

rivm

Rapport 703719049/2010

H. Blaak et al.

Emerging pathogenen in oppervlaktewater

RIVM Rapport 703719049/2010

Emerging pathogenen in oppervlaktewater

H. Blaak
H. H. J. L. van den Berg
A. E. Docters van Leeuwen
R. Italiaander
J. A. C. Schalk
S. A. Rutjes
F. M. Schets
A. M. de Roda Husman

Contact:
Hetty Blaak
Laboratorium voor zoonosen en omgevingsmicrobiologie
hetty.blaak@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van de VROM-Inspectie, Programma Schoon en Veilig Water in het kader van project M/703719 Monitoring en Handhaving Drinkwater, deelproject Emerging substances and pathogens, en van Rijkswaterstaat Waterdienst.

© RIVM 2010

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: 'Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave'.

Rapport in het kort

Emerging pathogenen in oppervlaktewater

In grote Nederlandse rivieren zijn twee virussen en een bacteriesoort aangetroffen die schadelijk kunnen zijn voor de gezondheid van de mens. Het betreft het hepatitis E virus (HEV), het humaan parechovirus (HPeV) en de methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) bacterie. Dit blijkt uit verkennend onderzoek van het RIVM. Deze ziekteverwekkende micro-organismen worden 'emerging' pathogenen genoemd. Het gaat daarbij om nieuwe ziekteverwekkers (MRSA) en ziekteverwekkers waarvan het bestaan pas relatief kort bekend is (HEV en HPeV). De aanwezigheid van emerging pathogenen in oppervlaktewater kan schadelijk zijn als mensen aan dit water worden blootgesteld, bijvoorbeeld door recreatie. Om in te kunnen schatten in welke mate dit schadelijk is, is onderzoek nodig naar deze pathogenen op dergelijke recreatielocaties.

Het RIVM heeft het onderzoek in samenwerking met Rijkswaterstaat Waterdienst uitgevoerd voor het VROM-Inspectie-project 'Emerging substances and pathogens'. Hiervoor zijn van mei 2008 tot en met mei 2009 drie meetlocaties onderzocht, te weten de Rijn bij Lobith, de Maas bij Eijsden en de Nieuwe Maas bij Brienoord. In deze wateren is elke vier weken gekeken of HPeV, HEV en MRSA aanwezig waren.

HEV en HPeV zijn in de Maas, de Rijn, en de Nieuwe Maas aangetroffen. Beide virussen zijn vooral in de Maas en het minst vaak in de Nieuwe Maas gevonden. HPeV werd vaker gevonden dan HEV. MRSA is in de Maas en de Rijn maar niet in de Nieuwe Maas gevonden.

Trefwoorden:

emerging infectieziekten, emerging pathogenen, zoönosen, oppervlaktewater, blootstelling, *S. aureus*, MRSA, HEV, HPeV

Abstract

Emerging pathogens in surface water

In large Dutch rivers, two virus species and a bacterial species were detected that can be detrimental to public health. It concerns hepatitis E virus (HEV), human parechovirus (HPeV) and the bacterium methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). This was demonstrated in an exploratory study performed at the RIVM. These pathogenic micro-organisms are called emerging pathogens. This can be newly evolved human pathogens (MRSA) or pathogens that have just recently been identified (HEV en HPeV). The presence of these pathogens in surface water can be harmful when people get exposed to these waters, for instance during recreation. To be able to estimate the magnitude of the health risk, the prevalence of these pathogens needs to be investigated in specific surface waters, such as those used for recreation.

The research was performed in collaboration with 'Rijkswaterstaat Waterdienst' as part of the project 'Emerging substances and pathogens' for the VROM-Inspectorate. For this purpose, three locations have been sampled from May 2008 to May 2009: the Rhine at Lobith, the Meuse at Eijsden, and the New Meuse at Brienenoord. Every four weeks these waters were screened for the presence of HPeV, HEV en MRSA.

HEV en HPeV were detected in the Meuse, Rhine and New Meuse. Both viruses were most often detected in the Meuse, and least in the New Meuse. Overall, HPeV was found more frequently than HEV. MRSA was observed in the Meuse and the Rhine, but not in the New Meuse.

Key words:

emerging infections, emerging pathogens, zoonoses, surface water, exposure, *S. aureus*, MRSA, HEV, HPeV

Inhoud

| | | |
|---------------------|---|-----------|
| Samenvatting | | 9 |
| 1 | Inleiding | 11 |
| 1.1 | Emerging infectieziekten | 11 |
| 1.2 | Emerging pathogenen: nieuwe en nieuw-ontdekte pathogenen | 11 |
| 1.3 | Zoönosen | 12 |
| 1.4 | Kwetsbare groepen en (re-)emerging infectieziekten | 13 |
| 1.5 | Transmissie via water | 13 |
| 1.6 | Drie potentieel wateroverdraagbare emerging pathogenen: HPeV, HEV en MRSA | 14 |
| 1.7 | Doel onderzoek | 15 |
| 2 | Materiaal en methoden | 17 |
| 2.1 | Monsterlocaties en monsterneming | 17 |
| 2.2 | Indicatoren van fecale verontreiniging | 17 |
| 2.2.1 | Bacteriën | 17 |
| 2.2.2 | Somatische colifagen | 17 |
| 2.3 | Methicilline-resistente <i>Staphylococcus aureus</i> | 19 |
| 2.3.1 | Isolatie <i>S. aureus</i> uit water | 19 |
| 2.3.2 | Opslag isolaten | 19 |
| 2.3.3 | Species bevestiging en methicilline-resistentie PCR | 19 |
| 2.3.4 | Antibioticumresistentiebepalingen | 20 |
| 2.4 | Detectie van HEV en HPeV | 21 |
| 2.4.1 | Concentratie van monsters water | 21 |
| 2.4.2 | RNA-isolatie | 21 |
| 2.4.3 | HEV en HPeV real-time RT-PCR | 22 |
| 3 | Resultaten | 23 |
| 3.1 | Humane pathogenen | 23 |
| 3.1.1 | HEV en HPeV | 23 |
| 3.1.2 | <i>S. aureus</i> en MRSA | 24 |
| 3.2 | Fecale verontreiniging | 25 |
| 4 | Discussie | 29 |
| 5 | Conclusies en aanbevelingen | 33 |
| | Literatuur | 35 |
| Bijlage 1 | Opbrengst somatische colifagen na concentratie van watermonsters | 43 |
| Bijlage 2 | RNA-extractievolumes en -verduunningen in RT-PCR | 45 |

Samenvatting

Dit rapport beschrijft de resultaten van een verkennend onderzoek in de Maas bij Eijsden, de Rijn bij Lobith en de Nieuwe Maas bij Brienenoord naar het voorkomen van drie ‘emerging’ pathogenen. Emerging pathogenen zijn pathogenen die recent in de bevolking zijn geïntroduceerd en nieuwe ziekten veroorzaken, maar ook pathogenen die recent zijn geïdentificeerd als verwekker van bekende ziekten of een nieuwe eigenschap hebben verworven. De onderzochte emerging pathogenen in deze studie zijn Hepatitis E virus (HEV), Humaan Parechovirus (HPeV) en methicilline-resistente *S. aureus* (MRSA). Deze pathogenen kunnen in oppervlaktewater terecht komen door contaminatie met feces van dierlijke (HEV, MRSA) en humane oorsprong (HEV, HPeV).

In de periode van mei 2008 tot en met mei 2009 zijn de genoemde wateren elke vier weken onderzocht op de aanwezigheid van HEV, HPeV en MRSA. Met behulp van moleculaire technieken kon HEV en HPeV aangetoond worden in alle drie de rivieren. In de Maas waren elf van de veertien monsters (79%) positief voor HPeV en twee (14%) daarvan waren ook positief voor HEV. In de Rijn waren vijf monsters (36%) positief voor HPeV en twee (14%) voor HEV. In de Nieuwe Maas was één monster (7,7%) positief voor HPeV en één voor HEV. *S. aureus* werd gevonden in alle monsters uit de Maas en de Rijn in de periode januari tot en met maart (Rijn) of januari tot en met april (Maas) 2009. Hoewel de meeste geïsoleerde stammen methicilline-sensitieve *S. aureus* (MSSA)-stammen waren, werd in beide rivieren in één van deze monsters ook MRSA aangetoond. De geïsoleerde MRSA-stammen waren resistent tegen meerdere antibiotica. Op de drie locaties werd ook de mate van fecale verontreiniging bepaald aan de hand van concentraties *Escherichia coli*, intestinale enterococci en somatische colifagen. Vooral in de Maas bij Eijsden waren de concentraties fecale indicatoren relatief hoog, in de Nieuwe Maas bij Brienenoord werd de minste verontreiniging gedetecteerd. Hoewel de aanwezigheid van HPeV grotendeels bleek te correleren met de mate van fecale verontreiniging, was dit in mindere mate het geval voor *S. aureus* (MSSA en MRSA), en niet voor HEV. Deze bevinding onderstreept het belang van het onderzoeken van oppervlaktewater voor specifieke pathogenen.

Dit verkennend onderzoek toont aan dat emerging pathogenen in Nederlandse oppervlaktewateren voorkomen. Kennis over de aanwezigheid van emerging pathogenen in oppervlaktewater is van belang om risico's voor de volksgezondheid door blootstelling aan deze pathogenen in water te kunnen schatten. Daarnaast kan deze kennis van belang zijn voor een snelle en adequate reactie op ziekte-uitbraken. De risico's voor de volksgezondheid als gevolg van de aanwezigheid van pathogenen zijn het hoogst als het water betreft waar mensen makkelijk mee in contact komen, zoals water waarin gerecreëerd wordt of dat wordt gebruikt als bron voor drinkwaterproductie. In een vervolgstudie zal daarom het vóórkomen van emerging pathogenen in oppervlaktewater met genoemde functies onderzocht moeten worden.

1 Inleiding

1.1 Emerging infectieziekten

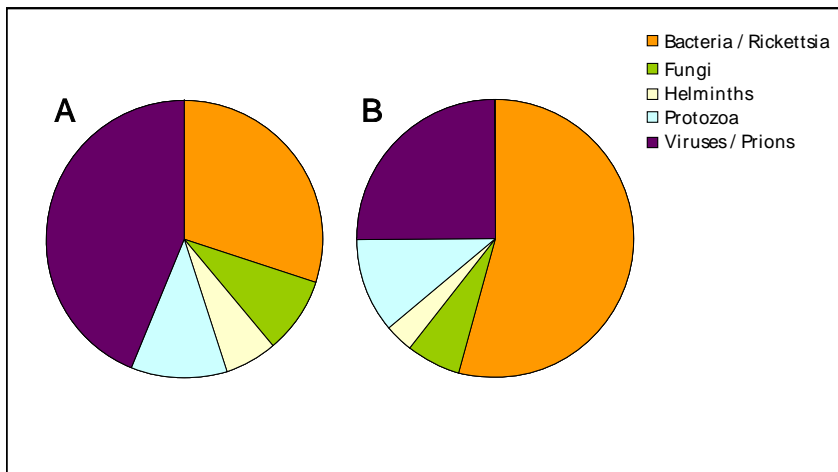
Infectieziekten zijn verantwoordelijk voor ongeveer een kwart van de sterfte wereldwijd. De meeste sterfte door infectieziekten wordt veroorzaakt door Acquired ImmunoDeficiency Syndrome (aids), tuberculose (tb), malaria, respiratoire infecties en diarree (bijvoorbeeld cholera) (Kindhauser, 2003). Een klein maar belangrijk deel van alle infectieziekten zijn nieuwe of zogenaamde ‘emerging’ infectieziekten (Taylor et al., 2001; Woolhouse en Gaunt, 2007; Jones et al., 2008). Onder emerging infectieziekten worden nieuwe infectieziekten verstaan, die worden veroorzaakt door nieuwe, ‘emerging’ pathogenen, maar ook voorheen relatief zeldzame infectieziekten waarvan de verwekker bekend is en die recent zijn toegenomen in incidentie, of die zich verspreid hebben naar nieuwe geografische gebieden. Vaak wordt bij de classificatie ‘emerging’ (arbitrair) de periode vanaf 1980 aangehouden (WHO, 1997).

1.2 Emerging pathogenen: nieuwe en nieuw-ontdekte pathogenen

Emerging pathogenen zijn strikt genomen pathogenen die recent in mensen zijn geïntroduceerd en een nieuwe infectieuze ziekte veroorzaken. Bekende voorbeelden zijn veelal virussen, zoals virus (EBOV) in 1979 (WHO, 1978b; WHO, 1978a), Human Immunodeficiency Virus (HIV)-1 en HIV-2, geïdentificeerd in respectievelijk 1983 en 1986 (Barré-Sinoussi et al., 1983; Gallo et al., 1984; Kanki et al., 1986), H5N1 aviaire influenza virus (H5N1 AIV) in 1997 (CDC, 1997; De Jong et al., 1997; Claas et al., 1998), Severe Acute Respiratory Syndrome coronavirus (SARS CoV) in 2003 (Drosten et al., 2003; Ksiazek et al., 2003; Kuiken et al., 2003; Peiris et al., 2003), en heel recent: Nieuwe Influenza A (H1N1) virus in 2009 (CDC, 2009; Dawood et al., 2009). Het moment dat de nieuwe ziekte wordt herkend hoeft niet noodzakelijkerwijs samen te vallen met de introductie van het pathogeen in de menselijke bevolking. Zo is voor HIV-1 en HIV-2 retrospectief aangetoond dat zowel de ziekte als de pathogenen in de menselijke bevolking aanwezig waren, al decennia voordat aids als nieuwe ziekte werd herkend (Korber et al., 2000; Lemey et al., 2003; Worobey et al., 2008). Emerging pathogenen kunnen ook nieuwe varianten zijn van ‘oude’ pathogenen (Jones et al., 2008). Hierbij gaat het vaak om drugresistente varianten, zoals methicilline-resistente *Staphylococcus aureus* (MRSA) (Jevons, 1961) en chloroquine-resistente *Plasmodium vivax* (CRPV) (Rieckmann et al., 1989), voor het eerst geïsoleerd in respectievelijk 1960 en 1989, of om varianten met verhoogde virulentie, zoals *Escherichia coli* O157:H7, voor het eerst geïsoleerd in 1975 (Riley et al., 1983).

