

# Literatuurstudie virussen

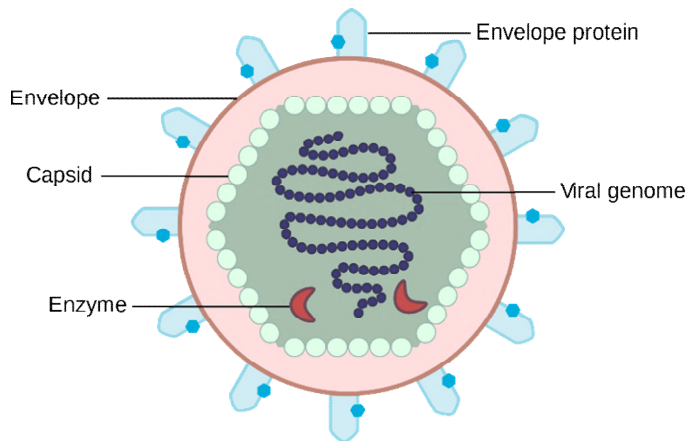
Afnan Suleiman & Anthony Verschoor (KWR Water Research Institute)

## Samenvatting

In de afgelopen jaren heeft onderzoek op het gebied van microbiologie de enorme diversiteit en complexiteit van microbiële gemeenschappen in verschillende ecosystemen aangetoond. De huidige methoden voor monitoring van de microbiële waterkwaliteit, voornamelijk gebaseerd op fecale indicatorbacteriën, geven soms onvoldoende informatie over gezondheidseffecten van virussen voor planten, dieren en mensen. Wetenschappers staan nu voor veel technologische en methodologische uitdagingen bij het analyseren van deze virussen. De vooruitgang in analytische en omics-technieken heeft het begrip van de verschillende virussen in watersystemen verbeterd. Hier gaan we in wat virussen zijn en doen (classificatie en ecologie) en kijken we naar mogelijk geschikte methodes voor het volgen van de waterkwaliteit, met de nadruk op moleculaire technieken en verschillende biosensoren die bekend zijn uit de literatuur.

## I.1 Structuur, vormen, gastheren en classificatie

Virussen zijn biologisch actieve deeltjes die vatbare gastheercellen nodig hebben voor vermeerdering en gastheerinfectie. Het zijn daarom zogenaamde obligate intracellulaire parasieten, die geen eigen stofwisseling hebben en afhankelijk zijn van een gastheer cel. Daarom kunnen ze zich van nature niet buiten een gastheer cel voortplanten. Virussen hebben een zeer eenvoudig ontwerp: de basis is altijd het erfelijk materiaal (genoom) wat bestaat uit nucleïnezuur (ofwel enkelstrengs (ss) of dubbelstrengs (ds) DNA of RNA), omgeven door een eiwitmantel die bekend staat als een capsid. De capsid is samengesteld uit kleinere eiwitcomponenten die capsomeren worden genoemd. De combinatie capsid + genoom wordt een nucleocapsid genoemd. Virussen kunnen ook aanvullende componenten bevatten, met als meest voorkomende een extra membraanlaag om de nucleocapsid, welke envelop wordt genoemd. De envelop wordt opgebouwd uit het kern- of plasmamembraan van de geïnfecteerde gastheer cel en vervolgens gemodificeerd met virale eiwitten, peplomen genaamd. Sommige virussen bevatten enzymen die nodig zijn voor infectie van een gastheer cel; de genetische code hiervoor zit ook in het virusgenoom. Een compleet virus, met alle componenten die nodig zijn voor infectie met een gastheer cel, wordt een virion genoemd. In Figuur 1 staat een schematische weergave van een virusstructuur.



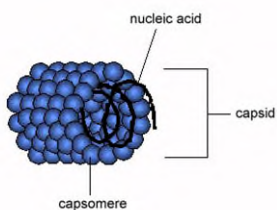
**Figuur 1** - Structuur van een virus: het virusgenoom (viral genome), met enzymen, omgeven door de capsid (capsid). Hieromheen zit de virusenvelop (envelope) met daarop de envelopeiwitten (envelope protein).

Virussen worden geïnclassificeerd op basis van morfologie (vorm), chemische samenstelling en replicatiemethode.

### Morfologie

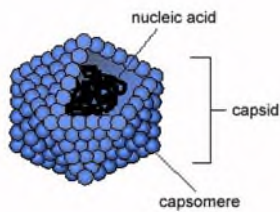
Over het algemeen zijn er vier basisvormen voor virussen: spiraalvormige symmetrie, icosahedrale symmetrie, envelop en complex.

*Spiraalvormige symmetrie:* deze virussen zijn samengesteld uit een enkel type capsomeer gestapeld rond een centrale as in een spiraalvormige structuur, die een centrale holte of buis kan hebben. Het genetische materiaal (typisch enkelstrengs RNA, maar in sommige gevallen ssDNA) wordt in de eiwithelix gebonden door interacties tussen het negatief geladen nucleïnezuur en positieve ladingen op het eiwit. Het bekende tabaksmozaïekvirus is een voorbeeld van een spiraalvormig virus (Figuur 2).



**Figuur 2** - Structuur van spiraalvormige symmetrie van virussen

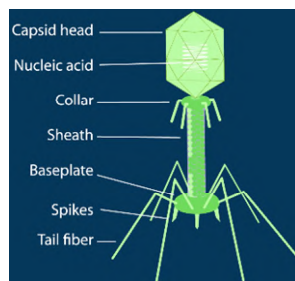
*Icosahedrale symmetrie:* deze virussen zien er bolvormig uit, maar een nadere blik onthult dat ze eigenlijk icosahedraal zijn (regelmatig twintigvlak: Figuur 3). De icoesaëder bestaat uit gelijkzijdige driehoeken die in een bolvorm zijn samengesmolten. Dit is de meest optimale manier om een gesloten schaal te vormen met identieke eiwitsubeenheden. Het genetische materiaal is volledig ingesloten in de capsid. Virussen met icosahedrale structuren worden vrijgegeven in de omgeving wanneer de cel sterft, afbreekt en kapotgaat (lyseert), waardoor de virions vrijkomen. Voorbeelden van virussen met een icosahedrale structuur zijn het poliovirus, rhinovirus en adenovirus.



**Figuur 3** - Structuur van icosahedrale symmetrie van virussen.

*Envelop*: deze virusstructuur is een conventionele icosahedrale of spiraalvormige structuur die wordt omgeven door een lipide dubbellaags membraan, wat betekent dat het virus is ingekapseld of omhuld. De envelop van het virus wordt gevormd wanneer het virus de cel verlaat via knopvorming, en de infectiviteit van deze virussen is meestal afhankelijk van de envelop. De meest bekende voorbeelden van omhulde virussen zijn het griepvirus, Hepatitis C en HIV.

*Complex*: deze virusstructuren hebben een combinatie van icoesaëder en helixvorm en kunnen een complexe buitenwand of kop-staartmorfologie hebben. De kop-staart morfologiestructuur is uniek voor virussen die alleen bacteriën infecteren en staan bekend als bacteriofagen (Figuur 4). De kop van het virus heeft een icosahedrale vorm met een schroefvormig gevormde staart. De bacteriofaag gebruikt zijn staart om zich aan de bacterie te hechten, maakt een gat in de celwand en brengt vervolgens zijn DNA in de cel in met de staart als kanaal. Het pokkenvirus is een van de grootste virussen en heeft een complexe structuur met een unieke buitenwand en capsid. Een van de meest bekende soorten pokkenvirussen is het variolavirus dat pokken veroorzaakt.



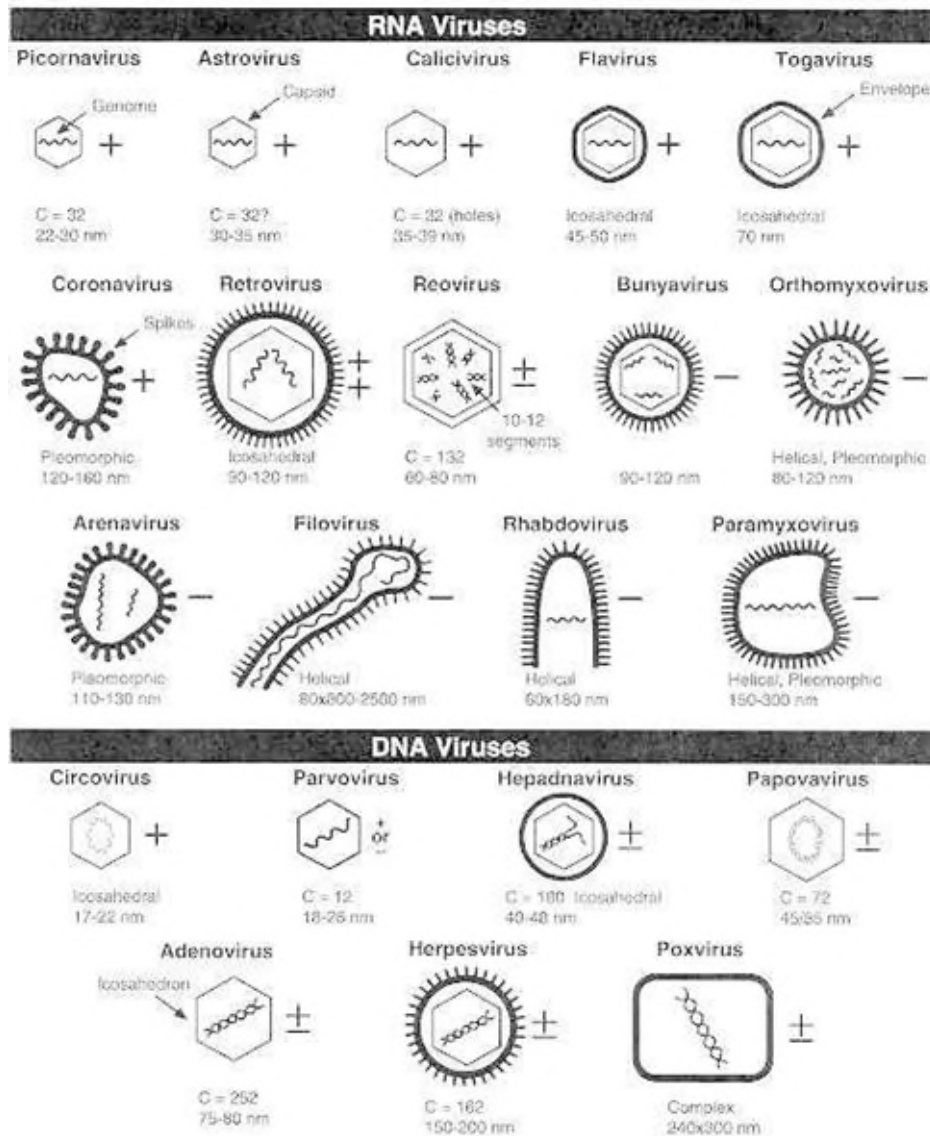
**Figuur 4** - Structuur van een bacteriofaag.

## Genomen

### RNA-virus genomen

RNA-virussen, die 70% van alle virussen omvatten, variëren opmerkelijk in genomstructuur (Figuur 5). Het virale RNA kan enkelstrengs (ss) of dubbelstrengs (ds) zijn en het genoom kan een enkel RNA-segment bezetten of verdeeld zijn over twee of meer afzonderlijke segmenten (gesegmenteerde genomen). Bovendien kan de RNA-streng van een enkelstrengs genoom een sense-streng (plus streng) zijn, die kan functioneren als messenger RNA (mRNA), of een antisense-streng (min streng), die complementair is aan de sense streng en niet functioneren als mRNA-eiwitvertaling. Virale sense-RNA kan alleen repliceren wanneer dit geïnjecteerd wordt in cellen, omdat het dan kan functioneren als mRNA en translatie van viruseiwitten kan bewerkstelligen. Antisense-RNA daarentegen heeft geen

translationale functie en kan op zichzelf geen virale componenten produceren. Plantenvirussen bevatten doorgaans voornamelijk enkelstrengs-RNA. Vanwege het foutpercentage van de enzymen die betrokken zijn bij RNA-replicatie, vertonen deze virussen meestal veel hogere mutatiesnelheden dan DNA-virussen.



**Figuur 5** - Schema's van 21 virusfamilies die mensen infecteren met een aantal onderscheidende criteria: aanwezigheid van een envelop of (dubbel-) capsid en intern nucleïnezuurgenoom. +, Sense-streng; - antisense streng; ±, dsRNA of DNA; 0, circulair DNA; C, aantal capsomeren of gaten, indien bekend; nm, afmetingen van capsid of envelop (indien aanwezig); de zeshoek duidt de aanwezigheid van een isometrische of icosahedrale omtrek aan.

