

BTO 2015.023 | April 2015

BTO rapport

Eigenschappen van DNA-merkers voor fecale verontreiniging

Concentratie DNA-merkers in feces
Stabiliteit DNA-merkers in water
Merker voor fecale verontreiniging van honden

BTO

Eigenschappen van DNA-merkers voor fecale verontreiniging

BTO 2015.023 | April 2015

Opdrachtnummer

B222009

Projectmanager

Luc Hornstra

Opdrachtgever

BTO

Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

Auteur(s)

Leo Heijnen

Verzonden aan

Dit rapport is selectief verspreid onder medewerkers van BTO-participanten en is verder niet openbaar.

Jaar van publicatie
2015

Meer informatie

T 030-6069743
E leo.heijnen@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

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



BTO 2015.023 | April 2015 © 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.

Inhoud

Inhoud	2
Samenvatting	3
1 Inleiding	5
2 Materiaal en methoden	7
2.1 Fecesmonsters	7
2.2 DNA-extracties	7
2.3 Meting van het rendement van de DNA-extracties	8
2.4 qPCR analyses	8
2.5 Incubatieexperiment	9
3 Resultaten	11
3.1 Ontwikkeling van een methode voor detectie van fecale verontreiniging van honden	11
3.2 Fecale merkers in feces van verschillende dieren	16
3.3 Stabiliteit van DNA-merkers en kweekbare E. coli in water	26
3.4 Verkenning: DNA merkers voor fecale verontreiniging in drinkwater	30
4 Discussie en conclusies	31
4.1 Methode voor detectie van fecale verontreiniging van honden	31
4.2 Fecale merkers in feces van verschillende dieren	32
4.3 Stabiliteit van DNA-merkers en kweekbare E. coli in water	33
4.4 DNA-merkers voor fecale verontreiniging in drinkwater	34
4.5 Toepassingmogelijkheden voor de drinkwatersector	35
5 Literatuur	37

Samenvatting

Fecale verontreiniging van grond- en drinkwater wordt gezien als een belangrijk risico bij de watervoorziening. Waterkwaliteitscontrole vindt doorgaans plaats door de afwezigheid van indicatororganismen (*E. coli* en enterococci) aan tonen. Hiermee wordt een indicatie verkregen over de aanwezigheid van fecaal materiaal afkomstig van warmbloedige dieren en daarmee over de mogelijke aanwezigheid van pathogene micro-organismen. Deze methoden geven echter geen informatie over de herkomst van een fecale verontreiniging waardoor de inschatting van het risico van de verontreiniging onzeker is en het nemen van gerichte maatregelen, in het geval van calamiteiten, moeilijk is.

In het BTO onderzoek van 2012 en 2013 zijn qPCR methoden ontwikkeld waarmee het mogelijk is om DNA-merkers van fecale bacteriën van bepaalde diergroepen (mensen, herkauwers, runderen, varkens en vogels) specifiek aan te tonen (1).

Deze methoden zijn om meerdere redenen waardevol voor de drinkwatersector:

- Door de dierlijke of menselijke oorsprong van een verontreiniging te bepalen kan beter worden geschat welke pathogenen aanwezig kunnen zijn, waardoor een nauwkeuriger risicoschatting mogelijk is.
- Merkers van diergroep-specifieke indicatoren vormen mogelijk een meer gevoelige indicator voor fecale verontreiniging bij waterkwaliteitscontrole (bij distributie) als aanvulling op of alternatief voor indicatororganismen.
- Bij reguliere waterkwaliteitscontrole of bij calamiteiten kunnen de methoden ingezet worden om snel de bron van besmetting te achterhalen waardoor snel gerichte maatregelen genomen kunnen worden.

Om de toepasbaarheid van deze diergroep-specifieke qPCR methoden beter te kunnen beoordelen en het aantal methoden uit te breiden zijn in dit onderzoek de volgende stappen gezet:

- Er is een methode ontwikkeld waarmee het DNA van honden specifiek kan worden gedetecteerd.
 - Deze DNA-merker wordt in alle fecesmonsters van honden aangetoond en in een klein deel van de fecesmonsters van katten en runderen wordt de merker in zeer lage concentraties aangetoond.
 - De concentratie van de hond-specifieke DNA-merker is lager dan de specifieke DNA-merkers voor *Bacteroides* bacteriën in feces van herkauwers, runderen, reeën/herten.
 - De voorkeur ging uit naar de ontwikkeling van een methode waarmee het DNA van fecale bacteriën van honden kan worden aangetoond maar hiervoor is nog geen geschikte informatie beschikbaar. Als alternatief is gekozen voor een methode waarmee het DNA van honden specifiek kan worden gedetecteerd. Door de aanwezigheid van hoge concentraties epitheelcellen in de feces is de aanwezigheid van deze merker indicatief voor de aanwezigheid van fecale vervuiling. Maar, met het gebruik van deze merker, worden niet alleen fecale verontreinigingen aangetoond maar mogelijk ook verontreinigingen t.g.v. de aanwezigheid van cellen van honden (afkomstig van b.v. haren, huidcellen of epitheelcellen in urine).

Op basis van bovenstaande bevindingen wordt geconcludeerd dat deze hond-specifieke DNA-merker bruikbaar lijkt om een indruk te krijgen over de aanwezigheid van DNA uit hondencellen in een watermonster. Maar, de ontwikkeling van een DNA-merker op basis van hond-specifieke darmbacteriën wordt aanbevolen vanwege de hoge concentratie en de exclusieve aanwezigheid in feces.

- De concentratie DNA-merkers van de “traditionele” indicatoren (*E. coli* en enterococci) en de concentratie merkers van dierspecifieke indicatoren is bepaald in de feces van verschillende diersoorten.
 - De concentratie dierspecifieke DNA-merkers voor fecale bacteriën van herkauwers, runderen en mensen is aanmerkelijk hoger (factor 71-3121) dan de concentratie DNA-merkers voor *E. coli* en enterococci in de feces van de betreffende diergroep.
 - De concentratie DNA-merkers voor vogelspecifieke *Helicobacter* bacteriën is lager dan de concentratie DNA-merkers voor *E. coli* en enterococci (resp. een factor 188 en 149).

Op basis hiervan is te verwachten dat detectie van DNA-merkers voor fecale verontreinigingen van herkauwers, runderen en mensen met hoge gevoeligheid mogelijk is. Fecale verontreinigingen van vogels zijn naar verwachting minder gevoelig detecteerbaar.

- De stabiliteit van verschillende DNA-merkers en kweekbare *E. coli* is onderzocht in drink- en rivierwater bij verschillende temperaturen (5°C en 20°C) en hieruit komt het volgende beeld:
 - De concentratie kweekbare *E. coli* neemt sneller af dan de concentratie DNA-merkers. In drinkwater bij 5°C is het aantal dagen waarin de concentratie kweekbare *E. coli* 99% afneemt (t_{99}) 33 dagen en t_{99} voor diergroep-specifieke merkers is dit gemiddeld 104 dagen. Het verschil is kleiner in drinkwater van 20°C (t_{99} kweekbare *E. coli* 40 dagen en DNA-merkers gem. 49 dagen) en in rivierwater van 5°C (t_{99} kweekbare *E. coli* 27 dagen en DNA-merkers gem. 45 dagen). In Lekwater van 20°C zijn de vervalsnelheden van kweekbare *E. coli* en DNA-merkers vergelijkbaar (t_{99} kweekbare *E. coli* 25 dagen en t_{99} DNA-merkers gem. 24 dagen).

Deze meetwaarden geven aan dat DNA-merkers langer detecteerbaar zijn dan kweekbare *E. coli* maar het verschil tussen deze beide parameters is gering.

- In 74 drinkwater monsters geproduceerd uit oppervlakte- en grondwater zijn geen mens-, herkauwer- of rund-specifieke fecale DNA-merkers aangetoond. In een beperkt aantal (n=10) monsters zijn wel een lage concentraties vogel-specifieke fecale DNA merkers aangetoond. Het is niet duidelijk of dit het gevolg is van de aanwezigheid van lage concentraties helicobacter-DNA of veroorzaakt wordt door kruisreacties met DNA van andere bacteriën. Door de DNA-sequentie van de verkregen PCR-fragmenten te bepalen is te bepalen welk organisme zorgt voor de positieve qPCR reacties. Deze sequentieanalyse geeft bovendien informatie waarmee de specificiteit van deze methode kan worden verbeterd.

Mogelijkheden voor toepassing

Op basis van de resultaten uit dit onderzoek is te verwachten dat diergroep-specifieke DNA-merkers van waarde kunnen zijn voor de drinkwatersector ten behoeve van:

- *Identificatie van de bron van fecale besmettingen*

De specificiteit en de hoge concentratie van de verschillende diergroep-specifieke DNA-merkers in feces maakt het mogelijk om de herkomst van fecale betrouwbaar en gevoelig vast te stellen. De kennis over de herkomst van een fecale besmetting kan helpen om problemen (tijdens productie of distributie) gericht op te lossen en/of risico's beter in te schatten bij het optreden van fecale besmettingen van drinkwater.

- *Kwaliteitscontrole*

Vanwege de hoge concentratie diergroep-specifieke DNA-merkers in de feces van de verschillende diersoorten is te verwachten dat deze merkers kunnen worden toegepast voor zeer gevoelige en snelle detectie van fecale besmettingen.

1 Inleiding

In het BTO onderzoek van 2012 en 2013 zijn diverse DNA-merkers ontwikkeld (1) waarmee het mogelijk is om de herkomst van fecale besmettingen te achterhalen. Bij deze methoden wordt een fragment van het DNA (DNA-merker) van specifieke bacterietypen (in veel, maar niet alle gevallen, behorende tot de orde van de *Bacteroidales* bacteriën), die alleen voorkomen in de darmflora van bepaalde diergroepen, gekwantificeerd. Zo zijn er DNA-merkers ontwikkeld waarmee het DNA van fecale bacteriën van herkauwers, mensen, vogels, varkens en runderen specifiek kunnen worden aangetoond. Met onderzoek van een groot aantal fecesmonsters van verschillende diersoorten werd aangetoond dat deze methoden zeer specifiek zijn en dat de merkerconcentraties in feces hoog zijn. Met de ontwikkelde dier-specifieke fecale DNA-merkers zijn er verschillende mogelijkheden voor toepassing in de drinkwatersector denkbaar: "Bronopsporing" en "Kwaliteitscontrole".

Vanwege de specificiteit van diergroep-specifieke DNA-merkers wordt er met het aantonen van deze merkers een sterke aanwijzing verkregen voor de aanwezigheid van fecaal materiaal afkomstig van een bepaalde diersoort. Hierdoor is het mogelijk om deze methoden in te zetten voor het opsporen van de fecale verontreinigingsbron. De methoden zijn hiervoor uitgebreid toegepast in onderzoek voor RWS (2, 3) waarbij is geïnventariseerd welke relevante besmettingsbronnen er aanwezig zijn in/rond zwemwater van locaties met een slechte kwaliteit. De verkregen informatie wordt vervolgens gebruikt voor het nemen van gerichte kwaliteitsverbeterende maatregelen. Ook in de drinkwatersector kunnen er situaties optreden waarbij kennis over de herkomst van een fecale besmetting kan helpen problemen op te lossen en/of risico's beter in te schatten.

Vanwege de hoge concentratie diergroep-specifieke DNA-merkers in de feces van de betreffende diersoorten is te verwachten dat deze merkers zeer gevoelig en snel te detecteren zijn. Door het gebruik van qPCR om de merkers aan te tonen, is snelle detectie mogelijk waarbij het resultaat binnen enkele uren na aankomst van het monster op het laboratorium beschikbaar is. Vanwege de hoge concentratie merkers in feces (mogelijk hoger dan de concentratie *E.coli* en enterococci) is te verwachten dat fecale verontreinigingen door toepassing van fecale DNA-merkers zeer gevoelig kunnen worden aangetoond.

Doordat hoge concentraties dier-specifieke fecale merkers worden aangetoond in feces van verschillende diersoorten is te verwachten dat de merkers ook in fecaal besmet oppervlaktewater in hoge concentraties voorkomen. Omdat niet te verwachten is dat de merkers (de organismen) zich tijdens zuiveringsprocessen vermeerderen zijn deze merkers mogelijk toepasbaar als procesindicator voor het meten van de efficiëntie van de zuiveringsstappen.

Om de mogelijkheden van fecale DNA-merkers voor detectie van fecale besmettingen en identificatie van de besmettingsbronnen beter te kunnen beoordelen is aanvullend onderzoek uitgevoerd:

- Om het mogelijk te maken om fecale verontreinigingen van zoveel mogelijk relevante diergroepen te kunnen detecteren is er in dit onderzoek een merker ontwikkeld waarmee verontreinigingen, veroorzaakt door honden, specifiek kunnen worden aangetoond.
 - o De methode is specifiek: er worden hoge concentraties aangetoond in feces van honden
- Door het bepalen van de concentratie *E.coli* en enterococci (met qPCR) in fecesmonsters is de relatie tussen diergroep-specifieke merkers en

E.coli/enterococcon vastgesteld in fecesmonsters van runderen, herkauwers, mensen, herten/reeën en vogels.

- Via incubatie-experimenten is onderzocht wat de stabiliteit van de merkers in drink- en oppervlaktewater is bij verschillende temperaturen.
- Door analyses uit te voeren op drinkwatermonsters is vastgesteld of er merker-DNA in drinkwater voorkomt.

De resultaten van dit onderzoek zijn in dit rapport samengevat.

2 Materiaal en methoden

2.1 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 (4). Gedurende de periode van onderzoek (april 2007-april 2008) zijn fecesmonsters van runderen (n=59), schapen (n=79), reeën (n=34) en damherten (n=84) verzameld en bewaard bij -20°C. Voor analyses (uitgevoerd 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 watervogels

Fecesmonsters van watervogels zijn verzameld op verschillende locaties. Monsters van ganzen zijn verzameld op een grasoever langs het Lekkanaal in Nieuwegein, op momenten dat verschillende soorten ganzen foerageren, op een locatie tussen de Beatrixsluis en de rivier de Lek. Daarnaast zijn er, in het kader van onderzoek in 2013 (2, 5) in opdracht van Rijkswaterstaat-Waterdienst, fecesmonsters van verschillende watervogels verzameld 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. De concentratie DNA in deze monsters is bepaald met de QuBit.