Vanwege de beschikbaarheid van moleculaire detectie- en identificatietechnieken, zoals ‘polymerase chain reaction’ (PCR) en ‘DNA sequencing’, worden ook steeds vaker ‘nieuwe’ pathogenen geïdentificeerd als verwekker van al bekende ziekten. Hoewel in zulke gevallen de ziekte noch het pathogeen noodzakelijk ‘emerging’ is in de letterlijke betekenis van het woord, worden zulke pathogenen vaak wel als zodanig beschouwd (Woolhouse et al., 2007). Voorbeelden van zulke nieuw ontdekte pathogenen zijn hepatitis E virus (HEV), dat in 1980 werd herkend als nieuwe virale verwekker van hepatitis en in 1990 voor het eerst werd gekarakteriseerd (Khuroo, 1980; Wong et al., 1980; Reyes et al., 1990), en humaan parechovirus (HPeV), wat in 1992 geïdentificeerd werd als een ‘nieuwe’ virale verwekker van gastroenteritis en respiratoire infecties.

Het merendeel (74-90%) van emergent pathogenen zijn virussen (of prionen) en bacteriën (of rickettsiae). Afhankelijk van het beschouwen van verschillende varianten van een soort als verschillende pathogenen (Jones et al., 2008), of indeling op soortniveau (Taylor et al., 2001; Woolhouse en Gowtage-Sequeria, 2005), zullen bacteriën dan wel virussen de grootste groep emergent pathogenen vormen (Figuur 1.1). De relatief grote bijdrage van bacteriën, als varianten van eenzelfde soort als afzonderlijke emergent pathogenen worden beschouwd, wordt op zijn minst gedeeltelijk veroorzaakt door antibioticum-resistente varianten (Jones et al., 2008).



Figuur 1.1 De bijdrage van de verschillende groepen van micro-organismen aan emergent pathogenen als pathogenen worden ingedeeld op soort zoals door Taylor et al. (2001) (A; n=175), of als varianten van één soort als verschillende pathogenen worden beschouwd zoals door Jones et al. (2008) (B; n=335)

1.3 Zoönosen

Het grootste deel (60-75%) van de beschreven emergent pathogenen zijn zoönosen (Taylor et al., 2001; Jones et al., 2008), wat wil zeggen dat de pathogenen overgedragen worden van dier (vertebraten) op mens. Een grote rol bij het ontstaan van nieuwe infectieziekten speelt dan ook de toegenomen kans op blootstelling van mensen aan dierlijke pathogenen. Deze toegenomen kans op blootstelling is onder andere gerelateerd aan:

- de economische ontwikkeling (zoals intensieve veeteelt, internationale handel);
- veranderingen in de omgeving en dus het leefgebied van de oorspronkelijke gastheer (door bijvoorbeeld ontbossing, intensieve landbouw, klimaat);
- demografische aspecten (zoals bevolkingsgroei, verstedelijking); en
- veranderd gedrag van mensen (zoals reizen, eten van bushmeat) (Woolhouse et al., 2007; Jones et al., 2008).

Voor de meeste van de zoönotische emergent pathogenen is de oorspronkelijke gastheer nog steeds de meest belangrijke gastheer en is er geen of inefficiënte transmissie tussen mensen onderling; dit geldt bijvoorbeeld voor SARS CoV (SARS), H5N1 AIV (vogelgriep), en *Coxiella burnetii* (Q-koorts). Voor uitbraken in de humane populatie is dan blijvend contact tussen mens en dier noodzakelijk. Het risico dat zoönosen zich in de loop van de tijd aanpassen aan de mens als primaire gastheer is echter reëel, voorbeelden hiervan zijn influenza A-virussen, HIV-1 en HIV-2.

1.4 Kwetsbare groepen en (re-)emerging infectieziekten

Wereldwijd is er een toename in het aantal mensen met een verhoogde gevoeligheid voor infectie of ziekte als gevolg van infectie, ook wel de kwetsbare groepen genoemd. Onder kwetsbare groepen vallen bijvoorbeeld ouderen, jonge kinderen, zwangere vrouwen, mensen die ondervoed zijn, of mensen met immuundeficiëntie, bijvoorbeeld door hiv-infectie of gebruik van immuunsuppressiva, zoals prednison. Daarnaast zijn er meer mensen in zieken- en verpleeghuizen, waar een hoge dichtheid is aan mensen met een verhoogde gevoeligheid voor infectie. Dit alles gaat gepaard met een globale toename in ziekte, of ernst van ziekte, veroorzaakt door micro-organismen die voorheen als relatief onschadelijk werden beschouwd (Taylor et al., 2001; Woolhouse et al., 2007; Jones et al., 2008). In deze gevallen wordt soms ook van emerging pathogenen en emerging infectieziekten gesproken. *Cryptosporidium parvum*-infectie bij hiv-geïnfekteerden (Navin et al., 1999) en ziekenhuisinfecties veroorzaakt door MRSA zijn hier voorbeelden van. De toename van mensen in kwetsbare groepen is ook een van de oorzaken van een stijgende incidentie van infectieziekten die aan het verdwijnen waren, of zogenaamde re-emerging infectieziekten. Een voorbeeld is de stijgende incidentie van tuberculose in westerse landen, wat onder andere geassocieerd is met hiv-infectie, vergrijzing en groeiende armoede (Tocque et al., 1998; Davies, 1999).

1.5 Transmissie via water

Een groot deel (47%) van bekende emerging pathogenen kan zich niet alleen direct maar ook, of zelfs primair, indirect naar mensen verspreiden (Taylor et al., 2001). Water speelt vaak een rol bij indirecte transmissie omdat veel pathogenen fecaal-oraal overdraagbaar zijn en met feces in oppervlaktewater terecht komen. Transmissie vindt vervolgens plaats door recreatie in gecontamineerd oppervlaktewater, door het drinken van niet, of niet voldoende, gezuiverd drinkwater, of door het inademen van aerosolen. Met name door intensieve veeteelt (hoge dichtheid van dieren) en verstedelijking (toename van stedelijk wild en huisdieren) is er een grotere kans op contaminatie van oppervlaktewater met animale pathogenen, en dus potentiële zoonosen. Dit gebeurt door afspoeling van mest en dierlijke uitwerpselen van land naar water, of door directe input van uitwerpselen of karkassen van dieren die in of op het water verblijven. Naast contaminatie van oppervlaktewater uit dierlijke bronnen komen in oppervlaktewater ook humane pathogenen terecht via humane feces. Een belangrijke bron van contaminatie met humane feces is rioolwater wat (gedeeltelijk) gezuiverd of in sommige gevallen – zoals bij hevige regenval via overstorten – ongezuiverd op het oppervlaktewater wordt geloosd. Ook via scheepvaart (beroep en plezier) wordt ongezuiverd afvalwater op oppervlaktewater geloosd. Vanwege de aard van de factoren die geassocieerd zijn met het ontstaan van emerging infectieziekten is het te verwachten dat nieuwe pathogenen en nieuwe infectieziekten zullen blijven ontstaan. Gebaseerd op de tot nu toe geïdentificeerde emerging pathogenen is de kans het grootst dat het dan gaat om zönotische micro-organismen die indirect overdraagbaar zijn en een brede gastheerrange hebben (Taylor et al., 2001; Woolhouse et al., 2005). Omdat water een belangrijke indirecte transmissieroute is, is het dan ook te verwachten dat een gedeelte van (toekomstige) emerging pathogenen via water op mensen overgedragen kan worden.

1.6 Drie potentieel wateroverdraagbare emergent pathogenen: HPeV, HEV en MRSA

Humaan Parechovirus, of HPeV, is een RNA-virus dat net als enterovirussen (zoals poliovirus) tot de familie van de picornavirussen behoort. HPeV veroorzaakt meestal milde ziekte met gastroenterale of respiratoire symptomen, maar ook ernstige symptomen als verlamming en hersenontsteking zijn geassocieerd met HPeV-infecties. Vooral jonge kinderen zijn vatbaar voor infectie met, en ziekte door, HPeV (reviewed door (Stanway et al., 2000)). Uit isolaten van gastroenteritispatiënten uit 1956 en patiënten met respiratoire infecties in 1964 werden virussen geïsoleerd die oorspronkelijk als echovirussen, genus enterovirus, werden geclassificeerd (Wigand en Sabin, 1961; Berchovich en Pangan, 1968). In 1992 werd door het gebruik van moleculaire technieken voor het eerst duidelijk dat deze virussen geen enterovirussen waren maar een 'nieuwe' groep van virussen vormden, de parechovirussen (Hyypiä et al., 1992; Stanway et al., 1994; Ghazi et al., 1998). Het is nog niet eerder onderzocht of HPeV in Nederlands oppervlaktewater voorkomt. Dit is echter wel aannemelijk omdat HPeV net als enterovirussen wordt uitgescheiden met feces, en enterovirussen in Europese (Hot et al., 2003; Pusch et al., 2005) en Nederlandse (Lodder en De Roda Husman, 2005; Schets et al., 2008) oppervlaktewateren worden aangetroffen.

Hepatitis E-virus, of HEV, is in ontwikkelingslanden endemisch bij mensen en veroorzaakt daar watergerelateerde uitbraken van hepatitis. Hepatitisuitbraken die retrospectief geassocieerd zijn met HEV zijn al vanaf 1955 beschreven en werden toen al als virale hepatitis herkend (Arankalle et al., 1994). Het werd echter pas in 1980 duidelijk dat het om uitbraken met een tot dusver onbekend virus ging, en het duurde nog tien jaar tot dit 'nieuwe' virus, HEV, gedeeltelijk werd geïdentificeerd en geclassificeerd (Khuroo, 1980; Wong et al., 1980; Reyes et al., 1990). In geïndustrialiseerde landen komt hepatitis als gevolg van HEV-infecties minder vaak voor dan in ontwikkelingslanden (reviewed door (Panda et al., 2007)). In Nederland worden bij mensen twee genotypische varianten aangetroffen: genotype 1, dat alleen wordt gevonden in reizigers die in gebieden zijn geweest waar dit genotype endemisch is, en genotype 3, dat vooral in geïndustrialiseerde landen wordt aangetroffen (Emerson en Purcell, 2003; Herremans et al., 2006; Borgen et al., 2008). In ontwikkelingslanden komt naast genotype 1 ook genotype 2 voor en uitbraken met deze twee genotypen zijn geassocieerd met gecontamineerd drinkwater (Panda et al., 2007). HEV-genotype 3 lijkt primair een zoönose te zijn, met mogelijk als oorspronkelijke gastheer het varken: isolaten uit patiënten en varkens en wilde zwijnen lijken nauw verwant (Meng et al., 1997; Widdowson et al., 2003; Rutjes et al., 2009). Vermoedelijk zijn er echter meerdere besmettingsbronnen die nog niet allemaal geïdentificeerd zijn (Borgen et al., 2008; Rutjes et al., 2009). HEV-genotype 3 is eerder aangetoond in Nederlands oppervlaktewater (Rutjes et al., 2009) en in rioolwater in Spanje, Frankrijk en de Verenigde Staten (Clemente-Casares et al., 2003). Water speelt daarom mogelijk een rol bij de transmissie van het zoönotische HEV-genotype 3.

MRSA zijn methicilline-resistente varianten van *Staphylococcus aureus*. *S. aureus* is een commensaal die op de huid en in slijmvliezen voorkomt en is voor de meeste mensen onschadelijk. Bij mensen met verminderde weerstand kan *S. aureus* echter ernstige ziekte en infecties veroorzaken, zoals longontsteking en bloedbaan- en wondinfecties, en is een van de belangrijkste veroorzakers van ziekenhuisinfecties (Jarvis en Martone, 1992; Ibelings en Bruining, 1994; NNIS, 1999; Struelens et al., 2004). Methicilline-resistente varianten van *S. aureus* vormen een groot probleem in ziekenhuizen, omdat infecties veroorzaakt door MRSA moeilijk te behandelen zijn. In 2004 is voor het eerste een dierlijke variant van MRSA beschreven, het zogenoemde veegerelateerde MRSA (v-MRSA) (Voss et al., 2005). V-MRSA komt veel voor bij varkens en andere landbouwhuisdieren, maar kan ook mensen koloniseren en waarschijnlijk ernstige ziekte veroorzaken (De Neeling et al., 2007; Van Loo et al.,

2007; van den Broek et al., 2008). Door afspoeling van mest kan veegerelateerde MRSA in oppervlaktewater terecht komen. De aanwezigheid van *S. aureus* en MRSA is eerder aangetoond in oppervlaktewater in binnen- en buitenland (Efstratiou et al., 1998; Soge et al., 2009; Blaak et al., 2010).

1.7 Doel onderzoek

Om de risico's voor de volksgezondheid door blootstelling aan emergent pathogenen in water te kunnen schatten, is het van belang om te inventariseren welke (potentiële) emergent pathogenen in oppervlaktewater voorkomen en in welke mate. Daarnaast kan de kennis die verkregen wordt uit onderzoek naar wateroverdraagbare emergent pathogenen in oppervlaktewater van belang zijn om snel en adequaat te kunnen reageren op ziekte-uitbraken. Voor het in dit rapport beschreven verkennende onderzoek zijn twee nieuwe (recent geïdentificeerde) virussen en een antibioticumresistente bacterievariant geselecteerd: HPeV, HEV, en MRSA. Deze pathogenen worden met feces uitgescheiden en zijn daarmee kandidaten voor transmissie via water. Er zijn geen of nog weinig gegevens bekend over het voorkomen van deze emergent pathogenen in Nederlands oppervlaktewater. In eerdere studies uitgevoerd op het RIVM werd HEV aangetroffen in de Maas maar niet in de Amsterdamse grachten (Schets et al., 2008; Rutjes et al., 2009), en MRSA in oppervlaktewater in een veeteeltgebied in Noordoost-Brabant (Blaak et al., 2010). In de huidige verkennende studie is het voorkomen van HPeV, HEV, en MRSA gedurende een jaar onderzocht op de Rijkswaterstaat Waterdienst-monsterlocaties de Rijn bij Lobith, de Maas bij Eijsden, en de Nieuwe Maas nabij eiland Brienoord. Deze locaties geven een globaal beeld van de prevalentie van deze pathogenen in Nederlands oppervlaktewater.