#### DNA-virus genomen

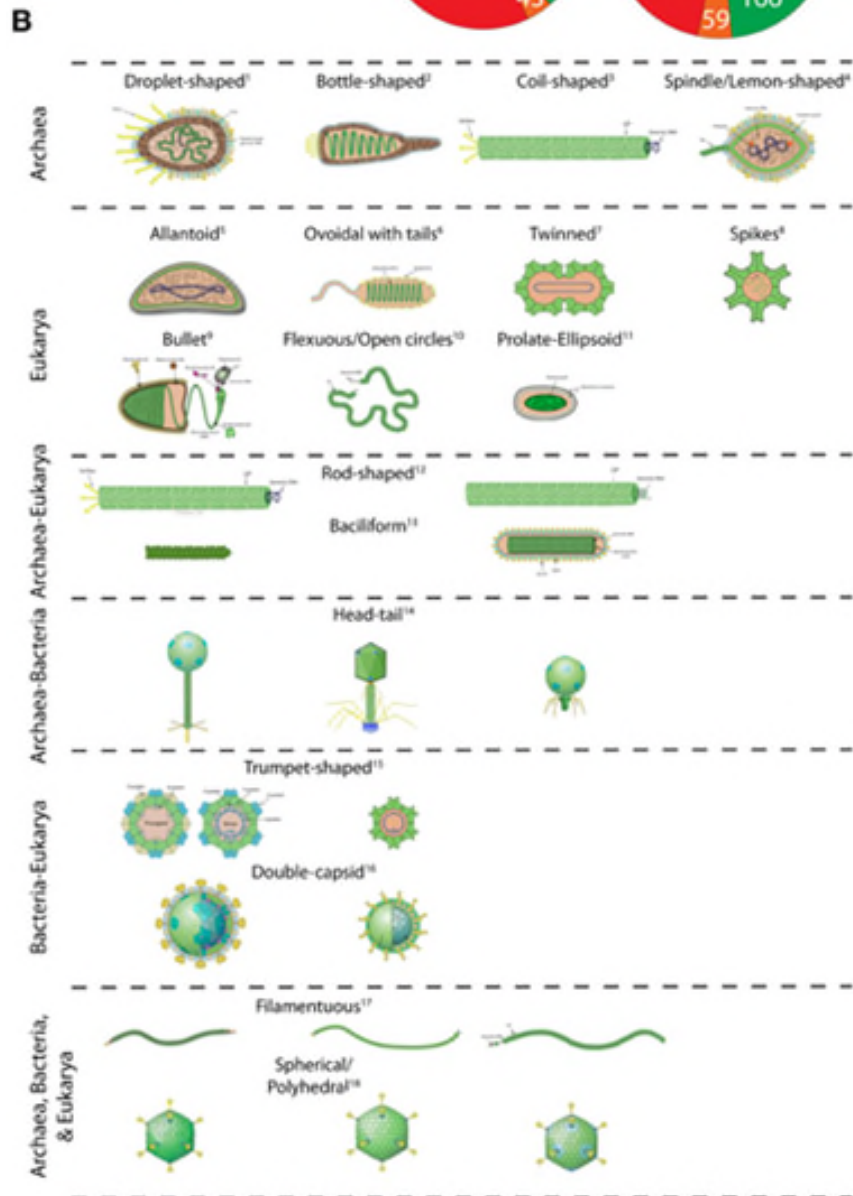
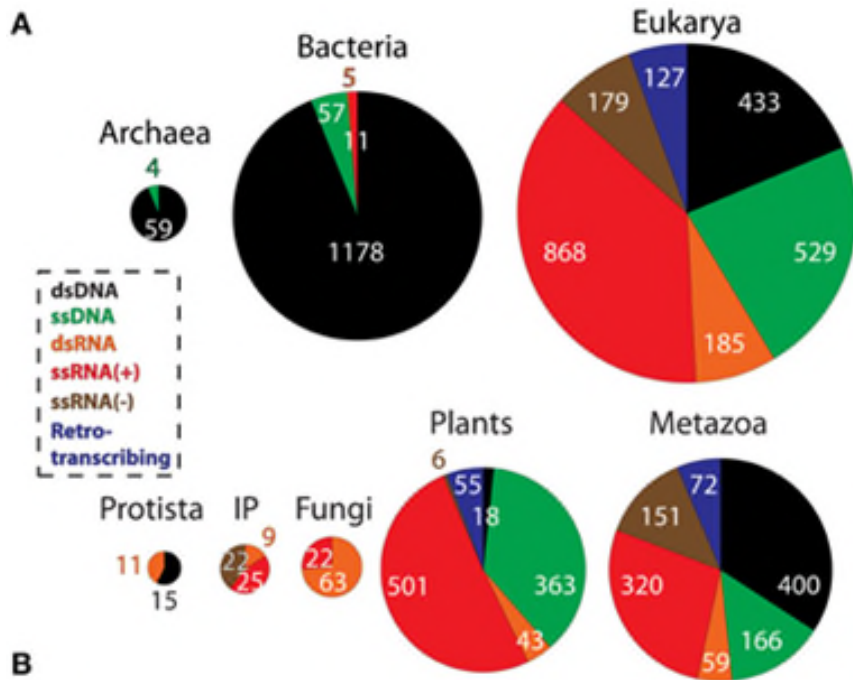
De meeste DNA-virussen (Figuur 5) bevatten een enkel genoom van lineair dsDNA, zoals bij bacteriofagen. De papovavirussen, die de polyoma- en papillomavirussen omvatten, hebben echter cirkelvormige DNA-genomen. DsDNA dient als een sjabloon zowel voor mRNA als voor zelftranscriptie. Bij de leden van de Parvovirus-familie, die bestaat uit de parvo-, de erythro- en de dependovirussen, wordt enkelstrengs lineair DNA (4-6 kb groot) gevonden

Het adeno-geassocieerde virus (AAV, een dependovirus) kan geen nageslachtvirussen produceren, behalve in de aanwezigheid van helpervirussen (adenovirus of herpesvirus). Er wordt daarom gezegd dat de replicatie defect is in dit virustype. In leden van de Circovirus-familie, die de kleinste autonoom propagerende virussen omvatten, wordt circulair enkelstrengs DNA gevonden.

#### *Gastheervoorkeuren*

In figuur 6 staan de gastheervoorkeuren weergegeven voor virussen met verschillende replicatiestrategieën en contrasterende virionmorfologieën. De verdeling van virussen over de verschillende soorten gastheren laat zien dat slechts 63 virussen exclusief zijn voor archaea (archeovirussen), 1251 voor bacteriëen (bacteriovirussen, voorheen bacteriofagen) en 2321 voor eukaryoten. De bacteriovirussen omvatten een groot aantal beschreven DNA-virussen (1178 van de totale 1760) maar vertonen zeer weinig familie- en morfotypediversiteit. In feite behoort 95% van de dsDNA-bacteriovirussen tot slechts één orde (Caudovirales) en slechts drie families (Myoviridae, Podoviridae en Siphoviridae). Bovendien zijn slechts 9 virionmorfologieën waargenomen in bacteriovirussen (vergeleken met 16 in de veel kleinere groep archeovirussen). Interessant is dat alle archeovirussen DNA-replicons bezitten maar geen RNA-genomen. Ter vergelijking: vertebraten herbergen talloze RNA- en retrovirussen. Verrassend genoeg zijn dsDNA-virussen zeldzaam in planten, terwijl dsRNA-virussen overvloedig aanwezig zijn in schimmels. Evenzo zijn retrovirussen geïntegreerd in de genomen van meercellige eukaryoten maar zijn volledig afwezig in de microbiële genomen.

**Figuur 6 (volgende bladzijde).** De overvloed en diversiteit van virale lijnen in de verschillende domeinen van het leven. (A) Cirkeldiagrammen beschrijven het voorkomen van dsDNA, ssDNA, dsRNA, ssRNA (+), ssRNA (-) en retrotranscriberende virussen in Archaea, Bacteria en Eukarya, en binnen de belangrijkste eukaryale afdelingen. Genoomgegevens van 3660 volledig gesequenteerde virale genomen overeenkomend met 1671 dsDNA, 610 ssDNA, 883 ssRNA (+), 179 ssRNA (-), 190 dsRNA en 127 retrotranscriberende virussen werden opgehaald uit de Viral Genomes Resource (april 2014). Bovendien werden twee ssDNA-archaeale virussen geïdentificeerd uit de literatuur (Pietilä et al., 2009; Mochizuki et al., 2012). Virussen die niet waren toegewezen aan een willekeurige volgorde, geslachten of soorten en niet-geclassificeerde virussen werden uitgesloten van bemonstering. Virussen werden in grote lijnen ingedeeld volgens gastheervoorkeuren in de volgende categorieën: Archaea, Bacteria, Protista (dierachtige protisten en bruine algen), ongewervelde dieren en planten (IP); Schimmels (alle schimmels en schimmelsachtige protisten); Planten (alle planten, groene algen en diatomeeën) en Metazoa (gewervelde dieren, ongewervelde dieren en mensen). Gastheerinformatie was beschikbaar voor ongeveer 99% (3633) van de bemonsterde virussen. Cirkeldiagrammen zijn evenredig aan de grootte van elke verdeling. (B) Virion-morfotypen die specifiek zijn voor een domein of die tussen domeinen worden gedeeld, worden weergegeven. Virion-afbeeldingen zijn ontleend aan de ViralZone-webbron (Hulo et al., 2011) en aan Pietilä et al. (2014) en Pina et al. (2011). Een op trefwoorden gebaseerde zoekopdracht werd uitgevoerd op tekstgegevens om de meest algemene morfotypen (bijvoorbeeld staafvormig, bolvormig, druppelvormig, enz.) aan alle virussen toe te wijzen. Het is mogelijk dat meerdere viridae hetzelfde morfotype hebben; dit is niet expliciet gemaakt. Het diagram impliceert niet altijd een evolutionaire relatie tussen virussen met gemeenschappelijke morfologie. Archeale en eukaryale staafvormige virussen zijn bijvoorbeeld waarschijnlijk niet evolutionair gerelateerd (Goulet et al., 2009). Goed bestudeerde uitzonderingen zijn kop-staart caudovirales die de capsidvouw van HK97 herbergen en van polyedrische virussen die de dubbele vouwrol hebben (Abrescia et al., 2012). 1Guttaviridae; 2Ampullaviridae; 3Spiraviridae [naam in afwachting van goedkeuring door ICTV]; 4Fuselloviridae; 5Ascoviridae; 6Nimaviridae; 7Geminiviridae; 8Astroviridae; 9Rhabdoviridae; 10Ophioviridae; 11Polydnnaviridae; (van links naar rechts) 12Rudiviridae (Archaea); 13Clavaviridae (Archaea) Roniviridae (Eukarya); 14 Siphoviridae, Myoviridae en Podoviridae (Archaea en bacteriën); 15 Microviridae (Bacteriën), Circoviridae (Eukarya); 16 Cystoviridae (Bacteriën), Reoviridae (Eukarya); 17 Lipothrixiviridae (Archaea), Inoviridae (Bacteria), Potyviridae (Eukarya); 18Sulfolobus torentjes icosahedral virus (Archaea), Tectiviridae (Bacteria), Adenoviridae (Eukarya).



## **Classificatie**

Virussen worden voornamelijk geïnclassificeerd op basis van fenotypische kenmerken, zoals morfologie, type nucleïnezuur, wijze van replicatie, gastheerorganismen en het type ziekte dat ze veroorzaken. De formele taxonomische classificatie van virussen is de verantwoordelijkheid van het International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) -systeem, hoewel het Baltimore-classificatiesysteem kan worden gebruikt om virussen in een van de zeven groepen te plaatsen op basis van hun manier van mRNA-synthese. Specifieke naamgevingconventies en verdere classificatierichtlijnen zijn vastgelegd door de ICTV.

### *ICTV-classificatie*

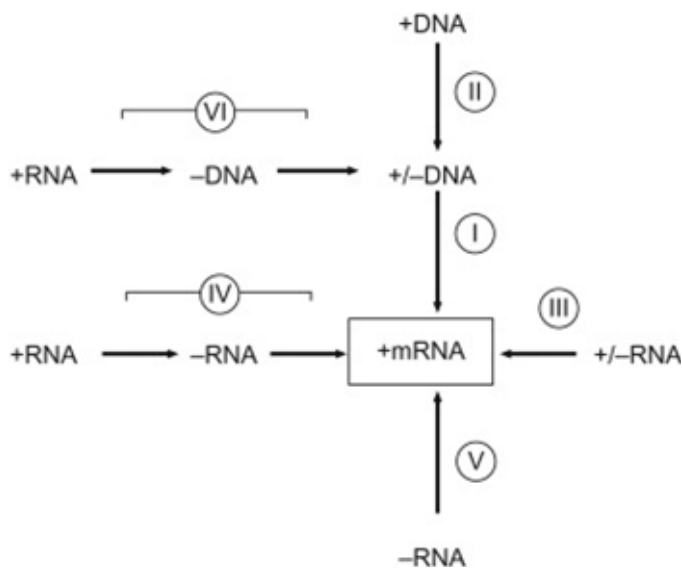
Voor de beschrijving en classificatie van een nieuw virus door de ICTV is informatie nodig over het gastheerbereik, de replicatiecyclus en de structuur en eigenschappen van virusdeeltjes, die vervolgens werden gebruikt om groepen virussen te definiëren. Momenteel zijn geïnclassificeerde virussen toegewezen aan de hiërarchische rangorde van familie, geslacht en soort, en elk taxon heeft een gedefinieerde, unieke en gereguleerde naam. Sommige families zijn ook verdeeld in subfamilies die ieder afzonderlijke geslachten bevatten, en een minderheid van families wordt ook toegewezen aan het hogere taxon van orde. De ICTV verspreidt informatie over virustaxonomie via de hoofdsortenlijst (MSL), die momenteel 7 orders, 112 families, 610 geslachten en 3.704 soorten bevat.

In het verleden was de goedkeuring van een nieuwe soort door de ICTV meestal afhankelijk van de beschikbaarheid van gegevens die de afzonderlijke biologische kenmerken van het desbetreffende virus aantonen. Deze vereiste legt beperkingen op aan het aantal virussen dat is geïnclassificeerd en opgenomen in de lijst met erkende soorten (MSL). Aangezien de meeste virussen nu worden ontdekt door metagenomica en een directe correlatie met biologische agentia missen, werd een workshop bijeengeroepen om een nieuw kader voor virustaxonomie te ontwikkelen in het tijdperk van metagenomica.

### *Baltimore classificatie*

Dit classificatiesysteem (Figuur 7) dat virussen in een van de zeven groepen plaatst, is afhankelijk van een combinatie van hun nucleïnezuur (DNA of RNA), strengigheid (enkelstrengig of dubbelstrengig), sense en replicatiemethode. Het classificeren van virussen op basis van hun genoom betekent dat virussen in een bepaalde categorie zich allemaal op dezelfde manier zouden moeten gedragen, wat een indicatie geeft van hoe verder onderzoek kan worden gedaan. Virussen kunnen in een van de zeven volgende groepen worden geplaatst:

- I: dsDNA-virussen (bijv. Adenovirussen, Herpesvirussen, Pokkenvirussen)
- II: ssDNA-virussen (+ streng of "sense") DNA (bijv. Parvovirussen)
- III: dsRNA-virussen (bijv. Reovirussen)
- IV: (+) ssRNA-virussen (+ streng of sense) RNA (bijv. Picornavirussen, Togavirussen)
- V: (-) ssRNA-virussen (- streng of antisense) RNA (bijvoorbeeld orthomyxovirussen, rhabdovirussen)
- VI: ssRNA-RT-virussen (+ streng of sense) RNA met DNA-intermediair in levenscyclus (bijv. Retrovirussen)
- VII: dsDNA-RT virussen DNA met RNA intermediair in levenscyclus (bijv. Hepadnavirussen)



**Figuur 7** - Indeling van virale genomeexpressie door mRNA. Route I is transcriptie van dsDNA, gewoonlijk door de gastheer-DNA-afhankelijke RNA-polymerase; route II is transcriptie van ssDNA om een dsDNA-sjabloon voor I te geven (bijvoorbeeld geminivirussen); route III is transcriptie van dsRNA, gewoonlijk door virusgecodeerde RdRp (bijv. reovirussen); route IV is replicatie van (+) - streng RNA via een (-) - strengsjabloon door virusgecodeerde RdRp - de virale (+) - streng is vaak de sjabloon voor vroege vertaling (de (+) - streng RNA-virussen); route V is transcriptie van (-) - streng RNA viraal genoom door virusgecodeerde RdRp (bijvoorbeeld tospovirussen); route VI is reverse transcriptie van het RNA-stadium van retro- en pararetrovirussen die leiden tot een dsDNA-sjabloon voor mRNA-transcriptie (voor pararetrovirussen kan de input virale dsDNA de sjabloon zijn).

## I.II Virale groeicycli

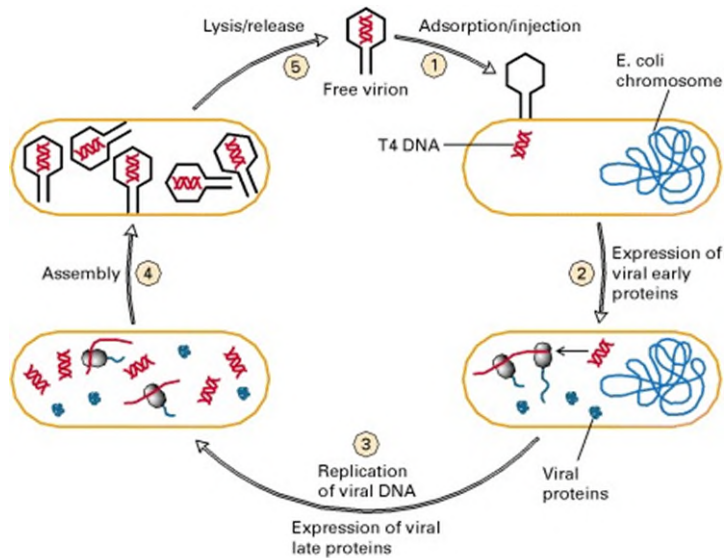
Het oppervlak van virussen omvat vele kopieën van één type eiwit dat bindt of adsorbeert, specifiek aan meerdere kopieën van een receptoreiwit op een gastheercel. Deze interactie bepaalt het gastheerbereik van een virus en is de start van het infectieproces (Afbeelding 8). Vervolgens kruist het virale DNA of RNA op één van de verschillende manieren het plasmamembraan in het cytoplasma. Het binnendringende genetische materiaal kan nog steeds vergezeld gaan van inwendige virale eiwitten, hoewel in het geval van veel bacteriofagen alle capsid-eiwitten buiten de geïnfecteerde cel blijven. Het genoom van de meeste DNA-bevattende virussen die eukaryotische cellen infecteren, wordt (met enkele bijbehorende eiwitten) getransporteerd naar de celkern, waar natuurlijk ook het cellulair DNA wordt gevonden. Eenmaal in de cel interageert het virale DNA met de machines van de gastheer voor het overschrijven (transcriberen) van DNA in mRNA. Het virale mRNA dat vervolgens wordt geproduceerd, wordt door virussen van gastheercellen, tRNA en translatiefactoren in virale eiwitten vertaald.