Fecesmonsters van honden en katten

Fecesmonsters van 45 honden en 20 katten zijn afkomstig van de afdeling microbiologie van de faculteit diergeneeskunde in Utrecht. Uit 100 mg fecesmateriaal is DNA geïsoleerd door gebruik te maken van de PowerBiofilm kit van MoBio.

2.2 DNA-extracties

Voor isolatie van DNA is de PowerBiofilm Kit van de firma MoBio gebruikt. Eerst zijn de monsters (ca. 100 mg fecaal materiaal of een membraanfilter) overgebracht naar bead-bead buisjes (met hierin keramische beads van verschillend formaat). Lysis buffer, met hierin een bekende hoeveelheid IC-DNA (Interne controle voor meten van opbrengst en inhibitie), is aan elk monster toegevoegd en de buisjes zijn 10 minuten bij 65°C geïncubeerd. Een bead-bead stap, waarbij de buisjes zeer krachtig worden geschud waardoor de keramische beads met grote snelheid door de vloeistof worden bewogen, zorgt in combinatie met de lysis buffer voor het openbreken van de cellen en het vrijkomen van (o.a.) het DNA. Na deze bead-bead stap zijn de buisjes ingevroren (-20°C) totdat verder gegaan werd met de zuivering van het DNA. Voor het zuiveren van het DNA is gebruik gemaakt de affiniteitszuivering met extractiekolommen van de PowerBiofilm Kit. Na een aantal "wasstappen" is het DNA uit elk monster geëluëerd in een volume van 200 µl. Voor de analyses met qPCR wordt 10 µl van

het geïsoleerde DNA gebruikt (in duplo). De opbrengst van de isolatieprocedure is bepaald door meting van het IC-DNA.

2.3 Meting van het rendement van de DNA-extracties

Het rendement van de DNA-isolatie en de eventuele aanwezigheid van remmende stoffen in het DNA van de water- of fecesmonsters is bepaald door aan elk monster een interne controle (IC) toe te voegen en hiervan de opbrengst te bepalen.

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 kwantitatief te detecteren. Door de concentratie van dit plasmide-DNA te bepalen na extractie van DNA 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. Voor fecesmonsters zijn alleen de monsters met een opbrengst van minimaal 5% meegenomen in de analyses en voor watermonsters is een drempelwaarde voor analyse van minimaal 10% aangehouden.

2.4 qPCR analyses

Bij de toegepaste qPCR methoden worden er, door toepassing van synthetische DNA moleculen (primers) specifieke DNA-merkers geamplificeerd. De, in dit onderzoek gebruikte DNA-merkers zijn specifiek voor het DNA van fecale bacteriën van bepaalde diergroepen: mensen, "herkauwers", runderen, vogels en een algemene bacteroidales merker voor detectie van bacteroidales bacteriën van warmbloedige dieren. Daarnaast zijn merkers toegepast waarmee het DNA van de "traditionele" indicatororganismen wordt gekwantificeerd (*E. coli* en enterococci) en is een merker ontwikkeld waarmee het DNA van honden kan worden gedetecteerd. Een overzicht van de toegepaste primers voor de amplificatie van specifieke merkers is weergegeven in tabel 1.

Naam	Namen van Primers and probe	Gedetecteerd organisme	Fragment lengte (bp)	Referenties
Algemeen (warmbloedige dieren)				
AllBac	GB342F GenBacR4 Probe: GB342Pr	Bacteroidales van warmbloedige dieren (16S rRNA gen)	129	Siefring <i>et al.</i> , 2008 (6) Dick <i>et al.</i> , 2004 (7)
Mensen				
HumBac	HF183F HF183R Probe: SSHBac-Pr	Mensspecifieke Bacteroidales (16S rRNA gen)	83	Bernhard <i>et al.</i> , 2000 (8) Seurinck <i>et al.</i> , 2005 (9) Haugland <i>et al.</i> , 2010 (10) Shanks <i>et al.</i> , 2010 (11)
Herkauwers				
RumBac2	BacB2-590F Bac708Rm Probe: BacB2-626P	Herkauwerspecifieke Bacteroidales (16S rRNA gen)	99	Mieszkin <i>et al.</i> , 2010 (12) Gourmelon <i>et al.</i> , 2010 (13)
Runderen				
CowBacM3	CowM3F CowM3R Probe: BacCowM3Pr	Onbekende familie van rundspectifieke darmbacteriën	131	Shanks <i>et al.</i> , 2008 (14) Shanks <i>et al.</i> , 2010 (15)
Vogels				
Bird-GFD	GFD_F GFD_R	Niet geclassificeerde Helicobacter soort	123	Green <i>et al.</i> , 2012 (16)
E. coli				
Coli-Hsp	ColiHsp-F2 ColiHsp-R2 Probe: ColiHsp-Pr	<i>E. coli</i> (Hsp70 gen)	110	Heijnen <i>et al.</i> 2012 (17) Heijnen <i>et al.</i> 2009 (18)
Enterococcen				
Ent-WLN	Ent-23S-F-WLN Ent-23SR-WLN Ent-WLN-PrA/Ent-WLN PrB	<i>Enterococcus faecium/faecalis/durans/hirae</i>	164	Ontwikkeld door Waterlaboratorium Noord (WLN)
Honden				
Dog	DogFk DogRk DogPr	Mitochondriaal DNA specifiek voor honden		Afkomstig van Caldwell <i>et al.</i> 2009 (19) en in deze studie en in Heijnen <i>et al.</i> (2) doorontwikkeld

Tabel 1. Overzicht van de toegepaste primers en probes.

2.5 Incubatieexperiment

De stabiliteit van kweekbare *E. coli* cellen en verschillende DNA-merkers in water is onderzocht op, met feces van runderen en honden, besmette drink- en oppervlaktewatermonsters. Voor het samenstellen van deze artificieel besmette watermonsters zijn eerst twee homogene fecessuspensie gemaakt door respectievelijk 4 gram verse feces afkomstig van een hond en 4 gram verse feces van een rund grondig te mengen in een volume van 400 ml PBS (Phosphate Buffered Saline). De concentraties kweekbare *E. coli* en enterococcen in deze suspensies zijn bepaald door het uitvoeren van de standaard *E. coli* (LSA) en enterococcen (S&B) methoden en de concentraties DNA-merkers zijn bepaald door een volume van 100µl van de suspensie te filtreren, hieruit DNA te isoleren en de merkerconcentraties te bepalen met qPCR. De concentraties kweekbare *E. coli* en enterococcen en de concentraties specifieke DNA-merkers in de suspensies zijn weergegeven in tabel 2.

Feces Suspensie	Kweek		qPCR merkers				
	KVE/ml		DNA kopieën/ml				
	E. coli	Enterococ	AllBac	RumBac2	Coli-Hsp	Ent-WLN	Dog
Hond	1,4 ^E +06	2,5 ^E +02	4,3 ^E +10	0	2,0 ^E +07	1,2 ^E +02	6,9 ^E +06
Rund	2,2 ^E +03	0	2,9 ^E +09	1,2 ^E +08	4,8 ^E +04	0	0

Tabel 2. De concentratie kweekbare *E. coli* en enterococcen (KVE/ml) en de concentratie DNA-merkers in suspensies met runder- of hondenfeces.

Aansluitend zijn volumes van 20 l Nieuwegeins drinkwater en 20 l oppervlaktewater (afkomstig uit het Lekkanaal in Nieuwegein) besmet met 4 ml van de beide fecesuspensies en zijn de monsters na homogenisatie gesplitst in twee monsters met een volume van 10 l. Van de twee drink- en oppervlaktewatermonster is er één geïncubeerd bij 5°C en één bij 20°C gedurende een periode van 96 dagen. Tijdens deze incubatieperiode zijn er periodiek monsters genomen waarin het aantal kweekbare *E. coli* is bepaald en zijn er watermonsters gefiltreerd door membraanfilters van polycarbonaat (Track-edge filters, Sartorius) met een poriegrootte van 0,2 µm en een doorsnede van 4,5 cm voor isolatie van DNA. Het geïsoleerde DNA is gebruikt voor qPCR analyses voor het bepalen van de concentratie DNA-merkers voor algemene bacteroidales (AllBac), herkauwer bacteroidales (RumBac2), *E. coli* (Coli-Hsp), enterococcen (Ent-WLN) en honden (Dog).

3 Resultaten

3.1 Ontwikkeling van een methode voor detectie van fecale verontreiniging van honden

Een methode waarmee fecale verontreinigingen van honden specifiek kunnen worden aangetoond is zowel in het belang van het beheer van zwemwater als ook in het belang van de drinkwaterbedrijven. De ontwikkeling van een hond-specifieke methode heeft daarom gedeeltelijk plaats gevonden binnen dit project en gedeeltelijk in opdracht van Rijkswaterstaat (2).

Voor de ontwikkeling van een methode waarmee een DNA-merker voor fecale verontreinigingen van honden specifiek kunnen worden aangetoond is eerst literatuuronderzoek uitgevoerd. In dit literatuuronderzoek is geïnventariseerd of er al veelbelovende methoden beschikbaar zijn, wat de eigenschappen van deze beschreven methoden zijn en welke ontwikkelingen er nog nodig zijn om deze methoden geschikt te maken voor toepassing. Vervolgens is een veelbelovende methode geselecteerd en de geselecteerde methode is geoptimaliseerd (optimalisatie van de primersequenties, reactieomstandigheden en ontwikkeling van een specifieke detectieprobe). Om kwantificatie mogelijk te maken is er een kalibratiesuspensie ontwikkeld van plasmide-DNA met een nauwkeurig bepaalde DNA-concentratie en er is onderzocht of qPCR reacties uitgevoerd op verdunningsreeksen van deze suspensies geschikt zijn voor het genereren van een ijklijn. De prestatiekenmerken van de methode zijn onderzocht door qPCR analyses uit te voeren op fecaal-DNA van een groot aantal verschillende diersoorten. Hierbij zijn de specificiteit en selectiviteit van de methode en de concentratie van de DNA merker in fecaal materiaal bepaald. Om de mogelijkheid van toepassing voor de analyse van zwemwatermonsters te onderzoeken is de ontwikkelde methode toegepast op DNA uit watermonsters van 16 verschillende zwemwaterlocaties.

3.1.1 Literatuuronderzoek

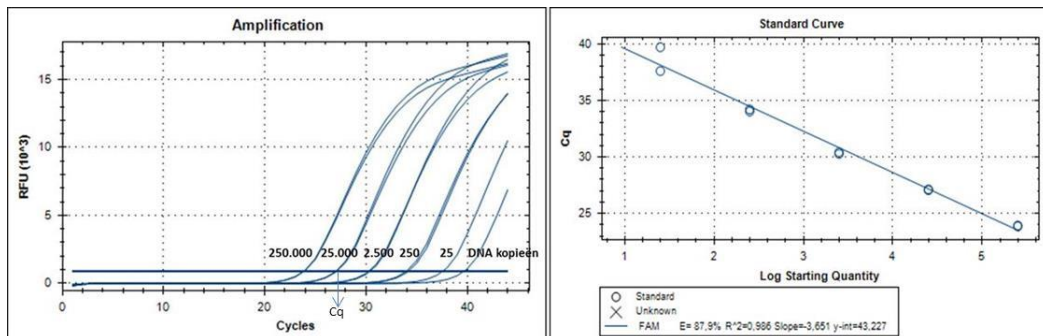
Naar analogie van de methoden die in eerdere projecten zijn ontwikkeld voor het identificeren van fecale verontreinigingen van verschillende diersoorten is in eerste instantie gezocht naar methoden waarmee DNA-merkers van diersoort-specifieke darmbacteriën kunnen worden aangetoond. In 2005 zijn er pogingen gedaan om, op basis van sequenties van het 16S rRNA gen, sequenties te identificeren waarmee eventueel onderscheid gemaakt zou kunnen worden tussen *Bacteroides* bacteriën die specifiek voorkomen bij een groot aantal verschillende diersoorten (20). Maar de sequentieverschillen tussen *Bacteroides* 16S rRNA sequenties van, vooral, honden en mensen bleken te klein om primers te ontwerpen waarmee onderscheid gemaakt zou kunnen worden. De mogelijkheden van een methode welke in 2007 is ontwikkeld (21) waarmee een DNA-merker van hond-specifieke *Bacteroides* bacteriën wordt aangetoond is in meer detail onderzocht. Uit analyse van de toegepaste synthetische DNA moleculen (primers) blijkt dat de specificiteit van deze methode volledig afhankelijk is van één van de toegepaste primers. Voor een hoge specificiteit heeft het de voorkeur om beide primers specifiek te laten zijn. Bij het toepassen van slechts één specifieke primer wordt de kans op kruisreacties groter. Dit is waargenomen bij het testen van de methode op DNA uit feces van verschillende diersoorten (21). De merker wordt niet in alle feces monsters van honden aangetoond (geen merker waargenomen in 37% van de onderzochte monsters) en de merker wel gevonden in feces van een deel van de feces monsters van mensen (22%) en katten (14%). Kruisreacties bij toepassing van deze methoden worden ook gevonden in studies waarin verschillende diergroep specifieke methoden met elkaar worden vergeleken (22). Deze PCR methode is dus beduidend minder specifiek dan de

eerder ontwikkelde methoden voor detectie van diergroep specifieke fecale besmettingen (17). Het is daarom te verwachten dat deze methode niet specifiek genoeg is om betrouwbaar onderscheid te maken tussen fecaal materiaal van honden en fecaal materiaal van andere dieren. Mogelijk dat de ontwikkeling van verbeterde methoden met een verbeterde specificiteit mogelijk is door compleet nieuwe qPCR primers te ontwerpen en te testen. Maar, voor de ontwikkeling van een dergelijke nieuwe methode zal een aanzienlijke investering noodzakelijk zijn en deze ontwikkeling was niet realiseerbaar binnen het budget van dit project. Daarom is toen gezocht naar alternatieve manieren om de aanwezigheid van fecale vervuilingen van honden te kunnen identificeren.

