat lager is dan de concentratie Influenza A (H3N2) virus uit de studie van Chan (Chan et al., 2009). Het is ook niet uit te sluiten dat het percentage grieppatiënten in Utrecht met een diarree lager is geweest dan de percentages die werden aangetoond in de studies in Amerika (Dawood et al., 2009) en Chili (Riquelme et al., 2009). Het kan ook zo zijn dat een groot deel van de influenza virusdeeltjes tijdens het transport door het riool wordt afgebroken waardoor deze deeltjes (en het RNA ervan) de RWZI niet bereikt en daardoor niet meer aantoonbaar zijn in het influent.

## 5 Literatuur

- Boom, R., Sol, C.J., Salimans, M.M., Jansen, C.L., Wertheim-van Dillen, P.M. and van der Noordaa, J., 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28 (3), 495-503.
- Chan, M.C., Lee, N., Chan, P.K., Leung, T.F. and Sung, J.J., 2009. Fecal detection of influenza A virus in patients with concurrent respiratory and gastrointestinal symptoms. *J Clin Virol* 45 (3), 208-211.
- Dawood, F.S., Jain, S., Finelli, L., Shaw, M.W., Lindstrom, S., Garten, R.J., Gubareva, L.V., Xu, X., Bridges, C.B. and Uyeki, T.M., 2009. Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N Engl J Med* 360 (25), 2605-2615.
- Dilantika, C., Sedyaningsih, E.R., Kasper, M.R., Agtini, M., Listiyaningsih, E., Uyeki, T.M., Burgess, T.H., Blair, P.J. and Putnam, S.D., 2010. Influenza virus infection among pediatric patients reporting diarrhea and influenza-like illness. *BMC Infect Dis* 10, 3.
- Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D. and Brown, I.H., 2003. Animal influenza virus surveillance. *Vaccine* 21 (16), 1754-1757.
- Girard, M.P., Tam, J.S., Assossou, O.M. and Kieny, M.P., 2010. The 2009 A (H1N1) influenza virus pandemic: A review. *Vaccine* 28 (31), 4895-4902.
- Guldemeester, J., Schutten, M., Bestebreuer, T. and Fouchier, R., 2009. Influenza A virus Taqman RT-PCR protocols. Website: [http://www.virology.nl/files/EMC\\_Taqman\\_influenzapdf](http://www.virology.nl/files/EMC_Taqman_influenzapdf).
- Meijer, A., Beerens, A., Claas, E., Hermans, M., de Jong, A., Molenkamp, R., Niesters, H., Overduin, P., Rossen, J., Schuurman, R., Wolffs, P., Fouchier, R., Osterhaus, A., Schutten, M. and Koopmans, M., 2009. Preparing the outbreak assistance laboratory network in the Netherlands for the detection of the influenza virus A(H1N1) variant. *J Clin Virol* 45 (3), 179-184.
- Olsen, B., Munster, V.J., Wallensten, A., Waldenstrom, J., Osterhaus, A.D. and Fouchier, R.A., 2006. Global patterns of influenza a virus in wild birds. *Science* 312 (5772), 384-388.
- Overduin, P., Wilbrink, B. and Meijer, A., 2009. Influenza A PCR Light Cycler – probe test A-Matrix-H1-H1v-H3-H5-N1-N1v-N2. Website: [http://www.rivm.nl/cib/binaries/Influenza\\_diagnostic\\_qPCR\\_RIVM\\_tcm92-61120pdf](http://www.rivm.nl/cib/binaries/Influenza_diagnostic_qPCR_RIVM_tcm92-61120pdf).
- Riquelme, A., Alvarez-Lobos, M., Pavez, C., Hasbun, P., Dabanch, J., Cofre, C., Jimenez, J. and Calvo, M., 2009. Gastrointestinal manifestations among Chilean patients infected with novel influenza A (H1N1) 2009 virus. *Gut* 58 (11), 1567-1568.
- Schijven, J.F. and De Roda Husman, A.M., 2005. Quantitative Risk Assessment of Avian Influenza Virus Infection via Water. RIVM rapport 703719012.
- Stallknecht, D.E. and Shane, S.M., 1988. Host range of avian influenza virus in free-living birds. *Vet Res Commun* 12 (2-3), 125-141.
- Uiprasertkul, M., Puthavathana, P., Sangsiriwut, K., Pooruk, P., Srisook, K., Peiris, M., Nicholls, J.M., Chokephaibulkit, K., Vanprapar, N. and Auewarakul, P., 2005. Influenza A H5N1 replication sites in humans. *Emerg Infect Dis* 11 (7), 1036-1041.
- van der Vries, E., Jonges, M., Herfst, S., Maaskant, J., Van der Linden, A., Guldemeester, J., Aron, G.I., Bestebroer, T.M., Koopmans, M., Meijer, A., Fouchier, R.A., Osterhaus, A.D., Boucher, C.A. and Schutten, M., 2010. Evaluation of a rapid molecular algorithm for detection of pandemic influenza A (H1N1) 2009 virus and screening for a key oseltamivir resistance (H275Y) substitution in neuraminidase. *J Clin Virol* 47 (1), 34-37.
- Veenendaal, H.R.B.-H., A. J., 2007. Een methode voor het concentreren van grote volumes water. BTO rapport BTO 2007.051.
- Ward, C.L., Dempsey, M.H., Ring, C.J., Kempson, R.E., Zhang, L., Gor, D., Snowden, B.W. and Tisdale, M., 2004. Design and performance testing of quantitative real time PCR assays for influenza A and B viral load measurement. *J Clin Virol* 29 (3), 179-188.
- Wootton, S.H., Scheifele, D.W., Mak, A., Petric, M. and Skowronski, D.M., 2006. Detection of human influenza virus in the stool of children. *Pediatr Infect Dis J* 25 (12), 1194-1195.