2 Materiaal en methoden

2.1 Monsterlocaties en monsterneming

Van mei 2008 tot en met mei 2009 zijn er 4-wekelijks 5 x 20 liter monsters genomen uit de Maas bij Eijsden, de Rijn bij Lobith, en de Nieuwe Maas nabij eiland Brienoord door RWS Waterdienst volgens NEN-EN-ISO 19458 (Anonymous, 2007) (zie Figuur 2.1). De monsters werden direct na monsterneming opgeslagen bij 5 ± 3 °C (Eijsden), of als dit niet mogelijk was (bij Lobith en Brienoord), maximaal 3 uur opgeslagen bij kamertemperatuur of in de schaduw alvorens ze gekoeld naar het RIVM werden vervoerd. Bij aankomst op het RIVM werden de monsters opgeslagen bij 5 ± 3 °C, en binnen 24 uur na monsterneming verwerkt. Bij de eerste monsterneming werd bij alle monsters de grens van drie uur ongekoelde opslag overschreden, bij de tweede monsterneming gebeurde dat bij het monster uit de Nieuwe Maas. Deze monsters zijn afgekeurd voor bacteriologische en bacteriofaag-analyses maar werden wel gebruikt voor moleculaire detectie van de pathogene virussen, omdat daarmee levende en dode deeltjes worden aangetoond waardoor detectie minder afhankelijk is van temperatuur. In december 2008 werden om logistieke redenen alleen de Rijn en de Maas bemonsterd. In totaal waren er 11 monsternamedata waarop alle 3 de locaties zijn bemonsterd én goedgekeurd.

2.2 Indicatoren van fecale verontreiniging

2.2.1 Bacteriën

Aantallen intestinale enterococci en *E. coli* werden bepaald met behulp van membraanfiltratie, volgens NEN-EN-ISO 7899-2 (Anonymous, 2000a) en ISO 9308-1 de 'rapid test' (Anonymous, 2000b). De aanwezigheid van beide indicatoren werd onderzocht in monster volumes van 1, 10 en 100 ml. Aan de hand van de resultaten werden concentraties kolonievormende eenheden (kve) per liter water en de bijbehorende 95%-betrouwbaarheidsintervallen berekend met behulp van Mathematica-software (WolframResearch, Champaign, IL, VS). Resultaten van de eerste monsters (mei 2008) en het tweede monster uit de Nieuwe Maas (juni 2008) zijn niet meegenomen in de gegevensanalyse (zie paragraaf 2.1). Als positieve controles werden vaste hoeveelheden controlestammen gefiltreerd (*E.coli*: circa 100 kve WR1, enterococci: circa 50 kve WR63). *E. coli*- en enterococcenaantallen werden betrouwbaar geacht als de tellingen van de controlemonsters binnen van tevoren bepaalde controlegrenzen (gemiddelde van 20 waarnemingen $\pm 3x$ standaardafwijking) vielen. Bij de *E. coli*-bepaling van de monsters van november 2008 en januari 2009 werd de telling van de positieve controle te laag bevonden. Voor deze monsters zijn de concentraties *E. coli* wel berekend aan de hand van het aantal gevonden kve, maar deze geven dus mogelijk een onderschatting van de werkelijkheid.

2.2.2 Somatische colifagen

Het aantonen en kwantificeren van somatische colifagen in de watermonsters werd uitgevoerd volgens ISO 10705-2 (Anonymous, 2001). Het aantal bacteriofagen werd bepaald in monster volumes van 0,1 of 1 ml, en aan de hand van de tellingen werden concentraties plaque vormende deeltjes (pvd) per liter water en bijbehorende 95%-betrouwbaarheidsintervallen berekend met behulp van Mathematica-software. Resultaten van de eerste monsters (mei 2008) en het tweede monster uit de Nieuwe Maas (juni 2008) zijn niet meegenomen in de gegevensanalyse (zie paragraaf 2.1).



Figuur 2.1 Meetlocaties Brienoord, Lobith en Eijsden van RWS

2.3 Methicilline-resistente *Staphylococcus aureus*

2.3.1 Isolatie *S. aureus* uit water

De aanwezigheid van *S. aureus* en methicilline-resistente (MRSA-)stammen werd onderzocht in monster volumes van 10 en 100 ml. Na membraanfiltratie (Tuffryn HT450, Pall Corporation, East hills NY, VS) werden filters 18 ± 2 uur geïncubeerd bij 36 ± 2 °C in 20 ml Mueller Hinton Broth (Oxoid, Hampshire, UK) met 6,5% NaCl (MH⁺). De hoge zoutconcentratie in het medium selecteert voor zouttolerante bacteriën, waaronder *S. aureus*. Na deze eerste ophoping werden de suspensies gehomogeniseerd en werd 1 ml overgebracht naar 9 ml Phenolred Mannitol Broth (PMB) met 75 µg/ml aztreonam (MP Biomedicals, Amsterdam, Nederland) voor de isolatie van *S. aureus* in het algemeen, en 1 ml naar 9 ml PMB met 75 µg/ml Az en 4 µg/ml oxacilline (Sigma Aldrich, Zwijndrecht, Nederland) voor een selectieve isolatie van MRSA-stammen. De kweken werden 18 ± 2 uur geïncubeerd bij 36 ± 2 °C. Na de tweede ophoping werden de suspensies opnieuw gehomogeniseerd en werd met een öse 10 µl van de *S. aureus*-ophopingscultuur (PMB met 75 µg/ml Az) op Baird-Parker agar (BPa) uitgestreken, en 10 µl van de MRSA-ophopingscultuur (PMB met 75 µg/ml Az en 4 µg/ml oxacilline) op BPa, bloedagar (BA) en een MRSA-screeningsplaat (MRSA brilliance, Oxoid). Kweken werden 24 ± 2 uur geïncubeerd bij 36 ± 2 °C. Karakteristieke kolonies zijn gitzwart met een precipitatiehof op BPa, crèmekleurig tot wit en haemolytisch op BA, en blauw op de MRSA screeningsplaat. Als positieve controles werden gebruikt 1 lenticule (36 kve) *S. aureus* NCTC 6571 (HPA, Londen UK), en 1 kve van MRSA ATCC 43300. Aan de hand van de aan- of afwezigheid van *S. aureus* in de geteste volumina werden concentraties kve per liter water berekend volgens het meest waarschijnlijke aantal (*most probable number* of MPN) met behulp van Mathematica-software. Resultaten van de eerste monsters (mei 2008) en het tweede monster van de Nieuwe Maas (juni 2008) zijn niet meegenomen in de gegevensanalyse (zie paragraaf 2.1).

De gevoeligheid van de isolatiemethode werd vóór de derde monsternamen vastgesteld door 2,5 liter water afkomstig uit de Maas bij Eijsden te spiken met 360 kve *S. aureus*-stam NCTC 6571, en van dit monster 10, 100 en 1000 ml te onderzoeken op de aanwezigheid van *S. aureus*. *S. aureus* kon worden teruggevonden in alle geteste volumina: 10 ml, 100 ml en 1 l. In de kweek van het 1 l-monster was echter veel stoorflora aanwezig waardoor de opbrengst van *S. aureus*-kve lager was dan in het 100 ml monster (data niet getoond). Daarom is vanaf de monsternamen van juli 2008 de isolatieprocedure alleen nog uitgevoerd voor 10 en 100 ml-monsters.

2.3.2 Opslag isolaten

Voor elk monster werden maximaal tien karakteristieke kolonies van BPa- en BA-kweken geselecteerd. Kolonies afkomstig van BPa-platen werden bevestigd op BA, en kolonies afkomstig van BA werden op BPa bevestigd. Stammen met karakteristieke morfologie op beide media werden als verdachte *S. aureus*-stammen beschouwd en opgeslagen voor moleculaire analyse en antibioticum-gevoeligheidsbepalingen. Voor opslag werden stammen overnacht gegroeid in 1 ml pepton gebufferd water bij 36 ± 2 °C, en na toevoegen van 15%-glycerol ingevroren bij -80 °C.

2.3.3 Species bevestiging en methicilline-resistentie PCR

Door middel van een multiplex PCR werd zowel de identiteit van verdachte kolonies bevestigd, door amplificatie van de *S. aureus*-specifieke Martineau-sequentie (Martineau et al., 1998), als de aan- of afwezigheid van het methicilline-resistentiegen *MecA* aangetoond. De aanwezigheid van het *MecA*-gen karakteriseert MRSA-stammen. Deze multiplex PCR toont daarnaast de aan- of afwezigheid van het Panton Valentine Leukocidine toxine (PVL)-gen aan, dat karakteristiek is voor virulente *S. aureus*-stammen. Voor deze analyse werden de verdachte *S. aureus*-isolaten vanuit glycerolstocks afgeënt op

BA, en na 18-20 uur incubatie bij 36 ± 2 °C tot verdere analyse opgeslagen bij 4 °C. Van de BA-kweken werd een entooigje koloniemateriaal opgenomen in 50 µl lysisbuffer (100 µg lysostaphine in 1 ml 1x TE-buffer) en gelyseerd door 35 minuten te incuberen bij 37 °C gevolgd door 10 minuten bij 95 °C. Dit lysaat werd vervolgens verdund met 200 µl 1xTE-buffer. Verkregen *S. aureus*-lysaten werden opgeslagen bij -20 °C. Van de lysaten werd 2 µl per reactie geanalyseerd met behulp van PuReTaq Ready-To-Go PCR beads (GE Healthcare, Diegem, België). In de reacties werden de volgende primers gebruikt: voor bevestiging van *S. aureus* (Martineau et al., 1998): Sa442-1 (5' AAT CTT TGT CGG TAC ACG ATA TTC ACG 3') en Sa442-2 (5' CGT AAT GAG ATT TCA GTA GAT AAT ACA ACA 3'); voor detectie van MecA-gen: MecA-1 (5'GTT GTA GTT GTC GGG TTT GG 3') en MecA-Cr (5' CTT CCA CAT ACC ATC TTC TTT AAC 3'); voor detectie van PLV-gen: SaPLV-1 (5' ATC ATT AGG TAA AAT GTC TGG ACA TGA TCC A 3') en SaPvL-2 (5' GCA TCA A(GC)T GTA TTG ATA GCA AAA GC 3'). De PCR-producten worden geanalyseerd door middel van agarose electroferese.

2.3.4 Antibioticumresistentiebepalingen

Bevestigde MRSA-stammen werden vanuit glycerolstocks afgeënt op BA en na 18 tot 20 uur incubatie bij 36 ± 2 °C gebruikt voor het bepalen van antibioticumgevoeligheidsprofielen. Het MRSA-phenotype werd bevestigd door de gevoeligheid voor oxacilline te bepalen. Oxacilline is een antibioticum dat verwant is aan methicilline en de aanwezigheid van het *MecA*-gen geeft resistentie tegen oxacilline. Daarnaast werd de gevoeligheid bepaald voor clindamycine, ciprofloxacin, vancomycine, quinupristin/dalfinopristin, sulfamethoxazole/trimethoprim, tetracycline en erythromycine. De gevoeligheid voor oxacilline, clindamycine en ciprofloxacin werd bepaald door middel van de Etest-methode (Biomerieux, Marcy l'Etoile, Frankrijk) volgens het protocol van de fabrikant. In het kort hield deze methode in dat bacteriesuspensies met een dichtheid van 1 MacFarland met behulp van wattenstaafjes werden uitgesmeerd op Mueller-Hinton agar (clindamycine, ciprofloxacin) of Mueller-Hinton agar waaraan 2% NaCl was toegevoegd (oxacilline). Vervolgens werd een Etest-strip met een antibioticumconcentratiegradiënt aangebracht (zie Tabel 2.1) en werden platen 18 tot 20 uur (ciprofloxacin, clindamycine) of 24 uur (oxacilline) geïncubeerd bij 36 ± 2 °C. Gevoeligheid voor de overige antibiotica werd bepaald door middel van microbouillonverdunding met behulp van het Sensititre Sensitouch systeem (TREK, MCS Diagnostics, Swalmen) volgens het protocol van de fabrikant. Deze methode hield in het kort in dat bacteriesuspensies met een dichtheid van 1 MacFarland 1000 keer werden verdund in Cation-adjusted Mueller-Hinton Broth (TREK, MCS Diagnostics) wat aan microtiterplaten werd toegevoegd welke een panel van gedehydrateerde antibiotica bevatten in verschillende concentratiereeksen (zie Tabel 2.1). De platen werden vervolgens 18 tot 20 uur geïncubeerd bij 36 ± 2 °C. Voor beide testen werd als controle de *S. aureus* ATCC 29213-stam meegenomen.

Tabel 2.1 Geteste antibioticumconcentraties in Etests en Sensititre analyses

| Antibioticum | Test | Concentratierange (µg/ml) |
|-------------------------------|------------|---------------------------|
| Oxacilline | Etest | 0,016 – 256 |
| Clindamycine | Etest | 0,016 – 256 |
| Ciprofloxacin | Etest | 0,002 – 32 |
| Vancomycine | Sensititre | 0,5 – 64 |
| Quinupristin/Dalfopristin | Sensititre | 0,5 – 64 |
| Sulfamethoxazole/trimethoprim | Sensititre | 0,25/4,75 – 16/304 |
| Tetracycline | Sensititre | 0,25 – 32 |
| Erythromycine | Sensititre | 0,25 – 32 |

Na incubatie werd voor elke isolaat-antibioticumcombinatie de *minimal inhibitory concentration* of MIC-waarde afgelezen, dat wil zeggen de laagste concentratie waar geen groei meer zichtbaar is. Voor sulfamethoxazole/trimethoprim werd als MIC-waarde de laagste concentratie waar 80% remming optreedt aangehouden, volgens richtlijnen van het Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009). Om te bepalen of een stam resistent of gevoelig is voor een antibioticum werd gebruikgemaakt van de epidemiologische cut-off-waarden zoals beschreven door The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, 2009). Deze waarden beschrijven de bovengrens van MIC-waarden die gevonden worden bij wildtype *S. aureus*-stammen. Stammen met een MIC-waarde boven deze grens zijn minder gevoelig voor een antibioticum dan wildtypestammen en hebben dus resistentiegenen verworven.