Het detecteren van het DNA uit de cellen van honden in plaats van het DNA uit darmbacteriën van honden vormt een mogelijk alternatief. Een methode waarmee het DNA van hondencellen aangetoond wordt, geeft niet direct informatie over de aanwezigheid van fecaal materiaal van honden. Het gedetecteerde DNA hoeft immers niet per definitie afkomstig te zijn uit de feces van honden maar kan ook afkomstig zijn van bijvoorbeeld huidcellen. Het is echter bekend dat de concentratie dierspecifieke epitheelcellen in de darmen (en dus in de feces) van dieren erg hoog is (23) waardoor het aantonen van dierspecifiek DNA in het milieu wel een sterke (maar indirecte) aanwijzing vormt voor de aanwezigheid van fecaal materiaal van de betreffende diersoort. Bij de methoden voor het aantonen van DNA van dierspecifieke cellen richt men zich op DNA-sequenties van het mitochondriaal-DNA. Mitochondriën komen in grote aantallen voor in elke cel (24, 25) waardoor het relatief eenvoudig is om deze mitochondriale DNA moleculen gevoelig te detecteren. De DNA-sequenties van het mitochondriaal-DNA zijn sterk geconserveerd (weinig variatie) binnen één diersoort en zeer variabel tussen diersoorten. Hierdoor is het mogelijk om selectieve primersequenties te ontwerpen waarmee een mitochondriaal DNA-fragment geamplificeerd en gedetecteerd kan worden wat kenmerkend is voor een bepaalde diersoort. Voor een groot aantal verschillende diersoorten zijn er inmiddels kenmerkende DNA-sequenties geïdentificeerd en zijn er methoden ontwikkeld waarmee het mogelijk is om de bron van fecale verontreinigingen te achterhalen (24, 26). Ook voor specifieke detectie van het mitochondriaal-DNA van honden is er een veelbelovende methode ontwikkeld (19). Bij deze methode wordt er een fragment van de NADH dehydrogenase subunit 5 (ND5) van het mitochondriaal DNA van honden vermenigvuldigd en gedetecteerd. Er is gekozen om de mogelijkheden van deze methode in dit onderzoek verder te onderzoeken.

3.1.2 Optimalisatie van de primersequenties

De primersequenties welke in de publicatie (19) zijn beschreven hebben een lengte van respectievelijk 24 en 27 nucleotiden. Dit is voor qPCR toepassingen vrij lang en het gebruik van lange primers vergroot de kans op kruisreacties met DNA van andere diersoorten. Om de efficiëntie van de qPCR met de beschreven (DogF/DogR) primers (19) te onderzoeken zijn er reacties uitgevoerd op een verdunningsreeks van plasmide-DNA met hierin een deel van het mitochondriale ND5 gen gekloneerd (het DNA dat gebruikt wordt voor het genereren van een ijklijn). Een voorbeeld van de resultaten welke worden verkregen door qPCR reacties uit te voeren op een verdunningsreeks van het plasmide-DNA is weergegeven in figuur 1.



Figuur 1. De amplificatiecurves en standaard curve van qPCR reacties op verdunningen (in duplo) van een fragment van het, in een plasmide gekloneerde, mitochondriaal ND5 fragment van honden met de primers van Caldwell et al. (19) waarbij per qPCR reactie respectievelijk 25, 250, 2500, 25000 en 250000 DNA kopieën zijn toegevoegd.

De amplificatiecurves laten zien dat alle concentraties van het plasmide-DNA detecteerbaar zijn. Het aantal PCR-cycli dat, bij een bepaalde DNA-concentratie, nodig is voor het genereren van een detecteerbaar fluorescentiesignaal (Cq waarde) geeft een globale indruk over de efficiëntie van de PCR. Door de Cq waarden van de verschillende verdunningen uit te zetten tegen de logaritme van de DNA-concentratie wordt een standaard curve verkregen (Figuur 1). De helling (slope) van deze curve wordt vervolgens gebruikt om de efficiëntie (E) van de qPCR reacties te bepalen. De efficiëntie van een qPCR methode waarbij optimaal ontworpen sequenties van de primers worden gebruikt nadert de 100%. Dit betekent dat er een verdubbeling van de concentratie van het gevormde PCR-fragment plaats vindt tijdens elke temperatuur cyclus. Bij het gebruik van de primers zoals die door Caldwell et al. (2009) zijn beschreven is de efficiëntie van de qPCR slechts 87,9%. In afwezigheid van stoffen die PCR-reacties kunnen remmen (dit is het geval bij sterk verdunde suspensies van plasmide-DNA), wil dit zeggen dat er geen verdubbeling plaats vindt van de hoeveelheid DNA tijdens iedere PCR-cyclus. Deze lage efficiëntie kan tot gevolg hebben dat de hoeveelheid fluorescentiesignaal bij lage concentraties DNA onder de detectiegrens blijft waardoor lage concentraties niet kunnen worden gedetecteerd.

Om de kans op kruisreacties met DNA van andere diersoorten te verkleinen en de efficiëntie van de qPCR methode te verhogen zijn er, door gebruik te maken van gespecialiseerde software en een internationale sequentie-database, alternatieve primers ontworpen. Om te onderzoeken of de toepassing van deze alternatieve primers invloed heeft op de efficiëntie van de qPCR zijn de verschillende primersets gebruikt om qPCR reacties uit te voeren op verdunningsreeksen van de plasmide suspensie (met hierin het fragment van het mitochondriaal ND5-gen van honden). De Cq waarden bij elke verdunning en de efficiënties van de qPCR reacties zijn vergeleken. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in tabel 3.

Concentratie→	2,50E+05		2,50E+04		2,50E+03		2,50E+02		2,50E+01		1,25E+01		efficiëntie	
Primers↓	Cq	Gem.	Cq	Gem.	Cq	Gem.	Cq	Gem.	Cq	Gem.	Cq	Gem.	(%)	
DogF/DogR	25,1	25,2	28,4	28,3	31,6	31,6	35,5	35,4	38,9	40,0	40,2	N/A	40,1	87,9
(Caldwell et al.)	25,2		28,3		31,7		35,3		41,0		N/A	40,0		
DogFa/DogR	25,0	25,0	28,2	28,2	31,6	31,5	34,7	34,9	37,8	37,8	38,5	38,5	39,1	103,0
	25,0		28,1		31,5		35,1		37,8		39,4	40,0		
DogFa/DogRa	24,7	24,8	28,0	28,0	31,4	31,4	34,7	34,8	38,7	38,3	38,7	39,0	38,5	99,7
	24,8		27,9		31,4		34,9		37,9		38,2	38,0		
DogFb/DogR	25,0	25,0	28,2	28,2	31,5	31,6	35,2	35,3	38,2	38,0	N/A	39,8	40,0	100,3
	25,0		28,2		31,6		35,4		37,7		41,0	39,1		
DogFk/DogRk	24,9	25,0	28,1	28,1	31,3	31,3	35,1	35,0	38,0	37,6	39,8	39,1	39,0	103,8
	25,0		28,1		31,4		34,9		37,2		39,7	37,3		

Tabel 3. Cq waarden bij het uitvoeren van qPCR reacties, uitgevoerd met verschillende primerparen, op DNA-verdunningen met bekende concentraties en de efficiëntie van de qPCR reacties (laatste kolom).

Uit de, in tabel 3 samengevatte resultaten is duidelijk op te maken dat het gebruik van de primers DogF/DogR (zoals toegepast door Caldwell et al.) zorgt voor minder efficiënte qPCR reacties: de Cq waarden zijn vooral bij lagere concentraties hoger, de efficiëntie is lager (87,9% tegen respectievelijk 103,0; 99,7; 100,3 en 103,8 %) en de verdunning met de laagste concentratie (van 12,5 DNA-kopieën/reactie) wordt slechts in 2 van de 4 reacties gedetecteerd. De resultaten van de andere vier primersets zijn zeer vergelijkbaar en op basis van dit experiment is er geen voorkeur voor één van de vier primersets. Op basis van analyse met specialistische software is te verwachten dat de kans op kruisreacties met het DNA van andere diersoorten het kleinst is door toepassing van het primerpaar DogFk/DogRk. Daarom is gekozen om in dit primerpaar toe te passen bij de volgende onderzoek stappen.

3.1.3 De specificiteit en sensitiviteit van de hond-specifieke methode

Voor betrouwbare toepassing in praktijksituaties dienen methoden waarmee de herkomst van fecale verontreinigingen kunnen worden aangetoond een hoge 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?) te hebben.

○ 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 honden dat positief is bij het uitvoeren van een qPCR waarmee DNA uit cellen van honden wordt 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:

$$\text{Sensitiviteit} = \frac{\text{Aantal: echt positieve reacties}}{\text{Aantal: echt positieve reacties} + \text{het aantal vals negatieve reacties}} \times 100\%$$

o 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 DNA van honden wordt 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:

$$\text{Specificiteit} = \frac{\text{Aantal: echt negatieve reacties}}{\text{Aantal: echt negatieve reacties} + \text{vals positieve reacties}} \times 100\%$$

De sensitiviteit van de hond-specifieke methode is bepaald door qPCR reacties uit te voeren op het DNA geïsoleerd uit de feces van 45 verschillende honden en de specificiteit van de methode is bepaald door de hond-specifieke qPCR methode uit te voeren op DNA uit feces van honden (n=45), katten (n=20), herten en reeën (n=111), mensen (n=80), runderen (n=63), schapen (n=74) en watervogels (n=138). De resultaten van deze analyses zijn samengevat in tabel 4.

Merker→ Monsters↓	n	Honden merker	
		n (%)	Conc. kopieën/g
Hond	45	45 (100)	8,4E+08
Kat	20	6 (30,0)	5,0E+04
Herten en reeën	112	0 (0,0)	0
Mensen	80	0 (0,0)	0
Runderen	63	4 (6,3)	4,9E+00
Schapen	74	0 (0,0)	0
Vogels	138	0 (0,0)	0
Aantal monsters	531		
Specificiteit		98,0	
Sensitiviteit	45/45	100	

Tabel 4. Het voorkomen en de concentratie van de DNA-merker voor honden in de feces van verschillende diersoorten. Het percentage van de fecesmonsters waarin de hond-specifieke merkers worden aangetoond en de concentratie van de merkers in de feces is weergegeven.

De belangrijkste conclusies over DNA-merkers in feces van honden zijn als volgt samen te vatten:

Voorkomen van DNA-merkers in feces:

- o De hond-specifieke DNA merker is aangetoond in alle onderzochte fecesmonsters van honden.
- o De hond-specifieke DNA merker is niet aangetoond in alle onderzochte fecesmonsters van mensen, schapen, herten/reeën en vogels.
- o De hond-specifieke DNA merker wordt aangetoond in 30% van de fecesmonsters van katten en in 6% van de fecesmonsters van runderen. De gemeten concentraties merker zijn in deze fecesmonsters zeer laag (resp.

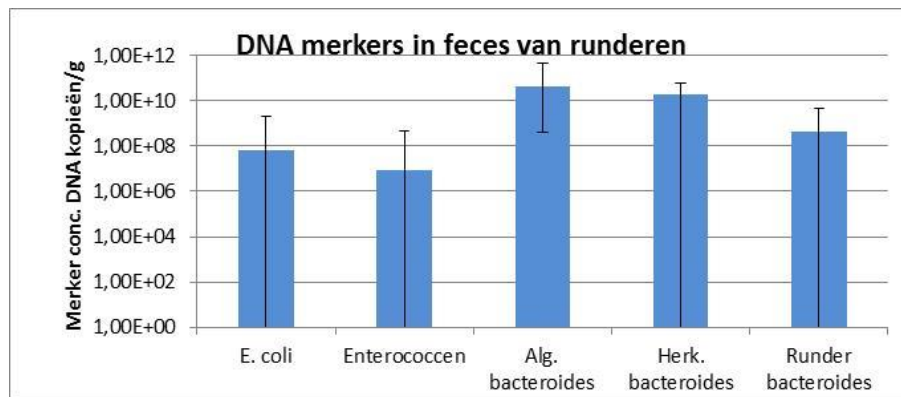
5.0^E+04 en 4.9^E+00 DNA kopieën/g feces) ten opzichte van de gemiddelde merkerconcentratie in feces van honden (8,4^E+08 DNA kopieën/g feces)

3.2 Fecale merkers in feces van verschillende dieren

Om beter inzicht te krijgen in de eigenschappen, toepassingmogelijkheden en beperkingen van de diverse fecale DNA-merkers, is kennis over het voorkomen en de concentratie in feces van verschillende diersoorten van belang. In het onderzoek van 2012/2013 (7) is het voorkomen van mens-, herkauwer-, rund-, varken- en vogelspecifieke fecale merkers in de feces van verschillende diergroepen onderzocht. Dit onderzoek maakte duidelijk dat de merkers in hoge concentratie voorkomen in de feces van de diergroepen waarvoor de merkers bedoeld zijn. Om duidelijk te krijgen in welke situaties te verwachten is dat dierspecifieke DNA-merkers bruikbaar kunnen zijn voor het identificeren van de herkomst van fecale besmettingen is het van belang om een goed beeld te hebben van de merkerconcentraties in feces en de relatie met de concentratie *E. coli* en enterococcen. In dit onderzoek zijn daarom de concentraties DNA-merkers voor de indicatorbacteriën *E. coli* en enterococcen bepaald in de feces van verschillende diersoorten en vergeleken met de concentraties diergroep-specifieke merkers.

3.2.1 Fecale merkers in de feces van runderen

De concentratie fecale DNA-merkers in de feces van runderen is bepaald door qPCR analyses uit te voeren op DNA van 59 fecesmonsters. De fecesmonsters zijn afkomstig van runderen welke verblijven in het duingebied van de Amsterdamse waterleidingduinen. De gemiddelde merkerconcentraties zijn weergegeven in figuur 2 en tabel 5 geeft een beeld van de verhouding tussen de concentraties van de verschillende DNA merkers. Voor het berekenen van de gemiddelde merkerconcentraties zijn de monsters waarin geen merkers zijn gedetecteerd meegenomen (met waarde 0).

