

RIVM rapport 330250002/2006

**De microbiologische kwaliteit van het  
ingenomen en afgeleverde water van  
Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch  
in 2001**

A.M. de Roda Husman, H.A.M. Ketelaars<sup>1</sup>,  
W.J. Lodder, G.J. Medema<sup>2</sup>, F.M. Schets

1 Evides, Postbus 4472, 3006 AL Rotterdam

2 Kiwa Water Research, Postbus 1072, 3430 BB Nieuwegein

Contact:

A.M. de Roda Husman

Microbiologisch Laboratorium voor Gezondheidsbescherming

[am.de.roda.husman@rivm.nl](mailto:am.de.roda.husman@rivm.nl)

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch, in het kader van project 330250, Oppervlaktewater kwaliteit.

## Het rapport in het kort

### De microbiologische kwaliteit van het ingenomen en afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch in 2001

Om van het afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch (WBB) drinkwater te maken dat voldoet aan de eisen uit het Nederlands Waterleidingbesluit dienen de zuiveringsprocessen de aantallen *Campylobacter* met minimaal 6,5 tot 7,3 log<sub>10</sub>-eenheden en de aantallen reo- en enterovirussen met minimaal 2,8 tot 3,6 log<sub>10</sub> eenheden reduceren. Drinkwater dat aan deze eisen voldoet zal bij consumptie minder dan 1 infectie per 10.000 personen per jaar veroorzaken.

In 2001 is onderzoek gedaan naar het voorkomen van noro- en rotavirussen in zowel het ingenomen als het afgeleverde water van WBB en werden de aantallen kweekbare entero- en reovirussen in deze wateren bepaald. Tevens werden de aantallen *Campylobacter* in het afgeleverde water bepaald.

In het ingenomen water werden kweekbare reo- en enterovirussen in concentraties van 0,01 tot 1 virusdeeltje per liter aangetroffen. In het afgeleverde water werden eveneens kweekbare reo- en enterovirussen aangetoond, de gemiddelde concentratie bedroeg 0,001 tot 0,007 kweekbaar virusdeeltje per liter. De decimale reductie door de spaarbekkens van WBB bedroeg voor reovirussen 1,4 log<sub>10</sub>-eenheden en voor enterovirussen 2,1 log<sub>10</sub>-eenheden. Zowel in het ingenomen als in het afgeleverde water werd met moleculaire methoden geen RNA van rotavirussen aangetoond. Norovirus RNA werd zowel in enkele monsters van het ingenomen als van het afgeleverde water aangetroffen. De decimale reductie van norovirus RNA door de spaarbekkens bedroeg 0,6 log<sub>10</sub>-eenheden. *Campylobacter* werd aangetoond in 84 % van de monsters van het afgeleverde water, met een gemiddeld meest waarschijnlijk aantal van 6,9 bacteriën per liter.

Trefwoorden: drinkwater, waterkwaliteit, enterale virussen, *Campylobacter*, infectierisico

## Abstract

### **Microbiological quality of source water and water produced by Water storage company Brabantse Biesbosch in 2001**

Production of drinking water from the drinking water half-product produced by Water storage company Brabantse Biesbosch (WBB) to meet the requirements of the Dutch Drinking Water Act requires drinking water purification processes to reduce the number of *Campylobacter* by a minimum of 6.5 tot 7.3 log<sub>10</sub>-units and the number of culturable reo- and enteroviruses by a minimum of 2.8 tot 3.6 log<sub>10</sub>-units. Drinking water meeting these requirements is responsible for less than one infection in 10,000 persons per year.

In 2001 the occurrence of noro- and rotaviruses in both the source and the water produced by WBB was studied, whereas the number of culturable reo- and enteroviruses in these waters was determined. *Campylobacter* numbers were determined in the produced water.

The source water contained culturable reo- and enteroviruses in concentrations of 0.01 to 1 virus particle per litre. The water produced also contained culturable reo- and enteroviruses, with an average concentration was 0.001 to 0.007 culturable virus particles per litre. The decimal reduction caused by the WBB storage reservoirs was 1.4 log<sub>10</sub>-units for reoviruses and 2.1 log<sub>10</sub>-units for enteroviruses. Molecular methods did not detect rotavirus RNA in either the source water or the produced water. Norovirus RNA, however, was detected in several samples of source and produced water. The decimal reduction capacity of the WBB storage reservoirs for the norovirus RNA was 0.6 log<sub>10</sub>-units. *Campylobacter* was detected in 84 % of the samples of the produced water, the average most probable number was 6.9 per litre.

Keywords: drinking water, water quality, enteric viruses, *Campylobacter*, infection risk



# Inhoud

<b>Samenvatting</b>	<b>7</b>
<b>1. Inleiding</b>	<b>9</b>
1.1 Wetgeving	9
1.2 Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch	10
1.3 Doel van de studie	10
<b>2. Pathogene virussen</b>	<b>13</b>
2.1 Enterale virussen	13
2.2 Het vóórkomen van enterale virussen	14
2.3 Ziekte veroorzaakt door enterale virussen	14
2.4 Bronnen van humane virussen in oppervlaktewater	15
2.4.1 Rioolwater	15
2.4.2 Humane bronnen	16
2.4.3 Dierlijke bronnen	16
<b>3. <i>Campylobacter</i></b>	<b>17</b>
3.1 Het genus <i>Campylobacter</i>	17
3.2 Het vóórkomen van <i>Campylobacter</i>	17
3.3 Bronnen van <i>Campylobacter</i>	18
3.4 Detectie van <i>Campylobacter</i> in water	18
<b>4. Materiaal en methoden</b>	<b>19</b>
4.1 Locatie beschrijving	19
4.2 Monsterneming, bacteriologische en fysische analyses	20
4.3 Monsterneming ten behoeve van virusanalyses	21
4.4 Detectie van bacteriofagen en kweekbare virussen	21
4.5 Detectie van niet-kweekbare virussen	22
<b>5. Resultaten</b>	<b>23</b>
5.1 Bacteriën in het water van de Maas	23
5.2 Virussen in het water van de Maas	24
5.3 Bacteriofagen in het water van de Maas	24
5.4 Fysische en chemische parameters	26
5.5 Opbrengst van concentratie met tweestaps-filtratie	27
5.6 <i>Campylobacter</i> in het afgeleverde water	27
5.7 Virussen in het afgeleverde water	29
5.8 Virusreductie in de spaarbekkens van WBB	31
5.9 Vereiste verwijdering van pathogenen bij drinkwaterproductie uit afgeleverd water van WBB	32

---

<b>6. Discussie</b>	<b>35</b>
6.1 Kweekbare virussen in de Maas	35
6.2 Vergelijking van de metingen in 2001 met eerder onderzoek naar virussen in de Maas	35
6.3 Detectie van niet-kweekbare virussen in de Maas	36
6.4 Efficiëntie van directe en indirecte bepaling van bacteriofagen	36
6.5 Bacteriofagen als indicator voor humaan pathogene virussen in water	37
6.6 Virussen in het afgeleverde water	38
6.7 <i>Campylobacter</i> in het afgeleverde water	39
6.8 Vereiste verwijdering van virussen en <i>Campylobacter</i> in de zuivering	40
<b>7. Conclusies</b>	<b>41</b>
<b>8. Aanbevelingen</b>	<b>43</b>
<b>Literatuur</b>	<b>45</b>
<b>Bijlagen:</b>	
Bijlage 1 Directe bepaling van bacteriofagen in de Maas bij Keizersveer door RIVM	53
Bijlage 2 Directe bepaling van bacteriofagen in het afgeleverde water door RIVM	54
Bijlage 3 Directe bepaling van bacteriofagen in het afgeleverde water van WBB door Kiwa	55
Bijlage 4 Meest Waarschijnlijke Aantallen (MWA) <i>Campylobacter</i> in Maas, Biesbosch bekken en afgeleverd water van WBB in 1994	56
Bijlage 5 Indirecte bepaling van bacteriofagen en virussen in de Maas bij Keizersveer door RIVM	57
Bijlage 6 Indirecte bepaling van bacteriofagen en virussen in het afgeleverde water van WBB door RIVM	58
Bijlage 7 <i>Campylobacter</i> in het afgeleverde water van WBB in 1994 en 2001	59
Bijlage 8 Watervogels aanwezig op het spaarbekken Petrusplaat in 1994	60

## Samenvatting

In West-Europese landen, zoals Nederland, is het drinkwater over het algemeen van goede kwaliteit. Hoewel aandoeningen die wateroverdraagbaar zijn, zoals gastro-enteritis, geelzucht en hersenvliesontsteking, daadwerkelijk in Nederland voorkomen, is het onduidelijk of deze optreden als gevolg van drinkwaterconsumptie. In het Nederlandse Waterleidingbesluit dat op 9 februari 2001 van kracht werd zijn normen opgenomen voor fecale indicatorparameters. Bovendien moet door waterleidingbedrijven een risicoanalyse worden uitgevoerd wanneer drinkwater wordt geproduceerd van oppervlaktewater of grondwater van kwetsbare winningen. Voor de ziekteverwekkende micro-organismen *Cryptosporidium*, *Giardia* en (entero)virusen geldt dat het infectierisico kleiner dan 1 infectie per 10.000 personen per jaar dient te zijn. Doordat de concentraties van deze micro-organismen in het drinkwater erg laag zijn, zijn zij niet of nauwelijks rechtstreeks in het drinkwater aan te tonen. De drinkwaterkwaliteit wordt dan ook vastgesteld door bepaling van de microbiologische kwaliteit van de grondstof en de effectiviteit van de drinkwaterzuivering.

Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch (WBB) onttrekt water uit de Maas en slaat dat op in drie spaarbekkens; de gemiddelde verblijftijd in deze bekkens is bijna 6 maanden. Tijdens het verblijf in de spaarbekkens daalt het aantal micro-organismen in het water onder andere door sedimentatie en afsterving.

In 2001 is onderzoek gedaan naar het voorkomen van de in Nederland belangrijke gastro-enteritis verwekkende micro-organismen, noro- en rotavirussen, in zowel het ingenomen water als het afgeleverde water en *Campylobacter* in het afgeleverde water van WBB. De aantallen kweekbare entero- en reovirussen in het ingenomen water en het afgeleverde water van WBB werden bepaald om te komen tot een update van eerdere gegevens over deze pathogenen.

In het ingenomen water van WBB werden kweekbare reo- en enterovirussen in concentraties van 0,01 tot 1 virusdeeltje per liter aangetroffen. Deze concentraties zijn lager dan die in eerdere onderzoeksperioden in 1983, 1985, 1985 en 1994 werden aangetroffen. In het ingenomen water werd met moleculaire methoden geen RNA van rotavirussen aangetoond. RNA van norovirussen werd wel aangetoond. In één nader onderzocht monster bleek dit het type Grimsby te zijn. Dit type circuleerde in 2001 dominant in de Nederlandse populatie. In 62 % van de onderzochte monsters van het afgeleverde water van WBB werden kweekbare reovirussen met een gemiddelde concentratie van 0,007 kweekbaar virusdeeltje per liter aangetoond. Enterovirussen werden in 31 % van de monsters aangetroffen met een gemiddelde concentratie van 0,001 kweekbaar virusdeeltje per liter. In 31 % van de monsters afgeleverd water werd RNA van norovirussen aangetroffen, terwijl rotavirus RNA niet werd aangetroffen. De decimale reductie door de spaarbekkens van WBB bedroeg voor kweekbare reovirussen 1,4 log<sub>10</sub>-eenheden, voor kweekbare enterovirussen 2,1 log<sub>10</sub>-eenheden en voor norovirus RNA 0,6 log<sub>10</sub>-eenheden. *Campylobacter* werd aangetoond in 84 % van de onderzochte monsters van het afgeleverde water van WBB, met een gemiddeld meest waarschijnlijk aantal van 6,9 per liter.

Eveneens in 2001 uitgevoerd onderzoek naar de bruikbaarheid van bacteriofagen als indicator voor verwijdering van virussen toonde aan dat de aantallen bacteriofagen in concentraten van het ingenomen water van WBB noch significante correlatie vertoonden met de aantallen kweekbare entero- en reovirussen noch met de aantallen noro- of rotavirus PCR detecteerbare eenheden in deze concentraten. Somatische colifagen bleken de beste worst-case schatter voor virusverwijdering in de spaarbekkens van WBB, maar gebruik van deze fagen als indicator voor reductie van concentraties humaan pathogene virussen zou in de hier gerapporteerde studie hebben geleid tot een overschatting van de reductie.

Uit vergelijking van de aantallen bacteriofagen verkregen na concentratie door middel van twee opvolgende filtratiestappen (indirect) met de aantallen direct bepaalde bacteriofagen bleek dat bij hoge bacteriofaagconcentraties een hogere opbrengst verkregen wordt met de directe methode dan met de indirecte methode. Bij lage bacteriofaagconcentraties worden met de indirecte methode meer monsters positief gevonden. Voor somatische colifagen was de gemiddelde opbrengst van de indirecte methode 43 %, voor F-specifieke RNA fagen bedroeg de gemiddelde opbrengst 83 %.

Op basis van de verkregen meetgegevens werd berekend welke reductie door de zuiveringsprocessen nodig is om van het afgeleverde water van WBB drinkwater te maken dat voldoet aan de eisen uit het Waterleidingbesluit. Bij een reductie van 6,5 tot 7,3 log<sub>10</sub>-eenheden voor *Campylobacter* en een reductie van 2,8 tot 3,6 log<sub>10</sub>-eenheden voor reo- en enterovirussen zal drinkwater verkregen worden dat bij consumptie leidt tot minder dan 1 infectie per 10.000 personen per jaar.



# 1. Inleiding

Blootstelling aan ziekteverwekkende micro-organismen in water kan leiden tot infectie en mogelijk ziekte bij de mens, afhankelijk van diens immunestatus en genetische achtergrond. Virulentie en dosis van de ziekteverwekker spelen hierbij ook een rol. In West-Europese landen, zoals Nederland, is het drinkwater over het algemeen van goede kwaliteit. Voor de productie van drinkwater wordt vooral gebruik gemaakt van grondwater, maar voor een niet onaanzienlijk deel wordt ook oppervlaktewater als grondstof gebruikt. In oppervlaktewater zijn meer micro-organismen aanwezig dan in grondwater, waaronder ziekteverwekkende bacteriën, virussen en parasitaire protozoa die in de Nederlandse populatie en in de ons omringende landen circuleren. Verschillende bronnen, zoals bijvoorbeeld lozingen van al dan niet gezuiverd rioolwater, kunnen het oppervlaktewater microbiologisch verontreinigen. Ziekteverwekkende organismen die via water overgedragen kunnen worden zijn bijvoorbeeld *Salmonella*, *Campylobacter*, *E. coli* O157, *Cryptosporidium*, *Giardia* en diverse virussen, waaronder bijvoorbeeld het poliovirus. Het is onduidelijk of en hoeveel wateroverdraagbare aandoeningen in Nederland optreden door drinkwaterconsumptie, maar aandoeningen die wateroverdraagbaar zijn, zoals gastro-enteritis, geelzucht en hersenvliesontsteking, komen daadwerkelijk in Nederland voor. Calicivirussen (zowel noro- als sapovirussen), rotavirussen en *Campylobacter* behoren tot de drie belangrijkste gastro-enteritisverwekkers in Nederland (De Wit *et al.*, 2001a; 2001b).

## 1.1 Wetgeving

Eén van de belangrijkste bedreigingen voor de drinkwaterkwaliteit is de aanwezigheid van pathogene micro-organismen. De drinkwaterkwaliteit moet worden bewaakt aan de hand van indicatoren voor fecale verontreiniging. In de Europese richtlijn voor de kwaliteit van water ten behoeve van consumptie door de mens (98/83/EG) staat expliciet vermeld dat in het drinkwater geen ziekteverwekkers aanwezig mogen zijn in aantallen die een bedreiging vormen voor de volksgezondheid. In het Nederlandse Waterleidingbesluit dat op 9 februari 2001 van kracht werd staat dat de aantallen *Escherichia coli* en intestinale enterococci niet hoger mogen zijn dan 1 kolonievormende eenheid per 100 ml leidingwater. Bovendien moet door de waterleidingbedrijven een risicoanalyse worden uitgevoerd wanneer drinkwater wordt geproduceerd van oppervlaktewater of grondwater van kwetsbare winningen. De kwaliteit van het drinkwater moet voldoen aan een acceptabel infectierisico voor de consument. Voor de ziekteverwekkende micro-organismen *Cryptosporidium*, *Giardia* en (entero)virussen geldt dat het infectierisico kleiner dan 1 infectie per 10.000 personen per jaar dient te zijn. Vanwege de lage concentraties van deze micro-organismen in het drinkwater, waardoor zij niet of nauwelijks rechtstreeks in het drinkwater aan te tonen zijn, wordt de drinkwaterkwaliteit vastgesteld door de microbiologische kwaliteit van de grondstof en de effectiviteit van de drinkwaterzuivering te bepalen.