De meeste virale eiwitproducten vallen in een van de volgende drie categorieën: speciale enzymen die nodig zijn voor virale replicatie; remmende factoren die gastheercel-DNA, RNA en eiwitsynthese stoppen; en structurele eiwitten die worden gebruikt bij de constructie van nieuwe virions. Deze laatste eiwitten worden in het algemeen in veel grotere hoeveelheden gemaakt dan de andere twee soorten. Nadat de synthese van honderden tot duizenden nieuwe virions is voltooid, scheuren de meeste geïnfecteerde bacteriële cellen en sommige geïnfecteerde planten- en dierlijke cellen, of lyseren, waarbij alle virions in één keer vrijkomen. Bij veel plantaardige en dierlijke virale



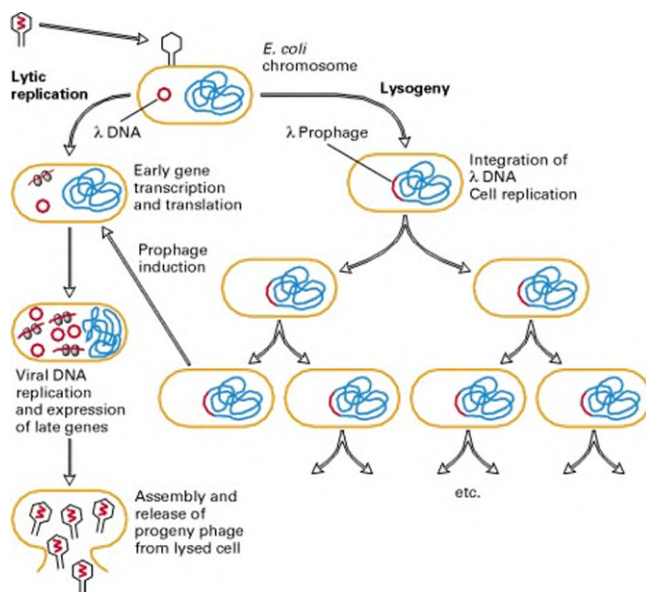
infecties treedt echter geen aparte lysis op; in plaats daarvan geeft de dode gastheercel de virions vrij terwijl deze geleidelijk uiteenvalt.

Deze gebeurtenissen - adsorptie, penetratie, replicatie en afgifte - beschrijven de lytische cyclus van virale replicatie. Het resultaat is de productie van een nieuwe ronde virale deeltjes en de dood van de cel. Figuur 8 illustreert de lytische cyclus voor de T4-bacteriofaag. Bij (envelop) omhulde dierlijke virussen is sprake van meer gecompliceerde processen. In dit geval 'schieten' de virions uit de gastheercel, waardoor ze hun buitenste fosfolipidenvelop verkrijgen, die voornamelijk virale glycoproteïnen bevat.



**Figuur 8** - De stappen in de lytische replicatiecyclus van een niet-omhuld virus worden geïllustreerd voor *E. coli* bacteriofaag T4, die een dubbelstrengs DNA-genoom heeft. Tijdens adsorptie (stap 1) interageren virale manteleiwitten (aan het uiteinde van de staart in T4) met specifieke receptoreiwitten aan de buitenkant van de gastheercel. Het virale genoom wordt vervolgens in de gastheer geïnjecteerd. Vervolgens transcriberen gastheercel-enzymen virale "vroeg" genen in mRNA's en vertalen deze vervolgens in virale "vroeg" eiwitten (stap 2), die het virale DNA repliceren en expressie van virale "late" eiwitten door gastheercel-enzymen induceren (stap 3). De virale late eiwitten omvatten capsid- en assemblage-eiwitten en enzymen die het gastheercel-DNA afbreken en nucleotiden leveren voor synthese van viraal DNA. Nageslacht virions worden geassembleerd in de cel (stap 4) en vrijgegeven (stap 5) wanneer de cel wordt gelyseerd door virale eiwitten. Nieuw bevrijde virussen initiëren een nieuwe infectiecyclus in andere gastheercellen.

In sommige gevallen, nadat een bacteriofaag-DNA-molecuul een bacteriecel is binnengegaan, wordt het geïntegreerd in het chromosoom van de gastheercel, waar het zich schuilhoudt en wordt gerepliceerd als onderdeel van het DNA van de cel van de ene generatie naar de volgende. Deze associatie wordt lysogenie genoemd en het geïntegreerde faag-DNA wordt een profaag genoemd (Figuur 9). Onder bepaalde omstandigheden wordt het profaag-DNA geactiveerd, wat leidt tot verwijdering (excisie) uit het chromosoom van de gastheercel en toegang tot de lytische cyclus. Bacteriële virussen van dit type worden gematigde fagen genoemd. De genomen van een aantal dierlijke virussen kunnen ook integreren in het gastheercelgenoom.



**Figuur 9** – Na besmetting van de bacterie *E. coli* ondergaat een  $\lambda$ -bacteriofaag **hetzij lytische replicatie of lysogenie**. Het lineaire dubbelstrengs-DNA wordt direct na infectie omgezet in circulaire vorm. (Links) als de cel goed gevoed is ondergaan de meeste cellen **lytische replicatie**, vergelijkbaar met de lytische replicatie van bacteriofaag T4. (Rechts) Als de voedingstoestand van de gastheercel niet de productie van grote hoeveelheden nieuwe fagen kan leiden, ontstaat **lysogenie**. In dat geval worden de virusgenen voor lytische replicatie onderdrukt en maakt de gastheercel viruseiwitten die het virus-DNA inbrengen in een specifieke sequentie in het gastheercel-chromosoom, waarbij geen verstoring optreedt van de genen van de gastheercel. Wanneer de gelysogeneerde cel (ook wel lysogeen genoemd) groeit en deelt wordt het profaag-DNA vermenigvuldigd in het gastheerchromosoom. In de nakomelingcellen blijven de virusgenen voor lytische replicatie onderdrukt worden. Op onregelmatige momenten wordt de profaag in een lysogeen geïnduceerd, of geactiveerd. Dit zorgt voor expressie van viruseiwitten, waardoor het profaag-DNA nauwkeurig van het gastheercel-chromosoom wordt afgescheiden, en de genen die de lytische cyclus onderdrukken niet langer geremd worden. Hierdoor wordt weer een normale cyclus van lytische replicatie ingezet.

## Genoomrepliatie

### DNA-virussen

De genoomrepliatie van de meeste DNA-virussen vindt plaats in de kern van de cel. Als de cel de juiste receptor (eiwitten waaraan de gastheer herkend wordt) op het oppervlak heeft, komen deze virussen de cel binnen. Soms gebeurt dit door directe fusie met het celmembraan (bijvoorbeeld bij herpesvirussen), of - meer gebruikelijk - door receptor-gemedieerde endocytose. De meeste DNA-virussen zijn volledig afhankelijk van de DNA- en RNA-synthesemachines van de gastheercel en de RNA-verwerkingsmachines. Virussen met grotere genomen kunnen voor veel van deze machines zelf coderen. Bij eukaryoten moet het virale genoom het kernmembraan van de cel passeren om toegang te krijgen tot deze machine, terwijl het bij bacteriën alleen de cel binnen hoeft te gaan.

### RNA-virussen

Repliatie vindt meestal plaats in het cytoplasma. RNA-virussen kunnen in vier verschillende groepen worden geplaatst, afhankelijk van de wijze van repliatie. De polariteit (of deze al dan niet direct door ribosomen kan worden gebruikt om eiwitten te maken) van enkelstrengige RNA-virussen bepaalt grotendeels het repliatiemechanisme; het andere belangrijke criterium is of het genetische materiaal enkelstrengig of dubbelstrengig is. Alle RNA-virussen gebruiken hun eigen RNA-replicase-enzymen om kopieën van hun genomen te maken.

### *Omgekeerde transcriptievirussen*

Deze hebben ssRNA (Retroviridae, Metaviridae, Pseudoviridae) of dsDNA (Caulimoviridae en Hepadnaviridae) in hun deeltjes. Bij omgekeerde transcriptie van virussen met RNA-genomen (retrovirussen) ontstaat een DNA-tussenproduct om te repliceren, terwijl bij DNA-genomen (pararetrovirussen) een RNA-tussenproduct ontstaat tijdens genoomreplicatie. Beide typen gebruiken een reverse transcriptase of RNA-afhankelijk DNA-polymerase-enzym om de nucleïnezuuromzetting uit te voeren. Vorming van dubbelstrengs DNA vindt plaats in het cytosol als een reeks van de volgende stappen:

- Lysyl tRNA werkt als een primer en hybridiseert met een complementair deel van het RNA-genoom van het virus dat de primerbindingsplaats of PBS wordt genoemd.
- Reverse transcriptase voegt vervolgens DNA-nucleotiden toe aan het 3'-uiteinde van de primer, waarbij DNA complementair aan het U5 (niet-coderend gebied) en R-gebied (een directe herhaling aan beide uiteinden van het RNA-molecuul) van het virale RNA wordt gesynthetiseerd.
- Een domein op het reverse transcriptase-enzym, RNase H genaamd, degradeert de U5- en R-regio's aan het 5'-uiteinde van het RNA.
- De tRNA-primer "springt" vervolgens naar het 3'-uiteinde van het virale genoom en de nieuw gesynthetiseerde DNA-strengen hybridiseren met het complementaire R-gebied op het RNA.
- Het complementaire DNA (cDNA) toegevoegd in (2) is verder uitgebreid.
- Het grootste deel van viraal RNA wordt afgebroken door RNase H, waardoor alleen de PP-sequentie overblijft.
- Synthese van de tweede DNA-streng begint, met gebruik van het resterende PP-fragment van viraal RNA als een primer.
- De tRNA-primer vertrekt en een "sprong" gebeurt. De PBS van de tweede streng hybridiseert met de complementaire PBS op de eerste streng.
- Beide strengen worden verlengd om een complete dubbelstrengige DNA-kopie van het oorspronkelijke virale RNA-genoom te vormen, die vervolgens door het enzym integrase in het genoom van de gastheer kan worden opgenomen.

### **I.III Modelvirussen**

Fagen zijn waardevolle modellen voor virussen omdat ze veel fundamentele eigenschappen en kenmerken delen. Hiertoe behoren structuur, samenstelling, morfologie, grootte en replicatieplaats. Bacteriofagen MS2 en PRD1 zijn veelvuldig gebruikt als modelvirussen in veld- en laboratoriumstudies.

Bacteriofaag MS2 is een RNA-virus dat mannelijke *Escherichia coli* infecteert. Mannelijke *E. coli* zijn bacteriële cellen die in staat zijn om een deel van hun genetisch materiaal (meestal in plasmidevorm) door te geven aan andere bacteriële cellen door een structuur die een pilus wordt genoemd. Dit proces van horizontale genoverdracht is een middel voor genetische uitwisseling binnen bacteriële populaties en is vooral bekend vanwege het verspreiden van antibioticaresistentie onder eerder antibiotica-gevoelige bacteriepopulaties. Vanwege de kleine omvang, relatief eenvoudige samenstelling en het gemak van groei, wordt MS2 gebruikt als een modelorganisme voor studie van

virusprocessen, waaronder virale replicatie, translatie, infectie en assemblage. In toenemende mate wordt MS2 ook gebruikt als een kwantitatieve marker voor de bepaling van de effectiviteit van antivirale en antiseptische middelen, en voor bepaling van de efficiëntie van waterzuiveringsinstallaties en filtratie-apparaten. Dit wordt gedaan vanwege onschadelijkheid voor de mens en duurzaamheid, vanwege het gemak waarmee deze verwijderd kan worden, en omdat het complete genoom is gesequenced.

PRD1, een dubbelstrengs DNA-bacteriofaag, is naar voren gekomen als een belangrijk modelvirus voor het bestuderen van de manier waarop micro-organismen door verschillende grondwaterlagen worden getransporteerd. De populariteit van deze faag voor gebruik in transportstudies met geologische media is gedeeltelijk te danken aan de relatieve stabiliteit bij een groot temperatuurbereik en lage mate van hechting in sedimenten van de watervoerende laag (aquifer). Laboratorium- en veldonderzoek waarbij PRD1 wordt gebruikt leidt tot een beter begrip van virale hechting en transportgedrag in verzadigde geologische media en tot verbeterde methoden voor het beschrijven van wiskundig ondergronds microbiële transport.

Er is aangetoond dat PRD1 de persistentie van pathogene virussen beter voorspelt dan MS2, met name bij hogere temperaturen. Desalniettemin kon door de verschillen in structuur, grootte en oppervlakte-eigenschappen tussen MS2 en PRD1 aanvullende informatie worden verzameld over het potentieel voor ondergronds viraal transport in verschillende hydrologische omgevingen. Hoewel sommige onderzoeken PRD1-sorbs in veel mindere mate suggereren dan MS2 in waterhoudende sedimenten, suggereren andere onderzoeken dat MS2 en PRD1 vergelijkbaar hechtingsgedrag vertonen. De gerapporteerde verschillen in relatief hechtingsgedrag tussen onderzoekslocaties kunnen deels te wijten zijn aan verschillen in sedimentmineralogie en organische inhoud. Er is echter ook een mogelijkheid dat de PRD1-stammen die in de verschillende onderzoeken worden gebruikt, niet structureel identiek zijn. Helaas is PRD1 nog niet beschikbaar in een grote cultuurcollectie (ATTC of NCTCC) die strenge kwaliteitsborgingsprotocollen hanteert en het is onzeker of de bestaande PRD1-laboratoriumvoorraden inderdaad genetisch identiek zijn.

## **I.IV Plantenvirussen**

Het is pas 30 jaar geleden dat plantenvirussen voor het eerst in aanzienlijke hoeveelheden in omgevingswateren aanwezig waren. Sindsdien zijn er veel vragen gerezen met betrekking tot het overleven en de verspreiding van plantenvirussen door water, vooral in het licht van toenemende irrigatie en het gebruik van hydrocultuursystemen in de landbouw. Plantenvirussen veroorzaken verschillende soorten ziekten, maar de ziekten leiden meestal niet tot plantendood. Ze veroorzaken echter symptomen zoals ringpotten, ontwikkeling van mozaïekpatronen, bladgeel en vervorming, evenals vervormde groei. De naam van de plantenziekte is vaak gerelateerd aan de symptomen die de ziekte veroorzaakt in de specifieke plant. Papaja-bladkrul en aardappelbladrol zijn bijvoorbeeld ziekten die specifieke soorten bladvervorming veroorzaken. Sommige plantenvirussen zijn niet beperkt tot één bepaalde plantengastheer, maar kunnen verschillende soorten planten infecteren. Planten zoals tomaten, paprika's, komkommers en tabak kunnen bijvoorbeeld allemaal worden geïnfecteerd door mozaïekvirussen. Het brome-mozaïekvirus infecteert gewoonlijk grassen, granen en bamboe.