# I Bijlage: opbrengsten bij spike monsters

Monster Datum	Herkomst	Onderzocht volume (ml, per RT-PCR)	RT-PCR-A: Influenza A				RT-PCR-B: Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009			
			Onverdund		1:10 verdund		Onverdund		1:10 verdund	
			Gemeten aantal RNA- kopieën per RT-PCR reactie	Opbrengst t.o.v. Spike suspensie (%)	Gemeten aantal RNA- kopieën per RT-PCR reactie	Opbrengst t.o.v. Spike suspensie (%)	Gemeten aantal RNA- kopieën per RT-PCR reactie	Opbrengst t.o.v. Spike suspensie (%)	Gemeten aantal RNA- kopieën per RT-PCR reactie	Opbrengst t.o.v. Spike suspensie (%)
	Spike suspensie	Meting 1 Meting 2 Gem.	1.80E+03 2.94E+03 <b>2.37E+03</b>		5.82E+02 2.06E+02 <b>3.94E+02</b>		1.95E+03 1.89E+03 <b>1.92E+03</b>		2.76E+02 2.11E+02 <b>2.43E+02</b>	
15 okt. 2009	Influent Effluent Vecht	3.38 23.34 318.00	1.98E+03 1.41E+03 NA	83,8 59,6 0	3.46E+02 2.62E+02 6.56E+01	87,8 66,5 16,7	6.36E+02 7.22E+02 3.80E+00	33,1 37,6 0,2	1.44E+02 1.79E+02 1.63E+01	59,0 73,4 6,7
26 okt 2009	Influent Effluent Vecht	5.44 23.79 206.67	2.32E+03 2.00E+03 3.31E+02	98,1 84,5 9,5	3.15E+02 4.45E+02 2.24E+02	80,0 113,0 2,4	2.11E+03 7.44E+02 3.00E+02	109,6 38,7 15,6	2.26E+02 2.00E+02 1.03E+02	92,8 82,3 42,3
9 nov 2009	Influent Effluent Vecht	4.14 92.80 157.00	1.88E+03 9.90E+02 1.03E+02	79,5 41,8 4,4	3.51E+02 5.34E+02 2.29E+02	89,0 135,6 58,1	1.88E+03 4.88E+02 1.02E+02	97,9 25,4 5,3	3.51E+02 1.59E+02 2.10E+02	144,0 65,3 86,2
2 dec 2009	Influent Effluent Vecht	6.16 18.75 386.25	2.74E+03 8.86E+02 NA	115,9 37,4 0	2.31E+02 6.00E+02 4.39E+01	58,6 152,3 11,1	9.48E+02 4.99E+02 NA	49,3 26,0 0	1.86E+02 1.32E+02 1.19E+01	76,3 54,2 4,9
7 dec 2009	Influent Effluent Vecht	9.17 31.43 135.56	5.49E+02 7.66E+02 NA	23,2 32,3 0	8.19E+01 2.23E+02 5.29E+01	20,8 56,6 13,4	2.22E+02 3.41E+02 1.15E+01	11,5 17,7 0,6	9.84E+01 NA 2.17E+01	40,4 0 8,9
23 dec 2009	Influent Effluent Vecht	9.29 37.52 490.83	1.12E+03 1.50E+03 1.06E+02	47,3 63,3 4,5	4.36E+02 2.70E+02 5.92E+01	110,7 68,6 15,0	4.41E+02 5.54E+02 1.12E+02	22,9 28,8 5,8	3.16E+02 1.92E+02 4.82E+01	129,8 78,9 19,8
7 jan 2010	Influent Effluent Vecht	3.10 15.63 414.00	1.02E+03 1.18E+03 3.14E+01	43,0 49,7 1,3	3.52E+02 4.04E+02 NA	89,3 102,6 0	3.06E+02 3.05E+02 4.12E+01	15,7 15,9 2,1	1.01E+02 1.79E+02 2.63E+01	36,7 73,4 9,5
18 jan 2010	Influent Effluent Vecht	2.51 23.62 290.45	6.33E+02 1.28E+03 1.49E+02	26,7 54,0 6,3	3.38E+02 4.17E+02 NA	85,9 106,0 0	2.28E+02 5.63E+02 3.06E+01	11,7 28,8 1,6	1.62E+02 1.33E+02 1.42E+01	58,7 48,1 5,1
2 feb	Influent	2.02	1.40E+03	59,1	6.34E+02	161,0	3.79E+02	19,5	1.90E+02	68,9