## 1.2 Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch

Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch (WBB) levert water aan Evides (voorheen Waterbedrijf Europoort (WBE) en DELTA Nutsbedrijven) en Brabant Water voor de productie van drinkwater en industriewater. WBB onttrekt water uit de Maas en slaat dat op in spaarbekkens. Door deze voorraadvorming kan inname uit de Maas gestaakt worden bij slechte kwaliteit van het rivierwater of te lage afvoer. Tijdens het verblijf in de spaarbekkens wordt tevens een bijdrage geleverd aan de verwijdering van micro-organismen en chemische stoffen. Dit geldt voor slibgebonden stoffen als polycyclische aromatische koolwaterstoffen (PAK's) en zware metalen, maar ook voor virussen uit rioolwater die slibgebonden zijn (Van Olphen *et al.*, 1992). Naast sedimentatie met slibdeeltjes treedt afsterving van micro-organismen op. De gemiddelde verblijftijd van het Maaswater in de drie Biesbosch bekkens is bijna 6 maanden. Gedurende deze verblijftijd verandert de waterkwaliteit als gevolg van biologische, fysische en chemische processen, zoals biologische afbraak van organische stoffen, nitrificatie, verdamping, sedimentatie, hydrolyse en fotolyse (Oskam, 1995). De mate van reductie van bacteriën in het spaarbekkensysteem is afhankelijk van het type bacterie. De hoogste decimale eliminatiecapaciteit werd gevonden voor bacteriën van de coligroep: deze varieerde van 2,2 tot 3,2  $\log_{10}$ -eenheden. Voor thermotolerante bacteriën van de coligroep varieerde de gemiddelde jaarlijkse verwijdering in de periode 1990-1997 van 2,1 tot 2,6  $\log_{10}$ -eenheden. De verwijderingscapaciteit voor fecale streptococci en sporen van sulfietreducerende Clostridia (SSRC) is lager. In bovengenoemde periode varieerde deze respectievelijk van 1,2 tot 1,9 en van 1,6 tot 1,9  $\log_{10}$ -eenheden. Voor de protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia* bedraagt de verwijdering door het spaarbekkensysteem respectievelijk 1,3 tot 1,6  $\log_{10}$ -eenheden en 0,8 tot 2,3  $\log_{10}$ -eenheden (Medema en Ketelaars, 1998). De grootste reductie wordt in het algemeen bereikt in de laatste twee bekkens (Honderd en Dertig, en Petrusplaat). Verklaringen hiervoor zijn de gedeeltelijke ontharding die bij de inlaat van de Petrusplaat plaatsvindt en het optreden van kortsluitstromen in het eerste bekken, De Gijster.

## 1.3 Doel van de studie

De onderhavige studie kende vier doelstellingen:

1. Onderzoek naar het voorkomen van de in Nederland belangrijke gastro-enteritis verwekkende micro-organismen, noro- en rotavirussen, in zowel het ingenomen water als het afgeleverde water en *Campylobacter* in het afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch (WBB) gedurende het jaar 2001.
2. Bepaling van de aantallen kweekbare ziekteverwekkende entero- en reovirussen in het ingenomen water en het afgeleverde water van WBB om te komen tot een update van de beschikbare gegevens omtrent deze pathogenen ten behoeve van berekeningen die in het kader van het nieuwe Waterleidingbesluit dienen te worden uitgevoerd.

3. Onderzoek naar de mogelijkheid om bacteriofagen als indicator voor verwijdering van virussen te gebruiken.
4. Onderzoek naar de opbrengst van de toegepaste virusconcentratiemethode door middel van twee opvolgende filtratiestappen, door de aantallen geconcentreerde bacteriofagen te vergelijken met de direct bepaalde aantallen.
5. Berekening van de benodigde reductie voor de toe te passen zuiveringsprocessen, om van het afgeleverde water van WBB betrouwbaar drinkwater te maken (i.e. voldoende aan de eis uit het Waterleidingbesluit van minder dan 1 infectie per 10.000 personen per jaar tengevolge van drinkwaterconsumptie).



## 2. Pathogene virussen

### 2.1 Enterale virussen

Enterale virussen worden met de feces uitgescheiden en overgedragen via de fecaal-orale transmissieroute. Indirect kan deze route via fecaal besmet riool- en oppervlaktewater verlopen. Wateroverdraagbare virussen zijn over het algemeen klein (ongeveer 30 nanometer) en hebben geen envelop om hun capsid. Hierdoor kunnen enterale virussen goed overleven in water. De virussen infecteren gastheercellen in het maag-darmstelsel na binding aan een specifieke receptor op het oppervlak van de cel. Na infectie kan het genetisch materiaal van het virus vermenigvuldigd worden in de aanwezigheid van gastheerfactoren. De nieuw gevormde virusdeeltjes worden vervolgens verpakt in de virale kapsels waarna de complete virusdeeltjes vrijkomen uit de gastheercel. Virusreproductie is gastheerspecifiek en gastheerafhankelijk; dit betekent dat deze virussen zich niet in water kunnen vermenigvuldigen. De enterale virussen (Tabel 1) die hier beschreven worden, infecteren humane cellen tenzij anders vermeld.

Tabel 1 Wateroverdraagbare enterale virussen

familie	genus	virus
<i>Picornaviridae</i>	enterovirus	poliomyelitis virus 1-3
		coxsackie virus A/ B
		ECHO virus
		enterovirus 70-71
		humaan enterovirus 68-71
<i>Reoviridae</i>	hepatovirus	hepatitis A virus (HAV)
	orthoreovirus	reovirus 1-3
	rotavirus	rotavirus A-C
<i>Caliciviridae</i>	sapovirus	Prototype Sapporo
	norovirus*	GGI prototype Norwalk
		GGII prototype Lordsdale
hepatitis E –like virussen		hepatitis E virus (HEV)
<i>Astroviridae</i>	astrovirus	humaan astrovirus (HAstV) 1-5
<i>Adenoviridae</i>	mastadenovirus	humaan adenovirus (HAdV) 1-47

\* voorheen Norwalk-achtige virussen of small round-structured virussen

## 2.2 Het vóórkomen van enterale virussen

Enterale virussen in water zijn afkomstig van feces van geïnfecteerde personen. De concentratie virussen in feces zal onder andere afhangen van de virulentie van de ziekteverwekker, de mate van afweer van de geïnfecteerde persoon en het stadium van de ziekte waarin de patiënt verkeert. Tijdens de piek van de infectie kunnen geïnfecteerde personen tot  $10^9$  virusdeeltjes per gram feces uitscheiden. Enterovirussen worden drie maanden na het begin van de infectie nog uitgescheiden (Chung *et al.*, 2001). Mensen kunnen ook hoge virusaantallen uitscheiden, bijvoorbeeld  $10^5$  norovirus-deeltjes per gram feces, terwijl zij zelf geen ziekteverschijnselen vertonen, de zogenaamde asymptomatisch verlopende virusinfecties (Marshall *et al.*, 2001). In tegenstelling tot respiratoire virussen, die de luchtwegen kunnen infecteren, zijn enterale virussen goed bestand tegen variaties in de pH en de temperatuur van het water (Schijven en Hassanizadeh, 2000). Door deze eigenschappen kunnen enterale virussen goed overleven in water en op voedingsmiddelen, vooral wanneer deze bij lage temperaturen en een gemiddelde luchtvochtigheid bewaard worden.

In de Verenigde Staten werden norovirussen aangemerkt als de belangrijkste ‘emerging’ virale voedselpathogenen van de afgelopen dertig jaar (Tauxe, 2002). De tot de *Caliciviridae* behorende norovirussen werden hierin op de voet gevolgd door rotavirussen, astrovirussen en hepatitis A virussen.

Enterale virussen komen wereldwijd voor, hoewel ze niet allemaal endemisch zijn in elke regio. Calicivirussen komen epidemisch voor door het optreden van explosies als gevolg van persoon-tot-persoon transmissie of via besmet voedsel. In Nederland vindt (her)introductie van hepatitis A virussen plaats doordat personen in het buitenland geïnfecteerd raken, maar niet ziek worden en vervolgens de infectie op gevoelige personen overdragen (Bruisten *et al.*, 2001). Enterovirussen circuleren gedurende het hele jaar in de populatie, met in de zomer pieken van ernstigere ziektegevallen (Schijven *et al.*, 1995). Rotavirus daarentegen laat een duidelijke winterpiek zien, terwijl gastro-enteritis veroorzaakt door enterale adenovirussen niet seizoensgebonden is.

## 2.3 Ziekte veroorzaakt door enterale virussen

Het merendeel van de humane enterale virussen veroorzaakt symptomen van gastro-enteritis, zoals diarree, braken en koorts (Tabel 2). Wateroverdraagbare entero- en reovirussen kunnen ook ernstigere klachten veroorzaken waaronder hersenvliesontsteking (Johansson *et al.*, 1996; Hauri *et al.*, 2005). De enterale hepatitis A, E of F virussen veroorzaken geelzucht (Koff, 1998), terwijl de poliovirustypen 1 tot en met 3 kinderverlamming kunnen veroorzaken (Pöyry *et al.*, 1988). Infectie met adenovirussen kan leiden tot gastro-enteritis, maar ook tot conjunctivitis en/of faryngitis (Russell, 1991).

Er zijn talloze explosies van virale gastro-enteritis en hepatitis geassocieerd met blootstelling aan fecaal besmette schelpdieren of fecaal besmet drinkwater of recreatiewater beschreven

(Hejkal *et al.*, 1982; Kaplan *et al.*, 1982; Xu *et al.*, 1992; Beller *et al.*, 1997; Brugha *et al.*, 1999; Kukkula *et al.*, 1999; Hafliger *et al.*, 2000; Sundkvist *et al.*, 2000). In Finland en Denemarken wordt het aandeel explosies van gastro-enteritis dat water gerelateerd is geschat op 25 % (Miettinen *et al.*, 2001). In Nederland is vooralsnog onbekend welk deel van de explosies van gastro-enteritis wordt veroorzaakt door blootstelling aan humaan pathogene virussen in water. Het is wel duidelijk dat elk jaar vier miljoen gevallen van gastro-enteritis optreden (De Wit *et al.*, 2001a). Deze gevallen zouden het gevolg kunnen zijn van persoon-tot-persoon transmissie, zoönotische transmissie of transmissie via voedsel en water. Jaarlijks bezoeken ongeveer 200.000 personen hun huisarts voor gastro-enteritis klachten (De Wit *et al.*, 2001b).

*Tabel 2 Wateroverdraagbare virale aandoeningen en hun verwekkers*

<b>aandoening</b>	<b>virale ziekteverwekker</b>
meningitis	coxsackievirussen ECHO virussen poliovirussen 1-3 reovirussen
gastro-enteritis	calicivirussen rotavirussen enterovirussen adenovirussen astrovirussen
kinderverlamming	poliovirussen 1-3
conjunctivitis	adenovirussen ECHO virussen
geelzucht	hepatitis A virussen hepatitis E-achtige virussen

## **2.4 Bronnen van humane virussen in oppervlaktewater**

### **2.4.1 Rioolwater**

Oppervlaktewater kan op uiteenlopende wijzen besmet raken met ziekteverwekkende micro-organismen zoals enterale virussen en bacteriën. De belangrijkste verontreinigingsbron is ongezuiverd rioolwater dat in binnen- en buitenland op het oppervlaktewater wordt geloosd (Puig *et al.*, 1994; Lodder *et al.*, 1999; Schvoerer *et al.*, 2001). Overstorten van ongezuiverd rioolwater, bij extreme belasting van rioolwaterzuiveringsinstallaties door hevige regenval of grote hoeveelheden smeltwater, spelen hierbij een belangrijke rol. Zuivering van rioolwater door rioolwaterzuiveringsinstallaties zal de concentraties pathogene micro-organismen

verlagen. Echter, deze zuiveringen zijn veelal niet gedimensioneerd voor het verwijderen van virussen (Van den Berg *et al.*, 2005). De zuiveringsefficiëntie van rioolwaterzuiveringsprocessen is voor virussen niet hoog, variërend van 1 tot 2 log<sub>10</sub>-eenheden. Hierdoor leiden ook lozingen van gezuiverd rioolwater tot een verhoogde virale belasting van het oppervlaktewater (Schvoerer *et al.*, 2001; Lodder en de Roda Husman, 2005).

In Nederland zijn in opdracht van het ministerie van VROM in 2000 risicovolle riooloverstorten in relatie tot dier- en volksgezondheid geïnventariseerd (FWVO rapport 00.04). Acht risicovolle riooloverstorten in het Maasstroomgebied lozen nabij Willemstad (1), Moerdijk (1), Oud-Beijerland (1), Middelharnis (1), Hellevoetsluis (3) en Goedereede (1) (in)direct op het Haringvliet. In de ons omringende landen wordt ook gezuiverd en veelal ongezuiverd rioolwater op de oppervlaktewateren geloosd. Dit water bereikt via de grote rivieren ons land. Import uit het buitenland werd in eerdere studies gekenmerkt als één van de meest significante bronnen voor enterovirussen in rivierwater (Schijven *et al.*, 1995; Hoogenboezem *et al.*, 2001).

#### **2.4.2 Humane bronnen**

Andere bronnen voor microbiologische verontreiniging van oppervlaktewater zijn lozingen van ongezuiverd rioolwater door de beroepsvaart, de pleziervaart en woonboten. Directe fecale besmettingen kunnen ook optreden door zogenaamde 'accidental fecal releases' van geïnfecteerde waterrecreanten en watersporters, die hierdoor bijdragen aan de vervuiling van oppervlaktewater met zwemwaterfunctie en/of als bron voor drinkwaterproductie.

#### **2.4.3 Dierlijke bronnen**

Virale besmetting van oppervlaktewater kan ook van dierlijke oorsprong zijn, bijvoorbeeld door afspoeling van mest (Hoogenboezem *et al.*, 2001). Recent is aangetoond dat landbouwhuisdieren, zoals varkens en runderen, geïnfecteerd kunnen zijn met norovirussen of andere enterale virussen. Het RNA van norovirussen gevonden bij varkens vertoonde grotere overeenkomsten met het RNA van humane norovirussen dan met RNA van norovirussen gevonden bij runderen (Van der Poel *et al.*, 2000). Zoönotische transmissie, de overdracht van dier naar mens, hoewel niet bewezen, wordt waarschijnlijker naarmate de virussequenties meer op elkaar lijken (Dastjerdi *et al.*, 1999). RNA-sequenties van hepatitis E virus (HEV) aangetoond bij varkens, bleken nauw verwant te zijn aan RNA-sequenties van HEV afkomstig van geïnfecteerde personen (Van der Poel *et al.*, 2001). Bovendien werden in deze studie op 22 % van de varkensbedrijven in Nederland HEV-sequenties aangetoond in gepoolde fecesmonsters. Deze animale virussen zouden door afspoeling van mest in het oppervlaktewater terecht kunnen komen van waaruit ze de mens zouden kunnen infecteren. Naast landbouwhuisdieren kunnen ook kleine huisdieren en wild, zoals herten en watervogels, het oppervlaktewater fecaal besmetten. Infecties met calicivirussen zijn aangetoond in kat, hond, konijn, nerts en zeeleeuw (Smith *et al.*, 1998). Het feline calicivirus is aangetroffen in een hond met diarree (Pratelli *et al.*, 2000), maar verder is nog onbekend of deze animale virussen andere dieren of zelfs de mens kunnen infecteren.



### 3. *Campylobacter*

#### 3.1 Het genus *Campylobacter*

*Campylobacter* bacteriën zijn gram-negatief, oxidase positief en spiraalvormig. Ze zijn 0,2-0,8 µm breed en 0,5-5 µm lang en bezitten een polaire flagel, die zorgt voor een karakteristieke kurkentrekkerachtige beweging. *Campylobacter* is micro-aërofiel en kan alleen groeien bij een verlaagde zuurstofspanning van 3-5 % en een verhoogde CO<sub>2</sub>-spanning van 3-15 %. Voor thermofiele *Campylobacter* soorten ligt de optimale groeitemperatuur tussen 37 °C en 42 °C, met als absolute grenzen 30 °C tot 45 °C. Overleving is mogelijk bij lagere dan wel hogere temperaturen en is langer bij koelkasttemperatuur (circa 4 °C) dan bij kamertemperatuur (circa 20 °C). Belangrijk daarbij is de gevoeligheid van *Campylobacter* voor uitdroging en voor invloeden van lucht (onder andere zuurstof-radicalen) en licht. Op dit moment omvat het genus *Campylobacter* 16 species (Logan *et al.*, 2000; Vandamme, 2000; Lawson *et al.*, 2001). De voor de mens meest relevante pathogene species zijn *C. jejuni*, *C. coli*, *C. lari* en *C. upsaliensis*. Deze species behoren tot de groep thermofiele *Campylobacter* soorten (Vandamme en de Ley, 1991). De overige species, mogelijk met uitzondering van *C. helveticus*, spelen in Westerse landen geen rol van betekenis als ziekteverwekker bij de mens.