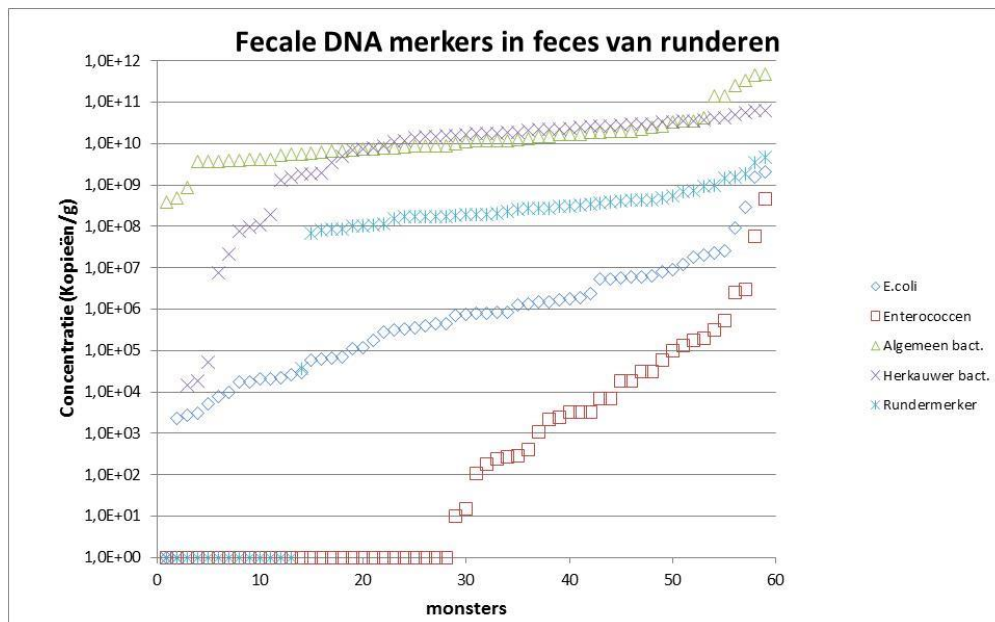


Figuur 2. De gemiddelde concentratie DNA-merkers in de feces van runderen. De error bars geven de spreiding tussen de hoogste en de laagste meetwaarde weer.

Verhoudingen			Alg.	Herk.	Runder
	E.coli	Enterococ	Bacteroides	Bacteroides	Bacteroides
E.coli	1	8	0,002	0,002	0,2
Enterococ	0,1	1	0,0002	0,0002	0,02
Alg. Bacteroides	600	4615	1	2	98
Herk. Bacteroides	257	1978	0,4	1	42
Runder Bacteroides	6	47	0,01	0,02	1

Tabel 5. De verhouding tussen de verschillende merkerconcentraties in de feces van runderen

De gemiddelde concentraties (figuur 2) laten zien dat de concentraties van de DNA merker voor enterococcen het laagst is, de merkerconcentratie voor *E. coli* is gemiddeld een factor 8 hoger (tabel 5) en de concentratie DNA-merker voor “algemene bacteroides”, “herkauwer-specifieke bacteroides” en “rund-specifieke bacteroides” zijn nog hoger (resp. een factor 4615, 1978 en 47).



Figuur 3. Overzicht van de concentraties fecale DNA-merkers in 59 fecesmonsters van runderen (in DNA kopieën/g feces). De concentratie DNA-merkers in de fecesmonsters (y-as) is afgezet tegen aantal onderzochte monsters (x-as) waarbij de concentratie van de betreffende merker in de monsters van links naar rechts toeneemt.

In figuur 3 is een overzicht gegeven van de concentraties fecale DNA merkers in fecesmonsters van runderen. De figuur geeft een beeld van de spreiding van de concentraties in de fecesmonsters en maakt duidelijk dat de DNA merkers voor “algemene bacteroides”, “herkauwer-specifieke bacteroides” en *E. coli* in een zeer groot deel van de onderzochte fecesmonsters voorkomen. De “rund-specifieke” DNA-merker en de DNA merker specifiek voor enterococcen wordt in een relatief groot deel van de fecesmonsters niet aangetoond (resp. in 20 en 47% van de monsters).

De belangrijkste conclusies over DNA-merkers in feces van runderen zijn als volgt samen te vatten:

Voorkomen van DNA-merkers in feces van runderen:

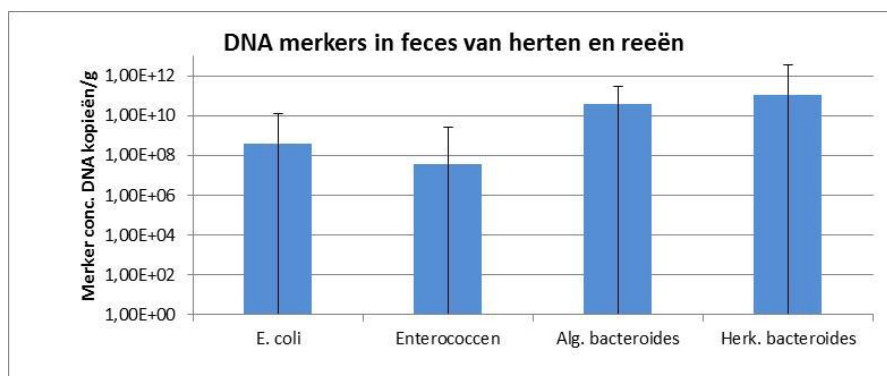
- De herkauwer-specifieke DNA merker komt zeer algemeen voor (ca. 97%) in fecesmonsters van runderen.
- DNA van *E. coli* komt eveneens zeer algemeen voor in fecesmonsters van runderen (ca. 98%).
- DNA van enterococci wordt in slechts ca. 53% van de fecesmonsters van runderen aangetoond.
- De rund-specifieke DNA merker wordt aangetoond in 80% van de fecesmonsters van runderen.

Gemiddelde concentraties van DNA-merkers in de feces van runderen:

- De gemiddelde concentratie rund-specifieke DNA merker is een factor 47 hoger dan de gemiddelde concentratie DNA merker voor enterococci en een factor 6 hoger dan de gemiddelde concentratie DNA-merker voor *E. coli*.
- De gemiddelde concentratie rund-specifieke DNA merker is 42x lager dan de concentratie gemiddelde herkauwer-specifieke DNA merker.
- De gemiddelde concentratie van de herkauwer-specifieke DNA merker is hoger dan de gemiddelde concentratie DNA van *E. coli* en de concentratie DNA van enterococci in fecesmonsters van runderen
 - De concentratie DNA-merker voor *E. coli* is gemiddeld een factor 257 lager
 - De concentratie DNA-merker voor enterococci is gemiddeld een factor 1978 lager

3.2.2 Fecale merkers in feces van herten en reeën

De concentratie fecale merkers in de feces van herten en reeën is bepaald door qPCR analyses uit te voeren op DNA van 111 fecesmonsters. Deze fecesmonsters zijn afkomstig van herten en reeën welke verblijven in het duingebied van de Amsterdamse waterleidingduinen. De gemiddelde merkerconcentraties zijn weergegeven in figuur 4 en tabel 6 geeft een beeld van de verhouding tussen de concentraties van de verschillende DNA merkers. Voor het berekenen van de gemiddelde merkerconcentraties zijn de monsters waarin geen merkers zijn gedetecteerd meegenomen (met waarde 0).

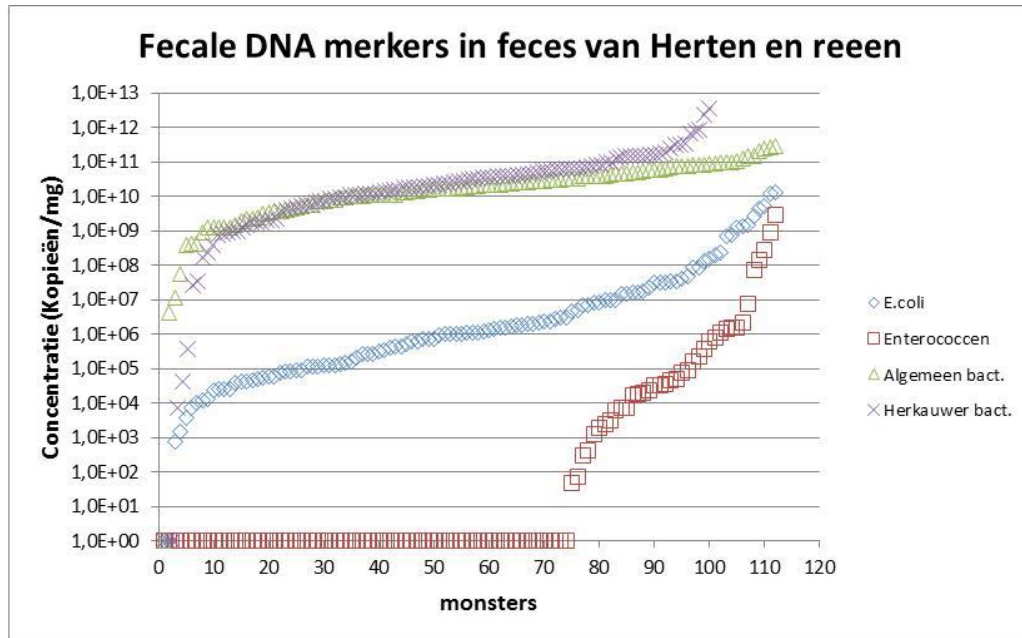


Figuur 4. De gemiddelde concentratie DNA-merkers in de feces van herten en reeën. De error bars geven de spreiding tussen de hoogste en de laagste meetwaarde weer.

Verhoudingen			Alg.	Herk.
	E.coli	Enterococ	Bacteroides	Bacteroides
E.coli	1	10	0,01	0,003
Enterococ	0,1	1	0,001	0,0003
Alg. Bacteroides	97	1003	1	0,3
Herk. Bacteroides	301	3121	3	1

Tabel 6. De verhouding tussen de verschillende merkerconcentraties in de feces van herten en reeën.

De gemiddelde concentraties (figuur 4) laten zien dat de concentraties van de DNA merker voor enterococchen het laagst is, de merkerconcentratie voor *E. coli* is een factor 10 hoger (tabel 6) en de concentratie DNA-merker voor “algemene bacteroides” en “herkauwer-specifieke bacteroides” zijn nog hoger (resp. een factor 1003, 3121).



Figuur 5. Overzicht van de concentraties fecale DNA-merkers (DNA kopieën/g feces) in 112 fecesmonsters van herten en reeën. De concentratie DNA-merkers in de fecesmonsters (y-as) is afgezet tegen aantal onderzochte monsters (x-as) waarbij de concentratie van de betreffende merker in de monsters van links naar rechts toeneemt.

In figuur 5 is een overzicht gegeven van de concentraties fecale DNA merkers in fecesmonsters van herten en reeën. De figuur geeft een beeld van de spreiding van de concentraties in de fecesmonsters en maakt duidelijk dat de DNA merkers voor “algemene bacteroides”, “herkauwer-specifieke bacteroides” en *E. coli* in een zeer groot deel van de onderzochte fecesmonsters voorkomen. De DNA merker specifiek voor enterococchen wordt in een relatief groot deel van de fecesmonsters niet aangetoond (66% van de monsters).

De belangrijkste conclusies over DNA-merkers in feces van herten en reeën zijn als volgt samen te vatten:

Voorkomen van DNA-merkers in feces van herten en reeën:

- De herkauwer-specifieke DNA merker komt zeer algemeen voor (ca. 98%) in fecesmonsters van herten en reeën.
- DNA van *E. coli* komt eveneens zeer algemeen voor in fecesmonsters van herten en reeën (ca. 98%)
- DNA van enterococchen wordt in slechts ca. 34% van de fecesmonsters van herten en reeën aangetoond

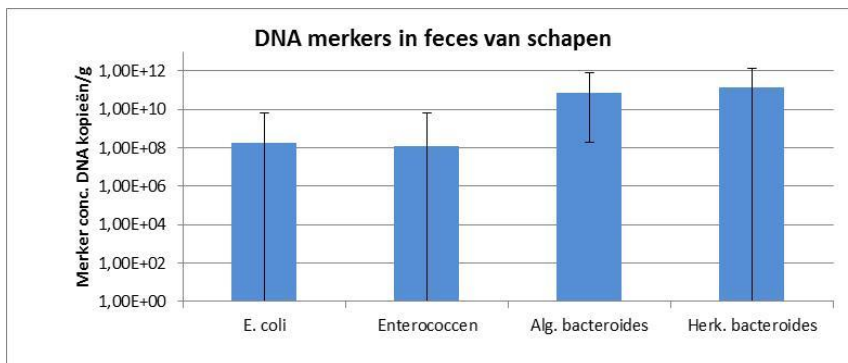
Gemiddelde concentraties van DNA-merkers in feces van herten en reeën:

- De gemiddelde concentratie van de herkauwer-specifieke DNA merker is hoger dan de concentratie DNA van *E. coli* en de concentratie DNA van enterococchen in fecesmonsters van herten en reeën
 - De concentratie DNA van *E. coli* is gemiddeld ca. een factor 301 lager

- De concentratie DNA van enterococcen is gemiddeld ca. een factor 3121 lager

3.2.3 Fecale merkers in feces van schapen

De concentratie fecale merkers in de feces van schapen is bepaald door qPCR analyses uit te voeren op DNA van 74 fecesmonsters. Deze fecesmonsters zijn afkomstig van schapen welke verblijven in het duingebied van de Amsterdamse waterleidingduinen. De gemiddelde merkerconcentraties zijn weergegeven in figuur 6 en tabel 7 geeft een beeld van de verhouding tussen de concentraties van de verschillende DNA merkers. Voor het berekenen van de gemiddelde merkerconcentraties zijn de monsters waarin geen merkers zijn gedetecteerd meegenomen (met waarde 0).

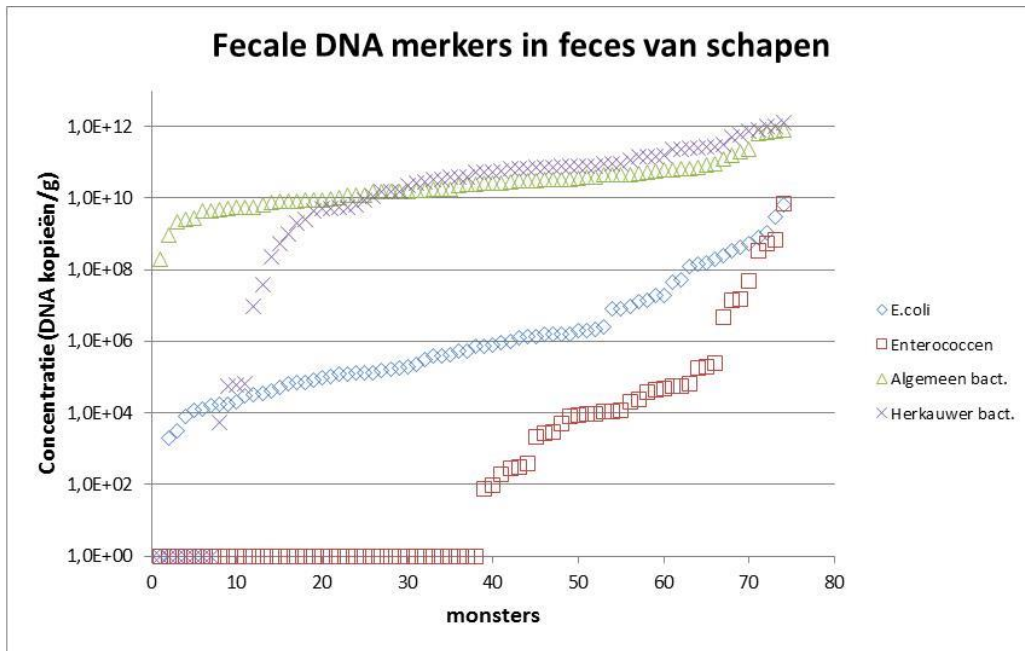


Figuur 6. De gemiddelde concentratie DNA-merkers in de feces van schapen. De error bars geven de spreiding tussen de hoogste en de laagste meetwaarde weer.