2010	Effluent	23.30	9.39E+02	39,7	1.68E+02	42,7	5.48E+02	28,1	3.11E+02	112,6
	Vecht	97.81	2.41E+02	10,2	1.25E+02	31,7	1.47E+02	7,5	7.43E+01	26,9
17 feb	Influent	3.29	8.26E+02	34,9	4.46E+02	113,3	2.78E+02	14,2	1.44E+02	52,2
2010	Effluent	11.81	1.06E+03	44,7	1.10E+02	27,9	4.77E+02	24,5	8.15E+01	29,5
	Vecht	419.86	1.34E+02	5,7	6.40E+02	106,7	6.92E+01	3,5	1.21E+01	4,4

## II Bijlage: influenzavirus metingen

Monster datum	Herkomst	Onderzocht volume (ml, per RT-PCR)	RT-PCR-A: Influenza A			RT-PCR-B: Nieuwe Influenza A (H1N1) 2009		
			Onverdund RNA Gemeten aantal RNA- kopieën per RT-PCR reactie	1:10 verdund RNA Gemeten aantal RNA- kopieën per RT-PCR reactie	Concentratie in het monster (RNA kopieën/L)	Onverdund RNA Gemeten aantal RNA- kopieën per RT-PCR reactie	1:10 verdund RNA Gemeten aantal RNA- kopieën per RT-PCR reactie	Concentratie in het monster (RNA kopieën/L)
15 okt. 2009	Influent	3.38	NA	NA	<1240	NA	NA	<1882
	Effluent	23.34	NA	NA	<280	NA	NA	<438
	Vecht	318.00	NA	NA	<210	NA	NA	<266
26 okt 2009	Influent	5.44	NA	NA	<1240	NA	NA	<1882
	Effluent	23.79	NA	NA	<280	NA	NA	<438
	Vecht	206.67	NA	NA	<210	NA	NA	<266
9 nov 2009	Influent	4.14	1.06E+02	NA	2.56E+05	NA	NA	<1882
	Effluent	92.80	NA	NA	<280	NA	NA	<438
	Vecht	157.00	NA	NA	<210	NA	NA	<266
2 dec 2009	Influent	6.16	NA	NA	<1240	NA	NA	<1882
	Effluent	18.75	NA	NA	<280	NA	NA	<438
	Vecht	386.25	1.88E+01	1.06E+02	2.75E+03	NA	NA	<266
7 dec 2009	Influent	9.17	NA	NA	<1240	NA	NA	<1882
	Effluent	31.43	NA	NA	<280	NA	NA	<438
	Vecht	135.56	NA	NA	<210	NA	NA	<266
23 dec 2009	Influent	9.29	NA	NA	<1240	NA	NA	<1882
	Effluent	37.52	NA	NA	<280	NA	NA	<438
	Vecht	490.83	9.64E+01	9.59E+01	1.96E+03	NA	NA	<266
7 jan 2010	Influent	3.10	NA	NA	<1240	NA	NA	<1882
	Effluent	15.63	NA	NA	<280	NA	NA	<438
	Vecht	414.00	NA	NA	<210	NA	NA	<266
18 jan 2010	Influent	2.51	NA	NA	<1240	NA	NA	<1882
	Effluent	23.62	NA	NA	<280	NA	NA	<438
	Vecht	290.45	4.70E+01	6.32E+01	1.62E+03	NA	NA	<266
2 feb 2010	Influent	2.02	NA	NA	<1240	NA	NA	<1882
	Effluent	23.30	NA	NA	<280	NA	NA	<438
	Vecht	97.81	NA	NA	<210	NA	NA	<266

17 feb 2010	Influent	3.29	NA	NA	<1240	NA	NA	<1882
	Effluent	11.81	NA	NA	<280	1.17E+01	NA	<438
	Vecht	419.86	1.19E+02	NA	2.84E+02	NA	NA	<266