#### 3.2 Het vóórkomen van *Campylobacter*

Infecties met bacteriën van het geslacht *Campylobacter* vormen een belangrijk volksgezondheidsprobleem in Nederland. Jaarlijks leiden deze infecties tot circa honderdduizend gevallen van gastro-enteritis, waarvan ruim 23.000 patiënten de huisarts bezoeken en enkele tientallen overlijden (Havelaar *et al.*, 2000; Havelaar, 2001). Daarnaast treden er als gevolg van *Campylobacter* infecties ongeveer zestig gevallen van het Guillain-Barré syndroom, een neurologische aandoening, (Van Koningsveld *et al.*, 2000) en enkele duizenden gevallen van reactieve artritis op. In Nederland zijn thermofiele *Campylobacter* soorten de meest frequent gevonden bacteriële veroorzakers van acute gastro-enteritis (De Wit *et al.*, 2001a; De Wit *et al.*, 2001b; Van Pelt en Valkenburgh, 2001). De hoogste incidentie wordt gezien in de stedelijke omgeving, in de zomerperiode, bij kinderen jonger dan vijf jaar, evenals bij jongvolwassenen (voornamelijk vrouwen). Explosies van *Campylobacter* infecties treden in Nederland zelden op (vijf explosies tussen 1997 en 2000), het merendeel van de infecties is sporadisch (Van Duynhoven *et al.*, 2000; Havelaar *et al.*, 2000).

*Campylobacter* komt voor in oppervlaktewater wat gebruikt wordt voor recreatie en drinkwaterproductie. Er zijn grote verschillen in de aantallen die van locatie tot locatie

worden gemeten, variërend van enkele tienden tot enkele honderden MWA (Meest Waarschijnlijke Aantal) per 100 milliliter. Bovendien is er een sterke seizoensvariatie waarbij de concentraties in de lente en zomer een factor 10 lager liggen dan in de herfst en winter (Havelaar, 2001; Schijven, 2003). In de winter van 1990 detecteerden Medema en Schets (1994) in water uit terugwinreservoirs na duininfiltratie en open spaarbekkens *Campylobacter* in concentraties van respectievelijk 4 tot 460 en 2 tot 110 MWA per liter. Typering van isolaten uit water en vogelfeces toonde aan dat de reservoirs en bekkens worden besmet door de in de winterperiode in grote getale aanwezige vogels.

### 3.3 Bronnen van *Campylobacter*

Zowel (landbouw-)huisdieren als in het wild levende dieren, zijn de belangrijkste reservoirs van *Campylobacter*. *Campylobacter* komt veel in kippen en watervogels voor, maar ook in varkens, runderen en katten en honden. *C. lari* is gerelateerd aan fecale besmetting afkomstig van meeuwen, *C. upsaliensis* aan besmetting van honden en *C. helveticus* wordt voornamelijk beschreven in associatie met katten. Vanuit deze reservoirs vindt een permanente besmetting van het milieu, de directe leefomgeving en het voedsel van de mens plaats. Een voorlopige schatting, gebaseerd op beperkte Nederlandse gegevens en extrapolatie van buitenlandse gegevens, suggereert dat kippenvlees verantwoordelijk is voor maximaal 40 % van alle humane gevallen van campylobacteriose (Havelaar, 2002). Andere geïdentificeerde risicofactoren zijn vlees van de barbecue (10 %), rauwe melk (10 %), contact met jonge honden (10-20 %), besmet oppervlaktewater (10 %) en buitenlandse reizen (10-20 %). In Nederland speelt consumptie van drinkwater geen rol van betekenis in de epidemiologie van *Campylobacter* (Schijven, 2003)

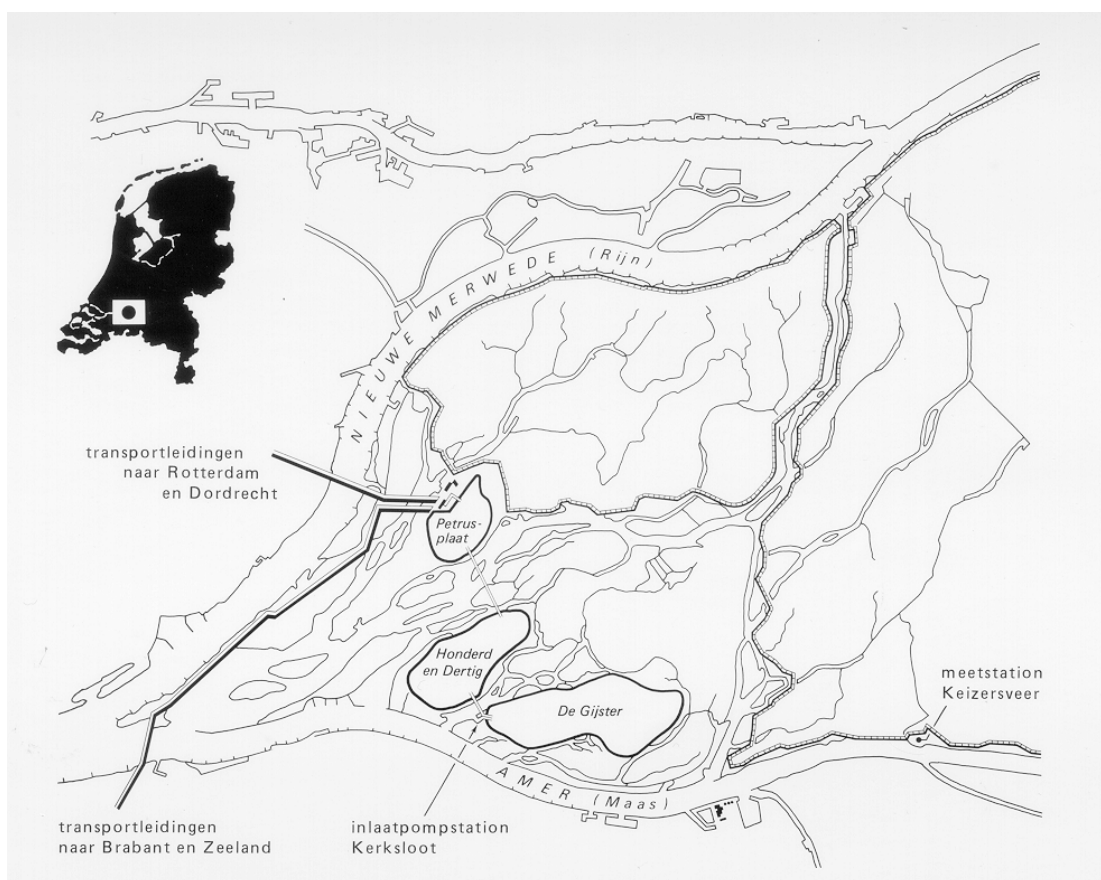
### 3.4 Detectie van *Campylobacter* in water

Het aantonen van *Campylobacter* in water vereist selectieve ophoping, al dan niet voorafgegaan door concentratie. Concentratie door middel van membraanfiltratie van het water door een filter met poriën van 0,2 µm wordt gevolgd door ophoping in een vloeibaar medium. Ophoping resulteert in kwalitatieve bevindingen (aantonen van aan- of afwezigheid). Door gebruik te maken van de methode van het Meest Waarschijnlijke Aantal (MWA) kunnen kwantitatieve gegevens worden afgeleid. De theoretische detectiegrens voor een ophoping is 1 kweekbare *Campylobacter* bacterie per onderzochte hoeveelheid monstermateriaal. Onderscheid tussen verschillende species kan worden gemaakt op grond van biochemische (fenotypische) eigenschappen, eiwitprofielen, vetzuursamenstelling en op genotypische eigenschappen (DNA/ RNA samenstelling). Nadelig bij testen op basis van fenotypische eigenschappen, zoals serotypering en faagtypering, is de geringe groeisnelheid van *Campylobacter*. Hierdoor wordt niet altijd een betrouwbaar resultaat verkregen en is het maken van onderscheid tussen species lastig.

## 4. Materiaal en methoden

### 4.1 Locatie beschrijving

Het WBB onttrekt water uit de Maas voor opslag in het open voorraadbekken De Gijster (Figuur 1). Dit bekken van 320 ha heeft een inhoud van  $40 \times 10^6 \text{ m}^3$ ; ten tijde van het onderzoek bedroeg de gemiddelde verblijftijd van het water 12 weken. Vanuit De Gijster wordt het water naar het procesbekken Honderd en Dertig gepompt; dit bekken is 219 ha groot en heeft een inhoud van  $33 \times 10^6 \text{ m}^3$ . Het water verblijft gemiddeld 10 weken in dit bekken. Tot slot wordt het water naar het tweede procesbekken, Petrusplaat, gepompt. In de inlaat van dit bekken wordt calciumhydroxide voor ontharding van het water gedoseerd (tot 1,5 mmol per liter). Gemiddeld verblijft het water 4 weken in dit kleinste (105 ha; inhoud  $13 \times 10^6 \text{ m}^3$ ) en laatste bekken. In de bekkens vindt homogenisatie van het water plaats met behulp van verschillende luchtinjectie-eenheden die op de bodem van elk van de bekkens aanwezig zijn. Indien nodig wordt het af te leveren water voor transport naar Evides (voorheen WBE en DELTA Nutsbedrijven) en Brabant Water op pH 9 gebracht. Jaarlijks wordt circa  $170 \times 10^6 \text{ m}^3$  water aan Evides en  $6 \times 10^6 \text{ m}^3$  water aan Brabant Water geleverd.



Figuur 1 Spaarbekkens van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch

## 4.2 Monsterneming, bacteriologische en fysische analyses

Monsterneming van het afgeleverde water vond plaats uit het laatste spaarbekken, Petrusplaat, en werd uitgevoerd volgens NEN 6559 (Anonymous, 1992) en NPR 6600 (Anonymous, 1993). In de periode van 31 januari tot 17 december 2001 werden wekelijks monsters genomen. De troebelheid en de temperatuur van het water werden gemeten. Bacteriologische analyses werden uitgevoerd door Kiwa Water Research. Het aantal *Escherichia coli* werd bepaald volgens NEN 6261 (Anonymous, 1990), het aantal fecale streptococci volgens NEN 6274 (Anonymous, 1995a) en voor bepaling van het aantal sporen van sulfiet-reducerende Clostridia (SSRC) werd de in de NEN 6567 (Anonymous, 1985) beschreven procedure gevolgd. Voor bepaling van (sporen van) *Clostridium perfringens* werd de door Bisson en Cabelli (1979) beschreven methode, die gebruik maakt van MCP-agar, toegepast. Onderzoek naar de aanwezigheid van *Campylobacter* werd uitgevoerd conform NEN 6269 (Anonymous, 1996). De monsters werden door WBB genomen en gekoeld bij 4 °C naar Kiwa getransporteerd. In de periode van januari tot juni 2001 zijn monsters van 4 liter genomen, in de zomerperiode, toen bleek dat de concentraties *Campylobacter* lager werden, zijn monsters van 7-12 liter genomen. Alle monsters werden onderzocht met behulp van een Meest Waarschijnlijke Aantal (MWA) methode. Van januari tot juni zijn volumes van 1000 ml, 100 ml en 10 ml in drievoud ingezet, op 29 juni werd 3x 2000 ml, 3x 200 ml en 3x 20 ml onderzocht en vervolgens tot 14 september 5x 2000 ml, 5x 200 ml en 5x 20 ml. Hierna zijn vijfvoudige MWA reeksen van 1000 ml, 100 ml en 10 ml ingezet. Karakteristieke kolonies op het isolatiemedium Karmali agar werden met behulp van fasecontrast microscopie en een latex agglutinatie test (Oxoid DR150M, Basingstoke, Engeland) bevestigd. Met deze methode wordt een schatting van het meest waarschijnlijke aantal thermofiele *Campylobacter* in een monster water verkregen. De methode maakt geen onderscheid tussen de verschillende *Campylobacter* soorten (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. upsaliensis*, *C. lari*) die tot deze groep behoren.

In één week in maart en één week in december is elke dag zowel om 9.00 uur als om 13.00 uur een monster van 4 liter genomen waarin de concentratie *Campylobacter* werd bepaald. Op deze manier kon de variatie in de concentratie binnen één dag en tussen dagen onderzocht worden. Op de gemeten concentraties is een log-transformatie toegepast om normaliteit te benaderen. De nulhypothese “er is geen verschil binnen de dagen” is met behulp van een variantie-analyse (Microsoft Excel) getoetst.



*Figuur 2 Bemonstering van het afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch bij spaarbekken 'Petrusplaat'*

### **4.3 Monsterneming ten behoeve van virusanalyses**

Het water uit de Maas bij Keizersveer werd in 2001 tweewekelijks en het afgeleverde water van WBB (Petrusplaat) vierwekelijks bemonsterd door het RIVM (Figuur 2) volgens een intern RIVM voorschrift (SOP MGB/ M157). Ter plaatse werden 300 liter Maaswater en 600 liter afgeleverd water gefiltreerd met behulp van een conventionele filter adsorptie-elutiemethode (Van Olphen *et al.*, 1984; Rutjes en de Roda Husman, 2004). Het verkregen eluaat (circa 1200 ml) werd gesplitst ten behoeve van detectie van kweekbare en niet-kweekbare virussen. Een klein volume water (circa 100 ml) werd bemonsterd voor de directe detectie van somatische colifagen en F-specifieke bacteriofagen.

### **4.4 Detectie van bacteriofagen en kweekbare virussen**

Directe detectie van bacteriofagen vond plaats in monstervolumes van 20 tot 100 ml water. Voor de detectie van F-specifieke bacteriofagen werd de gastheer WG49 gebruikt. Dit is een *Salmonella typhimurium* mutant met een lage pathogeniciteit waarin, kunstmatig de F-pilli tot expressie worden gebracht. De bepaling werd uitgevoerd volgens ISO 10705-1 (Anonymous,

1995b), zonder toevoeging van RNase. Voor de detectie van somatische colifagen werd als gastheer *Escherichia coli* CN (WG5) gebruikt. Deze bepaling werd uitgevoerd volgens ISO 10705-2 (Anonymous, 2000).

Voor de detectie van lage concentraties bacteriofagen en kweekbare enterovirussen werd het verkregen eluaat (zie boven) met behulp van ultrafiltratie verder geconcentreerd (Rutjes en de Roda Husman, 2004). Detectie van het aantal bacteriofagen in het na deze stap verkregen concentraat vond plaats zoals hierboven beschreven. Ten behoeve van het aantonen van kweekbare enterovirussen in dit concentraat werd een deel van dit concentraat op een cellijn geënt die geschikt is voor het kweken van enterovirussen: de Buffalo Green Monkey nierepitheel cellijn (Dahling en Wright, 1986). De gevolgde procedure is beschreven door Rutjes en de Roda Husman (2004). Uit het geanalyseerde volume en het aantal getelde virusplaques werd de virusconcentratie in het monster berekend. De gemiddelde virusconcentraties werden gewogen berekend. De opbrengst van de concentratiemethode werd weergegeven als rekenkundig gemiddelde.

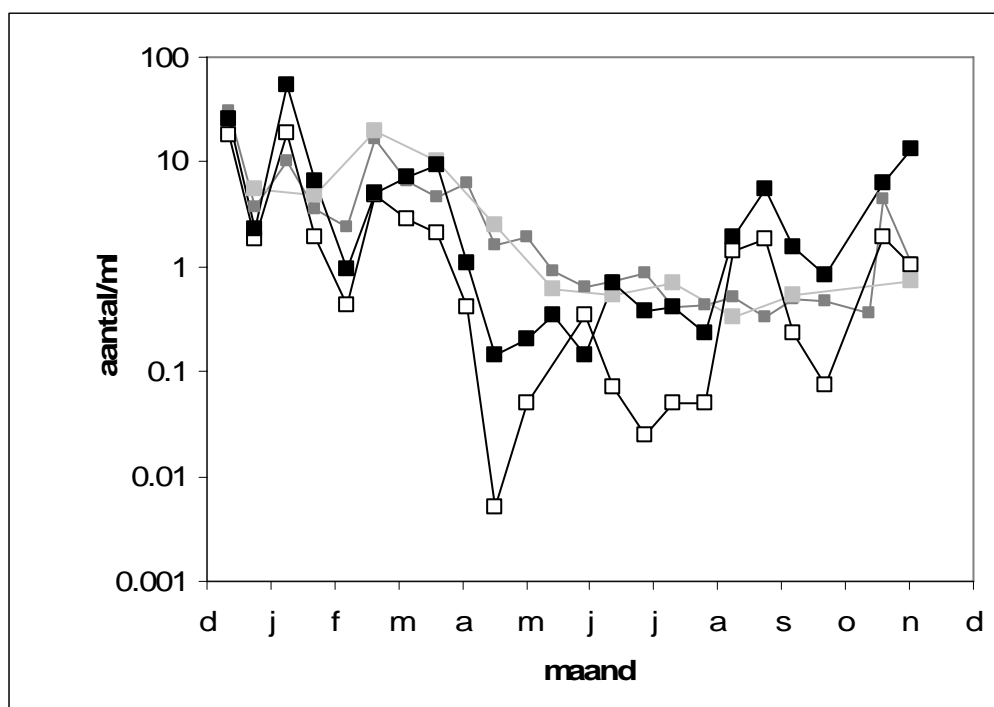
## 4.5 Detectie van niet-kweekbare virussen

Voor niet-kweekbare virussen, zoals norovirussen, en moeilijk kweekbare virussen, zoals rotavirussen, berustte de detectie op de polymerase kettingreactie (polymerase chain reaction: PCR). Ten behoeve van deze detectiemethode werd de ultrafiltratie stap vervangen door een concentratie met behulp van een gemodificeerde twee-fasenscheiding (Pöyry *et al.*, 1988; Lodder *et al.*, 1999). De procedure voor RNA-isolatie uit dit concentraat is beschreven door Rutjes en de Roda Husman (2004). Zij beschreven eveneens de semi-kwantitatieve RT-PCR die werd uitgevoerd voor detectie van enterovirussen, alsmede de procedure voor detectie van RT-PCR producten. Voor detectie van norovirus werd gebruik gemaakt van primers en probes beschreven door Vinje *et al.* (1997) en Vennema *et al.* (2002), terwijl voor de detectie van rotavirus de primers en probes beschreven door Husain *et al.* (1995) werden gebruikt. Virusconcentraties werden berekend door de aan- of afwezigheid van viraal RNA te bepalen in tienvoudige verdunningsreeksen van het RNA. De gemiddelde virusconcentraties werden gewogen berekend, waarbij de negatieve monsters als nul werden meegenomen. De aangetoonde virussen werden getypeerd door sequentie-analyse van de PCR-producten. Na elektroforese op een 2 % agarose-gel en hybridisatie met een virus-specifieke probe werden de PCR-producten uitgesneden en vervolgens gezuiverd met behulp van de Qiaquick gel-extractie kit (Qiagen, Hilden, Duitsland). Na klonering in een TA-vector werden de geregenereerde PCR-producten van minimaal 5 klonen gezuiverd. Deze werden onderworpen aan sequentie-analyse met een BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer). De DNA-sequenties werden bewerkt met SeqEd (V1.03, Applied Biosystems). Nucleotide-sequenties werden geanalyseerd met behulp van Geneworks (V2.5, Intelligenetics, CA) en het Treecon software pakket. Fylogenetische bomen werden geconstrueerd met de Neighbour-Joining methode en betrouwbaarheidsintervallen werden bepaald door middel van herhaalde analyses (100 rondes).