2.4 Detectie van HEV en HPeV

2.4.1 Concentratie van monsters water

Voor de detectie van virussen werden de watermonsters geconcentreerd door middel van negatieve membraanfiltratie gevolgd door ultrafiltratie (Rutjes en De Roda Husman, 2004). Hiervoor werd aan 50 liter water $MgCl_2$ toegevoegd tot een eindconcentratie van 0,05 M, en de pH werd verlaagd tot 3,8 met HCl. Door deze behandeling vormen de in het water aanwezige virussen positief geladen aggregaten. Vervolgens werd het water gefiltreerd over een negatief geladen filter (Milligard; Millipore, Billerica, MA, VS), waarbij de virusaggregaten aan het filter binden. Na filtratie werden de virusaggregaten van het filter geëluëerd met 3%-beefextractoplossing in een trisbuffer, pH 9. Het verkregen eluaat werd op pH 7 gebracht door toevoeging van azijnzuuracetaatbuffer, om de stabiliteit van de virussen te verhogen. De eluaten werden vervolgens verder gefiltreerd over een ultrafilter (Sartorius, Goettingen, Duitsland) onder hoge druk (3 bar). Hierbij wordt gebruikgemaakt van filters met een dusdanige kleine poriegrootte (10.000 Da) dat virusdeeltjes deze niet kunnen passeren. Het geconcentreerde monster werd vervolgens van het filter afgespoeld met 3%-beefextractoplossing pH 9. Het op deze manier verkregen concentraat is doorgaans 1000-2500 maal geconcentreerder dan het originele watermonster. Concentraten werden opgeslagen bij -80 °C. Op vier van de monsternamedagen werd voor elk monster additioneel 50 liter water geconcentreerd door middel van hemoflowfiltratie (Kuhn en Oshima, 2002). Bij deze methode werd 50 liter water continu over een cross-flow ultrafilter (Hemoflow HF80S; Fresenius Medical Care, Bad Homburg, Duitsland) gepompt. Hierbij wordt het water dat door het filter wordt geperst afgevoerd, zodat het volume van het monster steeds kleiner wordt. Het volume van het monster werd gereduceerd tot ongeveer 250 ml, waarna het monstervat werd gespoeld met 1 liter 0,1 M glycinebuffer. De glycinebuffer en het watermonster werden vervolgens over het filter gepompt, zodat gebonden virusdeeltjes van het filter werden geëluëerd. Aan het overgebleven eluaat (200-350 ml) werd beefextractoplossing toegevoegd in een eindconcentratie van 3%. Hierna werden de eluaten verder geconcentreerd door middel van ultrafiltratie. Voor beide concentratieprocedures werd de efficiëntie bepaald door concentraties somatische colifagen voor en na concentratie te bepalen (zie Bijlage 1). De opbrengst van de fagen was voor beide concentratiemethoden vergelijkbaar en gemiddeld 41% (17-116%).

2.4.2 RNA-isolatie

Uit waterconcentraten werd viraal RNA geïsoleerd met behulp van magnetische silicabolletjes volgens de instructies van de fabrikant (Magnetic Extraction Kit, Biomerieux, Boxtel, Nederland). De methode hield in het kort in dat het concentraat werd opgenomen in NucliSens lysisbuffer, waardoor de micro-organismen lyseren en er genomisch materiaal vrijkomt. Hier werden magnetische silicabolletjes aan

toegevoegd, die aanwezig RNA binden. De met RNA geladen bolletjes werden met een magneet uit het monster geïsoleerd en meerdere keren gewassen. Ten slotte werd het RNA van de bolletjes geëluëerd in 50 µl elutiebuffer. Voor de isolatie van RNA werden standaard volumes gebruikt van 1 ml- en 100 µl-concentraat. Omdat er in waterconcentraten stoffen aanwezig zijn die de RT-PCR (*reverse transcription polymerase chain reaction*) remmen heeft het testen van grotere volumes geen toegevoegde waarde (Rutjes et al., 2005). Ter indicatie van de mate van remming werd aan elk concentraat vóór RNA-extractie een standaard hoeveelheid Mengovirus toegevoegd. Voor monsters waar door remming het toegevoegde Mengovirus niet te detecteren was in RNA uit 100 µl- en/of 1 ml-concentraat, werd voor de detectie van HEV ook kleinere volumina concentraat (10 µl en/of 50 µl) gebruikt voor de isolatie van RNA (zie Bijlage 2).

2.4.3 HEV en HPeV real-time RT-PCR

De aanwezigheid van HEV- en HPeV-RNA werd onderzocht in onverdunde en 10 x verdunde RNA-extracten met behulp van real-time RT-PCR. Tijdens een PCR-reactie worden specifieke DNA-sequenties geamplificeerd, en het geïsoleerde RNA is daarom eerst omgezet in een DNA-kopie (cDNA). Dit gebeurde met behulp van het enzym *reverse transcriptase* en een targetspecifieke primer, zodat het target-RNA werd omgezet in cDNA (HEV RT-PCR), of met een *random* primer, waarbij alle aanwezige RNA-sequenties werden omgezet in cDNA (HPeV RT-PCR). Vervolgens werd met behulp van targetspecifieke primers het target-cDNA geamplificeerd. De ontstane DNA-moleculen werden gedetecteerd door middel van een probe met een fluorescerend label. De aanwezigheid van HEV RNA werd onderzocht met behulp van een real-time RT-PCR dat het ORF3 (*open reading frame 3*) van HEV amplificeert zoals beschreven door (Jothikumar et al., 2006) met enkele aanpassingen aan het protocol (Bouwknegt et al., 2009) De aanwezigheid van HPeV RNA werd onderzocht met behulp van een real-time RT-PCR dat de 5'UTR (*5' untranslated region*) van HPeV amplificeert (Schalk et al., 2009). De specificiteit van de HEV en HPeV real-time PCRs werd bevestigd door de DNA-sequenties van de PCR-producten van een aantal PCR-positieve watermonsters (3/7 voor HEV en 15/19 voor HPeV) te analyseren. Hiertoe werden PCR-producten onderworpen aan elektroforese op een 2%-agarosegel, en vervolgens uitgesneden en gezuiverd door middel van QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, Venlo, Nederland) of ExoSAP-IT (USB, Staufen, Duitsland). Voor HPeV werden gezuiverde PCR-producten verder geamplificeerd door middel van een tweede PCR-reactie, gebruikmakend van dezelfde primers als gebruikt in de eerste reactie (Schalk et al., 2009). Gezuiverde HEV en HPeV PCR-producten werden vervolgens gekloneerd in een TA-vector (pCRII-TOPO TA cloning kit, Invitrogen, Breda, Nederland), en onderworpen aan sequentieanalyse met een BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (PerkinElmer, Groningen, Nederland). De DNA-sequenties werden bewerkt met Bionumerics (Applied Maths NV, Sint-Martens-Latem, België) en vergeleken met sequenties in een internationale en vrij toegankelijke databank ter identificatie van de verkregen sequenties. In alle gevallen hadden de gevormde PCR-producten de juiste DNA-sequentie. Aan de hand van de aan- of afwezigheid van HEV- en HPeV-RNA in de verschillende RT-PCR-reacties (verschillende volumes concentraat en verschillende RNA-verdunningen, zie Bijlage 2) werd voor elk monster de concentratie PCR-detecteerbare eenheden (pde) per liter water met bijbehorende 95%-betrouwbaarheidsintervallen berekend met behulp van Mathematica-software. Bij de berekening werd aangenomen dat een negatief signaal in een testvolume een valsnegatief signaal is veroorzaakt door remming, als de eerst volgende hogere verdunning een positief signaal geeft.

3 Resultaten

3.1 Humane pathogenen

3.1.1 HEV en HPeV

Voor elk monster werd een RT-PCR-reactie ingezet op twee tot vier afzonderlijke RNA-extracten uit verschillende volumes concentraat (zie Bijlage 2). In elf van de 14 geteste Maas-monsters kon HPeV

Tabel 3.1 Concentraties (pde/l) HEV- en HPeV-RNA in de Maas, de Rijn en de Nieuwe Maas

| Nr. | Datum | Maas | | Rijn | | Nieuwe Maas | |
|------|----------|---------------------|----------------------|---------------------|---------------------|----------------------------------|---------------------|
| | | HEV | HPeV | HEV | HPeV | HEV | HPeV |
| 1 | 13-05-08 | 11,4 (0,6-76,5) | 41,9 (2,4-195,9) | 45,2 (2,5-211,3) | 0 (0-11,1) | 0 (0-8,5) | 0 (0-8,5) |
| 2 | 10-06-08 | 0 (0-7,8) | 149,2 (19,1-1339) | 0 (0-7,0) | 0 (0-7,0) | 0 (0-8,3) | 0 (0-8,3) |
| 3a* | 08-07-08 | 0 (0-18,4) | 20,3 (1,0-136,7) | 0 (0-6,1) | 0 (0-6,1) | 0 (0-6,3) | 0 (0-6,3) |
| 3b* | 08-07-08 | 0 (0-8,0) | 0 (0-8,4) | 0 (0-9,2) | 0 (0-9,2) | 0 (0-8,5) | 0 (0-8,5) |
| 4 | 05-08-08 | 29,1 (1,6-136,0) | 29,1 (1,6-136,0) | 0 (0-5,8) | 0 (0-5,8) | 36,2 (2,0-169,0) [‡] | 0 (0-8,9) |
| 5 | 02-09-08 | 0 (0-5,8) | 0 (0-5,8) | 0 (0-6,8) | 0 (0-6,8) | 0 (0-24,8) | 0 (0-24,8) |
| 6a* | 30-09-08 | 0 (0-6,2) | 25,5 (2,9-118,1) | 0 (0-5,3) | 21,6 (1,2-100,8) | 0 (0-6,5) | 0 (0-6,5) |
| 6b* | 30-09-08 | 0 (0-4,3) | 18,4 (2,1-85,3) | 13,5 (0,8-61,4) | 0 (0-4,8) | 0 (0-4,6) | 0 (0-4,8) |
| 7 | 28-10-08 | 0 (0-6,7) | 7,8 (0,4-52,4) | 0 (0-8,1) | 34,3 (1,9-160,2) | 0 (0-6,3) | 26,7 (1,5-124,7) |
| 8 | 25-11-08 | 7,8 (1,3-24,2) | 29,0 (1,6-135,4) | 0 (0-5,9) | 24,1 (1,4-112,5) | 0 (0-5,6) | 0 (0-5,9) |
| 9 | 16-12-08 | 0 (0-7,2) | 30,9 (1,7-144,4) | 0 (0-7,0) | 29,9 (1,7-139,5) | X | X |
| 10a* | 20-01-09 | 2,1 (0,1-9,3) | 17,3 (1,0-81,0) | 0 (0-7,5) | 0 (0-7,8) | 0 (0-6,3) | 0 (0-6,3) |
| 10b* | 20-01-09 | 0 (0-9,3) | 39,7 (2,2-185,7) | 0 (0-12,1) | 51,4 (2,9-240,3) | 0 (0-8,6) | 0 (0-9,1) |
| 11 | 17-02-09 | 0 (0-6,0) | 0 (0-6,3) | 0 (0-6,9) | 0 (0-7,2) | 0 (0-11,6) | 0 (0-11,6) |
| 12a* | 17-03-09 | 0 (0-6,8) | 29,3 (3,3-135,6) | 0 (0-6,9) | 0 (0-7,2) | 0 (0-7,7) | 0 (0-8,0) |
| 12b* | 17-03-09 | 0 (0-6,7) | 0 (0-7,1) | 0 (0-9,6) | 0 (0-10,1) | 0 (0-11,0) | 0 (0-11,6) |
| 13 | 14-04-09 | 0 (0-7,1) | 0 (0-7,4) | 0 (0-6,9) | 0 (0-7,2) | 0 (0-6,8) | 0 (0-7,1) |
| 14 | 12-05-09 | 0 (0-6,9) | 29,4 (1,6-137,3) | 0 (0-7,3) | 0 (0-7,6) | 0 (0-7,5) | 0 (0-7,9) |

Weergegeven zijn de concentraties in PCR-detecteerbare eenheden per liter water (pde/l) en het 95%-betrouwbaarheidsinterval. In kleur zijn de positieve monsters weergegeven. * Watermonsters die geconcentreerd waren door middel van zowel negatieve membraanfiltratie (a) als hemoflowfiltratie (b). [‡] Laag signaal in de PCR (Cp=40), en niet genoeg materiaal om resultaat te bevestigen door middel van sequentieanalyse. X = geen monster.

aangetoond worden (78,5%), vier van deze monsters bevatten ook HEV-RNA (28,5%) (zie Tabel 3.1). Vijf van de Rijn-monsters waren positief voor HPeV (35,7%) en twee voor HEV (14,2%). Eén van de 13 Nieuwe Maas-monsters was positief voor HPeV, en één voor HEV (7,7%).

Voor de monsters die door middel van negatieve membraanfiltratie (NMF) en hemoflowfiltratie (HF) geconcentreerd waren, werd in twee van de gevallen viraal RNA aangetoond in beide typen concentraat, in vier van de gevallen alleen in het NMF-concentraat en in twee gevallen alleen in het HF-concentraat (zie Tabel 3.1). Discrepancies lijken niet methodeafhankelijk en zijn mogelijk te verklaren door een variabele detectiekans bij lage RNA-concentraties. In de Maas werd HPeV-RNA het hele jaar door gevonden, in de Rijn van september 2008 tot en met januari 2009, in de Nieuwe Maas in oktober 2008. HEV-RNA werd op alle locaties zowel in winter- als zomermaanden aangetroffen.

3.1.2 *S. aureus* en MRSA

S. aureus kon worden gedetecteerd in de Maas, in elk monster in de periode van 20 januari tot en met 14 april 2009, en in de Rijn, in elk monster van 20 januari tot en met 17 maart 2009 (zie Tabel 3.2).