Verhoudingen	Verhoudingen			
	E.coli	Enterococ	Alg. Bacteroides	Herk. Bacteroides
E.coli	1	2	0,003	0,001
Enterococ	0,6	1	0,002	0,0008
Alg. Bacteroides	394	631	1	0,5
Herk. Bacteroides	754	1206	2	1

Tabel 7. De verhouding tussen de verschillende merkerconcentraties in de feces van schapen

De gemiddelde concentraties (figuur 6) laten zien dat de concentraties van de DNA merker voor enterococcen, ook in de feces van schapen, het laagst is, de merkerconcentratie voor *E. coli* is een factor 2 hoger (tabel 7) en de concentratie DNA-merker voor “algemene bacteroides” en “herkauwer-specifieke bacteroides” zijn nog hoger (resp. een factor 631, 1206).



Figuur 7. Overzicht van de spreiding van de concentraties fecale DNA-merkers (DNA kopieën/g feces) in 74 fecesmonsters van schapen. De concentratie DNA-merkers in de fecesmonsters (y-as) is afgezet tegen aantal onderzochte monsters (x-as) waarbij de concentratie van de betreffende merker in de monsters van links naar rechts toeneemt.

In figuur 7 is een overzicht gegeven van de concentraties fecale DNA merkers in fecesmonsters van schapen. De figuur geeft een beeld van de spreiding van de concentraties in de fecesmonsters en maakt duidelijk dat de DNA merkers voor “algemene bacteroides”, “herkauwer-specifieke bacteroides” en *E. coli* in een zeer groot deel van de onderzochte fecesmonsters voorkomen. De DNA merker specifiek voor enterococcen wordt in een relatief groot deel van de fecesmonsters niet aangetoond (51% van de monsters).

De belangrijkste resultaten van merkeranalyses in de feces van schapen zijn als volgt samen te vatten:

Voorkomen van DNA-merkers in feces van schapen:

- De herkauwer-specifieke DNA merker komt zeer algemeen voor (ca. 91%) in fecesmonsters van schapen.
- DNA van *E. coli* komt eveneens zeer algemeen voor in fecesmonsters van schapen (ca. 99%)
- DNA van enterococcen wordt in slechts ca. 49% van de fecesmonsters van schapen aangetoond

Gemiddelde concentraties van DNA-merkers in feces van schapen:

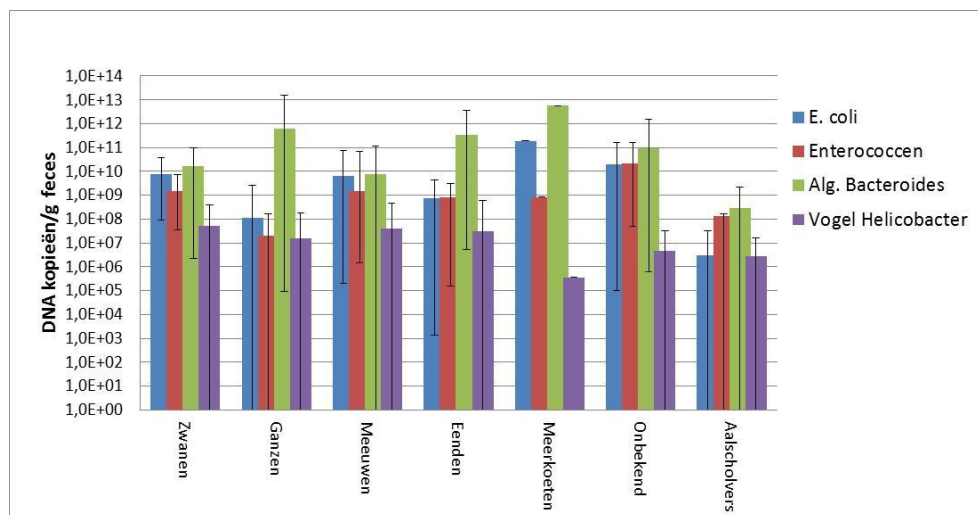
- De gemiddelde concentratie van de herkauwer-specifieke DNA merker is hoger dan de concentratie DNA van *E. coli* en de concentratie DNA van enterococcen in fecesmonsters van schapen.
 - De concentratie herkauwer-specifieke DNA-merker is gemiddeld ca. een factor 754 hoger dan de *E. coli* specifieke merkerconcentratie
 - De concentratie herkauwer-specifieke DNA-merker is gemiddeld ca. een factor 1206 hoger dan de enterococcen specifieke merkerconcentratie

3.2.4 Fecale merkers in de feces van vogels

De concentratie fecale merkers in de feces van vogels is bepaald door qPCR analyses uit te voeren op DNA van 124 fecesmonsters (niet van alle 138 monsters genoemd tabel 4 was nog DNA beschikbaar). Deze fecesmonsters zijn in 2013 verzameld t.b.v. onderzoek waarin de specificiteit van de vogel-specifieke methode is onderzocht, dit onderzoek is (gedeeltelijk) uitgevoerd in opdracht van Rijkswaterstaat (2). De fecesmonsters zijn afkomstig van vogels uit natuurgebieden en vogelasiel. De "vogel-specifieke" en "algemene bacteroides" qPCR analyses maakten deel uit van het onderzoek i.o.v. Rijkswaterstaat, de qPCR analyses voor het bepalen van de concentraties DNA van *E. coli* en enterococci zijn onderdeel van dit BTO-onderzoek. De resultaten van beide onderzoeken zijn in dit rapport samengevoegd. Het percentage vogels waarin de merkers zijn aangetoond zijn weergegeven in tabel 8 en de gemiddelde merkerconcentraties in feces van verschillende vogelfamilies zijn weergegeven in tabel 8 en figuur 8. Voor het berekenen van de gemiddelde merkerconcentraties zijn de monsters waarin geen merkers zijn gedetecteerd meegenomen (met waarde 0).

qPCR merkers in feces van vogels	Zwaan (n=16)	Gans (n=28)	Meeuw (n=20)	Eend (n=30)	Aalscholver (n=13)	Onbekend (n=16)	Meerkoet (n=1)	Gemiddeld (n=124)
E. coli	7,40E+09	1,20E+08	6,50E+09	7,70E+08	3,00E+06	1,90E+10	1,90E+11	4,57E+09
%	100	68	100	100	62	100	100	89
Enterococ	1,50E+09	2,00E+07	1,50E+09	8,40E+08	1,40E+08	2,20E+10	8,20E+08	3,61E+09
%	100	96	100	100	62	100	100	95
Algemeen	1,70E+10	6,01E+11	7,40E+09	3,30E+11	2,90E+08	9,50E+10	5,54E+12	2,42E+11
%	100	100	90	100	92	100	100	98
Vogel	5,00E+07	1,60E+07	4,00E+07	3,20E+07	2,80E+06	4,70E+06	3,60E+05	2,43E+07
%	81	93	80	93	92	88	100	89

Tabel 8. De gemiddelde concentratie (in DNA kopieën/g feces) DNA-merkers, specifiek voor *E. coli*, enterococci, "algemene bacteroides" en vogel-specifieke helicobacter in feces van verschillende vogelfamilies en het percentage (%) van de onderzochte monsters waarin de merker is aangetoond.



Figuur 8. De gemiddelde concentratie DNA-merkers (DNA kopieën/g feces) in de feces van verschillende vogelfamilies. De error bars geven de spreiding tussen de hoogste en de laagste meetwaarde weer.

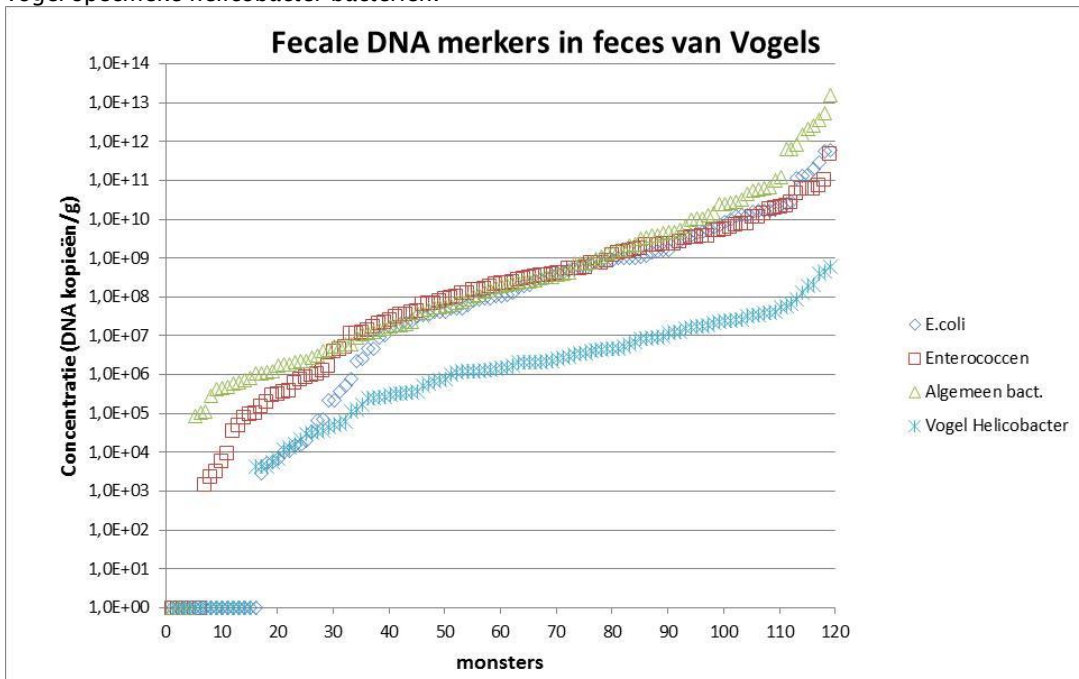
Bovenstaande resultaten laten zien dat DNA-merkers voor *E. coli* in vrijwel alle fecesmonsters (89%) van verschillen vogelfamilies in hoge concentraties aanwezig zijn (gemiddeld 4,6E+09 DNA kopieën/g feces), alleen in fecesmonsters van ganzen en aalscholvers zijn de concentraties lager (resp. 1,2E+08 en 3,0E+06 DNA kopieën/g feces) en

worden er in een beperkt aantal monsters geen *E. coli* specifieke merkers aangetoond (resp. 32% en 38%). Ook de enterococci-specifieke DNA merker wordt in vrijwel alle monsters (95%) in hoge concentraties aangetoond (gemiddeld $3,6E+09$ DNA kopieën/g feces), alleen in 38% van de monsters van aalscholvers en 4% van de monsters van ganzen worden geen enterococci-specifieke merkers aangetoond. De "algemene bacteroides" merker wordt in vrijwel alle fecesmonsters (98%) van alle vogelfamilies in hoge concentraties aangetoond en ontbreekt slecht in 10% van de monsters van meeuwen en 8% van de monsters van aalscholvers. De concentratie van de vogel-specifieke helicobacter merker is gemiddeld aanmerkelijk lager (gemiddeld $2,4E+07$ DNA kopieën/g feces) dan de concentratie van de andere merkers en ontbreekt in een beperkt deel van de fecesmonsters (11%). Vooral in de feces van zwanen en meeuwen wordt de merker in een relatief groot deel van de monsters niet aangetoond (resp. 19 en 20%).

Verhoudingen				
	E.coli	Enterococ	Alg. Bacteroides	Vogel Helicobacter
E.coli	1	1	0,02	188
Enterococ	0,8	1	0,01	149
Alg. Bacteroides	53	53	1	9934
Vogel Helicobacter	0,005	0,007	0,0001	1

Tabel 9. De verhouding tussen de verschillende merkerconcentraties in de feces van vogels

De gemiddelde merkerconcentraties in alle onderzochte vogelfamilies (tabel 8, laatste kolom) laten zien dat de concentraties van de DNA merker voor Vogel-specifieke helicobacter bacteriën, in de feces van vogels het laagst is. In tabel 9 zijn de verhoudingen tussen de gemiddelde merkerconcentraties in de feces van vogels weergegeven. Hieruit wordt duidelijk dat de merkerconcentraties voor DNA van enterococci en *E. coli* en "algemene" bacteroides aanzienlijk hoger zijn (resp. een factor 149, 188 en 9934) dan de merkerconcentratie voor vogel-specifieke helicobacter bacteriën.



Figuur 9. Overzicht van de concentraties fecale DNA-merkers (DNA kopieën/g feces) in 119 fecesmonsters van vogels. De concentratie DNA-merkers in de fecesmonsters (y-as) is afgezet tegen aantal onderzochte monsters (x-as) waarbij de concentratie van de betreffende merker in de monsters van links naar rechts toeneemt.

In figuur 9 is een overzicht gegeven van de concentraties fecale DNA merkers in fecesmonsters van vogels. De figuur geeft een beeld van de spreiding van de concentraties in de fecesmonsters en maakt duidelijk dat de DNA merkers voor "algemene bacteroides", enterococci en *E. coli* in een zeer groot deel van de onderzochte fecesmonsters voorkomen. De DNA merker specifiek voor vogel-specifieke helicobacter bacteriën wordt in 11% van de fecesmonsters niet aangetoond.

De belangrijkste resultaten van merkeranalyses in de feces van vogels zijn als volgt samen te vatten:

Voorkomen van DNA-merkers in feces van vogels:

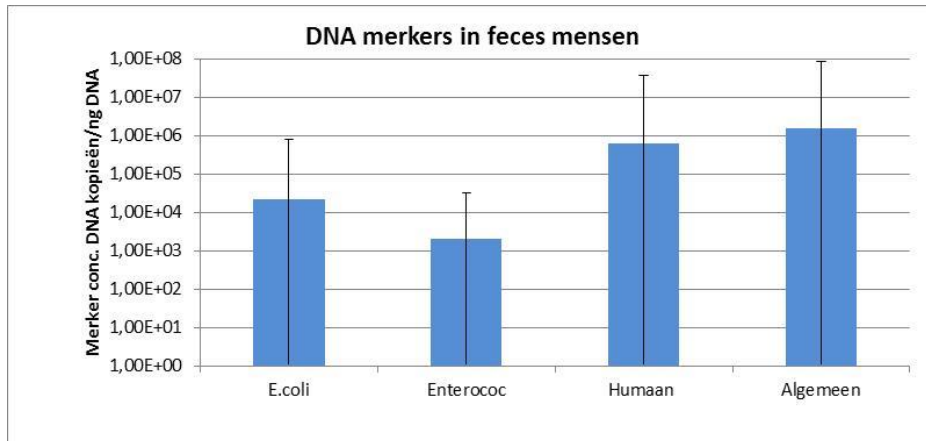
- De *E. coli*-, enterococci- en "algemene bacteroides"-specifieke DNA merker komt zeer algemeen voor in fecesmonsters van vogels (resp. 89, 95 en 98%).
 - De *E. coli* specifieke DNA-merker komt minder algemeen voor in feces van ganzen (68%) en feces van aalscholvers (62%).
 - De enterococci-specifieke DNA-merker komt minder algemeen voor in feces van aalscholvers (62%).
- De DNA merker voor vogel-specifieke helicobacter bacteriën komt minder algemeen voor in feces van vogels: gemiddeld ca. 89%.
 - Deze merker wordt niet aangetoond in een relatief groot deel van de fecesmonsters van zwanen (19%) en meeuwen (20%).

Gemiddelde concentraties van DNA-merkers in feces van vogels:

- De gemiddelde concentratie van de DNA-merker voor vogel-specifieke helicobacter bacteriën is lager dan de concentratie van de DNA-merkers voor *E. coli*, enterococci en "algemene bacteroides" in fecesmonsters van vogels.
 - De concentratie *E. coli* specifieke merker is gemiddeld een factor 188 hoger dan de merkerconcentratie voor vogel-specifieke helicobacter bacteriën.
 - De concentratie enterococci specifieke merker is gemiddeld een factor 149 hoger dan de merkerconcentratie voor vogel-specifieke helicobacter bacteriën.
 - De concentratie merker voor "algemene bacteroides" is gemiddeld een factor 9934 hoger dan de merkerconcentratie voor vogel-specifieke helicobacter bacteriën

3.2.5 Fecale merkers in feces van mensen

De concentratie DNA-merkers in de feces van mensen is bepaald op DNA-monsters afkomstig van het Anthonius ziekenhuis in Nieuwegein. De DNA-extracties zijn door het laboratorium van het ziekenhuis uitgevoerd op variabele en onbekende hoeveelheden feces waarbij ook niet bekend is wat de opbrengst van de extractieprocedure is geweest. Door gebruik te maken van een aantal aannames (schatting van de hoeveelheid feces en de opbrengst van de extractie) is in het rapport van 2013 (1) wel een schatting gemaakt van de merkerconcentraties in feces. Om een beeld te krijgen van de verhouding tussen de concentratie merkers voor bacteroides en merkers voor *E. coli* en enterococci zijn op deze DNA-monsters *E. coli* en enterococci qPCR analyses uitgevoerd op bekende hoeveelheden fecaal DNA en zijn de merkerconcentraties weergegeven in DNA kopieën per ng fecaal DNA (figuur 10). Deze concentraties zijn bruikbaar om de verhoudingen tussen de concentraties van de verschillende merkers in humane feces te vergelijken maar kunnen niet worden gebruikt om de merkerconcentraties te vergelijken met concentraties in de feces van andere diergroepen (zoals hierboven weergegeven in DNA kopieën/g feces).

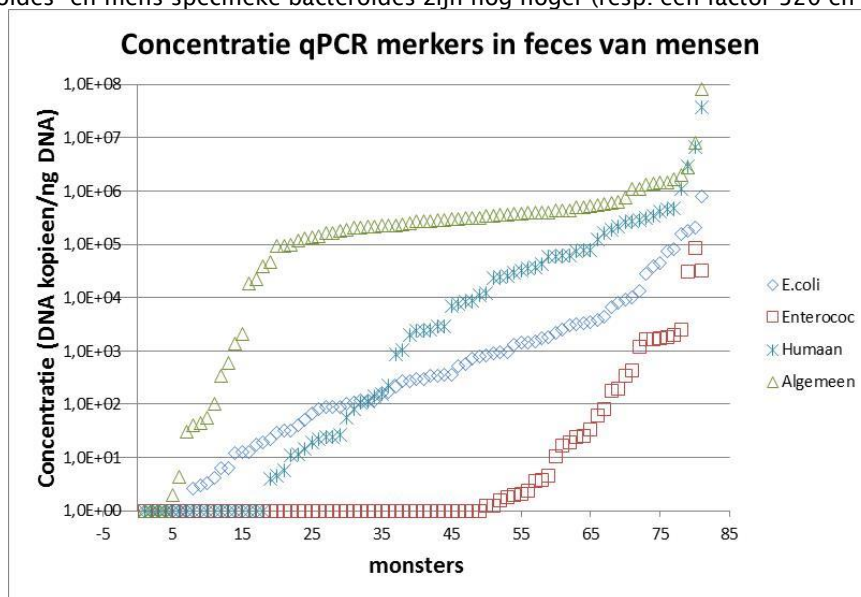


Figuur 10. De gemiddelde concentratie DNA-merkers in DNA geïsoleerd uit de feces van mensen (DNA kopieën/ng DNA). De error bars geven de spreiding tussen de hoogste en de laagste meetwaarde weer.

Verhoudingen	E.coli	Enterococ	Alg.	Humane
	E.coli	Enterococ	Bacteroides	Bacteroides
E.coli	1	11	0,03	0,01
Enterococ	0,1	1	0,003	0,001
Alg. Bacteroides	30	320	1	0,4
Humane Bacteroides	71	750	2	1

Tabel 10. De verhouding tussen de verschillende merkerconcentraties in de feces van mensen

De gemiddelde concentraties (figuur 10) laten zien dat de concentraties van de DNA-merker voor enterococceën, ook in de feces van mensen, het laagst is, de merkerconcentratie voor *E. coli* is een factor 11 hoger (tabel 10) en de concentratie DNA-merker voor “algemene bacteroides” en mens-specifieke bacteroides zijn nog hoger (resp. een factor 320 en 750).



Figuur 11. Overzicht van de concentraties fecale DNA-merkers (DNA kopieën/ng fecaal DNA) in 81 fecesmonsters van mensen. De concentratie DNA-merkers in de fecesmonsters (y-as) is afgezet tegen aantal onderzochte monsters (x-as) waarbij de concentratie van de betreffende merker in de monsters van links naar rechts toeneemt.

In figuur 11 is een overzicht gegeven van de concentraties fecale DNA merkers in fecesmonsters van mensen. De figuur geeft een beeld van de spreiding van de concentraties in de fecesmonsters en maakt duidelijk dat de DNA merkers voor “algemene bacteroides”, mens-specifieke bacteroides en *E. coli* in een zeer groot deel van de onderzochte fecesmonsters voorkomen. De DNA merker specifiek voor enterococcen wordt in 51% van de fecesmonsters van mensen niet aangetoond.

De belangrijkste resultaten van merkeranalyses in de feces van mensen zijn als volgt samen te vatten:

Voorkomen van DNA-merkers in feces van mensen:

- De *E. coli*-, “algemene bacteroides”- en mens-specifieke DNA merker komt zeer algemeen voor in fecesmonsters van mensen (resp. 91, 95 en 78%).
 - De enterococcen specifieke DNA-merker komt minder algemeen voor in feces van mensen: 60%

Gemiddelde concentraties van DNA-merkers in feces van mensen:

- De gemiddelde concentratie van de DNA-merker voor mens-specifieke bacteroides bacteriën is hoger dan de concentratie van de DNA-merkers voor *E. coli*, enterococcen en “algemene bacteroides” in fecesmonsters van mensen.
 - De concentratie mens-specifieke fecale DNA-merker is gemiddeld een factor 71 hoger dan de merkerconcentratie *E. coli*.
 - De concentratie mens-specifieke fecale DNA-merker is gemiddeld een factor 750 hoger dan de concentratie DNA-merker voor enterococcen.
 - De mens-specifieke fecale DNA-merker is gemiddeld een factor 2 hoger dan de merkerconcentratie voor “algemene bacteroides”.

3.3 Stabiliteit van DNA-merkers en kweekbare *E. coli* in water

Het is te verwachten dat DNA-merkers die gebruikt kunnen worden voor het detecteren en identificeren fecale verontreinigingen andere eigenschappen bezitten dan de, met kweektechnieken aangetoonde, traditionele indicatororganismen (*E. coli* en enterococcen). qPCR analyses voor het zijn immers fundamenteel anders dan analyses met kweekmethoden:

- Bij het detecteren van DNA-merkers met qPCR worden DNA moleculen aangetoond afkomstig van, op een membraanfilter geconcentreerde, cellen.
- Bij het toepassen van kweektechnieken zullen alleen de bacteriën worden gedetecteerd die op een membraanfilter geconcentreerd worden en in staat zijn een kolonie te vormen op een voedingsbodem.

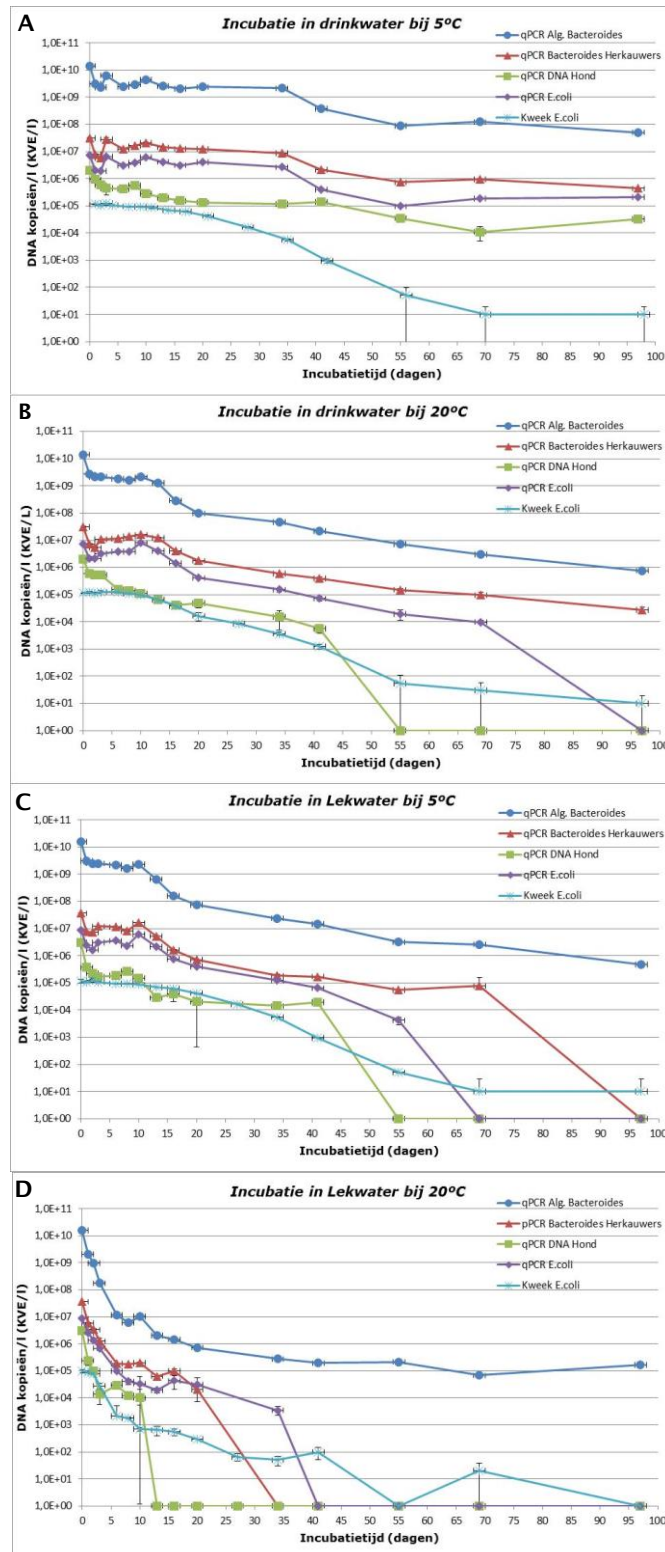
Het is te verwachten dat het DNA afkomstig van cellen die niet in staat zijn om een kolonie te vormen (“dode”, of “levende maar niet kweekbare”) nog aantoonbaar zal zijn waardoor met qPCR mogelijk ook oudere fecale verontreiniging nog kunnen worden aangetoond. Om een goede interpretatie van qPCR analyses mogelijk te maken is het noodzakelijk om meer kennis te genereren over de stabiliteit van DNA-merkers in drink- en oppervlaktewater en het verschil met de stabiliteit van indicatorbacteriën die met kweektechnieken worden aangetoond. Daarom zijn er incubatie experimenten uitgevoerd waarbij watermonsters (drinkwater en oppervlaktewater uit het Lekkanaal) zijn besmet met een fecesmengsel afkomstig van honden en runderen. De monsters zijn vervolgens gedurende 96 dagen geïncubeerd bij een temperatuur van 5°C en 20 °C. Tijdens de incubatieperiode zijn er periodiek analyses uitgevoerd op deelmonsters met kweek (*E. coli* en enterococcen) en qPCR (DNA merkers van: honden, fecale bacteriën van herkauwers, *E. coli* en enterococcen). Deze analyses geven informatie over de stabiliteit van kweekbare *E. coli* en enterococcen en verschillende typen DNA-merkers (met mogelijk verschillende eigenschappen):

- DNA-merkers afkomstig uit dierlijke (Honden) cellen.
- DNA-merkers afkomstig van gram positieve aerobe darmbacteriën (enterococcen).

- DNA-merkers afkomstig van aerobe gram negatieve darmbacteriën (*E. coli*).
- DNA-merkers afkomstig van gram negatieve anaerobe darmbacteriën (bacteroidales).

De kweek- en qPCR analyses lieten aan het begin van het experiment zien dat er in de suspensie met hondenfeces zeer lage concentraties enterococci aanwezig waren en dat in de suspensie met runderfeces geen enterococci aantoonbaar waren. Vanwege deze lage concentraties bleek het niet mogelijk om de stabiliteit van kweekbare enterococci en DNA-merkers voor enterococci te bepalen.

In figuur 12 is het verloop van de concentratie (10log) van de verschillende DNA-merkers en kweekbare *E. coli* uitgezet in de tijd tijdens incubatie in drink- en Lekwater bij 5°C en 20°C.

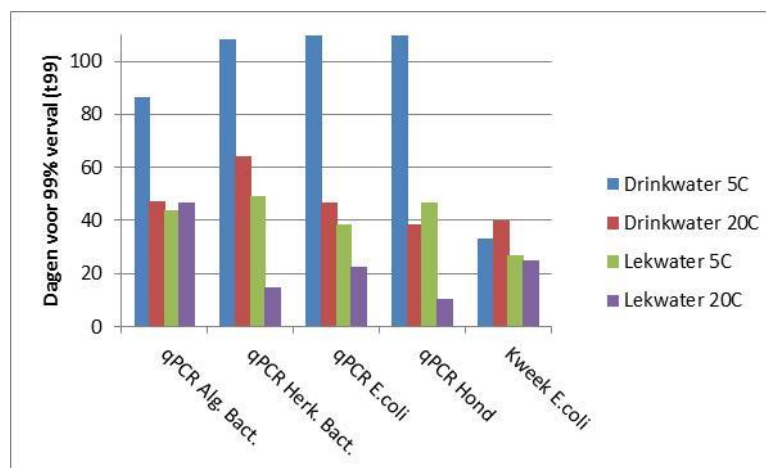


Figuur 12. De concentratie (gemiddelden van duplo-metingen) DNA merkers (algemene bacteroides, bacteroides van herkauwers, DNA van honden en DNA van E.coli) en kweekbare E. coli tijdens incubatie bij 5°C (A en C) en 20°C (B en D) van, met een mengsel van honden- en runderfeces, besmet drink- (A en B) en Lekwater (C en D). De concentraties zijn weergegeven op een Log10 schaal, in monsters waarin geen DNA-merkers of E.coli's zijn aangetoond is een waarde 1 gebruikt.

De figuren maken duidelijk dat de concentratie van zowel DNA-merkers als kweekbare *E. coli* cellen afneemt tijdens de incubatieperiode van 96 dagen. De snelheid waarmee de concentraties afnemen is afhankelijk van de temperatuur (bij hogere temperatuur veelal snellere afname) en de matrix (snellere afname in Lekwater) waarin de fecale besmetting is aangebracht. Om een duidelijker beeld te krijgen van de snelheid waarmee DNA-merkers en kweekbare *E. coli*'s in deze watertypen bij de twee temperaturen afnemen (vervalsnelheid) is een regressieanalyse uitgevoerd waarbij een lineaire afname is verondersteld. Er is een schatting van de gemiddelde vervalsnelheid gedaan op basis van de helling van de regressielijn en deze vervalsnelheid (k) is gebruikt om de tijd die nodig is voor een verval van 99% (t_{99}) van de DNA-merkers of kweekbare *E. coli*'s te berekenen. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in tabel 11 en in figuur 13 zijn de tijden t_{99} waarden gevisualiseerd.

	Drinkwater						Lekwater					
	5°C			20°C			5°C			20°C		
	k (dag ⁻¹)	R^2	t_{99} (dag)	k (dag ⁻¹)	R^2	t_{99} (dag)	k (dag ⁻¹)	R^2	t_{99} (dag)	k (dag ⁻¹)	R^2	t_{99} (dag)
qPCR alg. Bacteroides	-0,023	0,87	87	-0,042	0,92	47	-0,045	0,91	44	-0,043	0,55	47
qPCR herk. Bacteroides	-0,018	0,82	108	-0,031	0,91	64	-0,041	0,87	49	-0,135	0,82	15
qPCR <i>E. coli</i>	-0,018	0,73	110	-0,043	0,92	47	-0,052	0,92	38	-0,088	0,73	23
qPCR Hond	-0,018	0,77	110	-0,052	0,88	38	-0,043	0,66	47	-0,194	0,65	10
<i>E. coli</i> KVE	-0,060	0,95	33	-0,050	0,96	40	-0,075	0,98	27	-0,080	0,86	25

Tabel 11. De gemiddelde vervalsnelheid (k , in dag⁻¹) en het aantal benodigde dagen voor het verval 99% van het merker-DNA (t_{99}) of kweekbare *E. coli* bij incubatie van, met runder- en honden-feces, besmet drink- of Lekwater.



Figuur 13. Het aantal benodigde dagen voor het verval 99% van het merker-DNA (t_{99}) of kweekbare *E. coli* bij incubatie van, met runder- en honden-feces, besmet drink- of Lekwater.

De resultaten laten zien dat de drie DNA merkers zich gelijkwaardig gedragen onder verschillende omstandigheden, de DNA merkers voor "Herkauwer bacteroides", "*E.coli*" en DNA van honden. Deze merkers zijn zeer stabiel ($t_{99} \geq 108$ dagen) in drinkwater bij een temperatuur van 5°C, minder stabiel (t_{99} : 38-64 dagen) in drinkwater van 20 °C of Lekwater van 5°C (t_{99} : 38-49 dagen) en relatief snel vervallen in Lekwater van 20 °C (t_{99} : 10-23 dagen). De DNA-merker voor detectie van "algemene" bacteroides wijkt enigszins af t.o.v. de drie

andere DNA-merkers. Deze “algemene” bacteroides merker is, vergeleken met de andere DNA-merkers, minder stabiel in drinkwater bij een temperatuur van 5°C (t_{99} :87 dagen), heeft een vergelijkbare stabiliteit in drinkwater met een temperatuur van 20°C (t_{99} :47 dagen) en in Lekwater met een temperatuur van 20°C (t_{99} :47 dagen) en is stabiel in Lekwater bij 5°C (t_{99} :44 dagen). Het verval van kweekbare *E. coli* verloopt in drinkwater bij een temperatuur van 5°C aanmerkelijk sneller (t_{99} :33 dagen) dan het verval van DNA-merkers. In drinkwater van 20°C is er weinig verschil tussen de vervalsnelheid van DNA-merkers (t_{99} :38-64 dagen) of de vervalsnelheid van kweekbare *E. coli* cellen (t_{99} :40 dagen). In Lekwater van 5°C is de vervalsnelheid van kweekbare *E. coli* cellen (t_{99} :27 dagen) hoger dan de vervalsnelheid van DNA-merkers voor “algemene” bacteroides (t_{99} :44 dagen), herkauwer bacteroides (t_{99} :49 dagen), *E. coli* (t_{99} :38 dagen) of DNA van honden (t_{99} :47 dagen). In Lekwater van 20°C is de vervalsnelheid van kweekbare *E. coli* cellen lager (t_{99} :25 dagen) dan de vervalsnelheid van DNA-merkers voor bacteroides van herkauwers (t_{99} :15 dagen), *E. coli* (t_{99} :23 dagen) of DNA van honden (t_{99} :10 dagen) en hoger dan DNA-merkers voor “algemene” bacteroides (t_{99} :47 dagen).

3.4 Verkenning: DNA merkers voor fecale verontreiniging in drinkwater

Om metingen van fecale DNA-merkers beter te kunnen interpreteren is het van belang om te weten of deze DNA-merkers in drinkwater voorkomen. Aangezien drinkwater onder normale omstandigheden niet fecaal besmet is, valt te verwachten dat deze DNA-merkers in drinkwater niet voorkomen. Er kan alleen niet worden uitgesloten dat er in drinkwater (onbekende) bacteriën aanwezig kunnen zijn waarvan het DNA aanleiding geeft voor het geven van kruisreacties of dat er fecale DNA-merkers zijn die de zuivering passeren en zorgen voor detecteerbare concentraties in het drinkwater. Als verkennende studie is er DNA uit 74 drinkwatermonsters, afkomstig uit het voorzieningsgebied van drie productiebedrijven die drinkwater produceren door zuivering van oppervlaktewater en één productiebedrijf die drinkwater produceert uit grondwater, onderzocht op het bevatten van DNA-merkers voor “algemene” fecale verontreiniging en fecale verontreiniging specifiek voor: mensen, herkauwers, runderen, vogels, en honden.

Watertype	Aantal monsters	DNA-merkers					
		Algemeen	Mens	Herkauwer	Rund	Vogel	Hond
oppervlaktewater	52	12 (23%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	8 (15%)	0 (0%)
grondwater	22	3 (14%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	2 (9%)	0 (0%)
Grond+oppervlakte	74	15 (20%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	10 (14%)	0 (0%)

Tabel 12. Het aantal drinkwatermonsters, afkomstig van grond- en oppervlaktewaterwinningen, waarin “algemene bacteroides” DNA-merkers of DNA-merkers specifiek voor fecale verontreinigingen van mensen, herkauwers, runderen, vogels of honden zijn aangetroffen.

De resultaten van deze analyses (samengevat in tabel 12) laten zien dat DNA-merkers voor fecale verontreiniging van mensen, herkauwers, runderen en honden niet worden aangetoond in de 74 drinkwatermonsters. De “algemene” bacteroides merker en de DNA-merker waarmee DNA van helicobacter bacteriën uit vogels worden wel aangetoond in een deel van de onderzochte monsters (“algemene” bacteroides merker in 20% en vogel-specifieke merker in 14% van de monsters). De merkerconcentratie is in de onderzochte drinkwatermonsters zeer laag: DNA-merker voor “algemene” bacteroides gemiddeld 1,8 DNA kopieën/ml en de vogel-specifieke DNA-merker 0,01 DNA kopieën/ml. Ook in een eerdere studie, uitgevoerd door Paul van der Wielen bij KWR (27), werden “algemene” bacteroides merkers aangetoond in een deel van, uit grond- en oppervlaktewater, geproduceerde drinkwatermonsters.

4 Discussie en conclusies

Dit onderzoek beschrijft een aantal nieuwe ontwikkelingen op het gebied van DNA-merkers voor detectie van fecale verontreinigingen:

- De ontwikkeling van een DNA-merker voor identificatie van fecale verontreinigingen van honden.
- De concentraties van DNA-merkers in de feces van verschillende diergroepen en de verhouding met de concentratie DNA-merkers voor *E. coli* en enterococcon.
- De stabiliteit/vervalsnelheid van verschillende DNA-merkers en kweekbare *E. coli* in fecaal besmet drink en oppervlaktewater bij twee temperaturen (5°C en 20°C).
- Het voorkomen van DNA-merkers in drinkwater.

De resultaten van het onderzoek worden per onderdeel besproken.

4.1 Methode voor detectie van fecale verontreiniging van honden

Voor de ontwikkeling van een qPCR methode waarmee fecale verontreinigingen van honden kunnen worden geïdentificeerd en gekwantificeerd is eerst literatuuronderzoek uitgevoerd. Om verontreinigen van fecale oorsprong specifiek te kunnen detecteren heeft het de voorkeur om de methode te richten op detectie van het DNA van dominante darmbacteriën (zoals bij de eerder ontwikkelde diergroep-specifieke methoden (1, 3)). Detectie van een dergelijke DNA-target is, vanwege de hoge concentraties in feces, bruikbaar voor zeer gevoelige detectie en bij detectie van het DNA van fecale bacteriën is duidelijk dat de gedetecteerde verontreiniging afkomstig is van fecaal materiaal. Voor het detecteren van DNA van hond-specifieke bacteroides-bacteriën is in 2007 een methode beschreven (21). Een uitgebreide vergelijking van de in bij deze methode toegepaste primers met database-sequenties laat zien dat de primersequenties niet geheel specifiek zijn voor bacteroides bacteriën van honden en toepassing van deze methode (21, 22) laat zien dat kruisreacties met fecale bacteriën uit andere diersoorten regelmatig optreedt. Het is daarom aan te bevelen om verbeterde primers te ontwikkelen voor specifieke detectie van DNA van hond-specifieke darmbacteriën. Maar, er is nog relatief weinig informatie beschikbaar over het bestaan van hond-specifieke darmbacteriën en hun DNA-sequenties waardoor de ontwikkeling van specifieke primersequenties niet eenvoudig is. Het is eerst noodzakelijk om de sequentiedatabase uit te breiden met DNA-sequenties afkomstig van darmbacteriën van verschillende honden en vervolgens is deze informatie te gebruiken voor de ontwikkeling van specifieke primers. Een dergelijke aanpak is zeer arbeidsintensief en kostbaar, vandaar dat gezocht is naar alternatieve mogelijkheden voor de ontwikkeling van een methode waarmee een indruk verkregen kan worden over de aanwezigheid van fecale verontreinigingen door honden. Daarom is in dit projectonderdeel een qPCR methode ontwikkeld waarmee het DNA van honden kan worden gekwantificeerd. Het gebruik van qPCR methoden waarmee het DNA van dieren kan worden onderscheiden is eerder beschreven als methoden die mogelijk toepasbaar zijn voor het identificeren van fecale verontreinigingen (24, 26). Deze methoden geven geen directe aanwijzing voor de aanwezigheid van fecaal materiaal maar, door de aanwezigheid van hoge concentraties darmepitheel cellen in de feces van dieren geeft een dergelijke methode wel een indruk over de mogelijke aanwezigheid van fecaal materiaal van honden. Het is echter ook mogelijk dat van DNA uit andere bronnen zoals huid-, urineweg- of speekselcellen en DNA uit haren van honden aangetoond kan worden met deze qPCR methode.

Na optimalisatie van de primersequenties is er een qPCR methode en een ijklijn ontwikkeld waarmee het mogelijk is om zeer specifiek en gevoelig het DNA van honden aan te tonen. De methode heeft de volgende eigenschappen:

- De DNA-merker wordt in alle (n=45) fecesmonsters van honden aangetoond.
- De merker-concentratie in feces van honden is gemiddeld $8,4^E+08$ DNA kopieën/gram feces.