## 5. Resultaten

### 5.1 Bacteriën in het water van de Maas

De concentraties thermotolerante bacteriën van de coligroep, fecale streptococci en *Clostridium perfringens* in het inname water werden tweewekelijkse bepaald, terwijl de concentraties SSRC met een vierwekelijkse frequentie werden vastgesteld. In de zomerperiode van 2001, globaal van mei tot en met september, werden veel lagere concentraties van bovengenoemde bacteriën aangetroffen dan in de koudere maanden (oktober tot en met april) van het jaar (Figuur 3). De gemiddelde concentraties thermotolerante bacteriën van de coligroep en fecale streptococci waren respectievelijk 6,3 (range 0,15-55,2) en 2,6 (range <0,005-18,9) kolonie-vormende eenheden (kve) per milliliter, terwijl voor *C. perfringens* een gemiddelde van 4,2 (range 0,3-30,5) kve per milliliter werd gevonden. In 2001 was de gemiddelde concentratie sporen van sulfiet-reducerende Clostridia in de Maas bij Keizersveer 4,2 (range 0,3-19,7) kve per milliliter.

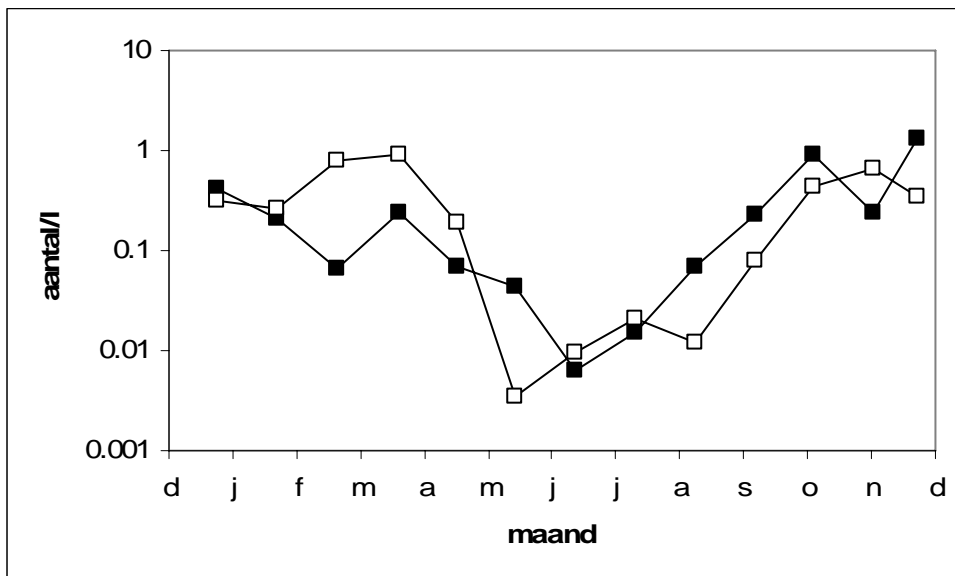


Figuur 3 Concentraties bacteriën in het door Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch in 2001 ingenomen water uit de Maas. ■ Thermotolerante bacteriën van de coligroep; □ Fecale streptococci; ■ Sporen van sulfiet-reducerende clostridia; ■ *Clostridium perfringens*

## 5.2 Virussen in het water van de Maas

De Maas werd in 2001 vierwekelijks bemonsterd. In elk van de dertien monsters water werden enterovirussen en reovirussen aangetroffen (Bijlage 5). De gemiddelde concentratie enterovirussen in het Maaswater bedroeg 0,2 (range 0,003-0,9) plaque-vormende deeltjes (pvd) per liter, de gewogen gemiddelde concentratie reovirussen bedroeg 0,2 (range 0,006-1,3) pvd per liter (Figuur 4). De maximale concentraties enterovirussen en reovirussen in de grondstof bedroegen respectievelijk 0,9 en 1,3 pvd per liter.

Rotavirus RNA werd in 2001 niet aangetoond in het water van de Maas. In vijf van de dertien monsters werd wel RNA van norovirussen aangetoond (Bijlage 5). De norovirus RNA positieve monsters uit de Maas werden genomen in januari, mei, oktober en november van 2001. De gemiddelde concentratie norovirussen was 0,06 PCR detecteerbare eenheden (pde) per liter met een maximum van 16 pde per liter. Voor het Maaswater bemonsterd op 26 november 2001 bij Keizersveer is sequentie-analyse van gekloneerde PCR-producten uitgevoerd. De gevonden norovirus-sequentie vertoonde geen overeenkomsten met de positieve controles van het norovirus-type Girlington, Mexico en WhiteRose, maar vertoonde wel overeenkomsten met het norovirus-type Grimsby (data niet getoond).



Figuur 4 Infectieuze virussen in het door Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch in 2001 ingenomen water uit de Maas. ■ reovirussen; □ enterovirussen.

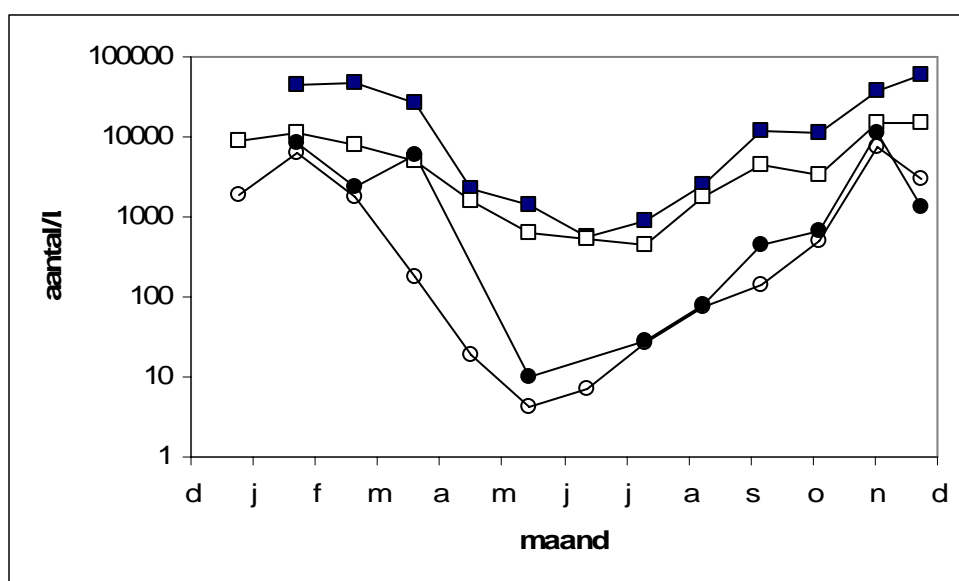
## 5.3 Bacteriofagen in het water van de Maas

Om de mogelijke relatie met pathogene virussen te onderzoeken werden de aantallen bacteriofagen vierwekelijks in het Maaswater bij Keizersveer bepaald. In elk van de dertien

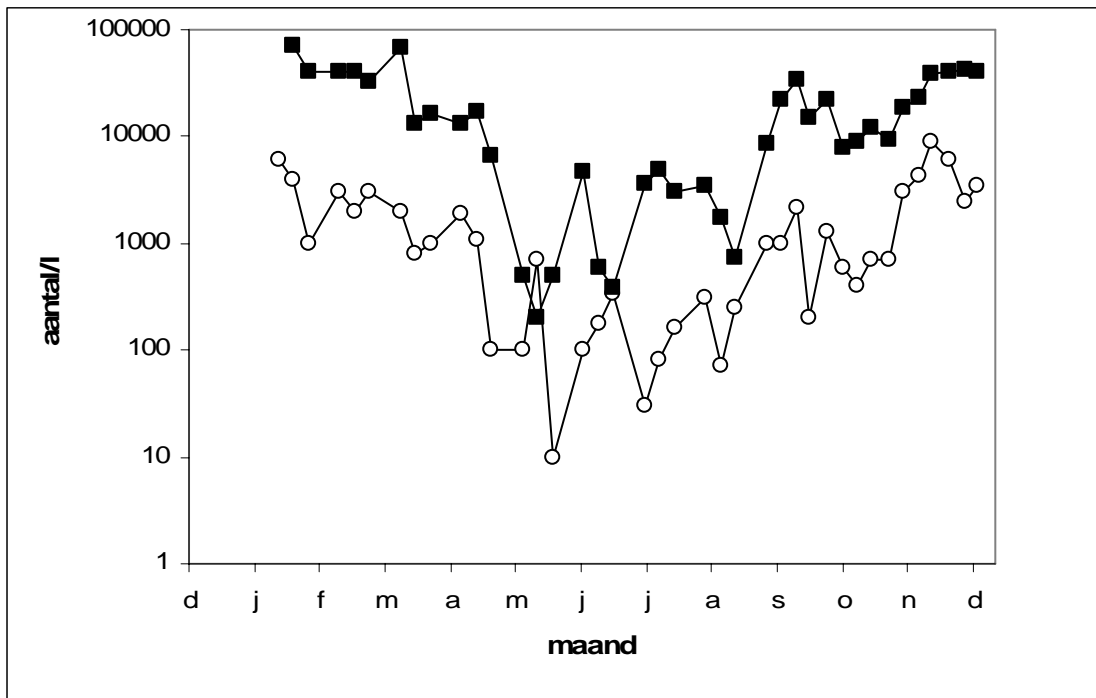


waterconcentraten werden somatische colifagen en F-specifieke fagen aangetoond (Figuur 5). De meetgegevens zijn opgenomen in Bijlage 4. De gemiddelde concentratie somatische colifagen was  $1,18 \times 10^3$  pvd per liter, met een maximum van  $1,53 \times 10^4$  pvd per liter. De gemiddelde concentratie F-specifieke fagen bedroeg 37 pvd per liter, met een maximum van  $7,38 \times 10^3$  pvd per liter.

Kiwa bepaalde in 2001 wekelijks het aantal somatische colifagen en het aantal F-specifieke fagen in het water van de Maas bij Keizersveer (Figuur 6); deze meetgegevens zijn opgenomen in Bijlage 3.



*Figuur 5 Somatische colifagen (vierkantjes) en F-specifieke fagen (bolletjes) in het water van de Maas bij Keizersveer, vierwekelijks gemeten door RIVM. Dichte symbolen geven de direct bepaalde aantallen weer, open symbolen geven de aantallen bepaald na concentratie (indirect) weer.*



Figuur 6 Somatische colifagen (■) en F-specifieke fagen (○) in het water van de Maas bij Keizersveer, wekelijks gemeten door Kiwa Water Research.

## 5.4 Fysische en chemische parameters

De gemiddelde watertemperatuur in de Maas bij Keizersveer in 2001 was 13,4 °C, met een minimum van 4,4 °C in januari en een maximum van 23,2 °C eind juli. De watertemperatuur was significant negatief gecorreleerd met de concentraties somatische colifagen ( $p < 0,0001$ ) en F-specifieke fagen ( $p < 0,01$ ), zowel direct bepaald als in concentraat. Ook de concentraties enterovirussen waren significant negatief gecorreleerd met de watertemperatuur ( $p < 0,05$ ). Een dergelijke negatieve correlatie werd niet waargenomen voor de watertemperatuur en de aanwezigheid van reovirussen en norovirussen.

De troebelheid van het water varieerde gedurende het jaar tussen 0,6 en 96,2 FTU (Formazine Turbidity Units), met een gemiddelde van 11,5 FTU. De troebelheid was significant gecorreleerd met de direct bepaalde concentratie somatische colifagen ( $p < 0,05$ ). Voor de F-specifieke fagen was er noch bij directe bepaling noch bij toepassing van de indirecte methode een significante correlatie met de troebelheid. De concentraties enterovirussen waren significant gecorreleerd met de troebelheid ( $p < 0,001$ ), voor reo- en norovirussen gold dit niet.

## 5.5 Opbrengst van concentratie met tweestaps-filtratie

Om de opbrengst van de concentratiemethode met behulp van tweestaps-filtratie te bepalen werden de aantallen bacteriofagen die direct werden bepaald vergeleken met de aantallen bepaald met behulp van deze concentratiemethode (indirect). In Bijlage 1 en 5 zijn de meetgegevens opgenomen. De gemiddelde concentratie somatische colifagen gevonden in de Maas bij Keizersveer met behulp van de directe methode was  $1,24 \times 10^4$  (range  $5,60 \times 10^2$ - $5,82 \times 10^4$ ) pvd per liter. De aantallen somatische colifagen bepaald met de directe methode waren significant gecorreleerd ( $p < 0,0001$ ; correlatie coëfficiënt 0,92) aan de aantallen bepaald in het concentraat (indirect). De opbrengst aan somatische colifagen met de concentratiemethode was 17 % tot 91 % (met een gemiddelde van 43 %) van de opbrengst met de directe methode. Voor de F-specifieke fagen werd in de Maas bij Keizersveer met behulp van de directe methode een gemiddelde concentratie van  $2,3 \times 10^3$  (range  $< 17$ - $1,095 \times 10^4$ ) pvd per liter gevonden. De opbrengst met de indirecte methode was 28 % tot 213 % (met een gemiddelde van 83 %) van de opbrengst van de directe methode. De aantallen F-specifieke fagen bepaald met de directe methode waren significant gecorreleerd ( $p < 0,00001$ ) aan de aantallen bepaald in het concentraat (correlatiecoëfficiënt 0,93).

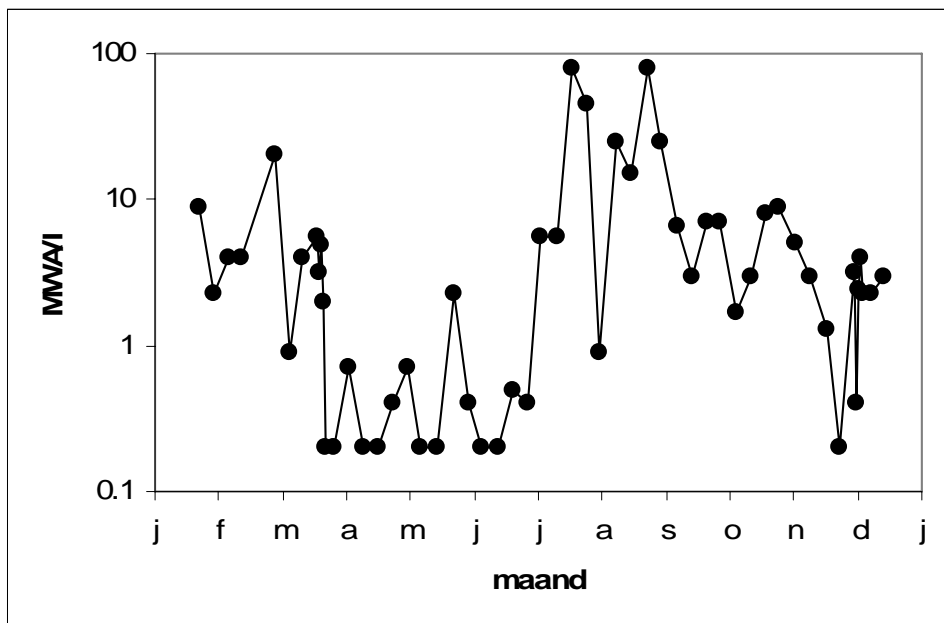
## 5.6 *Campylobacter* in het afgeleverde water

*Campylobacter* komt algemeen voor in het afgeleverde water van WBB: 84 % van de onderzochte monsters was positief (Tabel 3). Het meest waarschijnlijke gemiddelde aantal *Campylobacter* bacteriën bedroeg 6,9 per liter, terwijl het maximale aantal meer dan 80 per liter bedroeg. Deze hoge concentratie kwam voor in twee pieken in de maanden juli en augustus; een eerdere piek (20 per liter) werd begin maart gevonden (Figuur 7). Van eind januari tot eind maart lagen de concentraties meestal tussen de 4 en 20 per liter, om begin april te zakken tot 0 - 0,7 per liter. Begin juli stegen de concentraties sterk tot  $> 80$  per liter. In augustus traden enkele pieken op, waarna de concentratie daalde tot het niveau van de wintermaanden. Vergelijking met de concentraties *E. coli* en fecale streptococci (Figuur 8) gaf aan dat piekconcentraties voor *Campylobacter* samen vielen met verhoogde *E. coli* (en in september ook fecale streptococci) concentraties. Op dergelijke momenten is er dus sprake van een verhoogde verontreiniging met fecaal materiaal.