Tabel 3.2 Detectie van *S. aureus* en MRSA-stammen in de Maas, de Rijn en de Nieuwe Maas

| Datum | Maas | | Rijn | | Nieuwe Maas | |
|-------------|------------------------------|------|------------------------------|------|------------------|------|
| | <i>S. aureus</i> | MRSA | <i>S. aureus</i> | MRSA | <i>S. aureus</i> | MRSA |
| 1 10-06-08 | 0 (0-1,9) | - | 0 (0-1,9) | - | x | x |
| 2 08-07-08 | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - |
| 3 05-08-08 | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - |
| 4 02-09-08 | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - |
| 5 30-09-08 | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - |
| 6 28-10-08 | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - |
| 7 25-11-08 | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - |
| 8 16-12-08 | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - | x | x |
| 9 20-01-09 | 24 (1-225) | 0/5 | 24 (1-225) | 6/6 | 0 (0-17,4) | - |
| 10 17-02-09 | 239 (15 - 2256) ¹ | 2/10 | 239 (15 - 2256) ¹ | 0/10 | 0 (0-17,4) | - |
| 11 17-03-09 | 24 (1-225) | 0/7 | 239 (11 - 2256) ² | 0/10 | 0 (0-17,4) | - |
| 12 14-04-09 | 239 (15 - 2256) ¹ | 0/10 | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - |
| 13 12-05-09 | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - | 0 (0-17,4) | - |

Voor *S. aureus* zijn de concentraties in kolonievormende eenheden per liter water (kve/l) weergegeven, en het 95%-betrouwbaarheidsinterval. Voor MRSA is aangegeven hoeveel van de bevestigde en geanalyseerde *S. aureus*-isolaten konden worden gekarakteriseerd als MRSA. X = monster afgekeurd of geen monstername. ^{1,2}Hypothetische concentraties bepaald omdat ¹beide testvolumes positief waren of ²alleen het 10 ml-testvolume positief was. Voor deze berekeningen is aangenomen dat 1 ml-monster, indien getest, negatief was geweest. Deze waarde geeft dus een ondergrens van de werkelijke concentratie aan. In blauw zijn de positieve monsters weergegeven. In de tabel zijn de monsternames van 13-5-08 niet weergegeven omdat de monsters op alle drie de locaties waren afgekeurd (zie paragraaf 2.1).

In deze periode waren ook de aantallen fecale indicatoren relatief hoog (zie Figuur 3.1) en was de watertemperatuur laag (zie Figuur 3.2). In beide rivieren bleken geïsoleerde *S. aureus*-varianten van één van de monsters het *MecA*-gen te bevatten en dus MRSA-stammen te zijn. Deze stammen waren inderdaad resistent tegen oxacilline (Tabel 3.3). Daarnaast waren alle MRSA-stammen ook resistent tegen erythromycine en ciprofloxacine, en beide isolaten uit de Maas ook tegen clindamycine.

Tabel 3.3. Antibioticumgevoeligheidsprofielen van MRSA-stammen uit de Maas en de Rijn

| Monster | QU/DA | TET | ERY | VAN | SU/TR | CIP | OXA | CLI |
|---------|----------------|-----|-----|-----|--------|-----|------|------------------|
| Maas | 1,0 | 1,0 | >32 | 1,0 | ≤ 0,25 | >32 | >256 | >256 |
| Rijn | ≤ 0,5 – 1,0 | 1,0 | >32 | 1,0 | ≤ 0,25 | >32 | >256 | 0,094 – 0,125 |
| Epi CO* | 1,0 | 1,0 | 1,0 | 2,0 | 0,5 | 1,0 | 2,0 | 0,25 |

Weergegeven zijn de MIC-waarden in µg/ml. QU/DA = Quinupristine/dalfopristine, TET = tetracycline, ERY=erythromycine, VAN=vancomycine, SU/TR=sulfamethoxazole/trimethoprim, CIP=ciprofloxacine, OXA=oxacilline, CLI=clindamycine. In blauw zijn de antibiotica weergegeven waartegen resistentie is verworven. *Epidemiologische cut-off waarden voor *S. aureus* zoals bepaald door EUCAST (<http://www.eucast.org/>).

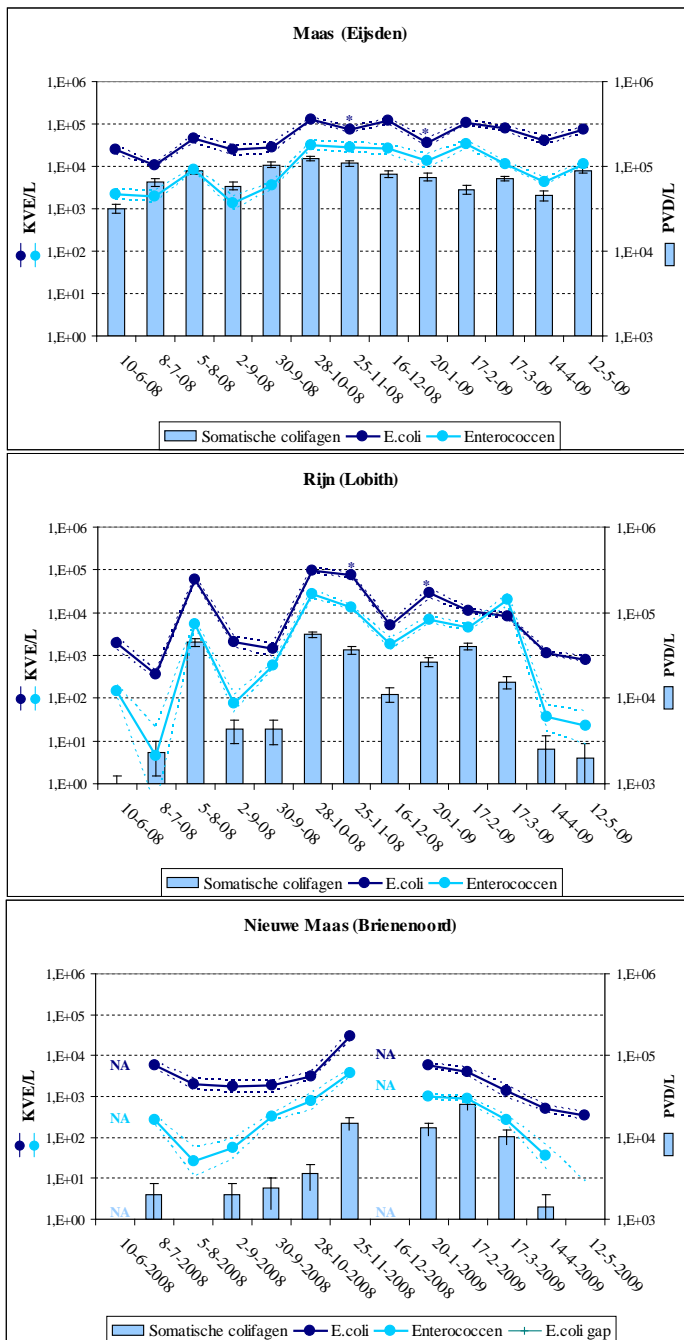
3.2 Fecale verontreiniging

Gemiddeld waren de concentraties fecale indicatoren, intestinale enterococcen, *E. coli* en somatische colifagen het hoogst in de Maas en het laagst in de Nieuwe Maas (zie Tabel 3.4). Op elke locatie hadden de drie verschillende indicatoren een vergelijkbaar verloop in de tijd (zie Figuur 3.1). In de Maas was de mate van fecale contaminatie redelijk stabiel in de tijd. In de Rijn waren daarentegen grote fluctuaties waarneembaar: op piekdagen was de mate van verontreiniging vergelijkbaar met die in de Maas, maar op andere dagen was het besmettingsniveau laag en vergelijkbaar met dat geobserveerd in de Nieuwe Maas. Met uitzondering van een piek in augustus 2008 in de Rijn, waren in de Nieuwe Maas en de Rijn concentraties fecale indicatoren hoger in de periode van oktober/november 2008 tot en met maart 2009 dan in de overige maanden (zie Figuur 3.1). In deze winterperiode zijn ook de laagste watertemperaturen gemeten (zie Figuur 3.2).

Tabel 3.4 Gemiddelde concentraties fecale indicatoren in de Maas, de Rijn, de Nieuwe Maas in de periode juni 2008 – mei 2009

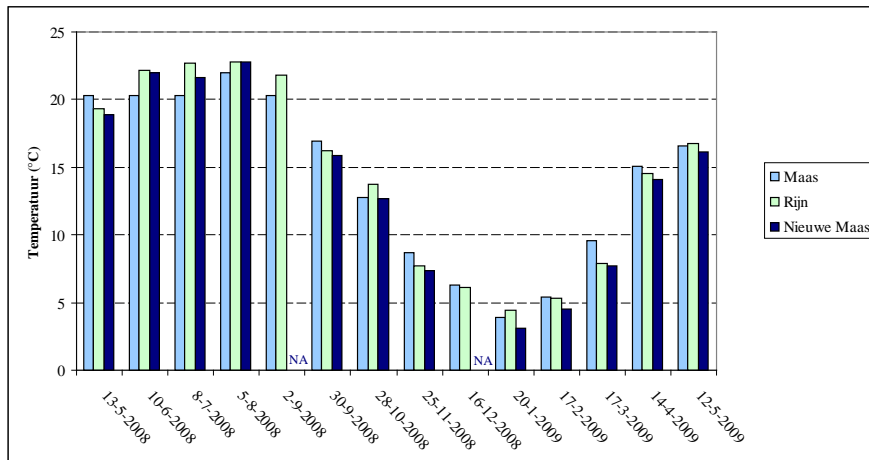
| Locatie | Enterococcen (x10 ³ kve/l) | | E. coli (x10 ³ kve/l) | | Somatische colifagen (x10 ³ pfd/l) | |
|-------------|--|------------|-------------------------------------|----------|--|----------|
| | Gemiddeld | Range | Gemiddeld | Range | Gemiddeld | Range |
| Maas | 14 | 1,4 – 33 | 60 | 11 – 130 | 76 | 32 – 120 |
| Rijn | 6,1 | 0,005 - 27 | 22 | 0,4 - 99 | 19 | 0,8 - 55 |
| Nieuwe Maas | 0,7 | 0 – 3,8 | 5,1 | 0,3 – 29 | 6,8 | 0,2 – 25 |

De weergegeven waarden zijn gebaseerd op 13 vier-wekelijkse monsternames in de periode juni 2008 tot en met mei 2009 voor de Rijn en de Maas, en voor de Nieuwe Maas op 11 monsternames, omdat er voor deze locatie geen gegevens zijn voor juni en december 2008.



Figuur 3.1 Concentraties fecale indicatoren in de Maas, Rijn en Nieuwe Maas in de periode juni 2008 tot en met mei 2009

De lijnen geven de concentraties *E. coli* en enterococci weer in kolonievormende eenheden (kve) per liter water, de doorbroken lijnen de 95% betrouwbaarheidsintervallen. De balken geven de concentratie somatische fagen in plaquevormende deeltjes (pvd) per liter water, de error bars de 95%-betrouwbaarheidsintervallen. * De waarde van de positieve controle voor de *E. coli*-bepaling was lager dan de onderste controlegrens, de weergegeven concentraties zijn daarom mogelijk een onderschatting. NA = niet geanalyseerd. In de figuren zijn de monsternames van 13-5-08 niet weergegeven omdat de monsters op alle drie de locaties waren afgekeurd (zie paragraaf 2.1).



Figuur 3.2 Watertemperaturen in de Maas, Rijn en Nieuwe Maas in de periode mei 2008 t/m mei 2009

NA = niet geanalyseerd.

4 Discussie

Dit rapport beschrijft de resultaten van een inventariserend onderzoek naar het vóórkomen van emergent pathogenen in Nederlands oppervlaktewater. Onderzocht is het voorkomen van HEV, HPeV en MRSA, in de Rijn bij Lobith, de Maas bij Eijsden en de Nieuwe Maas bij Brieneoord.

HEV-RNA werd in de Maas, Rijn en de Nieuwe Maas aangetoond in respectievelijk vier (29%), twee (14%) en één (8%) van de monsters. Het virus werd zowel in winter- als zomermaanden aangetroffen. HEV is eerder aangetoond in de Maas, maar niet in Amsterdamse grachten (Schets et al., 2008; Rutjes et al., 2009). In Nederland komt vooral HEV-genotype 3 voor bij mensen en bij varkens (Widdowson et al., 2003; Herremans et al., 2006; Rutjes et al., 2007; Borgen et al., 2008). Genotypen 1, 2, en 4 komen in Nederland en andere westerse landen slechts sporadisch voor bij reizigers (Zaaijer et al., 1993; Teo, 2006). Ook de HEV-virussen in de Maas beschreven door Rutjes et al. (2009) behoorden tot genotype 3. Het lijkt daarom het meest waarschijnlijk dat er bij contaminatie van oppervlaktewater in Nederland sprake is van contaminatie met HEV-genotype 3. Vervolgonderzoek zal moeten bevestigen of de virussen die in de huidige studie in de Maas zijn gevonden en de virussen die in de Rijn en de Nieuwe Maas zijn inderdaad tot genotype 3 behoren.

HPeV-RNA werd in de Maas, Rijn en de Nieuwe Maas aangetoond in respectievelijk 11 (79%), vijf (36%), en één (8%) van de monsters. Het virus werd in de Maas het hele jaar door gevonden, en in de Rijn en de Nieuwe Maas tussen september 2008 en januari 2009. Er zijn aanwijzingen, met name uit serologische studies, dat HPeV-infecties bij mensen wereldwijd frequent voorkomen (Joki-Korpela en Hyypiä, 2001). Ook in Nederland komen HPeV-infecties regelmatig voor bij jonge kinderen (Benschop et al., 2008). De relatief hoge prevalentie van HPeV in Nederlands oppervlaktewater is hiermee in overeenstemming. In Nederland en Duitsland komen vooral HPeV-genotypen 1 (HPeV-1) en 3 (HPeV-3) voor (Baumgarte et al., 2008; Benschop et al., 2008; Van der Sanden et al., 2008). Een recente studie naar de prevalentie van HPeV in Nederland in de periode van 2000 tot 2007 liet zien dat HPeV-3 in tweejaarlijkse intervallen voorkomt, vooral in de maanden juni tot en met september, en dat HPeV-1 elk jaar voorkomt, met name van september tot en met maart (Van der Sanden et al., 2008). De bevinding dat HPeV het hele jaar door in de Maas aanwezig was, is hiermee in overeenstemming. Vervolgonderzoek zal moeten aantonen of de HPeV-varianten die in de verschillende seizoenen werden gevonden inderdaad tot verschillende genotypen behoren.

