

BTO 2017.065 | Oktober 2017

BTO rapport

Genetische typering van
drinkwaterstammen van
opportunistische
ziekteverwekkers

BTO

Genetische typering van drinkwaterstammen van opportunistische ziekteverwekkers

BTO 2017.065 | Oktober 2017

Opdrachtnummer

400554/090

Projectmanager

Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische activiteit

Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

Auteur

Bart Wullings

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.
Een jaar na publicatie is het openbaar.

Jaar van publicatie
2017

Meer informatie

Ir. B.A. Wullings
T 06 11 36 52 19
E bart.wullings@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl

Keywords Opportunistische ziekteverwekkers, genetische typering, drinkwaterstammen, patientenstammen, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus*, *Stenotrophomonas maltophilia*



BTO | Januari 2017 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

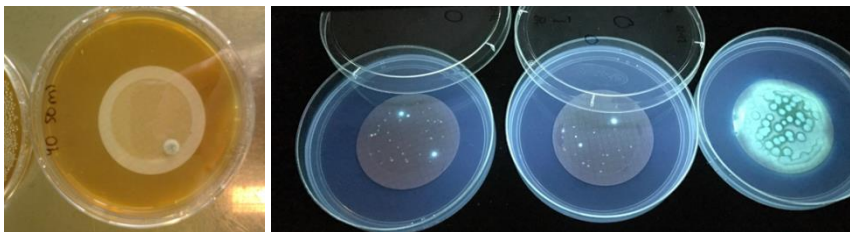
Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

BTO Managementsamenvatting

Klinische en drinkwaterisolaten *P. aeruginosa* en *A. fumigatus*. vertonen genetische overeenkomst

Auteur ir. Bart Wullings

De opportunistische ziekteverwekkers *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* worden sporadisch aangetroffen in het gedistribueerde Nederlandse drinkwater. De betekenis voor de volksgezondheid van het voorkomen van deze organismen in het drinkwater is echter niet onderzocht en blijft daarom onduidelijk. In het hier beschreven onderzoek is de aanwezigheid van kweekbare (en daarmee dus levende) *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in drinkwater direct bemonsterd uit het distributiesysteem aangetoond en is er een genetische verwantschap gevonden tussen drinkwater- en klinische isolaten van *P. aeruginosa* en *A. fumigatus*. Het is dan ook niet uit te sluiten dat deze twee organismen via drinkwater mensen kunnen infecteren. Hoe groot dit risico precies is en hoe dat risico is in verhouding staat tot andere milieubronnen waar deze micro-organismen aanwezig kunnen zijn, is op basis van deze studie niet aan te geven.



Kolonie van *A. fumigatus* op MEA medium (links) en typische oplichtende *P. aeruginosa* bacteriën bij belichting met UV licht (rechts)

Belang: overeenkomst drinkwaterisolaten *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* met patiënt-stammen

Onderzoek heeft aangetoond dat de genetische diversiteit van stammen van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* groot is. Het is daarom mogelijk dat patiëntstammen genetisch verschillend zijn van stammen die worden gekweekt uit het milieu. Tot op heden is het echter onduidelijk of stammen van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* die in het Nederlandse drinkwater voorkomen tot de milieustammen behoren of ook daadwerkelijk ziekte veroorzaken bij mensen met een verzwakt immuunsysteem. Inzicht in de aanwezigheid van ziekteverwekkende stammen van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in drinkwater is cruciaal

om de levering van onberispelijk, betrouwbaar drinkwater te kunnen garanderen en om het vertrouwen van de consument in de drinkwatersector en het imago van de drinkwatersector hoog te houden. Ook is deze informatie belangrijk in een maatschappij waarin (i) het aantal personen dat gevoelig is voor infectie met *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* (immunogecomprimeerden) de aankomende jaren verder zal stijgen en (ii) de groeiomstandigheden voor *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in drinkwater mogelijk verbeteren door hogere drinkwatertemperaturen als gevolg van de opwarming door klimaatverandering.

Aanpak: analyse grote volumes drinkwater en genotypische vergelijking met patiëntstammen

De aanwezigheid van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in drinkwater is geanalyseerd tijdens een meetcampagne in 2014, waarbij in negen voorzieningsgebieden op 43 locaties monsters van 100 liter drinkwater en spuiwater zijn verzameld via een standpijp. Een tweede meetcampagne is uitgevoerd in 2016 en was specifiek gericht op de isolatie van *P. aeruginosa*. Bij acht voorzieningsgebieden en op 17 locaties zijn grootvolumedrinkwatermonsters (100 liter) genomen via een aanboring of distributiereservoir. De mogelijke aanwezigheid van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* is geanalyseerd met behulp van specifieke kweekmedia. Typische kolonies zijn nader geïdentificeerd.

De genetische verwantschap van de geïsoleerde drinkwaterisolaten met patiëntisolaten is bepaald met specifieke typeringsmethoden. Voor *P. aeruginosa* is een gepubliceerde *mutiocus sequence based typing methode* (MLST) gebruikt, die is gebaseerd op het bepalen van de DNA-volgorde van zeven verschillende genen. De informatie van elke stam is vergeleken met de informatie van 5821 stammen in een internationale database van milieu- en patiëntisolaten. Tevens zijn de drinkwaterstammen vergeleken met stammen geïsoleerd uit cystic fibrose patiënten uit Nederland via de database van het Universitair Medisch Centrum Utrecht (UMCU). De drinkwaterstammen van *S. maltophilia* zijn getypeerd door middel van het analyseren van het hele bacteriegenoom (WGS), waarmee op gedetailleerde wijze de mate van verwantschap tussen verschillende stammen is bepaald. *A. fumigatus* stammen zijn genetisch onderscheiden met behulp van een standaardmethode, gebaseerd op een zogeheten *microsatellieten analyse* (STRf), die is ontwikkeld en uitgevoerd door de onderzoeksgroep medische microbiologie van de Radboud Universiteit Nijmegen. Tevens is elke drinkwaterstam gescreend op azolresistentie, een eerstelijns antischimmelmiddel waarvoor in toenemende mate resistentie optreedt.

Resultaten: genetische link tussen *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* in drinkwater en patiëntstammen.

Tijdens de eerste meetcampagne is *P. aeruginosa* sporadisch gekweekt uit drinkwater van drie locaties in drie verschillende voorzieningsgebieden. Tijdens de tweede meetcampagne is *P. aeruginosa* wederom sporadisch gekweekt uit het distributiesysteem (twee voorzieningsgebieden en drie locaties). In totaal zijn

33 *P. aeruginosa*-stammen geïsoleerd, en genetisch vergeleken met patiëntisolaten (genotypering). *S. maltophilia* is in alle geanalyseerde voorzieningsgebieden aangetoond, zowel in het drinkwater als in de spuiwatermonsters. In totaal zijn er 1171 typische kolonies van *S. maltophilia* geïsoleerd uit de drinkwatermonsters en 510 kolonies uit de spuiwatermonsters. Hiervan zijn 50 kolonies geselecteerd voor genotypering en vergelijking met patiëntstammen. *A. fumigatus* is ook in de meeste drinkwatermonsters aangetoond. In totaal zijn er 107 *A. fumigatus* stammen geïsoleerd en vervolgens geanalyseerd in het genotyperingonderzoek. De genetische verwantschap van de 33 geïsoleerde drinkwaterisolaten van *P. aeruginosa* met MLST heeft geresulteerd in 11 verschillende sequentietypen. Zeven van deze 11 sequentietypen zijn ook bij patiënten aangetroffen. Deze patiëntisolaten waren aanwezig in de internationale database en in de UMCU database. De 50 drinkwaterstammen van *S. maltophilia* zijn niet verwant met patiëntstammen en kan er dus geen directe link gelegd worden tussen stammen uit drinkwater en beschikbare patiëntstammen. Bij zes (5%) van de in totaal 123 geanalyseerde *A. fumigatus*-stammen is azolresistentie aangetoond. Op basis van de microsatellietanalyse komt één azolresistente stam uit drinkwater overeen met drie klinische stammen uit Nederland en komen vier azoolgevoelige drinkwaterstammen overeen met een klinische azoolgevoelige stam uit Nederland.

Implementatie: mogelijk infectierisico door *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* in drinkwater

De aanwezigheid van kweekbare (en daarmee dus levende) *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in drinkwater direct afkomstig uit het distributiesysteem en de genetische verwantschap die is gevonden tussen drinkwater- en klinische isolaten van *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* maakt dat het niet uit te sluiten is dat deze twee organismen via drinkwater mensen kunnen infecteren. Hoe groot dit risico precies is en hoe dat risico is in verhouding staat tot andere milieubronnen waar deze micro-organismen aanwezig kunnen zijn, is op basis van deze studie niet aan te geven.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport Genetische typering van drinkwaterstammen van opportunistische ziekteverwekkers (BTO-2017.065).

Samenvatting

Een bedreiging voor de Nederlandse drinkwaterkwaliteit is de vermeerdering van opportunistische pathogenen in het drinkwatersysteem. Eerder BTO-onderzoek, waarbij analyses met een selectief kweekmedium en qPCR zijn gebruikt, hebben laten zien dat *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* sporadisch worden aangetroffen in het gedistribueerde Nederlandse drinkwater. De betekenis voor de volksgezondheid van het voorkomen van deze organismen in het drinkwater is echter niet onderzocht en blijft daarom onduidelijk. Het doel van het hier beschreven onderzoek is om te achterhalen of stammen van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* die kunnen worden gekweekt uit drinkwater dat afkomstig is van het distributiesysteem en, indien kweek positief is, wat de genetische overeenkomst is met stammen die zijn geïsoleerd uit patiënten.

De aanwezigheid van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in drinkwater is geanalyseerd tijdens een eerste meetcampagne in 2014 waarbij in negen voorzieningsgebieden op 43 locaties 100l drinkwater en spuiwater is bemonsterd via een standpijp. Een tweede meetcampagne is uitgevoerd in 2016 en was specifiek gericht op de isolatie van *P. aeruginosa*. Bij acht voorzieningsgebieden en op 17 locaties is 100l drinkwater bemonsterd via een aanboring of distributiereservoir. Tijdens de eerste meetcampagne is *P. aeruginosa* sporadisch gekweekt uit drinkwater van drie locaties in drie verschillende voorzieningsgebieden. Tijdens de tweede meetcampagne is *P. aeruginosa* wederom sporadisch gekweekt uit het distributiesysteem (twee voorzieningsgebieden en drie locaties). In totaal zijn 33 *P. aeruginosa* stammen geïsoleerd, opgenomen in de KWR stammencollectie en genetisch vergeleken met patiëntisolaten (genotypering). *S. maltophilia* is in alle geanalyseerde voorzieningsgebieden aangetoond, zowel in het drinkwater als in de spui monsters. In totaal zijn er 1171 typische kolonies van *S. maltophilia* geïsoleerd uit de drinkwatermonsters en 510 kolonies uit de spuiwatermonsters. Hiervan zijn 50 kolonies geselecteerd voor genotypering en vergelijking met patiëntstammen. *A. fumigatus* is ook in de meeste drinkwatermonsters aangetoond. In totaal zijn er 107 *A. fumigatus* stammen geïsoleerd en vervolgens geanalyseerd in het genotyperingonderzoek.

De genetische verwantschap van de geïsoleerde drinkwaterisolaten met patiëntisolaten is bepaald met specifieke typeringsmethoden. Voor *P. aeruginosa* is een gepubliceerde multilocus sequence based typing methode (MLST) gebruikt, die is gebaseerd op het bepalen van de DNA-volgorde van zeven verschillende genen. De informatie van elke stam is vergeleken met de informatie van 5821 stammen in een internationale database van milieu- als patiëntenisolaten. Tevens zijn de drinkwaterstammen vergeleken met stammen geïsoleerd uit cystic fibrose patiënten uit Nederland en die zijn opgenomen in de database van de Universitair medisch centrum Utrecht (UMCU). Genotypering van de 33 geïsoleerde drinkwaterstammen van *P. aeruginosa* met MLST heeft geresulteerd in 11 verschillende sequentietypes. Zeven van deze 11 sequentietypen zijn ook bij patiënten aangetroffen. Deze patiëntisolaten waren aanwezig in de internationale database en in de UMCU database. Sequentietype 252 werd het vaakst aangetroffen in de drinkstammencollectie (18 van de 33 isolaten). Dit sequentietype is in internationale database met 29 isolaten vertegenwoordigd die zowel uit water als uit patiënten zijn geïsoleerd en is in de UMCU database met 3 patiëntisolaten vertegenwoordigd. De drinkwaterstammen van *S. maltophilia* zijn getypeerd door middel van het analyseren van het hele bacteriegenoom (WGS), waarmee op gedetailleerde wijze de mate van verwantschap tussen verschillende stammen is bepaald.

De 50 geselecteerde drinkwaterstammen die met de WGS methode zijn geanalyseerd zijn op basis van het criterium (minder dan 20 genen verschillend), niet verwant en kan er dus geen directe link gelegd worden tussen stammen uit drinkwater en beschikbare patiëntenstammen. De database van *S. maltophilia* bevat echter maar een beperkt aantal patiëntstammen (n=33). *A. fumigatus* stammen zijn genetisch onderscheiden met behulp van een standaardmethode gebaseerd op een microsatellieten analyse (STRf), die is ontwikkeld en uitgevoerd door de onderzoeksgroep medische microbiologie van de Radboud Universiteit Nijmegen. Tevens is elke drinkwaterstam gescreend op azolresistentie, een eerstelijns antischimmelmiddel waarvoor in toenemende mate resistentie optreedt. Bij zes (5%) van de in totaal 123 geanalyseerde drinkwaterstammen is azoolresistentie aangetoond. Op basis van de microsatellietanalyse komt één azoolresistente stam uit drinkwater overeen met drie klinische stammen uit Nederland en komen vier azoolgevoelige drinkwaterstammen overeen met een klinische azoolgevoelige stam uit Nederland.

Overall concluderen we op basis van (i) de aanwezigheid van kweekbare (en daarmee dus levende) *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in drinkwater direct bemonsterd uit het distributiesysteem en (ii) de genetische verwantschap die is gevonden tussen drinkwater en klinische isolaten van *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* dat het niet uit te sluiten is dat deze twee organismen via drinkwater mensen kunnen infecteren. Hoe groot dit risico precies is en hoe dat risico is in verhouding tot andere milieubronnen waar deze micro-organismen aanwezig kunnen zijn, is op basis van deze studie niet aan te geven.

Inhoud

Samenvatting	2
Inhoud	7
1 Inleiding	9
1.1 Aanleiding onderzoek	9
1.2 Genetische typeringsmethoden	10
1.3 Doel van het onderzoek	10
2 Proefopzet	11
2.1 Fasering onderzoek	11
2.2 Meetcampagne	12
2.3 Meetcampagne 2014	14
2.4 Meetcampagne 2016	14
2.5 Genetische typering	14
3 Resultaten	17
3.1 Meetcampagnes	17
3.2 Genotypering	19
4 Discussie	25
4.1 Selectieve kweekmethoden	25
4.2 Genotypering van drinkwaterisolaten	26
4.3 Risicobeoordeling voor aanwezigheid van opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater	26
4.4 Risico van imagoschade	Error! Bookmark not defined.
5 Conclusies en aanbevelingen	30
5.1 Conclusies	30
5.2 Aanbevelingen voor verder onderzoek	32
6 Literatuur	33
Bijlage I Bemonsteringsprotocol	35
Bijlage II Geanalyseerd watervolume meetcampagne 2014	36
Bijlage III Isolaten veldstudie 2014	38
Bijlage IV Geanalyseerd watervolume meetcampagne 2016	43
Bijlage V Isolaten veldstudie 2016	44

Bijlage VI Overzicht getypeerde <i>P. aeruginosa</i> stammen en MLST-analysedata	45
Bijlage VII Overzicht getypeerde <i>S. maltophilia</i> stammen 47	
Bijlage VIII WGS-T <i>S. maltophilia</i>	49
Bijlage IX Overzicht getypeerde <i>A. fumigatus</i> stammen 51	

1 Inleiding

In Nederland wordt het drinkwater gedistribueerd zonder een desinfectieresidu. Voorwaarde om drinkwater zonder desinfectieresidu te distribueren is dat het drinkwater van een volmaakte kwaliteit is. Groei van opportunistische pathogenen vormt mogelijk een bedreiging voor de volmaakte kwaliteit, met name door een steeds verder toenemend aantal mensen met een verzwakt immuunsysteem (door de vergrijzing en verbeterde gezondheidszorg) en die gevoelig zijn voor infectie met opportunistische pathogenen [1]. Daarnaast zal onder invloed van klimaatverandering de drinkwatertemperatuur in de zomer mogelijk toenemen, dat gunstig is voor de vermeerdering van opportunistische pathogenen. Van o.a. *Legionella* is bekend dat de soorten en typen die gerelateerd zijn aan ziektegevallen met name vermeerderen bij een hogere watertemperatuur [2]. *Legionella pneumophila* is de bekendste opportunistische ziekteverwekker die in staat is zich te vermeerderen in biofilms op de leidingwand van drinkwatersystemen [3], maar ook andere opportunistische pathogenen zoals *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* en *Stenotrophomonas maltophilia* kunnen zich in drinkwater vermeerderen [1, 4, 5]. Zo is in Groot-Brittannië recent de aandacht voor *P. aeruginosa* toegenomen, omdat in een ziekenhuis in Belfast drie baby's zijn overleden door een infectie met een *P. aeruginosa* stam die ook in de drinkwaterleidinginstallatie van het ziekenhuis werd aangetroffen. Ook in Nederland leidt het voorkomen van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in ziekenhuizen tot problemen, omdat deze organismen zijn aangetroffen bij ziekenhuisinfecties. De bron waar deze organismen vandaan komen is overigens meestal onduidelijk, maar momenteel kan niet worden uitgesloten dat drinkwater een rol speelt in de verspreiding van deze opportunistische ziekteverwekkers. In een aantal BTO-projecten is onderzocht of *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* voorkomen in het Nederlandse drinkwater. Analyses met een selectief kweekmedium en qPCR hebben laten zien dat deze organismen sporadisch worden aangetroffen in het gedistribueerde Nederlandse drinkwater [6, 7]. De betekenis voor de volksgezondheid van het voorkomen van deze organismen in het drinkwater is echter niet onderzocht en blijft onduidelijk.

1.1 Aanleiding onderzoek

Onderzoek heeft aangetoond dat de genetische diversiteit van legionellabacteriën in drinkwater zeer groot is [8]. Door genetisch onderzoek is verder aangetoond dat in drinkwater, typen die gerelateerd kunnen worden aan patiëntenstammen, vrijwel niet voorkomen [8, 9]. Ook de genetische diversiteit van stammen van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* is groot en kunnen patiëntenstammen genetisch verschillend zijn van stammen die worden gekweekt uit het milieu [10-18]. Tot op heden is het echter onduidelijk of stammen van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* die in het Nederlandse drinkwater voorkomen tot deze milieustammen behoren of ook daadwerkelijk ziekte veroorzaken bij mensen met een verzwakt immuunsysteem. Inzicht of ziekteverwekkende stammen van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* ook in drinkwater aanwezig zijn, is cruciaal om de eerder genoemde levering van volmaakt en betrouwbaar drinkwater te kunnen garanderen en om het vertrouwen van de consument in de drinkwatersector en het imago van de drinkwatersector onverminderd hoog te houden. Tevens is dergelijke informatie belangrijk in een maatschappij waar (i) het aantal personen dat gevoelig is voor infectie met *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* (immunogecomprimeerden) de aankomende jaren verder zal stijgen en (ii) de groeiomstandigheden voor *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in drinkwater

mogelijk verbeteren door hogere drinkwatertemperaturen als gevolg van de opwarming door klimaatverandering.

1.2 Genetische typeringsmethoden

Verschillende op DNA gebaseerde typeringsmethoden zijn ontwikkelend om de genetische verwantschap tussen bacterie-isolaten van (opportunistisch) pathogenen te onderzoeken. Genotyperingsmethoden worden tevens toegepast in epidemiologisch onderzoek om de (milieu)bronnen van ziekteverwekkende stammen op te sporen (bronopsporing). De belangrijkste aspecten van een typeringsmethoden zijn de reproduceerbaarheid en het onderscheidend vermogen. Daarnaast is het van belang om de beschikking te hebben over een uitgebreide referentiedatabase met informatie van een (genetisch) breed scala aan stammen, afkomstig van verschillende milieubronnen. Voor elk van de opportunistische pathogenen die in dit onderzoek zijn geanalyseerd is een afweging gemaakt welke methode het meest geschikt is (zie verder 2.5).

1.3 Doel van het onderzoek

Het doel van het onderzoek is om te achterhalen of stammen van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* die worden geïsoleerd uit het Nederlandse drinkwater (in het voorzieningsbied voor de watermeter), genetisch overeenkomen met stammen die zijn geïsoleerd bij patiënten.

2 Proefopzet

Om inzicht te krijgen in de mate van genetische verwantschap tussen stammen van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* geïsoleerd uit drinkwater en stammen geïsoleerd uit patiënten, zijn met behulp van genotyperingsmethoden de stammen onderling op DNA-niveau vergeleken. Drinkwaterstammen zijn geïsoleerd met behulp van selectieve kweekmethoden uit grootvolumedrinkwatermonsters (ongeveer 100l) en spuiwatermonsters die zijn bemonsterd uit verschillende voorzieningsgebieden in Nederland. Een selectie van stammen van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* zijn vervolgens met specifieke genotyperingsmethoden vergeleken met patiëntstammen. De informatie van deze patiëntstammen is voor *P. aeruginosa* beschikbaar in publieke databases en voor *A. fumigatus* en *S. maltophilia* is respectievelijk samenwerking aangegaan met het Radboud Universitair Medisch Centrum en Universitair Medisch Centrum Groningen.

2.1 Fasering onderzoek

Het onderzoek is gefaseerd in 2014, 2015 en 2016 uitgevoerd. Hieronder is in hoofdlijnen uiteengezet wat de stappen zijn die in de verschillende fasen zijn uitgevoerd.

2.1.1 Fase I (2014)

Fase IA: Een “proof of principle” voor de specifieke kweekmethoden voor *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in combinatie met het concentreren van een groot volume drinkwater (100 liter) en het analyseren van spuiwater.

Fase IB: Een meetcampagne van monsters afkomstig van negen voorzieningsgebieden en per voorzieningsgebied vijf locaties. Voor de bemonstering is een bemonsteringsprotocol opgesteld (bijlage 1).

In het projectplan is na de eerste fase een go/no go moment opgenomen waarbij voor een go minimaal tien specifieke kolonies moeten zijn geïsoleerd met de drie kweekmethodes. De resultaten van fase 1 voldeden aan dit go moment, zodat het onderzoek is vervolgd met fase II.

2.1.2 Fase II (2015 en 2016)

Fase IIA: Een selectie is gemaakt van de meest geschikte gepubliceerde typeringsmethoden voor *A. fumigatus* en *S. maltophilia*. De MLST methode voor typering van *P. aeruginosa* is al beschikbaar vanuit een eerder uitgevoerd BTO onderzoek [19].

Fase IIB: Door het relatief groot aantal drinkwaterstammen dat in de Fase IB van *S. maltophilia* en *A. fumigatus* is geïsoleerd, is de focus van de deze fase gelegd op de isolatie van *P. aeruginosa*.

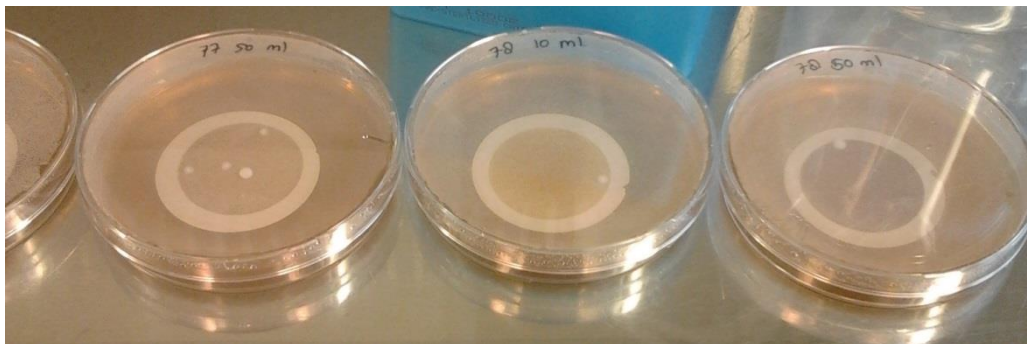
Fase IIC: Genotypering van een selectie van drinkwater- en patiëntstammen van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia*.

2.2 Meetcampagne

2.2.1 “Proof of principle” kweekmethoden

Een voorstudie of een “proof of principle” is uitgevoerd om de toepasbaarheid te beoordelen van de specifieke kweekmethoden voor isolatie van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in combinatie met het concentreren van een groot volume drinkwater (100 liter). Hiervoor is het rendement van elk van de drie micro-organismen bepaald van de kweekmethoden van grootvolumemonsters die met de hemoflow-filtratie zijn geconcentreerd.

Bij aanvang van het onderzoek is voor elk van de doelorganismen de meest veelbelovende kweekmethode geselecteerd op basis van de beschikbare voorschriften van het microbiologische laboratorium en methodieken beschreven in de literatuur. Deze kweekmethoden maken gebruik van groeimedia die qua samenstelling zijn geoptimaliseerd voor groei van deze specifieke bacteriën en schimmels en aan de andere kant groei van andere storende bijgroei zoveel mogelijk beperkt. Voor *P. aeruginosa* is een internationaal gestandaardiseerde kweekmethode voor drinkwater gebruikt (ISO 16266) en voor *A. fumigatus* is een kweekmethode gebruikt die voorheen door het Centraal Bureau voor Schimmels (CBS) is getest voor drinkwater (pers. comm. Dr. A. van Diepingen) (tabel 1). De selectiviteit van het MEA medium voor isolatie van *A. fumigatus* wordt met name gerealiseerd door de incubatie van de agarplaten bij 50°C (figuur 1).



FIGUUR 1: KOLONIE VAN *A. FUMIGATUS* OP MEA MEDIUM NA INCUBATIE BIJ 50°C

Voor detectie van *S. maltophilia* zijn verschillende kweekmedia beschreven waarvan het VMA medium een “verbeterde” versie is van het VIA medium (tabel 1). Om de methode met het hoogste rendement te selecteren zijn voor dit organisme drie verschillende kweekmedia met elkaar vergeleken.

TABEL 1: SELECTIEVE KWEKMETHODEN VOOR *P. AERUGINOSA*, *A. FUMIGATUS* EN *S. MALTOPHILIA*

Organisme	Kweekmedium	Incubatie temp.	Incubatietijd	Antibiotica	Voorschrift/lit. verwijzing
<i>P. aeruginosa</i>	CNA	36°C	24 - 48 uur*	-	LMB-038
<i>S. maltophilia</i>	LLA	30°C	48 - 72 uur*	-	LMB-075
	VIA	30°C	48 - 72 uur*	Vancomycine Imipenem Amphotericin B	[20]
	VMA	30°C	48 - 72 uur*	Vancomycine Meropenem Amphotericin B	[20]
<i>A. fumigatus</i>	MEA	50°C	48 - 72 uur*	Penicilline G Streptomycine	[21]

* Kolonies beoordelen na respectievelijk 24 en 48 of 48 en 72 uur

Voor het bepalen van het rendement van de kweekmethoden zijn twee spike-experimenten uitgevoerd waarbij ongeveer 5×10^3 kve/l van ieder testorganisme is toegevoegd aan 100l drinkwater dat is bemonsterd aan de tap van het KWR laboratorium te Nieuwegein. Het 100l watermonsters wordt met behulp van de hemoflow filtratie teruggebracht tot een restvolume van ongeveer 500ml. Van het concentraat is in drievoud 10ml, 1ml, 0,1ml en 0,1 ml van de 10x verdunning uitgespateld op de verschillende selectieve agarmedia. In tabel 2 zijn de berekende rendementen weergegeven van de drie doelorganismen op basis van de kweekresultaten op de verschillende media. Voor detectie van *S. maltophilia* is het VMA medium het meest geschikt omdat het LLA medium te weinig selectief is en veel bijgroei geeft, terwijl het VIA medium een lager rendement heeft dan het VMA medium. Het rendement van *P. aeruginosa* op het CNA medium en van *A. fumigatus* op het MEA medium was lager dan het rendement van *S. maltophilia* op het VMA medium. De rendementen van alle drie de organismen waren hoger dan 30%, wat voldoende is voor verdere toepassing van de methode op met hemoflow geconcentreerde drinkwatermonsters en spuimonsters.

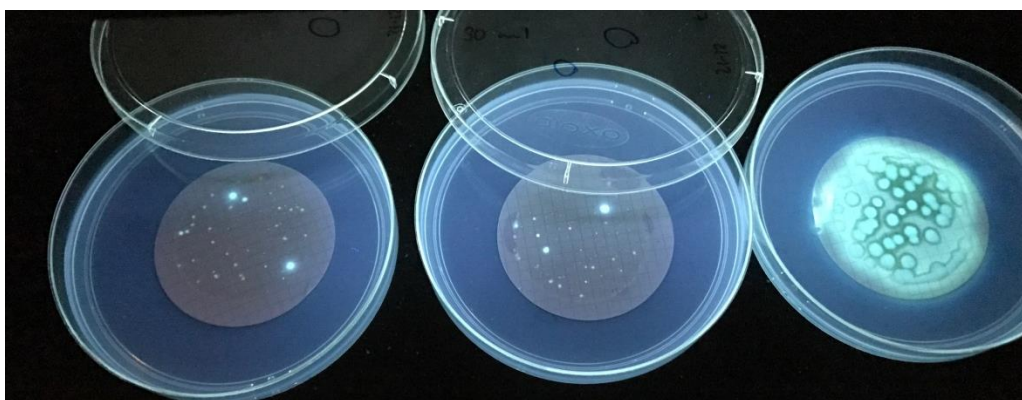
TABEL 2: RENDEMENT VAN DE SELECTIEVE KWEKMETHODEN VOOR *P. AERUGINOSA*, *A. FUMIGATUS* EN *S. MALTOPHILIA* UIT 100L DRINKWATER

Organisme	Kweekmedium	Experiment 1	Experiment 2
<i>P. aeruginosa</i>	CNA	-	38
<i>S. maltophilia</i>	LLA	92	ntb*
	VIA	42	46
	VMA	63	68
<i>A. fumigatus</i>	MEA	56	35

*Agarplaten overgroeid waardoor het niet mogelijk was de platen te beoordelen

2.2.2 Controle van de identiteit van de kolonies

De typische kolonies die zijn gegroeid op het CNA medium voor isolatie van *P. aeruginosa* en het VMA medium voor isolatie van *S. maltophilia* zijn aansluitend gecontroleerd of ze ook behoren tot *P. aeruginosa* of *S. maltophilia*. De verdachte *P. aeruginosa* kolonies zijn met de qPCR methode (voorschrift LMB-65 bijlage 10) geanalyseerd en tevens is bepaald of de kolonies oplichten onder UV-licht (zie figuur 2). De verdachte kolonies op het VMA medium zijn geïdentificeerd met qPCR [22]. De mogelijke *A. fumigatus* kolonies gegroeid op het MEA medium zijn niet verder getypeerd omdat het medium in combinatie met de relatief hoge incubatietemperatuur dusdanig selectief is dat verdere identificatie niet noodzakelijk werd geacht.



Figuur 2: Typische oplichtende *Pseudomonas aeruginosa* bacteriën bij belichting met UV licht

2.3 Meetcampagne 2014

Een meetcampagne is uitgevoerd om met behulp van de selectieve kweekmedia te onderzoeken of bacteriën van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en/of *S. maltophilia* gekweekt kunnen worden uit drinkwater. Bij aanvang van het project is in overleg met de projectgroep een bemonsteringsprotocol opgesteld (Bijlage 1). In de voorzieningsgebieden: Kamerik, Leiduin, Weesperkarspel, Scheveningen, Spannenburg, Zuidwolde, Braakman, Berenplaat en Rosmalen zijn vijf locaties bemonsterd. In de voorzieningsgebieden Weesperkarspel en Leiduin zijn in totaal 8 locaties bemonsterd. Een belangrijk aspect van het onderzoek is dat het drinkwater wordt bemonsterd uit het voorzieningsgebied en dus voor de watermeter. Voor de bemonstering is gebruik gemaakt van een LIDO standpijp. Op elke locatie is conform het bemonsteringsprotocol 100l drinkwater en 20l spuiwater bemonsterend. De spui- en drinkwatermonsters zijn naar het microbiologische laboratorium van KWR getransporteerd en binnen 24 uur geanalyseerd. De drinkwatermonsters zijn met behulp van de hemoflow-filtratie geconcentreerd tot een volume van ongeveer 500ml (200x geconcentreerd). Het concentraat en ook de spui monsters zijn vervolgens verder geconcentreerd over een polycarbonaatfilter (0,2 µm) geïncubeerd op het selectieve medium of rechtstreeks uitgespateld op het medium. Per monster is in drievoud 0,1ml, 1ml, 10ml of in enkelvoud 30ml, 50ml of 100ml geanalyseerd. Het totaalvolume van het geconcentreerde drinkwater en het spuiwater dat is geanalyseerd op de verschillende voedingsmedia is weergegeven in tabel 9 in de bijlage II. Het volume dat per individueel monsters is geanalyseerd, is gebaseerd op de ervaring van de analist en wordt mede gebaseerd op een visuele beoordeling van de troebelheid en mate van filtreerbaarheid. De datum van bemonstering is in bijlage III weergegeven.

2.4 Meetcampagne 2016

In overleg met de projectgroep is de focus voor de meetcampagne van 2016 gelegd op het uitbreiden van de stammencollectie van *P. aeruginosa*. Voor de selectie van onderzoekslocaties is de eerste prioriteit gelegd bij de voorzieningsgebieden en/of locaties waar tijdens de eerste meetcampagne *P. aeruginosa* stammen zijn geïsoleerd. Uit de resultaten van de eerste meetcampagne waarin watermonsters zijn geanalyseerd uit de voorzieningsgebieden: Kamerik, Leiduin, Weesperkarspel, Scheveningen, Spannenburg, Zuidwolde, Braakman, Berenplaat en Rosmalen is gebleken dat uit de spuiwatermonsters relatief weinig doelorganismen zijn gekweekt. Om deze reden is, in overleg met de TG Biologische Activiteit, voor gekozen om in deze tweede meetcampagne alleen 100 l drinkwater bij iedere locatie te bemonsteren. Op verzoek van de projectgroep is het bemonsteringsprotocol aangepast. De monsters zijn deze tweede keer niet genomen met de standpijp, maar het water is bemonsterd of door middel van een aanboring of uit een reservoir in het distributienet. Deze verandering in bemonstering is doorgevoerd om een mogelijk risico op besmetting vanuit het omringende milieu uit te sluiten. De datum van bemonstering is in bijlage IV weergegeven. Per locatie is 100l drinkwater met behulp van hemoflowfiltratie geconcentreerd en vervolgens is het hele concentraat in verschillende volumes gefiltreerd en geïncubeerd op het selectieve medium voor *P. aeruginosa* (Bijlage IV).

2.5 Genetische typering

Bij aanvang van het onderzoek zijn verschillende onderzoekscentra in Nederland bezocht voor kennisuitwisseling en mogelijke samenwerking. Onder andere door overleg met deze experts is een keuze gemaakt welke typeringsmethode voor de drie geselecteerde opportunistische pathogenen het meest geschikt is (Tabel 3). De selectie is gebaseerd op de volgende criteria: (1) onderscheidend vermogen, (2) beschikbare database van milieu- en patiënt gerelateerde stammen/informatie en in mindere mate (3) de kosten van de analyse.

TABEL 3: GECONSULTEERDE MEDISCHE EXPERTS

Experts	Universiteit/Instituut	Expertise/reden contact
Dr. John Rossen	Universiteit medisch centrum Groningen, afdeling medische microbiologie	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
Dr. John Hays en dr. Wil Goessens	Medische Microbiologie & Infectieziekten en Moleculaire Diagnostiek Laboratorium, Erasmus Universitair Medisch Centrum Rotterdam	<i>Aspergillus fumigatus</i> en <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Prof. dr. Paul Verwey en dr. Jacques Meis	Department of Medical Microbiology and Infectious Diseases, Radboud University Nijmegen Medical Center en Canisius Wilhelmina Ziekenhuis Nijmegen	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Dr. Anne van Diepeningen	CBS-KNAW Fungal Diversity Centre, Utrecht	<i>Aspergillus fumigatus</i>
Dr. Peter Sneerburger en dr. Mirjam Hermans	Jeroen Bosch Ziekenhuis, Moleculaire Diagnostiek, s-Hertogenbosch	Patientenstammen van <i>S. maltophilia</i>

2.5.1 *Pseudomonas aeruginosa*

Voor *P. aeruginosa* is een multilocus sequence based typing methode ontwikkeld (MLST) die in 2013 is geïmplementeerd in het microbiologisch laboratorium van KWR [19]. De methode is gebaseerd op het bepalen van de DNA-volgorde van zeven verschillende genen [23]. Op basis van de DNA-volgorde van elk gen wordt een bepaalde code toegekend aan ieder gen, zodat uiteindelijk een code van zeven verschillende cijfers wordt verkregen. Die code wordt vervolgens omgezet tot een sequentietype (ST-type) en stammen die hetzelfde sequentietype bevatten zijn genetisch aan elkaar verwant. Het toekennen van de codes en sequentietype wordt gedaan door de gegevens op te sturen naar een internationale database (<https://pubmlst.org/paeruginosa/>). Tevens geeft de internationale database weer welke *P. aeruginosa* stammen hetzelfde sequentietype hebben. Op dit moment bevat de database de MLST data van 5821 isolaten afkomstig van zeer veel landen. Het onderscheidend vermogen van deze methode is beperkter dan methoden waarbij de gehele genoomsequentie wordt bepaald, maar bijvoorbeeld voor vergelijking van stammen van *L. pneumophila* is de MLST methode nog steeds de standaardmethode om stammen uit het milieu en van patiënten te vergelijken. Daarnaast maakt de zeer uitgebreide ST-database voor *P. aeruginosa* de MLST methode zeer informatief en waardevol.

2.5.2 *Stenotrophomonas maltophilia*

De MLST-methode is ook beschikbaar voor genotypering van *S. maltophilia* [24]. De beschikbare internationale database bevat echter maar de gegevens van 277 isolaten waardoor het beperkte onderscheidende vermogen onvoldoende wordt gecompenseerd. Door de samenwerking met dr. John Rossen was het mogelijk om de drinkwaterstammen van *S. maltophilia* te genotypen door middel van het analyseren van het hele bacteriegenoom met behulp van NGS-analyse [25]. Dit is mogelijk geworden door de grote ontwikkelingen die op het gebied van DNA-sequentieanalyse zijn gemaakt. Op het gebied van kosten per base, snelheid en reproduceerbaarheid zijn de afgelopen jaren grote stappen gezet [26]. Met behulp van "Whole genom sequencing" typering (WGS) is het mogelijk op zeer gedetailleerde wijze de mate van verwantschap tussen verschillende stammen te bepalen. De beschikbare referentiegenoomsequenties is nu echter nog enigszins beperkt maar zal waarschijnlijk snel toenemen in de toekomst.

2.5.3 *Aspergillus fumigatus*

Om *A. fumigatus* stammen te identificeren en onderscheiden is een genotypingsmethode ontwikkeld op basis van microsatellieten [27-29]. Microsatellieten of "short tandem repeats" (STRf) zijn korte DNA-fragmenten met een lengte tot 10 nucleotiden die algemeen voorkomen op het genoom en maar zodanig per isolaat verschillen (positie en aantal) dat het

kan fungeren als genetische merker [30]. De STRf methodiek voor *A. fumigatus* omvat negen verschillende merkers en is ontwikkeld door de onderzoeksgroep medische microbiologie van de Radboud Universiteit Nijmegen. Door samenwerking met deze onderzoekers was het mogelijk alle drinkwaterisolaten te analyseren met de STRf typering en de resultaten te vergelijken met de grote database die deze onderzoeksgroep heeft opgebouwd.

2.5.3.1 Azol resistentie

De ziekte aspergillosis heeft wereldwijd een zeer hoog sterftecijfer bij Immunogecomprobeerde patiënten. De belangrijkste veroorzaker van deze ziekte is infectie met de schimmel *A. fumigatus*. Voor eerste-lijnbehandeling van deze infectie wordt veelal het antischimmel medicijn azol voorgeschreven. Azolen vallen onder de triazolen en omvatten een breed scala aan zeer verwante antischimmelmiddelen met een overeenkomende chemische structuur. Er zijn echter steeds meer meldingen van azolresistente *A. fumigatus* stammen, zowel in ziekenhuissetting alsook in het milieu [31, 32].

Infectie met een *A. fumigatus* resistente stam is zeer problematisch met een sterftecijfer van tussen de 50 en 100% [32]. Dit wordt veroorzaakt doordat alternatieve medicijnen vrijwel niet voorhanden zijn. Voor een risicobeoordeling van de *A. fumigatus* drinkwaterstammen is naast een genotypering ook screening op azolresistentie zeer belangrijk. Om deze reden zijn alle drinkwaterstammen die in dit onderzoek zijn geanalyseerd nader onderzocht op deze resistentie. Er zijn verschillende typen resistentie voor azol en aanvullend is voor elke resistente stammen bepaalt welk type mutatie aanwezig is [31, 33].

3 Resultaten

3.1 Meetcampagnes

3.1.1 Meetcampagne 2014

Voor het onderzoek naar de aanwezigheid van de drie opportunistische ziekteverwekkers hebben zich zeven waterleidingbedrijven (wlb) aangemeld voor het beschikbaar stellen van onderzoekslocaties in één of twee van hun voorzieningsgebieden. In totaal zijn negen voorzieningsgebieden geselecteerd, resulterend in 43 verschillende 100l drinkwater- en spui monsters. In bijlage III is per locatie aangegeven hoeveel kolonies van ieder van de drie bacteriesoorten zijn geïsoleerd uit de geconcentreerde watermonsters en spuiwatermonsters. De meetcampagne heeft een zeer wisselend beeld opgeleverd met betrekking tot het aantal geïsoleerde kolonies per soort.

3.1.1.1 *P. aeruginosa*

P. aeruginosa is incidenteel gekweekt uit drinkwater van drie locaties in drie verschillende voorzieningsgebieden en ook bij drie verschillende drinkwaterbedrijven. In het voorzieningsgebied van Kamerik (Oasen) is op de locatie Bodegraven één kolonie in het drinkwater geïsoleerd, in het voorzieningsgebied van Leiduin en Weesperkarspel (Waternet) zijn op de locatie Rubenstraat zes kolonies uit het drinkwatermonsters geïsoleerd en is in het voorzieningsgebied van Braakman (Evides) op de locatie Oostburg vijf kolonies geïsoleerd in het watermonster en 2 kolonies in het spuiwatermonster. Alleen op de locatie Oostburg is dus zowel in het geconcentreerde drinkwater als ook in het spuiwater *P. aeruginosa* gekweekt. Hoewel dit niet het doel van het onderzoek was, zijn ook de aantallen geïsoleerde kolonies per monsters laag en varieerde omgerekend naar kve/100 liter van 36 kve per 100 liter in drinkwater op locatie Rubenstraat in Amsterdam tot 30 kve per 100 liter spuiwater op locatie Oostburg in Braakman. Het totaal aantal van 14 typische kolonies is zeer gering om een goed beeld te krijgen van de genetische herkomst van de gekweekte *P. aeruginosa* bacteriën uit drinkwater.

3.1.1.2 *S. maltophilia*

In alle geanalyseerde voorzieningsgebieden is zowel in het drinkwater als in de spui monsters *S. maltophilia* gekweekt. Uit deze analyse blijkt dat de bacterie redelijk algemeen voorkomt in het bemonsterde drinkwater. De gedetecteerde aantallen kolonies variëren sterk met maximale aantallen in het drinkwater op locatie kerkweg van Berenplaat (252 kve/l) en in spuiwater van $1,52 \times 10^3$ kve/l op locatie Rubenstraat in Amsterdam tot $1,17 \times 10^3$ kve/l op locatie Gruttersslop in Berenplaat. Opvallend is dat in enkele voorzieningsgebieden alle drinkwatermonsters positief zijn, terwijl in een andere voorzieningsgebied maar op twee van de vijf locaties typische kolonies zijn aangetoond.

In totaal zijn er 1171 typische kolonies van *S. maltophilia* geïsoleerd uit de drinkwatermonsters en 510 kolonies uit de spuiwatermonsters (Tabel 4). Een deel van deze kolonies is nader geïdentificeerd en opgenomen in de KWR stammencollectie voor nader onderzoek. De aantallen kolonies per voorzieningsgebied verschillen aanzienlijk van 12 uit het voorzieningsgebied van Weesperkarspel (3 locaties) tot 650 kolonies uit Berenplaat (Tabel 4). Het resultaat van de meetcampagne is dat er voldoende kolonies zijn geïsoleerd voor een genotyperingonderzoek

3.1.1.3 A. fumigatus

Ook *A. fumigatus* is in de meeste drinkwatermonsters in lage aantallen aangetoond. De aantallen in drinkwater zijn relatief laag met maxima van 92 kve per 100 liter bij Kamerik locatie Bodegraven en 153 kve per 100 liter op locatie Gruttersslop bij Berenplaat. Opvallend is dat maar in enkele spuiwatermonster zeer lage aantallen kolonies van *A. fumigatus* zijn geïsoleerd.

Het resultaat van de meetcampagne is dat er in totaal 154 typische kolonies uit drinkwater en 9 kolonies uit spuiwater zijn geïsoleerd (Tabel 4). De verschillen per voorzieningsgebied zijn minder groot ten opzichte van *S. maltophilia* met 6 kolonies uit het voorzieningsgebied van Scheveningen, Spannenburg en Zuidwolde tot maximaal 44 kolonies in Kamerik. Ook deze campagne heeft voldoende kolonies opgeleverd voor een genotyperingonderzoek.

TABEL 4: KOLONIES VAN *P. AERUGINOSA*, *S. MALTOPHILIA* EN *A. FUMIGATUS* GEÏSOLEERD UIT 5 VERSCHILLENDE GROOTVOLUME DRINKWATER- OF SPUIWATERMONSTERS BEMONSTERD IN VERSCHILLENDE VOORZIENINGSGEBIEDEN. NUMMERS TUSSEN HAAKJES ZIJN HET AANTAL KOLONIES DAT IS GEANALYSEERD MET DE GENOTYPERINGSMETHODE.

DWB	Voorzieningsgebied	<i>P. aeruginosa</i> *		<i>S. maltophilia</i> *		<i>A. fumigatus</i> *	
		drinkwater	spuiwater	drinkwater	spuiwater	drinkwater	spuiwater
Oasen	Kamerik	1 (1)	-	11 (11)	5 (5)	40 (24)	4 (4)
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel	6 (6)	-	99 (12)	15 (10)	9 (8)	-
Waternet	Weesperkarspel ¹	-	-	5 (5)	7 (7)	11 (11)	3 (3)
Dunea	Scheveningen	-	-	25 (12)	5 (5)	6 (6)	-
Vitens	Spannenburg	-	-	351 (22)	9 (9)	6 (6)	-
WMD	Zuidwolde	-	-	201 (40)	6 (6)	6 (6)	-
Evides	Braakman	5 (5)	2 (2)	60 (40)	50 (22)	29 (18)	2 (2)
Evides	Berenplaat	-	-	243 (39)	407 (50)	39 (17)	-
Brabant water	Nuland	-	-	176 (32)	6 (6)	18 (17)	-
	<i>Totaal</i>	12 (12)	2 (2)	1171 (213)	510 (120)	154 (113)	9 (9)

*, aantal positief geïdentificeerde kolonies die opgenomen zijn in de KWR stammencollectie (max. ±5*10 per locatie); 1, 3 grootvolume en spui monsters

3.1.2 Meetcampagne 2016

De aanvullende meetcampagne van 2016 is volledig gericht op het uitbreiden van de drinkwaterstammencollectie van *P. aeruginosa*. Bij acht drinkwaterbedrijven zijn bij één van hun voorzieningsgebieden op één tot drie locaties (17 locaties totaal) 100l drinkwatermonster bemonsterd (tabel 4). In bijlage III is per locatie aangegeven hoeveel kolonies zijn geïsoleerd.

Overeenkomend de eerste meetcampagne is *P. aeruginosa* sporadisch geïsoleerd uit het drinkwater. In het voorzieningsgebied van Breeheer een laag aantal van twee kolonies gevonden, terwijl op locatie IJzendijke van Braakman 91 typische kolonies geteld waarvan er 19 nader zijn geïdentificeerd (Tabel 5). Bij de andere zes voorzieningsgebieden is *P. aeruginosa* niet geïsoleerd uit het bemonsterde drinkwater. Eind 2016 zijn de twee locaties waar tijdens de meetcampagne van 2016 typische kolonies zijn geïsoleerd opnieuw bemonsterd (zie bijlage III), maar uit deze herhalingsmonsters kon *P. aeruginosa* niet worden geïsoleerd. Het resultaat van de twee meetcampagnes is dat er in totaal 33 *P. aeruginosa* kolonies zijn opgenomen in de KWR stammencollectie en getypeerd.

TABEL 5: KOLONIES VAN *P. AERUGINOSA* GEISOLEERD UIT VERSCHILLENDE GROOTVOLUME DRINKWATERMONSTERS BEMONSTERD IN VERSCHILLENDE VOORZIENINGSGEBIEDEN

DWB	Voorzieningsgebied	Locaties	<i>P. aeruginosa</i> ²
Oasen	Kamerik	3	-
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel	1	-
Vitens	Spannenburg	3	-
WMD	Zuidwolde	1	-
Dunea	Scheveningen	2	-
WBG	Appingendam	1	-
Evides	Braakman	3 (+1) ¹	91 (19)
WML	Breehei	1 (+1) ¹	2 (2)
<i>Totaal</i>		17	93 (21)

¹, herbemonstering; ², aantal positief geïdentificeerde kolonies die opgenomen zijn in de KWR stammencollectie

3.2 Genotypering

Van de geïsoleerde kolonies van de drie opportunistische ziekteverwekkers zijn alle *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* drinkwaterstammen en een selectie van stammen van *S. maltophilia* geanalyseerd met één van de geselecteerde genotyperingsmethoden en vervolgens vergeleken met genotypen van patiëntenstammen.

3.2.1 MLST analyse *P. aeruginosa*

De MLST-analyse van de 33 drinkwaterstammen van *P. aeruginosa* die in de twee meetcampagnes zijn geïsoleerd heeft geresulteerd in 11 verschillende sequentietypen (ST) (Tabel 6). Bij één stam is de sequentieanalyse van één gen niet gelukt waardoor op basis van de overige 6 genen er twee mogelijke sequentietypen zijn. Alleen ST-252 is gevonden in twee verschillende voorzieningsgebieden, namelijk die van Leiduin/Weesperkarspel en IJzendijke. De overige sequentietypen zijn slechts in één van de voorzieningsgebieden aangetroffen. In drie voorzieningsgebieden behoren alle geïsoleerde kolonies tot één sequentietype, maar opvallend is dat de stammen uit IJzendijke een grote diversiteit laten zien van zeven verschillende sequentietypen. In Breehei werden twee sequentietypen aangetroffen, waarvan één nog niet in de database is beschreven.

TABEL 6: MLST ANALYSE VAN KOLONIES VAN *P. AERUGINOSA* GEISOLEERD UIT VERSCHILLENDE GROOTVOLUME DRINKWATERMONSTERS BEMONSTERD IN VERSCHILLENDE VOORZIENINGSGEBIEDEN

WLB	Voorzieningsgebied	Sequentietype										
		27	242	252	256	308	385	780	1244	1690	164/ 1407	new
Waternet	Leiduin/Weesperkarspel			6								
Oasen	Kamerik				1							
Evides	Braakman (Oostburg)		7									
	„ (IJzendijke)	1		12		1		1	1	2	1	
WML	Breehei						1					1

Op basis van de beschikbare informatie van de herkomst van de stammen in de referentiedatabase is een inventarisatie gemaakt naar de herkomst van de referentiestammen met hetzelfde sequentietype als aangetroffen in het drinkwater (Tabel 7). Van zeven van de elf aangetroffen sequentietypen in drinkwater zijn overeenkomende referentiestammen in de database aanwezig, afkomstig van de internationale database PubMLST of van de database van het UMC Utrecht. Bij elk van deze zeven sequentietypen die in het drinkwater zijn aangetroffen, zijn, naast milieustammen (water), patiënt-gerelateerde stammen beschreven. Deze drinkwaterstammen zijn dus op basis van MLST-typering niet te onderscheiden van patientenstammen.

ST-252, geïsoleerd uit een watermonster van een locatie in het voorzieningsgebied van Leiduin/Weesperkarspel en Braakman is met 18 isolaten het meest aangetroffen in drinkwater. Dit sequentietype is met 29 stammen vertegenwoordigd in de PubMLST database, waarvan er twee gerelateerd zijn aan een patiënt en zes aan water als isolatiebron. Van de overige stammen in de database met dit sequentietype is de herkomst niet aangegeven. Dit sequentietype is ook aangetroffen bij drie patiënten met cystic fibrose die in de database van het UMC Utrecht zijn opgenomen. ST-242 is zeven keer geïsoleerd uit het drinkwater (Braakman) en dit sequentietype komt zeven keer voor in de internationale database, waarbij een aantal stammen uit bloed of sputum van patiënten is geïsoleerd. ST-27, 308, 385, 780 en 164/1407 zijn met één isolaat uit drinkwater vertegenwoordigd. Deze vijf sequentietypen zijn ook bij patiënten aangetroffen die zijn opgenomen in de PubMLST database. ST-27 is daarnaast ook meerdere malen (17 keer) aanwezig in de database met cystic fibrosepatiënten van UMC Utrecht. Het merendeel van de *P. aeruginosa* isolaten uit drinkwater hebben dus hetzelfde MLST-type als *P. aeruginosa* isolaten uit patiënten. Het is daarom niet uit te sluiten dat deze *P. aeruginosa* stammen ook ziekte kunnen veroorzaken.

Van vier sequentietypes (vijf verschillende drinkwaterstammen) zijn geen referentiestammen in de database opgenomen en voor deze drinkwaterisolaten is dus geen nadere informatie over de genetische overeenkomst met een patiënten- of milieustam beschikbaar. Eén sequentietype, uit het voorzieningsgebied van Breehei, is niet eerder beschreven, waardoor ook voor dit sequentietype geen nadere informatie beschikbaar is over genetische overeenkomst met patiënten- of milieustammen.

TABEL 7: OVEREENKOMST TUSSEN DRINKWATERISLATEN EN ISOLATEN UIT DE PUBMLST EN UMCU DATABASE OP BASIS VAN MLST ANALYSE

MLST type	Drinkwater Isolaten	PubMLST database		UMCU database Isolaten
		Isolaten	Herkomst	
27	1	61	Bloed/sputum/water/onbekend	17
242	7	17	Bloed/sputum/onbekend	0
252	18	29	Water/onbekend/2 patientenstammen	3
256	1	1	Onbekend	0
308	1	134	Bloed/sputum/water/onbekend	0
385	1	10	Bloed/sputum/water/onbekend	0
780	1	2	Sputum	0
1244	1	1	Onbekend	1
1690	2	1	Onbekend	0
164/1407	1	164:16 1407:1	Bloed/sputum/onbekend Sputum	3 0
nieuw	1	0	-	0

3.2.2 WGS *Stenotrophomonas maltophilia*

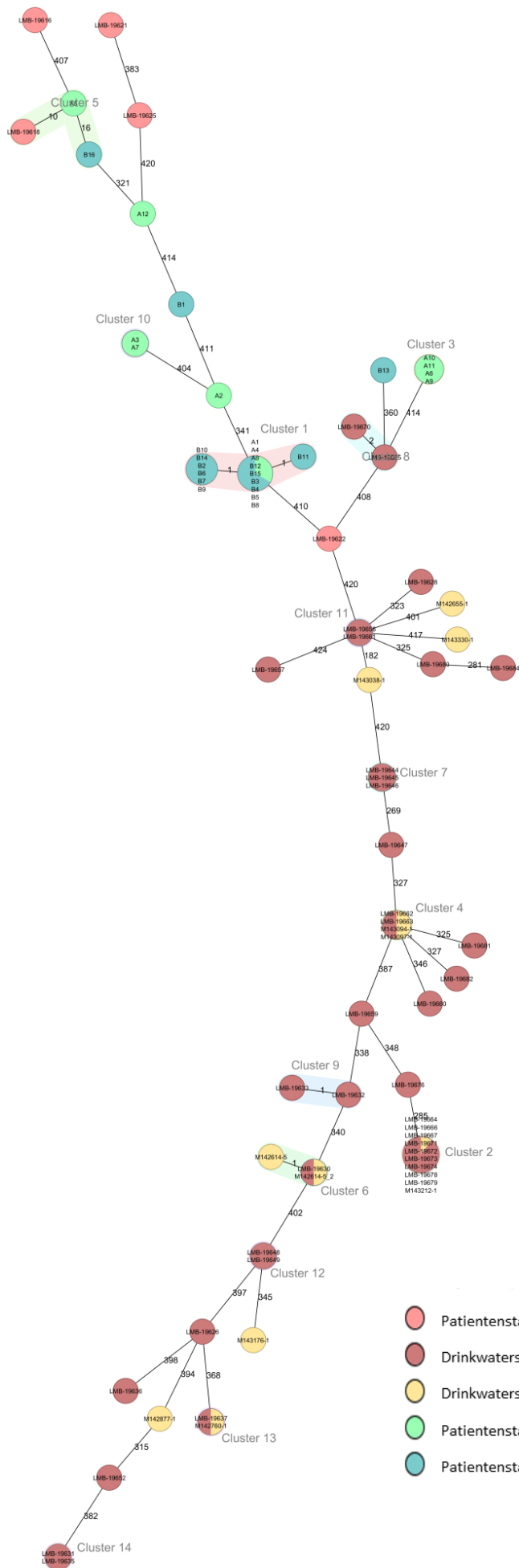
Voor het analyseren van de genetische verwantschap van *S. maltophilia* isolaten is van elke stam het hele genoom bepaald (whole genome sequencing, WGS). Van de 333 beschikbare drinkwaterisolaten zijn 50 stammen getypeerd. De stammen zijn geselecteerd zodat ze representatief zijn voor de verschillende geanalyseerde voorzieningsgebieden en locaties (Bijlage VII). Naast de 50 drinkwaterstammen zijn er ook vijf patiëntenstammen geanalyseerd die door het Jeroen Bosch Ziekenhuis beschikbaar zijn gesteld. De WGS analyses zijn uitgevoerd door het UMCG.

De WGS data van de drinkwaterstammen (11 geanalyseerd in 2015 en 39 in 2016) en de vijf patiëntenstammen van het Jeroen Bosch ziekenhuis, zijn in een analyse vergeleken met 28 patiëntenstammen van UMC Groningen. In de analyse zijn de DNA-sequenties van 476 genen geanalyseerd. De genetische verwantschap van de *S. maltophilia* stammen is in een dendrogram of verwantschapsstamboom weergegeven (figuur 2). De afstand en mate van overeenkomst/verschil tussen stammen/clusters is aangegeven als "het aantal verschillende genen". Een gen tussen twee stammen/clusters is verschillend als >1 nucleotide verschillend is. Een cluster van stammen bestaat uit volledig genetisch identieke stammen (op basis van de 476 genen), weergegeven als een groepsbolletje, of een groter samengesteld cluster van identieke clusters die zijn samengevoegd als ze onderling <20 genen verschillen (criteria op basis van pers. toelichting dr. John Rossen, UMCG).

Deze analyse heeft geleid tot 14 verschillende clusters van verwante stammen. Hieronder wordt besproken welke stammen in ieder van de 14 clusters aanwezig waren:

- Cluster 1: 16 patiëntenstammen (alle uit de database van het UMC Groningen);
- Cluster 2: 10 drinkwaterstammen (1 uit Berenplaat en 9 uit Braakman);
- Cluster 3: 4 patiëntenstammen (alle uit de database van het UMC Groningen);
- Cluster 4: 4 drinkwaterstammen (alle uit Holysloot Weesperkarspel);
- Cluster 5: 3 patiëntenstammen (2 uit database UMC Groningen en 1 uit Jeroen Bosch ziekenhuis 's Hertogenbosch);
- Cluster 6: 3 drinkwaterstammen (1 uit Nieuwkoop, Kamerik en 2 uit Zevenhoven, Kamerik);
- Cluster 7: 3 drinkwaterstammen (2 uit Leidschendam, Scheveningen en 1 uit Sloten, Spannenburg);
- Cluster 8: 2 drinkwaterstammen (beide uit Oostburg, Braakman);
- Cluster 9: 2 drinkwaterstammen (beide uit Amsterdam, menggebied Leiduin en Weesperkarspel);
- Cluster 10: 2 patiëntenstammen (beide uit de database van UMC Groningen);
- Cluster 11: 2 drinkwaterstammen (beide uit Middelveenseweg, Zuidwolde);
- Cluster 12: 2 drinkwaterstammen (beide uit Makkum, Spannenburg);
- Cluster 13: 2 drinkwaterstammen (beide uit Den Haag, Scheveningen);
- Cluster 14: 2 drinkwaterstammen (beide uit Amsterdam, menggebied Leiduin en Weesperkarspel).

In de dendrogram zijn geen (samengestelde)clusters aanwezig die bestaan uit zowel drinkwater- en patiëntenstammen. Op basis van deze genetische analyse is dus geen aantoonbare verwantschap waargenomen tussen drinkwaterstammen en de beschikbare patiëntenstammen van het UMCG en/of het Jeroen Bosch Ziekenhuis. Hierbij moet wel worden opgemerkt dat deze conclusie is gebaseerd op een beperkt aantal beschikbare genomdata van patiëntenstammen.



FIGUUR 2: WGS-TYPERING VAN DRINKWATER- EN PATIENTENSTAMMEN VAN *S. MALTIPHILIA*

(IN BIJLAGE VIII IS EEN UITVERGROTING VAN DEZE DENDROGRAM WEERGELEGGEN)

De drinkwaterstammen die bij elkaar groeperen in een cluster, zijn overwegend geïsoleerd uit hetzelfde voorzieningsgebied (clusters 4,6, 7, 8, 9, 11, 12, 13 en 14). Alleen in cluster 2 en cluster 7 groeperen stammen van twee verschillende voorzieningsgebieden bij elkaar. In cluster 2 zijn dit negen stammen uit Braakman en één stam uit Berenplaat. In cluster 7 zijn dit twee stammen uit Scheveningen en één stam uit Spannenburg. De genetische diversiteit van de drinkwaterstammen in de verschillende bemonsterde voorzieningsgebieden is op basis van deze WGS analyse dus relatief groot.

In vier clusters zijn patiëntenstammen samengevoegd waarbij in cluster 5 twee stammen van het UMCG met één stam van het Jeroen Bosch Ziekenhuis bij elkaar groeperen en dus verwant zijn. In de overige vier clusters zijn alleen patiëntenstammen van UMCG aanwezig.

3.2.3 *A. fumigatus*

3.2.3.1 Azoolresistentie

Alle beschikbare 122 (113 + 9) *A. fumigatus* isolaten zijn geanalyseerd op de aanwezigheid van azoolresistentie. Van deze collectie was het mogelijk om er 107 opnieuw op te kweken door het laboratorium van Radboud Universiteit Nijmegen en genetisch te typeren. Het risico van azoolresistentie is eerder toegelicht (2.5.3.1). Een overzicht van de drinkwaterstammencollectie is weergegeven in bijlage IX.

In zes drinkwaterstammen (5%) is azoolresistentie aangetoond (tabel 8). Deze stammen zijn dus niet behandelbaar met (Tri)azoolmedicijnen en vormen daardoor een groter gevaar voor de volksgezondheid, waardoor deze stammen in een risicobeoordeling van groter belang zijn dan azoolgevoelige stammen. Het type resistentie is alleen van wetenschappelijk belang maar niet voor een risicobeoordeling. De zes stammen zijn geïsoleerd uit vijf verschillende voorzieningsgebieden en lijken dus verspreid voor te komen.

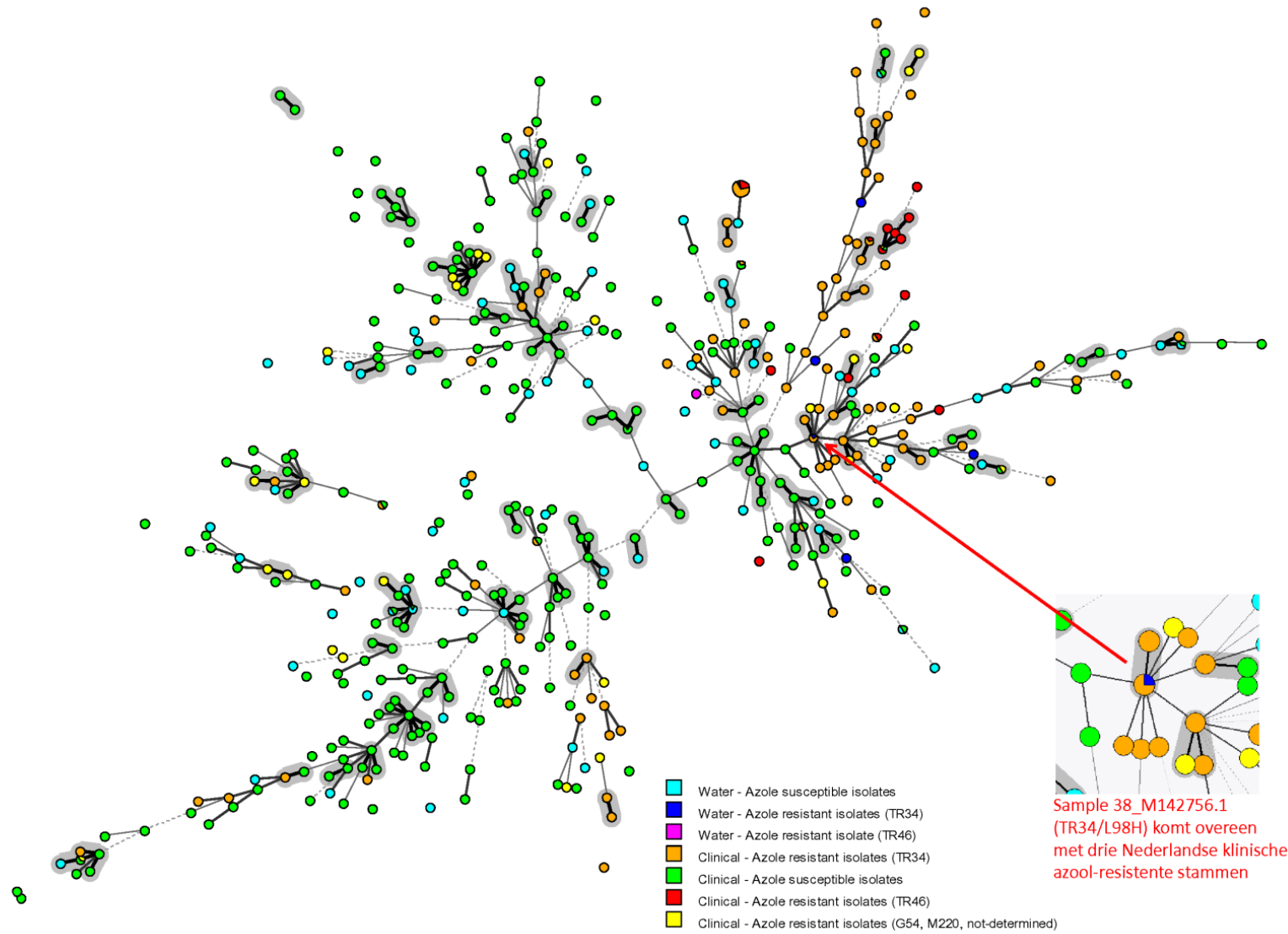
TABEL 8: TRIAZOLE RESISTENTIE BIJ DRINKWATERSTAMMEN

Nr.	WLB	Voorzieningsgebied	Azool/antischimmelmiddel			Type resistentie (mutaties)
			Itraconazol	Voriconazole	Posaconazole	
38	Dunea	Scheveningen	groei	groei	groei	TR34/L98H/T289A
50	WMD	Zuidwolde	geen groei	groei	groei	TR34/L98H
61	Waternet	Weesperkarspel	groei	groei	groei	TR46/Y121F/T289A
63	Waternet	Weesperkarspel	zwakke groei	groei	groei	TR34/L98H
106	Evides	Berenplaat	groei	groei	zwakke groei	TR34/L98H
109	Brabant Water	Rosmalen	geen groei	geen groei	groei	TR34/L98H

3.2.3.2 Microsatelliettypering

Naast azoolresistentie is de genetische verwantschap tussen *A. fumigatus* stammen uit drinkwater en patiënten met microsatelliettypering onderzocht. De resultaten van de deze microsatellietanalyse van Nederlandse klinische isolaten en 123 drinkwaterisolaten met en zonder Azool-resistentie zijn weergegeven in een verwantschapsboom (figuur 3). In de figuur zijn een paar clusters aanwezig waarbij drinkwater- en patiëntenstammen een overeenkomend microsatellietpatroon hebben.

In een cluster met azoolresistente stammen komt één stam uit het voorzieningsgebied van Scheveningen genetisch overeen met drie azoolresistente stammen uit patiënten. In vier andere clusters komen vier azoolgevoelige drinkwaterstammen overeen met patiëntenstammen. Twee van deze vier drinkwaterstammen zijn geïsoleerd uit Kamerik (Nieuwkoop), één uit Amsterdam en één uit Scheveningen. In totaal zijn er dus vijf van de 123 geteste drinkwaterstammen (4,0%) die genetisch verwant zijn met patiëntenstammen.



FIGUUR 3:
MICROSATELLIET-
TYPERING VAN
DRINKWATER-
STAMMEN EN
PATIËNTENSTAM-
MEN

4 Discussie

4.1 Selectieve kweekmethoden

Voor het isoleren van de drie geselecteerde opportunistische ziekteverwekkers uit de spui- en drinkwatermonsters zijn selectieve kweekmethoden toegepast in combinatie met een geavanceerde concentreringsmethoden (hemoflow filtratie). Deze kweekmethoden zijn geoptimaliseerd om de doelorganismen selectief te laten groeien op het agarmedium. Tevens moet de methode zo optimaal mogelijk groei van andere micro-organismen, de zogenaamde stoorflora, verhinderen. De stoorflora kan de groei van het doelorganisme namelijk mogelijk negatief beïnvloeden. Voor *P. aeruginosa* is een internationaal gestandaardiseerde kweekmethode voor drinkwater gebruikt (ISO 16266), voor *A. fumigatus* het MEA kweekmedium en incubatie bij 50°C en voor *S. maltophilia* het VMA medium.

De agarplaten voor de selectieve kweek van *P. aeruginosa* liet veel bijgroei van andere bacteriën dan *P. aeruginosa* zien. Deze bacteriekolonies lichten soms ook licht op als ze werden blootgesteld aan UV-licht. Een daarop volgende identificatie met behulp van qPCR voor *P. aeruginosa* gaf uitsluitsel over de identiteit van de kolonie en of deze dus behoorde tot *P. aeruginosa*. Hoewel het agarmedium de internationale standaard is voor selectieve kweek van *P. aeruginosa*, laten deze resultaten zien dat het agarmedium minder geschikt is om het aantal *P. aeruginosa* in drinkwater betrouwbaar kwantitatief te bepalen. Het kan namelijk zijn dat op sommige platen *P. aeruginosa* overgroeit is door andere bacteriesoorten, waardoor *P. aeruginosa* niet kon worden gedetecteerd. In dat geval is het resultaat dus vals-negatief, waarmee een onderschatting kan optreden van het aantal monsters dat *P. aeruginosa* bevat. Tevens kan een deel van de kolonies worden gemist. In dat geval is het monster terecht positief voor *P. aeruginosa*, maar wordt het aantal *P. aeruginosa* in het monster onderschat. Detectie van *P. aeruginosa* met een andere detectiemethode zoals bijvoorbeeld qPCR heeft dit bezwaar niet. Daarentegen is het dan niet mogelijk het gedetecteerde *P. aeruginosa* DNA genetisch te typeren en maakt de methode ook geen onderscheid tussen dode en levende bacteriën. Het is daarom raadzaam om bij dit type projecten zowel kweek- als qPCR-analyses in te zetten.

De toegepaste kweekmethode met VMA medium bleek goed selectief voor *S. maltophilia*. Daarnaast is weinig bijgroei van andere bacteriën op de agarplaten waargenomen, waardoor de gedetecteerde kolonieaantallen (koloniegetal) betrouwbaar zijn.

Ook de kweekmethode voor isolatie van *A. fumigatus* was zeer selectief en had vrijwel geen last van bijgroei van andere bacterie- of schimmelsoorten. Dit wordt waarschijnlijk voornamelijk gerealiseerd door de incubatietemperatuur van 50°C. Bij deze relatief hoge temperatuur zijn vrijwel geen bacteriën en schimmels uit drinkwater in staat te groeien. Het bleek echter wel lastig om de identiteit van de verschillende kolonies met behulp van de specifieke qPCR voor *A. fumigatus* te bepalen. Dit werd veroorzaakt doordat het niet mogelijk bleek om op een relatief eenvoudige wijze DNA uit deze schimmelkolonies te extraheren. Daarom is besloten om de kolonies zonder nadere identificatie op te sturen voor genetische typering. Van de in totaal 122 mogelijke *A. fumigatus* isolaten die bij KWR zijn ingevroren, konden 111 stammen opnieuw worden gekweekt opgekweekt door het laboratorium van Radboud Universiteit Nijmegen. Van deze collectie bleken vier stammen geen *A. fumigatus* te zijn; drie van die vier stammen behoorden tot een andere schimmel, terwijl de vierde stam een bacteriesoort was. Uiteindelijk bleek het dus mogelijk om 107 van

de 122 stammen (88%) van de isolaten te typeren. Dit laat dus zien dat de gebruikte kweekmethode goed selectief is voor *A. fumigatus*.

4.2 Genotypering van drinkwaterisolaten

De genetische vergelijking van patientenstammen met stammen geïsoleerd uit drinkwater geeft informatie over het mogelijke risico ("pathogenic potential") van de aanwezigheid van deze opportunistische ziekteverwekkers in het drinkwater van de verschillende bemonsterde voorzieningsgebieden. Deze genetische vergelijking wordt gedaan door de stammen uit de verschillende milieubronnen op DNA-niveau met elkaar te vergelijken. Doordat de afgelopen decennia de methoden in het veld van de moleculaire microbiologie elkaar snel opvolgen, zijn in het verleden zeer veel verschillende methodieken toegepast (PCR-based fingerprinting, pulsed-field gel elektroforese, multilocus variable number tandem repeat analysis, multilocus sequence typing en whole genome sequencing) om stammen van micro-organismen te typeren. Het grootse verschil tussen deze methodieken is in welke mate ze in staat zijn verschillende stammen te onderscheiden, i.e. het onderscheidende vermogen. In de loop van de jaren zijn de methodieken ook steeds geavanceerder geworden en zo ook het onderscheidende vermogen waarbij met de "whole genome sequencing" methodiek het maximaal haalbare onderscheidende vermogen is bereikt, maar het is daarbij nog veelal de vraag bij welk onderscheidend vermogen (percentage overeenkomst) een milieu-isolaat qua virulentie identiek is aan de patiëntisolaat. Een eerder genoemde DNA-typeringstechniek (MLST) wordt bijvoorbeeld toegepast om de milieubron te achterhalen van de *L. pneumophila* stam die bij een patiënt de ziekte heeft veroorzaakt. Daarbij wordt gericht in de omgeving van de patiënt bemonsterd en de daarbij aangetroffen milieu-isolaten met MLST te vergelijken met de isolaat uit de patiënt [34, 35]. Dergelijke typeringsmethoden kunnen ook worden gebruikt om te achterhalen of stammen die in het milieu worden aangetroffen (maar niet direct gerelateerd aan de omgeving van de patiënt) genotypisch vergelijkbaar met stammen die bij patiënten worden aangetroffen, zoals in de hier beschreven studie is gedaan. In dat geval betekent het aantreffen van hetzelfde genotype in het milieu niet dat die milieustam verantwoordelijk is geweest voor het desbetreffende ziektegeval (de monsters zijn immers niet uit de omgeving van de patiënt genomen), maar laat wel zien dat een dergelijke milieustam in potentie de mogelijkheid heeft om iemand ziek te maken..

De betrouwbaarheid van een dergelijke vergelijkingsanalyse wordt in dit geval mede bepaald door de omvang van de vergelijking, dat wil zeggen door het aantal stammen dat uit het milieu is geïsoleerd en door het aantal patiëntstammen dat in de database aanwezig is en waarmee de stammen uit het milieu worden vergeleken. Om deze reden is de keuze voor de typeringsmethodiek in dit onderzoek gemaakt op basis van het onderscheidende vermogen van de methode en beschikbaarheid van voldoende patientenstammen om een betrouwbare genetische vergelijking te kunnen maken.

4.3 Betekenis van aanwezigheid van opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater

Het risico van de aanwezigheid van een opportunistische pathogeen in drinkwater wordt naast de genetische verwantschap natuurlijk ook bepaald door hoe algemeen het organisme in het milieu voorkomt en in welke aantallen. Andere belangrijke aspecten voor een risicobeoordeling zoals transmissieroutes en infectieuze dosis zijn beschreven in een eerder rapport [1]. Hoewel het onderzoek door middel van het concentreren en isoleren van de organismen uit groot volume drinkwater- en spuiwatermonsters een minder betrouwbare kwantitatieve methodiek is (doordat de opbrengst van deze methode voor opportunistische pathogenen onbekend is), geeft het wel een beeld over de mate waarin de onderzochte opportunistische pathogenen in drinkwater voorkomen. Ook de vrij omvangrijke meetcampagnes die zijn uitgevoerd geven naar verwachting een redelijk goed beeld over de

aanwezigheid van de onderzochte micro-organismen in de verschillende watertypen en voorzieningsgebieden.

4.3.1 *P. aeruginosa*

In twee meetcampagnes in 2014 en 2015 is in vier van de elf onderzochte voorzieningsgebieden *P. aeruginosa* geïsoleerd in een concentratie van 1 tot max. 91 kolonies uit 100l drinkwater of spuiwater. Op basis van het aantal positieve voorzieningsgebieden en het aantal geïsoleerde kolonies, is *P. aeruginosa* een sporadisch voorkomend micro-organismen in water. Genotypering met behulp van MLST analyse van 33 geïsoleerde drinkwaterstammen heeft geresulteerd in 11 verschillende sequentietypen. De MLST-typen zijn bepaald op basis van een vergelijking met een internationale database die de informatie van 5821 stammen bevat en de database van het Universitair Medisch Centrum Utrecht. De analyse laat zien dat het merendeel van de drinkwaterisolaten een MLST type heeft dat ook bij patientenstammen is angetroffen zowel bij stammen in de internationale database als ook in de database van het UMCU. De MLST die het meest veelvuldig is aangetoond in drinkwater (ST252) is zowel in water als een enkele keer bij patiënten geïsoleerd. Door de genetische verwantschap op basis van de zeven geanalyseerde genen met klinische isolaten is het niet uit te sluiten dat een deel van de in drinkwater aangetroffen *P. aeruginosa* ziekte bij mensen met een verzwakt immuunsysteem een infectie kan veroorzaken.

Het is moeilijk om een uitspraak te doen over de minimale infectieuze dosis voor deze opportunistische ziekteverwekker, omdat dosisresponsrelaties niet zijn onderzocht en ook afhangt van de immunestatus van de persoon die met het organisme in aanraking komt. Daarnaast is onduidelijk of deze micro-organismen uit het distributiesysteem zich weten te vermeerderen in de drinkwaterinstallatie. Daarom is het op basis van deze resultaten en de huidige wetenschappelijke kennis om betrouwbare uitspraken te doen over het precieze risico van de aanwezigheid van *P. aeruginosa* in gedistribueerd drinkwater. De informatie dat het genotype van een deel van de drinkwaterstammen vergelijkbaar is met het genotype van patiëntstammen geeft wel aan dat *P. aeruginosa* in drinkwater een potentieel risico vorm voor een klein deel van de populatie (mensen met een verzwakt immuunsysteem).

4.3.2 *A. fumigatus*

A. fumigatus is in elk van de negen geanalyseerde voorzieningsgebieden aangetoond. In de meeste geanalyseerde drinkwatermonsters en enkele spuiwatermonsters hebben zich kolonies gevormd op de selectieve kweekmedia in aantallen variërend van enkele tot maximaal 153kve uit 100l drinkwater. In drinkwater is *A. fumigatus* dus een redelijk algemeen voorkomend micro-organismen, maar wel in relatief lage aantallen (max. ≈ 1 kve/l).

De drinkwaterisolaten van *A. fumigatus* zijn met twee analyses getypeerd. Een actueel opkomend probleem in de bestrijding van microbiologische infectieziekten is het ontstaan van (multi)resistente tegen antibiotica in het geval van bacteriën en resistentie tegen antischimmelmiddelen uit de groep van azolen bij schimmels. In totaal zijn 107 *A. fumigatus* drinkwaterisolaten geanalyseerd op een azool resistentie. Zes isolaten (5%) zijn daarbij resistent gevonden tegen azolen en deze stammen waren afkomstig uit vijf verschillende voorzieningsgebieden. Onderzoekers van de Radboud universiteit en laboratorium (zie ook 2.5) hebben aangegeven dat dit percentage overeenkomt met isolaten die uit andere milieubronnen worden gekweekt. Deze zes stammen zijn potentieel gevaarlijker dan de niet resistente stammen, aangezien schimmelinfecties alleen met azoolmiddelen zijn te bestrijden.

Uit de microsatellietanalyse, een genetisch typeringsmethode, is gebleken dat de meeste drinkwaterisolaten niet groeperen met patiëntisolaten en dus genetisch minder verwant zijn. Van de zes azoolresistente stammen komt echter één drinkwaterstam genetisch overeen met drie azoolresistente stammen van patiënten. Van de azoolgevoelige stammen zijn vier isolaten genetisch verwant met patiëntstammen. Van de 107 geanalyseerde drinkwaterstammen zijn er dus vijf stammen genetisch verwant met patiëntstammen (5%) waarvan er één ook azoolresistent is.

Evenals is opgemerkt voor *P. aeruginosa*, is ook het inschatten van het risico van de aanwezigheid van *A. fumigatus* in relatief lage aantallen in drinkwater moeilijk. Het is wel zo dat sporen van *A. fumigatus* alom aanwezig zijn in de lucht, waardoor mensen relatief vaak worden blootgesteld aan *A. fumigatus*. Echter, in het drinkwaterdistributiesysteem zijn deze micro-organismen in staat om zich te vermeerderen (BTO 2014.217(s)), waardoor bij verneveling mensen ook worden blootgesteld aan vegetatieve cellen van *A. fumigatus*. In hoeverre dat een verhoogd risico is, zou verder onderzocht kunnen worden in middels een literatuuronderzoek.

4.3.3 *S. maltophilia*

In alle voorzieningsgebieden en in het merendeel van de onderzochte locaties (81%) is *S. maltophilia* geïsoleerd. Hiermee is aangetoond dat *S. maltophilia* in drinkwater een relatief algemeen voorkomend micro-organisme is. Het aantal kolonies dat per monster is geïsoleerd is echter laag, variërend van enkele kolonies tot max. 650 kolonies per 100l. Om de verwantschap met klinische isolaten te analyseren is van 50 kolonies het gehele genoom gesequenced (WGS). Hieruit bleek dat de drinkwaterstammen niet verwant zijn met de (beperkte) beschikbare patiëntstammen van het Universitair medisch centrum Groningen (UMG). De beschikbare referentiedatabase (nationaal en internationaal) met klinische isolaten (totaal 33) is echter beperkt. Hierdoor is het lastig om een betrouwbare uitspraak te doen over de genetische verwantschap tussen isolaten van *S. maltophilia*. Het is waarschijnlijk dat de WGS database voor *S. maltophilia* bij het UMG en ook Internationaal zich de komende jaren zal uitbreiden. Het is dan ook zinvol om de vergelijking van de drinkwaterstammen met de beschikbare klinische isolaten over enkele jaren te herhalen.

Doordat een relatief lage genetische verwantschap tussen drinkwaterisolaten en patiëntisolaten is aangetroffen, is het risico van *S. maltophilia* in drinkwater, op basis van de nu beschikbare kennis, beperkt ondanks dat dit organisme veelvuldig met de kweekmethode in drinkwater is aangetoond. In vergelijking met *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* wordt *S. maltophilia* ook weinig aangetroffen bij ziekenhuisinfecties (1), wat een verdere aanwijzing is dat dit organisme minder virulent is. Desondanks is in het verleden wel een kleine uitbraak van *S. maltophilia* onder vroeggeboren baby's in Nederland geweest, waarbij de patiëntstammen genetisch verwant waren aan stammen uit het drinkwater [38].

4.3.4 Risico voor de volksgezondheid

Het doel van dit onderzoek was om na te gaan of isolaten van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* genetisch verwant zijn met isolaten uit patiënten. De resultaten van deze studie hebben laten zien dat er verschillen zijn tussen de mate waarin drinkwaterisolaten van de drie onderzochte opportunistische ziekteverwekkers genetisch verwant zijn met patiëntisolaten. De meeste isolaten van *P. aeruginosa* die zijn aangetroffen in drinkwater zijn genetisch verwant met patiëntisolaten, slechts een klein deel van de *A. fumigatus* isolaten uit drinkwater waren genetisch verwant met patiëntisolaten, terwijl geen genetische verwantschap tussen *S. maltophilia* isolaten uit drinkwater en patiënten kon worden aangetoond.

De achterliggende reden om deze verwantschap te onderzoeken, is dat genetische verwantschap tussen drinkwater- en klinische isolaten een risicofactor is dat mede bepalend is of de aanwezigheid van deze opportunistische ziekteverwekkers een risico vormen voor de volksgezondheid. Een andere risicofactor is de aantallen waarin drinkwaterisolaten, die genetisch verwant zijn met klinische isolaten, aanwezig zijn in het drinkwater. De resultaten verkregen in deze studie hebben laten zien dat de aantallen van dergelijke isolaten van *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* laag zijn in het gedistribueerde drinkwater, waarbij *A. fumigatus* in hogere aantallen en vaker in het drinkwater wordt gedetecteerd dan *P. aeruginosa*. Het ontbreekt op dit moment echter aan dosis-respons relaties van deze micro-organismen voor mensen met een verzwakt immuunsysteem, waardoor het moeilijk is om aan te geven of deze aantallen wel of geen risico vormen voor mensen met een (ernstig) verzwakt immuunsysteem. Daarnaast zorgt de aanwezigheid van dergelijke opportunistische pathogenen ervoor dat de drinkwaterinstallatie via het distributiesysteem kan worden gevoed met stammen die genetisch verwant zijn aan klinische stammen. De uitgroei van klinisch relevante stammen in de drinkwaterinstallatie kan tot volksgezondheidskundige problemen leiden, zoals kleine uitbraken van *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* in het verleden hebben laten zien [38-40].

Overall concluderen we op basis van (i) de aanwezigheid van kweekbare (en daarmee dus levende) *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in drinkwater direct bemonsterd uit het distributiesysteem en (ii) de genetische verwantschap die is gevonden tussen drinkwater en klinische isolaten van *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* dat het niet uit te sluiten is dat deze twee organismen via drinkwater mensen kunnen infecteren. Hoe groot dit risico precies is en hoe dat risico is in verhouding tot andere milieubronnen waar deze micro-organismen aanwezig kunnen zijn, is op basis van deze studie niet aan te geven.

5 Conclusies en aanbevelingen

5.1 Conclusies

- De opportunistische ziekteverwekkers *P. aeruginosa*, *S. maltophilia* en *A. fumigatus* kunnen (sporadisch) voorkomen in drinkwater bemonsterd direct uit het distributiesysteem;
- De aangetoonde aantallen van deze drie micro-organismen in het geanalyseerde drinkwater zijn laag, maar het is niet ondenkbaar dat eventuele kolonisatie van drinkwaterinstallaties in gebouwen door deze drie opportunistische ziekteverwekkers optreedt vanuit het aangeleverde drinkwater uit het distributiesysteem;
- Drinkwaterstammen van *P. aeruginosa* hebben een grote mate van verwantschap met patiëntstammen;
- Drinkwater stammen van *A. fumigatus* hebben een zeer beperkte of geen verwantschap met patiëntstammen, maar *A. fumigatus* stammen die resistent zijn tegen het enige werkzame antibioticum voor schimmels (azolen) zijn wel aangetroffen.
- Drinkwaterstammen van *S. maltophilia* hebben geen verwantschap met patiëntstammen die in de database aanwezig zijn.
- Overall concluderen we op basis van (i) de aanwezigheid van kweekbare (en daarmee dus levende) *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en *S. maltophilia* in drinkwater direct bemonsterd uit het distributiesysteem en (ii) de genetische verwantschap die is gevonden tussen drinkwater en klinische isolaten van *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* dat het niet uit te sluiten is dat deze twee organismen via drinkwater mensen kunnen infecteren

5.1.1 *P. aeruginosa*

- Specifieke kolonies zijn in de twee meetcampagnes geïsoleerd op 5 verschillende locaties van 4 voorzieningsgebieden in een concentratie van 1 tot max. 91 kolonies per locaties;
- Genotypering met behulp van MLST analyse van de 33 geïsoleerde drinkwaterstammen heeft geresulteerd in 11 verschillende sequentietypes op basis van een internationale databases waarin in totaal 5821 stammen zijn opgenomen.
- In drie van de vijf voorzieningsgebieden waarin *P. aeruginosa* is geïsoleerd is één sequentietype aangetoond en in één voorzieningsgebied respectievelijk twee en 7 sequentietypen.
- Onder de gedetecteerde sequentietypen is één sequentietype aangetoond die niet eerder in de database is beschreven;
- Van zeven sequentietypen die zijn geïdentificeerd zijn in de database overeenkomende stammen opgenomen die zijn geïsoleerd uit patiënten. Er is geen informatie beschikbaar of de stammen die bij patiënten zijn geïsoleerd ook daadwerkelijk verantwoordelijk zijn voor de ziekte of zich hebben kunnen vermeerderen door een verzwakt immuunsysteem;
- Sequentietype 252 is in de drinkstammencollectie met 18 isolaten veruit het meest aangetoond. Dit type is in de database met 29 isolaten vertegenwoordigd die zowel uit water als uit patiënten zijn geïsoleerd;
- Het onderscheidend vermogen van de MLST is onvoldoende om een direct verband te leggen tussen patiënt en milieustam.

- De MLST analyse toont aan dat het merendeel van de geïsoleerde drinkwaterstammen genetisch zeer overeenkomen met stammen die uit patiënten zijn geïsoleerd.

5.1.2 *S. maltophilia*

- In elk van de negen voorzieningsgebieden en in 35 van de 43 bemonsterde locaties zijn kolonies van *S. maltophilia* geïsoleerd. Het aantal geïsoleerde kolonies per locatie in het geconcentreerde drinkwater en spuiwater varieerde aanzienlijk van enkele tot max. 650 kolonies;
- De 50 geselecteerde drinkwaterstammen (333 beschikbaar) die met de WGS methode zijn geanalyseerd zijn op basis van het criterium: <20 genen verschillend, niet verwant met de beschikbare patiënten (ziekenhuis)stammen (criteria op basis van pers. toelichting Dr. John Rossen);
- Op basis van de WGS analyse kan er geen direct link gelegd worden tussen stammen uit drinkwater en patiënten;
- De drinkwaterstammen in de WGS dendrogram zijn aanwezig als losse stammen of geclusterd in één van de 11 drinkwaterclusters. Het grootste cluster met 10 drinkwaterstammen zijn afkomstig van twee voorzieningsgebieden van Evides;
- Één van de vijf geanalyseerde patiëntenstammen afkomstig van het Jeroen Bosch Ziekenhuis clustert samen met twee ziekenhuisstammen van het UMCG.
- Vooral nog lijkt de aanwezigheid van *S. maltophilia* in drinkwater geen gevaar voor de volksgezondheid te zijn, maar pas nadat de database met patiëntstammen is uitgebreid kan hierover een betrouwbare conclusie worden getrokken.

5.1.3 *A. fumigatus*

- In 31 van de 43 geanalyseerde locaties is *A. fumigatus* gekweekt waarbij het aantal geïsoleerde kolonies per locatie relatief laag was met op één locatie max. 32 kolonies.
- Er is bij 6 van de in totaal 123 geanalyseerde drinkwaterstammen een azool resistentie aangetoond;
- Op basis van de microsattelietanalyse komt één drinkwater azool resistente stam geïsoleerd uit voorzieningsgebied Scheveningen overeen met drie Nederlands-klinische stammen.
- Vier azool gevoelige drinkwaterstammen komen op basis van de genotypering overeen met een klinische azool gevoelige stam;
- Dit onderzoek heeft geen sterke verwantschap aangetoond tussen de geanalyseerde drinkwaterstammen en de beschikbare patiëntenstammen, mede gebaseerd op het feit dat *A. fumigatus* algemeen voorkomt in het milieu en sporen zich zeer makkelijk verspreiden.
- Het kan echter niet worden uitgesloten dat *A. fumigatus* stammen uit drinkwater onder de juiste omstandigheden pathogeen kunnen zijn, gezien ook de azool-resistente stam die overeenkomt met een patiëntenstam.

5.2 Aanbevelingen voor verder onderzoek

Hoewel *P. aeruginosa* sporadisch voorkomt in drinkwater is er een duidelijke genetisch relatie met patientenstammen. *A. fumigatus* komt vaker voor in het gedistribueerde drinkwater, maar een kleiner deel van deze organismen is genetisch verwant met patiëntstammen. Hoewel de aantallen in het drinkwater uit het distributiesysteem laag zijn, bestaat er een risico voor de volksgezondheid doordat (i) de mogelijkheid is dat stammen uit het distributiesysteem kunnen uitgroeien in de drinkwaterinstallatie en (ii) drinkwaterstammen bij patiënten zijn aangetroffen. Daarom wordt het volgende vervolgonderzoek voorgesteld:

- Welke milieufactoren maken groei van *P. aeruginosa* en *A. fumigatus* in het drinkwatermilieu mogelijk en hoe zijn deze te beheersen;
- Waar in het drinkwatersysteem (voor en/of na de watermeter) is er een (groot) risico voor groei en besmetting;
- Is er op basis van gedetailleerde genetische typering (WSG) een sterke genetische verwantschap tussen drinkwaterstammen en patientenstammen;

Bij uitvoering van dergelijk onderzoek is de extra inspanning om *S. maltophilia* mee te nemen zeer laag. Hoewel met de huidige beschikbare gegevens het risico voor de volksgezondheid van de aanwezigheid van *S. maltophilia* in drinkwater lager lijkt te zijn dan die van *P. aeruginosa* en *A. fumigatus*, is de extra inspanning gering om *S. maltophilia* mee te nemen in het hierboven genoemde onderzoek. Het is daarom aanbevelingswaardig om bij een dergelijk onderzoek alle drie de organismen te betrekken.

6 Literatuur

1. van der Wielen, P. *Opportunistische ziekteverwekkers in drinkwater: betekenis voor de drinkwatersector*. in *BTO congres*. 2014. Nieuwegein.
2. van der Kooij, D., et al., *Multiplication of legionella pneumophila sequence types 1, 47, and 62 in buffered yeast extract broth and biofilms exposed to flowing tap water at temperatures of 38°C to 42°C*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2016. **82**(22): p. 6691-6700.
3. van der Kooij, D., et al., *Biofilm Composition and Threshold Concentration for Growth of Legionella Pneumophila on Surfaces Exposed to Flowing Warm Tap Water without Disinfectant*. *Appl Environ Microbiol*, 2017.
4. van der Wielen, P. *Opportunistic pathogens in unchlorinated drinking water in the Netherlands*. in *International symposium on Waterborne Pathogens*. 2015. Savannah.
5. van der Wielen, P.W.J.J., et al., *Opportunistic pathogens in drinking water in the Netherlands*, in *Microbial growth in drinking-water supplies. Problems, causes, control and research needs*, D. van der Kooij and P.W.J.J. van der Wielen, Editors. 2013, IWA: London. p. 177-205.
6. van der Wielen, P., *Effect van waterkwaliteit, seizoen, drinkwaterinstallatie en verblijftijd/afstand op opportunistische pathogenen in drinkwater*. 2014, KWR: Nieuwegein. p. 85.
7. van der Wielen, P. and D. van der Kooij, *Opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater*. 2011, KWR: Nieuwegein. p. 70.
8. Wullings, B.A. and D. van der Kooij, *Occurrence and genetic diversity of uncultured Legionella spp. in drinking water treated at temperatures below 15 degrees C*. *Appl Environ Microbiol*, 2006. **72**(1): p. 157-66.
9. Euser, S.M., et al., *Legionella prevention in the Netherlands: an evaluation using genotype distribution*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*, 2013. **32**(8): p. 1017-22.
10. Gomila, M., et al., *Genetic diversity of clinical Pseudomonas aeruginosa isolates in a public hospital in Spain*. *BMC Microbiol*, 2013. **13**: p. 138.
11. van Mansfeld, R., et al., *The population genetics of Pseudomonas aeruginosa isolates from different patient populations exhibits high-level host specificity*. *PLoS One*, 2010. **5**(10): p. e13482.
12. Feng, W., et al., *Epidemiology and resistance characteristics of Pseudomonas aeruginosa isolates from the respiratory department of a hospital in China*. *J Glob Antimicrob Resist*, 2017. **8**: p. 142-147.
13. Khan, N.H., et al., *Multilocus sequence typing and phylogenetic analyses of Pseudomonas aeruginosa Isolates from the ocean*. *Appl Environ Microbiol*, 2008. **74**(20): p. 6194-205.
14. Chazalet, V., et al., *Molecular typing of environmental and patient isolates of Aspergillus fumigatus from various hospital settings*. *J Clin Microbiol*, 1998. **36**(6): p. 1494-500.
15. Guinea, J., et al., *Molecular epidemiology of Aspergillus fumigatus: an in-depth genotypic analysis of isolates involved in an outbreak of invasive aspergillosis*. *J Clin Microbiol*, 2011. **49**(10): p. 3498-503.
16. Bain, J.M., et al., *Multilocus sequence typing of the pathogenic fungus Aspergillus fumigatus*. *J Clin Microbiol*, 2007. **45**(5): p. 1469-77.
17. Brooke, J.S., *Stenotrophomonas maltophilia: an emerging global opportunistic pathogen*. *Clin Microbiol Rev*, 2012. **25**(1): p. 2-41.
18. Gherardi, G., et al., *An overview of various typing methods for clinical epidemiology of the emerging pathogen Stenotrophomonas maltophilia*. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2015. **81**(3): p. 219-26.
19. van der Wielen, P., G. Elsinga, and B. Wullings, *Typering Pseudomonas Aeruginosa stammen*. 2016, KWR: Nieuwegein.

20. Foster, N.F., B.J. Chang, and T.V. Riley, *Evaluation of a modified selective differential medium for the isolation of Stenotrophomonas maltophilia*. J Microbiol Methods, 2008. 75(1): p. 153-5.
21. Skaar, I. and H. Stenwig, *Malt-yeast extract-sucrose agar, a suitable medium for enumeration and isolation of fungi from silage*. Appl Environ Microbiol, 1996. 62(10): p. 3614-9.
22. da Silva Filho, L.V., et al., *Identification of Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia complex, and Stenotrophomonas maltophilia in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR*. Pediatr Pulmonol, 2004. 37(6): p. 537-47.
23. Curran, B., et al., *Development of a multilocus sequence typing scheme for the opportunistic pathogen Pseudomonas aeruginosa*. J Clin Microbiol, 2004. 42(12): p. 5644-9.
24. Kaiser, S., K. Biehler, and D. Jonas, *A Stenotrophomonas maltophilia multilocus sequence typing scheme for inferring population structure*. J Bacteriol, 2009. 191(9): p. 2934-43.
25. Deurenberg, R.H., et al., *Application of next generation sequencing in clinical microbiology and infection prevention*. J Biotechnol, 2017. 243: p. 16-24.
26. Mellmann, A., et al., *High Interlaboratory Reproducibility and Accuracy of Next-Generation-Sequencing-Based Bacterial Genotyping in a Ring Trial*. J Clin Microbiol, 2017. 55(3): p. 908-913.
27. de Valk, H.A., et al., *Use of a novel panel of nine short tandem repeats for exact and high-resolution fingerprinting of Aspergillus fumigatus isolates*. J Clin Microbiol, 2005. 43(8): p. 4112-20.
28. de Valk, H.A., J.F. Meis, and C.H. Klaassen, *Microsatellite based typing of Aspergillus fumigatus: strengths, pitfalls and solutions*. J Microbiol Methods, 2007. 69(2): p. 268-72.
29. de Valk, H.A., et al., *Interlaboratory reproducibility of a microsatellite-based typing assay for Aspergillus fumigatus through the use of allelic ladders: proof of concept*. Clin Microbiol Infect, 2009. 15(2): p. 180-7.
30. van Belkum, A., et al., *Short-sequence DNA repeats in prokaryotic genomes*. Microbiol Mol Biol Rev, 1998. 62(2): p. 275-93.
31. Garcia-Rubio, R., M. Cuenca-Estrella, and E. Mellado, *Triazole Resistance in Aspergillus Species: An Emerging Problem*. Drugs, 2017. 77(6): p. 599-613.
32. Meis, J.F., et al., *Clinical implications of globally emerging azole resistance in Aspergillus fumigatus*. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci, 2016. 371(1709).
33. Verweij, P.E., et al., *Azole Resistance in Aspergillus fumigatus: Can We Retain the Clinical Use of Mold-Active Antifungal Azoles?* Clin Infect Dis, 2016. 62(3): p. 362-8.
34. Underwood, A.P., et al., *Comparison of the Legionella pneumophila population structure as determined by sequence-based typing and whole genome sequencing*. BMC Microbiol, 2013. 13: p. 302.
35. Mercante, J.W. and J.M. Winchell, *Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations*. Clin Microbiol Rev, 2015. 28(1): p. 95-133.

Bijlage I Bemonsteringsprotocol

Protocol bemonstering spuiwater en grootvolumemonsters voor BTO-onderzoek eerste veldstudie

De bemonstering van spuiwater en grootvolumemonsters is in het kader van BTO-onderzoek naar het voorkomen van opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen: *Pseudomonas aeruginosa*, *Stenotrophomonas maltophilia* en *Aspergillus fumigatus* in sediment en drinkwater. De eerste meetcampagne is gepland in de zomerperiode van 2014. Op maximaal 50 locaties, verdeelt over 10 voorzieningsgebieden, wordt per locatie een spuiwatermonster en een grootvolumeleidingwatermonster bemonsterd. Deze monsters worden genomen aan de brandkraan. Deze fase van het project heeft tot doel om, met een zo groot mogelijk pakkans, de drie micro-organismen te isoleren met behulp van de daarvoor ontwikkelde selectieve kweekmethode. Het resultaat van dit onderzoek is dat indien er geen opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen worden geïsoleerd met vrij grote zekerheid kan worden geconcludeerd dat de betreffende micro-organismen niet of niet aantoonbaar aanwezig zijn in het leidingnet en indien er wel bacteriën worden geïsoleerd deze kunnen worden vergeleken met patientenstammen om zo een eventueel risico te kunnen inschatten.

Diameter leiding bemonstering: bij voorkeur 100mm, selectie locaties zoveel mogelijk representatief voor voorzieningsgebied (PVC, AC en gietijzer)

Bemonsterings protocol:

De monsters worden genomen aan de LIDO standpijp. De Standpijp moet voor aanvang aan de monstername worden gedesinfecteerd.

De standpijp en straatpot moet worden gespoeld voorafgaande aan de monstername uit de 90% stroom (15 sec of visueel beoordelen);

Spoel de 10% stroom kort voor (2 min) en bemonster 100 liter water met een "geknepen" volumestroom (indicatie 2 min voor vullen 20l) uit de 10% stroom (90% stroom dicht) de 5 jerrycans van 20 liter of via het monsterkraantje. KWR zorgt dat er voldoende jerrycans tijdens de bemonstering beschikbaar zijn. Deze jerrycans gaat naar KWR (gekoeld transport);

Voor de spui monsters wordt zowel de 90% als 10% stroom geopend tot een spuisnelheid van 1 m/s. De jerrycans worden gevuld met de 10% stroom. Na ca. 30 sec (of visueel beoordelen) wordt 20 liter spuiwater bemonsterd. KWR zorgt voor de jerry can en ook dit monster gaat naar KWR (gekoeld transport);

In het laboratorium van KWR worden de monsters geconcentreerd en geanalyseerd op de drie selectieve kweekmethoden.

Bijlage II Geanalyseerd watervolume meetcampagne 2014

TABEL 9: GEANALYSEERD VOLUME VAN DE 100L DRINKWATER - EN SPUIWATERMONSTERS

Voorzieningsgebied	Locatie	Drinkwater	<i>P. aeruginosa</i>		<i>S. maltophilia</i>		<i>A. fumigatus</i>	
		Concentraat (ml)	drinkwater (ml)	spuiwater (ml)	drinkwater (ml)	spuiwater (ml)	drinkwater (ml)	spuiwater (ml)
Kamerik	Bodegraven (Dirk bavolaan)	512	133	133	133	133	133	133
	Nieuwveen (Schoterpark)	433	83	133	83	133	83	133
	Zevenhoven (vlijtlaan)	442	133	133	133	133	133	133
	Nieuwkoop (Karhark)	454	133	133	133	133	133	133
	Nieuwkoop (Wassenburglaan)	498	133	83	133	83	133	83
Leiduin en Weesperkarspel	Veeteeltstraat	500	63	0,3	63	0,3	63	0,3
	Griftstraat	500	83	0,3	83	0,3	83	0,3
	Rubenstraat	500	83	0,3	83	0,3	83	0,3
	Den Texstraat	500	83	0,3	83	0,3	83	0,3
	Herman Gorterstraat	500	133	0,3	133	0,3	133	0,3
Scheveningen	Rozenstraat, den Haag	510	33	332	33	332	83	332
	Keizersstraat, Den Haag	493	33	332	33	332	83	332
	H. van Randwijkstraat, Leidschendam	532	33	332	33	332	83	332
	Sophiastraat, Voorburg	520	33	332	33	332	83	332
	Nonnetjessingel, Den Haag	446	33	332	33	332	83	332
Spannenburg	Breedshaal, Sloten	488	33	330	33	330	83	330
	Middelweg, Sloten	588	33	330	33	330	83	330
	Suderseewei, Hindelopen	563	33	330	33	330	83	330
	Middelgronden, Makkum	542	33	330	33	330	83	330

Zuidwolde	Blauwhuis	564	33	330	33	330	83	330
	Gedempte Hoofddiep, Kerkenveld	570	33	330	33	330	83	330
	Middelveenseweg, Zuidwolde	403	33	330	33	330	83	330
	Vuile Riete, Linde	424	33	330	33	330	83	330
	Hoogeveenseweg, Zuidwolde	539	33	330	33	330	83	330
Weesperkarspel	Veeningen, Veebubgeb	433	33	330	33	330	83	330
	Lentestraat	554	33	330	33	330	133	330
	Fraunhof	520	33	330	33	330	133	330
Braakman	Holystraat	572	33	330	33	330	133	330
	Biervliet	479	33	330	33	330	133	330
	Cadzand	429	33	330	33	330	133	330
	Oostburg	493	33	330	33	330	133	330
	Bijlokestraat	424	33	330	33	330	133	330
Berenplaat	Philippine	356	33	330	33	330	133	330
	Kerkweg	445	33	33	3	330	83	330
	Sneeuwbal, Hellevoetsluis	412	33	33	3	330	83	330
	De Hoef	396	33	33	3	330	83	330
	Etty Hillesumstraat, Spijkernisse	392	33	33	3	330	83	330
Rosmalen	Gruttersslop, Geervliet	380	33	33	3	30	33	330
	Edelweisstraat, Rosmalen	412	33	330	3	330	83	330
	Vliertwijkstraat, Rosmalen	359	33	330	33	330	83	330
	Vinkenveld, Rosmalen	381	33	330	3	330	83	330
	Adelheidstraat, Den Bosch	438	33	330	3	330	83	330
	Rozenstraat, Rosmalen	436	33	330	3	330	83	330

Bijlage III Isolaten veldstudie 2014

TABEL 10: KOLONIES VAN *P. AERUGINOSA*, *S. MALTOPHILIA* EN *A. FUMIGATUS* GEISOLEERD UIT DRINKWATER EN SPIUWATER UIT HET VOORZIENINGSGEBIED VAN KAMERIK VAN DRINKWATERBEDRIJF OASEN

Monstercode	Locatie	Monsterdatum	<i>P. aeruginosa</i>				<i>S. maltophilia</i>				<i>A. fumigatus</i>			
			drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater	
			T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B
M142612/617	Bodegraven, Dirk Bavolaan	01-09-2014	1	1			1	1	4	4	24	10	1	1
M142613/618	Nieuwveen, Schoterpark	01-09-2014					1	1			2	2		
M142614/619	Zevenhoven, Vlijtlaan	01-09-2014					5	5						
M142615/620	Nieuwkoop, Karhark	01-09-2014					3	3	1	1	2	2		
M142616/621	Nieuwkoop, Wassaburglaan	01-09-2014					1	1			12	10	3	3

T, totaal aantal typische kolonies; B, aantal positief geïdentificeerde kolonies die opgenomen zijn in de KWR stammencollectie (max. 10 per locatie)

TABEL 11: KOLONIES VAN *P. AERUGINOSA*, *S. MALTOPHILIA* EN *A. FUMIGATUS* GEISOLEERD UIT DRINKWATER EN SPUIWATER UIT HET VOORZIENINGSGBIED VAN WEESPERKARSPER EN LEIDUIN INCLUSIEF MENGGBIEDEN VAN DRINKWATERBEDRIJF WATERNET

Monstercode	Locatie	Monsterdatum	<i>P. aeruginosa</i>				<i>S. maltophilia</i>				<i>A. fumigatus</i>				
			drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater		
			T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	
M142648/653	Veeteeltstraat 103, Amsterdam	3-9-2014										1	1		
M142649/654	Griftstraat 48, Amsterdam	3-9-2014										1	1		
M142650/655	Rubensstraat 51, Amsterdam	3-9-2014	6	6					13	8	3	3			
M142651/656	Den Texstraat 56A, Amsterdam	3-9-2014					20	5	2	2	3	3			
M142652/657	Herman Gorterstraat 33, Amsterdam	3-9-2014					79	7							

T, totaal aantal typische kolonies; B, aantal positief geïdentificeerde kolonies die opgenomen zijn in de KWR stammencollectie (max. 10 per locatie)

TABEL 12: KOLONIES VAN *P. AERUGINOSA*, *S. MALTOPHILIA* EN *A. FUMIGATUS* GEISOLEERD UIT DRINKWATER EN SPUIWATER UIT HET VOORZIENINGSGBIED VAN SCHEVENINGEN VAN DRINKWATERBEDRIJF DUNEA

Monstercode	Locatie	Monsterdatum	<i>P. aeruginosa</i>				<i>S. maltophilia</i>				<i>A. fumigatus</i>				
			drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater		
			T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	
M142756/761	Rozenstraat 97, Den Haag	9-9-2014										1	1		
M142757/762	Keizerstraat 36A, Den Haag	9-9-2014										1	1		
M142758/763	H van Randwijkstraat 37, Leidschendam	9-9-2014							5	5	1	1			
M142759/764	Sophiastraat 37, Voorburg	9-9-2014					2	2			2	2			
M142760/765	Nonnetjessingel 38, Den Haag	9-9-2014					23	10			1	1			

T, totaal aantal typische kolonies; B, aantal positief geïdentificeerde kolonies die opgenomen zijn in de KWR stammencollectie (max. 10 per locatie)

TABEL 13: KOLONIES VAN *P. AERUGINOSA*, *S. MALTOPHILIA* EN *A. FUMIGATUS* GEISOLEERD UIT DRINKWATER EN SPUIWATER UIT HET VOORZIENINGSGBIED VAN SPANNENBURG VAN DRINKWATERBEDRIJF VITENS

Monstercode	Locatie	Monsterdatum	<i>P. aeruginosa</i>				<i>S. maltophilia</i>				<i>A. fumigatus</i>			
			drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater	
			T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B
M142875/880	Sloten Breedshaal	15-9-2014					2	2						
M142876/881	Stavoren Middelweg	15-9-2014												
M142877/882	Hindelopen Suderseewei	15-9-2014					117	10	6	6	4	4		
M142878/883	Makkum, Middelgronden	15-9-2014					232	10	3	3	2	2		
M142879/884	Blauwhuis, BK757	15-9-2014												

T, totaal aantal typische kolonies; B, aantal positief geïdentificeerde kolonies die opgenomen zijn in de KWR stammencollectie (max. 10 per locatie)

TABEL 14: KOLONIES VAN *P. AERUGINOSA*, *S. MALTOPHILIA* EN *A. FUMIGATUS* GEISOLEERD UIT DRINKWATER EN SPUIWATER UIT HET VOORZIENINGSGBIED VAN ZUIDWOLDE VAN DRINKWATERBEDRIJF WMD

Monstercode	Locatie	Monsterdatum	<i>P. aeruginosa</i>				<i>S. maltophilia</i>				<i>A. fumigatus</i>			
			drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater	
			T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B
M143038/043	Gedempte Hoofddiep 27, 7926 TP Kerkenveld, brandkraan 90-36	17-9-2014					18	10	1	1				
M143039/044	Middelveenseweg 6, 7921 RN Zuidwolde, brandkraan 90-276	17-9-2014					145	10	5	5				
M143040/045	Vuile Riete 6, 7925 PM Linde, brandkraan 90-58	17-9-2014					28	10			2	2		
M143041/046	Hoogeveenseweg 15, 7921 PC Zuidwolde, brandkraan 90-214	17-9-2014					7	7			3	3		
M143042/047	Veeningen 44, 7924 PJ Veeningen brandkraan 90-1206	17-9-2014					3	3			1	1		

T, totaal aantal typische kolonies; B, aantal positief geïdentificeerde kolonies die opgenomen zijn in de KWR stammencollectie (max. 10 per locatie)

TABEL 15: KOLONIES VAN *P. AERUGINOSA*, *S. MALTOPHILIA* EN *A. FUMIGATUS* GEISOLEERD UIT DRINKWATER EN SPIUWATER UIT VOORZIENINGSGBIED VAN WEESPERKARSPSEL VAN DRINKWATERBEDRIJF WATERNET

Monstercode	Locatie	Monsterdatum	<i>P. aeruginosa</i>				<i>S. maltophilia</i>				<i>A. fumigatus</i>				
			drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater		
			T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	
M143092/095	Lentestraat	22-9-2014										2	2		
M143093/096	Fraunhof	22-9-2014										3	3	2	2
M143094/097	Holysloot	22-9-2014					5	5	7	7	6	6	1	1	

T, totaal aantal typische kolonies; B, aantal positief geïdentificeerde kolonies die opgenomen zijn in de KWR stamcollectie (max. 10 per locatie)

TABEL 16: KOLONIES VAN *P. AERUGINOSA*, *S. MALTOPHILIA* EN *A. FUMIGATUS* GEISOLEERD UIT DRINKWATER EN SPIUWATER UIT HET VOORZIENINGSGBIED VAN BRAAKMAN VAN DRINKWATERBEDRIJF EVIDES

Monstercode	Locatie	Monsterdatum	<i>P. aeruginosa</i>				<i>S. maltophilia</i>				<i>A. fumigatus</i>				
			drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater		
			T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	
M143176/181	Biervliet	23-09-2014					12	10	1	1	11	10	2	2	
M143177/182	Cadzand	23-09-2014					23	10	7	7	14	4			
M143178/183	Oostburg	23-09-2014	5	5	2	2	15	10	38	10					
M143179/184	Bijlokestraat	23-09-2014					2	2			1	1			
M143180/185	Philippine	23-09-2014					8	8	4	4	3	3			

T, totaal aantal typische kolonies; B, aantal positief geïdentificeerde kolonies die opgenomen zijn in de KWR stamcollectie (max. 10 per locatie)

TABEL 17: KOLONIES VAN *P. AERUGINOSA*, *S. MALTOPHILIA* EN *A. FUMIGATUS* GEISOLEERD UIT DRINKWATER EN SPUIWATER UIT HET VOORZIENINGSGBIED VAN BEERENPLAAT VAN DRINKWATERBEDRIJF EVIDES

Monstercode	Locatie	Monsterdatum	<i>P. aeruginosa</i>				<i>S. maltophilia</i>				<i>A. fumigatus</i>			
			drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater	
			T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B
M143212/217	Kerkweg	29-9-2014					170	10	219	10				
M143213/218	Sneeuwbal, Hellevoetsluis	29-9-2014					30	10	82	10	1	1		
M143214/219	De Hoef	29-9-2014							28	10	32	10		
M143215/220	Etty Hillesumstraat, Spijkenisse	29-9-2014					20	10	43	10				
M143216/221	Gruttersslop, Geervliet	29-9-2014					23	9	35	10	6	6		

T, totaal aantal typische kolonies; B, aantal positief geïdentificeerde kolonies die opgenomen zijn in de KWR stammencollectie (max. 10 per locatie)

TABEL 18: KOLONIES VAN *P. AERUGINOSA*, *S. MALTOPHILIA* EN *A. FUMIGATUS* GEISOLEERD UIT DRINKWATER EN SPUIWATER UIT HET VOORZIENINGSGBIED VAN NULAND VAN DRINKWATERBEDRIJF BRABANT WATER

Monstercode	Locatie	Monsterdatum	<i>P. aeruginosa</i>				<i>S. maltophilia</i>				<i>A. fumigatus</i>			
			drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater		drinkwater		spuiwater	
			T	B	T	B	T	B	T	B	T	B	T	B
M143330/333	Edelweisstraat, Rosmalen	6-10-2014					31	10	1	1	2	2		
M143331/334	Vliertwijksestraat, Rosmalen	6-10-2014					105	10						
M143332/335	Vinkenveld, Rosmalen	6-10-2014					38	10	4	4	5	5		
M143416/418	Adelheidstraat, Den Bosch	8-10-2014					1	1						
M143417/419	Rozenstraat, Rosmalen	8-10-2014					1	1	1		11	10		

T, totaal aantal typische kolonies; B, aantal positief geïdentificeerde kolonies die opgenomen zijn in de KWR stammencollectie (max. 10 per locatie)

Bijlage IV Geanalyseerd watervolume meetcampagne 2016

TABEL 19: INGEZET EN GEANALYSEERD WATERVOLUME VAN DE GECONCENTREERDE OORSPRONKELIJK $\pm 100L$ DRINKWATER MONSTERS

Voorzieningsgebied	Locatie	Watervolume (l)	<i>P. aeruginosa</i> (ml)
WMD	Pesse	106	63,01mL (1) 100mL (2) 50mL (1) 10mL (5)
WBG	Appingedam	106	206,02mL (1) 100mL (2) 50mL (1) 10mL (5)
Evides, Braakman	Nijverheidsweg, Eede	112	162,03mL (1) 100mL (2) 50mL (1) 10mL (5)
	Opjager, Oostburg	106	91,56mL (1) 100mL (2) 50mL (1) 10mL (5)
Vitens, Spannenburg	Boerenverdriet, IJzendijke	95	128,99mL (1) 100mL (2) 50mL (1) 10mL (5)
	Tank Kollum	107	152,2mL (1) 100mL (2) 50mL (1) 10mL (5)
	Reservoir Greuns	107	163,2mL (1) 100mL (2) 50mL (1) 10mL (5)
Dunea	Reservoir Bolsward	110	29mL (1) 100mL (3) 50mL (1) 10mL (5)
	Orinocostroom, Zoetermeer	103	93,5mL (1) 100mL (3) 50mL (1) 10mL (5)
	Schoolstraat, Noordwijkerhout	108	20,4mL (1) 100mL (3) 50mL (1) 10mL (5)
WML, Breehei		107	52,33mL (1) 100mL (3) 50mL (1) 10mL (5)
Oasen, Kamerik	Reigersbos, Ter Aar	109	70mL (1) 100mL (3) 50mL (1) 10mL (5)
	Rijksstraatweg, Zwammerdam	109	42mL (1) 100mL (2) 50mL (1) 10mL (5)
	Bavolaan, Bodegraven	114	36mL (1) 100mL (2) 50mL (1) 10mL (5)
Waternet, Leiduin	Driemondweg, Amsterdam	98	44,2mL (1) 100mL (3) 50mL (1) 10mL (5)

Bijlage V Isolaten veldstudie 2016

TABEL 20: KOLONIES VAN *P. AERUGINOSA* GEISOLEERD UIT DRINKWATER UIT DRINKWATER BEMONSTERD IN VERSCHILLENDE VOORZIENINGSGEBIEDEN

Monstercode	DWB	Pompstation	Locatie	Monsterdatum	<i>P. aeruginosa</i>	
					T	B
LMB-10952	WMD	??	Pesse	4-7-2016	-	
LMB-10953	WBG	??	Appingedam	4-7-2016	-	
LMB-10954	Vitens	Spannenburg	Tank Kollum	4-7-2016	-	
LMB-10955	Vitens	Spannenburg	Res. Greuns richting stad	4-7-2016	-	
LMB-10956	Vitens	Spannenburg	Res. Bolsward-verzamelleiding	4-7-2016	-	
LMB-11620	Dunea	Scheveningen	Waterput 943449	13-7-2016	-	
LMB-11621	Dunea	Scheveningen	Waterput 943450	13-7-2016	-	
LMB-12232	Evides	Braakman	Nijverheidsweg, Eede	25-7-2016	-	
LMB-12233	Evides	Braakman	Opjager, Oostburg	25-7-2016	-	
LMB-12234	Evides	Braakman	Boerenverdriet, IJzendijke	25-7-2016	91	19
LMB-12479	WML	Breehei	??	1-8-2016	2	2
LMB-13376	Oasen	Kamerik	Dirk Bavolaan, Bodegraven	15-8-2016	-	
LMB-13377	Oasen	Kamerik	Reigersbos, Ter Aar	15-8-2016	-	
LMB-13380	Oasen	Kamerik	Rijksstraatweg, Zwammerdam	15-8-2016	-	
LMB-14097	Waternet	Leiduin	-	23-8-2016	-	
LMB-23777	WML	Breehei	Twitsweg, Vredepeel	20-12-2016	-	
LMB-24286	Evides	Braakman	Schansestraat, IJzendijke	16-1-2017	-	

T, totaal aantal typische kolonies; B, aantal positief geïdentificeerde kolonies die opgenomen zijn in de KWR stamencollectie.

Bijlage VI Overzicht getypeerde *P. aeruginosa* stammen en MLST-analysedata

TABEL 21: MLST-DATA VAN GETYPEERDE *P. AERUGINOSA* STAMMEN

Herkomst			Matrix	Stamnr.	Allelen MLST-analyse							
DWB	Voorzieningsgebied	Adres			<i>acsA</i>	<i>aroE</i>	<i>guaA</i>	<i>nuoD</i>	<i>mutL</i>	<i>ppsA</i>	<i>trpE</i>	ST
Oasen	Kamerik	Dirk Bavolaan, Bodegraven	drinkwater	M142612.9	20	5	5	3	3	13	9	256
Waternet	Leiduin & weesperkarspel	Rubensstraat, Amsterdam	„	M142650.1	6	28	4	3	3	4	7	252
„	„	„	„	M142650.2	6	28	39 ¹	3	3	4	7	252
„	„	„	„	M142650.3	6	28	4	3	3	4	7	252
„	„	„	„	M142650.4	6	28	39 ¹	3	3	4	7	252
„	„	„	„	M142650.5	6	28	4	3	3	4	7	252
„	„	„	„	M142650.6	6	28	4	3	3	4	7	252
Evides	Braakman	Oostburg	„	M143178.1	28	5	5	3	11	15	44	242
„	„	„	„	M143178.2	28	5	5	3	11	15	44	242
„	„	„	„	M143178.3	28	5	5	3	11	15	44	242
„	„	„	„	M143178.4	28	5	5	3 ¹	11	15	44	242
„	„	„	„	M143178.5	28	5	5	3	11	15	44	242
„	„	„	spuiwater	M143183.5	28	5	5	3	11	15	44	242
„	„	„	„	M143183.6	28 ¹	5	- ²	3	11	15	44	242
Evides	Braakman	Boerenverdriet, IJzendijke	drinkwater	12234.1	6	28	4	3	3	4	7	252

Evides	Braakman	Boerenverdriet, IJzendijke	drinkwater	12234.2	6	28	4 ¹	3	3	4	7	252
”	”	”	”	12234.3	6	28	4	3	3	4	7	252
”	”	”	”	12234.4	22	10	11	3	4	28	3	1244
”	”	”	”	12234.5	6	28	4	3	3	4	7	252
”	”	”	”	12234.6	35	24	36	11	15	15	14	780
”	”	”	”	12234.7	6	28	4	3	3	4	7	252
”	”	”	”	12234.8	6	28	4	3	3	4	7	252
”	”	”	”	12234.9	6	28	4	3	3	4	7	252
”	”	”	”	12234.10	6	28	4 ¹	3	3	4	7	252
”	”	”	”	12234.11	6	28	4	3	3	4	7	252
”	”	”	”	12234.12	41	5	7	61	2	4	7	1690
”	”	”	”	12234.13	6	28	4	3 ¹	3	4	7	252
”	”	”	”	12234.14	1	5	1	11	4	10	- ²	164/1407
”	”	”	”	12234.15	13	4	5	5	12	7	15	308
”	”	”	”	12234.16	6	28	4 ¹	3	3	4	7	252
”	”	”	”	12234.17	41	5	7	61	2	4	7	1690
”	”	”	”	12234.18	6	28	4	3	3	4	7	252
”	”	”	”	12234.19	6	5	6	7	4	6	7	27
WML	Breehei	??	”	12479.1	36	5	36	61	4	4	52	new
”	”	”	”	12479.2	15	5	5	5	50	4	14	385

1, Mindere kwaliteit van de sequentieanalyse waardoor typering minder betrouwbaar is; 2, sequentieanalyse van dit allel is mislukt

Bijlage VII Overzicht getypeerde *S. maltophilia* stammen

TABEL 22: SELECTIE VAN DRINKWATERISOLATEN VAN *S. MALTOPHILIA* VOOR "WHOLE GENOME" ANALYSE

Herkomst			Matrix	Stamnr.
DWB	Voorzieningsgebied	Adres		
Oasen	Kamerik	Vlijtlaan, Zevenhoven	water	M142614.1
Oasen	Kamerik	Schoterpark, Nieuween	water	M142613.1
Oasen	Kamerik	Wasseburglaan, Nieuwkoop	water	M142616.1
Oasen	Kamerik	Dirk Bavolaan, Bodegraven	spuiwater	M142617.1*
Oasen	Kamerik	Karhark, Nieuwkoop	spuiwater	M142620.1
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel	Rubenstraat, Amsterdam	spuiwater	M142655.1
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel	Den Texstraat, Amsterdam	water	M142651.1
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel	Herman Gortherstraat, Amsterdam	water	M142652.1
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel	Herman Gortherstraat, Amsterdam	water	M142652.4
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel	Den Texstraat, Amsterdam	spuiwater	M142656.2
Dunea	Scheveningen	Nonnetjessingel, Den Haag	water	M142759.2
Dunea	Scheveningen	Nonnetjessingel, Den Haag	water	M142760.5
Dunea	Scheveningen	H. van Randwijkstraat, Leidschendam	spuiwater	M142763.1
Dunea	Scheveningen	H. van Randwijkstraat, Leidschendam	spuiwater	M142763.4
Vitens	Spannenburg	Suderseewei, Hindelopen	water	M142877.1
Vitens	Spannenburg	Breedshaal, Sloten	water	M142875.1
Vitens	Spannenburg	Suderseewei, Hindelopen	water	M142877.7
Vitens	Spannenburg	Middelgronden, Makkum	water	M142878.1
Vitens	Spannenburg	Middelgronden, Makkum	water	M142878.7
Vitens	Spannenburg	Suderseewei, Hindelopen	spuiwater	M142882.1
WMD	Zuidwolde	Gedempte Hoofddiep, Kerkenveld	water	M143038.1
WMD	Zuidwolde	Middelveenseweg, Zuidwolde	water	M143039.1
WMD	Zuidwolde	Vuile Riete, Linde	water	M143040.1
WMD	Zuidwolde	Hoogeveenseweg, Zuidwolde	water	M143041.1
WMD	Zuidwolde	Veeningen, Veeningen	water	M143042.1
WMD	Zuidwolde	Middelveenseweg, Zuidwolde	spuiwater	M143044.1
Waternet	Weesperkarspel	Holysloot, Amsterdam	water	M143094.1
Waternet	Weesperkarspel	Holysloot, Amsterdam	spuiwater	M143097.1
Waternet	Weesperkarspel	Holysloot, Amsterdam	water	M143094.4
Waternet	Weesperkarspel	Holysloot, Amsterdam	spuiwater	M143097.5
Evides	Braakman	Biervliet	water	M143176.1
Evides	Braakman	Cadzand	water	M143177.1
Evides	Braakman	Oostburg	water	M143178.1
Evides	Braakman	Bijlokestraat	water	M143179.1

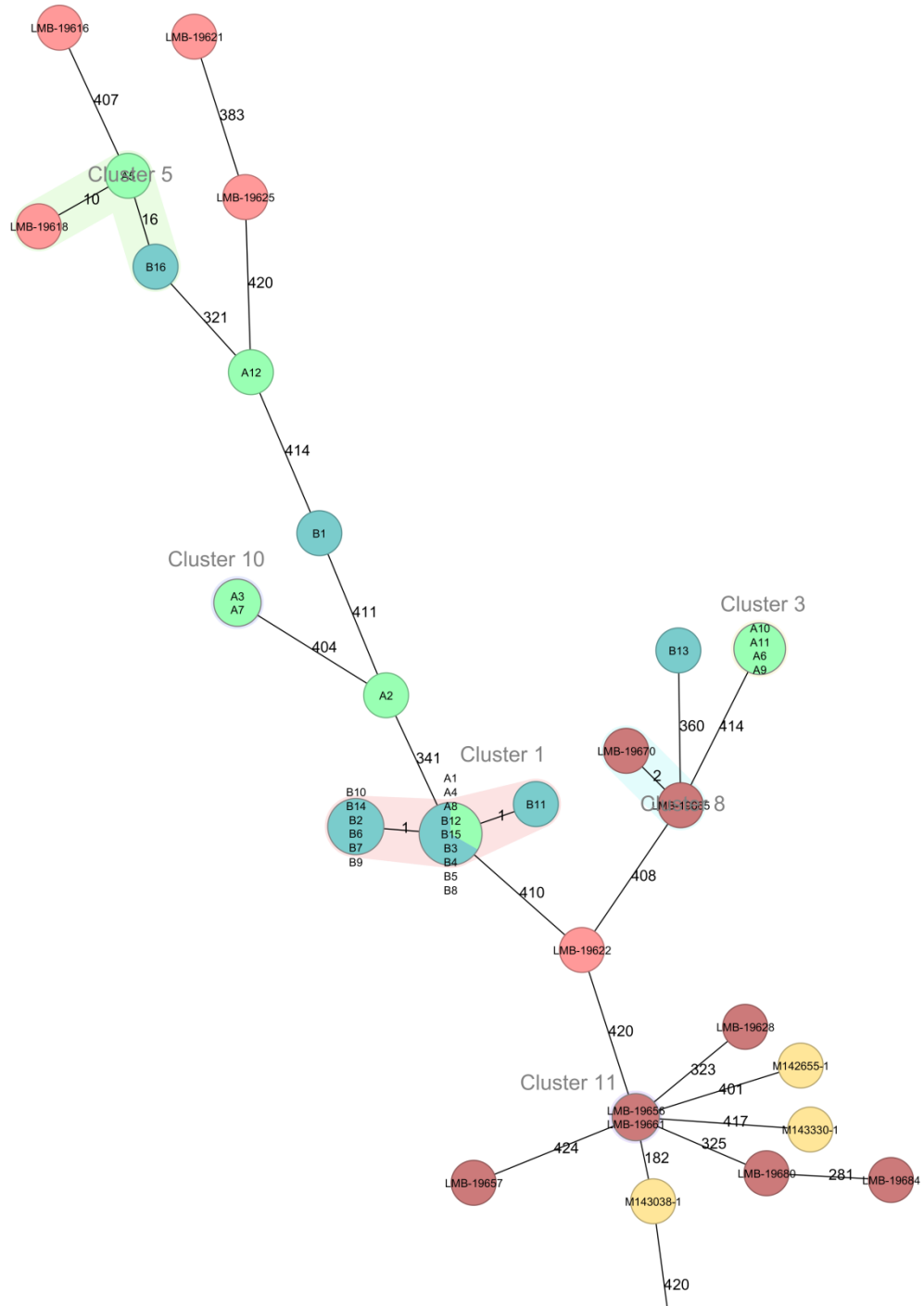
Evides	Braakman	Philippine	water	M143180.1
Evides	Braakman	Oostburg	spuiwater	M143183.1
Evides	Braakman	Philippine	spuiwater	M143185.1
Evides	Berenplaat	Kerkweg	water	M143212.1
Evides	Berenplaat	Sneeuwbal, Hellevoetsluis	water	M143213.1
Evides	Berenplaat	Etty Hillesumstraat, Spijkenisse	water	M143215.1
Evides	Berenplaat	Gruttersloep, Geervliet	water	M143216.1
Evides	Berenplaat	Sneeuwbal, Hellevoetsluis	spuiwater	M143218.1
Evides	Berenplaat	Etty Hillesumstraat, Spijkenisse	spuiwater	M143220.1
Evides	Berenplaat	Gruttersloep, Geervliet	spuiwater	M143221.1
Brabant Water	Rosmalen	Edelweisstraat, Rosmalen	water	M143330.1
Brabant Water	Rosmalen	Vlierwijkersestraat, Rosmalen	water	M143331.1
Brabant Water	Rosmalen	Vinkerveld, Rosmalen	water	M143332.1
Brabant Water	Rosmalen	Adelheidstraat, Den Bosch	water	M143416.1
Brabant Water	Rosmalen	Edelweisstraat, Rosmalen	spuiwater	M143333.1

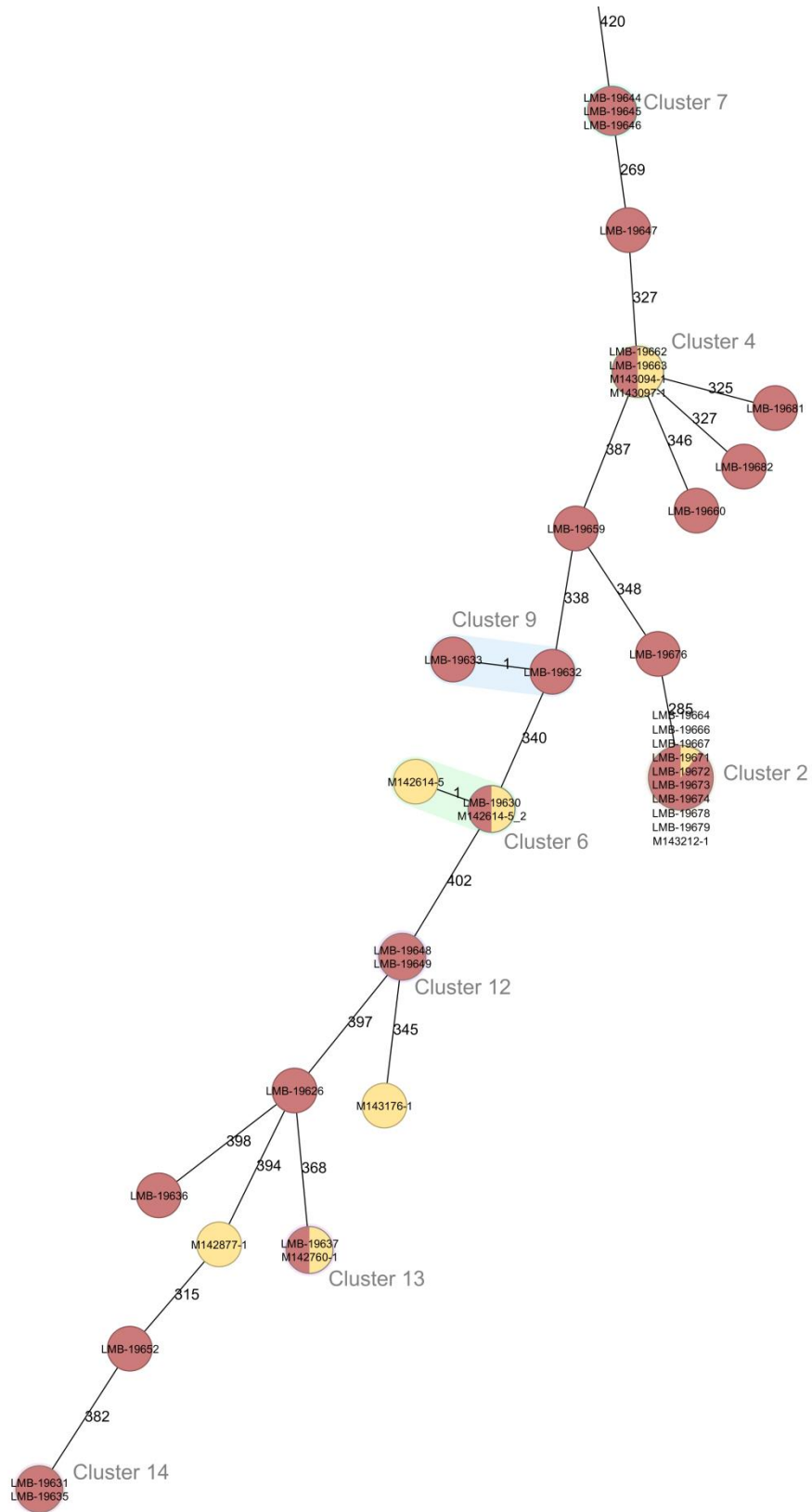
**, Stam is na typering geïdentificeerd als Ralstonia eutropha/Cupriavidus necator.*

TABEL 23: SELECTIE VAN PATIENTISOLATEN VAN *S. MALTOPHILIA* VOOR "WHOLE GENOME" ANALYSE

Herkomst	Matrix	Stamnr.
Jeroen Bosch Ziekenhuis	patiënt	1
Jeroen Bosch Ziekenhuis	patiënt	3
Jeroen Bosch Ziekenhuis	patiënt	6
Jeroen Bosch Ziekenhuis	patiënt	7
Jeroen Bosch Ziekenhuis	patiënt	10

Bijlage VIII WGS-T *S. maltophilia*





Bijlage IX Overzicht getypeerde *A. fumigatus* stammen

TABEL 24: SELECTIE VAN DRINKWATERISOLATEN VAN *A. FUMIGATUS* VOOR MLST-ANALYSE

DWB	Herkomst		Matrix	Stamn.	Nr.
	Voorzieningsgebied	Adres			
Oasen	Kamerik	Bodegraven, Dirk Bavolaan	Water	M142612.1	1
Oasen	Kamerik	Bodegraven, Dirk Bavolaan	Water	M142612.2	2
Oasen	Kamerik	Bodegraven, Dirk Bavolaan	Water	M142612.3	3
Oasen	Kamerik	Bodegraven, Dirk Bavolaan	Water	M142612.4	4
Oasen	Kamerik	Bodegraven, Dirk Bavolaan	Water	M142612.5	5
Oasen	Kamerik	Bodegraven, Dirk Bavolaan	Water	M142612.6	6
Oasen	Kamerik	Bodegraven, Dirk Bavolaan	Water	M142612.7	7
Oasen	Kamerik	Bodegraven, Dirk Bavolaan	Water	M142612.8	8
Oasen	Kamerik	Bodegraven, Dirk Bavolaan	Water	M142612.9	9
Oasen	Kamerik	Bodegraven, Dirk Bavolaan	Water	M142612.10	10
Oasen	Kamerik	Nieuwveen, Schoterpark	Water	M142613.1	11
Oasen	Kamerik	Nieuwveen, Schoterpark	Water	M142613.2	12
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Karhark	Water	M142615.1	13
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Karhark	Water	M142615.2	14
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Wassaburglaan	Water	M142616.1	15
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Wassaburglaan	Water	M142616.2	16
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Wassaburglaan	Water	M142616.3	17
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Wassaburglaan	Water	M142616.4	18
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Wassaburglaan	Water	M142616.5	19
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Wassaburglaan	Water	M142616.6	20
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Wassaburglaan	Water	M142616.7	21
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Wassaburglaan	Water	M142616.8	22
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Wassaburglaan	Water	M142616.9	23
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Wassaburglaan	Water	M142616.10	24
Oasen	Kamerik	Bodegraven, Dirk Bavolaan	Spuiwater	M142617.1	25
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Wassaburglaan	Spuiwater	M142621.1	26
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Wassaburglaan	Spuiwater	M142621.2	27
Oasen	Kamerik	Nieuwkoop, Wassaburglaan	Spuiwater	M142621.3	28
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel	Veeteeltstraat, Amsterdam	Water	M142648.1	29
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel	Griftstraat, Amsterdam	Water	M142649.1	30
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel	Rubensstraat, Amsterdam	Water	M142650.1	31
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel		Water	M142650.2	32

Waternet	Leiduin en Weesperkarspel		Water	M142650.3	33
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel	Den Texstraat, Amsterdam	Water	M142651.1	34
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel		Water	M142651.2	435
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel		Water	M142651.3	36
Waternet	Leiduin en Weesperkarspel	Herman Gorterstraat, Amsterdam	Water	M143418.8	37
Dunea	Scheveningen	Rozenstraat, Den Haag	Water	M142756.1	38
Dunea	Scheveningen	Keizerstraat, Den Haag	Water	M142757.1	39
Dunea	Scheveningen	H van Randwijkstraat, Leidschendam	Water	M142758.1	40
Dunea	Scheveningen	Sophiastraat 37, Voorburg	Water	M142759.1	41
Dunea	Scheveningen		Water	M142759.2	42
Dunea	Scheveningen	Nonnetjessingel 38, Den Haag	Water	M142760.1	43
Vitens	Spannenburg	Hindelopen Suderseewei	Water	M142877.1	44
Vitens	Spannenburg		Water	M142877.2	45
Vitens	Spannenburg		Water	M142877.3	46
Vitens	Spannenburg		Water	M142877.4	47
Vitens	Spannenburg	Makkum, Middelgronden	Water	M142878.1	48
Vitens	Spannenburg		Water	M142878.2	49
WMD	Zuidwolde	Vuile Riete 6, Linde	Water	M143040.1	50
WMD	Zuidwolde		Water	M143040.2	51
WMD	Zuidwolde	Hoogeveenseweg 15 Zuidwolde	Water	M143041.1	52
WMD	Zuidwolde		Water	M143041.2	53
WMD	Zuidwolde		Water	M143041.3	54
WMD	Zuidwolde	Veeningen 44, Veebubgeb	Water	M143042.1	55
Waternet	Weesperkarspel	Lentestraat	Water	M143092.1	56
Waternet	Weesperkarspel		Water	M143092.2	57
Waternet	Weesperkarspel	Fraunhof	Water	M143093.1	58
Waternet	Weesperkarspel		Water	M143093.2	59
Waternet	Weesperkarspel		Water	M143093.3	60
Waternet	Weesperkarspel	Holysloot	Water	M143094.1	61
Waternet	Weesperkarspel		Water	M143094.2	62
Waternet	Weesperkarspel		Water	M143094.3	63
Waternet	Weesperkarspel		Water	M143094.4	64
Waternet	Weesperkarspel		Water	M143094.5	65
Waternet	Weesperkarspel		Water	M143094.6	66
Waternet	Weesperkarspel	Fraunhof	Spuiwater	M143096.1	67
Waternet	Weesperkarspel		Spuiwater	M143096.2	68
Waternet	Weesperkarspel	Holysloot	Spuiwater	M143097.1	69
Evides	Braakman	Biervliet	Water	M143176.1	70
Evides	Braakman		Water	M143176.2	71
Evides	Braakman		Water	M143176.3	72
Evides	Braakman		Water	M143176.4	73
Evides	Braakman		Water	M143176.5	74
Evides	Braakman		Water	M143176.6	75
Evides	Braakman		Water	M143176.7	76

Evides	Braakman		Water	M143176.8	77
Evides	Braakman		Water	M143176.9	78
Evides	Braakman		Water	M143176.10	79
Evides	Braakman	Cadzand	Water	M143177.1	80
Evides	Braakman		Water	M143177.2	81
Evides	Braakman		Water	M143177.3	82
Evides	Braakman		Water	M143177.4	83
Evides	Braakman	Bijlokestraat	Water	M143179.1	84
Evides	Braakman	Philippine	Water	M143180.1	85
Evides	Braakman		Water	M143180.2	86
Evides	Braakman		Water	M143180.3	87
Evides	Braakman	Biervliet	Spuiwater	M143181.1	88
Evides	Braakman		Spuiwater	M143181.2	89
Evides	Berenplaat	Sneeuwbal (Hellevoetsluis)	Water	M143213.1	90
Evides	Berenplaat	De Hoef	Water	M143214.1	91
Evides	Berenplaat		Water	M143214.2	92
Evides	Berenplaat		Water	M143214.3	93
Evides	Berenplaat		Water	M143214.4	94
Evides	Berenplaat		Water	M143214.5	95
Evides	Berenplaat		Water	M143214.6	96
Evides	Berenplaat		Water	M143214.7	97
Evides	Berenplaat		Water	M143214.8	98
Evides	Berenplaat		Water	M143214.9	99
Evides	Berenplaat		Water	M143214.10	100
Evides	Berenplaat	Gruttersslop (Geervliet)	Water	M143216.1	101
Evides	Berenplaat		Water	M143216.2	102
Evides	Berenplaat		Water	M143216.3	103
Evides	Berenplaat		Water	M143216.4	104
Evides	Berenplaat		Water	M143216.5	105
Evides	Berenplaat		Water	M143216.6	106
Brabant Water	Rosmalen	Edelweisstraat Rosmalen	Water	M143330.1	107
Brabant Water	Rosmalen		Water	M143330.2	108
Brabant Water	Rosmalen	Vinkenveld Rosmalen	Water	M143332.1	109
Brabant Water	Rosmalen		Water	M143332.2	110
Brabant Water	Rosmalen		Water	M143332.3	111
Brabant Water	Rosmalen		Water	M143332.4	112
Brabant Water	Rosmalen		Water	M143332.5	113
Brabant Water	Rosmalen	Rozenstraat Rosmalen	Water	M143417.1	114
Brabant Water	Rosmalen		Water	M143417.2	115
Brabant Water	Rosmalen		Water	M143417.3	116
Brabant Water	Rosmalen		Water	M143417.4	117
Brabant Water	Rosmalen		Water	M143417.5	118
Brabant Water	Rosmalen		Water	M143417.6	119
Brabant Water	Rosmalen		Water	M143417.7	120

Brabant Water	Rosmalen		Water	M143417.9	121
Brabant Water	Rosmalen		Water	M143417.10	122
Referentiestam		????????????????		unknown #1	123
Referentiestam		????????????????		unknown #2	124
	Velden	AGW Hanik		M150105	125
Dunea	Scheveningen	SW		M150106	126
Evides	Braakman	Phillipine		M150107	127
Evides	Braakman	SW Braakman, Phillipine		M150108	128
Vitens		OGW Amersfoortseweg		M150109	129
Evides	Braakman	SW Braakman, Hoek		M150110	130
Vitens		OGW Amersfoortseweg		M150111	131
Evides	Braakman	SW Braakman, Hoek		M150112	132
	Velden	AGW Hanik		M150113	133