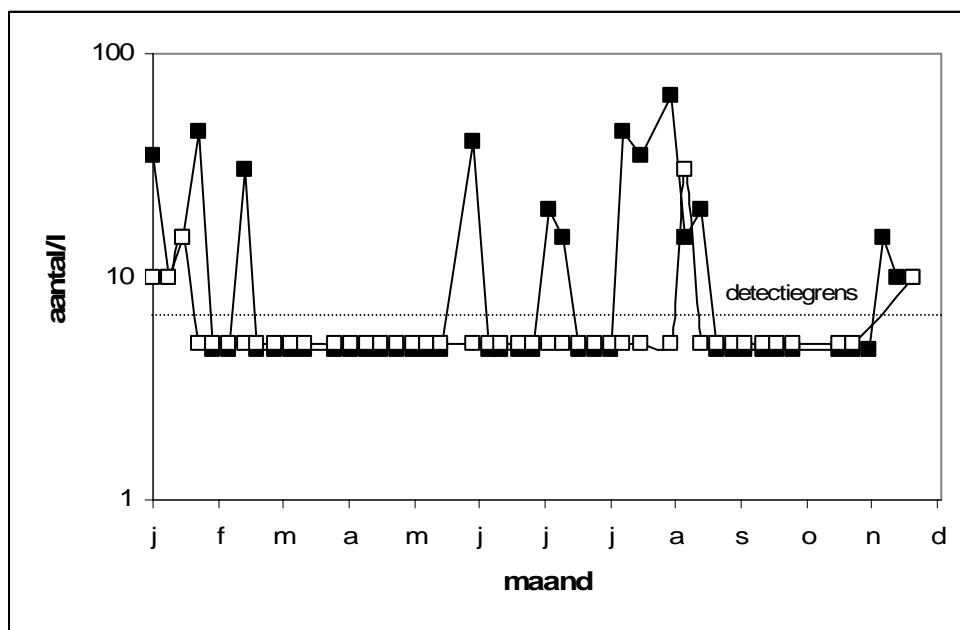
Op vijf opeenvolgende meetdagen in twee periodes (maart en december) is zowel om 9 uur als om 13 uur een monster genomen om de variatie over de dag en tussen dagen vast te stellen (Tabel 4). De variatie tussen de dagen was groter dan binnen de dagen. Met een variantieanalyse (na log-transformatie en het op 0,1 stellen van de beide monsters die  $< 0,3$  MWA/l als resultaat hadden) is de nulhypothese 'er is geen verschil tussen de gemeten concentratie binnen een dag' getoetst. Zowel voor de afzonderlijke periodes ( $p = 0,26$  en  $0,27$ ) als voor de totale periode ( $p = 0,64$ ) werd de nulhypothese niet verworpen.

Tabel 3 Beschrijvende statistiek van de gedetecteerde concentraties *Campylobacter* in het afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch in 2001

aantal monsters	64
aantal (%) monsters positief	54 (84 %)
minimum concentratie	0
5-percentiel	0
10-percentiel	0
mediane concentratie	2,7
gemiddelde concentratie	6,9
90-percentiel	13,2
95-percentiel	25
maximale concentratie	>80



Figuur 7 Het meest waarschijnlijke aantal (MWA) *Campylobacter* in het afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch in 2001.



Figuur 8 Verloop van de concentratie *E. coli* (■) en fecale streptococci (□) in het afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch in 2001.

Tabel 4 Variatie in het meest waarschijnlijke aantal (MWA) *Campylobacter* in het afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch binnen een dag en binnen een week in maart en december 2001.

maart 2001			december 2001		
<i>Campylobacter</i> (MWA/l)			<i>Campylobacter</i> (MWA/l)		
datum	9:00	13:00	datum	9:00	13:00
26-3-2001	7,0	4,0	3-12-2001	2,3	4,0
27-3-2001	4,0	2,3	4-12-2001	0,4	0,4
28-3-2001	0,9	9,0	5-12-2001	4,0	0,9
29-3-2001	<0,3	4,0	6-12-2001	4,0	0,9
30-3-2001	<0,3	0,4	7-12-2001	2,3	0,9

## 5.7 Virussen in het afgeleverde water

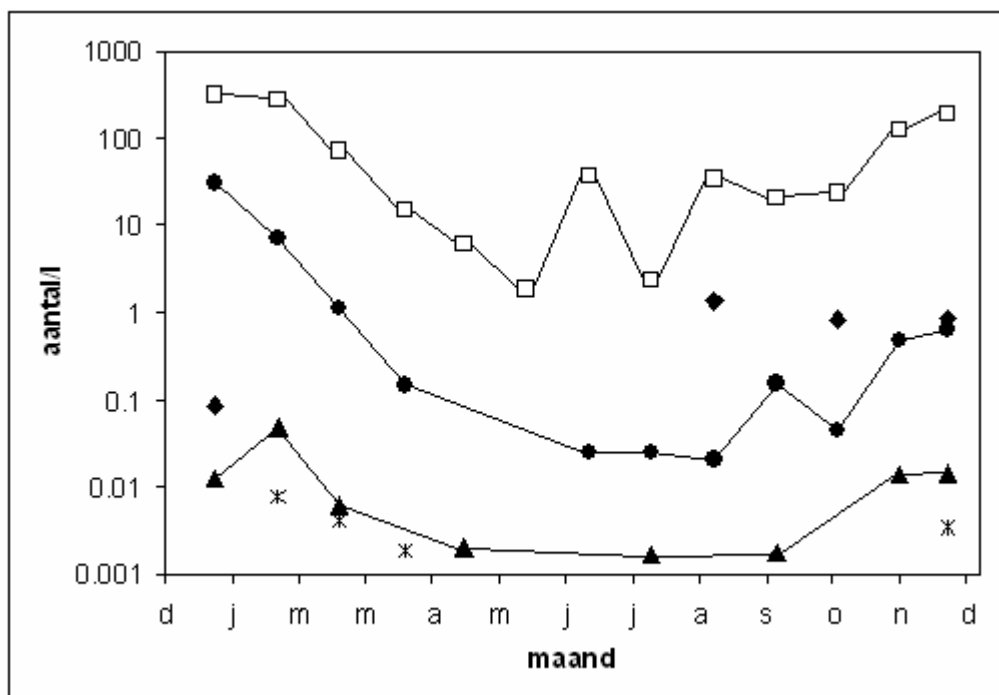
Het ingenomen Maaswater wordt door drie in serie geschakelde bekkens geleid, waarbij in het laatste bekken ontharding wordt toegepast. Voor transport wordt het af te leveren water op pH 9 gebracht. Dit af te leveren water werd vierwekelijks bij het laatste bekken,

Petrusplaat, bemonsterd en geanalyseerd op de aanwezigheid van humaan pathogene virussen en bacteriofagen. De meetresultaten zijn in Bijlage 2 en 6 opgenomen.

Enterovirussen werden in vier van de dertien monsters aangetroffen (Figuur 9). De gewogen gemiddelde concentratie enterovirussen bedroeg 0,001 pvd per liter, met een maximum van 0,008 pvd per liter. Reovirussen werden in acht van de dertien monsters aangetroffen, met een gemiddelde concentratie van 0,007 pvd per liter en een maximum van 0,05 pvd per liter.

Het afgeleverde water werd met behulp van moleculaire methoden onderzocht op de aanwezigheid van de niet- of moeilijk kweekbare noro- en rotavirussen. Rotavirus RNA werd niet aangetoond in het afgeleverde water, terwijl in vier van de dertien monsters wel norovirus RNA werd aangetoond (Figuur 9). De gemiddelde norovirus RNA-concentratie was 0,015 pde per liter, met een maximum van 1,3 pde per liter.

Somatische colifagen konden worden aangetoond in elk van de onderzochte monsters van het afgeleverde water, van januari tot en met december 2001. De gewogen gemiddelde concentratie somatische colifagen over het hele jaar was 15 (range 1,9 - 319) pvd per liter. In elf van de dertien monsters konden F-specifieke fagen worden aangetoond met een gemiddelde concentratie van 1,0 (range 0-31) pvd per liter.



*Figuur 9 Concentraties van het afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch die positief waren voor de aanwezigheid van somatische colifagen (□), F-specifieke fagen (●), reovirussen (▲), enterovirussen (x) of norovirussen (◆).*

## 5.8 Virusreductie in de spaarbekkens van WBB

De virusreductie door onder andere afsterving en sedimentatie van (gehechte) virusdeeltjes in de drie geschakelde spaarbekkens van WBB, de decimale reductie (DR) werd geschat door gebruik te maken van een eenvoudige vergelijking en door toepassing van een binomiaal model om het 95 % betrouwbaarheidsinterval vast te stellen (De Roda Husman en Medema, 2005). De gewogen gemiddelde virusconcentratie in het ruwe (r) water (Maas bij Keizersveer) werd berekend als een gewogen rekenkundig gemiddelde waarde uit de gemeten totale aantallen virussen (n) gedeeld door de totale aantallen onderzochte volumes van het ruwe water (V) (vergelijking 1). De gewogen gemiddelde virusconcentratie in het behandelde (b) water (het afgeleverde water, Petrusplaat) werd op dezelfde manier berekend volgens vergelijking (2). De gewogen gemiddelde virusconcentraties in het ruwe water ( $C_{ruw}$ ) en het behandelde water ( $C_{behandeld}$ ) werden gedeeld en log-getransformeerd om de decimale reductie ten gevolge van de spaarbekkens te berekenen volgens vergelijking (3). De berekende DR-waarden en het 95 % betrouwbaarheidsinterval zijn weergegeven in Tabel 5.

$$C_{ruw} = \frac{(n_{r1} + n_{r2} + n_{rn})}{(V_{r1} + V_{r2} + V_{rn})} \quad \text{vergelijking (1)}$$

$$C_{behandeld} = \frac{(n_{b1} + n_{b2} + n_{bn})}{(V_{b1} + V_{b2} + V_{bn})} \quad \text{vergelijking (2)}$$

$$DR = \log_{10} \left( \frac{C_{ruw}}{C_{behandeld}} \right) \quad \text{vergelijking (3)}$$

Tabel 5 Virusreductie in de spaarbekkens van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch

locatie	concentratie				
	(95% betrouwbaarheids interval)				
	somatische fagen (pvd/l)	F-specifieke fagen (pvd/l)	enterovirussen (pvd/l)	reovirussen (pvd/l)	norovirussen (pde/l)
Keizersveer	1180 (1137 – 1224)	37 (36 – 38)	0,16 (0,15 – 0,18)	0,20 (0,18 – 0,22)	0,055 (0,037 – 0,077)
Petrusplaat	15 (14 – 15)	0,96 (0,89 – 1,0)	0,0014 (0,00067 – 0,0025)	0,0073 (0,0054 – 0,0096)	0,015 (0,0087 – 0,023)
DR (log <sub>10</sub> )	1,6	1,9	2,1	1,4	0,6

DR: decimale reductie; pvd/l: plaque vormende deeltjes per liter; pde/l: PCR detecteerbare eenheden per liter

## 5.9 Vereiste verwijdering van pathogenen bij drinkwaterproductie uit afgeleverd water van WBB

De benodigde effectiviteit van de zuivering om van het afgeleverde water van WBB drinkwater te bereiden dat voldoet aan de eisen uit het Waterleidingbesluit wordt berekend uit de gewogen gemiddelde concentratie in het ruwe water en de toegestane concentratie in het drinkwater (De Roda Husman en Medema, 2005). De toegestane concentratie in het drinkwater is berekend uit de dosis-respons relatie voor rotavirussen (Teunis *et al.*, 1996). De op deze manier berekende vereiste decimale reductiecapaciteit voor norovirussen bedroeg 4,4 log<sub>10</sub>-eenheden voor Maaswater bemonsterd bij Keizersveer en 3,9 log<sub>10</sub>-eenheden voor het afgeleverde water (Tabel 5). De norovirus concentraties in het ruwe water zijn weergegeven in aantallen PCR detecteerbare eenheden per liter. Experimenten met poliovirus suggereren dat mogelijk eenhonderdste deel van de PCR detecteerbare eenheden infectieus is. Extrapolatie van deze verhouding betekent dat de vereiste DR voor norovirussen in het afgeleverde water mogelijk geen 3,9 log<sub>10</sub>-eenheden is, maar slechts 1,9 log<sub>10</sub>-eenheden. Rotavirussen werden niet aangetroffen in het Maaswater of het afgeleverde water. Reovirussen vereisen een DR van 5,0 log<sub>10</sub>-eenheden voor het Maaswater en 3,6 log<sub>10</sub>-eenheden voor het afgeleverde water. Voor Enterovirussen liggen de vereiste DR's in dezelfde orde van grootte, respectievelijk 4,9 en 2,8 log<sub>10</sub>-eenheden voor het Maaswater en het afgeleverde water. De somatische colifagen geven conservatieve waarden voor de vereiste DR-waarden voor het Maaswater en het afgeleverde water (respectievelijk 8,8 en 6,9 log<sub>10</sub>-eenheden). Dit geldt ook voor F-specifieke fagen, de vereiste DEC-waarden voor het Maaswater en het afgeleverde water bedragen respectievelijk 7,3 en 5,7 log<sub>10</sub>-eenheden. Voor *Campylobacter* is de vereiste DR 8,0 log<sub>10</sub>-eenheden voor het Maaswater. Door de geringe verwijdering tijdens verblijf in de bekkens of herbesmetting in de bekkens is de concentratie *Campylobacter* in het afgeleverde water nog steeds relatief hoog. De vereiste DR voor het afgeleverde water is 6,5 – 7,3 log<sub>10</sub>-eenheden (afhankelijk van het meetjaar).



*Tabel 6 Vereiste effectiviteit van de zuiveringsprocessen om van Maaswater en afgeleverd water betrouwbaar drinkwater te maken*

<b>type virussen</b>	<b>concentratie in het Maaswater bij Keizersveer</b>	<b>vereiste DR (log<sub>10</sub>)</b>	<b>concentratie in het afgeleverde water</b>	<b>vereiste DR (log<sub>10</sub>)</b>
norovirussen (pde/l)	0,055	4,4	0,015	3,9
rotavirussen (pvd/l)	0		0	
reovirussen (pvd/l)	0,20	5,0	0,0073	3,6
enterovirussen (pvd/l)	0,16	4,9	0,0014	2,8
SOMF (pvd/l)	1180	8,8	15	6,9
FSPF (pvd/l)	37	7,3	0,96	5,7
<i>Campylobacter</i> (MWA/l)	194 *	8,0	6,9 – 40 *	6,5 – 7,3

DR: decimale reductie; pvd/l: plaque vormende deeltjes per liter; pde/l: PCR detecteerbare eenheden per liter; SOMF: somatische fagen; FSPF: F-specifieke fagen. \* Op basis van gegevens 1994 (zie Bijlage 4)



## 6. Discussie

### 6.1 Kweekbare virussen in de Maas

Pathogene micro-organismen worden in rivieren over de hele wereld aangetroffen (Nestor *et al.*, 1981; Payment *et al.*, 1988; Matsuura *et al.*, 1993; Obi *et al.*, 2003; Lodder en de Roda Husman, 2005). In Nederland wordt op diverse plaatsen water aan het Maasstroomgebied onttrokken voor de productie van drinkwater (De Roda Husman en Ketelaars, in voorbereiding). Het WBB neemt water in uit de Bergse Maas/Amer circa 7 km na meetpunt Keizersveer. In 2001 werd de aanwezigheid van pathogene virussen in het Maaswater onderzocht. Gedurende het hele jaar werden concentraties van 0,01 tot 1 infectieus reo- en/of enterovirusdeeltje per liter aangetoond. Van april tot oktober werden concentraties reovirussen van minder dan 0,1 deeltje per liter vastgesteld.; ook de laagste concentraties enterovirussen (<0,1 pvd/l) werden in de zomer (juni tot oktober) gemeten. Enterovirus-infecties circuleren vooral in de zomer in de humane populatie, maar concentraties enterovirussen in rioolwater blijken door het jaar constant. Verhoogde afsterving door hogere temperatuur en meer zonlicht is mogelijk debet aan de lagere concentraties enterovirussen in het oppervlaktewater in de zomer (Schijven *et al.*, 1995).