S. aureus-bacteriën werden in de Maas en de Rijn in de tweede helft van de winterperiode (januari tot en met maart/april 2009) aangetroffen. In één van de monsters uit de Maas (februari 2009) en de Rijn (januari 2009) werden ook methicilline-resistente *S. aureus* of MRSA aangetoond. Deze stammen hadden het *MecA*-gen en waren, behalve tegen oxacilline, resistent tegen meerdere andere antibiotica. De aanwezigheid van MRSA is eerder aangetoond in zeewater bij stranden in de Verenigde Staten (Soge et al., 2009). In Nederland zijn oxacilline-resistente *S. aureus*-bacteriën, en dus potentiële MRSA-stammen, eerder aangetroffen in Nederlands oppervlaktewater in veeteeltgebied (Blaak et al., 2010). Daarnaast suggereert de aanwezigheid van MRSA in actief slib en het effluent van rioolwaterzuiverings installaties in Zweden (Borjesson et al., 2009a; Borjesson et al., 2009b) en van het *MecA*-gen in Duits ziekenhuisafvalwater (Schwartz et al., 2003; Volkmann et al., 2004) dat MRSA vaker in oppervlaktewater voorkomen dan tot nu toe is beschreven.

Voor negatieve watermonsters is het niet uit te sluiten dat de onderzochte pathogenen aanwezig zijn in concentraties onder de detectiegrens van de gebruikte methoden. De detectielimiet van de methode

voor de isolatie van *S. aureus* bleek in een spike-experiment minstens 100-200 kve per liter. De detectielimiet wordt bepaald door de aanwezigheid van andere bacteriën (stooflora) in het water: hoe meer stooflora er is ten opzichte van *S. aureus*, hoe lager de kans om de laatste te detecteren. Voor RT-PCR's zoals die gebruikt zijn voor de detectie van HEV en HPeV, wordt de detectielimiet bepaald door het minimale aantal RNA-kopieën dat gedetecteerd kan worden in één RT-PCR-reactie (oftewel de grootte van 1 PCR-detecteerbare eenheid of pde), en het volume water dat in één reactie getest kan worden. Beide factoren worden negatief beïnvloed door de aanwezigheid van remmende stoffen in het watermonster (Rutjes et al., 2005). Behalve de detectielimiet van de RT-PCR speelt ook het rendement van het concentratieproces een rol. Deze was voor bacteriofagen gemiddeld 41%. Hoewel dit vanwege verschillende detectietechnieken (levend virus vergeleken met RNA) niet direct vertaalbaar is naar HEV- en HPeV-opbrengsten geeft dit wel aan dat de gemeten concentraties HEV- en HPeV-RNA en het aantal positieve monsters mogelijk een onderschatting van de werkelijkheid zijn.

De onderzochte pathogenen kunnen in oppervlaktewater terechtkomen met feces van humane en/of animale oorsprong. In de Maas was de mate van fecale verontreiniging over de hele periode relatief hoog en er was geen duidelijke seizoensgebonden correlatie. In de Rijn en de Nieuwe Maas werden verschillen waargenomen in concentraties fecale indicatoren in zomer- en wintermaanden. Deze seizoensvariatie is in overeenstemming met wat eerder beschreven is voor bacteriofagen (De Roda Husman et al., 2005; De Roda Husman et al., 2006; Westrell et al., 2006), en leek omgekeerd gerelateerd aan watertemperaturen. Een betere overleving bij lagere temperaturen zou hier een verklaring voor kunnen zijn (Nasser en Oman, 1999). Andere mogelijke verklaringen voor fluctuaties in de mate van fecale verontreiniging zijn de detectie van recente lozingen, wat bijvoorbeeld de niet-seizoensgebonden piek in augustus 2008 in de Rijn zou kunnen verklaren, en fluctuaties in de waterafvoer. De afvoer van de Rijn is op jaarbasis relatief regelmatig, en wordt in het voorjaar en de vroege zomer vooral bepaald door smeltwater, in de herfst en winter door regenwater. In de Maas wordt de waterafvoer bepaald door neerslag en is de afvoer in zomermaanden lager dan in de wintermaanden. Bij een lagere afvoer is het te verwachten dat het effect van contaminaties groter is. De afvoerkenmerken van de Rijn (regelmatig) en de Maas (seizoensgebonden) werden echter niet weerspiegeld in de concentraties fecale indicatoren gemeten in 2008 en 2009. De oorsprong van fecale indicatororganismen en humane pathogenen is niet onderzocht, maar kan, omdat het stroomgebied van de rivieren zowel landbouwgebieden als steden omvat, zowel humane (ongezuiverd en gedeeltelijk gezuiverd afvalwater in bebouwde gebieden) als animale (mest in landbouwgebieden) bronnen hebben.

De frequentere detectie van humane pathogenen in de Maas vergeleken met de andere rivieren correleert met de constant hoge mate van fecale verontreiniging in deze rivier. Vooral de aanwezigheid van detecteerbare concentraties HPeV-RNA leek in grote lijnen overeen te komen met perioden van hoge fecale verontreiniging: het hele jaar door in de Maas en in de (vroege) wintermaanden in de Rijn en de Nieuwe Maas. *S. aureus*-bacteriën werden zowel in de Maas als de Rijn alleen tussen januari en maart/april aangetroffen, en niet in de overige maanden waarin sprake was van hoge mate van verontreiniging, en waarin soms HPeV wel kon worden aangetoond. Dit zou kunnen betekenen dat de bronnen van *S. aureus*, indicatororganismen en HPeV niet dezelfde zijn, en/of dat *S. aureus* voor overleving lagere temperaturen nodig heeft dan de indicatoren. Het feit dat *S. aureus* niet in november en december 2008 werd gevonden, geeft echter aan dat niet alleen de temperatuur hierbij een rol speelt. Voor HEV was de correlatie met mate van fecale verontreiniging het minst duidelijk. Weliswaar werd HEV het meest frequent gedetecteerd in de Maas, maar de helft van de monsters met aantoonbare concentraties HEV-RNA waren monsters in de zomermaanden mei en augustus. Hoewel concentraties van fecale indicatoren in mei 2008 niet konden worden bepaald, suggereert het verloop in de tijd en de gemeten watertemperaturen dat deze op dat moment in de Rijn en de Nieuwe Maas relatief laag waren.

Het is eerder beschreven dat concentraties pathogenen niet noodzakelijkerwijs correleren met concentraties fecale indicatoren (De Roda Husman en Ketelaars, 2004; De Roda Husman et al., 2005). Dit kan bijvoorbeeld veroorzaakt worden door verschillende bronnen van contaminatie, of door (seizoensgebonden) fluctuaties in de prevalentie van een pathogeen (Westrell et al., 2006). Daarnaast zou een verschil in overleving of stabiliteit in water en bij verschillende watertemperaturen tussen pathogenen en indicatoren een rol kunnen spelen (Nasser et al., 1999). Een andere mogelijke verklaring is het gebruik van verschillende detectiemethoden voor pathogenen en indicatoren, zoals het gebruik van moleculaire technieken en kweken. Behalve dat verschillende methoden een andere gevoeligheid hebben om micro-organismen te detecteren, speelt hierbij ook een verschil in de stabiliteit van levende organismen vergeleken met genetisch materiaal een rol. Dat de aanwezigheid van specifieke pathogenen niet noodzakelijk correleert met concentraties fecale indicatoren geeft het belang aan van onderzoek naar de aanwezigheid van de pathogenen.

De resultaten van deze studie laten zien dat humane emerging pathogenen in Nederlands oppervlaktewater voorkomen. Om te bepalen of deze aanwezigheid geassocieerd is met uitbraken van ziekte zullen de bevindingen in oppervlaktewater gecombineerd moeten worden met epidemiologische gegevens. Zulke gegevens zijn echter niet altijd beschikbaar. Daarbij is het lastig vast te stellen wat in het geval van een uitbraak precies de bijdrage is van transmissie via water vergeleken met directe transmissie en additionele indirecte transmissieroutes. Een alternatieve manier om de relevantie van de aanwezigheid van pathogenen in water vast te stellen, is het bepalen van risico's van blootstelling en infectie via water met behulp van kwantitatieve risicoschattingen (Schijven et al., 2005; Schets et al., 2008). De risico's voor de volksgezondheid verbonden aan de aanwezigheid van HEV, HPeV en MRSA in oppervlaktewater zullen in vervolgstudies worden geschat. Voor het aantonen van HEV en HPeV zijn in deze studie moleculaire technieken gebruikt, wat geen inzicht geeft in de verhouding levend en dood virus. Hoewel voor het schatten van volksgezondheidsrisico's informatie over concentraties infectieus virus gewenst is, zijn niet alle pathogenen te kweken in vitro. Zo is HEV in vitro zeer moeilijk te kweken (Chandra et al., 2008), en de kweeksystemen die beschreven zijn waarschijnlijk niet gevoelig genoeg om HEV te detecteren in natuurlijke watermonsters. Hoewel HPeV in vitro kan vermeerderen in HT29-cellen (Schalk et al., 2009), is er op dit moment nog geen methode beschreven om dit virus in monsters te detecteren door middel van kweek. Voor pathogenen die niet door middel van kweek aan te tonen zijn, worden in risicoschattingen aannames gemaakt over percentage infectieuze versus geïnactiveerde virussen. Het gebruik van PCR-resultaten voor kwantitatieve microbiële risicobeoordeling (QMRA) moet nader verkend worden (Costán-Longares en de Roda Husman, In preparation).

De meetlocatie Nieuwe Maas bij Brienenoord ligt in het Rijnstroomgebied, ongeveer 134 km stroomafwaarts van Lobith. Het feit dat het water hier minder fecale indicatoren en pathogenen bevatte dan de Rijn bij Lobith kan verklaard worden doordat er stroomafwaarts verdunning plaatsvindt door samenkomen met minder verontreinigde rivieren en regenval, en door afsterving van de micro-organismen. Deze bevinding lijkt te suggereren dat de mate van contaminatie van de Rijn binnen Nederlandse grenzen minder hoog is dan daarbuiten. Afname van concentraties virale indicatoren en pathogenen is eerder beschreven voor het Rijnstroomgebied tussen Lobith en het IJsselmeer bij Andijk (De Roda Husman et al., 2005) en voor protozoa in het Maasstroomgebied (Hoogenboezem et al., 2001). Het is echter niet uit te sluiten dat er tussen Lobith en de Nieuwe Maas belangrijke contaminatiebronnen zijn die door verdunning en afsterving niet meer te registreren zijn in de Nieuwe Maas. Om een indruk te krijgen van de bijdrage van contaminatie binnen Nederland in verschillende regio's zou er op meer plaatsen in een stroomgebied monsters genomen moeten worden.

Het in dit rapport beschreven onderzoek had een inventariserend karakter. De gekozen meetlocaties, de Maas bij Eijsden, de Rijn bij Lobith en de Nieuwe Maas bij Brieneoord geven een algemeen beeld weer van het voorkomen van pathogenen in Nederlands oppervlaktewater: het voorkomen van pathogenen in deze wateren kan niet worden gerelateerd aan de aanwezigheid van specifieke contaminatiebronnen, ziektegevallen, of volksgezondheidsrisico's. Daarnaast geven de locaties Eijsden en Lobith geen informatie over de verontreiniging binnen onze landsgrenzen. De prevalentie van pathogenen in oppervlaktewater zal variëren tussen locaties, afhankelijk van de nabijheid van contaminatiebronnen, de mate van verdunning, en de stabiliteit van de pathogenen in water. De risico's voor mensen om blootgesteld te worden aan pathogenen die in oppervlaktewater voorkomen zijn het grootst waar direct contact is met water, zoals in wateren die (officieel dan wel onofficieel) gebruikt worden voor recreatie, en wateren die als bron voor drinkwaterproductie gebruikt worden. Ook kunnen mensen indirect worden blootgesteld aan pathogenen die in oppervlaktewater voorkomen, bijvoorbeeld als gecontamineerd oppervlaktewater wordt gebruikt als irrigatiewater om gewassen te besproeien. Door in toekomstige studies specifiek locaties te kiezen die voor deze doeleinden worden gebruikt en die in de nabijheid zijn gelegen van bekende contaminatiebronnen (bijvoorbeeld rioolwaterzuiveringsinstallaties, of gebieden met hoge concentraties aan landbouwhuisdieren) zal er specifiek informatie verkregen worden aan de hand waarvan risicoschattingen kunnen worden gedaan. Naast de in de huidige studie onderzochte emerging pathogenen HEV, HPeV en MRSA, zal de relevantie van andere mogelijk *waterborne* emerging pathogenen continu bijgehouden moeten worden aan de hand van recente vakliteratuur. Een voorbeeld van een emerging pathogeen dat in prevalentie toeneemt en een risico vormt voor de volksgezondheid is de extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producerende *E. coli* (Coque et al., 2008). Het voorkomen van ESBL-producerende bacteriën in oppervlaktewater verdient nader onderzoek.

De aanwezigheid van humane emerging pathogenen in dit inventariserend onderzoek in de rivieren de Maas, de Rijn en de Nieuwe Maas onderstrepen het belang van onderzoek naar pathogenen in oppervlaktewater en het schatten van de risico's voor de volksgezondheid van transmissie via water.

5 Conclusies en aanbevelingen

In de Maas bij Eijsden, de Rijn bij Lobith en de Nieuwe Maas bij Brieneoord komen de emergent pathogenen HPeV, HEV en MRSA voor. De relevantie voor de volksgezondheid van de aanwezigheid van deze emergent pathogenen in oppervlaktewater moet worden bepaald, bijvoorbeeld door middel van kwantitatieve risicoschattingen. Om volksgezondheidsrisico's in te schatten moet in toekomstig onderzoek het voorkomen van emergent pathogenen vooral onderzocht worden op plaatsen waar de kans op menselijke blootstelling groot is, zoals in recreatiewater.

Het voorkomen van humane pathogenen is niet noodzakelijkerwijs gecorreleerd aan hoeveelheid fecale indicatoren, wat het belang onderstreept van onderzoek naar de aanwezigheid van pathogenen. Voor het bepalen van volksgezondheidsrisico's, geassocieerd met het voorkomen van emergent pathogenen in oppervlaktewater, zal continu bijgehouden moeten worden welke emergent pathogenen op welk moment een mogelijk risico vormen, gebaseerd op recente vakliteratuur.

Toekomstig onderzoek moet uitwijzen wat de bijdrage is van verschillende soorten contaminatiebronnen, zoals afvalwater van verpleeg- en ziekenhuizen, boerderijen of slachterijen, aan het voorkomen van verschillende soorten emergent pathogenen in oppervlaktewater. Om een betere indruk te krijgen van de bijdrage van contaminatie van oppervlaktewater binnen Nederland en de mate van contaminatie in verschillende regio's (bijvoorbeeld met landbouwgebieden of grote steden) zou er op meer plaatsen in een stroomgebied monsters genomen moeten worden.