Plantencellen zijn eukaryotische cellen die vergelijkbaar zijn met dierlijke cellen. Plantencellen hebben echter een celwand die vrijwel onmogelijk door virussen kan worden doorbroken om infecties te veroorzaken. Als gevolg hiervan worden plantenvirussen meestal verspreid door twee gemeenschappelijke mechanismen: horizontale transmissie en verticale transmissie. In het horizontale type overdracht wordt het plantenvirus overgedragen als gevolg van een externe bron. Om de plant te kunnen "binnendringen" moet het virus door de buitenste beschermende laag van de plant heenkomen. Planten die zijn beschadigd door het weer, snoeien of plantvectoren (bacteriën, schimmels, nematoden en insecten) zijn daarom doorgaans gevoeliger voor virussen. Horizontale transmissie vindt ook plaats door bepaalde kunstmatige methoden van vegetatieve reproductie die typisch worden gebruikt door tuinders en boeren. Plantensnijden en -transplantatie zijn veel voorkomende wijzen waarop plantvirussen kunnen worden overgedragen. Bij de verticale overdracht wordt het virus van een ouder geërfd. Dit type overdracht vindt plaats bij zowel asexuele als seksuele reproductie. Bij asexuele reproductieve methoden zoals vegetatieve vermeerdering ontwikkelen de nakomelingen zich van en zijn genetisch identiek aan een enkele plant. Wanneer de nieuwe planten zich ontwikkelen van de stengels, wortels, bollen, enz. van de ouderplant, wordt het virus doorgegeven aan de ontwikkelende plant. Bij seksuele voortplanting vindt virale overdracht plaats als gevolg van zaadinfectie.

Virussen zijn niet de enige plantpathogenen. Infectieuze deeltjes die bekend staan als viroïden en satellietvirussen veroorzaken ook verschillende plantenziekten. Viroïden zijn extreem kleine plantpathogenen die bestaan uit kleine enkelstrengs-RNA-moleculen, meestal slechts een paar honderd nucleotiden lang. In tegenstelling tot virussen missen ze een eiwitcapside om hun genetisch materiaal tegen schade te beschermen. Viroïden coderen niet voor eiwitten en zijn meestal rond van vorm. Men denkt dat viroïden interfereren met het metabolisme van een plant, wat leidt tot onderontwikkeling. Ze verstoren de productie van plantaardige eiwitten door de transcriptie in gastheercellen te onderbreken. Enkele veel voorkomende plantenviroïden zijn de aardappelspindelknolviroïde, perzik latent mozaïek viroïde, avocado zonnevlek (sunblotch) viroïde en peerblaar canker viroïde. Satellietvirussen zijn infectieuze deeltjes die bacteriën, planten, schimmels en dieren kunnen infecteren. Ze coderen voor hun eigen eiwitcapside, maar ze hebben een helpervirus nodig om te kunnen repliceren. Satellietvirussen veroorzaken plantenziekten door de specifieke activiteit van plantgenen te verstoren. In sommige gevallen is de ontwikkeling van plantenziekten afhankelijk van de aanwezigheid van zowel het helpervirus als de satelliet. Hoewel satellietvirussen de infectieuze symptomen van hun helpervirus veranderen, beïnvloeden of verstoren ze de virale replicatie in het helpervirus niet.

Het tijdschrift *Molecular Plant Pathology* heeft een 'Top 10' lijst samengesteld van plantenvirussen op basis van hun waargenomen belang, wetenschappelijk of economisch (Tabel 1).

**Tabel 1.** Top 10 plantenvirussen. De tabel geeft de gerangschikte lijst weer van plantenvirussen waarop is gestemd door plantenvirologen die bij *Molecular Plant Pathology*. (Scholthof et al., 2011)

Rang	Virus
1	<i>Tobacco mosaic virus</i> [tabaksmozaïekvirus] (TMV)
2	<i>Tomato spotted wilt virus</i> [tomaat gevlekt verwelken virus] (TSWV)
3	<i>Tomato yellow leaf curl virus</i> [tomaat geel blad krulvirus] TYLCV)
4	<i>Cucumber mosaic virus</i> [komkommormozaïekvirus] (CMV)
5	<i>Potato virus Y</i> [aardappelvirus Y] (PVY)
6	<i>Cauliflower mosaic virus</i> [bloemkoolmozaïekvirus] (CaMV)
7	<i>African cassava mosaic virus</i> [Afrikaans cassavemozaïekvirus] (ACMV)
8	<i>Plum pox virus</i> [Sharka-virus] (PPV)
9	<i>Brome mosaic virus</i> [Brome-mozaïekvirus] (BMV)
10	<i>Potato virus X</i> [aardappelvirus X] (PVX)

Het komkommormozaïekvirus (CMV) is een lid van een van de belangrijkste virusfamilies, Bromoviridae, die ten minste 1200 vatbare soorten in meer dan 100 plantenfamilies kan infecteren, waaronder gewassen, fruit, groenten, siergewassen, houtachtige planten en andere economisch belangrijke planten wereldwijd. CMV kan ernstige systemische mozaïeksymptomen veroorzaken, zoals bladvervorming, systemische necrose, chlorose, dwerggroei en fruitletsels, wat leidt tot drastische opbrengstvermindering. CMV kan op niet-persistente wijze door ten minste 80 bladluisoorten worden overgedragen; het wordt ook overgedragen door de parasitaire plantfamilie van de warkruiden (*Cuscuta spp.*) en via zaden. Onder experimentele omstandigheden kan het worden vastgesteld door mechanische besmetting met sap, gezuiverde virions of viraal RNA. Tegenwoordig is er geen enkele chemische stof die dit virus in een besmette plant kan bestrijden. Daarom is de beste beheersing in dit geval preventie van de infectie en uitroeiing. Om dit te bereiken, is het cruciaal om onkruid en zieke planten van het veld te verwijderen en schone en gezuiverde gereedschappen te gebruiken. Een andere optie bestaat uit het gebruik van resistente rassen of de zogenaamde "trapgewassen".

Het merendeel van de plantpathogene virussen die tot nu toe in omgevingswater zijn teruggevonden, zijn zeer stabiel, ze kunnen planten via de wortels infecteren zonder hulp van een vector en hebben vaak een breed

gastheerbereik. Het vrijkomen van dergelijke virussen uit planten kan leiden tot hun verspreiding in oppervlaktewater, waardoor de virussen over grote afstand verspreid kunnen worden terwijl ze anders, onder natuurlijke omstandigheden, beperkt zouden blijven tot beperkte gebieden. Vanwege het wijdverbreide gebruik van hydrocultuursystemen en intensieve irrigatie en hergebruik in de tuinbouw, is het van het hoogste belang om verspreiding van virale infectie via water te begrijpen, te kunnen volgen en op basis hiervan maatregelen te ontwikkelen om de verspreiding van virussen te voorkomen. De ontwikkeling van nieuwe methoden voor het tegelijkertijd detecteren van meerdere plantenvirussen, zoals microarrays of nieuwe generatie sequencing, zal de monitoring van omgevingswateren en wateren in tuinbouwbedrijven vergemakkelijken. Het valt te verwachten dat de lijst van plantenvirussen die in water worden gevonden, hierdoor flink zal worden uitgebreid. Dit zal de noodzaak benadrukken van verder onderzoek om de biologische betekenis van virustransport via water te bepalen.

## **I.V Overleving van virussen in watersystemen**

De overleving van virussen wordt beïnvloed door de hoeveelheid tijd die een virus nodig heeft om zijn vermogen om gastheercellen te infecteren (d.w.z. inactiveringsproces) te verliezen en de snelheid waarmee een virus permanent aan deeltjes adsorbeert. Beide processen zijn virusspecifiek en over het algemeen onafhankelijk van elkaar. Hoewel bekend is dat virusconcentraties in het milieu (buiten de gastheer) vanzelf afnemen in de tijd, zijn de inactiverings- en adsorptieprocessen zeer complex en niet goed begrepen. Een van de grootste uitdagingen is dat virussen colloïdale deeltjes zijn die kunnen bewegen als onafhankelijk gesuspendeerde deeltjes of door zich te hechten aan andere niet-levende colloïdale deeltjes zoals klei of organische macromoleculen. Adsorptie is naar verluidt het dominante proces voor grondwaterbronnen, maar speelt ook een belangrijke rol bij de filtratie van rivieren en meren. Virussen worden geïnactiveerd door verstoringen van hun manteleiwitten en afbraak van hun nucleïnezuren. De belangrijkste factoren die de inactivering van virussen beïnvloeden zijn temperatuur, adsorptie aan deeltjes en microbiële activiteit. Een hogere temperatuur betekent een snellere vermindering van de virale populatie, net als toegenomen zonlicht, hogere concentraties antimicrobiële stoffen of hogere zuurstofniveaus. Een ander gedocumenteerd effect is gekoppeld aan de aanwezigheid van inheemse microbiële populaties: virusoverleving is hoger in steriel water. Omgevingsfactoren inactiveren virussen door directe of indirecte effecten (op een deel van) de virale structuur: genoom, capsid of envelop indien aanwezig. Virale populaties hebben ook resistentiemechanismen, meestal bestaand uit fysieke afscherming van de omgeving; beschermende mechanismen zijn bijvoorbeeld omvat aggregatie, hechting of internalisatie in levende structuren. Vanwege deze mechanismen kan de inactivatiekinetiek afwijken van traditionele log-lineaire vormen. Het is daarom belangrijk om rekening te houden met alle factoren die van invloed kunnen zijn op de overleving, om experimenten zorgvuldig te ontwerpen om voldoende gegevens te garanderen en om de juiste modelbenadering te selecteren. Virussen blijven in ieder geval langer actief in water bij een lagere temperatuur, bij bescherming tegen zonlicht en bij minder microbiële activiteit. Een belangrijk fenomeen bij virale resistentie tegen ongunstige omgevingscondities is aggregatie. Hechting en aggregatie worden beïnvloed door omgevingsfactoren: een lage pH (onder het iso-elektrische punt) zal de hechting bevorderen, evenals de aanwezigheid van tweewaardige ionen in het medium; omgekeerd kan organische stof in het

medium concurreren met virussen voor adsorptie op oppervlakken. Het adsorptieproces in ondergrondse omgevingen wordt voornamelijk geregeld door elektrostatische en hydrofobe interacties. De hydrologische eigenschappen, de oppervlakte-eigenschappen van het virus als functie van waterchemie en de fysische en chemische eigenschappen van de afzonderlijke deeltjes spelen allemaal een rol in de adsorptiedynamiek. Positief geladen minerale bestanddelen (bijv. ijzer-, aluminium- of mangaanoxiden) bevorderen de adsorptie van virussen omdat de meeste virussen negatief geladen zijn in natuurlijke wateren. Organisch materiaal kan zowel hydrofobe interacties verstoren als hydrofobe adsorptieplaatsen bieden, afhankelijk van de combinatie van deeltjes en het type virus. Humusachtige stoffen zijn net als virussen negatief geladen en concurreren daarom om dezelfde adsorptieplaatsen als virussen. Hydraulische omstandigheden spelen ook een belangrijke rol bij virusadsorptie. De watersnelheid moet langzaam genoeg zijn om virussen in staat te stellen contact te maken met en vast te houden aan de deeltjes; anders blijft het virus in het water en wordt het naar beneden getransporteerd. Aangezien dergelijke fenomenen omkeerbaar zijn, kunnen virussen later vrijkomen en moeten dus worden meegenomen in beoordeling van het besmettingsrisico.

Watergedragen infecties worden veroorzaakt door inname vanuit de lucht of door contact met besmet water met infectieuze agentia, waaronder virussen. Momenteel wordt geschat dat er 1407 soorten watergedragen pathogenen zijn die mensen infecteren, waaronder bacteriën (538 soorten), virussen (208 soorten), parasitaire protozoa (57 soorten) en verschillende schimmels en platwormen. De belangrijkste watergedragen ziekteverwekkende virussen voor de mens, en hun gerelateerde ziekten, worden vermeld in Tabel 2.

**Tabel 2** – Ziekteverwekkende virussen voor de mens en hun bijbehorende ziekten. Alle genoemde virussen kunnen langere tijd overleven in drinkwatersystemen.

Ziekteverwekker	Bijbehorende ziekte
Adenovirus	Gastroenteritis (maagdarminfectie)
Enterovirussen	Gastroenteritis
Hepatitis A virus	Hepatitis (leverontsteking)
Hepatitis E virus	Besmettelijke hepatitis; misramen en sterfte
Rotavirus	Gastroenteritis
Sapovirussen	Acute virale gastroenteritis
Astrovirussen	Diarree
Norovirus	Gastroenteritis



Afwezigheid van fecale indicatorbacteriën (*E. coli*, totale coliformen) sluit niet noodzakelijkerwijs de afwezigheid van enterische virussen uit. De toepassing en controle van een multi-barrière, bron-tot-kraan-aanpak, inclusief proces- en nalevingsmonitoring (bijv. troebelheid, desinfectieproces, *E. coli*) is belangrijk om te controleren of het water voldoende is behandeld en daarmee van een acceptabele microbiologische kwaliteit. In het geval van onbehandeld water is testen op indicatorbacteriën nuttig bij het beoordelen van het potentieel voor fecale besmetting, waaronder enterische virussen.

De fysieke verwijdering van virussen kan een uitdaging zijn vanwege hun kleine omvang en variaties in hun oppervlaktelading. Daarom is desinfectie een belangrijke barrière om het juiste niveau van virusreductie in water te bereiken. Virussen worden effectief geïnactiveerd door de toepassing van verschillende desinfectietechnologieën, afzonderlijk of in combinatie, bij relatief lage doseringen.

## **I.VI Virale waterkwaliteitsindicatoren**

Er is geen enkele consistent betrouwbare indicator voor virale aanwezigheid in bronwater of drinkwater. Daarom wordt direct aantonen van specifieke virussen voorgesteld als een indicatie van de mogelijke aanwezigheid van virussen in water. Virale waterkwaliteitsindicatoren vallen hoofdzakelijk in twee groepen: menselijke pathogenen en cultiveerbare bacteriofagen geassocieerd met menselijke ontlasting. Voorbeelden van humane pathogenen die eerder werden voorgesteld als indicatoren voor de kwaliteit van het virale water omvatten adenovirus, polyomavirus, norovirus en reovirus. Deze methoden hebben het voordeel dat ze zijn gebaseerd op menselijke virussen die ziekten kunnen veroorzaken en zeer specifiek zijn voor mensen, maar zijn lastig te bepalen door lage en variabele concentraties in afvalwater. Faag-gebaseerde indicatoren worden momenteel geëvalueerd als een indicator voor virale waterkwaliteit door het United States Environmental Protection Agency. Meer recent zijn alternatieve virusindicatoren voorgesteld, zoals Pepper Mild Mottle Virus (PMMoV) en de bacteriofaag Cross-Assembly phage (CrAssphage) voorgesteld, Adenovirus en Torque Teno virus (TTV). Adenovirussen lijken daarbij de meest kansrijke indicator te zijn, gezien hun hoge en consistente concentraties in afvalwater en hun hoge weerstand tegen UV-desinfectie. Hun lage concentraties in bronwater en problemen met detectie hebben hun bruikbaarheid als indicator echter beperkt. Net als adenovirus is het PMMoV ook aanwezig in hoge concentraties in afvalwater, evenals behandeld afvalwater, en is daarom naar voren gebracht als een mogelijke indicator voor het enterische virusrisico van bronwater. Het is echter onduidelijk of hun aanwezigheid gecorreleerd is met die van infectieuze enterische virussen. Daarnaast komt TTV ook veel voor bij mensen, hoewel het geen ziekte lijkt te veroorzaken.