### 6.2 Vergelijking van de metingen in 2001 met eerder onderzoek naar virussen in de Maas

In de winterperioden 1983-1984 en 1984-1985 werd eerder onderzoek gedaan naar de enterovirussen in de Maas bij Keizersveer. In het water van de Maas werden hogere aantallen aangetroffen dan in 2001. Bij een gemiddelde verblijftijd van ruim 8 maanden werd in bovengenoemde onderzoeksperiode de concentratie kweekbare virussen gereduceerd van 1-20 pvd per liter in het ingenomen Maaswater tot 1-48 pvd per 1000 liter in het afgeleverde water (Van Olphen *et al.*, 1992). De reductie van humane enterovirussen varieerde in deze periode van 540 tot >1600. De geïsoleerde enterovirussen waren coxsackie B-, ECHO- en poliovirussen, waarbij de coxsackie B-virussen veruit in de meerderheid waren. De geïsoleerde poliovirussen waren vaccinstammen, naar alle waarschijnlijkheid afkomstig uit de ons omringende landen waar, in tegenstelling tot in Nederland, poliovaccinatie met verzwakt levend virus plaatsvindt. Het aantal geïsoleerde ECHO-virussen was klein, hetgeen mogelijk veroorzaakt is door de geringe gevoeligheid van de gebruikte gastheercellen (Van Olphen *et al.*, 1992). Hoewel in De Gijster het meeste slib sedimenteerde, trad in dit spaarbekken niet de sterkste reductie van virussen op. Kortsluitstromen, die in de winter vaker optreden door geringere temperatuurverschillen tussen het Maaswater en het spaarbekkenwater zijn hier mogelijk debet aan (Van Olphen *et al.*, 1992).

### **6.3 Detectie van niet-kweekbare virussen in de Maas**

De met moleculaire methoden aangetoonde humaan pathogene norovirussen worden in de regel in de koudere periode van het jaar aangetroffen in het Maaswater, maar soms ook wel in de warmere periode. Norovirussen lijken veel piekmatiger voor te komen dan enterovirussen. Het is vooralsnog onbekend hoe breed deze pieken zijn, hoe hoog en hoe vaak deze pieken optreden. Voor poliovirussen is bekend dat bij de reproductie van ieder infectieus virus 100 niet-infectieuze deeltjes gevormd worden. Deze gegevens zijn nog niet beschikbaar voor humane norovirussen, maar als wordt uitgegaan van dezelfde verhouding infectieuze / defectieve virusdeeltjes, kan het Maaswater tientallen infectieuze norovirusdeeltjes bevatten. Er moet onderzocht worden in welke verhouding infectieuze / defectieve norovirusdeeltjes ontstaan en hoe variabel deze verhouding is. Mogelijk is de verhouding infectieuze / defectieve virusdeeltjes afhankelijk van bepaalde factoren tijdens de virusreproductie zoals de beschikbaarheid van gastheerfactoren.

Met behulp van sequentie-analyse kon voor één monster, genomen in november 2001, bevestigd worden dat de aangetroffen RNA-bevattende deeltjes norovirus-specifiek waren. De aanwezigheid van norovirus-specifiek RNA wordt altijd bevestigd door de PCR-producten te hybridiseren met een norovirus-specifieke probe. De sequentie-analyse liet zien dat het aanwezige RNA van het type Grimsby was dat in 2001 dominant in de Nederlandse populatie circuleerde (M.P.G. Koopmans, persoonlijke mededeling). Bovendien vertoonde het aangetoonde RNA weinig overeenkomsten met de toegepaste norovirus-positieve PCR-controle waardoor contaminatie grotendeels kon worden uitgesloten. Niet alle monsters konden worden onderworpen aan sequentie-analyse omdat de concentratie virusdeeltjes in de meeste monsters te laag was.

### **6.4 Efficiëntie van directe en indirecte bepaling van bacteriofagen**

De aantallen getelde micro-organismen in een monster worden voor een deel bepaald door de efficiëntie van de detectiemethode. In deze studie werd membraanfiltratie gevolgd door ultrafiltratie toegepast om kweekbare virussen te concentreren uit grote volumes water. De opbrengst van de toegepaste tweestapsfiltratie werd getoetst door de aantallen bacteriofagen direct in water en in het bijbehorende waterconcentraat (indirect) te bepalen. De concentraties van zowel de somatische colifagen als F-specifieke bacteriofagen die gevonden werden in water bij Keizersveer met de directe en indirecte methoden zijn significant gecorreleerd. Met de directe methode werden over het algemeen hogere concentraties aangetoond dan met de indirecte methode. Echter, de concentraties somatische colifagen en F-specifieke fagen konden met behulp van de directe methode in één respectievelijk 11 van de metingen in het afgeleverde water niet bepaald worden. Met de indirecte methode was dit wel mogelijk. Dit betekent dat bij hoge faagconcentraties de directe methode beter geschikt is, terwijl bij lagere faagconcentraties de voorkeur uitgaat naar de indirecte methode. De opbrengsten met de

concentratiemethoden varieerden van 17 % tot 91 %, met een gemiddelde van 43 %, voor somatische colifagen en 28 % tot 213 %, met een gemiddelde van 83 %, voor F-specifieke fagen. Hieruit blijkt dat de gemiddelde opbrengsten van virusconcentratie uit oppervlaktewater redelijk goed zijn. De verschillen tussen de minimale en maximale waarden zijn respectievelijk 0,7 en 0,9- $\log_{10}$  eenheden voor somatische colifagen en F-specifieke fagen.

De juiste bepaling van opbrengsten van methoden die worden toegepast verdient meer aandacht, zodat de concentraties bacteriofagen die werden berekend uit de getelde aantallen bacteriofagen in concentraat en het onderzochte volume gecorrigeerd zouden kunnen worden voor de behaalde opbrengsten. Daarbij dient onderzocht te worden of de opbrengst van een methode afhankelijk is van een bepaalde locatie of een bepaald seizoen of samenhangt met andere parameters zoals troebelheid. Om een betrouwbare infectierisicoschatting te kunnen doen zal voorlopig op hetzelfde moment een directe en indirecte bacteriofaagbepaling moeten worden uitgevoerd. Bij deze benadering wordt aangenomen dat de resultaten die worden verkregen voor bacteriofagen te extrapoleren zijn naar virussen.

## **6.5 Bacteriofagen als indicator voor humaan pathogene virussen in water**

In deze studie is gekeken naar de bruikbaarheid van bacteriofagen als indicator voor humaan pathogene virussen. De aantallen infectieuze entero- en reovirussen waren echter niet significant gecorreleerd met de aantallen bacteriofagen in de concentraten van het Maaswater. Tussen de aantallen bacteriofagen en norovirus of rotavirus PCR detecteerbare eenheden in de concentraten werd eveneens geen significante correlatie gevonden. Eerdere studies laten vergelijkbare resultaten zien of tonen juist goede correlaties tussen met name F-specifieke fagen en entero- en reovirussen (Havelaar *et al.*, 1993a; 1993b). In de winterperiode van 1984-1985 werd onderzoek gedaan naar de waarde van bacteriofagen als model voor het gedrag van virussen in de spaarbekkens. Uit dit onderzoek bleek de verwijdering van F-specifieke bacteriofagen die van de enterovirussen goed te volgen (reductiefactor respectievelijk 600 en 540). Somatische colifagen werden minder goed verwijderd (reductiefactor 120) dan humane virussen, wat waarschijnlijk toe te schrijven is aan herbesmetting door watervogels. Het is echter ook mogelijk dat deze organismen in de spaarbekkens beter overleven dan virussen.

In de in 2001 uitgevoerde studie is de bruikbaarheid van bacteriofagen voor het vaststellen van de reductie van pathogene virussen door verblijf in de spaarbekkens van het WBB eveneens onderzocht. Vanwege te lage concentraties (onder de detectiegrens van de methode) in het behandelde water wordt de decimale reductie meestal aan de hand van bacteriofaagconcentraties berekend. In deze studie konden echter wel tellingen van virussen worden gedaan, zodat vergelijking van de decimale reductie waarden berekend aan de hand van virusconcentraties en aan de hand van bacteriofaagconcentraties vergeleken konden worden. De eigenschappen van somatische colifagen, zoals grootte en lading, komen het

meest overeen met die van enterovirussen. De berekende DR-waarden waren respectievelijk 1,6 en 2,1  $\log_{10}$ -eenheden. De F-specifieke fagen worden in de spaarbekkens met 1,9  $\log_{10}$ -eenheden gereduceerd. De eigenschappen van deze bacteriofagen zijn vergelijkbaar met die van reo- en norovirussen, waarvoor DR-waarden van respectievelijk 1,4 en 0,6  $\log_{10}$ -eenheden werden berekend. Somatische colifagen lijken hier dus de beste worst-case schatter, hoewel er rekening mee moet worden gehouden dat zowel reo- als norovirussen slechter verwijderd werden dan somatische colifagen. Gebruik van de verwijdering van bacteriofagen door de spaarbekkens als indicator voor de reductie van de concentraties humaan pathogene virussen zou in deze studie hebben geleid tot een overschatting van de efficiëntie van de eliminatie van infectieuze reovirus en norovirus RNA-bevattende deeltjes.

Om te voldoen aan het  $10^{-4}$  infectierisico uit het Waterleidingbesluit is de vereiste decimale reductie voor enterovirussen in het afgeleverde water 2,8  $\log_{10}$ -eenheden, voor reovirussen is deze 3,6  $\log_{10}$ -eenheden. De vereiste decimale reductie voor norovirussen ligt in dezelfde orde van grootte, namelijk op 3,9  $\log_{10}$ -eenheden. Ook indien er van uit wordt gegaan dat slechts één van elke honderd norovirusdeeltjes infectieus is, is nog een reductie van 1,9  $\log_{10}$ -eenheden vereist om van het afgeleverde water betrouwbaar drinkwater te maken. Er is verder onderzoek nodig om de reductiecapaciteit van zuiveringsprocessen voor norovirussen te bepalen. Dit is mogelijk met behulp van animale calicivirussen. Voorts kan een gedegen procesmodel voor het beschrijven van virusreductie in de spaarbekkens leiden tot een beter begrip van de parameters die hierbij een rol spelen. Op deze manier kunnen de variatie en onzekerheden in de risicoschatting voor humaan pathogene virussen worden vastgelegd.

## 6.6 Virussen in het afgeleverde water

Het door WBB geproduceerde afgeleverde water werd in 2001 onderzocht op de aanwezigheid van de in Nederland belangrijkste gastro-enteritis verwekkende virussen, norovirus, en rotavirus.

In 8 van de 13 monsters van het afgeleverde water werden reovirussen aangetroffen, entero- en norovirussen werden in 4 van de 13 monsters gedetecteerd. De gemiddelde concentraties entero- en reovirussen lagen respectievelijk ongeveer 1,0 en 0,3  $\log_{10}$ -eenheden lager dan de concentratie norovirus RNA-bevattende deeltjes. De gemiddelde virusconcentraties werden gewogen berekend, omdat de aantallen virussen regelmatig verspreid over een heel jaar gemeten werden. Bij de berekening van de virusreductie door de spaarbekkens werd echter niet uitgegaan van gepaarde monsters maar van rekenkundige gemiddelden omdat de verblijftijd enkele maanden in beslag nam (Evers en Groennou, 1999). De gemiddelde DR door verblijf in de spaarbekkens bedroeg voor enterovirussen 2,1  $\log_{10}$ -eenheden, voor reo- en norovirussen bedroegen de DR-waarden respectievelijk 1,4 en 0,6  $\log_{10}$ -eenheden.

## 6.7 *Campylobacter* in het afgeleverde water

*Campylobacter* werd aangetroffen in 84 % van de onderzochte monsters van het afgeleverde water van WBB. De concentraties varieerden van 0 tot meer dan 80 MWA per liter, met een gemiddelde concentratie van 6,9 MWA per liter. De concentraties lagen daarmee in dezelfde orde van grootte als de concentraties die in 1990 in spaarbekkens voor drinkwaterproductie werden aangetroffen (Medema en Schets, 1994).

Het onderzoek naar de korte-termijnvariatie (dag-week) van de *Campylobacter* concentratie gaf aan dat de concentratie binnen een dag zowel zeer gering als zeer aanzienlijk (<1 tot >1,3 log<sub>10</sub>-eenheden) kan verschillen. Het gemiddelde verschil is klein, maar de variatie (standaarddeviatie) is groot (0,12 ± 0,74 log<sub>10</sub>-eenheden). Dit verschil uit zich ook in de monsters van 29 en 30 maart, waar in het monster van 9.00 uur geen *Campylobacter* is aangetroffen en in het monster van 13.00 uur wel. De variatie wordt deels veroorzaakt door de onzekerheid van de MWA-methode en deels door werkelijke variatie van de concentratie in het water. Dit korte-termijn variatieonderzoek laat zien dat het voor dergelijke metingen belangrijk is om niet uit te gaan van slechts enkele metingen, omdat dan de onzekerheid groot is. Seriëmetingen zoals hier zijn uitgevoerd leveren een betrouwbaarder zicht op de gemiddelde concentraties en de variatie.

In 1994 zijn ook metingen uitgevoerd naar het voorkomen van *Campylobacter* in het afgeleverde water van WBB, de Maas bij Keizersveer en in het uitgaande water van bekken Honderd en Dertig (Bijlage 4). De statistische kentallen van de metingen in het afgeleverde water van WBB uit 1994 staan naast de kentallen van deze metingen in 2001 weergegeven in Bijlage 7. Hierin is tevens een figuur opgenomen die het verloop van de *Campylobacter* concentratie in het afgeleverd water in 1994 en 2001 laat zien. Het verloop van de *Campylobacter* concentratie in afgeleverd water over het jaar is in 1994 vrijwel identiek aan het verloop in 2001. In 1994 werden op een aantal meetdagen hoge concentraties *Campylobacter* gevonden (110 – 5000 per liter), waardoor het gemiddelde voor dat jaar op 40 MWA per liter ligt, terwijl het gemiddelde voor 2001 6,9 MWA per liter is. De mediaan verschilt voor beide jaren slechts weinig.

In 1994 is de vogelbelasting op de spaarbekkens van WBB bestudeerd; er zijn vogeltellingen verricht door de Stichting Natuur- en Vogelwacht Dordrecht (Bijlage 8). Daaruit bleek dat de aantallen vogels op de Petrusplaat laag waren in de voorjaarsmaanden en eind juni stijgen, met name door toename van watervogels (kuifeend, meerkoet, fuut) die dag en nacht op het bekken verblijven en dus voor relatief veel fecale verontreiniging zorgen. De stijging van de *Campylobacter* concentratie in het afgeleverde water bleek samen te vallen met de stijging van het aantal watervogels dat op de Petrusplaat verbleef. Dit is een indicatie voor de mogelijke rol van watervogels als bron van *Campylobacter* in het afgeleverde water. Ook de relatief geringe verwijdering tijdens het verblijf in de Biesbosch-bekkens van *Campylobacter* (0,69 log<sub>10</sub>) ten opzichte van andere fecale bacteriën (2,6 log<sub>10</sub> voor *E. coli*) is een indicatie dat herbesmetting optreedt. Herbesmetting door dieren die op en rond de bekkens leven werd ook al gesuggereerd door Havelaar *et al.* (1995) op basis van de relatief geringe verwijdering van fecale streptococci en het feit dat de concentraties van fecale bacteriën en somatische

colifagen niet gelijkmatig afnamen over de reservoirs, maar soms in een later reservoir hoger waren dan in een eerder reservoir.

*Campylobacter* soorten die pathogeen zijn voor de mens kunnen ook bij vogels voorkomen (Medema en Schets, 1994). Eerder onderzoek is voornamelijk uitgevoerd bij meeuwen (25 % van de feces positief (Medema en Schets, 1994)) en pluimvee (tot 100 % van de feces positief (Jacobs-Reitsma *et al.*, 1995)). Het is daarom niet goed aan te geven in hoeverre menspathogene *Campylobacter* soorten ook voorkomen bij de vogels die in de Biesbosch bekkens verontreiniging kunnen veroorzaken. Hier zou een gericht onderzoek naar het voorkomen van *Campylobacter* bij de vogels die op de spaarbekkens voorkomen en in het water van de spaarbekkens gevolgd door genotypering van de geïsoleerde stammen informatie over kunnen geven.

Het gegeven dat de concentratie *Campylobacter* in het afgeleverde water in dezelfde grootteorde ligt als die van *E. coli* is van belang voor de beoordeling van de veiligheid van de nazuivering. In het indicator-concept, dat aan de *E. coli* eis in het Waterleidingbesluit ten grondslag ligt, werd er van uit gegaan dat de concentratie indicatorbacteriën duidelijk hoger was dan de concentratie pathogenen en dat er in de eis van afwezigheid van indicatorbacteriën een zekere marge zat ten aanzien van de afwezigheid van pathogenen. Dat is hier niet het geval. Dat betekent dat wanneer in de nazuivering doorslag van *E. coli* wordt gemeten, ook *Campylobacter* zou kunnen doorslaan. Daarbij moet nog wel worden opgemerkt dat *Campylobacter* mogelijk beter wordt afgedood door chemische desinfectie dan *E. coli* (Blaser *et al.*, 1986).