Literatuur

Anonymous (2000a). NEN-EN-ISO 7899-2 Water quality – Detection and enumeration of enterococci – part 2: Membrane filtration method (ISO 7899-2:2000, IDT). Nederlands Normalisatie-instituut, Delft.

Anonymous (2000b). NEN-EN ISO 9308-1 Water quality – Detectie and enumeratie van *Escherichia coli* and bacterien van de coligroep – Deel 1: Methode met membraan filtratie (ISO 9308-1:2000, IDT). Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

Anonymous (2001). NEN-EN-ISO 10705 Water – Detectie en telling van bacteriofagen – Deel 2: Telling van somatische colifagen (ISO 10705-2:2000, IDT). Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.

Anonymous (2007). NEN-EN-ISO 19458 Water quality – Sampling for microbiological analysis (ISO 19458:2006, IDT). Nederlands Normalisatie-instituut, Delft.

Arankalle VA, Chadha MS, Tsarev SA, Emerson SU, Risbud AR, Banerjee K and Purcell RH (1994). Seroepidemiology of water-borne hepatitis in India and evidence for a third enterically-transmitted hepatitis agent. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3428-34-32.

Barré-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dauguet C, Axler-Blin C, Vézinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W and Montagnier L (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220: 868-871.

Baumgarte S, Kleber de Souza Luna L, Grywna K, Panning M, Drexler JF, Karsten C, Huppertz HI and Drosten C (2008). Prevalence, types, and RNA concentrations of human parechoviruses, including a sixth parechovirus type, in stool samples from patients with acute enteritis. J. Clin. Microbiol. 46: 242-248.

Benschop K, Thomas X, Serpenti C, Molenkamp R and Wolthers K (2008). High prevalence of human parechovirus (HPeV) genotypes in the Amsterdam region and identification of specific HPeV variants by direct genotyping of stool samples. J. Clin. Microbiol. 46: 3965-3970.

Berchovich S and Pangan J (1968). Recoveries of virus from premature infants during outbreaks of respiratory disease: The relation of echovirus 22 to disease of the upper and lower respiratory tract in the premature infant. Bull. N. Y. Ac. Med. 44: 378-387.

Blaak H, Schets FM, Italiaander R, Schmitt H and De Roda Husman AM (2010). Antibioticresistente bacteriën in Nederlands oppervlaktewater in veeteeltgebied. RIVM rapport 703719031, Rijksinstituut voor volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.

Borgen K, Herremans T, Duizer E, Vennema H, Rutjes S, Bosman A, De Roda Husman AM and Koopmans M (2008). Non-travel related hepatitis E virus genotype 3 infections in the Netherlands; A cases series 2004-2006. BMC Infect. Dis. 8: 61.

Borjesson S, Matussek A, Melin S, Lofgren S and Lindgren PE (2009a). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in municipal wastewater: an uncharted threat? J Appl. Microbiol.

Borjesson S, Melin S, Matussek A and Lindgren PE (2009b). A seasonal study of the *mecA* gene and *Staphylococcus aureus* including methicillin-resistant *S. aureus* in a municipal wastewater treatment plant. Water Res. 43(4): 925-32.

Bouwknegt M, Rutjes SA, Reusken CB, Stockhofe-Zurwieden N, Frankena K, de Jong MC, de Roda Husman AM and Poel WH (2009). The course of hepatitis E virus infection in pigs after contact-infection and intravenous inoculation. *BMC Vet. Res.* 5: 7.

CDC (1997). Isolation of Avian Influenza A (H5N1) viruses from humans - Hong Kong, May-December 1997. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* 46: 1204-1207.

CDC (2009). Swine influenza A (H1N1) infection in two children, Southern California, March-April 2009. *MMWR Morb. Mortal Wkly. Rep.* 58: 400-402.

Chandra V, Taneja S, Kalia M and Jameel S (2008). Molecular biology and pathogenesis of hepatitis E virus. *J. Biosci.* 33: 451-464.

Claas ECJ, Osterhaus ADME, van Beek R, De Jong JC, Rimmelzwaan GF, Senne DA, Krauss S, Shortridge KF and Webster RG (1998). Human influenza A H5N1 virus related to highly pathogenic avian influenza virus. *Lancet* 351: 472-477.

Clemente-Casares P, Pina S, Buti M, Jardi R, Martín M, Bofill-Mas S and Girones R (2003). Hepatitis E virus epidemiology in industrialized countries. *Emerg. Infect. Dis.* 9: 448-454.

CLSI (2009). M7-A8, Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria that grow Aerobically, Third edition, Approved standard - Seventh addition. Clinical and Laboratory Standards Institute.

Coque TM, Baquero F and Canton R (2008). Increasing prevalence of ESBL-producing enterobacteriaceae in Europe. <http://www.eurosurveillance.org>. *Eurosurveillance* 13 (47).

Costán-Longares A and de Roda Husman AM (In preparation). Real time PCR: a useful tool for risk assessment studies on pathogens in the environment.

Davies PD (1999). The effects of poverty and ageing on the increase in tuberculosis. *Monaldi Arch. Chest Dis.* 54(2): 168-71.

Dawood FS, Jain S, Finelli L, Shaw MW, Lindstrom S, Garten RJ, Gubareva LV, Xu X, Bridges CB and Uyeki TM (2009). Emergence of a novel swine-origin influenza A (H1N1) virus in humans. *N. Engl. J. Med.* 360(25): 2605-15.

De Jong JC, Claas ECJ, Osterhaus ADME, Webster RG and Lim WL (1997). A pandemic warning? *Science* 389: 554.

De Neeling AJ, van den Broek MJM, Spalburg EC, van Santen-Verheuvel MG, Dam-Deisz WDC, Boshuizen HC, van de Giessen AW, van Duijkeren E and Huijsdens XW (2007). High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. *Vet. Microbiol.* 122: 366-372.

De Roda Husman AM and Ketelaars HAM (2004). Humane virussen in de Maas. RIVM rapport 330200001. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.

De Roda Husman AM, Ketelaars HAM, Lodder WJ, Medema GJ and Schets FM (2006). De microbiologische kwaliteit van het ingenomen en afgeleverde water van het Waterwinningsbedrijf Brabantse Biesbosch in 2001. RIVM rapport 330250002, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.

De Roda Husman AM, Lodder WJ, Penders EJM, Krom AP, Bakker GL and Hoogenboezem W (2005). Viruses in the Rhine and source waters for drinking water production. RIWA rapport. ISBN 90-6683-000-x.

Drosten C, Günther S, Preiser W, van der Werf S, Brodt HR, Becker S, Rabenau H, Panning M, Kolesnikova L, Fouchier RA, Berger A et al (2003). Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348: 1967-1976.

Efstratiou MA, Mavridou A, Richardson SC and Papadakis JA (1998). Correlation of bacterial indicator organisms with *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* and *Candida albicans* in sea water. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 342-346.

Emerson SU and Purcell RH (2003). Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 13: 145-154.

EUCAST (2010). <http://www.eucast.org/>. Voor het laatst geraadpleegd mei 2010.

Gallo RC, Salahuddin SZ, Popovic M, Shearer GM, Kaplan M, Haynes BF, Palker TJ, Redfield R, Oleske J and Safai B (1984). Frequent detection and isolation of cytopathic retroviruses (HTLV-III) from patients with AIDS and at risk for AIDS. *Science* 224: 500-503.

Ghazi F, Hughes PJ, Hyypiä T and Stanway G (1998). Molecular analysis of human parechovirus type 2 (formerly echovirus 23). *J. Gen. Virol.* 79: 2641-2650.

Herremans M, Vennema H, Bakker J, van der Veer B, Duizer E, Benne CA, Waar K, Hendriks B, Schneeberger P, Blaauw G, Kooiman M and Koopmans M (2006). Swine-like hepatitis E viruses are a cause of unexplained hepatitis in the Netherlands. *J. Viral Hepat.* 14: 140-146.

Hoogenboezem W, Ketelaars HAM, Medema GJ, Rijs GBJ and Schijven JF (2001). *Cryptosporidium* en *Giardia*: Voorkomen in rioolwater, mest en oppervlaktewater met zwem- en drinkwaterfunctie. RIWA/RIZA/RIVM rapport. ISBN 9036953324.

Hot D, Legeay O, Jacques J, Gantzer C, Caudrelier Y, Guyard K, Lange M and Andréoletti L (2003). Detection of somatic phages, infectious enteroviruses and enterovirus genomes as indicators of human enteric viral pollution in surface water. *Water Res.* 37: 4703-4710.

Hyypiä T, Horsnell C, Maaronen M, Khan M, Kalkkinen N, P. A, Kinnunen L and Stanway G (1992). A distinct picornavirus group identified by sequence analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8847-8851.

Ibelings MS and Bruining HA (1994). Nederlandse resultaten van het Europese prevalentieonderzoek naar infecties tijdens intensive care (EPIIC). II Aard van de infecties. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* 138: 2244-2247.

Jarvis WR and Martone WJ (1992). Predominant pathogens in hospital infections. *J. Antimicrob. Chemother.* 29 Suppl. A: 19-24.

Jevons MP (1961). Celbenin-resistant staphylococci. *Br. Med. J.* 1: 124-125.

Joki-Korpela P and Hyypiä T (2001). Parechoviruses, a novel group of human picornaviruses. *Ann. Med.* 33: 466-471.

Jones KE, Patel NG, Levy MA, Storeygard A, Balk D, Gittleman JL and Daszak P (2008). Global Trends in emerging infectious diseases. *Nature* 451: 990-994.

Jothikumar N, Cromeans TL, Robertson BH, Meng XJ and Hil VR (2006). A broadly reactive one-step real-time RT-PCR assay for rapid and sensitive detection of hepatitis E virus. *J. Virol. Methods* 131: 65-71.

Kanki PJ, Barin F, M'Boup S, Allan JS, Romet-Lemonne JL, Marlink R, McLane MF, Lee TH, Arbeille B and Denis F (1986). New human T-lymphotropic retrovirus related to simian T-lymphotropic virus type III (STLV-IIIAGM). *Science* 232: 238-243.

Khuroo MS (1980). Study of an epidemic of non-A, non-B hepatitis. Possibility of another human hepatitis virus distinct from past-transfusion non-A, non-B type. *Am. J. Med.* 68: 818-824.

Kindhauser MK, Ed. (2003). Global defence against the infectious disease threat. World Health Organization, Geneva.

Korber B, Muldoon M, Theiler J, Gao F, Gupta R, Lapedes A, Hahn BH, Wolinsky S and Bhattacharya T (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science* 288: 1789-1796.

Ksiazek TG, Erdman D, Goldsmith CS, Zaki SR, Peret T, Emery S, Tong S, Urbani C, Comer JA, Lim W, Rollin PE, Dowell SF, Ling AE, Humphrey CD, Shieh WJ et al (2003). A novel coronavirus associated with severe acute respiratory syndrome. *N. Engl. J. Med.* 348: 1953-1966.

Kuhn RC and Oshima KH (2002). Hollow-fiber ultrafiltration of *Cryptosporidium parvum* oocysts from a wide variety of 10-liter surface water samples. *Can. J. Microbiol.* 48: 542-549.

Kuiken T, Fouchier RAM, Schutten M, Rimmelzwaan GF, van Amerongen G, van Riel D, Laman JD, de Jong T, van Doornum G, Lim W, Ling AE, Chan PKS, Tam JS, Zambon MC, Gopal R, Drosten C, van der Werf S, Esciriu N, Manuguerra JC, Stöhr K, Peiris JSM and Osterhaus ADME (2003). Newly discovered coronavirus as the primary cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 362: 263-270.

Lemey P, Pybus OG, Wang B, Saksena NK, Salemi M and Vandamme AM (2003). Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100: 6588-6592.

Lodder WJ and De Roda Husman AM (2005). Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 1453-1461.

Martineau F, Picard FJ, Roy PH, Ouellette M and Bergeron MG (1998). Species-specific and ubiquitous-DNA-based assays for rapid identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Microbiol.* 36: 618-623.

Meng XJ, Purcell RH, Halbur PG, Lehman JR, Webb DM, Tsareva TS, Haynes JS, Thacker BJ and Emerson SU (1997). A novel virus in swine is closely related to the human hepatitis E virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 9860-9865.

Nasser AM and Oman SD (1999). Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Res.* 33: 1748-1752.

Navin TR, Weber R, Vugia DJ, Rimland D, Roberts JM, Addiss DG et al (1999). Declining CD4+ T-lymphocyte counts are associated with increased risk of enteric parasitosis and chronic diarrhea: results of a 3-year longitudinal study. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.* 20: 154-159.

NNIS (1999). National Nosocomial Infections Surveillance (NNIS) System report, data summary from January 1990-May 1999, issued June 1999. *Am. J. Infect. Control* 27(6): 520-32.

Panda SK, Thakral D and Rehman S (2007). Hepatitis E virus. *Rev. Med. Virol.* 17: 151-180.

Peiris JSM, Lai ST, Poon LLM, Guan Y, Yam LYC, Lim W, Nicholls J, Yee WKS, Yan WW, Cheung MT, Cheng VCC, Chan KH, Tsang DNC, Yung RWH, Ng TK, Yuen KY and members of the SARS study group (2003). Coronavirus as a possible cause of severe acute respiratory syndrome. *Lancet* 361: 1319-1325.