## **I.VII Methoden voor het concentreren van virussen in water**

De selectie van geschikte concentratiemethoden kan de detecteerbaarheid van virussen verbeteren. In eerdere studies zijn talloze primaire en secundaire virusconcentratiemethoden gebruikt voor milieumonsters. Omdat veel van deze methoden zijn ontwikkeld om virussen te concentreren in relatief kleine hoeveelheden water (<1 liter), zijn toepassingen in veldonderzoek gericht op grotere watervolumes soms moeilijk; deze methoden worden tegenwoordig echter nog steeds in veel onderzoeken gebruikt als primaire of secundaire concentratiemethoden.

### **Adsorptie / elutiemethoden**

De ontwikkeling van virusadsorptie / elutiemethoden (VIRADEL) omvat de adsorptie van virale deeltjes aan filtermedia door ladinginteractie en daaropvolgende elutie van het virus door een pH-aangepaste oplossing. De watermatrix, het type filter dat wordt gebruikt om het virus te adsorberen en elutieoplossingen variëren. Deze methoden gebruikt voor de meeste watermonsters, behalve rioolmonsters (die de filters kunnen verstopen). De meest gebruikelijke elutie-oplossing bevat doorgaans rundvleesextract; oplossingen met andere aminozuren en / of zouten zijn echter ook gebruikt om geadsorbeerd virus uit het filter te verwijderen. Enterische virussen hebben een aanzienlijke variatie in het aantal eiwitten dat in hun capsid aanwezig is, wat vervolgens de grootte en lading van de eiwitten waaruit het capsid bestaat beïnvloedt. Omdat virussen in water typisch een netto negatieve oppervlaktelading hebben, afhankelijk van het gebruikte filtertype, moeten de filters of het watermonster worden geconditioneerd voorafgaand aan filtratie van het monster om adsorptie mogelijk te maken. Er zijn twee basisfiltertypen die worden gebruikt om het virus te adsorberen: elektronegatieve filters en elektropositieve filters.

### **Elektronegatieve filters**

De eerste elektronegatieve filters die werden gebruikt voor virusconcentratie werden ontwikkeld met behulp van membraanfilters om virussen te scheiden van ruwe celextracten. Door zoutconcentratie en pH aan te passen, konden membraanfilters worden gebruikt om virussen van ruwe cellysaten te concentreren. Deze benadering werd vervolgens toegepast op watermonsters om virussen te concentreren met patroon- of platte membraanfilters om een groter bemonsteringsvolume mogelijk te maken. De voordelen van het gebruik van elektronegatieve filters zijn de relatief hoge rendementen voor de meeste enterovirussen, het potentieel voor sommige stammen van norovirus, en de lage prijs en brede beschikbaarheid (Tabel 3). Het grote nadeel is echter dat het voorbereiden van een groot watermonster moeilijk kan zijn. Dit watermonster moet op pH worden ingesteld door zuur in de waterstroom te injecteren voordat het monster door het filter gaat, wat in het veld kan worden uitgevoerd maar moeilijk te controleren kan zijn. Alternatief is dat het monster in het veld wordt verzameld en teruggestuurd naar het laboratorium voor filtratie, wat de hoeveelheid monster die kan worden genomen beperkt, omdat de meeste laboratoria niet zijn uitgerust om honderden liters water te verwerken. Voorbewerking van elektronegatieve filters, in plaats van het watermonster, kan voorafgaand aan monsterafname worden uitgevoerd. Hoewel dit een redelijke benadering is, is het grote nadeel hierbij het potentieel voor meer variabiliteit in filteroppervlaktelading, wat een andere variabele toevoegt bij het meten van filterprestaties, waardoor dit zich niet goed leent voor routinematige monitoring, tenzij strikte kwaliteitsborgingsmaatregelen zijn getroffen.

**Tabel 3** - Voor- en nadelen van verschillende filtertypes om virussen te concentreren

Filtertype	Voordelen	Nadelen
Electronegatief	<p>Goedkoop</p> <p>Kan grote volumes filteren, zelfs in troebel water, voordat verstopping optreedt</p> <p>Is getest met een reeks enterische virussen</p> <p>Hoog herstel voor vaak geteste enterovirussen</p>	<p>Vereist voorbereiding van watermonster of filter voorafgaand aan filtratie</p>
Elektropositief 1 MDS	<p>Geen voorbehandeling van watermonster vereist</p> <p>Is getest met een reeks enterische virussen</p> <p>Kan grote volumes filteren, zelfs in troebel water voordat verstopping optreedt</p>	<p>Extreem hoge kosten per filter</p>
Elektropositief NanoCeram	<p>Goedkoop</p> <p>Vergelijkbare herstellmogelijkheden tot 1 MDS voor geteste virussen</p> <p>Geen voorbehandeling van watermonster vereist</p>	<p>Verstoppingen in troebel water</p> <p>Op dit moment beperkte gegevens beschikbaar om de effectiviteit ervan te bepalen met meerdere virale pathogenen</p>
Electropositieve glaswol	<p>Goedkoop</p> <p>Geen voorbehandeling van watermonster vereist</p> <p>Makkelijk te gebruiken</p> <p>In het veld te gebruiken</p>	<p>Ieder laboratorium moet filterapparaat in elkaar zetten, waardoor variatie tussen laboratoria kan ontstaan</p> <p>Troebel water kan verstopping veroorzaken</p> <p>Beperkte gegevens beschikbaar op dit moment om de effectiviteit ervan te bepalen met meerdere virale pathogenen.</p>
Elektropositief ViroCap	<p>Goedkoop</p> <p>Geen voorbehandeling van watermonster vereist</p> <p>Makkelijk te gebruiken</p> <p>In het veld te gebruiken</p>	<p>Troebel water kan verstopping veroorzaken</p> <p>Mogelijk beperkt tot volume dat kan worden gefilterd vanwege de filtergrootte</p> <p>Op dit moment beperkte gegevens beschikbaar om de effectiviteit ervan te bepalen met meerdere virale pathogenen</p>

Holle vezel ultrafiltratie	Concentratie van meerdere pathogenen Goedkoop Geen voorbehandeling van watermonster vereist	Troebel water kan verstopping veroorzaken Niet gemakkelijk in het veld inzetbaar Langzame filtratiesnelheid Beperkte gegevens beschikbaar op dit moment om de effectiviteit ervan te bepalen met meerdere virale pathogenen.
----------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------	---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

### Electropositieve filters

Terwijl elektronegatieve filters afhankelijk zijn van de voorbewerking van het watermonster om een netto positieve oppervlaktelading van een viraal deeltje te veroorzaken, werken elektropositieve filters door uit te gaan van de aanwezige negatieve lading van het virale deeltje in water, waardoor doorgaans geen voorafgaande behandeling van een watermonster nodig is. Het 1 MDS-filter (Cuno, Meriden, CT, VS) is al vele jaren een populaire elektropositieve filterkeuze voor milieuvirologie.

De voordelen van de meeste elektropositieve filters zijn dat ze gemakkelijk te gebruiken zijn, zonder dat de watermonsters vooraf moeten worden geconditioneerd, en dat ze vanwege het cartridgeformaat grote hoeveelheden water (> 1000 l) kunnen filteren bij hoge filtratiesnelheden zonder te verstopen in de meeste gevallen (Tabel 3). Het grote nadeel van het 1 MDS-filter is de kostprijs, ongeveer \$ 200 - 300 per filter, afhankelijk van de bestelde hoeveelheid. Het netto resultaat is dat zowel routinematige monitoring als sommige onderzoeksprojecten te duur kunnen worden. Het NanoCeram-filter (Argonide, Sanford, FL, VS) is een ander elektropositief filter dat in cartridge-indeling wordt geleverd in een zelfstandige cartridge-indeling onder de naam Virocap (Scientific Methods, Inc., Granger, IN, VS). In tegenstelling tot het 1 MDS-filter is het NanoCeram-filter betaalbaarder (Tabel 3).

Verder onderzoek naar het vermogen van het NanoCeram-filter om andere virustypen in andere watermatrices te concentreren is gerechtvaardigd. Het gebruiksgemak maakt het een aantrekkelijke keuze voor grootschalige virusconcentratie omdat het geen voorbewerking van watermonsters vereist voorafgaand aan filtratie (Tabel 3). Bovendien is het een goedkoper alternatief voor het populaire 1 MDS elektropositieve filter, dat de afgelopen jaren aan populariteit heeft verloren vanwege de hoge kosten. Begin jaren negentig werd glaswol een populair hulpmiddel voor het concentreren van virussen uit grote hoeveelheden water. De glaswol wordt verpakt in een kolom en de kolom wordt vervolgens verbonden met de waterbron. Het belangrijkste voordeel van glaswol is dat het goedkoop is en vanwege de elektropositieve lading vereist het gebruik ervan geen extra behandeling van het watermonster voorafgaand aan filtratie (Tabel 3). Vanwege het gebruiksgemak is glaswol een aantrekkelijke optie voor bemonstering met grote volumes en / of in-line continue bemonstering. Glaswolfilters worden momenteel echter met de hand verpakt door het laboratorium dat de tests uitvoert, in plaats van dat ze commercieel beschikbaar zijn in een kolomformaat, zoals andere filtertypen. Dit maakt kwaliteitsborging en kwaliteitscontrole moeilijk, omdat de verpakking van persoon tot persoon kan verschillen, wat kan leiden tot potentieel grote variaties in filterprestaties.

### **Ultrafiltratie**

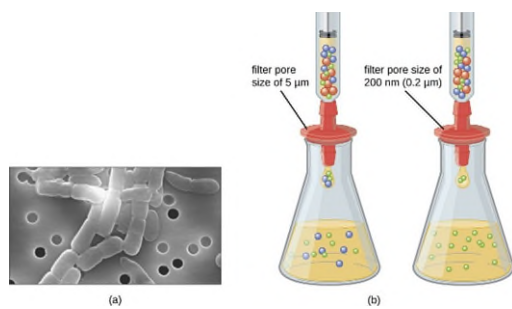
Holle vezel ultrafiltratie is in het afgelopen decennium populair geworden als een aantrekkelijke methode voor virusconcentratie uit grote hoeveelheden water. De methode van ultrafiltratie berust op grootte-uitsluiting en wordt uitgevoerd door het watermonster door capillairen of holle vezels of door vlakke platen te leiden met behulp van tangentiële stroming. Vanwege de poriegrootte kunnen water en stoffen met een laag molecuulgewicht door de vezels en in het filtraat passeren, terwijl grotere stoffen, zoals virussen en andere micro-organismen, worden gevangen en vastgehouden in het retentaat. Ultrafiltratie kan doodlopend zijn (enkele doorgang van het monster door het ultrafilter) of tangentiële stroom ([cross-flow] meerdere circulaties van het monster door het ultrafilter). Gewoonlijk wordt het ultrafilter vervolgens teruggewassen om alle micro-organismen die op het filter achterblijven te verwijderen, en deze terugspoeling wordt gecombineerd met het retentaat van het uiteindelijke monster voor analyse. Een groot voordeel van het gebruik van holle vezel ultrafiltratie is dat de kosten van de filters veel lager zijn dan andere bemonsteringssystemen in het veld, aangezien holle vezel ultrafilters zijn gemaakt voor gebruik bij dialysebehandeling van medische patiënten. De belangrijkste nadelen van het gebruik van ultrafilters zijn langzame filtratiesnelheden, problemen bij gebruik in het veld en de neiging om te verstopen onder omstandigheden waarbij deeltjes de concentratie van  $1,6 \text{ g l}^{-1}$  overschrijden (Tabel 3).

## **I.VIII Virusdetectiemethoden**

Historisch gezien waren celkweekmethoden de gouden standaard voor de detectie van infectieuze virussen; de op DNA-gebaseerde PCR- en qPCR-methoden zijn echter hebben zich echter ontwikkeld tot goede alternatieven voor virusdetectie in watermonsters. Dit is grotendeels te wijten aan kortere detectietijden (binnen enkele uren), hoge gevoeligheid en specificiteit, evenals het vermogen om virussen te detecteren die niet gemakkelijk te kweken zijn en soms niet aangetoond kunnen worden met kweekmethoden. De flexibiliteit van het ontwerp van de primer / probe betekent dat (q)PCR-tests kunnen worden aangepast aan de gewenste specificiteit voor brede detectie van een hele virusclade (bijvoorbeeld enterovirussen), of voor meer specifieke virusstammen, afhankelijk van de gekozen doel-DNA / RNA-sequenties. Verschillende methoden om virussen te detecteren worden hieronder samengevat.

### **Virussen kweken**

In tegenstelling tot bacteriën, waarvan er veel op een kunstmatig voedingsmedium kunnen worden gekweekt, vereisen virussen een levende gastheercel voor replicatie. Geïnfecteerde gastheercellen (eukaryotisch of prokaryotisch) kunnen worden gekweekt en gekweekt en vervolgens kan het groeimedium worden geoogst als een bron van virussen. Virions in het vloeibare medium kunnen van de gastheercellen worden gescheiden door centrifugatie of filtratie. Filters kunnen fysiek alles in de oplossing verwijderen dat groter is dan de virions; de virussen kunnen vervolgens worden verzameld in het filtraat (zie Figuur 10).



**Figuur 10** - Membraanfilters kunnen worden gebruikt om cellen of virussen uit een oplossing te verwijderen. (a) Deze scanning electron microfoto toont staafvormige bacteriecellen gevangen op het oppervlak van een membraanfilter. Let op verschillen in de relatieve grootte van de membraanporiën en bacteriën. Virussen passeren dit filter. (b) De grootte van de poriën in het filter bepaalt wat wordt gevangen op het oppervlak van het filter (dier [rood] en bacteriën [blauw]) en verwijderd uit vloeistof die erdoorheen gaat. Merk op dat de virussen (groen) door het fijnere filter gaan.

Virussen kunnen in vivo worden gekweekt (in een heel levend organisme, plant of dier) of in vitro (buiten een levend organisme in cellen in een kunstmatige omgeving, zoals een reageerbuis, celkweekfles of agarplaat). Bacteriofagen kunnen worden gekweekt in aanwezigheid van een dichte laag bacteriën in een zachte agar van 0,7% in een petrischaaltje of platte (horizontale) kolf. De agar-concentratie is verlaagd van de 1,5% die gewoonlijk wordt gebruikt bij het kweken van bacteriën. Door de zachte 0,7% agar diffunderen de bacteriofagen gemakkelijker door het medium. Voor lytische bacteriofagen kan lysis van de bacteriële gastheren dan gemakkelijk worden waargenomen wanneer een heldere zone, plaque genaamd, wordt gedetecteerd. Terwijl de faag de bacteriën doodt, worden heldere plaques waargenomen in de troebele bacterielaag.