## 6.8 Vereiste verwijdering van virussen en *Campylobacter* in de zuivering

De benodigde effectiviteit van de zuivering om van het afgeleverde water van WBB drinkwater te maken dat voldoet aan de eisen uit het Waterleidingbesluit ligt voor de gemeten virussen in dezelfde orde van grootte (circa 3 log<sub>10</sub>-eenheden). Voor bacteriofagen en *Campylobacter* is de vereiste decimale reductie veel hoger (circa 6 tot 7 log<sub>10</sub>-eenheden) dan voor de gemeten virussen. De benodigde effectiviteit van de zuivering kan dus variëren afhankelijk van het micro-organisme wat verwijderd dient te worden. Onbekende micro-organismen kunnen ook een hogere effectiviteit van de zuivering vereisen en daar dient rekening mee gehouden te worden. In dit onderzoek werden bovendien maar weinig monsters van het afgeleverde water positief voor virussen gevonden terwijl (bijna) alle monsters bacteriofagen bevatten. Bij berekeningen is er een effect van veel metingen met 'nul' als uitslag, waardoor mogelijk een minder betrouwbare schatting van de vereiste zuivering wordt verkregen.



## 7. Conclusies

- Om van het afgeleverde water van WBB drinkwater te maken dat aan de eisen uit het Waterleidingbesluit voldoet is de vereiste effectiviteit van zuiveringsprocessen voor *Campylobacter* 6,5 tot 7,3-log<sub>10</sub>-eenheden en voor reo- en enterovirussen 2,8 tot 3,6 log<sub>10</sub>-eenheden.
- In het ingenomen water van WBB zijn in 2001 kweekbare reo- en enterovirussen in concentraties van 0,01 tot 1 virusdeeltje per liter aangetroffen. Deze concentraties zijn lager dan die in eerdere onderzoeksperioden in 1983, 1985, 1985 en 1994 zijn aangetroffen.
- Met moleculaire methoden werd geen RNA van rotavirussen in het ingenomen water van WBB aangetoond, terwijl RNA van norovirussen wel werd aangetoond. Het norovirus RNA bleek van het type Grimsby te zijn, dat in 2001 dominant in de Nederlandse populatie circuleerde.
- In 62 % van de onderzochte monsters van het afgeleverde water van WBB werden kweekbare reovirussen met een gemiddelde concentratie van 0,007 virusdeeltje per liter aangetoond. Enterovirussen werden in 31 % van de monsters aangetroffen met een gemiddelde concentratie van 0,001 kweekbaar virusdeeltje per liter. In 31 % van de monsters afgeleverd water werd norovirus RNA aangetroffen, rotavirus RNA werd niet aangetroffen.
- De decimale reductie door de spaarbekkens van WBB bedroeg voor kweekbare reovirussen 1,4 log<sub>10</sub>-eenheden, voor kweekbare enterovirussen 2,1 log<sub>10</sub>-eenheden en voor norovirus RNA 0,6 log<sub>10</sub>-eenheden.
- *Campylobacter* werd aangetoond in 84 % van de onderzochte monsters van het afgeleverde water van WBB, met een gemiddeld meest waarschijnlijk aantal van 6,9 per liter.
- Bij hoge bacteriofaagconcentraties wordt een hogere opbrengst verkregen met de directe methode voor bepaling van bacteriofagen dan met de indirecte methode, waarbij concentratie door middel van tweestapsfiltratie wordt toegepast. Bij lage bacteriofaagconcentraties worden met de indirecte methode meer monsters positief gevonden.
- Voor somatische colifagen was de gemiddelde opbrengst van de indirecte methode 43 %, voor F-specifieke RNA-fagen bedroeg de gemiddelde opbrengst 83 %.
- De aantallen bacteriofagen in concentraten van het ingenomen water van WBB vertoonden noch significante correlatie met de aantallen kweekbare entero- en reovirussen noch met de aantallen noro- of rotavirus RNA bevattende deeltjes.
- De decimale reductie door de spaarbekkens van WBB bedroeg voor somatische colifagen en F-specifieke RNA fagen respectievelijk 1,6 en 1,9 log<sub>10</sub>-eenheden. Hiermee zijn somatische colifagen de beste 'worst-case' schatter voor virusverwijdering in de spaarbekkens van WBB, maar gebruik van deze fagen als indicator voor reductie van concentraties humaan pathogene virussen zou in deze studie hebben geleid tot een overschatting van de reductie.



## 8. Aanbevelingen

Om een betrouwbare infectierisicoschatting voor virussen te kunnen doen zijn gegevens over het aantal infectieuze virusdeeltjes in oppervlaktewater wat wordt gebruikt voor drinkwaterproductie nodig. Het is tevens van belang inzicht te hebben in de opbrengsten van de detectiemethoden die worden toegepast. Bovendien is het nodig om de reductiecapaciteit van zuiveringsprocessen voor verschillende virussen te bepalen. Nader onderzoek zou zich dan ook kunnen richten op de volgende facetten.

- Nader onderzoek naar de verhouding tussen infectieuze en defectieve, niet-infectieuze, norovirusdeeltjes in oppervlaktewater wat voor drinkwaterproductie wordt gebruikt. Mogelijk is deze verhouding infectieuze / defectieve virusdeeltjes variabel en afhankelijk van bepaalde factoren tijdens de virusreproductie zoals de beschikbaarheid van gastheerfactoren.
- Onderzoek naar de juiste bepaling van opbrengsten van detectiemethoden waarbij vastgesteld dient te worden of de opbrengst van een methode afhankelijk is van een bepaalde locatie of een bepaald seizoen of samenhangt met andere parameters zoals bijvoorbeeld troebelheid.
- Onderzoek naar de reductiecapaciteit van zuiveringsprocessen voor norovirussen kan uitgevoerd worden behulp van animale calicivirussen, bijvoorbeeld zoals dit voor desinfectie met behulp van straling is gedaan (De Roda Husman *et al.*, 2004). Een gedegen procesmodel voor het beschrijven van virusreductie in spaarbekkens kan leiden tot een beter begrip van de parameters die hierbij een rol spelen. Op deze manier kunnen de variatie en onzekerheden in de risicoschatting voor humaan pathogene virussen worden vastgelegd.

Hoewel watervogels de meest waarschijnlijke besmettingsbron van de spaarbekkens van WBB zijn is niet goed aan te geven in hoeverre menspathogene *Campylobacter* soorten ook voorkomen bij de vogels die op deze bekkens verontreiniging kunnen veroorzaken. Gericht onderzoek naar het voorkomen van *Campylobacter* bij de vogels die op de spaarbekkens voorkomen en in het water van de spaarbekkens, gevolgd door genotypering van de geïsoleerde stammen kan hierover informatie verschaffen.



## Literatuur

- Anonymous. Bacteriologisch onderzoek van water – Onderzoek met behulp van membraanfiltratie naar de aanwezigheid van sporen van sulfietreducerende clostridia. NEN 6567, 1985, Nederlands Normalisatie Instituut, Delft
- Anonymous. Bacteriologisch onderzoek van water – Onderzoek met behulp van membraanfiltratie naar de aanwezigheid en het aantal kolonievormende eenheden van *Escherichia coli*. NEN 6261, 1990, Nederlands Normalisatie Instituut, Delft
- Anonymous. Bacteriologisch onderzoek van water – Monsterneming en conservering. NEN 6559, 1992, Nederlands Normalisatie Instituut, Delft
- Anonymous. Water – Monsterneming, deel 2 Oppervlaktewater. NPR 6600, 1993, Nederlands Normalisatie Instituut, Delft
- Anonymous. Bacteriologisch onderzoek van water – Kwantificeren van faecale streptococcon door membraanfiltratie. NEN 6274, 1995a, Nederlands Normalisatie Instituut, Delft
- Anonymous. Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages – part 1 Enumeration of F- specific RNA bacteriophages. ISO 10705-1, 1995b, International Organization for Standardization, Geneva
- Anonymous. Bacteriologisch onderzoek van water – Onderzoek naar de aanwezigheid en/of het meest waarschijnlijke aantal van thermofiele *Campylobacter*-bacteriën. NEN 6269, 1996, Nederlands Normalisatie Instituut, Delft
- Anonymous. Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages – part 2 Enumeration of somatic coliphages. ISO 10705-2, 2000, International Organization for Standardization, Geneva
- Beller M, Ellis A, Lee SH, Drebot MA, Jenkerson SA, Funk E, Sobsey MD, Simmons III OD, Monroe SS, Ando T, Noel J, Petric M, Middaugh JP, Spika JS. Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. JAMA 1997; 278: 563-568
- Berg H van den, Lodder W, Poel W van der, Vennema H, Roda Husman AM de. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. Research in Microbiology 2005; 156: 532-540
- Bisson JW, Cabelli VJ. Membrane filter enumeration method for *Clostridium perfringens*. Appl Environ Microbiol 1979; 37: 55-66

- Blaser MJ, Smith PF, Wang WL, Hoff JC. Inactivation of *Campylobacter jejunie* by chlorine and monochloramine. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51: 307-311
- Brugha R, Vipond IB, Evans MR, Sandifer QD, Roberts RJ, Salmon RL, Caul EO, Mukerjee AK. A community outbreak of food-borne small round-structured virus gastroenteritis caused by a contaminated water supply. *Epidem Infect* 1999; 122: 145-154
- Bruisten SM, Steenberg JE van, Pijl AS, Niesters HGM, Doornum GJJ van, Coutinho RA. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Amsterdam, the Netherlands. *J Med Virol* 2001; 63: 88-95
- Chung PW, Huang YC, Chang LY, Lin TY, Ning H. Duration of enterovirus shedding in stool. *J Microbiol Immunol Infect* 2001; 34: 167-170
- Dahling DR, Wright BA. Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environment. *Appl Environ Microbiol* 1986; 51: 790-812
- Dastjerdi AM, Green J, Gallimore CI, Brown DWG, Bridger JC. The bovine Newbury agent-2 is genetically more closely related to human SRSVs than to animal caliciviruses. *Virology* 1999; 254 :1-5
- Duynhoven YTHP van , Wit MAS de, Broek MJM van den. Registratie van voedselinfecties en –vergiftigingen onderzocht door GGD's en Keuringsdiensten van Waren. RIVM rapport 213690007, 2000, Rijksintituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven
- Evers EG, Groennou JT. Berekening van de verwijdering van micro-organismen bij de bereiding van drinkwater. RIVM rapport 734301016, 1999, Rijksintituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven
- Hafliger D, Hubner P, Luthy J. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *Int J Food Microbiol* 2000; 54:123-126
- Havelaar AH, Olphen M van, Drost YC. F-specific RNA bacteriophages are adequate model organisms for enteric viruses in fresh water. *Appl Environ Microbiol* 1993a; 59: 2956-2962
- Havelaar AH. Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment: Although imperfect, phages can act as sentinels for a safer water supply. *ASM News* 1993b;59(12):614-619.
- Havelaar AH, Olphen M van, Schijven JF. Removal and inactivation of viruses by drinking water treatment processes under full scale conditions. *Wat. Sci. Technol.* 1995; 31: 55-62

- Havelaar AH, Wit MA de, Koningsveld R van, Kempen E van. Health burden in the Netherlands due to infection with thermophilic *Campylobacter* spp. *Epidemiol Infect* 2000; 125: 505-522
- Havelaar AH. *Campylobacteriose in Nederland. Risico's en interventiemogelijkheden*. RIVM rapport 250911001, 2001, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven
- Havelaar AH. *Campylobacteriose in Nederland. Meer onderzoek is nodig voor effectieve bestrijding*. *Infect Bull* 2002; 13: 268-270
- Hauri AM, Schimmelpfennig M, Walter-Domes M, Letz A, Diedrich S, Lopez-Pila J, Schreier E. An outbreak of viral meningitis associated with a public swimming pond. *Epidemiology and Infection* 2005; 133 (2): 291-298
- Hejkal TW, Keswick BH, LaBelle RL, Gerba CP, Sanchez Y, Dreesman G, Hafkin B, Melnick JL. Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. *JAWWA* 1982; 74: 318-321
- Hoogenboezem W, Ketelaars HAM, Medema GJ, Rijs GBJ, Schijven JF. *Cryptosporidium* en *Giardia*: Voorkomen in rioolwater, mest en oppervlaktewater met zwem- en drinkwaterfunctie. RIWA/RIVM/RIZA rapport. ISBN 90369533242000, 2001
- Husain M, Seth P, Broor S. Detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reaction in faeces from children with acute gastroenteritis. *Arch Virol* 1995; 140: 1225-1233
- Jacobs-Reitsma WF, van de Giessen AW, Bolder NM, Mulder RW. Epidemiology of *Campylobacter* spp. at two Dutch broiler farms. *Epidemiol Infect* 1995; 114 (3): 413-421
- Johansson PJ, Sveger T, Ahlfors K, Ekstrand J, Svensson L. Reovirus type 1 associated with meningitis. *Scand J Infect Dis* 1996; 28: 117-120
- Kaplan JE, Goodman RA, Schonberger LB, Lippy EC, Gary GW. Gastroenteritis due to Norwalk virus: An outbreak associated with a municipal water system. *J Infect Dis* 1982; 146: 190-197
- Koff RS. Hepatitis A. *Lancet* 1998; 351: 1643-1649
- Koningsveld R van, Doorn PA van, Schmitz PIM, Meché FGA van der. Mild forms of Guillain-Barré syndrome in an epidemiologic survey in the Netherlands. *Neurology* 2000; 54: 620-625

- Koopmans MPG, Vinje J, Wit MAS de, Leenen EJTM, Poel WHM van der, Duynhoven YTHP van. Human enteric caliciviruses in the Netherlands. *J Infect Dis* 2000; 181: S262-S269.
- Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, Bonsdorff CH von. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 1999; 180: 1771-1776
- Lawson AJ, On SL, Logan JM, Stanley J. *Campylobacter hominis* sp. Nov., from the human gastrointestinal tract. *Int J Syst Evol Microbiol* 2001; 51: 651-660
- Lodder WJ, Vinje J, Heide R van de, Roda Husman AM de, Leenen EJTM, Koopmans MPG. Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. *Appl Environ Microbiol* 1999; 65(12): 5624-5627
- Lodder WJ, Vinje J, Heide R van de, Roda Husman AM de, Koopmans MPG, Leenen EJTM. Detectie van Norwalk-like calicivirussen en rotavirussen in rioolwater in relatie tot explosies van gastro-enteritis. RIVM rapport 289202025, 2000, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven
- Lodder WJ, de Roda Husman AM. Presence of noroviruses and other enteric viruses in sewage and surface waters in The Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 1453-1461
- Logan JM, Burnens A, Linton D, Lawson AJ, Stanley J. *Campylobacter lanienae* sp. Nov., a new species isolated from workers in an abattoir. *Int J Syst Evol Microbiol* 2000; 50: 865-872
- Marshall JA, Salamone S, Yuen L, Catton MG, Wright J. High level excretion of Norwalk-like virus following resolution of clinical illness. *Pathology* 2001; 33: 50-52
- Matsuura K, Ishikura M, Nakayama S, Morita O, Katori K, Uetake H. Ecological studies on Reovirus pollution of rivers in Toyama prefecture. II. Molecular epidemiological study of reoviruses isolated from river water. *Microbiol Immunol* 1993; 37: 305-310
- Medema GJ, Schets FM. *Campylobacter* en *Salmonella* in open reservoirs voor de drinkwaterbereiding. RIVM rapport 149103002 herziene versie, 1994, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven
- Medema GJ, Ketelaars HAM. *Cryptosporidium* en *Giardia* in het afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch. Rapport KOA 98.105, 1998, Kiwa Onderzoek en Advies, Nieuwegein
- Miettinen IT, Zacheus O, Bonsdorff CH von, Vartiainen T. Waterborne epidemics in Finland in 1998-1999. *Water Sci Techn* 2001; 43: 67-71



- Nestor I, Lazar L, Sovrea D, Ionescu N. Investigations on viral pollution in the Romanian section of the Danube river during 1972-1977 period. *Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg* 1981; 173: 517-527
- Obi CL, Potgieter N, Bessong PO, Matsaung G. Scope of potential bacterial agents of diarrhoea and microbial assessment of quality of river water sources in rural Venda communities in South Africa. *Water Sci Technol* 2003; 47: 59-64
- Olphen M van, Kapsenberg JG, Baan E van de, Kroon WA. Removal of enteric viruses from surface water at eight waterworks in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 1984; 47: 927-932
- Olphen M van, Baan E van de, Kapsenberg JG, Breemen LWCA van. Virusverwijdering bij opslag van Maaswater in spaarbekkens. *H2O* 1992; 20: 550-555
- Oskam G. Main principles of water quality improvement in reservoirs. *J Wat Supply Res Rech Aqua* 1995; 44 (suppl. 1): 23-29
- Payment P, Affoyon F, Trudel M. Detection of animal and human enteric viruses in water from the Assomption River and its tributaries. *Can J Microbiol* 1988; 34: 967-973
- Pelt W van, Valkenburgh SM, editors. Zoonoses and zoonotic agents in humans, food, animals and feed in the Netherlands 2001. 2001, Inspectorate for Health Protection and Veterinary Public Health, Ministry of Public Health, Welfare and Sport, The Hague
- Pöyry T, Stenvik M., Hovi T. Viruses in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. *Appl Environ Microbiol* 1988; 54: 371-374
- Poel WHM van der, Vinje J, Heide R van der, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MPG. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis* 2000; 6: 36-41
- Poel WHM van der, Verschoor F, Heide R van der, Herrera MI, Vivo A, Kooreman M, Roda Husman AM de. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2001; 7: 970-976
- Pratelli A, Greco G, Camero M, Corrente M, Normanno G, Buonavoglia C. Isolation and identification of a calicivirus from a dog with diarrhoea. *New Microbiol* 2000; 23: 257-260.
- Puig M, Jofre J, Lucena F, Allard A, Wadell G, Girones R. Detection of adenoviruses and enteroviruses in polluted waters by nested PCR amplification. *Appl Environ Microbiol* 1994; 60: 2963-2970