- Pusch D, Oh DY, Wolf S, Dumke R, Schröter-Bobsin U, Höhne M, Röske I and Schreier E (2005). Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Arch. Virol.* 150: 929-947.
- Reyes GR, Purdy MA, Kim JP, Luk KC, Young LM, Fry KE and Bradley DW (1990). Isolation of cDNA from the virus responsible for enterically transmitted non-A, non-B hepatitis. *Science* 247: 1335-1339.
- Rieckmann KH, Davis DR and Hutton DC (1989). Plasmodium vivax resistance to chloroquine? *Lancet* 2: 1183-1184.
- Riley LW, Remis RS, Helgerson SD, McGee HB, Wells JG, Davis BR, Hebert RJ, Olcott ES, Johnson LM, Hargrett NT, Blake PA and Cohen ML (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare Escherichia coli serotype. *N. Engl. J. Med.* 308: 681-685.
- Rutjes S and De Roda Husman AM (2004). Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001. RIVM rapport 330000007. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.
- Rutjes SA, Italiaander R, van den Berg HHJL, Lodder WJ and de Roda Husman AM (2005). Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens miniMAG system and real-time Nucleic Acid Sequence-Based Amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 3734-3740.
- Rutjes SA, Lodder WJ, Bouwknegt M and de Roda Husman AM (2007). Increased hepatitis E virus prevalence on Dutch pig farms from 33 to 55% by using appropriate internal quality controls for RT-PCR. *J. Virol. Methods* 143: 112-116.
- Rutjes SA, Lodder WJ, Lodder-Verschoor F, van den Berg HJL, Vennema H, Duizer E, Koopmans M and De Roda Husman AM (2009). Sources of hepatitis E virus genotype 3 in the Netherlands. *Emerg. Infect. Dis.* 15: 381-387.
- Schalk JAC, Rutjes SA, Docters van Leeuwen AE and de Roda Husman AM (2009). Detectie van infectieuze enterovirussen met celkweek-PCR voor de in Nederland wettelijk vereiste infectierisicoschatting voor drinkwater. RIVM rapport 330204003, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.
- Schets FM, van Wijnen JH, Schijven JF, Schoon H and de Roda Husman AM (2008). Monitoring of waterborne pathogens in surface waters in Amsterdam, the Netherlands, and the potential health risk associated with exposure to *Cryptosporidium* and *Giardia* in these waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 2069-2078.
- Schijven JF, Teunis PFM and De Roda Husman AM (2005). Quantitative risk assessment of avian influenza virus infection via water. RIVM rapport 703719012. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.
- Schwartz T, Kohnen W, Jansen B and Obst U (2003). Detection of antibiotic-resistant bacteria and their resistance genes in wastewater, surface water, and drinking water biofilms. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43(3): 325-35.
- Soge OO, Meschke JS, No DB and Roberts MC (2009). Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus and methicillin-resistant coagulase-negative Staphylococcus spp. isolated from US West Coast public marine beaches. *J. Antimicrob. Chemother.* 64: 1148-1155.

- Stanway G, Joki-Korpela P and Hyypiä T (2000). Human parechoviruses - biology and clinical significance. *Rev. Med. Virol.* 10: 57-69.
- Stanway G, Kalkkinen N, Roivainen M, Ghazi F, Khan M, Smyth M, Meurman O and Hyypiä T (1994). Molecular and biological characteristics of Echovirus 22 a representative of a new picornavirus group. *J. Virol.* 68: 8232-8233.
- Struelens MJ, Denis O and Rodriguez-Villalobos H (2004). Microbiology of nosocomial infections: progress and challenges. *Microbes Infect.* 6(11): 1043-8.
- Taylor LH, Latham SM and Woolhouse MEJ (2001). Risk factors for human disease emergence. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 356: 983-989.
- Teo CG (2006). Hepatitis E indigenous to economically developed countries: to what extent a zoonosis? *Curr. Opin. Infect. Dis.* 19(460-466).
- Tocque K, Bellis MA, Tam CM, Chan SL, Syed Q, Remington T and Davies PD (1998). Long-term trends in tuberculosis. Comparison of age-cohort data between Hong Kong and England and Wales. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158(2): 484-8.
- Van den Broek IVF, van Cleef BAGL, Haenen A, Broens EM, van der Wolf PJ, van den Broek MJM, Huijsdens XW, Kluytmans JAJW, van de Giessen AW and Tiemersma EW (2008). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in people living and working in pig farms. *Epidemiol. Infect.* 137: 700-708
- Van der Sanden S, de Bruin E, Vennema H, Swanink C, Koopmans M and van der Avoort H (2008). Prevalence of human parechovirus in The Netherlands in 2000 to 2007. *J. Clin. Microbiol.* 46: 2884-2889.
- Van Loo I, Huijsdens XW, Tiemersma EW, De Neeling AJ, van de Sande-Bruinsma N, Beaujean D, Voss A and Kluytmans JAJW (2007). Emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* of animal origin in humans. *Emerg. Infect. Dis.* 13: 1834-1839.
- Volkman H, Schwartz T, Bischoff P, Kirchen S and Obst U (2004). Detection of clinically relevant antibiotic-resistance genes in municipal wastewater using real-time PCR (TaqMan). *J. Microbiol. Methods* 56(2): 277-86.
- Voss A, Loeffen F, Bakker J, Klaassen C and Wulf M (2005). Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in pig farming. *Emerg. Infect. Dis.* 11: 1965-1966.
- Westrell T, Teunis P, van den Berg H, Lodder W, Ketelaars H, T.A. S and De Roda Husman AM (2006). Short- and long-term variations of norovirus concentrations in the Meuse river during a 2-year study period. *Water Res.* 40: 2613-2620.
- WHO (1978a). Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. *Bull. World Health Organ.* 56: 247-270.
- WHO (1978b). Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. *Bull. World Health Organ.* 56: 271-293.
- WHO (1997). Division of emerging and communicable diseases surveillance and control annual report – 1996. Geneva, World Health Organization, 1997.
- Widdowson MA, Jaspers WJM, van der Poel WHM, Verschoor F, De Roda Husman AM, Winter HLJ, Zaaijer HL and Koopmans M (2003). Cluster of cases of acute hepatitis associated with hepatitis E virus infection acquired in the Netherlands. *Clin. Infect. Dis.* 36: 29-33.

Wigand R and Sabin AB (1961). Properties of ECHO types 22, 23, and 24 viruses. Arch. Gesamte Virusforsch. 11: 224-247.

Wong DC, Purcell RH, Sreenivasan MA, Prasad SR and Pavri KM (1980). Epidemic and endemic hepatitis in India: evidence for a non-A, non-B hepatitis virus aetiology. Lancet 2: 876-879.

Woolhouse M and Gaunt E (2007). Ecological origins of human novel pathogens. Crit. Rev. Microbiol. 33: 231-242.

Woolhouse MEJ and Gowtage-Sequeria S (2005). Host range and emerging and reemerging pathogens. Emerg. Infect. Dis. 11: 1842-283.

Worobey M, Gemmel M, Teuwen DE, Haselkorn T, Kunstman K, Brunce M, Muyembe JJ, Kabongo JM, Kalengayi RM, van Marck E, Gilbert MT and Wolinsky SM (2008). Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. Nature 455: 661-664.

Zaaijer HL, Kok M, Lelie PN, Timmerman RJ, Chau K and Van der Pal HJ (1993). Hepatitis E in The Netherlands: imported and endemic. Lancet 341: 826.

Bijlage 1 Opbrengst somatische colifagen na concentratie van watermonsters

| Datum | Concentratie-Methode* | Maas (%) | Rijn (%) | Nieuwe Maas (%) |
|--------------------------------|-----------------------|-------------|-------------|-----------------|
| 10-jun-08 | NMF | 84,0 | 153,5 | 81,2 |
| 8-jul-08 | NMF | 45,7 | 13,9 | 58,3 |
| 5-aug-08 | NMF | 52,3 | 39,6 | 105,2 |
| 2-sep-08 | NMF | 17,6 | 17,8 | 35,7 |
| 30-sep-08 | NMF | 27,5 | 24,4 | 27,4 |
| 28-okt-08 | NMF | 25,4 | 29,2 | 39,2 |
| 25-nov-08 | NMF | 25,7 | 37,4 | 26,3 |
| 16-dec-08 | NMF | 25,7 | 34,2 | - |
| 20-jan-09 | NMF | 47,0 | 31,3 | 27,9 |
| 17-feb-09 | NMF | 20,5 | 48,4 | 27,4 |
| 17-mar-09 | NMF | 23,6 | 19,7 | 21,5 |
| 14-apr-09 | NMF | 41,8 | 46,8 | 31,7 |
| 12-mei-09 | NMF | 45,0 | 48,1 | 116,1 |
| 8-jul-08 | HF | 35,3 | 21,8 | 25,7 |
| 30-sep-08 | HF | 17,1 | 28,9 | 52,8 |
| 20-jan-09 | HF | 48,4 | 39,4 | 46,6 |
| 17-mar-09 | HF | 31,5 | 33,2 | 27,0 |
| <i>Gemiddeld per locatie</i> | | <i>36,1</i> | <i>39,3</i> | <i>46,9</i> |
| <i>Gemiddeld alle monsters</i> | | | | <i>40,6</i> |

Weergegeven zijn de aantallen fagen na concentratie uitgedrukt als percentage van de aantallen fagen voor concentratie.

* NMF = negatieve membraan filtratie, HF = hemoflow filtratie.

Bijlage 2 RNA-extractievolumes en -verduunningen in RT-PCR

| Locatie | Monsterdatum | HEV | | | | | | | | HPeV | | | | Totaal volume (ml)* | |
|-------------|--------------|-----|-----|-------|-----|--------|-----|--------|-----|------|-----|-------|-----|---------------------|-------|
| | | 1ml | | 0,1ml | | 0,05ml | | 0,01ml | | 1ml | | 0,1ml | | HEV | HPeV |
| | | onv | 10x | onv | 10x | onv | 10x | onv | 10x | onv | 10x | onv | 10x | | |
| Maas | 13-5-2008 | + | - | - | - | x | x | x | x | - | - | + | - | 186,6 | 186,6 |
| Maas | 10-6-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | + | + | + | - | 246,8 | 246,8 |
| Maas | 8-7-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | + | - | - | - | 104,5 | 104,5 |
| Maas | 8-7-2008 HF | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | - | - | 240,3 | 229,9 |
| Maas | 5-8-2008 | - | + | - | - | x | x | x | x | - | - | + | - | 268,9 | 268,9 |
| Maas | 2-9-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 330,8 | 330,8 |
| Maas | 30-9-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | + | - | + | - | 309,6 | 309,6 |
| Maas | 30-9-2008 HF | - | - | - | - | - | - | x | x | + | - | + | - | 448,6 | 429,1 |
| Maas | 28-10-2008 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | 287,6 | 272,8 |
| Maas | 25-11-2008 | - | - | - | + | + | - | - | - | - | - | + | - | 284,7 | 270,0 |
| Maas | 16-12-2008 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | 266,9 | 253,1 |
| Maas | 20-1-2009 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - | 476,1 | 451,5 |
| Maas | 20-1-2009 HF | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | + | - | 205,9 | 196,9 |
| Maas | 17-2-2009 | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | - | - | 319,1 | 305,2 |
| Maas | 17-3-2009 | - | - | - | - | - | - | x | x | + | - | + | - | 282,0 | 269,7 |
| Maas | 17-3-2009 HF | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 285,1 | 270,3 |
| Maas | 14-4-2009 | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | - | - | 270,8 | 259,0 |
| Maas | 12-5-2009 | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | + | - | 278,5 | 266,4 |
| Rijn | 13-5-2008 | - | - | + | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 173,0 | 173,0 |
| Rijn | 10-6-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 273,8 | 273,8 |
| Rijn | 8-7-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 312,5 | 312,5 |
| Rijn | 8-7-2008 HF | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 208,8 | 208,8 |
| Rijn | 5-8-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 333,7 | 333,7 |
| Rijn | 2-9-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 284,0 | 284,0 |
| Rijn | 30-9-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | + | - | 362,7 | 362,7 |
| Rijn | 30-9-2008 HF | - | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 424,0 | 402,0 |
| Rijn | 28-10-2008 | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | + | - | 238,6 | 228,2 |
| Rijn | 25-11-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | + | - | - | - | 325,1 | 325,1 |
| Rijn | 16-12-2008 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - | 276,3 | 262,0 |
| Rijn | 20-1-2009 | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | - | - | 256,1 | 244,9 |
| Rijn | 20-1-2009 HF | - | - | - | - | - | - | x | x | + | - | - | - | 159,1 | 152,2 |
| Rijn | 17-2-2009 | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | - | - | 277,7 | 265,6 |
| Rijn | 17-3-2009 | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | - | - | 278,6 | 266,5 |
| Rijn | 17-3-2009 HF | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 200,6 | 190,2 |
| Rijn | 14-4-2009 | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | - | - | 277,3 | 265,2 |
| Rijn | 12-5-2009 | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | - | - | 264,9 | 253,4 |
| Nieuwe Maas | 13-5-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 226,8 | 226,8 |
| Nieuwe Maas | 10-6-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 232,0 | 232,0 |
| Nieuwe Maas | 8-7-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 303,3 | 303,3 |
| Nieuwe Maas | 8-7-2008 HF | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 225,7 | 225,7 |
| Nieuwe Maas | 5-8-2008 | - | + | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 216,3 | 216,3 |
| Nieuwe Maas | 2-9-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 77,3 | 77,3 |
| Nieuwe Maas | 30-9-2008 | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 295,8 | 295,8 |
| Nieuwe Maas | 30-9-2008 HF | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 420,1 | 398,3 |
| Nieuwe Maas | 28-10-2008 | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | + | - | 306,6 | 293,3 |
| Nieuwe Maas | 25-11-2008 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 342,1 | 324,4 |
| Nieuwe Maas | 20-1-2009 | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 305,9 | 305,9 |
| Nieuwe Maas | 20-1-2009 HF | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 223,0 | 211,5 |
| Nieuwe Maas | 17-2-2009 | - | - | - | - | x | x | x | x | - | - | - | - | 166,2 | 166,2 |
| Nieuwe Maas | 17-3-2009 | - | - | - | - | - | - | x | x | - | - | - | - | 250,7 | 239,8 |
| Nieuwe Maas | 17-3-2009 HF | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 175,1 | 166,0 |
| Nieuwe Maas | 14-4-2009 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 280,9 | 268,7 |
| Nieuwe Maas | 12-5-2009 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 257,4 | 244,1 |

Weergegeven zijn de RNA extractie volumes (1, 0,1, 0,05 of 0,01ml concentraat) en de in de RT-PCR geteste RNA verduunningen: onv (=onverdund) of 10x. Negatief in RT-PCR = -, positief in RT-PCR = +, niet getest in RT-PCR = x. *Het omgerekende volume water monster dat getest is in RT-PCR. *Het totaal volume watermonster wat omgerekend getest was in de verschillende RT-PCR reacties.

RIVM

Rijksinstituut
voor Volksgezondheid
en Milieu

Postbus 1
3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl