



Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen

Detectie van diergroepspecifieke fecale
verontreiniging

Februari 2013

Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen

Detectie van diergroepspecifieke fecale
verontreiniging

Februari 2013

© 2013 KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

Colofon

Titel

Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen

Opdrachtnummer

B111705

Rapportnummer

BTO 2013.014

Onderzoeksprogramma

Microbiologie

Projectmanager

Niels Dammers

Opdrachtgever

CVO

Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

Auteur(s)

Leo Heijnen en Kimberly Learbuch*

** Studente Masteropleiding Forensic Science (Universiteit van Amsterdam)*

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar

Samenvatting

Aanleiding: opsporing bron van fecale verontreiniging

Fecale verontreiniging van drink- en oppervlaktewater (recreatie) vormt een risico voor de volksgezondheid. Bij aanwezigheid van fecaal materiaal in water is het mogelijk dat verschillende ziekteverwekkende micro-organismen van fecale herkomst in het water aanwezig zijn en daarmee een risico vormen. Met de methoden die routinematig gebruikt worden om (drink)watermonsters te screenen op de aanwezigheid van fecaal materiaal worden de fecale bacteriën *E. coli* en enterococci via kweekmethoden aangetoond. Deze bacteriën zijn algemeen aanwezig in de feces van warmbloedige dieren. Daarmee zijn deze parameters waardevol om te bepalen of er fecale verontreiniging aanwezig is, maar er wordt dus geen informatie verkregen over de herkomst (welke diersoort?) van het aangetoonde fecaal materiaal. Kennis over de herkomst van een fecale besmetting is zeer waardevol. Deze kennis kan, in gevallen van fecale besmettingen, helpen om de bron (veroorzaker) op te sporen, om zeer gericht maatregelen te nemen om deze besmettingen te bestrijden en voorkomen. Kennis over de herkomst van fecale besmettingen maakt het ook mogelijk om het risico van een fecale besmetting beter in te schatten (bv. meer risico op virussen bij fecale verontreinigingen van mensen).

Doel: ontwikkelen methoden voor bronopsporing

Doelstelling van dit onderzoek was de ontwikkeling van methoden waarmee fecale bacteriën van specifieke diergroepen kunnen worden aangetoond.

Werkwijze: methoden ontwikkelen voor dierspecifieke bacteriesoorten

Door genetische en morfologische verschillen tussen diersoorten en een verschillend voedselpatroon van de diersoorten is de samenstelling van de bacteriële darmflora bij verschillende diersoorten zeer verschillend, hoewel ook veel bacteriesoorten bij meerdere diersoorten voorkomen. Op basis van de verschillen in samenstelling van de bacteriële darmflora zijn er in de literatuur diverse bacterietypen geïdentificeerd die slechts voorkomen in darmen van één specifieke groep van dieren (zoals bv.: herkauwers, mensen, vogels, runderen). Vooral bacteriën welke behoren tot de orde van de *Bacteroidales* bacteriën worden in dit verband veel gebruikt, maar toepassing van andere bacteriën is ook beschreven. Met deze kennis over diergroepspecifieke fecale bacteriën zijn verschillende selectieve qPCR methoden geselecteerd en ontwikkeld. Daarmee wordt een kenmerkend DNA fragment (merker) van deze diergroepspecifieke bacteriën vermeerderd en gekwantificeerd.

Resultaat: diergroepspecifieke qPCR methoden lijken voldoende specifiek en selectief

In dit onderzoek zijn de kenmerken van negen van deze merkers onderzocht waarmee fecale bacteriën kunnen worden aangetoond van: warmbloedige dieren (algemeen), mensen, herkauwers, runderen, varkens en vogels. Om kwantificatie van de merkers mogelijk te maken zijn er nauwkeurig gekwantificeerde DNA-suspensies gegenereerd waarbij gebruik gemaakt is van plasmide-DNA waarin de kenmerkende qPCR fragmenten zijn gekloneerd. Van de negen merkers bleken er zeven toepasbaar, de amplificatie van één merker verliep zeer inefficiënt de selectiviteit van een andere merker bleek zeer laag. De sensitiviteit (worden de merkers aangetoond in alle fecesmonsters van de doelgroep aangetoond?) en specificiteit (worden de merkers alleen in feces van de doelgroep aangetoond en niet in andere diergroepen?) zijn onderzocht door qPCR reacties uit te voeren op DNA-monsters geïsoleerd uit een grote collectie fecesmonsters van verschillende dieren. De sensitiviteit (78,1-100%) en specificiteit (67,0-100%) van de zeven merkers en de concentratie van de merkers in feces van dieren uit doelgroep bleek zeer hoog (variërend van $8,9 \times 10^4$ tot $1,4 \times 10^8$ DNA kopieën per mg feces).

Kruisreacties met DNA uit feces van andere diergroepen traden sporadisch op maar de concentratie in deze kruisreagerende monsters was zeer laag zodat niet te verwachten valt dat kruisreacties de juiste interpretatie van meetresultaten zullen belemmeren. Toepassing van de methoden op DNA uit riool- en oppervlaktewater toonde aan dat de verschillende merkers aantoonbaar zijn in monsters waarin deze merkers ook verwacht worden.

Conclusie: bronopsporingsmethoden beschikbaar

Dit onderzoek heeft methoden beschikbaar gemaakt waarmee merkers voor bacteriën uit de feces van warmbloedige dieren, mensen, herkauwers, runderen, varkens en vogels specifiek en zeer gevoelig kunnen worden aangetoond. Met deze methoden is het mogelijk om de herkomst van fecale besmettingen zeer snel te achterhalen waardoor risico's beter ingeschat kunnen worden en gerichte maatregelen genomen kunnen worden.

Verklarende woorden- en afkortingenlijst

Amplicon	DNA-fragment dat middels PCR wordt vermenigvuldigd
bp	Het aantal bouwstenen (basenparen) van een DNA fragment, een maat voor de lengte van een fragment
Cq	Quantification cycle of drempelwaarde, is het moment van detectie van het vermenigvuldigde specifieke DNA-fragment van een monster door de qPCR apparatuur na een x-aantal PCR cycli (verdubbelingen). De Cq waarde wordt gebruikt voor kwantificatie van de concentratie DNA-kopieën in een monster.
Detectie	Aantonen van de aanwezigheid van (merker van) een organisme
DNA	Desoxyribonucleïnezuur
DNA-sequentie	Nucleotidevolgorde van een bepaald stuk(je) DNA
Gen	Een DNA-segment dat de code bevat van een eiwit
Genoom	Totaal aan erfelijk materiaal van een organisme (DNA)
IC	Interne controle DNA. Hiermee wordt de opbrengst van de DNA-extractiemethode en de aanwezigheid van matrixcomponenten die de PCR reacties remmen bepaald
Merker	Een DNA sequentie die zeer specifiek voorkomt bij een bepaalde groep van organismen (bacteriën)
mg	milligram
ml	milliliter
Multiplex-PCR	PCR-reactie waarbij gebruik gemaakt wordt van meerdere primer/probe sets. Hierbij worden in één PCR-reactie verschillende specifieke DNA-fragmenten vermenigvuldigd
Nucleotide	Bouwsteen van het DNA
PCR	Polymerase ketting (chain) reactie, techniek voor de vermenigvuldiging van specifieke (kenmerkende) DNA-sequenties (merkers)
Plasmide	Cirkelvormige DNA molecule die zich buiten het chromosomaal DNA van een bacterie bevindt en zich onafhankelijk van de bacterie vermeerderd
Primer	Kort synthetisch DNA-molecule waarvan er twee worden gebruikt in de PCR reactie voor het vermeerderen van een specifieke DNA sequentie. De

samenstelling van deze primers bepaald de selectiviteit en sensitiviteit van een qPCR methode

Probe	Oligonucleotide gelabeld met een fluorescente groep waarmee bij qPCR reacties het vermenigvuldigde DNA molecule tijdens de PCR-reactie ("Real-time") wordt gedetecteerd
qPCR	Kwantitatieve (quantitative) PCR (Polymerase Chain Reaction) waarbij met behulp van real-time PCR kwantificatie mogelijk is
rRNA	Ribosomaal RNA dat onderdeel is van de eiwitsynthese in de cel
Sensitiviteit	Het percentage terecht positieve uitslagen bij het uitvoeren van de qPCR tests op DNA van fecesmonsters van de diergroep waartegen de test gericht is
Sequentie	Nucleotidevolgorde van een DNA-molecule
Specificiteit	De specificiteit van een qPCR methode beschrijft het vermogen van de methode om echt-negatieve reacties te genereren (voorbeeld in dit onderzoek: geen signaal met een methode waarmee mensspecifieke fecale bacteriën worden aangetoond bij het testen van DNA uit de feces van koeien).

Inhoud

Samenvatting	1
Verklarende woorden- en afkortingenlijst	3
Inhoud	5
1 Inleiding	7
2 Materiaal en methoden	9
2.1 Water- en fecesmonsters	9
2.1.1 Fecesmonsters	9
2.1.2 Monsters van oppervlakte- en rioolwater	9
2.2 qPCR merkers voor het aantonen van diergroepspecifieke fecale besmettingen	10
2.2.1 Algemene Bacteroidales merker	10
2.2.2 Merker voor specifieke detectie van fecale bacteriën van mensen	11
2.2.3 Merkers voor specifieke detectie van fecale bacteriën van herkauwers	11
2.2.4 Merkers voor specifieke detectie van fecale bacteriën van runderen	11
2.2.5 Merkers voor specifieke detectie van fecale bacteriën van varkens	12
2.2.6 Merkers voor specifieke detectie van fecale bacteriën van vogels	12
2.3 Extractie van DNA uit water- en fecesmonsters	13
2.4 Kwantificatie met qPCR	14
2.4.1 De qPCR reacties	14
2.4.2 De kwantificatie methode	15
2.4.3 Rendement en remming: IC-DNA	15
3 Resultaten	17
3.1 Testen van primers en probes (Fase 1)	17
3.2 Constructie van ijklijnen (Fase 2)	18
3.2.1 Sequenties van de fragmenten van de CowBac en GFD merkers	18
3.2.2 Ijklijnen en de efficiëntie van de qPCR reacties	19
3.3 Specificiteit, sensitiviteit en concentratie van de fecale merkers (Fase 3)	20
3.3.1 Specificiteit en sensitiviteit	21
3.3.2 Concentratie van merkers in fecaal materiaal	22
3.4 Toepassing in watermonsters (Fase 4)	23
3.4.1 Analyse van rioolwater	24
3.4.2 Analyse van oppervlaktewater	27
3.4.3 Merkers in zwemplas "De Middelwaard" in Vianen	29
4 Discussie, conclusies en aanbevelingen	33
5 Literatuur	37

1 Inleiding

Fecale verontreiniging van drink- en recreatiewater vormt een potentieel gezondheidsrisico vanwege de mogelijke aanwezigheid van ziekteverwekkende micro-organismen (pathogenen) in fecaliën van mens en dier. Vanwege de grote variëteit aan pathogene micro-organismen, de lage (maar wel risicovolle) concentraties van deze pathogenen in water en het ontbreken van geschikte methoden voor het detecteren van de meeste pathogenen, wordt voor het monitoren van de hygiënische kwaliteit van water, gebruik gemaakt van indicatororganismen. Vooral *Escherichia coli* (*E. coli*) en enterococci en in mindere mate sulfietreducerende clostridia worden toegepast als indicatororganismen voor de aanwezigheid van pathogene bacteriën van fecale herkomst. Voor het detecteren van deze organismen zijn relatief eenvoudige methoden beschikbaar. Deze methoden worden routinematig ingezet om de aanwezigheid en concentratie van de indicatororganismen te bepalen en daarmee een indruk te krijgen over de hygiënische kwaliteit van het onderzochte water. Doordat de gebruikte indicatororganismen algemeen aanwezig zijn in de darmen van warmbloedige dieren wordt met het gebruik van deze indicatororganismen geen informatie verkregen over de herkomst (bron) van een fecale besmetting. Kennis over de bron van fecale besmettingen is van grote waarde, deze kennis maakt de mogelijke risico's van de besmetting beter inzichtelijk doordat bepaalde pathogene micro-organismen alleen bij specifieke diersoorten voorkomen (zoals menspathogene virussen alleen voorkomen in de feces van mensen). Daarnaast geeft identificatie van de fecale besmettingsbron de bron (veroorzaker) op te sporen en de mogelijkheid om maatregelen te nemen om daarmee deze bron weg te nemen en de kans op herbesmettingen terug te dringen.

Voor het traceren van de bron van fecale besmettingen is de toepassing van verschillende typeringsmethoden onderzocht waarmee de, uit watermonsters, gekweekte *E. coli* of enterococci bacteriën in detail worden onderzocht. Uit onderzoek, waarbij DNA-fingerprinting technieken worden toegepast om *E. coli* of enterococci stammen van verschillende diersoorten te onderscheiden, blijkt dat de genetische variëteit van de *E. coli* en de enterococci stammen bij verschillende diersoorten zeer groot is waardoor de correlatie tussen de DNA-fingerprints en de herkomst van de individuele bacteriestammen zeer moeilijk te maken is [1-3]. Methoden waarbij er, uitgaande van een celsuspensie, "Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry" (MALDI-TOF-MS) wordt gebruikt voor genereren van een bacteriële fingerprint op basis van de specifieke samenstelling van de bacteriën [4] is goed bruikbaar voor het identificeren van gekweekte bacteriesoorten [5]. Mogelijk is het onderscheidend vermogen van MALDI-TOF MS ook voldoende voor het differentiëren van *E. coli* [6] of enterococci [7] van verschillende diersoorten. Maar, meer onderzoek is noodzakelijk om de mogelijkheden en beperkingen van MALDI-TOF-MS voor het differentiëren van dierspecifieke *E. coli* en enterococci stammen te leren kennen.

De mogelijkheden van kwantitatieve qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) methoden, waarmee DNA van diersoortspecifieke darmbacteriën wordt aangetoond, zonder dat daarvoor een kweekstap noodzakelijk is, zijn recent door diverse onderzoeksgroepen uitgebreid onderzocht [8-18]. Door genetische en morfologische verschillen tussen diersoorten en een verschillend voedselpatroon van de diersoorten is de samenstelling van hun bacteriële darmflora zeer verschillend. Op basis van de verschillen in samenstelling van de bacteriële darmflora zijn er diverse bacterietypen geïdentificeerd die slechts voorkomen in darmen van één specifieke groep van dieren (zoals bv.: herkauwers, mensen, vogels of runderen). Vooral bacteriën welke behoren tot de orde van de *Bacteroidales* bacteriën worden in dit verband veel gebruikt, maar ook andere bacteriën worden in dit verband toegepast. *Bacteroidales* bacteriën vermeerderen zich alleen in de darmen van warmbloedige dieren en komen in zeer hoge concentraties in de feces voor (meestal veel hoger dan *E. coli* en enterococci) [19]. Er zijn

DNA-sequenties van *Bacteroidales* bacteriën geïdentificeerd welke exclusief bij bepaalde diergroepen voorkomen. De aanwezigheid van de specifieke DNA-sequenties van deze diergroepspecifieke darmbacteriën in het milieu (water) vormt dan een indicatie voor de aanwezigheid van een fecale besmetting afkomstig van deze specifieke diergroep. Op basis van deze diergroepspecifieke bacteriën zijn verschillende selectieve qPCR methoden ontwikkeld waarmee een kenmerkend DNA fragment (merker) van deze diergroepspecifieke bacteriën kan worden vermeerderd en gekwantificeerd. Zo zijn er methoden ontwikkeld waarmee er (een DNA-fragment van) *Bacteroidales* bacteriën kan worden aangetoond die specifiek voorkomen in de darmen van; mensen [8-11], herkauwers [8, 12-14], runderen [15, 16], varkens [14, 17] of *Lactobacillus* bacteriën die specifiek voorkomen in de darmen van varkens [18, 20] of *Helicobacter* bacteriën die specifiek voorkomen in de darmen van vogels [21]. Ook zijn er algemene qPCR methoden ontwikkeld waarmee het mogelijk is om, in principe, "alle" *Bacteroidales* bacteriën die voorkomen in de darmen van warmbloedige dieren (diergroep-onafhankelijk) aan te tonen om daarmee snel en gevoelig fecale besmettingen "in zijn algemeenheid" aan te tonen. Hoewel, van een aantal van deze "algemene" methoden is aangetoond dat de specificiteit van deze methoden niet toereikend is [22] om te kunnen toepassen als alternatieve methode voor het detecteren van fecale contaminatie in drinkwater. Deze methoden zijn mogelijk wel bruikbaar om een indruk te krijgen over de besmettingsgraad in het geval van besmetting bij calamiteiten of voor het meten van fecale besmettingen in ruw oppervlaktewater (o.a. recreatiewater). Kwantitatieve PCR methoden voor het detecteren van diergroepspecifieke fecale verontreinigingen lijken bruikbaar voor het snel, en onafhankelijk van kweekmethoden, opsporen van de potentiële bron van de fecale verontreinigingen. Daarom zijn in dit onderzoek, op basis van een literatuurstudie, veelbelovende methoden geïdentificeerd en zijn de mogelijkheden en beperkingen van de geselecteerde methoden onderzocht

De doelen van dit onderzoek waren:

- Op basis van literatuuronderzoek veelbelovende methoden selecteren voor het aantonen van fecale verontreinigingen, veroorzaakt door een aantal relevante diergroepen:
 - o Algemeen: "alle" warmbloedige dieren
 - o Mensen
 - o Herkauwers
 - o Runderen
 - o Varkens
 - o Vogels
- De methoden testen en, indien noodzakelijk, optimaliseren
- Ontwikkelen van gestandaardiseerde DNA-suspensies die gebruikt kunnen worden voor het genereren van ijklijnen waarmee kwantificatie van de specifieke merkers mogelijk wordt
- De selectiviteit van de methoden onderzoeken door de methoden toe te passen op DNA monsters uit fecaal materiaal afkomstig van verschillende dieren
- De concentratie van de merkers in feces van verschillende dieren bepalen
- De methoden toepassen op veldmonsters om de toepassingsmogelijkheden in praktijksituaties te toetsen.

2 Materiaal en methoden

2.1 Water- en fecesmonsters

Voor dit onderzoek is een groot aantal water- en fecesmonsters geanalyseerd. Deze monsters zijn afkomstig van een aantal verschillende locaties en bronnen.

2.1.1 Fecesmonsters

Fecesmonsters van runderen, schapen, reeën en herten

De onderzochte fecesmonsters van runderen, schapen, reeën en herten zijn afkomstig van een onderzoek naar het voorkomen van pathogene micro-organismen in de feces van grote grazers die verblijven in de Amsterdamse waterleidingduinen. Dit onderzoek is, in opdracht van Waternet, uitgevoerd in 2007 en 2008 en gerapporteerd in 2009 [23]. Gedurende de periode van onderzoek (april 2007-april 2008) zijn fecesmonsters van runderen (n=61), schapen (n=79), reeën (n=34) en damherten (n=84) verzameld en bewaard bij -20°C. Voor analyses (in 2008) zijn de monsters ontdooid en is DNA geëxtraheerd uit 250 mg feces. Het geëxtraheerde DNA is bewaard bij -80°C en voor dit onderzoek gebruikt.

Fecesmonsters van landbouwhuisdieren: koeien en varkens

DNA-monsters geïsoleerd uit feces van vlees- en melkkoeien (n=184) en varkens (n=146) zijn afkomstig van de Gezondheidsdienst voor Dieren in Deventer (GD). Bij deze monsters is DNA geïsoleerd door de GD uit 20 tot 300 mg feces.

Fecesmonsters van watervogels

Fecesmonsters van watervogels zijn verzameld op verschillende locaties. Monsters van verschillende ganzensoorten zijn verzameld op een grasoever langs het Lekkanaal in Nieuwegein op een locatie tussen de Beatrixsluis en de rivier de Lek. Daarnaast zijn er, in het kader van onderzoek voor Rijkswaterstaat-Waterdienst (in samenwerking met Grontmij), fecesmonsters door Sovon (Vogelonderzoek Nederland) van verschillende watervogels verzameld (3 Brandganzen, 2 Grauwe Ganzen, 1 Nijlgans, 2 Knobbelswanen, 2 Kokmeeuwen en 2 Wilde eenden) en getransporteerd naar KWR. Bij KWR is DNA geïsoleerd uit 10 mg fecaal materiaal door gebruik te maken van de MoBio Power Biofilm Kit.

Humane fecesmonsters

DNA-monsters van humane feces (n=187) zijn verkregen van de moleculair-biologische afdeling (Dr. Erik van Hannen) van het microbiologisch laboratorium van het St Antonius ziekenhuis in Nieuwegein. Deze monsters zijn afkomstig van patiënten waarbij routinematig onderzoek is gedaan naar het voorkomen van pathogene organismen in de feces. Bij het Antonius ziekenhuis is DNA geïsoleerd uit een onbekende maar zeer kleine hoeveelheid feces (een "oogje van een 1 µl öse" of 10 µl van waterige feces). Dit DNA is enkele weken opgeslagen bij +4°C en vervolgens naar KWR getransporteerd en aansluitend geanalyseerd.

2.1.2 Monsters van oppervlakte- en rioolwater

De DNA-monsters van oppervlakte- en rioolwater van diverse locaties zijn afkomstig van een onderzoek uitgevoerd in 2009 waarbij de aanwezigheid van *Legionella pneumophila* in oppervlakte- en afvalwater is onderzocht [24]. Het DNA is, sinds 2009, bewaard bij -80°C. De monsters van recreatieplas "De Middelwaard" in Vianen zijn speciaal voor dit onderzoek verzameld in wegwerpflessen van kunststof met een volume van 1L. Deze flessen zijn direct getransporteerd naar KWR waarna een volume van 100 ml is gefiltreerd en DNA is geëxtraheerd door gebruik te maken van de Power Biofilm Kit van MoBio.

2.2 qPCR merkers voor het aantonen van diergroepspecifieke fecale besmettingen

Literatuuronderzoek is uitgevoerd om verschillende bacteriële qPCR merkers te selecteren. Op basis van de, in de wetenschappelijke literatuur beschreven onderzoeksresultaten, zijn vervolgens veelbelovende merkers geselecteerd welke in dit project zijn onderzocht. Van de onderzochte merkers zijn de namen, de fragmentlengte, het gedetecteerde organisme en de bijbehorende referenties weergegeven in tabel 1, een uitgebreidere beschrijving van de merkers wordt weergegeven in de aansluitende paragrafen.

Tabel 1. Overzicht van de toegepaste primers en probes. *De namen die in dit rapport zijn gehanteerd zijn vetgedrukt, de namen die gebruikt zijn in de literatuur staan tussen haakjes.

Naam*	Namen van Primers and probe	Gedetecteerd organisme	Fragment lengte (bp)	Referenties
Algemeen (Warmbloedige dieren)				
AllBac (GB342)	GB342F GenBacR4 GB342Pr	Bacteroidetes	129	Siefring <i>et al</i> , 2008 [25] Dick <i>et al</i> , 2004 [19]
Mensen				
HumBac (HF183)	HF183F HF183R SSHBac-Pr	Mensspecifieke Bacteroides	83	Bernhard <i>et al</i> , 2000 [8] Seurinck <i>et al</i> , 2005 [9] Haugland <i>et al</i> , 2010 [26] Shanks <i>et al</i> , 2010[11]
Herkauwers				
RumBac1	CF128 BacCow305R BacCowPr	Herkauwer –specifieke Bacteroidales	177	Bernard <i>et al</i> , 2000 [8] Kildare <i>et al</i> , 2007[12]
RumBac2	BacB2-590F Bac708Rm BacB2-626P	Herkauwersspecifieke Bacteroidales	99	Mieszkin <i>et al</i> , 2010 [13] Gourmelon <i>et al</i> , 2010 [14]
Runderen				
CowBacM2	CowM2F CowM2R BacCowM2Pr	Onbekende Rundspecifieke darmbacteriën	92	Shanks <i>et al</i> , 2008 [15] Shanks <i>et al</i> , 2010 [16]
CowBacM3	CowM3F CowM3R BacCowM3Pr	Onbekende Rundspecifieke darmbacteriën	131	Shanks <i>et al</i> , 2008 [15] Shanks <i>et al</i> , 2010 [16]
Varkens				
PigBac2	Pig-2-Bac41F Pig-2-Bac163Rm	Varkensspecifieke Bacteroidales	116	Mieszkin <i>et al</i> , 2009 [17] Gourmelon <i>et al</i> 2010 [14]
PigLac	OTU171_F OTU171_R	Varkensspecifieke Lactobacillus sobrius/amylovorus	175	Konstantinov <i>et al</i> , 2005 [20] Marti <i>et al</i> , 2010 [18]
Vogels				
Bird-GFD (GFD)	GFD_F GFD_R	Unclassified Helicobacter spp.	123	Green <i>et al</i> , 2012 [21]

2.2.1 Algemene Bacteroidales merker

Er zijn, in de literatuur, verschillende algemene *Bacteroidales* merkers beschreven en onderzocht. Deze merkers kunnen, in principe, gebruikt worden voor het detecteren van “algemene” (niet diergroep-specifiek) fecale contaminatie. Van een deel van deze methoden is

echter aangetoond dat deze niet voldoende specifiek zijn om te kunnen dienen als alternatieve methode voor het aantonen van fecale besmettingen in drinkwater [22, 27]. Mogelijk dat deze "algemene" *Bacteroidales* merkers niet goed bruikbaar zijn om de afwezigheid van fecale contaminatie in drinkwater met zekerheid te kunnen aangeven maar is een algemene bacteroides merker wel waardevol om de mate van besmetting te bepalen in oppervlaktewater en mogelijk ook in gevallen van fecale besmettingen bij calamiteiten.

De, in dit onderzoek toegepaste methode, is ontwikkeld in 2004 [19] en later geoptimaliseerd [26] en is in diverse studies toegepast als merker voor het detecteren van fecale besmettingen [9, 10, 15, 16]. Deze merker is niet onderzocht in eerder BTO onderzoek (van der Wielen [22, 27]).

2.2.2 Merker voor specifieke detectie van fecale bacteriën van mensen

Primers voor het detecteren van een mensspecifieke bacteroides merker zijn al ontwikkeld in 2000 [28]. Maar, het PCR-fragment dat gevormd wordt door toepassing van deze primers is vrij lang waardoor de PCR reactie niet efficiënt verloopt en de gevoeligheid van de methode beperkt is. Daarom is er later voor één van de primers een alternatief ontwikkeld waarmee een korter fragment wordt gegenereerd [9]. Toepassing van deze primers, in een klein aantal pilot-experimenten bij KWR liet zien dat detectie van mensspecifieke fecale besmettingen met deze primers mogelijk leek [27]. Met deze primers wordt een fragment (83 bp) van het 16S rRNA gen van mensspecifieke *Bacteroidales* stammen geamplificeerd. Een studie van Mieszkin [13] laat zien dat deze methode specifiek is voor mensspecifieke fecale verontreinigingen.

2.2.3 Merkers voor specifieke detectie van fecale bacteriën van herkauwers

De diergroep van herkauwers vormt een groep van dieren (waaronder runderen, schapen, geiten en reeën) met een zeer speciaal spijsverteringssysteem, het rumen, waarbij vier magen worden gebruikt om het voedsel te verteren. Op basis van de specifieke bacteriën die in dit speciale verteringssysteem voorkomen zijn diverse qPCR methoden ontwikkeld om fecaal materiaal van herkauwers te kunnen aantonen. Twee van de beschreven methoden zijn geselecteerd om verder te onderzoeken: RumBac1 en RumBac2.

RumBac1

De basis voor de RumBac1 qPCR is gelegd door Bernhard en Field [8]. Deze qPCR methode is specifiek voor fecale bacteriën van herkauwers, maar kruisreacties met fecaal materiaal van varkens bleek in een latere studie sporadisch op te treden [29]. Om de efficiëntie en specificiteit van de methode te vergroten is één van de primers aangepast om de amplificatie van een korter DNA-fragment mogelijk te maken. Om de specificiteit te vergroten en de analyse te vereenvoudigen is er ook een probe ontwikkeld [12]. Met de qPCR primers wordt een fragment (177 bp) van het 16S rRNA van herkauwersspecifieke *Bacteroidales* stammen vermenigvuldigd en aangetoond.

RumBac2

Ook voor deze qPCR is de basis gelegd door Bernhard en Field [8]. In later onderzoek is één van de primers aangepast zodat een korter fragment wordt geamplificeerd en is er een probe ontwikkeld [13] om de analyses te vereenvoudigen en de qPCR methode specifiek te maken. Ook bij deze qPCR methode wordt er een fragment (99 bp) van het 16S rRNA gen van herkauwersspecifieke *Bacteroidales* stammen vermenigvuldigd en gedetecteerd.

2.2.4 Merkers voor specifieke detectie van fecale bacteriën van runderen

Voor de detectie van fecale bacteriën van runderen zijn, vanuit de literatuur, twee veelbelovende merkers geselecteerd: CowBacM2 en CowBacM3. De ontwikkeling van beide merkers is beschreven door Shanks *et al.*, 2008 [15]. Beide merkers tonen fragmenten van

functionele genen van onbekende runderspecifieke darmbacteriën aan. Deze merkers blijken in een vervolgstudie zeer specifiek voor fecale bacteriën van runderen te zijn [16].

2.2.5 Merkers voor specifieke detectie van fecale bacteriën van varkens

Vanwege strenge regelgeving voor het lozen van varkensmest lijken verontreinigingen ten gevolge van fecale bacteriën van varkens waarschijnlijk niet zeer relevant voor drinkwaterbedrijven of beheerders van recreatiewater. Maar vanuit het Nederlands Forensisch Instituut (NFI) was er zeer veel interesse voor methode waarmee varkens-specifieke fecale bacteriën specifiek kunnen worden aangetoond. Deze methoden kunnen door het NFI mogelijk worden toegepast om bewijsmateriaal te verzamelen tegen afvalverwerkers die illegaal mest verwerken in hun afvalstroom. Daarom is de ontwikkeling van deze methode gedeeltelijk gefinancierd door het NFI (Lida van den Eijkel).

Drie verschillende methoden voor het detecteren van fecale bacteriën afkomstig van varkens zijn onderzocht: PigBac1, PigBac2 en PigLac. Met de methoden voor detectie van de PigBac1 en PigBac2 merkers worden fragmenten van het 16S rRNA gen van varkensspecifieke *Bacteroidales* bacteriën gedetecteerd, de methoden zijn in 2009 beschreven door Mieszkin *et al* [17] en later (2011) toegepast door Marti *et al* [30] waarbij enige kruisreactie met fecale bacteriën van muskusratten werd aangetoond. De PigLac merker is ontwikkeld in 2005 [20] en richt zich op een DNA-fragment van varkensspecifieke *Lactobacillus* bacteriën.

2.2.6 Merkers voor specifieke detectie van fecale bacteriën van vogels

Methoden voor het detecteren van fecaal materiaal van vogels zijn zeer recent beschreven door Green *et al* 2012 [21]. Met deze vogelspecifieke methoden wordt geen DNA van *Bacteroidales* bacteriën gedetecteerd aangezien aangetoond is dat *Bacteroidales* bacteriën slechts weinig voorkomen in de feces van vogels [13]. In de publicatie worden drie verschillende methoden beschreven: GFB, GFC en GFD. Bij toepassing van de GFD primers wordt een DNA-fragment van de bacteriële groep van *Fusobacterium*, met de GFC primers een DNA-fragment van de bacteriesoort *Catellibacterium marimammalium* en met de GFD primers een DNA-fragment van een vogelspecifiek *Helicobacter*-type aangetoond. Volgens de studie [21] is de specificiteit van de drie primerparen zeer verschillend en is geen van de primerparen ideaal voor het detecteren van alle vogelsoorten zonder daarbij ook fecaal materiaal van andere diersoorten aan te tonen. Het voorkomen van de verschillende merkers is getest op fecaal materiaal van een groot aantal vogel- en andere diersoorten in de Verenigde Staten, een samenvatting van deze onderzoeksresultaten is weergegeven in de, uit het originele artikel gekopieerde tabel (Tabel 1). De GFB-merker wordt in een beperkt deel van de fecesmonsters van meeuwen, ganzen, kippen en zwanen aangetoond (respectievelijk 26, 1, 6 en 50%) en deze merker wordt niet aangetoond in de feces van eenden, daarnaast wordt de merker aangetroffen in 2% van de fecesmonsters van konijnen (maar verder niet bij andere diersoorten). De GFC merker wordt aangetoond in een groter deel van de fecesmonsters van meeuwen, ganzen, eenden en kippen (respectievelijk 64, 3, 4 en 4%) en in een kleiner deel van de fecesmonsters van zwanen (13%), maar deze merker wordt ook gedetecteerd in vrij groot deel van de fecesmonsters van schapen (35%). De GFD merker wordt aangetoond in een groot deel van de fecesmonsters van meeuwen, ganzen, eenden, kippen, zwanen (respectievelijk 59, 68, 7, 43 en 100%) en wordt niet aangetoond bij andere diersoorten (o.a. mensen, koeien, honden, katten, konijnen en paarden). Vanwege de hoge sensitiviteit (veel "echt positieven") en specificiteit (weinig "vals positieven") is ervoor gekozen om in eerste instantie de GFD merker verder te onderzoeken.

Tabel 2. Kopie van de tabel uit Green et al (2012) [21] waarin een samenvatting wordt gegeven van een screening van de verschillende vogelspecifieke PCR methoden op DNA uit fecaal materiaal van verschillende vogel- en andere diersoorten.

TABLE 4 Species distribution of markers

Fecal source	No. of samples		No. (%) of samples that amplified with the following marker:			
	Total	From New Zealand	GFB	GFC	GFD	Total ^a
Gull	73	12	19 (26)	47 (64)	43 (59)	51 (70)
Goose	106	12	1 (1)	3 (3)	72 (68)	73 (69)
Duck	76	12	0 (0)	3 (4)	58 (76)	59 (78)
Chicken	98	8	6 (6)	4 (4)	42 (43)	44 (45)
Human	11		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sewage	11	11	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Cat	9	4	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Dog	16	12	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Cow	24	12	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Horse	18	6	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sheep	34	12	0 (0)	12 (35)	0 (0)	12 (35)
Goat	12	12	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Deer	9		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Pig	5		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Rabbit	12	12	2 (17)	0 (0)	0 (0)	2 (17)
Rodent	3		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Possum	12	12	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Sea lion	22		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Dolphin	9		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Elephant seal	10		0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Harbor seal	1		0/0	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Godwit	2		1 (50)	1 (50)	0 (0)	2 (100)
Sandpiper	13		1 (8)	3 (23)	4 (31)	7 (54)
Coot	2		1 (50)	0 (0)	2 (100)	2 (100)
Pigeon	13		1 (8)	0 (0)	2 (15)	3 (23)
Cormorant	3		0 (0)	0 (0)	2 (67)	2 (67)
Egret	3		0 (0)	0 (0)	2 (67)	2 (67)
Pelican	4		0 (0)	1 (25)	4 (100)	4 (100)
Tern	3		0 (0)	0 (0)	1 (33)	1 (33)
Crow	1		0 (0)	0 (0)	1 (100)	1 (100)
Swan	8	8	4 (50)	1 (13)	8 (100)	8 (100)
Pukeko	10	10	0 (0)	9 (90)	0 (0)	9 (90)
Avian specificity ^b			0.99	0.98	1.00	
Avian sensitivity ^c			0.08	0.17	0.57	
Gull specificity ^d			0.97	0.94	0.64	
Gull sensitivity ^e			0.26	0.64	0.58	

^a The total number (percentage) of each source that was detected by at least one marker.

^b Avian specificity = true negative_{nonavian} / (true negative_{nonavian} + false positive_{nonavian}).

^c Avian sensitivity = true positive_{avian} / (true positive_{avian} + false negative_{avian}).

^d Gull specificity = true negative_{nongull} / (true negative_{nongull} + false positive_{nongull}).

^e Gull sensitivity = true positive_{gull} / (true positive_{gull} + false negative_{gull}).

2.3 Extractie van DNA uit water- en fecesmonsters

Watermonsters

Voor de extractie van DNA uit watermonsters is voor elk monster een volume van 100 ml water (onder vacuüm) gefiltreerd over polycarbonaat membraanfilters (Track-edge filters, Sartorius) met een poriëgrootte van 0,2 µm en een doorsnede van 4,5 cm. Bij een beperkt aantal monsters bleek filtratie van 100 ml niet mogelijk, bij deze monsters is een kleiner volume gefiltreerd. Voor extractie van DNA uit de, op de filters, geconcentreerde organismen is het filter opgevouwen en overgebracht naar een bead-bead buisje (met hierin keramische beads van verschillend formaat) van de PowerBiofilm Kit van MoBio (MoBio, USA). Lysis buffer en een "inhibitie en recovery" controle (IC) wordt aan het filter toegevoegd. Een bead-bead stap, waarin de buisjes zeer krachtig worden geschud waardoor de keramische beads met grote snelheid door het monster worden bewogen, zorgt in combinatie met de lysis buffer voor het

open breken van de cellen en het vrijkomen van (o.a.) het DNA. Aansluitend wordt via een affiniteitskolom het DNA gezuiverd van celresten en monstercomponenten. Ten slotte wordt het DNA geëluëerd van de affiniteitskolom in een volume van 200 µl.

2.4 Kwantificatie met qPCR

Verschillende qPCR reacties worden uitgevoerd voor het detecteren van de diergroepspecifieke merkers waarbij verdunningsreeksen van gekwantificeerde suspensies van plasmide-DNA worden gebruikt voor het kwantificeren van de merkers.

De polymerase ketting reactie (PCR) is een enzymatische reactie waarmee, onder invloed van nauwkeurig gecontroleerde temperatuurwisselingen (cycli), een kenmerkend DNA-fragment (merker) bij elke cyclus wordt verdubbeld waardoor dit fragment in korte tijd exponentieel tot hoge aantallen wordt vermenigvuldigd. Met behulp van korte synthetische DNA-moleculen (primers) met een DNA-volgorde (sequentie) die zeer specifiek is voor een bepaald bacterietype kan in de PCR een DNA-fragment van dit bacterietype selectief worden vermenigvuldigd. Bij Real-time PCR wordt tijdens de reactie de vorming van deze kenmerkende DNA-fragmenten on-line gevolgd. De gevormde fragmenten worden gedetecteerd met: een synthetische DNA-probe die is gelabeld met een fluorescente kleurstof of een fluorescente kleurstof (SYBR-green) die pas fluoresceert na binding aan dubbelstrengs DNA. Het aantal PCR-cycli waarbij het DNA-signaal boven de detectiegrens uitkomt ("quantification cycle" of C_q-waarde) is een maat voor de DNA-concentratie in het monster. De C_q-waarden van de referentiemonsters worden gebruikt voor berekening van een ijklijn. Deze ijklijn vormt vervolgens de basis voor het kwantificeren van de verschillende merker in de monsters.

2.4.1 De qPCR reacties

Voor het uitvoeren van de qPCR analyses zijn de volgende reacties uitgevoerd:

- Reacties waarin twee merkers gelijktijdig worden aangetoond: de "algemene *Bacteroidales* merker" en het IC-DNA

Voor de reacties wordt gebruik gemaakt van twee afzonderlijke probes met hieraan labels gekoppeld die fluorescentielicht produceren bij verschillende golflengten. Door het gebruik van deze verschillende labels is het mogelijk om beide merkers gelijktijdig in één reactie aan te tonen.

- Reacties waarmee de mensspecifieke fecale merker wordt aangetoond
- Reacties waarmee de herkauwerspecifieke fecale merker wordt aangetoond
- Reacties waarmee de rundveespecifieke fecale merker wordt aangetoond
- Reacties waarmee de varkensspecifieke fecale merker wordt aangetoond
- Reacties waarmee de vogelspecifieke fecale merker wordt aangetoond

Bij deze vogelspecifieke fecale merker is er (nog) geen probe ontwikkeld. Voor detectie van dit fragment wordt er gebruik gemaakt van de kleurstof SYBR-green. Deze kleurstof bindt niet-selectief aan dubbelstrengs-DNA en de stof fluoresceert pas na binding aan dubbelstrengs DNA. Om de integriteit van het gevormde DNA-fragment te bepalen wordt een smeltcurve analyse uitgevoerd waarbij de smelttemperatuur afhankelijk is van de lengte en samenstelling van het DNA-fragment.

qPCR analyses zijn uitgevoerd in een volume van 50 µl en er is gebruik gemaakt van een geoptimaliseerd reagens mengsel waarin alle componenten (Taq polymerase, nucleotiden en buffer) al door de fabrikant van dit mengsel (Biorad) zijn toegevoegd. Van elk monster is een volume van 10 µl van het geëxtraheerde DNA in elke qPCR reactie (in duplo) geanalyseerd. Ook is van elk monster een analyse uitgevoerd op 10 µl van een 10-voudige verdunning van het DNA.

2.4.2 De kwantificatie methode

Voor het kwantificeren van de verschillende merkers zijn er *E. coli* plasmiden geconstrueerd waarin de DNA-sequenties van de individuele PCR-fragmenten zijn gekloneerd. Deze plasmiden zijn vermeerderd in *E. coli* cellen en vervolgens gezuiverd. Het DNA van de gezuiverde plasmiden is gekleurd met een fluorescente kleurstof en gekwantificeerd met een fluorometer. Voor het kwantificeren zijn verdunningsreeksen van de gekwantificeerde plasmide-suspensies samengesteld en qPCR reacties, uitgevoerd op deze gekwantificeerde plasmide-suspensies, zijn gebruikt voor het genereren van ijklijnen. De C_q waarden die worden verkregen uit qPCR reacties op monsters uit deze verdunningsreeksen worden door de software van de qPCR apparatuur gebruikt voor het genereren van een ijklijn, deze ijklijn vormt de basis voor het kwantificeren van de merkers in onbekende monsters van DNA geïsoleerd uit feces- en watermonsters.

2.4.3 Rendement en remming: IC-DNA

Het rendement van de DNA-isolatie en de eventuele aanwezigheid van remmende stoffen in het DNA van de monsters is bepaald door aan elk monster een interne controle (IC) toe te voegen en hiervan de opbrengst te bepalen. Het hiervoor gebruikte DNA-fragment wordt gelijktijdig met het AllBac DNA-fragment kwantitatief gedetecteerd in een zogenoemde multiplex-reactie. Om onderscheid te maken tussen de twee gevormde DNA-fragmenten is de probe voor de detectie van de interne controle gelabeld met een andere fluorescente kleurgroep.

Het IC-DNA bestaat uit een suspensie met een bekende hoeveelheid plasmide-DNA. Dit plasmide-DNA bevat een uniek DNA-fragment. Voor detectie van dit unieke fragment zijn primers en een probe ontworpen. Met deze primers en probe is het mogelijk om het unieke DNA-fragment te amplificeren en te kwantificeren. Door dit plasmide-DNA aan elk monster toe te voegen en de concentratie ervan (na extractie van DNA) te bepalen en te vergelijken met eenzelfde hoeveelheid plasmide-DNA dat geen extractiestap heeft ondergaan is het mogelijk om de opbrengst van de isolatie-procedure te bepalen en een indruk te krijgen van de eventuele aanwezigheid van stoffen die de PCR-reactie remmen. De, met het IC-DNA, gemeten opbrengst van de isolatie-procedure is gebruikt om de meetwaarden voor elk individueel monster te corrigeren voor verlies van DNA t.g.v. de extractiemethode.

3 Resultaten

Om te onderzoeken of de geselecteerde methoden (tabel 1) toepasbaar zijn voor het identificeren van de dierlijke bron van fecale besmettingen van drink- of oppervlaktewater is dit onderzoek gefaseerd uitgevoerd:

- Testen van de verschillende primers en probes (Fase 1): met de beschreven primers en probes is op DNA van een beperkte set fecesmonsters onderzocht of de qPCR reacties goed verlopen (hoge signaalsterkte en efficiënte qPCR).
- Ijklijnen construeren (Fase 2): voor de goed werkende qPCR methoden uit fase 1 zijn *E. coli* plasmiden geconstrueerd waarmee DNA suspensies voor ijklijnen zijn samengesteld om kwantificatie van de merkers mogelijk te maken.
- Specificiteit, sensitiviteit en concentratie van de merkers (Fase 3): op DNA van een groot aantal fecesmonsters is onderzocht of de methoden specifiek zijn en wat de concentratie van de merkers in feces is.
- Toepassing op watermonsters (Fase 4): de methoden zijn toegepast op watermonsters om te onderzoeken de geselecteerde methoden bruikbaar zijn in praktijksituaties.

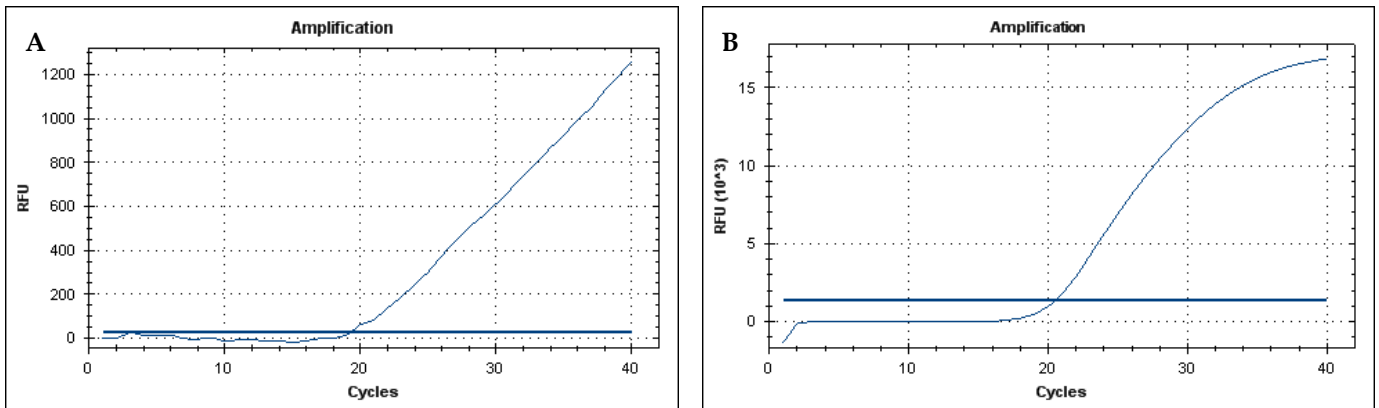
3.1 Testen van primers en probes (Fase 1)

Om te onderzoeken welke van de geselecteerde methoden bruikbaar zijn voor het identificeren en kwantificeren van fecale verontreinigingen zijn in eerste instantie PCR reacties uitgevoerd op verdunningsreeksen van DNA van een beperkt aantal fecesmonsters. De resultaten van de uitgevoerde PCR reacties zijn beoordeeld op basis van de (amplificatie)curves die verkregen. Na deze fase is, door veranderingen van de reactieomstandigheden en samenstelling van de reagentia, optimalisatie eventueel mogelijk. Bij de beoordeling van de verschillende methoden zijn de volgende criteria beoordeeld:

- Is de maximale signaalsterkte voldoende?
De maximale signaalsterkte is een maat voor de hoeveelheid fluorescentielicht die tijdens de plateau fase van de qPCR reactie gevormd is. Een lage maximale signaalsterkte maakt de qPCR minder robuust.
 - o Hierbij is, op basis van ervaringen met een groot aantal andere qPCR-methoden, gestreefd naar minimaal 10.000 RFU (Relatieve Fluorescentie Units) bij monsters met een C_q waarde van tussen de 20 en 30.
- De vorm van de amplificatiecurve is beoordeeld.
 - o Bij exponentiele amplificatie van het kenmerkende fragment wordt er een S curve gevormd (zoals zichtbaar is in figuur 2B).
- Wordt alleen het kenmerkende DNA-fragment gevormd, of worden er tijdens de PCR reactie meerdere fragmenten gevormd.
 - o Bij het toepassen van suboptimale primersequenties is het mogelijk dat er tijdens de PCR reactie extra (artefact) fragmenten worden gevormd (o.a. primer-dimers). De vorming van deze fragmenten verstoort de vorming van het specifieke fragment waardoor de gevoeligheid van de PCR negatief beïnvloed wordt. Deze extra fragmenten kunnen zichtbaar gemaakt worden door de PCR reacties uit te voeren met de DNA-bindende kleurstof SYBR-green en aansluitend een analyse van de smeltcurve uit te voeren (beschreven in 2.4.1). Door analyse van de smeltcurve kan onderscheid gemaakt worden tussen het specifieke fragment en eventuele extra fragmenten.

De negen geselecteerde qPCR methoden (tabel 1) zijn uitgevoerd op een kleine set fecale DNA-monsters van verschillende diersoorten. De resultaten van deze analyses zagen er voor vrijwel

alle methoden goed uit en voldeden aan de criteria zoals die hierboven zijn beschreven. Alleen bij het uitvoeren van de RumBac1 methode op DNA van runderen was de maximale signaalsterkte laag (ca. 1200) en de vorm van de amplificatiecurve was duidelijk afwijkend. In figuur 2 worden twee voorbeelden van amplificatiecurves met de Rumbac1 (A) en Rumbac2 (B) primersets op DNA van runderen. Vergelijkbare resultaten werden verkregen met andere fecesmonsters van runderen, schapen en reeën.



Figuur 2. Amplificatiecurves van qPCR reacties uitgevoerd met de RumBac1 (A) en RumBac2 (B) primersets op DNA van runderfeces.

Vervolgens zijn qPCR reacties uitgevoerd met SYBR-green waarmee alle gevormde fragmenten zichtbaar gemaakt worden en kunnen worden onderscheiden door de analyse van een smeltcurve. De resultaten van de analyse van de smeltcurves maakte duidelijk dat er meerdere fragmenten gevormd werden bij toepassing van de RumBac1 qPCR waardoor de vorming van het specifieke fragment minder efficiënt verloopt resulterend in een lagere maximale signaalsterkte en afwijkende amplificatiecurves.

Deze analyses maakten duidelijk dat van de RumBac1 qPCR, waarmee herkauwerspecifieke fecale merkers kunnen worden aangetoond, niet direct toepasbaar is voor gevoelige detectie van deze merker. Wellicht is verbeteringen van deze methode mogelijk door optimalisatie van de primersequenties, reactieomstandigheden of reagentia. Maar, aangezien de andere geselecteerde herkauwerspecifieke methode (RumBac2) wel optimaal was is ervoor gekozen om de RumBac1 methode niet te optimaliseren maar in eerste instantie af te laten vallen.

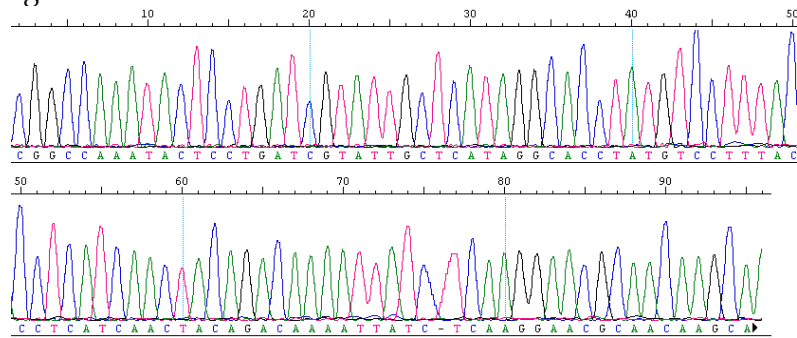
3.2 Constructie van ijklijnen (Fase 2)

Voor constructie van ijklijnen zijn de kenmerkende amplificatie fragmenten van de verschillende methoden gekloneerd in *E.coli* plasmiden. Van een deel van de methoden is de samenstelling van het geamplificeerde DNA fragment (DNA sequentie) bekend en was deze sequentie informatie te vinden in de grote, wereldwijd gebruikte, sequentiedatabase in de Verenigde Staten (National Center for Biotechnology, NCBI). Deze bekende sequenties zijn gebruikt voor het genereren van de plasmiden, met hierin het kenmerkende fragment gekloneerd. Van de rundvee specifieke merkers (CowBacM2 en CowBacM3) en de vogel specifieke merker (GFD) was de sequentie van het kenmerkende DNA fragment niet beschikbaar in de database van NCBI, deze sequenties zijn in dit onderzoek bepaald.

3.2.1 Sequenties van de fragmenten van de CowBac en GFD merkers

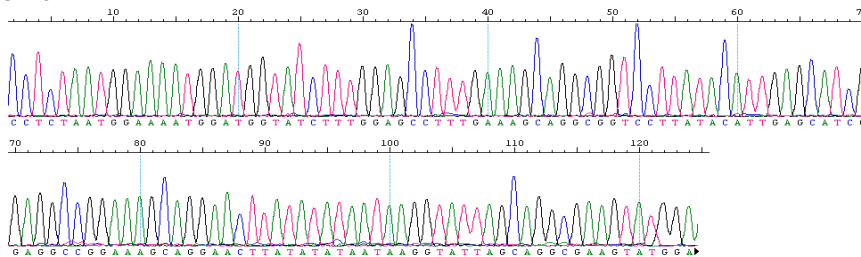
Voor het bepalen van de DNA-sequenties van de CowBacM2, CowBacM3 en GFD merkers zijn deze fragmenten gegenereerd door de specifieke PCR reacties uit te voeren op DNA van runderfeces (voor CowBacM2 en CowBacM3) en vogelfeces (voor GFD). Aansluitend zijn deze DNA fragmenten gekloneerd in een *E. coli* plasmide en is de sequentie bepaald van vier

individuele klonen. Voorbeelden van de resultaten van deze sequentie-analyses zijn weergegeven in figuur 4.



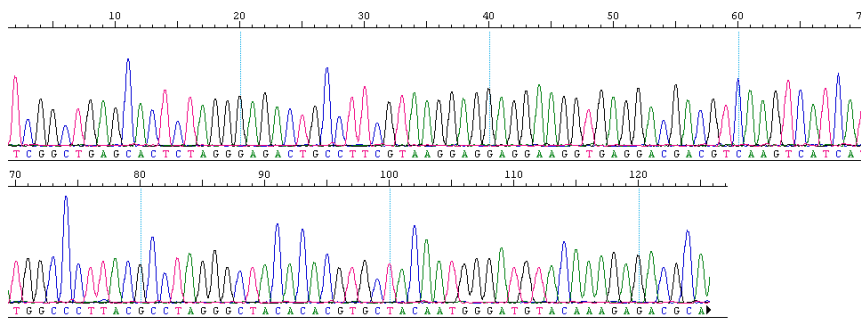
DNA sequentie van de CowBacM2 merker:

5'-CGGCCAAATACCTCGATGATTCCTGATCGTATTGCTCATAGGCACCTATGTCTTACCTCATCAACTACAGRCAAATTATCTCAAGAACGCAACAAGCA-3'



DNA-Sequentie van de CowBacM3 merker:

5'-CCTCTAATGGAAAATGGATGGTATCTTTGGAGCCTTTGAAAGCAGGCGGTCTTATACATTGAGCATCGAGGCCGGAAAGCAGGAAGTATATATAATAAGGTATTAGCAGGCGAAGTATGGA-3'



DNA-Sequentie van de GFD merker

5'-TCGGCTGAGCACTCTAGGGAGACTGCCTTCGTAAGGAGGAGGAAGGTGAGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACCCTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGGATGTACAAAGAGACGCA-3'

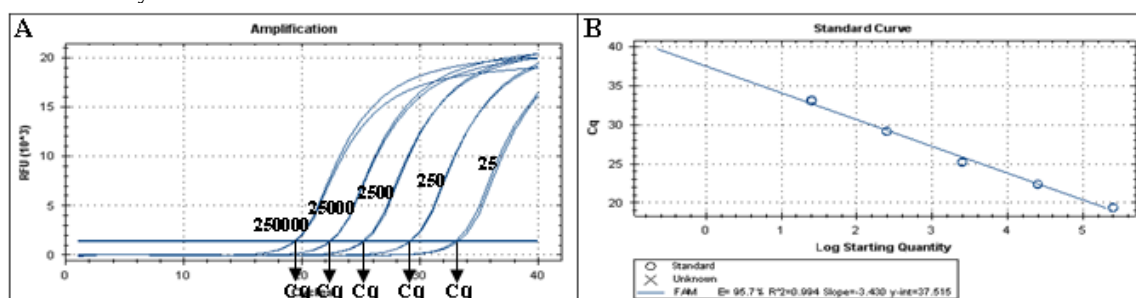
Figuur 4: De resultaten van de sequentie analyses van gekloneerde merker fragmenten van de CoawBacM2, CowBacM3 en GFD merkers. De piekenpatronen zijn voorbeelden van de resultaten van sequentieanalyse van één kloon. Onder elk piekenpatroon staat de consensus sequentie welke is bepaald door de sequentie van vier individuele klonen te bepalen.

De verkregen DNA-sequenties zijn vergeleken met DNA-sequenties uit de NCBI database. Uit deze vergelijking blijkt dat de GFD merker inderdaad een fragment is waarvan de sequentie overeen komt met die van een onbekende *Helicobacter* soort. Het is niet duidelijk van welke bacteriesoort(en) de CowBacM2 en CowBacM3 merkers afkomstig zijn, zoals ook beschreven is in de wetenschappelijke literatuur: [11, 15, 16])

3.2.2 IJklijnen en de efficiëntie van de qPCR reacties

Voor het genereren van ijklijnen zijn er verdunningsreeksen van de gekwantificeerde plasmide suspensies gemaakt. De concentraties in deze verdunningsreeksen variëren van 25 tot 2,5X10⁵ DNA kopieën per PCR. Een voorbeeld van qPCR uitgevoerd op verdunningen (in duplo) van een ijklijn (GFD) is te zien in figuur 5. De amplificatiecurves maken het mogelijk om voor elke toegepaste concentratie een Cq waarde te bepalen (5A) waarna de Cq waarden worden uitgezet tegen de logaritme van de concentratie DNA resulterend in de standaard curve (5B). Op basis

van de helling van de standaard curve wordt de efficiëntie van de qPCR reacties bepaald. Bij een optimale qPCR methode wordt een efficiëntie van 100% benaderd. Een efficiëntie van 100% wil zeggen dat er een verdubbeling plaatsvindt van het kenmerkend DNA fragment gedurende elke PCR cyclus.



Figuur 5: Voorbeeld van amplificatiecurves van qPCR reacties op een verdunningsreeks van het GFD plasmide met hierin een kenmerkend DNA van fecale *Helicobacter* bacteriën die specifiek bij vogels voorkomen (A). Figuur B geeft de standaard curve weer waarin de relatie tussen de Cq waarden en de log van de DNA concentratie is vastgelegd. Op basis van de standaardcurve is ook de efficiëntie van de qPCR reacties, R² en de helling van deze curve weergegeven.

Voor robuuste qPCR methoden waarmee ook lage concentraties aangetoond kunnen worden is een efficiëntie die de 100% benaderd belangrijk. Daarom zijn de DNA suspensies die gebruikt worden voor het genereren van de verschillende ijklijnen gebruikt om de efficiëntie van de verschillende qPCR methoden te bepalen. Hiervoor zijn van de acht qPCR methoden ijklijnen gegenereerd in drie onafhankelijke experimenten door qPCR reacties uit te voeren op verdunningen van de gekwantificeerde suspensies.

Tabel 3: de efficiënties van de onderzochte qPCR methoden. Een efficiëntie van 100% (optimaal) betekent dat een verdubbeling plaats vindt van het specifieke pPCR fragment tijdens elke cyclus van de qPCR reactie

qPCR	Efficiëntie			Gem
AllBac	99,6	106,1	98,8	101,5
HumBac	99,2	100,8	103,5	101,2
RumBac2	109,7	98,5	100,7	103,0
CowBacM2	103,4	104,5	100,5	102,8
CowBacM3	104,1	105,9	106,8	105,6
PigBac2	92,4	99,8	102,6	98,3
PigLac	99,0	98,7	100,8	99,5
GFD	96,2	103,3	102,1	100,5

3.3 Specificiteit, sensitiviteit en concentratie van de fecale merkers (Fase 3)

Voor betrouwbare toepassing in praktijksituaties dienen methoden waarmee de herkomst van fecale bacteriën kunnen worden aangetoond een aantal eigenschappen te bezitten: de methoden dienen een hoge sensitiviteit en specificiteit te hebben en de concentratie van de merkers in de feces moet hoog te zijn.

- *Sensitiviteit*

De sensitiviteit is (in dit geval) het percentage terecht positieve uitslagen bij het uitvoeren van de qPCR test op DNA van fecesmonsters van de diergroep waartegen de test gericht is. Voorbeeld: het percentage fecesmonsters van mensen dat positief is bij het uitvoeren van een qPCR waarmee menselijke fecale bacteriën worden aangetoond. In het meest ideale geval is de sensitiviteit 100%, bij een lager percentage wordt met een deel van de fecale monsters geen signaal gevonden en zijn er dus vals-negatieve reacties.

De sensitiviteit wordt berekend met de volgende formule:

$$\text{Sensitiviteit} = \frac{\text{Het aantal echt positieve reacties}}{\text{Het aantal echt positieve reacties} + \text{het aantal fout negatieve reacties}} \times 100\%$$

- *Specificiteit*

De specificiteit van een methode is de verhouding tussen het aantal terecht negatieve uitslagen en het totaal aantal negatieve monsters. De specificiteit van een qPCR methode beschrijft het vermogen van de methode om echt-negatieve reacties te genereren (voorbeeld in dit onderzoek: geen signaal met een methode waarmee mensspecifieke fecale bacteriën worden aangetoond bij testen van DNA uit de feces van koeien). In het ideale geval is de specificiteit van een methode 100%, bij lagere percentages treden er vals-positieve reacties op.

De specificiteit wordt berekend met de volgende formule:

$$\text{Specificiteit} = \frac{\text{Het aantal echt negatieve monsters}}{\text{Het aantal echt negatieve monsters} + \text{het aantal fout positieve monsters}} \times 100\%$$

- *Concentratie*

Voor gevoelige detectie van diergroep specifieke fecale verontreinigingen dient de concentratie van de specifieke merker in de feces zo hoog mogelijk te zijn. Bij hoge concentraties in de feces zal de merker in sterk verdunde watermonsters nog steeds detecteerbaar zijn.

3.3.1 Specificiteit en sensitiviteit

De specificiteit en sensitiviteit van de acht verschillende qPCR methoden zijn onderzocht door analyses uit te voeren op DNA uit feces van verschillende diersoorten. Fecesmonsters van runderen (n=59), schapen (n=74) en damherten en reeën (n=112) waren in 2007 en 2008 verzameld van dieren die verblijven in de Amsterdamse Waterleidingduinen (onderzoek in opdracht van Waternet, [23]). DNA van fecesmonsters van landbouwhuisdieren van verschillende locaties (runderen, n=188 en varkens, n=168) waren afkomstig van de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD) in Deventer. DNA-monsters van feces van mensen (n=187) waren afkomstig van het Anthoniusziekenhuis in Nieuwegein. Fecesmonsters van vogels zijn verzameld op de dijk langs het lekkanaal op korte afstand van KWR (Ganzen) en er zijn, door Sovon, monsters verzameld in het IJsselmeergebied. Op het DNA van de fecesmonsters zijn de verschillende qPCR methoden toegepast en het aantal monsters dat een specifiek signaal gaf met een methode is bepaald. Aansluitend zijn de specificiteit en de sensitiviteit van elke methode bepaald, de resultaten zijn samengevat in tabel 4.

Tabel 4. Resultaten van de verschillende qPCR reacties uitgevoerd op DNA uit feces van diverse diersoorten. Het aantal onderzochte monsters, het aantal positieve reacties (per diersoort/methode) en de specificiteit en sensitiviteit van de methoden zijn weergegeven. NG: niet getest

Bron↓ Merker→	Aantal monsters	AllBac	HumBac	RumBac2	CowM2	CowM3	Pig-2-Bac	PigLac	GFD
		Alle	Mens	Herkauwer	Rund	Rund	Varken	Varken	Vogel
Runderen (duinen)	59	59	3	57	48	48	0	13	33
Runderen (GD)	188	188	1	188	163	157	2	62	75
Schapen	74	74	0	67	0	0	0	2	13
Herten/Reeën	112	112	2	110	0	0	0	5	9
Mensen	187	187	146	5	0	0	0	3	1
Varkens	168	168	3	1	0	0	167	168	129
Gans (onbekend)	20	20	0	2	0	0	0	9	19
Brandgans	3	3	NG	NG	NG	NG	NG	NG	3
Grauwe Gans	2	2	NG	NG	NG	NG	NG	NG	2
Nijlgans	1	1	NG	NG	NG	NG	NG	NG	0
Kokmeeuw	1	1	NG	NG	NG	NG	NG	NG	1
Wilde eend	2	2	NG	NG	NG	NG	NG	NG	2
Specificiteit (%)		NA	98,5	97,8	100	100	99,7	85,2	67,0
Sensitiviteit (%)		100	78,1	97,5	85,4	83,0	99,4	100	93,1

Bovenstaande resultaten geven aan dat de meeste van de onderzochte methoden een hoge sensitiviteit hebben. De sensitiviteit van de methode voor het aantonen van mensspecifieke fecale bacteriën is beduidend lager. Mogelijk is dit het gevolg van het gebruik van DNA van fecesmonsters van patiënten die opgenomen zijn in het ziekenhuis. Van deze patiënten zijn fecesmonsters afgenomen voor onderzoek en het is te verwachten dat deze patiënten, door ziekte en/of antibioticumgebruik, een verstoorde darmflora hebben. De sensitiviteit van de beide rundspecifieke methoden is ook lager (85,4 en 83%) zodat verwacht wordt dat een klein deel van de populatie runderen deze fecale merker niet bezit. De specificiteit van de meeste van de onderzochte methoden is erg hoog (>97,8%) wat betekent dat de qPCR methoden zeer weinig kruisreacties geven met DNA uit feces van andere diersoorten. Uitzondering hierop zijn de PigLac (85,2%) methode voor het aantonen van varkensspecifieke fecale bacteriën en de GFD (67,0%) methode voor het aantonen van vogelspecifieke fecale bacteriën. Deze beide methoden vertonen kruisreacties met fecaal DNA van verschillende diersoorten. Het aantal feces monster van vogels dat is onderzocht in deze studie is nog beperkt, om meer zekerheid te krijgen over de prestatiekenmerken van deze merker is nog aanvullend onderzoek noodzakelijk.

3.3.2 Concentratie van merkers in fecaal materiaal

Om diergroepspecifieke qPCR methoden te kunnen toepassen voor het betrouwbaar identificeren van fecale besmettingsbronnen in watermonsters zijn, naast hoge sensitiviteit en selectiviteit, hoge concentraties van de merkers in de feces van belang. Alleen bij hoge concentraties in de feces zal het mogelijk zijn om deze merkers, na sterke verdunning van feces in water, nog aan te tonen. De concentraties van de verschillende merkers in alle fecesmonsters van verschillende diersoorten (tabel 4) zijn bepaald en de gemiddelde concentraties van de merkers zijn, per diergroep, weergegeven in tabel 5. Van een deel van de monsters (varkens- en rundermonsters van GD en monsters van mensen van het Antonius Ziekenhuis) was niet exact bekend hoeveel fecaal materiaal gebruikt is voor het isoleren van DNA en was ook niet bekend wat de efficiëntie van de, door deze laboratoria gebruikte, extractieprocedure was. Om de concentraties in deze monsters toch te bepalen is uitgegaan van gemiddelde hoeveelheden feces (materiaal en methoden) en een gemiddelde opbrengst van de extractieprocedure van 30%.

Tabel 5. Overzicht van de gemiddelde concentraties van de merkers in de feces van verschillende diersoorten in DNA kopieën per mg feces.

Diergroep→ Merker↓	Runderen	Schapen	Reeën Herten	Mensen	Varkens	Vogels
Algemeen: AllBac	2,2X10 ⁸	7,2X10 ⁸	3,8X10 ⁸	8,4X10 ⁷	3,2X10 ⁶	1,8X10 ⁶
Mensen: HumBac	4,3X10 ¹	0	1,1X10 ¹	2,2X10 ⁷	3,0X10 ⁻²	0
Herkauwers: RumBac2	2,1X10 ⁷	1,4X10 ⁸	1,2X10 ⁸	1,1X10 ¹	1,6X10 ⁻³	6,7X10 ¹
Runderen: CowM2	8,9X10 ⁴	0	0	0	0	0
Runderen: CowM3	4,3X10 ⁵	0	0	0	0	0
Varkens: Pig-2-Bac	0	0	0	0	4,6X10 ⁵	0
Varkens: PigLac	3,4X10 ⁴	1,0X10 ⁻¹	1,6X10 ¹	1,9X10 ¹	2,7X10 ⁵	1,5X10 ¹
Vogels: GFD	3,0X10 ⁻¹	4,9X10 ⁻¹	1,3X10 ⁻²	4,2X10 ⁻²	4,4X10 ⁻⁰	1,9X10 ⁶

De gemiddelde concentraties van alle onderzochte merkers zijn in de feces van de dieren waarin deze merkers verwacht worden hoog en variëren van 8,9X10⁴ DNA kopieën/mg (voor de runderspecifieke merker in feces van runderen) tot 1,4X10⁸ DNA kopieën/mg (voor de herkauwer-specifieke merker in de feces van runderen). In vrijwel alle gevallen is de gemiddelde concentratie van de merkers in feces waarin de merkers niet verwacht worden zeer veel lager. Dit betekent dat de kruisreacties, die in een aantal gevallen kunnen optreden (tabel 4), zeer waarschijnlijk geen of zeer beperkte invloed zullen hebben bij toepassing van deze methoden in de praktijk. Een uitzondering hierop is de PigLac merker, deze merker komt in hoge concentraties (2,7X10⁵ DNA kopieën/mg) voor in de feces van varkens maar de concentratie van deze merker is in de feces van runderen ook hoog (3,4X10⁴ DNA kopieën/mg) zodat te verwachten is dat deze merker niet bruikbaar is om fecale bacteriën van varkens specifiek te kunnen aantonen. Deze merker is daarom in de volgende stappen van het onderzoek niet verder toegepast.

Conclusies: sensitiviteit/selectiviteit en concentraties

- De sensitiviteit van de onderzochte methoden is zeer hoog: de merkers worden in het grootste deel van de fecesmonsters van de dieren, waarin de betreffende merker verwacht wordt, aangetoond.
- De specificiteit van de meeste onderzochte methoden is zeer hoog: de merkers komen vooral voor in de feces van de dieren waarin de merkers verwacht worden, kruisreacties met bacteriën uit de feces van andere dieren komen weinig voor.
- De concentraties van de merkers zijn, in het geval van kruisreacties, zeer laag. Hierdoor is te verwachten dat deze kruisreacties, bij de analyse van praktijkmonsters, geen invloed zullen hebben op de analyseresultaten.
- Vanwege het grote aantal kruisreacties met bacteriën uit de feces van runderen en de hoge concentraties van de merker in deze kruisreagerende fecesmonsters lijkt de PigLac merker niet bruikbaar
- Er zijn bruikbare merkers beschikbaar voor het selectief detecteren van fecale bacteriën van: herkauwers, runderen, mensen, varkens, mensen en vogels en er is een merker voor het aantonen van "algemene" (onafhankelijk van de diergroep) fecale besmettingen

3.4 Toepassing in watermonsters (Fase 4)

Om inzicht te krijgen in de toepassingsmogelijkheden van de ontwikkelde methoden zijn deze toegepast op een groot aantal praktijkmonsters: rioolwater van verschillende locaties, oppervlaktewater van verschillende locaties en zwemwater.

3.4.1 Analyse van rioolwater

DNA van rioolwatermonsters, geïsoleerd in 2007, 2008 en 2010 is voor dit onderzoek gebruikt voor het uitvoeren van diergroep-specifieke qPCR analyses om te onderzoeken welke fecale merkers in rioolwater voorkomen en wat de concentraties van deze merkers zijn. Van 25 rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI's) is DNA van zowel influent- als effluentwater geanalyseerd en de resultaten zijn samengevat in tabel 6.

Tabel 5. Overzicht van de analysesresultaten van 25 RWZI's voor het kwantificeren van diergroep specifieke merkers in rioolwater influent en effluent. De concentraties zijn weergegeven in DNA kopieën per ml water. NA: niet aangetoond. De weergegeven meetwaarden zijn de gemiddelden van twee metingen.

Merker → Locatie ↓		AllBac Algemeen	HumBac Mensen	RumBac2 Herkauwers	CowM2 Runderen	CowM3 Runderen	Pig-2-Bac Varkens	GFD Vogels
Aalten	influent	1.1E+08	2.1E+07	9.7E+03	1.6E+02	5.5E+02	2.0E+03	1.5E+02
	effluent	4.7E+05	1.4E+04	3.2E+02	NA	4.4E+01	7.4E+02	NA
Alkmaar	influent	1.1E+09	6.8E+07	3.4E+03	NA	NA	NA	1.4E+02
	effluent	2.1E+06	7.6E+03	NA	NA	NA	NA	1.2E+01
Alphen a/d Rijn	influent	1.9E+09	8.6E+06	NA	NA	NA	NA	4.0E+02
	effluent	2.3E+07	1.2E+05	NA	NA	NA	NA	6.1E+00
Apeldoorn 2009	influent	1.1E+09	8.8E+07	1.5E+03	NA	NA	8.0E+04	1.5E+02
	effluent	2.7E+06	6.2E+03	NA	NA	NA	4.9E+00	3.3E+02
Apeldoorn 2010	influent	1.8E+09	7.7E+06	8.5E+02	NA	NA	1.9E+02	5.9E+01
	effluent	3.0E+07	1.0E+05	NA	NA	NA	2.9E+01	1.9E+02
Assen	influent	7.0E+08	2.8E+07	NA	NA	NA	NA	1.3E+03
	effluent	1.3E+06	5.9E+04	6.5E+01	NA	1.0E+02	NA	3.8E+01
Culemborg	influent	6.0E+08	3.1E+07	3.1E+02	NA	NA	NA	1.1E+02
	effluent	5.3E+06	1.8E+05	NA	NA	NA	NA	2.0E+00
De Stolpen	influent	9.8E+08	3.5E+07	2.1E+03	NA	NA	NA	1.7E+02
	effluent	1.8E+05	1.1E+04	NA	NA	NA	NA	NA
Den Helder	influent	1.1E+09	3.2E+07	NA	NA	NA	9.4E+02	9.0E+01
	effluent	4.7E+06	8.5E+03	NA	NA	NA	NA	NA
Ede	influent	5.7E+08	2.0E+07	5.4E+03	8.7E+01	7.0E+02	3.5E+05	8.0E+01
	effluent	2.0E+06	7.4E+03	NA	NA	NA	1.1E+02	NA
Elburg	influent	2.1E+09	7.3E+06	4.6E+03	5.9E+01	NA	NA	7.2E+01
	effluent	9.0E+05	3.6E+03	NA	NA	NA	NA	NA
Emmen	influent	1.1E+09	4.0E+07	5.1E+02	NA	1.1E+02	NA	2.3E+02
	effluent	2.9E+06	1.9E+05	NA	NA	NA	NA	NA
Epe	influent	2.2E+09	7.6E+06	2.0E+04	6.4E+01	NA	5.8E+04	2.3E+02
	effluent	5.4E+06	1.8E+04	NA	NA	NA	7.1E+01	3.8E+00
Harderwijk 2009	influent	7.0E+08	3.1E+07	4.3E+03	NA	NA	2.1E+02	2.5E+03
	effluent	1.4E+06	6.1E+03	NA	NA	NA	NA	7.2E+00
Harderwijk 2010	influent	4.2E+09	1.6E+07	3.5E+04	5.7E+01	2.39E+01	3.4E+01	7.1E+02
	effluent	1.9E+06	9.4E+03	NA	NA	NA	NA	NA
Heiloo	influent	8.9E+07	6.1E+06	NA	NA	NA	3.1E+02	5.9E+01
	effluent	1.3E+07	3.2E+05	NA	NA	NA	NA	8.4E+01
Katwijk	influent	1.6E+09	7.8E+07	NA	NA	NA	NA	3.1E+02
	effluent	3.8E+06	2.1E+04	NA	NA	NA	NA	NA
Lelystad	influent	1.5E+09	5.9E+07	2.0E+03	NA	NA	NA	2.3E+01
	effluent	7.5E+05	1.5E+04	NA	NA	NA	NA	NA
Lichtenvoorde	influent	6.5E+08	2.0E+07	1.4E+04	1.0E+02	2.1E+02	1.1E+05	4.8E+01
	effluent	1.0E+06	2.6E+04	NA	NA	NA	5.7E+02	2.2E+01
Nieuwegein	influent	2.2E+09	8.6E+07	2.0E+02	NA	NA	4.3E+03	1.5E+02
	effluent	4.5E+06	7.1E+03	NA	NA	NA	NA	NA
Renkum	influent	6.1E+08	2.2E+07	NA	NA	NA	3.4E+02	1.3E+02
	effluent	2.1E+06	4.6E+03	NA	NA	NA	NA	NA
Rotterdam	influent	1.9E+08	1.4E+05	NA	NA	NA	3.1E+01	NA

Sleen	effluent	2.2E+07	1.3E+06	NA	NA	NA	1.3E+02	NA
	influent	1.1E+09	5.5E+07	3.2E+04	4.8E+02	1.7E+03	NA	1.7E+02
Spijkenisse	effluent	7.0E+06	2.7E+05	3.4E+02	NA	3.0E+01	NA	2.8E+01
	influent	1.1E+09	7.5E+06	5.0E+02	NA	NA	NA	2.9E+02
Varsseveld	effluent	6.1E+06	3.7E+05	5.3E+01	NA	NA	NA	2.9E+01
	influent	7.3E+08	2.7E+07	2.9E+04	2.1E+02	1.1E+03	5.7E+02	2.1E+01
Veenendaal	effluent	5.0E+01	NA	NA	NA	NA	NA	2.2E+00
	influent	1.0E+09	4.4E+07	2.9E+03	NA	NA	6.9E+02	1.7E+02
Woudenberg	effluent	1.1E+06	1.2E+05	NA	NA	NA	2.5E+01	5.8E+01
	influent	6.8E+08	3.1E+07	7.1E+03	NA	4.7E+02	6.5E+03	4.1E+01
	effluent	3.4E+05	1.2E+04	NA	NA	NA	NA	NA

Merker voor "algemene" fecale verontreiniging

De algemene *Bacteroidales* merker is in alle rioolwatermonsters aangetoond. In influent is de concentratie gemiddeld $1,2 \times 10^9$ DNA kopieën/ml en varieert van $8,9 \times 10^7$ tot $4,2 \times 10^9$ DNA kopieën per ml. De concentraties van deze algemene *Bacteroidales* merker zijn in effluent gemiddeld een factor 224 lager: gemiddeld $5,4 \times 10^6$ DNA kopieën/ml (range: $1,1 \times 10^1$ tot $7,0 \times 10^6$ DNA kopieën/ml). De aanwezigheid van hoge concentraties van de algemene *Bacteroidales* merker in rioolwaterinfluent en -effluent was te verwachten, rioolwater is verontreinigd met hoge concentraties fecaal materiaal.

Merker voor mensspecifieke fecale verontreiniging

De mensspecifieke *Bacteroidales* merker wordt ook in alle monsters van rioolwaterinfluent aangetoond met een gemiddelde concentratie van $3,3 \times 10^7$ DNA kopieën/ml (range $1,4 \times 10^5$ tot $8,8 \times 10^7$ DNA kopieën/ml). In monsters van het effluent is de concentratie van de mensspecifieke merker een factor 277 lager dan in het effluent (gem. $1,2 \times 10^5$ DNA kopieën/ml, range 0 tot $3,1 \times 10^5$ DNA kopieën/ml). De aanwezigheid van hoge concentraties van de mensspecifieke *Bacteroidales* merker in rioolwaterinfluent en -effluent was te verwachten, rioolwater is verontreinigd met hoge concentraties fecaal materiaal waarbij een groot deel van de fecaliën die door de RWZI worden verwerkt afkomstig zijn van mensen.

Zoals te verwachten worden beide merkers ("algemene" en mensspecifieke merker) met dezelfde efficiëntie verwijderd tijdens het zuiveringsproces, in beide gevallen gaat het namelijk om merkers voor verschillende typen van dezelfde bacteriën (*Bacteroidales*). Het is opvallend dat de beide merkers in de RWZI van Varsseveld zeer efficiënt worden verwijderd (ca. 7 log eenheden), dit is het gevolg van het toepassen van ultrafiltratie (MembraanBioReactor) voor het zuiveren van het water bij deze RWZI.

Merker voor fecale verontreiniging van herkauwers

De merker voor fecale verontreiniging van herkauwers wordt in 20 van de 27 onderzochte influent- en in vier effluentmonsters aangetoond. De gemiddelde concentratie in positieve influentmonsters was $8,8 \times 10^3$ DNA kopieën/ml (range: $2,0 \times 10^2$ tot $3,2 \times 10^4$ DNA kopieën/ml). Er is te verwachten dat landbouwhuisdieren als runderen, schapen en geiten de belangrijkste herkauwers zullen zijn die, via de boerenbedrijven, mestverwerkers en slachterijen, het rioolwater kunnen vervuilen. Er is bij KWR, voor de onderzochte RWZI's, geen data beschikbaar over de bijdrage van boerenbedrijven of slachterijen aan de afvalstroom die deze RWZI's verwerken. Maar met de hoogste concentraties ($>1 \times 10^4$ DNA kopieën/ml) herkauwersspecifieke merkers in het influent van de RWZI's in Aalten, Epe, Harderwijk, Lichtenvoorde, Sleen en Varsseveld lijkt er een verband te zijn tussen de aanwezigheid van intensieve veeteelt en de aanwezigheid van hoge concentraties van de herkauwersspecifieke merker.

Merkers voor fecale verontreiniging van runderen

De twee merkers die zijn toegepast om runderspecifieke fecale besmettingen te detecteren worden beide aangetoond in acht van de 27 onderzochte influentmonsters en in zes van deze monsters werden de beide runderspecifieke merkers (CowM2 en CowM3) aangetoond. De gemiddelde concentratie van de CowM2 merker in positieve monsters is $1,5 \times 10^2$ DNA kopieën/ml (range: $5,7 \times 10^1$ tot $4,8 \times 10^2$ DNA kopieën/ml) en van de CowM3 merker is de gemiddelde concentratie $5,1 \times 10^2$ DNA kopieën/ml (range: $2,4 \times 10^1$ tot $1,7 \times 10^3$ DNA kopieën/ml). Zoals verwacht, waren in alle monsters waarin runderspecifieke merkers werden aangetoond ook herkauwer-specifieke merkers aanwezig. In alle monsters met hoge concentraties herkauwersspecifieke merkers (Aalten, Harderwijk, Lichtenvoorde, Sleen en Varsseveld) worden ook de beide runderspecifieke merkers aangetoond wat suggereert dat fecaal materiaal van runderen een besmettingsbron is bij deze RWZI's.

Merker voor fecale verontreiniging van varkens

De merker voor fecale verontreiniging van varkens is aangetoond in 16 van de 27 onderzochte monsters van rioolwaterinfluent. De gemiddelde concentratie van deze merker in positieve influentmonsters was: $3,8 \times 10^4$ DNA kopieën/ml (range: $3,1 \times 10^1$ tot $3,5 \times 10^5$ DNA kopieën/ml). Er is bij KWR, voor de onderzochte RWZI's, geen data beschikbaar over de bijdrage van varkensmesterijen of -slachterijen aan de afvalstroom die deze RWZI's verwerken. Van de RWZI's met de hoogste concentraties ($>1 \times 10^5$ DNA kopieën/ml) varkensspecifieke fecale merkers in het influent kon, via een google zoekopdracht op internet, worden vastgesteld dat in

deze gemeenten (Apeldoorn, Ede, Epe en Lichtenvoorde) varkensfokkerijen, -mesterijen of -slachterijen aanwezig zijn. Overigens is het voor deze bedrijven verboden om varkensmest op het riool te lozen.

Merker voor fecale verontreiniging van vogels

De GFD merker voor het aantonen van fecale verontreiniging van vogels wordt in vrijwel alle monsters van rioolwaterinfluent aangetoond, alleen in het monster van RWZI Rotterdam wordt deze merker niet gedetecteerd. De gemiddelde concentratie van deze merker in positieve influentmonsters was: $3,0 \times 10^2$ DNA kopieën/ml (range: $2,1 \times 10^1$ tot $2,5 \times 10^3$ DNA kopieën/ml). Het is niet verwonderlijk dat de merker voor fecale verontreiniging van vogels in vrijwel alle influentmonster detecteerbaar is. In en rond alle gemeenten komen grote aantallen vogels voor waarvan de uitwerpselen, via afspoeling in het rioolwater terecht kunnen komen. Daarnaast zijn RWZI's vaak aantrekkelijke verblijfplaatsen voor bepaalde vogelsoorten (o.a. Meeuwen). Het is onduidelijk waarom er geen vogelspecifieke fecale merkers worden aangetoond in het influent van RWZI Rotterdam.

3.4.2 Analyse van oppervlaktewater

Om een indruk te krijgen over het voorkomen van de diergroepspecifieke merkers in oppervlaktewater zijn er 31 oppervlaktewatermonsters geanalyseerd. Daarnaast zijn er twee drinkwatermonsters van verschillende locaties (Nieuwegein en Wageningen) onderzocht. Het grootste deel van de oppervlaktewatermonsters ($n=28$) was afkomstig van onderzoek uit 2010, een deel van deze monsters ($n=3$) zijn voor dit onderzoek in de omgeving van KWR verzameld. De monsters uit de omgeving van KWR zijn afkomstig van drie locaties:

- Het lekkkanaal op een locatie langs de dijk van het lekkkanaal (Locatie A). Op deze oever langs het lekkkanaal graasden, ten tijde van de monstername, een groot aantal schapen en ganzen.
- Het innamepunt van de WRK (Locatie B) waar, vanwege de kale en steile oevers geen dieren aanwezig zijn. Deze locatie is ca 300 m stroomafwaarts van locatie A.
- De vijver vóór het KWR gebouw waarin regelmatig eenden zwemmen.

De resultaten van de analyses zijn samengevat in tabel 7.

Tabel 7. Overzicht van analyses uitgevoerd op DNA uit oppervlakte- en drinkwater van verschillende locaties. NA: niet aangetoond. De weergegeven meetwaarden zijn de gemiddelden van twee metingen. De concentraties zijn weergegeven in DNA kopieën per ml water.

Locatie	AllBac Algemeen	HumBac Mensen	RumBac2 Herkauwers	CowM2 Runderen	CowM3 Runderen	Pig-2- Bac Varkens	GFD Vogels
Monsters 2010							
Beekse Bergen (Tilburg)	1.7E+04	NA	NA	NA	NA	NA	5.4E+02
Biesbosch (Werkendam)	4.2E+03	7.0E+00	NA	NA	NA	NA	5.2E+01
Drentsche Aa (Glimmen)	3.4E+03	1.4E+00	NA	NA	NA	NA	6.2E+00
Haringvliet (Stellendam)	2.6E+02	NA	NA	NA	NA	NA	2.8E+00
Haringvliet (Willemstad)	8.8E+03	5.9E+02	4.8E+00	NA	NA	NA	4.7E+01
IJsselmeer (Andijk)	1.1E+04	2.4E+00	NA	NA	NA	NA	4.0E+02
IJsselmeer (Lemmer)	6.1E+03	7.8E+00	NA	NA	NA	NA	3.3E+01
Ketelmeer (Ketelbrug)	9.8E+03	NA	NA	NA	NA	NA	1.4E+02
Leiduin (Leiduin)	8.5E+03	NA	5.4E+00	NA	NA	NA	3.0E+02
Lek (Krimpen a/d Lek)	8.4E+03	5.2E+02	4.2E+00	NA	NA	NA	NA
Lekkanaal (Nieuwegein)	4.3E+03	2.8E+01	2.9E+00	NA	NA	NA	NA
Loosdrechtse plassen (Loenen)	7.2E+01	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Maas (Keizersveer)	4.8E+03	3.5E+00	9.9E+00	NA	NA	NA	7.9E+01
Maas (Lith)	1.6E+03	2.5E+00	NA	NA	NA	NA	NA
Markermeer (Volendam)	8.1E+03	3.4E+00	NA	NA	NA	NA	3.5E+01
Mokerplas (Mook)	2.5E+03	4.7E+00	NA	NA	NA	NA	NA
Nieuwe waterweg (Hoek van Holland)	4.2E+03	1.1E+02	3.5E+00	NA	NA	NA	NA
Nieuwkoopse plassen (Nieuwkoop)	2.0E+03	6.2E+00	NA	NA	NA	NA	3.4E+00
Oosterschelde (Burgh Haamstede)	3.4E+02	4.5E+00	NA	NA	NA	NA	3.0E+01
Reeuwijkse plassen (Reeuwijk)	3.9E+01	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Rijn (Tolkamer)	4.3E+03	7.7E+01	1.4E+01	NA	NA	NA	1.1E+00
Rijn (Wageningen)	1.1E+03	5.6E+00	NA	NA	NA	NA	NA
Slotermeer (Sloten)	3.9E+03	3.6E+01	NA	NA	NA	NA	6.1E+01
Spaarbekken (Andijk)	1.2E+03	NA	NA	NA	NA	NA	3.7E+00
Tjeukermeer (Parkeerplaats A6)	2.9E+04	NA	NA	NA	NA	NA	1.5E+01
Vecht (Ommen)	6.7E+04	4.9E+00	5.7E+01	6.7E+00	NA	NA	NA
Waal (Nijmegen)	1.4E+03	4.7E+01	6.3E+00	NA	NA	NA	NA
Westereinden plassen (Aalsmeer)	2.2E+03	NA	NA	NA	NA	NA	4.6E+00
Monsters 2012							
Lekkanaal Locatie A (Nieuwegein): Schapen en Ganzen	1.3E+05	1.5E+02	1.1E+01	NA	NA	NA	1.7E+00
Lekkanaal Locatie B (Nieuwegein) Inname WRK, geen dieren	1.8E+04	2.9E+02	NA	NA	NA	NA	NA
Vijver vóór KWR (Nieuwegein): Eenden	2.1E+04	NA	NA	NA	NA	NA	2.2E+01
Drinkwater Nieuwegein	3,5E+00	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Drinkwater Wageningen	2.4E+01	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Merker voor "algemene" fecale verontreiniging

De algemene *Bacteroidales* merker wordt in alle oppervlaktewatermonsters aangetoond met een gemiddelde concentratie van $8,3E+03$ DNA kopieën/ml (range: $3,9E+01$ tot $1,3E+05$ DNA kopieën/ml). De algemene *Bacteroidales* merker wordt ook, in zeer lage concentraties, aangetoond in drinkwater uit Wageningen en Nieuwegein. Zoals eerder aangetoond [22] suggereert dit dat de aanwezigheid van "algemene" *Bacteroidales* merkers niet in alle gevallen een goede indicatie is voor de aanwezigheid van fecale besmettingen. De, t.o.v. drinkwater, sterk verhoogde meetwaarden in oppervlaktewater kunnen het gevolg zijn van variërende concentraties fecale verontreiniging of van de aanwezigheid van verschillende concentraties niet-fecale *Bacteroidales* bacteriën (zoals beschreven door van de Wielen *et al* [22]). In onderzoek,

naar de toepassingsmogelijkheden van qPCR methoden voor het monitoren van de hygiënische kwaliteit van zwemwater (uitgevoerd in opdracht van Rijkswaterstaat-Waterdienst) werd een verband aangetoond tussen de concentraties *E. coli* en enterococcon en de concentratie algemene *Bacteroidales* merkers. Deze onderzoeksresultaten impliceren dat ook in dit onderzoek de variërende concentratie algemene *Bacteroidales* merker een indicatie vormen voor meerdere of mindere mate van fecale besmetting van het oppervlaktewater.

Merker voor mensspecifieke fecale verontreiniging

De mensspecifieke *Bacteroidales* merker wordt niet in drinkwater maar wel in 21 van de 32 onderzochte oppervlaktewatermonsters aangetoond. Zoals verwacht, wordt de merker aangetoond in water van de onderzochte grote rivieren (Waal, Rijn, Maas, Lek) en kanalen die in verbinding staan met de grote rivieren (Nieuwe Waterweg, Lekkanaal). Langs deze rivieren en kanalen zijn diverse RWZI's gelegen die grote hoeveelheden menselijk fecaal materiaal op deze rivieren lozen (zoals hoofdstuk 3.4.1 laat zien). De mensspecifieke fecale merker wordt niet aangetoond in water van geïsoleerde plassen waar geen invloed van RWZI's te verwachten is (Beekse Bergen, Leiduin, Loosdrechtse Plassen, Reeuwijkse plassen, Westereinden Plassen en de vijver vóór KWR).

Merker voor herkauwerspecifieke fecale verontreiniging

De herkauwerspecifieke fecale merker wordt niet in drinkwater aangetoond maar wel in 10 van de 32 oppervlaktewatermonsters. Ook deze merker wordt vooral aangetroffen in de grote rivieren waarvan het water door diverse agrarische gebieden stroomt. Het is opvallend dat deze merker in 2012 niet wordt aangetoond in het water van het lekkanaal ter hoogte van het innamepunt van de WRK (locatie B) maar wel in het lekkanaal ter hoogte van grazende schapen. Dit laat zien dat afspoeling van het fecaal materiaal van schapen zorgt voor plaatselijk verhoogde concentraties van deze merker en maakt duidelijk dat verschillen zeer lokaal kunnen optreden.

Merkers voor runderspecifieke fecale verontreiniging

De merkers voor runderspecifieke fecale verontreiniging zijn niet aangetoond in de onderzochte drink- of oppervlaktewatermonsters. Dit is waarschijnlijk het gevolg van de relatief lage concentraties van deze merkers in de feces van runderen in combinatie met het kleine analysevolume waardoor de concentraties van deze merkers beneden de detectiegrens van de methode liggen. Mogelijk dat met de analyse van grotere volumes deze merkers wel detecteerbaar zijn.

Merker voor vogelspecifieke fecale verontreiniging

De merker voor vogelspecifieke fecale verontreiniging wordt niet aangetoond in drinkwater maar wel in 21 van de 32 onderzochte oppervlaktewatermonsters. Deze merker wordt in een aantal monsters van het water van de grote rivieren niet aangetoond, mogelijk dat de verhouding tussen het aantal vogels en het grote volume water in deze rivieren daarbij een rol speelt. De vogelspecifieke merker wordt ook niet aangetoond in het lekkanaal ter hoogte van het innamepunt van de WRK (in 2010 en 2012) maar wordt wel aangetoond in het water in de nabijheid van een oever met een groot aantal ganzen (locatie A). Dit geeft opnieuw aan dat lokale verschillen t.g.v. de plaatselijke aanwezigheid van dieren groot kunnen zijn.

3.4.3 Merkers in zwemplas "De Middelwaard" in Vianen

Zwemplas "De Middelwaard" in Vianen is evenwijdig aan de rivier "De Lek" gelegen langs de rijksweg A2. De plas is ontstaan door het afgraven van zand en grind en het water in deze recreatieplas bestaat uit grond- en regenwater, er is geen open verbinding met de Lek. De omgeving van de plas is ingericht als natuurgebied waar grote grazers (paarden en Schotse

hooglanders) zijn uitgezet, daarnaast wordt het gebied veel gebruikt voor het uitlaten van honden. De grazers kunnen de west, noord en zuidkant van de plas bereiken en verblijven regelmatig in het water van de plas (figuur 6). De grazers worden, door hekken, weggehouden bij de oostkant van de plas. Deze oostkant van de plas is ingericht als recreatiegebied waar, tijdens warme dagen, zeer intensief (ca. 2000 bezoekers tijdens topdagen) gebruik van wordt gemaakt (zwemmen). De zwemwaterkwaliteit aan de oostkant is, op basis van *E. coli* en enterococcon metingen, over het algemeen beoordeeld als “uitstekend”.



Figuur 6. Runderen in “De Middelwaard” bij Vianen

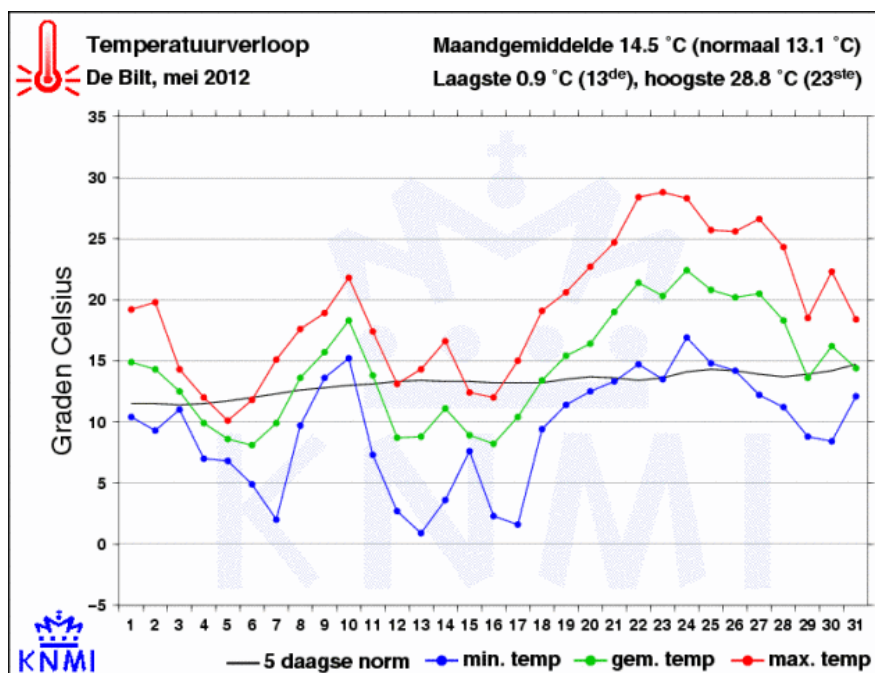
In 2012 zijn op verschillende dagen watermonsters van verschillende locaties uit “De Middelwaard” (noord, oost, zuid en west) geanalyseerd op het bevatten van de verschillende diergroepspecifieke merkers. De kenmerken van de verschillende kanten van “De Middelwaard” zijn als volgt te omschrijven:

- Noord: grote grazers kunnen deze kant bereiken, de waterkant is begroeid met riet zodat hier ook watervogels verblijven. Deze kant wordt niet gebruikt door zwemmers.
- Oost: grote grazers kunnen dit deel van de plas niet bereiken en er is geen begroeiing waardoor de dichtheid watervogels laag is. Zwemmers maken op warme dagen intensief gebruik van deze kant van de plas.
- Zuid: er is weinig begroeiing langs deze kant waardoor de dichtheid watervogels laag is. De wal loopt langzaam af het water in, hierdoor lopen grote grazers hier zeer regelmatig in het water, langs de waterkant ligt veel feces van runderen. Er wordt hier niet gezwommen.
- West: zoals “Zuid”.

Er zijn monsters verzameld op drie verschillende data:

- 22 mei 2012: op dit tijdstip in het jaar waren er nog geen warme dagen geweest en was “De Middelwaard” nog niet intensief gebruikt door zwemmers.
- 29 mei 2012: van 23 tot 28 mei waren de eerste warme dagen van het jaar met 28 mei (2^e pinksterdag) als warmste dag (zie figuur 7) in deze periode. Vanwege de pinksterdagen in deze periode werd er door zwemmers zeer intensief gebruik gemaakt van “De Middelwaard”.
- 5 juni 2012: een week na de warme periode, een week waarin er door zwemmers geen gebruik gemaakt werd van “De Middelwaard”.

Op DNA van de monsters zijn analyses uitgevoerd met de algemene *Bacteroidales* qPCR en de qPCR methoden met specificiteit voor fecale bacteriën van: mensen, herkauwers, runderen en vogels. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in tabel 8.



Figuur 7. Temperatuurverloop in De Bilt in de maand mei van 2012

Tabel 8. Overzicht van analyses uitgevoerd op DNA uit water van recreatieplas “De Middelwaard” in Vianen. De watermonsters zijn genomen op: 22 en 29 mei en 5 juni NA: niet aangetoond. De weergegeven meetwaarden zijn de gemiddelden van twee metingen.

	AllBac (Algemeen)	HumBac (Mensen)	RumBac2 (Herkauwers)	CowM2 (Rund)	CowM3 (Rund)	GFD (Vogels)
22 Mei						
Noord	1,1E+04	NA	1,0E+03	1,8E+01	1,0E+01	1,7E+01
Oost	2,0E+03	NA	2,9E+01	NA	NA	4,3E+00
Zuid	4,9E+04	NA	2,5E+03	1,5E+01	4,6E+00	7,6E+00
West	Geen monster geanalyseerd					
29 Mei						
Noord	7,7E+03	5,1E-01	1,9E+01	NA	NA	4,8E+00
Oost	1,5E+04	3,8E+00	2,8E+01	NA	NA	9,5E+00
Zuid	3,8E+04	NA	1,3E+03	1,8E+00	4,9E+01	2,1E+00
West	4,2E+03	NA	7,2E+01	5,7E-01	5,9E-01	1,0E+01
5 Juni						
Noord	8,4E+04	NA	5,6E+00	NA	NA	8,0E+00
Oost	2,5E+05	1,1E+00	1,0E+00	NA	NA	1,4E+02
Zuid	4,4E+04	NA	2,3E+03	2,0E+00	5,4E+01	9,7E-01
West	2,5E+04	NA	2,8E+01	2,8E+00	1,7E+00	3,9E+00

De analyses met de algemene *Bacteroidales* qPCR laten zien dat alle watermonsters fecaal besmet zijn. De concentratie van de algemene *Bacteroidales* varieert per locatie en varieert tussen de verschillende data waarop de monsters zijn genomen. Met de HumBac qPCR methode worden merkers van mensspecifieke fecale bacteriën aangetoond in de monsters die genomen zijn in het deel van de recreatieplas waar intensief gezwommen werd (Oost) en zeer lage concentraties van deze merkers worden aangetoond in het noordelijke deel van de plas. Deze merkers voor mensspecifieke fecale bacteriën worden nog niet aangetoond in de monsters

welke zijn genomen voordat er gezwommen werd (22 mei) en de merkers zijn een week na de intensieve zwemactiviteiten (5 juni) nog steeds aantoonbaar. Merkers voor fecale bacteriën van herkauwers worden bij alle locaties in de recreatieplas aangetoond. Zoals verwacht, worden de hoogste concentraties herkauwerspecifieke merkers gevonden in het deel van de plas waar runderen eenvoudig de waterkant en het water kunnen bereiken (zuid). In het zuidelijk deel van de plas is ook de concentratie runderspecifieke fecale merkers het hoogst. Vogelspecifieke fecale merkers worden in alle monsters aangetoond, de concentratie van deze merkers varieert tussen de locaties en de data waarop de monsters zijn genomen. De hoogste concentratie vogelspecifieke fecale merkers wordt aangetoond op 5 juni in het gedeelte van de plas waar intensief gerecreëerd werd. Tijdens het nemen van de monsters ('s morgens) was het opvallend dat er veel vogels (vooral meeuwen) aanwezig waren op het strand na dagen met veel recreatieve activiteiten. Waarschijnlijk worden deze vogels aangetrokken door de etensresten die de recreanten op het strand achterlaten.

4 Discussie, conclusies en aanbevelingen

Bruikbaarheid van merkers

In dit onderzoek zijn de eigenschappen en toepasbaarheid van negen moleculaire qPCR merkers voor het aantonen van diergroepspecifieke fecale verontreinigingen onderzocht. Van deze merkers bleek er één (RumBac1 voor het aantonen van fecale verontreinigingen van herkauwers) niet bruikbaar vanwege technische problemen met de qPCR reactie. En een andere merker (PigLac voor het aantonen van varkensspecifieke fecale verontreiniging) bleek niet bruikbaar vanwege de lage selectiviteit van deze merker, deze merker bleek veel kruisreacties te geven met DNA uit feces van runderen en, in mindere mate, mensen en ganzen. Er bleven zeven potentieel bruikbare merkers over. Om kwantificatie van deze zeven merkers mogelijk te maken zijn er suspensies van plasmide-DNA gegenereerd waarbij het kenmerkende qPCR fragment gekloneerd is in het plasmide. De efficiëntie van de qPCR reacties van deze zeven merkers bleek hoog (~100%) zodat te verwachten is dat lage concentraties van deze merkers in monsters aantoonbaar zullen zijn. Om de prestatiekenmerken van deze methoden beter te kennen zal in vervolgonderzoek nauwkeurig onderzocht moeten worden wat de laagste detectiegrens van deze qPCR methoden is. Met de zeven geselecteerde merkers is mogelijk om fecale bacteriën aan te tonen van: warmbloedige dieren, mensen, herkauwers, runderen (2 methoden), varkens en vogels.

Sensitiviteit en specificiteit

De sensitiviteit (worden de merkers aangetoond in alle fecesmonsters van de doelgroep?) en specificiteit (worden de merkers alleen in feces van de doelgroep aangetoond en niet in monsters van andere diergroepen?) bleek voor de zeven geselecteerde methoden heel goed te zijn. In een aantal gevallen traden er kruisreacties op. Maar, de merkerconcentraties in kruisreagerende monsters bleek in alle gevallen zeer laag zodat te verwachten is dat deze kruisreacties in praktijksituaties niet zullen leiden tot onjuiste interpretatie van meetgegevens. De sensitiviteit en specificiteit van de vogelspecifieke fecale merker is slechts onderzocht op een beperkt aantal fecesmonsters afkomstig van een beperkt aantal vogelsoorten. De hoge sensitiviteit, die in dit onderzoek wordt aangetoond, voor feces van ganzen komt overeen met de resultaten van de oorspronkelijke ontwikkelaars van deze methode [21]. Om een goed beeld te krijgen van de aanwezigheid en concentratie van deze merker in feces van verschillende relevante vogelsoorten wordt voor vervolgonderzoek aanbevolen om een grote collectie fecesmonsters, afkomstig van verschillende relevante vogelsoorten, te onderzoeken. In de praktijk blijkt het verzamelen van fecesmonsters waarvan de herkomst bekend is voor sommige vogelsoorten zeer lastig. De sensitiviteit van de mensspecifieke fecale merker is vrij laag (78,1%) waardoor deze merker mogelijk niet aanwezig is in een relatief groot deel (21,9%) van de menselijke fecesmonsters. Mogelijk is dit het gevolg van het testen van DNA van fecesmonsters die afkomstig zijn van een ziekenhuis. Zeer waarschijnlijk zijn deze monsters afkomstig van patiënten die, door ziekte en/of gebruik van antibiotica, een verstoorde darmflora hebben (er was immers een goede reden om de feces van deze patiënten te onderzoeken) waardoor deze merker afwezig kan zijn in een ongewoon hoog percentage van de onderzochte monsters. Mogelijk dat de merker aantoonbaar is in een hoger percentage fecesmonsters bij onderzoek van DNA uit fecesmonsters van gezonde mensen.

De "Algemene" merker (AllBac) voor detectie van fecale bacteriën van warmbloedige dieren wordt, in lage concentraties, ook aangetoond in drinkwater. Het is mogelijk dat dit het gevolg is van zeer lage concentraties fecale bacteriën maar er kan ook niet uitgesloten worden dat dit wordt veroorzaakt door het aantonen van bacteriën in het drinkwater die geen relatie hebben met fecale verontreiniging. Hoewel de toegepaste methode niet is onderzocht in het onderzoek

van Paul van der Wielen [22], waarin hij aantoonde dat met *Bacteroidales*-specifieke methoden niet alleen fecale bacteriën worden aangetoond, kan niet uitgesloten worden dat ook de AllBac methode onvoldoende specifiek is. Dit onderzoek maakt duidelijk dat de concentraties van de AllBac merker in feces van verschillende diergroepen zeer hoog is. Daarnaast zijn er in onderzoek (in opdracht van RWS-Waterdienst) relaties aangetoond tussen concentraties *E. coli* en enterococci en concentraties AllBac merker in zwemwater. Mogelijk is het aantonen van alleen de aanwezigheid van deze merker in drinkwater van weinig waarde maar geeft de merkerconcentratie wel een indruk over de mate van besmetting. Aanvullend onderzoek moet duidelijk maken of deze *Bacteroidales* merker bruikbaar is als alternatieve merker voor het detecteren en kwantificeren van fecale besmettingen.

Concentratie van de merkers in feces

De concentratie van de merkers is in de feces van de doelgroep diersoorten zeer hoog: (variërend van $8,9 \times 10^4$ DNA kopieën/mg voor runderspecifieke merker CowM2 in de feces van runderen tot $1,4 \times 10^8$ DNA kopieën/mg voor de herkauwerspecifieke merker in de feces van schapen). Als aangenomen wordt dat het mogelijk is om 10 DNA-kopieën aan te tonen in een qPCR-reactie (op basis van ander onderzoek is dit een reële aanname) dan zou het mogelijk zijn om, per qPCR-reactie, met de runderspecifieke methode de merker aan te tonen afkomstig uit $1,1 \times 10^{-7}$ mg runderfeces en de herkauwerspecifieke merker afkomstig uit $7,1 \times 10^{-11}$ mg schapenfeces te detecteren. Ter illustratie: met een merkerconcentratie van 10^8 DNA kopieën in 1 mg feces is het mogelijk om deze merker aan te tonen als 1 gram feces vermengd wordt in een volume van 10^9 liter water (bij een analysevolume van 100 ml). Deze berekeningen geven aan dat fecale besmettingen met deze methoden zeer gevoelig kunnen worden aangetoond. Aanvullend onderzoek zal noodzakelijk zijn om de onderste analysegrenzen, voor elke methode, experimenteel te bepalen. De vergelijking met de gevoeligheid van deze qPCR methoden met de standaard methoden voor het aantonen van fecale besmettingen (kweekbare *E. coli* en enterococci) is interessant. Maar, vanwege de beperkte beschikbaarheid van de concentratie (kweekbare) *E. coli* en enterococci in feces van verschillende diergroepen is de vergelijking moeilijk te maken. Aanvullend literatuur- en laboratoriumonderzoek zal meer inzicht geven in deze vergelijking.

Voor het bepalen van de concentraties van de merkers in de fecesmonsters van mensen en runderen (de monsters van de Gezondheidsdienst voor Dieren, GD) zijn aannames gedaan over de hoeveelheid feces die is gebruikt voor het isoleren van het DNA en de opbrengst van de isolatiemethode. Hierdoor kunnen de werkelijke merkerconcentraties afwijken van de concentraties die hier gerapporteerd zijn. Om de concentraties nauwkeurig te bepalen zullen DNA-isolaties uit fecesmonsters moeten worden uitgevoerd waarbij de hoeveelheid feces nauwkeurig wordt bepaald en de opbrengst van de isolatieprocedure wordt gemeten.

Toepassing in praktijksituaties

De voorbeelden in dit onderzoek laten zien dat de methoden toepasbaar zijn voor het identificeren van de fecale besmettingsbronnen in riool- en oppervlaktewater. En, in de eindfase van dit onderzoek zijn de methoden, in opdracht van Rijkswaterstaat, succesvol toegepast om fecale besmettingsbronnen bij kwetsbare zwemlocaties te identificeren [31]. Het is te verwachten dat de methoden ook toepasbaar voor het identificeren van fecale besmettingsbronnen in drinkwater. Hierbij kan gedacht worden aan toepassing bij situaties waarbij fecale besmetting van drinkwaterbronnen plaats vindt t.g.v. kwetsbare situaties waarbij ondiepe grondwaterwinningen besmet kunnen worden door afspoeling van feces vanaf het maaiveld. Maar, ook in gevallen waarbij besmettingen van het geleverde drinkwater worden geconstateerd (calamiteiten) kunnen deze methoden van grote waarde zijn. De methoden maken het immers mogelijk om zeer snel inzicht te krijgen in de bron van de fecale besmetting waardoor er snel gerichte maatregelen genomen kunnen worden waardoor gezondheidsrisico's

en productieverliezen kunnen worden beperkt. Om de waarde van deze methoden voor de drinkwatersector beter te kunnen beoordelen zal aanvullend onderzoek noodzakelijk zijn waarbij de methoden worden ingezet in relevante situaties, zoals wanneer een besmetting in het net wordt vastgesteld.

Andere methoden

Door dit onderzoek zijn er methoden beschikbaar waarmee fecale bacteriën van een groot aantal relevante diergroepen kunnen worden aangetoond (warmbloedige dieren, mensen, herkauwers, runderen, varkens en vogels). Maar, in waterwingebieden en oppervlaktewater dat wordt gebruikt voor recreatie kunnen fecale besmettingen van andere dierlijke bronnen, zoals honden, paarden en knaagdieren, ook een rol spelen. Daarom wordt aanbevolen om ook voor deze diergroepen methoden te ontwikkelen.

5 Literatuur

1. Ahmed, W., et al., *Real-time PCR detection of pathogenic microorganisms in roof-harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(17): p. 5490-6.
2. McLellan, S.L., *Genetic diversity of Escherichia coli isolated from urban rivers and beach water*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(8): p. 4658-65.
3. Goto, D.K. and T. Yan, *Genotypic diversity of Escherichia coli in the water and soil of tropical watersheds in Hawaii*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(12): p. 3988-97.
4. Lay, J.O., Jr., *MALDI-TOF mass spectrometry of bacteria*. Mass Spectrom Rev, 2001. **20**(4): p. 172-94.
5. Giebel, R., et al., *Microbial fingerprinting using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) applications and challenges*. Adv Appl Microbiol, 2010. **71**: p. 149-84.
6. Siegrist, T.J., et al., *Discrimination and characterization of environmental strains of Escherichia coli by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS)*. J Microbiol Methods, 2007. **68**(3): p. 554-62.
7. Giebel, R.A., W. Fredenberg, and T.R. Sandrin, *Characterization of environmental isolates of Enterococcus spp. by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry*. Water Res, 2008. **42**(4-5): p. 931-40.
8. Bernhard, A.E. and K.G. Field, *A PCR assay To discriminate human and ruminant feces on the basis of host differences in Bacteroides-Prevotella genes encoding 16S rRNA*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(10): p. 4571-4.
9. Seurinck, S., et al., *Detection and quantification of the human-specific HF183 Bacteroides 16S rRNA genetic marker with real-time PCR for assessment of human faecal pollution in freshwater*. Environ Microbiol, 2005. **7**(2): p. 249-59.
10. Haugland, R.A., et al., *Evaluation of genetic markers from the 16S rRNA gene V2 region for use in quantitative detection of selected Bacteroidales species and human fecal waste by qPCR*. Syst Appl Microbiol, 2010. **33**(6): p. 348-57.
11. Shanks, O.C., et al., *Performance of PCR-based assays targeting Bacteroidales genetic markers of human fecal pollution in sewage and fecal samples*. Environ Sci Technol, 2010. **44**(16): p. 6281-8.
12. Kildare, B.J., et al., *16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: a Bayesian approach*. Water Res, 2007. **41**(16): p. 3701-15.
13. Mieszkina, S., et al., *Phylogenetic analysis of Bacteroidales 16S rRNA gene sequences from human and animal effluents and assessment of ruminant faecal pollution by real-time PCR*. J Appl Microbiol, 2010. **108**(3): p. 974-84.
14. Gourmelon, M., et al., *Development of microbial and chemical MST tools to identify the origin of the faecal pollution in bathing and shellfish harvesting waters in France*. Water Res, 2010. **44**(16): p. 4812-24.
15. Shanks, O.C., et al., *Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution*. Appl Environ Microbiol, 2008. **74**(3): p. 745-52.
16. Shanks, O.C., et al., *Performance assessment PCR-based assays targeting bacteroidales genetic markers of bovine fecal pollution*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(5): p. 1359-66.
17. Mieszkina, S., et al., *Estimation of pig fecal contamination in a river catchment by real-time PCR using two pig-specific Bacteroidales 16S rRNA genetic markers*. Appl Environ Microbiol, 2009. **75**(10): p. 3045-54.
18. Marti, R., et al., *Evaluation of Lactobacillus sobrius/L. amylovorus as a new microbial marker of pig manure*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(5): p. 1456-61.
19. Dick, L.K. and K.G. Field, *Rapid estimation of numbers of fecal Bacteroidetes by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes*. Appl Environ Microbiol, 2004. **70**(9): p. 5695-7.
20. Konstantinov, S.R., H. Smidt, and W.M. de Vos, *Representational difference analysis and real-time PCR for strain-specific quantification of Lactobacillus sobrius sp. nov.* Appl Environ Microbiol, 2005. **71**(11): p. 7578-81.
21. Green, H.C., et al., *Genetic markers for rapid PCR-based identification of gull, Canada goose, duck, and chicken fecal contamination in water*. Appl Environ Microbiol, 2012. **78**(2): p. 503-10.

22. van der Wielen, P.W. and G. Medema, *Unsuitability of quantitative Bacteroidales 16S rRNA gene assays for discerning fecal contamination of drinking water*. Appl Environ Microbiol, 2010. **76**(14): p. 4876-81.
23. Heijnen, L., *Pathogenen in de mest van grazers*. KWR Rapport i.o.v. Waternet, 2009.
24. Wullings, B.A.V., H.R.; Wubbels, G.; van der Kooij, D., *Detectie van Legionella pneumophila in leidingwater met een kwantitatieve PCR-methode (Een beoordeling van de prestatiekenmerken van de methode)*. BTO rapport, 2006. **06.087**.
25. Siefring, S., et al., *Improved real-time PCR assays for the detection of fecal indicator bacteria in surface waters with different instrument and reagent systems*. J Water Health, 2008. **6**(2): p. 225-37.
26. Haugland, R.A., et al., *Comparison of Enterococcus measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis*. Water Res, 2005. **39**(4): p. 559-68.
27. Wielen, P.W.J.J., *Het gebruik van alternatieve indicatororganismen voor de detectie van fecale verontreinigingen in water*. BTO rapport, 2008(2006.028).
28. Bernhard, A.E. and K.G. Field, *Identification of nonpoint sources of fecal pollution in coastal waters by using host-specific 16S ribosomal DNA genetic markers from fecal anaerobes*. Appl Environ Microbiol, 2000. **66**(4): p. 1587-94.
29. Fremaux, B., et al., *Evaluation of host-specific Bacteroidales 16S rRNA gene markers as a complementary tool for detecting fecal pollution in a prairie watershed*. Water Res, 2009. **43**(19): p. 4838-49.
30. Marti, R., et al., *Development and validation of a microbial source tracking marker for the detection of fecal pollution by muskrats*. J Microbiol Methods, 2011. **87**(1): p. 82-8.
31. Leenen, I., et al., *Bijdrage Vogels aan de zwemwaterkwaliteit*. Grontmij Rapport, i.o.v. RWS-Waterdienst, 2012.