- Roda Husman AM de, Bijkerk P, Lodder W, van den Berg H, Pribil W, Cabaj A, Gehringer P, Sommer R, Duizer E. Calicivirus inactivation by nonionizing (253.7-nanometer wavelength (UV) and ionizing (gamma) radiation. *Appl Environ Microbiol* 2004; 70: 5089-5093
- Roda Husman AM, Medema GJ. Inspectierichtlijn – Analyse microbiologische veiligheid drinkwater (Artikelcode: 5318), 2005, VROM-Inspectie Regio Noord-West, Haarlem
- Roda Husman AM de, Ketelaars HAM. Humane virussen in de Maas. RIVM rapport 330200001, in voorbereiding, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven
- Russell WC. Adenoviridae. *Arch Virol* 1991; Supplementum 2:140-144
- Rutjes SA, de Roda Husman AM. Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001. RIVM rapport 330000007, 2004, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven
- Schijven JF, Annema JA, Nijts ACM de, Theunissen JJH, Medema GJ. Enterovirussen in het oppervlaktewater in Nederland - Emissie en verspreiding berekend. RIVM rapport 289202006, 1995, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven
- Schijven JF, Hassanizadeh SM. Removal of viruses by soil passage: Overview of modeling, processes, and parameters. *Crit Rev Environ Sci Techn* 2000; 30: 49-127
- Schijven JF. Schatting van de kans op infectie door *Campylobacter* via water. *H2O* 2003; 19: 27-30
- Schvoerer E, Ventura M, Dubos O, Cazaux G, Serceau R, Gournier N, Dubois V, Caminade P, Fleury HJ, Lafon ME. Qualitative and quantitative molecular detection of enteroviruses in water from bathing areas and from a sewage treatment plant. *Res Microbiol* 2001; 152: 179-186
- Smith AW, Skilling DE, Cherry N, Mead JH, Matson DO. Calicivirus emergence from ocean reservoirs: Zoonotic and interspecies movements. *Emerg Infect Dis* 1998; 4: 13-19
- SOP MGB/M157 Methode voor de concentratie van enteric virussen in grote volumina water door middel van filtratie en elutie in het veld. Revisie 0, 970409, 1997, Microbiologisch Laboratorium voor Gezondheidsbescherming; [am.de.roda.husman@rivm.nl](mailto:am.de.roda.husman@rivm.nl)
- Sundkvist T, Hamilton GR, Hourihan BM, Hart IJ. Outbreak of hepatitis A spread by contaminated drinking glasses in a public house. *Commun Dis Public Health* 2000; 3: 60-62
- Tauxe RV. Emerging foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2002;78 : 31-41

- Teunis PFM, Heijden OG van der, Giessen JWB van der, Havelaar AH. The dose-response relation in human volunteers for gastrointestinal pathogens. RIVM report 284550002, 1996, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven
- Vandamme P, Ley J de. Proposal for a new family, Campylobacteriaceae. *Int J Syst Bacteriol* 1991; 41: 451-455
- Vandamme P. Taxonomy of the family Campylobacteriaceae. In: Nachamkin I, Blaser MJ, editors. *Campylobacter*, 2<sup>nd</sup> ed. Washington, DC: ASM Press; 2000. p. 3-26
- Vennema H, Bruin E de, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol* 2002; 25: 233-235
- Vinje J, Altena SA, Koopmans MPG. The incidence and genetic variability of Small Round-Structured Viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1997; 176: 1374-1378
- Wit MAS de, Koopmans MPG, Kortbeek LM, Wannet WJB, Vinje J, Leusden F van, Bartelds AIM, Duynhoven YTHP van. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands, incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001a; 154: 666-674
- Wit MAS de, Koopmans MPG, Kortbeek LM, Leeuwen WJ van, Bartelds AIM, Duynhoven YTHP van. Gastroenteritis in sentinel general practices in the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2001b; 1: 82-91
- Xu ZY, Li ZH, Wang JX, Xiao ZP, Dong DX. Ecology and prevention of a shellfish-associated hepatitis A epidemic in Shanghai, China. *Vaccine* 1992; 10: S67-S68



## Bijlage 1 Directe bepaling van bacteriofagen in de Maas bij Keizersveer door RIVM

parameter	F-specifieke fagen		somatische fagen	
	telling	volume	telling	volume
eenheid	aantal	liter	aantal	liter
datum				
19-2-01	168	0,020	922	0,020
19-3-01	48	0,020	931	0,020
17-4-01	116	0,020	538	0,020
14-5-01	0	0,035	80	0,035
11-6-01	1	0,10	107	0,075
9-7-01	0	0,060	56	0,10
6-8-01	2	0,070	65	0,075
3-9-01	8	0,10	257	0,10
1-10-01	9	0,020	1181	0,10
29-10-01	65	0,10	1142	0,10
26-11-01	1095	0,10	3772	0,10
17-12-01	34	0,025	291	0,0050

## Bijlage 2 Directe bepaling van bacteriofagen in het afgeleverde water door RIVM

parameter	F-specifieke fagen		somatische fagen	
	telling	volume	telling	volume
kenmerk				
eenheid	aantal	liter	aantal	liter
datum				
19-2-01	0	0,020	6	0,020
19-3-01	2	0,020	5	0,020
17-4-01	0	0,075	6	0,075
14-5-01	0	0,10	0	0,10
11-6-01	0	0,10	1	0,075
9-7-01	0	0,10	11	0,10
6-8-01	0	0,070	1	0,075
3-9-01	0	0,10	4	0,10
1-10-01	0	0,020	4	0,10
29-10-01	0	0,10	4	0,10
26-11-01	0	0,10	20	0,10
17-12-01	0	0,070	12	0,10

### Bijlage 3 Directe bepaling van bacteriofagen in het afgeleverde water van WBB door Kiwa

parameter	F-specifieke fagen		somatische fagen	
	telling	volume	telling	volume
eenheid	aantal	liter	aantal	liter
datum				
30-1-01	6	0,001		
6-2-01	4	0,001	70	0,001
13-2-01	1	0,001	40	0,001
27-2-01	3	0,001	40	0,001
6-3-01	2	0,001	41	0,001
13-3-01	3	0,001	33	0,001
27-3-01	2	0,001	67	0,001
3-4-01	8	0,01	13	0,001
10-4-01	10	0,01	16	0,001
24-4-01	19	0,01	13	0,001
1-5-01	11	0,01	17	0,001
8-5-01	1	0,01	65	0,01
22-5-01	1	0,01	5	0,01
29-5-01	7	0,01	2	0,01
5-6-01	0	0,01	5	0,01
19-6-01	1	0,01	47	0,01
26-6-01	18	0,1	6	0,01
3-7-01	34	0,1	38	0,1
17-7-01	3	0,1	36	0,01
24-7-01	8	0,1	492	0,1
31-7-01	16	0,1	299	0,1
14-8-01	31	0,1	34	0,01
21-8-01	7	0,1	17	0,01
28-8-01	25	0,1	74	0,1
11-9-01	1	0,001	85	0,01
18-9-01	1	0,001	22	0,001
25-9-01	22	0,01	34	0,001
1-10-01	2	0,01	15	0,001
9-10-01	13	0,01	22	0,001
16-10-01	6	0,01	77	0,01
23-10-01	4	0,01	88	0,01
29-10-01	7	0,01	12	0,001
6-11-01	7	0,01	95	0,01
13-11-01	30	0,01	19	0,001
20-11-01	43	0,01	23	0,001
26-11-01	91	0,01	39	0,001
4-12-01	60	0,01	40	0,001
11-12-01	25	0,01	43	0,001
17-12-01	35	0,01	41	0,001

#### **Bijlage 4 Meest Waarschijnlijke Aantallen (MWA) *Campylobacter* in Maas, Biesbosch bekken en afgeleverd water van WBB in 1994**

<b>datum</b>	<b>Maas bij Keizersveer <i>Campylobacter</i> (MWA/L)</b>	<b>Honderd en Dertig <i>Campylobacter</i> (MWA/L)</b>	<b>afgeleverd water <i>Campylobacter</i> (MWA/L)</b>
16/02/1994	23		9
22/02/1994	500	23	9
02/03/1994	500	23	21
09/03/1994	500	40	0
16/03/1994	90	23	4
29/03/1994	1100	23	23
05/04/1994	500	9	2.3
12/04/1994	90	0	0.4
19/04/1994	40	4	0.4
26/04/1994	40	0	0.9
10/05/1994	n.a.	0.4	0
17/05/1994	9	0	0.4
25/05/1994	n.a.	9	0.9
31/05/1994	20	7	0.9
14/06/1994	4	1.5	0
28/06/1994	23	2.1	4
05/07/1994	n.a.	4	4
12/07/1994	n.a.	0.7	50
19/07/1994	23	110	110
26/07/1994	n.a.	21	90
02/08/1994	500	n.a.	n.a.
09/08/1994	n.a.	500	23
16/08/1994	40	9	150
23/08/1994	90	90	500
30/08/1994	23	9	40
06/09/1994	n.a.	9	4
13/09/1994	9	0.9	4
20/09/1994	n.a.	0	7
27/09/1994	23	50	110
11/10/1994	500	50	110
08/11/1994	90	15	4
15/11/1994	40	20	9
29/11/1994	70	50	2.3

n.a. = niet geanalyseerd



**Bijlage 5 Indirecte bepaling van bacteriofagen en virussen in de Maas bij Keizersveer door RIVM**

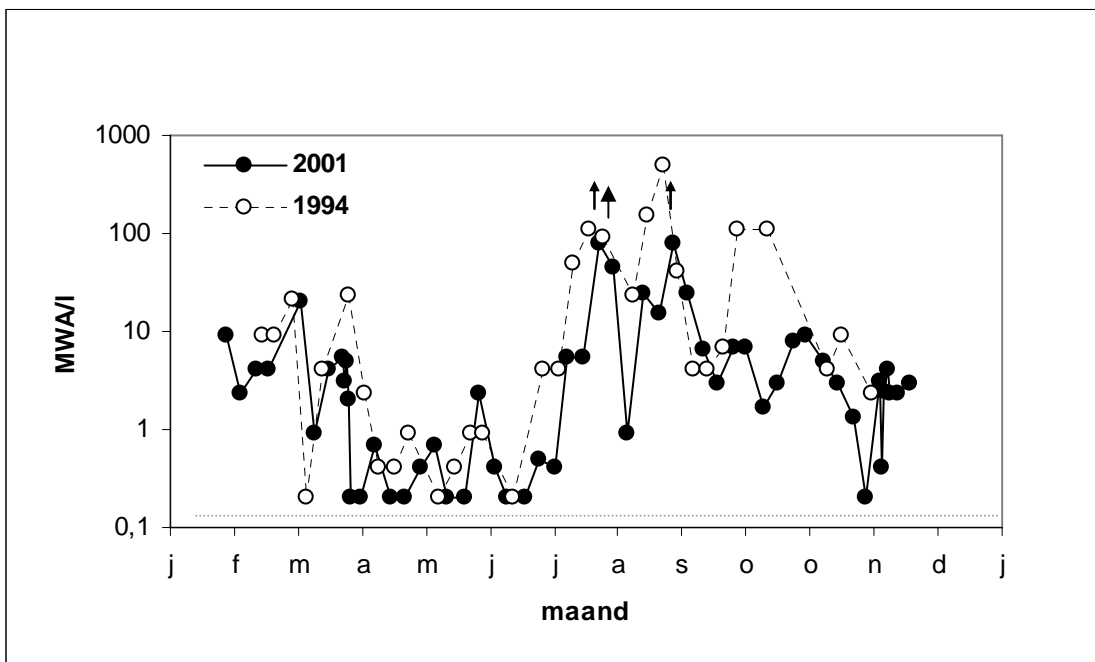
<b>parameter</b>	<b>F-specifieke fagen</b>		<b>somatische fagen</b>		<b>enterovirussen</b>		<b>reovirussen</b>		<b>norovirussen</b>		<b>rotavirussen</b>	
<b>kenmerk</b>	<b>telling</b>	<b>volume</b>	<b>telling</b>	<b>volume</b>	<b>telling</b>	<b>Volume</b>	<b>telling</b>	<b>volume</b>	<b>verduunning</b>	<b>volume</b>	<b>verduunning</b>	<b>volume</b>
<b>eenheid</b>	<b>aantal</b>	<b>liter</b>	<b>aantal</b>	<b>liter</b>	<b>aantal</b>	<b>liter</b>	<b>aantal</b>	<b>liter</b>	<b>positief</b>	<b>liter</b>	<b>positief</b>	<b>liter</b>
<b>datum</b>												
22-1-01	626	0,31	260	0,029	28	90	37	90	0,01	16	negatief	32
19-2-01	185	0,029	331	0,029	53	197	41	197	negatief	15	negatief	31
19-3-01	380	0,21	165	0,021	49	61	4	61	negatief	10	negatief	21
17-4-01	720	0,44	217	0,043	34	38	9	38	negatief	20	negatief	39
14-5-01	46	2,6	40	0,026	33	177	12	177	onverdund	16	negatief	31
11-6-01	283	33,0	42	0,066	1	294	13	294	negatief	18	negatief	36
9-7-01	286	45	857	1,7	3	319	2	319	negatief	18	negatief	35
6-8-01	1299	50	160	0,36	7	329	5	329	negatief	12	negatief	23
3-9-01	249	3,4	55	0,031	4	328	23	328	negatief	12	negatief	24
1-10-01	452	3,3	130	0,030	25	313	73	313	0,1	13	negatief	25
29-10-01	200	0,41	136	0,041	63	142	129	142	0,01	18	negatief	37
26-11-01	131	0,018	299	0,020	60	93	22	93	0,1	17	negatief	35
17-12-01	256	0,088	128	0,0087	34	97	121	97	negatief	15	negatief	29

**Bijlage 6 Indirecte bepaling van bacteriofagen en virussen in het afgeleverde water van WBB door RIVM**

<b>parameter</b>	<b>F-specifieke fagen</b>		<b>somatische fagen</b>		<b>enterovirussen</b>		<b>reovirussen</b>		<b>norovirussen</b>		<b>rotavirussen</b>	
<b>kenmerk</b>	<b>telling</b>	<b>volume</b>	<b>telling</b>	<b>volume</b>	<b>telling</b>	<b>volume</b>	<b>telling</b>	<b>volume</b>	<b>verdunding</b>	<b>volume</b>	<b>verdunding</b>	<b>volume</b>
<b>eenheid</b>	<b>aantal</b>	<b>liter</b>	<b>aantal</b>	<b>liter</b>	<b>aantal</b>	<b>liter</b>	<b>aantal</b>	<b>liter</b>	<b>positief</b>	<b>liter</b>	<b>positief</b>	<b>liter</b>
<b>datum</b>												
22-1-01	156	5,0	159	0,50	0	78	1	78	onverdund	30	negatief	60
19-2-01	432	62	166	0,61	4	522	25	522	negatief	30	negatief	59
19-3-01	56	48	65	0,89	2	486	3	486	negatief	29	negatief	58
17-4-01	16	107	121	8,0	1	529	0	529	negatief	31	negatief	62
14-5-01	0	64	206	32	0	494	1	494	negatief	27	negatief	54
11-6-01	0	153	101	54	0	468	0	468	negatief	30	negatief	60
9-7-01	1	40	739	20	0	589	0	589	negatief	30	negatief	61
6-8-01	1	41	83	35	0	573	1	573	negatief	20	negatief	40
3-9-01	1	48	159	4,8	0	564	0	564	0,1	19	negatief	38
1-10-01	6	40	84	4,1	0	569	1	569	negatief	20	negatief	40
29-10-01	3	67	173	7,4	0	492	0	492	0,1	31	negatief	62
26-11-01	54	111	398	3,3	0	506	7	506	negatief	32	negatief	64
17-12-01	63	100	57	0,30	2	564	8	564	0,1	29	negatief	58

## Bijlage 7 *Campylobacter* in het afgeleverde water van WBB in 1994 en 2001

	1994	2001
aantal monsters	32	64
aantal (%) monsters positief	29 (91 %)	54 (84 %)
minimum concentratie	0	0
5-percentiel	0	0
10-percentiel	0.4	0
mediane concentratie	4.0	2.7
gemiddelde concentratie	40	6.9
90-percentiel	110	13.2
95-percentiel	128	25
maximale concentratie	500	>80



*Verloop van het meest waarschijnlijke aantal (MWA) Campylobacter in het afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch in 1994 en 2001.*

## Bijlage 8 Watervogels aanwezig op het spaarbekken Petrusplaat in 1994

Totaal aantal dominante vogels op de Petrusplaat 1994