Dierlijke virussen vereisen cellen in een gastdier of weefselkweekcellen afgeleid van een dier. Het kweken van diervirussen is belangrijk voor 1) identificatie en diagnose van pathogene virussen in klinische soorten, 2) productie van vaccins en 3) onderzoek in het algemeen. In vivo gastheerbronnen kunnen een zich ontwikkelend embryo zijn in het ei van een bevruchte vogel (bijvoorbeeld kip, kalkoen) of een heel dier. De meeste griepvaccins die worden geproduceerd voor jaarlijkse griepvaccinatieprogramma's worden bijvoorbeeld in kippeneieren gekweekt. Het embryo- of gastheerdier dient als een incubator voor virale replicatie. De plaats binnen het embryo of gastdier is belangrijk. Veel virussen hebben een weefsel tropisme en moeten daarom op een specifieke locatie worden geïntroduceerd. Binnen een embryo omvatten doellocaties de vruchtholte, het chorioallantoïsche membraan of de dooierzak. Virale infectie kan weefselmembranen beschadigen en laesies veroorzaken die pokken worden genoemd, de embryonale ontwikkeling verstoren of de dood van het embryo veroorzaken.

Voor in vitro-onderzoeken kunnen verschillende soorten cellen worden gebruikt om de groei van virussen te ondersteunen. Een primaire celkweek wordt vers bereid uit dierlijke organen of weefsels. Cellen worden uit weefsels geëxtraheerd door mechanisch schrapen of fijnhakken om cellen vrij te maken of met een enzymatische methode met trypsine of collagenase om weefsel af te breken en afzonderlijke cellen in suspensie af te geven. Primaire celkweken worden uitgevoerd in een vloeibaar kweekmedium in een petrischaal of weefselkweekfles, zodat cellen een vast oppervlak hebben zoals glas of plastic voor hechting en groei. Primaire culturen hebben meestal een beperkte levensduur. Wanneer cellen in een primaire cultuur mitose ondergaan en een voldoende hoge dichtheid

van cellen ontstaat, komen cellen in contact met andere cellen. Wanneer dit cel-cel-contact optreedt wordt de mitose gestopt. Dit wordt contactremming genoemd en het voorkomt dat de dichtheid van de cellen te hoog wordt. Om contactremming te voorkomen, moeten cellen uit de primaire celkweek regelmatig worden overgebracht naar vers groeimedium. Dit wordt een secundaire celkweek genoemd. Periodiek moet de celdichtheid worden verlaagd door een deel van de cellen weg te gieten en vers medium toe te voegen om de celgroei te behouden. In tegenstelling tot primaire celkweken, zijn continue cellijnen, meestal afgeleid van getransformeerde cellen of tumoren, vaak in staat om vele malen doorgekweekt te worden of zelfs voor onbepaalde tijd te groeien (in welk geval ze onsterfelijk worden genoemd). Continue cellijnen vertonen mogelijk geen ankerafhankelijkheid (ze zullen in suspensie groeien) en kunnen hun contactremming hebben verloren. Als gevolg hiervan kunnen continue cellijnen groeien in stapels of brokken die lijken op kleine tumorgroei.

### **Op PCR gebaseerde detectiemethoden (qPCR, dPCR, RT-PCR en ICC-PCR)**

Het beoordelen van de diversiteit van virale soorten is niet zo eenvoudig als voor prokaryoten. Bacteriën en archaea kunnen worden geclassificeerd via het 16S rRNA-gen, maar onder alle virale soorten is er geen enkel gemeenschappelijk geconserveerd gen bekend. Daarom moet hier hele genoomsequencing (WGS) in plaats van gerichte gensequencing worden gebruikt om de heterogeniteit van virale taxa in een monster (het metaviroom) te beoordelen.

Gelijktijdige detectie van meerdere doelen in een monster is mogelijk met multiplex qPCR-testen die verschillende fluoroforen gebruiken voor verschillende doelen, hoewel deze methode wordt beperkt door de golflengtes die huidige qPCR-instrumenten kunnen detecteren (meestal 2 tot 5 golflengtebereiken). Om deze beperking te overwinnen, is aangetoond dat qPCR met hoge doorvoer met behulp van microfluidische technologie een directe multi-pathogeen detectiemethode is voor watermonsters uit de omgeving. Deze methode maakt gebruik van microfluidische chips die gelijktijdige kwantificering van grote steekproefgroottes voor tal van enterische virussen en andere pathogenen mogelijk maken in hoge monstervolumes.

Op PCR gebaseerde methoden hebben het nadeel dat ze vatbaar zijn voor remmende stoffen die vaak samen worden geconcentreerd met virussen, zoals humuszuren, die vaak aanwezig zijn in watermonsters uit de omgeving. Digitale PCR (dPCR) heeft recent aandacht gekregen als een middel voor directe absolute kwantificering van virale genkopieën in een monster, zonder de noodzaak van kalibratie. Deze methoden omvatten het verdelen van doel-DNA / RNA-moleculen en (RT-) PCR-mastermix in enkele duizenden (~10–50k), kleinvolume (meestal nanoliter) PCR-reacties, waarna het aantal positieve reacties wordt bepaald en absolute hoeveelheden worden berekend op basis van een Poisson-verdeling. Een groot voordeel van dPCR is de tolerantie van de methode voor remmende stoffen vanwege het feit dat, anders dan qPCR, kwalitatieve amplificatie van doelgenomen minder wordt beïnvloed door PCR-remmers.

Op PCR gebaseerde methoden zijn echter minder geschikt voor het onderscheiden van infectieuze virussen van niet-infectieuze virussen. Geïntegreerde celkweek (ICC) –PCR is een combinatie van celkweekmethoden en moleculaire methoden, en bevat de voordelen van beide methoden om ieders tekortkomingen te overwinnen. Door doelvirussen te verspreiden en hun (RT-) PCR-detectie eenvoudiger te maken, zijn problemen met kweekmethoden voor

kwantificering van inheemse virussen in watermonsters uit de omgeving minder belangrijk. Verschillende onderzoeken hebben de specifieke detectie van de intermediaire replicatieproducten van virale genomen (mRNA voor DNA-virussen of negatiefstrengs RNA voor positieve enkelstrengige RNA-virussen) voorgesteld door RT-PCR om bewijs te verkrijgen voor virale replicatie en om virale infectiviteit nauwkeuriger te beoordelen.

### **Op immunologie gebaseerde methoden**

Immunologische detectie met antilichamen is een technologie die wordt gebruikt voor de detectie van meerdere pathogenen. Deze werkwijzen zijn gebaseerd op antilichaam-antigen-interactie, waarbij een specifiek antilichaam zal binden aan specifiek antigen dat het gebruik van polyklonale en monoklonale antilichamen omvat. Immunologische detectie omvat bijvoorbeeld serumneutralisatietests (SNT), immunofluorescentie en enzymgebonden immunosorbentbepalingen (ELISA). SNT-tests worden gebruikt voor de serotyping van virussen en bestaan uit het mengen van een monster, geëxtraheerd uit een plaque-assay, met antiserum en vervolgens het beoordelen van de afname van infectiviteit door plaque-assay. Deze technieken hebben beperkingen zoals lage gevoeligheid, vals negatieve resultaten, kruisreactiviteit met nauw verwante antigenen en de noodzaak van voorconcentratie om de celoppervlakantigenen te verminderen.

ELISA's worden doorgaans uitgevoerd op een polystyreenplaat die antilichamen of eiwitten kan binden door een enzym-substraatreactie. Om een nauwkeurig en reproduceerbaar resultaat te krijgen, moeten omstandigheden en timing van de enzym-substraatreactie optimaal zijn. Het infectieniveau wordt gemeten op basis van de optische dichtheid (de mate van kleurings) van de ELISA-reactie. Voordelen van ELISA zijn dat het gevoelig is, een groot aantal monsters tegelijkertijd kan worden onderzocht, slechts een kleine hoeveelheid antilichaam nodig is voor de detectie van ziekten en het proces kan semi-geautomatiseerd zijn. Voor veel virussen zijn specifieke antisera ontwikkeld, waaronder CMV, Citrus tristeza virus (CTV), Potato Leaf Roll Virus (PLRV), Potato Virus X (PVX) en Potato Virus Y (PVY). Vergeleken met moleculaire methoden is voor ELISA een grotere hoeveelheid monster nodig om het antigen van interesse aan te kunnen tonen, en het duurt ongeveer 2 dagen voor diagnose. Aangezien ELISA een op antilichaam-antigen gebaseerde test is, is de beschikbaarheid van antilichaam dat op de juiste wijze op het virus-antigen reageert een zeer belangrijke factor. ELISA kan vaak een verkeerde diagnose geven (vals-positief) wat voornamelijk het gevolg is van niet-specifieke reacties of kruisreactiviteit met bepaalde factoren in het monster. Het antilichaam gebruikt in ELISA kan op veel stammen reageren met een duidelijk ander symptoom vanwege een gebrek aan specificiteit. Daarom kunnen zeer verwante virusstammen niet correct worden gedifferentieerd door ELISA. Hoewel de ELISA-gevoeligheid kan worden verhoogd door toevoeging van enkele additieven in de extractiebuffer, is ELISA over het algemeen minder gevoelig in vergelijking met moleculaire methoden. Hoewel ELISA's vroeger op grote schaal zijn gebruikt voor diagnostische doeleinden, lijkt het gebruik van ELISA in termen van diagnose vanwege deze redenen geleidelijk te zijn afgenomen.

### **Biosensoren**

Biosensoren zijn de snelstgroeijende technologie voor het detecteren van virussen. Een biosensor wordt gedefinieerd als een analytisch apparaat met een herkenningselement geassocieerd of geïntegreerd met fysisch-chemische transducers die een elektrochemische, optische, massagevoelige, calorimetrisch of magnetisch signaal genereren.



Biosensoren hebben een herkenningselementen (receptor) nodig dat in staat is om gevoelig en selectief de beoogde parameter (doel) te detecteren en vervolgens de receptor op het oppervlak van de transducer aan te brengen / immobiliseren om een compleet apparaat mogelijk te maken. Antilichamen, MIP's en aptameren zijn voorbeelden van het type herkenningsreceptoren dat kan worden gebruikt voor virusherkenning en detectie. De doelen zijn virale eiwitten, virale nucleïnezuuren of antilichamen die door de gastheer worden geproduceerd als gevolg van virale infectie. Problemen met bio-receptoren, zoals sterische hinder, denaturatie en niet-specifieke binding aan niet-doelmoleculen, kunnen een probleem zijn tijdens de detectie. Daarom is een succesvolle opname van bio-receptoren cruciaal voor de werking van de biosensor. Sensoren kunnen worden gecombineerd met microfluidica, wat voordelen biedt zoals kleine monstervolumes, goedkope reagentia, gemakkelijke vloeistofregeling en gemakkelijke procesautomatisering. Het gebruik van biosensortechnologie met slimme-affiniteitsmaterialen en nanomaterialen kan een groot potentieel hebben voor het detecteren van virussen in watermonsters. Deze sectie rapporteert over de nieuwste technologieën die worden gebruikt voor het verwijderen en detecteren van watergedragen virussen met de nadruk op snelle detectie met behulp van biosensoren. Tabel 4 toont verschillende soorten biosensoren om virussen te detecteren.

**Tabel 4** - Verschillende soorten biosensoren voor de detectie van virussen.

Type Sensor	Detectieprincipe	Doel gedetecteerd	Detectiegrens
Piëzo-elektrische QCM-sensoren	Detecteert de bindingsgebeurtenis die optreedt wanneer het doel zich bindt aan de elektrode van de sensor en de frequentie van de kwartsresonator verandert	M13 M13 Influenza A	20 fagen 106 pfu.mL <sup>-1</sup> 4 virus deeltje.mL <sup>-1</sup>
Optische gebaseerde SPR-sensoren	Indirecte, afgeleide detectie van het bestaan van oppervlakte-plasmonen uit de resulterende absorptie door het doel die overeenkomt met de koppeling van licht aan het oppervlakte-plasmon	Hepatitis C Hepatitis B Besmettelijk bursaal virus	60 pM 2 fg.mL <sup>-1</sup> 2.5 ng.mL <sup>-1</sup>
Elektrochemische sensoren	Directe omzetting van een biologische gebeurtenis (doelbinding aan affiniteitsligand) in een elektronisch signaal	Bacteriophage MS2 Bacteriophage MS2 Hepatitis B Adenovirus Rotavirus	3.2 x 10 <sup>10</sup> viral deeltje.mL <sup>-1</sup> 1.5 x 10 <sup>10</sup> viral deeltje.mL <sup>-1</sup> 7.19x10 <sup>-9</sup> M 10 <sup>3</sup> virus deeltje.mL <sup>-1</sup> 10 <sup>3</sup> pfu.mL <sup>-1</sup>

Biosensoren worden meestal geclassificeerd op basis van hun wijze van fysiochemische signaaltransductie. De transducer speelt een vitale rol binnen een biosensor: deze moet de (bio) chemische interactie / signaal reproduceerbaar omzetten in een meetbaar fysiek signaal. Transductiemethoden omvatten momenteel overwegend elektrochemische, optische en piëzo-elektrische principes, maar ze breiden zich voortdurend uit naar het gebruik van andere fysieke effecten.

#### *Elektrochemische biosensoren*

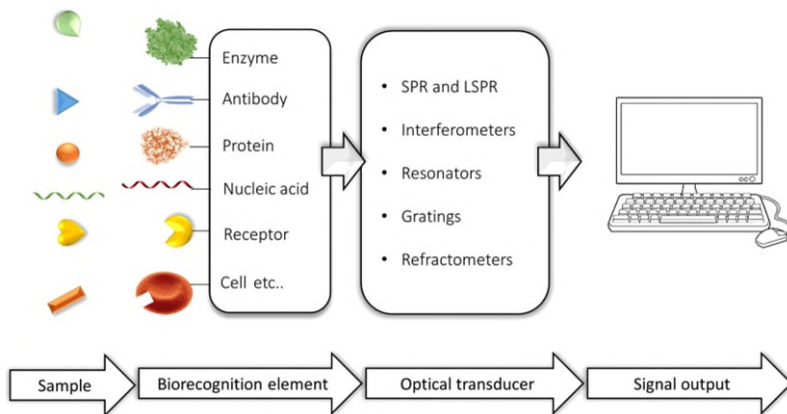
Elektrochemische sensoren bestaan uit een op zichzelf staand geïntegreerd apparaat, dat kwantitatieve of semi-kwantitatieve analyse van doelherkenning-gekatalyseerde reacties met behulp van een elektrochemisch transductie-element kan uitvoeren. Elektrochemische biosensoren worden verder geclassificeerd in voltammetrische, potentiometrische, amperometrische en op impedantie gebaseerde biosensoren.

#### *Piëzo-sensoren*

Piëzo-sensoren reageren op de binding van het doel door de geïnduceerde toename van de massa, die op zijn beurt de oscillatiefrequentie van een piëzo-elektrisch materiaal / kristal verandert en een bijbehorend elektrische signaal produceert. De transducer in piëzo-elektrische biosensoren is gemaakt van piëzo-elektrische materialen (bijvoorbeeld kwarts) en het biosensoroppervlak is gecoat of geïmmobiliseerd op het piëzo-elektrische oppervlak dat oscilleert met zijn natuurlijke frequentie. Als een doel zich bindt aan het detectieoppervlak, wordt een frequentieverschuiving veroorzaakt die veranderingen in piëzo-elektrische stroom veroorzaakt die recht evenredig is met de geïnduceerde massaverandering.

#### *Optische biosensoren*

Het gebruik van een verscheidenheid aan optische detectiemethoden wordt gepromoot als een veelbelovend alternatief transducerplatform voor pathogeenanalyse. Dit type biosensor kan zelfs kleine veranderingen in doelen detecteren, waardoor gevoelige en specifieke metingen mogelijk zijn. Optische detectie wordt uitgevoerd door gebruik te maken van de interactie van het optische veld met een bioherkennings-element. Optische bioherkenning kan grofweg worden verdeeld in twee algemene modi: labelvrij en labelgebaseerd. In het kort: in een labelvrije modus wordt het gedetecteerde signaal direct gegenereerd door de interactie van het geanalyseerde materiaal met de transducer. Label-gebaseerde waarneming omvat daarentegen het gebruik van een label en het optische signaal wordt vervolgens gegenereerd door een colorimetrische, fluorescerende of luminescerende methode. Een optische biosensor is een compact analytisch apparaat dat een bioherkennings-sensor bevat dat is geïntegreerd met een optisch transducersysteem (Figuur 11).

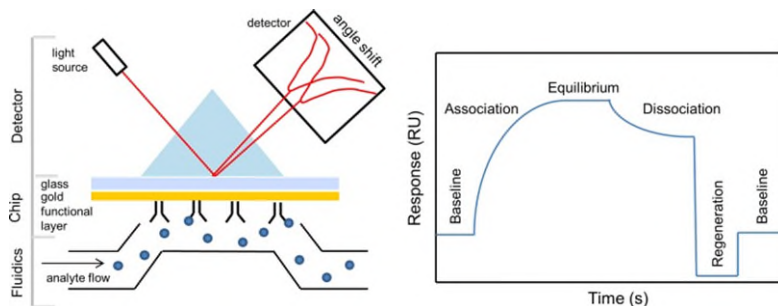


**Figuur 11** - Optische biosensoren.

Optische biosensoren kunnen verschillende types transducer gebruiken:

*a) Oppervlakte plasmon resonantie biosensoren (SPR)*

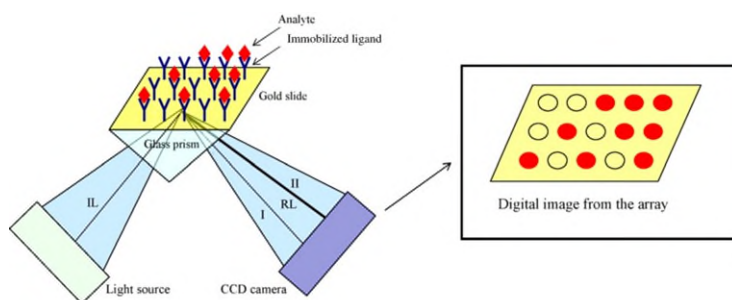
Het SPR-fenomeen treedt op op het oppervlak van metaal (of andere geleidende materialen) op het raakvlak van twee media (meestal glas en vloeistof) wanneer het wordt verlicht door gepolariseerd licht onder een specifieke hoek. Dit genereert oppervlakteplasmonen en bijgevolg een vermindering van de intensiteit van gereflecteerd licht onder een specifieke hoek die bekend staat als de resonantiehoek. Dit effect is evenredig met de massa op het oppervlak. Een sensorgram kan worden verkregen door de verschuiving van reflectiviteit, hoek of golflengten tegen de tijd te meten. In alle configuraties maakt het SPR-fenomeen directe, labelvrije en real-time veranderingen van de brekingsindex op het sensoroppervlak mogelijk, wat evenredig is met de concentratie van de biomoleculen. Om een ligand-doel interactie te meten, moet één interactief molecuul op het sensoroppervlak worden geïmmobiliseerd. Een praktisch SPR-instrument combineert een optisch detectordeel, meestal het meten van de intensiteitsverschuiving, een sensorchip met een gouden oppervlak en een laag die ligandimmobilisatie mogelijk maakt, geïntegreerd in een vloeistofstelsel dat een doorstroming mogelijk maakt. Het werkingsprincipe van een typisch SPR-instrument wordt weergegeven in Figuur 12.



**Figuur 12** - Het principe van SPR-instrument (links) en typisch SPR-sensorgram met de stappen van een analytische cyclus (rechts).

De SPR-chip bevat een functionele laag die de immobilisatie van op elkaar inwerkende moleculen mogelijk maakt. Huidige instrumenten zijn meestal gebaseerd op immobilisatie op basis van een zelf-geassembleerde monolaag bedekt met een gecarboxymethyleerd dextran. Deze configuratie maakt de effectieve immobilisatie van eiwitten mogelijk met behulp van N-hydroxysuccinimide (NHS) chemie. In een praktisch experiment is één interactiecomponent, b.v. het ligand, permanent bevestigd aan het chipoppervlak en een andere interactiecomponent, b.v. het doel stroomt over het oppervlak en bindt zich aan het ligand. De nadelen hier zijn meerdere andere effecten die kunnen optreden en SPR-analyse compliceren, waaronder niet -1: 1 bindende stoichiometrie, aviditeit, niet-specifieke absorptie van ligand en beperking van massaoverdracht. Er is momenteel geen vergelijkbare technologie beschikbaar om labelvrij biomoleculaire interactie in realtime te karakteriseren, en daarom is SPR momenteel een belangrijk hulpmiddel voor onderzoek naar biologische wetenschappen en de ontwikkeling van farmaceutische geneesmiddelen.

Bij SPR-beeldvorming (SPRi) gaat de SPR-analyse een stap verder door de gevoeligheid van SPR en ruimtelijke beeldvorming samen te voegen in een microarray-indeling waardoor meerdere verschillende interacties gelijktijdig kunnen worden bestudeerd. SPRi maakt het mogelijk om tegelijkertijd meerdere verschillende interacties op een reeks nauwkeurig gevormde moleculen te bestuderen (Figuur 13).



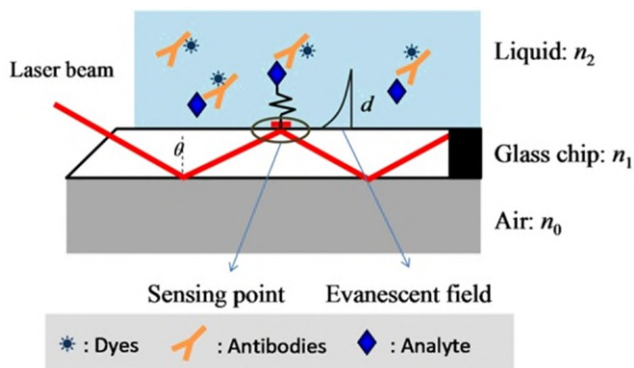
**Figuur 13** - Een schematische illustratie van de opstelling voor de SPR-beeldvorming

Localized SPR (LSPR) is gebaseerd op metalen nanostructuren (MNP's) (Au, Ag, etc.) met unieke optische eigenschappen die niet worden gezien in grotere metalen structuren. Een voorbeeld van een dergelijk fenomeen is de rode kleur van waterige dispersies van colloïdale gouddeeltjes, wat een manifestatie is van LSPR. Het optische fenomeen van LSPR doet zich voor wanneer invallend licht een wisselwerking heeft met MNP's: het elektromagnetische veld van het licht induceert collectieve elektronenladingoscillaties beperkt in MNP's en de daaropvolgende absorptie van licht binnen de ultraviolet-zichtbare (UV-VIS) band. Het grote verschil tussen SPR en LSPR is dus dat geïnduceerde plasmonen lokaal op de nanostructuur oscilleren in plaats van langs het metaal / diëlektrische oppervlak.

*b) Fluorescentie-biosensoren van de elektromagnetische golf*

De biologische herkenning en de daaruit voortvloeiende bindende gebeurtenis vinden plaats binnen de grenzen van een vluchtige golf. De vluchtige golf komt voort uit de manier waarop licht zich gedraagt wanneer het wordt

opgesloten in een optische golfgeleider of vezels. Geleid licht wordt volledig intern gereflecteerd wanneer het de interface van de golfgeleider / vezel en een omringend medium met een lagere brekingsindex ontmoet, als gevolg hiervan strekt een elektromagnetisch veld dat een vluchtige golf wordt genoemd zich uit van de interface naar het medium met lagere index. De vluchtige golf vervalst exponentieel met de afstand van het oppervlak, in het algemeen over de afstand van 100nm tot ongeveer een golflengte. Omdat de verdwijnende golf zo'n fenomeen dichtbij het oppervlak is, is detectie met behulp van verdwijnende golfexcitatie om het fluorescentiesignaal te genereren oppervlaktegevoelig, wat betekent dat alleen fluorescerende moleculen nabij het oppervlak worden geëxciteerd (Figuur 14).



**Figuur 14** - Schematische weergave van een vlakke optische golfgeleiderchip met vluchtige golf.

#### c) Bioluminescente biosensoren van optische vezels

Deze techniek maakt gebruik van recombinante bioluminescente cellen, en het bioluminescente signaal wordt vanaf het doel overgebracht door een optische vezel. Hiervoor wordt bijvoorbeeld een stam van *Escherichia coli*, genetisch gemodificeerd om een luminescent signaal uit te zenden in aanwezigheid van genotoxische middelen, geïmmobiliseerd op een glasvezel. Hiermee is het ook mogelijk om een bioluminescente biosensor met levende celarray te vervaardigen, door het immobiliseren van bacteriecellen op optische vezels gerangschikt in een array van microwells met hoge dichtheid. Elke microwell bevat dan een enkele genetisch gemanipuleerde bacterie die reageert op een specifiek doel, waardoor de array-biosensor multidetectie van bijvoorbeeld genotoxinen mogelijk maakt.

#### d) Interferometrische biosensoren met optische golfgeleider

Een geïntegreerde planaire optische golfgeleider interferometrische biosensor is een combinatie van methoden voor het detecteren van vluchtig veld en optische faseverschil. Door het nabije oppervlakgebied van een roostersensorgebied af te tasten met het vluchtende veld, induceert elke verandering van de brekingsindex van het geteste volume een faseverschuiving van de geleide modus in vergelijking met een referentieveld, typisch van een modus die zich voortplant door de referentiearm van dezelfde golfgeleiderstructuur. De interfererende velden van deze modi produceren een interferentiesignaal dat wordt gedetecteerd aan de uitgang van de sensor, waarvan de wijziging evenredig is met de brekingsindexverandering en het signaal gerelateerd is aan de concentratie van het doel. Deze techniek, ook wel resonant waveguide-grid (RWG) genoemd, is geschikt voor het detecteren van de

herverdeling van cellulaire inhoud, het bestuderen van cellulaire responsen en cellulaire processen, en werd ook toegepast bij de detectie van het vogelgriepvirus.

#### *e) Ellipsometrische biosensoren*

Een ellipsometrische biosensor meet veranderingen in de polarisatie van licht wanneer het wordt gereflecteerd vanaf een oppervlak. Dit platform werd toegepast bij het detecteren van de binding van influenza A-virusstammen met een panel van glycanen met verschillende structuren. De schijnbare evenwichtsdissoctatieconstanten (aviditeitsconstanten, 10-100 pM) werden gebruikt als kenmerkende parameters van virale receptorprofielen.

#### *f) Biosensoren van reflectometrische interferentiespectroscopie*

Reflectometrische interferentiespectroscopie (RfS) is een labelvrije en tijdsafhankelijke methode waarbij de eenvoudige optische opstelling is gebaseerd op witlichtinterferentie op dunne lagen. Veranderingen in de fase en amplitude van gepolariseerd licht geven informatie over de dikte en brekingsindex van de geadsorbeerde eiwitlaag. Deze methode werd bijvoorbeeld gebruikt voor de detectie en kwantificering van diclofenac in rundermelk; de verkregen detectiegrens was  $0,112 \mu\text{g l}^{-1}$  in de complexe melkmatrix. Een RfS-biosensor voor de detectie van circulerende tumorcellen was in staat selectieve kankercellen te detecteren binnen een concentratiebereik van 1000-1000.000 cellen  $\text{ml}^{-1}$  met een detectielimiet van  $<1000$  cellen  $\text{ml}^{-1}$ .

#### *g) Oppervlakte-verbeterde Raman-verstrooiingsbiosensoren*

Oppervlakversterkte Raman-verstrooiing (SERS) is een biosensortechniek die de intensiteit van de trillingspectra van een molecuul met verschillende ordes van grootte verbetert wanneer het zich in de nabijheid bevindt van nano-geruwde metalen oppervlakken of nanodeeltjes gemaakt van goud of zilver. Een SERS-actief oppervlak gefabriceerd op de punt van optische vezels is toegepast voor de detectie van kankereiwitten ( $\sim 100$  pg) in een laag monstervolume ( $\sim 10$  nl). Ook is een SERS-biosensor beschreven voor de snelle en gevoelige detectie van een eiwitbiomarker van hormoonontregelende verbindingen in een aquatisch milieu, met een detectielimiet van  $5 \text{ ng l}^{-1}$ .

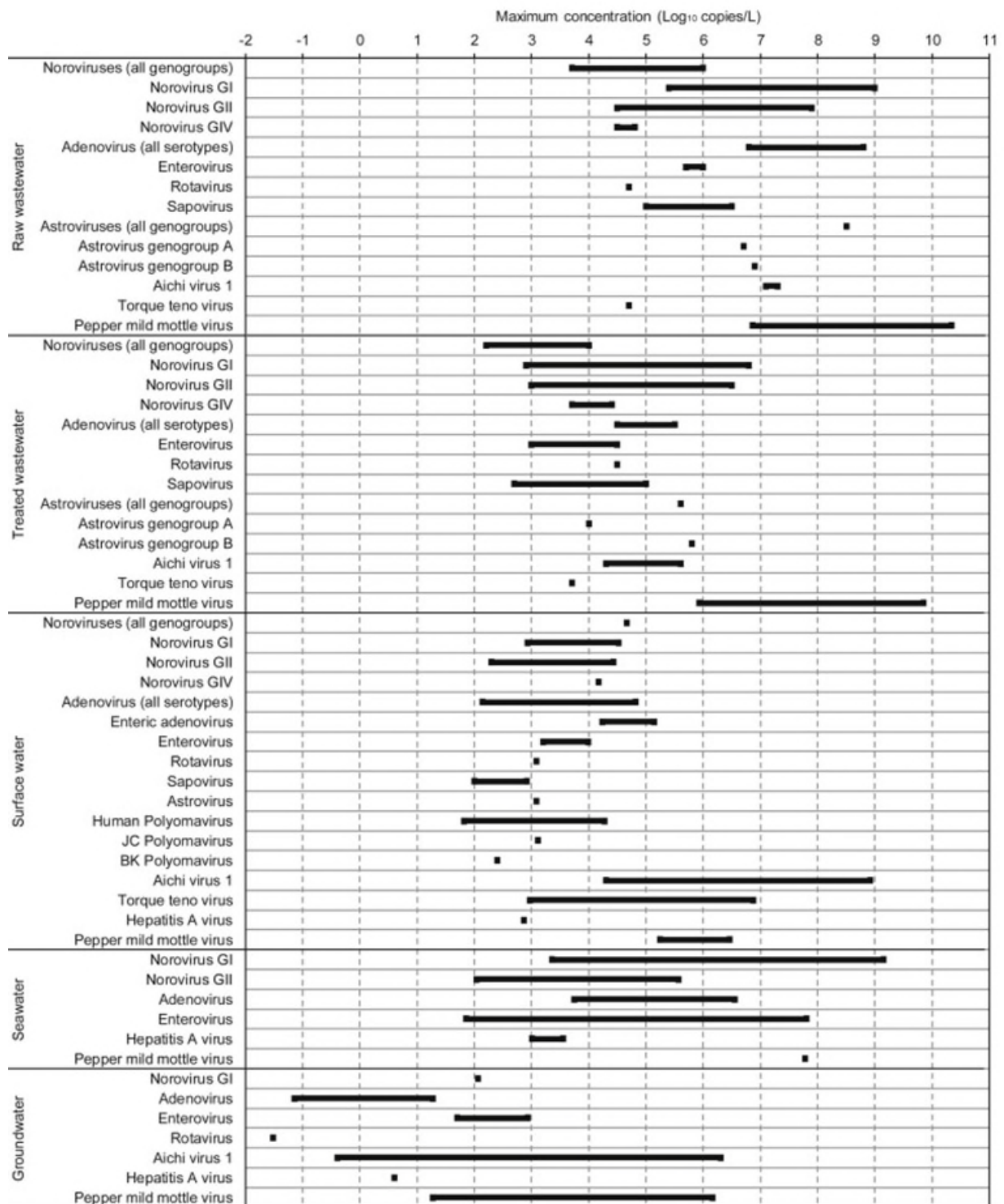
### **Uitdagingen met betrekking tot biosensoren**

Een grote uitdaging wordt gevormd door de vele en potentieel interfererende microbiële soorten die aanwezig zijn, samen met deeltjes, organische / anorganische bestanddelen en verontreinigingen, en moleculaire agglomeraten en geassocieerde stoffen, bijvoorbeeld van humusverbindingen. Door niet-specifieke interacties en adsorptie op het biosensoroppervlak worden de levensduur, specificiteit en betrouwbaarheid van biosensoren die worden toegepast op complexe omgevingsmonsters beperkt. Bovendien zijn biosensoren die worden gebruikt bij de detectie van pathogenen vaak afhankelijk van de interactie van een natuurlijke receptor, meestal een antilichaam, dat dient als het bioherkennings-element met zijn overeenkomstige tegenhanger. Deze uitdagingen kunnen worden aangepakt door gebruik te maken van robuustere moleculaire detectieschema's zoals de DNA-signatuur van pathogenen, aangezien DNA een inherent robuust molecuul is. Als alternatief kunnen natuurlijke receptoren zoals enzymen en

antilichamen in toenemende mate worden vervangen door geavanceerde biomimetische herkenningselementen zoals die worden geboden door peptiden, aptameren en moleculair ingeprinte / gesjablonerde polymeren. Ondanks deze uitdagingen worden steeds vaker duidelijk vooruitstrevende biosensorplatforms ontwikkeld, waarin een breed scala aan transductietechnologieën en moleculaire herkenningsschema's wordt gecombineerd met geïntegreerde bemonsterings- / microfluidische concepten.

## **I.IX            Kwantificering van virussen in water**

Wereldwijd zijn verschillende soorten virussen aanwezig zijn in verschillende soorten wateren. Afbeelding 15 laat de maximale concentratie zien van verschillende virustypen in de literatuur. De maximale concentratie is belangrijk omdat deze het worst-case scenario beschrijft in termen van niveaus van virale besmetting en bijbehorende risico's voor de menselijke gezondheid.



**Figuur 15** - Bereiken van maximale concentraties van virussen (aangegeven als balken) in verschillende soorten omgevingswateren gerapporteerd in de literatuur.



## **I.X Bioveiligheid en verwijdering**

De noodzaak van het nemen van voorzorgsmaatregelen bij het experimenteren met virale culturen hangt af van de bron en aard van het biologische materiaal, de experimentele procedure en de laboratorium- / insluitingsomstandigheden. Omdat elke situatie anders is, moeten de risico's voor elke afzonderlijke stam worden geïdentificeerd en moeten de juiste voorzorgsmaatregelen worden genomen voordat met enig werk wordt begonnen.

Een bioveiligheidsniveau (biosafety level, BSL) wordt gebruikt om het niveau van voorzorgsmaatregelen te specificeren in ruimtes waar gewerkt wordt met biologische stoffen. Zowel in de Verenigde Staten als in de EU wordt hiermee gewerkt.

### **Biosafety level 1 (BSL 1)**

Hier mag gewerkt worden met alle micro-organismen (virussen, schimmels, bacteriën, etc.) die normaal geen ziekte bij de mens veroorzaken. Er zijn geen speciale veiligheidsmaatregelen nodig anders dan een goed geoutilleerd microbiologisch laboratorium. Gewone laboratoriumhygiëne is voldoende. Alle afval wordt ontsmet.

### **Biosafety level 2 (BSL 2)**

Hier mag gewerkt worden met organismen die ziekten veroorzaken die zich niet makkelijk onder de bevolking verspreiden en waartegen effectieve geneesmiddelen of vaccins bestaan. Voorbeelden zijn kinkhoest, difterie, mazelen en meningokokken. Het lab is echter alleen toegankelijk voor mensen die er werken en de procedures kennen. Deuren zijn altijd gesloten tijdens het werk en ramen kunnen niet open. De hele ruimte is ingericht om efficiënt schoon te maken en te desinfecteren. Alle afval wordt ontsmet.

### **Biosafety level 3 (BSL 3)**

Hier wordt gewerkt met veroorzakers van zeer ernstige ziekten die zich mogelijk verspreiden onder de bevolking, maar waartegen wel medicijnen of vaccinaties beschikbaar zijn. Denk aan polio, tuberculose en tyfus. De luchtdruk in deze ruimten is lager dan die van de omgeving, zodat de lucht altijd 'naar binnen' stroomt. Men mag het lab alleen binnengaan via een sluis en gekleed in een jas met achtersluiting. Er wordt gewerkt in een biologische veiligheidswerkbank of in een handschoenenkast (glovebox). Materialen mogen pas naar buiten als ze dubbel verpakt zijn en aan de buitenkant ontsmet. Mogelijk besmet afval wordt eerst ontsmet voordat het wordt afgevoerd.

### **Biosafety level 4 (BSL 4)**

De organismen waarmee hier wordt gewerkt, zijn besmettelijk en dodelijk en er zijn geen medicijnen of vaccins tegen (bijvoorbeeld het Ebolavirus). Een uitzondering op die regel is het pokkenvirus; ondanks het feit dat er een vaccin tegen bestaat wordt er toch in een BSL 4 laboratorium gewerkt. Om iedere mogelijkheid op ontsnappen van het organisme te voorkomen, is het lab een hermetisch gesloten 'doos' van roestvast staalplaat. De wanden, het plafond en de vloer worden aan elkaar gelast. Het werk vindt plaats in veiligheidskabinetten of isolatoren en de mensen die er gaan werken dragen overdrukpakken die bij vertrek uit de ruimte in een decontaminatiedouche worden ontsmet.

### **Verwijdering van infectieuze materialen**

Alle virale culturen, voorraden en potentieel besmettelijke materialen moeten voorafgaand aan verwijdering naar behoren worden ontsmet. De schriftelijke methode voor juiste ontsmetting moet beschikbaar zijn in het laboratorium

en de BSL-faciliteit. Verschillende sterilisatiemethoden omvatten het gebruik van een autoclaaf, chemische desinfectie, verbranding of een andere gevalideerde ontsmettingsmethode.

### **Biologische risicobeoordeling voor het werken met opkomende virussen**

Voordat experimenten met opkomende virussen in een laboratoriumomgeving worden uitgevoerd, moeten de gezondheids- en milieugerelateerde risico's die met manipulatie gepaard gaan, worden beoordeeld. De beoordeling van het biologische risico bij het werken met opkomende virussen is vooral gericht op het voorkomen van laboratoriuminfecties en onbedoelde afgifte van een virus. De bio-risicobeoordeling wordt vaak als moeilijk gezien vanwege het gebrek aan informatie over kenmerken van de virussen en de veroorzaakte infectie. Het risiconiveau voor laboratoriummedewerkers moet worden beoordeeld aan de hand van de best beschikbare informatie over de opkomende virussen.

Traditioneel zijn de relatief gevaarlijke ziekteverwekkers, inclusief virussen, gegroepeerd in vier risiconiveaus:

- Risicogroep 1 zijn ziekteverwekkers met een laag risico voor het individu en de gemeenschap;
- Risicogroep 2 zijn ziekteverwekkers met een matig risico voor individuen en een laag risico voor de gemeenschap;
- Risicogroep 3 zijn ziekteverwekkers met een hoog risico voor individuen, een laag risico voor de gemeenschap; en
- Risicogroep 4 zijn ziekteverwekkers met een hoog risico voor individuen en een hoog risico voor de gemeenschap.

Opkomende virussen behoren in het algemeen tot risicogroep 2 zoals hepatitis C en het knokkelkoortsvirus; Risicogroep 3 zoals het HPAI H5N1, West-Nijlvirus, Japans B-encefalitisvirus; of Risicogroep 4 zoals het Ebola-virus, het Marburg-virus. Risicogroepen van bepaalde opkomende virussen en aanbevolen voorzorgsmaatregelen voor de behandeling ervan worden hieronder weergegeven.

Veiligheidsapparatuur omvat bioveiligheidskasten (BSC), gesloten containers en andere technische controles die zijn ontworpen om blootstelling aan opkomende virussen te elimineren of te verminderen. De BSC is het belangrijkste veiligheidsapparaat dat wordt gebruikt om te zorgen voor insluiting van besmettelijke druppels of aerosolen die ontstaan tijdens het werken. Bovendien kan de veiligheidsuitrusting ook bestaan uit persoonlijke beschermingsmiddelen. Een andere veiligheidsuitrusting die fungeert als primaire barrière voor virusbeheersing is de afgesloten centrifugebeker, die is ontworpen om het vrijkomen van aerosolen tijdens centrifugeren te voorkomen. De juiste desinfectie is essentieel voor het onderbreken van de verspreiding van opkomende virussen in het laboratorium. Sommige virussoorten zijn bestand tegen extreme omstandigheden en zijn in staat om langdurig besmettelijk op oppervlakken te blijven en bieden daardoor een hoge weerstand tegen desinfectie. Geschikte middelen om verschillende virussen te inactiveren zijn onder andere alkalische detergentia op basis van kaliumhydroxide en natriumhydroxide, desinfectiemiddelen op basis van perazijnzuur en azijnzuur en gasvormig waterstofperoxide. Er is aangetoond dat deze virucidale werkzaamheid bieden en daarom een zeer hoog niveau van bescherming tegen virale besmetting kunnen bieden. Zika-virus wordt gedood door kaliumpermanganaat bij 0,5%, 24 uur contact met ether en temperaturen boven 60 ° C maar wordt niet geïnactiveerd door 10% ethanol. Voor de ontsmetting van BSC zijn de primaire methoden het gebruik van formaldehydgas, de dampfase van waterstofperoxide en chloordioxidegas.

De virusinactiveringsmechanismen van verschillende veel voorkomende virucidale middelen zijn gemeld. Behandelingen met ultraviolette (UV) straling, singletzuurstof en hypochloorzuur vernietigen meestal het virale genoom, terwijl chloordioxide en hitte het proces van gastheercelherkenning voor virusbinding onderbreken. Omhulde (envelop) virussen zijn aanzienlijk gevoeliger voor virucidale chemicaliën vanwege de aanwezigheid van essentiële lipiden in hun envelop. Onder de niet-omhulde virussen zijn die met een kleinere deeltjesgrootte minder gevoelig dan die met een groter formaat. Andere studies toonden echter aan dat nauw verwante virussen verschillende kinetiek kunnen vertonen voor desinfectie wanneer dezelfde biociden worden gebruikt.

De classificatie van opkomende virussen is daarom gebaseerd op twee maatregelen: biologische veiligheid voor laboratoriummedewerkers (biosafety) en verspreiding van ziekteverwekkers in de omgeving (biosecurity). Voor bioveiligheidsevaluatie in het laboratorium is de belangrijkste overweging het vermogen van virussen om lokale of wijdverspreide ziekten te veroorzaken door laboratoriumongevallen. Op het gebied van ziekteverspreiding, met name bij de beoordeling van biodefensie, is de grootste zorg dat virussen als wapens kunnen worden gebruikt bij terrorisme en schade kunnen veroorzaken die verband houdt met hun ongeoorloofde introductie.

## **I.XI Referenties**

<https://www.nature.com/articles/s41545-019-0032-3>

<https://en.wikipedia.org/wiki/Virus>

[https://file.scirp.org/pdf/AiM\\_2013091110391866.pdf](https://file.scirp.org/pdf/AiM_2013091110391866.pdf)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4493476/>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160518303064>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4482390/>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4915788/>

<https://www.canada.ca/content/dam/hc-sc/documents/programs/consultation-enteric-virus-drinking-water/document/enteric-viruses-drinking-water.pdf>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908415001443?via%3Dihub>

<https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2018/an/c7an00983f#!divAbstract>

[https://en.wikipedia.org/wiki/Virus\\_classification](https://en.wikipedia.org/wiki/Virus_classification)

[https://en.wikipedia.org/wiki/Cucumber\\_mosaic\\_virus](https://en.wikipedia.org/wiki/Cucumber_mosaic_virus)

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135418302501>

<http://microchemlab.com/information/ms2-bacteriophage-viral-screening-tool>

<https://www.nature.com/articles/nature03056>

<https://morgridge.org/wp-content/uploads/Virus-Structure.pdf>

[https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A\\_Microbiology\\_\(Bruslind\)/08%3A\\_Introduction\\_to\\_Viruses](https://bio.libretexts.org/Bookshelves/Microbiology/Book%3A_Microbiology_(Bruslind)/08%3A_Introduction_to_Viruses)

<https://www.nature.com/articles/s41598-019-39734-w>

<https://www.thoughtco.com/plant-viruses-373892>

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>

<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2014.00194/full>

<https://www.intechopen.com/books/genetic-diversity/diversity-of-plant-virus-populations-a-valuable-tool-for-epidemiological-studies>

[https://en.wikipedia.org/wiki/Reverse\\_transcriptase](https://en.wikipedia.org/wiki/Reverse_transcriptase)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6618307/>

<https://courses.lumenlearning.com/microbiology/chapter/isolation-culture-and-identification-of-viruses/>

[https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Virology\\_Guide.ashx](https://www.atcc.org/~media/PDFs/Culture%20Guides/Virology_Guide.ashx)

<https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0167105>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0043135418301039#bib89>

<http://www.ub.edu/virusenterics/wp-content/uploads/2013/06/FEMS-Micbiol-Rev-COST.pdf>

<https://cpb-us-w2.wpmucdn.com/sites.coecis.cornell.edu/dist/4/182/files/2018/01/J55-2k1sfj.pdf>

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908415001443>

<https://www.nature.com/articles/nrmicro.2016.177>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21523/>

<https://www.karger.com/Article/FullText/484899>

[https://www.cell.com/structure/comments/S0969-2126\(03\)00222-3](https://www.cell.com/structure/comments/S0969-2126(03)00222-3)

<https://academic.oup.com/femsec/article/49/1/3/527569>

<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/jam.12143>

<http://www.online-rpd.org/journal/view.html?uid=14&vmd=Full&>

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4986466/>