- Deze concentratie is lager dan de specifieke DNA-merkers voor bacteroides bacteriën in feces van herkauwers, runderen, reeën/herten zodat te verwachten is dat feces van honden minder gevoelig gedetecteerd kan worden dan feces van diergroepen waarvoor een bacteroides-merker beschikbaar is.
- De DNA-merker wordt niet aangetoond in fecesmonsters van herten en reeën (n=111), vogels (n=138), schapen (n=74), en mensen (n=80).
- De DNA merker wordt aangetoond in een klein deel (6 van de 30) van de fecesmonsters van katten, de concentraties zijn in feces van katten aanmerkelijk lager: $5,0^E+04$ DNA kopieën/g feces.
- De DNA merker wordt sporadisch (4 van de 63) aangetoond in fecesmonsters van runderen, de concentraties zijn in feces van runderen zeer laag: $4,9^E+00$ DNA kopieën/g feces.

Op basis van bovenstaande gegevens is te verwachten dat de aanwezigheid van DNA van honden specifiek kan worden aangetoond in watermonsters. Het is niet duidelijk of de fecesmonsters van katten en runderen, waarin lage concentraties DNA-merker van honden worden aangetoond, besmet zijn met DNA van honden of dat dit het gevolg is van kruisreacties van de primers met DNA van katten en runderen. Vergeleken met de concentraties DNA merkers voor diergroep-specifieke bacteroides bacteriën zijn de concentraties DNA-merkers voor honden in de feces van honden laag. Dit betekent waarschijnlijk dat hond-specifieke verontreinigingen minder gevoelig aantoonbaar zijn dan fecale verontreinigingen van herkauwers, herten/reeën en runderen. De gemiddelde concentratie DNA-merker voor vogel-specifiek helicobacter bacteriën in feces van vogels is lager (gem. $2,4^E+07$ DNA kopieën/g) dan de concentratie hond-specifieke DNA-merker in feces van honden zodat verwacht wordt dat fecale verontreinigingen van honden gevoeliger gedetecteerd kunnen worden dan verontreinigingen door vogels.

Deze hond-specifieke DNA merker lijkt bruikbaar om een indruk te krijgen over de aanwezigheid van hondencellen in een watermonster. Maar, vanwege de hoge concentratie en de exclusieve aanwezigheid in feces, wordt de ontwikkeling van een DNA-merker op basis van hond-specifieke darmbacteriën aanbevolen.

4.2 Fecale merkers in feces van verschillende dieren

In het onderzoek van 2012/2013 zijn er metingen uitgevoerd van diergroep-specifieke DNA-merkers in feces van verschillende diergroepen (1). Uit deze metingen bleek dat de DNA-merkers in hoge concentraties aanwezig zijn in fecesmonsters van dieren waarin de aanwezigheid van de merkers te verwachten was. In dit onderzoek zijn op dezelfde fecesmonsters ook metingen uitgevoerd van de concentratie DNA-merkers van de "klassieke" fecale indicatororganismen (*E. coli* en enterococcen) en zijn deze concentraties vergeleken met de concentraties diergroep-specifieke merkers.

Uit deze vergelijking komt een aantal belangrijke waarnemingen naar voren:

- *De gemiddelde concentratie DNA-merkers voor E. coli is in de feces van vrijwel alle onderzochte diergroepen (mensen, herkauwers, runderen en schapen) hoger dan de gemiddelde concentratie DNA-merkers voor enterococcen. Alleen in de feces van vogels is de gemiddelde concentratie DNA-merkers voor enterococcen hoger (11X) dan de gemiddelde concentratie E. coli-specifieke DNA-merkers.*

De lage gemiddelde concentratie DNA-merkers voor enterococcen en het hoge aantal fecesmonsters waarin geen enterococcen-specifieke DNA-merkers worden aangetoond is mogelijk het gevolg van de toegepaste primerset. Deze primerset is ontworpen zodat vooral het DNA van enterococcen soorten met fecale herkomst (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* en *E. hirae*) efficiënt kan worden gedetecteerd. Hierdoor is te verwachten dat mogelijk het DNA van een deel van de enterococcen (afkomstig van andere soorten) niet zal worden

gedetecteerd. Bij toepassing van deze qPCR methoden is daardoor te verwachten dat bij fecale verontreinigingen, veroorzaakt door de in dit onderzoek onderzochte diergroepen, de concentraties DNA van *E. coli* hoger zullen zijn dan de concentraties DNA van enterococcen. In gevallen van fecale verontreiniging door vogels is te verwachten dat de concentraties enterococcen relatief hoog zullen zijn.

- *De gemiddelde concentratie bacteroides-specifieke DNA-merkers is in de feces van alle diergroepen hoger dan de gemiddelde concentratie DNA-merker voor E. coli en enterococcen.*

Hierdoor is te verwachten dat de concentratie bacteroides-specifieke DNA-merkers bij fecale verontreinigingen hoger zal zijn dan de concentratie DNA-merkers voor de "traditionele" indicatororganismen (*E. coli* en enterococcen). Met het gebruik van bacteroides-specifieke DNA-merkers is het dus mogelijk om de bron van fecale verontreinigingen te identificeren en kunnen fecale verontreinigingen zeer gevoelig aangetoond worden.

- *De gemiddelde concentratie vogel-specifieke DNA-merker in de feces van vogels is lager dan de gemiddelde concentratie diergroep-specifieke bacteroides merkers in de feces van de andere diergroepen en de gemiddelde concentratie vogel-specifieke DNA-merker is lager dan de concentratie DNA-merkers voor E. coli en enterococcen.*

Hierdoor is te verwachten dat fecale verontreinigingen t.g.v. vogelfeces minder gevoelig gedetecteerd kunnen worden door toepassing van de vogel-specifieke DNA-merker. Er is dus meer vogelfeces nodig om een signaal te genereren met de vogel-specifieke qPCR methode signaal. Dit betekent ook dat er relatief veel feces van vogels aanwezig zal zijn in gevallen waar er met de qPCR methode de vogels-specifieke DNA-merkers wel worden gedetecteerd. Deze resultaten suggereren dat het DNA van de, met de qPCR gedetecteerde, helicobacter bacteriën niet dominant aanwezig is in de feces van vogels. Voor de ontwikkeling van een methode waarmee, met hoge gevoeligheid, fecale verontreinigingen gedetecteerd kunnen worden die veroorzaakt zijn door vogels is het wellicht noodzakelijk om de methode te richten op vogel-specifieke bacteriën die in hogere concentraties aanwezig zijn in de feces van vogels.

4.3 Stabiliteit van DNA-merkers en kweekbare *E. coli* in water

Om de resultaten van metingen van DNA-merkers (geïsoleerd uit bacterie- of dierlijke-cellen) goed te kunnen interpreteren is het van belang om meer te weten over de stabiliteit van DNA-merkers en de relatie met de stabiliteit van kweekbare indicatorbacteriën. Het is mogelijk dat de snelheid waarmee kweekbare indicatorbacteriën afsterven, of in een "levend maar niet kweekbaar stadium komen, verschilt van de snelheid waarmee DNA-merkers, t.g.v. afbraak van het DNA uit de cel, verdwijnen. Als DNA-merkers veel langer aantoonbaar blijven dan kweekbare *E. coli* of enterococcen cellen dan is het mogelijk dat ook oude (en uit het oogpunt risicobeoordeling minder relevante) fecale besmettingen met qPCR worden aangetoond.

Incubatie experimenten waarbij drink- en oppervlaktewatermonsters zijn besmet met feces van honden en runderen en geïncubeerd bij 5°C en 20°C zijn gebruikt om inzicht te krijgen in de stabiliteit van verschillende typen fecale indicatoren:

- DNA merkers afkomstig van gram-positieve cocvormige aerobe bacteriën: DNA van enterococcen.
- DNA merkers afkomstig van gram-negatieve staafvormige aerobe bacteriën: DNA van *E. coli*.
- DNA merkers afkomstig van gram-negatieve staafvormige anerobe bacteriën: DNA van "algemene bacteroides" en herkauwer-specifieke bacteroides.
- Kweekbare *E. coli* cellen.

De experimenten maken duidelijk dat de kweekbaarheid van de *E. coli* cellen in oppervlaktewater (99% verval in 27 dagen bij 5°C en in 25 dagen bij 20°C) sneller afneemt dan in drinkwater (99% verval in 33 dagen bij 5°C en in 40 dagen bij 20°C). Waarschijnlijk is dit het gevolg van de aanwezigheid van een meer geconcentreerde en actieve biologische omgeving en de mogelijke aanwezigheid van toxische chemicaliën in het oppervlaktewater. Ook in onderzoek uitgevoerd door Dick *et al.* (28) en Korajkik *et al.* (29) is het duidelijk dat de aanwezigheid van hogere concentraties (micro)biologische flora zorgt voor versnelde afname van kweekbare *E. coli* cellen in fecaal besmet oppervlaktewater. Het is wel opvallend dat de afname van de kweekbare *E. coli* in het onderzoek van Dick *et al.* (28) en Korajkik *et al.* (29) sneller verloopt (Dick *et al.* 99% verval in 2-3 dagen en Korajkik *et al.* 99% in ca. 10 dagen). In het onderzoek, uitgevoerd door Hijnen *et al.* (30), is vastgesteld dat verschillen in watersamenstelling invloed hebben op de vervalsnelheid van kweekbare *E. coli* cellen. Het is dus mogelijk dat *E. coli* cellen in het water uit het Lekkanaal, wat in dit onderzoek is gebruikt, langere tijd kweekbaar zijn. Het is ook mogelijk dat de matrix die gebruikt is voor het besmetten van de watermonsters (een fecessuspensie van honden en runderen) een hoge concentratie verse *E. coli* cellen bevat die nog langere tijd kweekbaar zijn.

Bij incubatie in drinkwater is weinig verschil tussen de vervalsnelheden van de verschillende DNA-merkers. Ook bij incubatie in Lekwater 5°C hebben de verschillende DNA-merkers een vergelijkbare stabiliteit. Maar, bij incubatie van fecaal besmet Lekwater bij 20°C gedraagt de merker waarmee DNA van honden wordt aangetoond zich afwijkend; de concentratie van deze merker neemt sneller af (99% in 10 dagen) dan de merkers voor *E. coli* en herkauwer-specifieke- en algemene bacteroides (resp. 23, 15 en 47 dagen voor 99% afname). Waarschijnlijk is dit het gevolg van de kwetsbare celmembraan (kwetsbaarder dan de stevige bacteriële celwand) van de hondencellen waardoor het DNA van deze cellen makkelijker bereikbaar is en eenvoudiger is af te breken door de in het water aanwezige organismen.

De vervalsnelheid van de verschillende DNA-merkers, bij incubatie bij 5°C in drinkwater, is aanmerkelijk lager (variërend van verval van 99% in 87-110 dagen) dan de vervalsnelheid van kweekbare *E. coli* cellen (verval van 99% in 33 dagen, gemiddeld 3X sneller dan DNA-merkers). Bij een hogere incubatietemperatuur neemt de vervalsnelheid van DNA-merkers in drinkwater sterk toe (tot gemiddeld 49 dagen voor een verval van 99% van de DNA-kopieën) en nadert de vervalsnelheid van kweekbare *E. coli* cellen (verval van 99% in 40 dagen). In water van het Lekkanaal bij een temperatuur van 5°C zijn DNA-merkers stabiel (gemiddeld verval van 99% in 45 dagen dan kweekbare *E. coli* cellen (verval van 99% in 27 dagen). Ook in andere studies is aangetoond dat er weinig verschil is tussen de stabiliteit van kweekbare *E. coli* cellen en fecale DNA-merkers. Oladeinde *et al.* (31) laten zien dat een afname van 99% van de kweekbare *E. coli* cellen plaats vindt in 16 dagen en dat de concentratie bacteroides DNA-merkers voor herkauwers, runderen en algemene-bacteroides in respectievelijk 41, 37 en 36 dagen 99% afnemen in feces van runderen.

Samenvattend kan geconcludeerd worden dat het verschil in stabiliteit in drink- en oppervlaktewater tussen DNA-merkers en kweekbare *E. coli* cellen beperkt is. Hierdoor is niet te verwachten dat DNA-merkers veel langer na de besmetting detecteerbaar zullen zijn dan kweekbare *E. coli* cellen (in dit onderzoek: maximaal ca. 3X langer voor een 99% reductie bij een temperatuur van 5°C in drinkwater).

4.4 DNA-merkers voor fecale verontreiniging in drinkwater

In 74 watermonsters (52 afkomstig van oppervlaktewaterzuiveringen en 22 afkomstig van grondwaterzuiveringen) zijn geen DNA-merkers aangetoond waarmee fecale verontreinigingen van mensen, herkauwers, runderen en honden kunnen worden gedetecteerd. Er zijn dus geen (mens-, herkauwer- of rund-)specifieke bacteroides bacteriën of cellen van honden die de zuivering passeren of tijdens de zuivering of distributie in het water worden geïntroduceerd. Er zijn dus in het water ook geen DNA moleculen aanwezig die kunnen zorgen voor kruisreacties tijdens de qPCR-reacties. Lage concentraties algemene

bacteroides merker is wel aangetoond in 20% van de drinkwatermonsters. Van de primers die gebruikt worden voor het aantonen van algemene bacteroides is al eerder aangetoond dat deze kruisreageren met DNA in drinkwater (27, 32). Vanwege deze kruisreacties is deze methode niet bruikbaar voor het detecteren van lage concentraties fecale verontreinigingen. De vogel-specifieke merker waarmee DNA van helicobacter bacteriën wordt (in lage concentraties) aangetoond in 14% van de drinkwatermonsters gedetecteerd. Het is niet duidelijk of dit het gevolg is van de aanwezigheid van lage concentraties helicobacter-DNA of veroorzaakt wordt door kruisreacties met DNA van andere bacteriën. Door de DNA-sequentie van de verkregen PCR-fragmenten te bepalen is te bepalen welk organisme zorgt voor de positieve qPCR reacties. Deze sequentieanalyse geeft bovendien informatie waarmee de ontwikkeling van een detectieprobe beter mogelijk gemaakt kan worden waardoor de specificiteit van de methode mogelijk verbeterd kan worden.

4.5 Toepassingsmogelijkheden voor de drinkwatersector

Dit rapport geeft een beschrijving van:

- De ontwikkeling van DNA merker voor specifieke detectie van het DNA van honden.
- De concentratie diergroep-specifieke DNA-merkers in de feces van verschillende diersoorten en de relatie met DNA-merkers voor de indicatororganismen *E. coli* en enterococci.
- De stabiliteit van DNA-merkers en de kweekbaarheid van *E. coli* in drink- en oppervlaktewater bij verschillende temperaturen.
- Een indruk over het voorkomen van DNA-merkers in verschillende drinkwatertypen.

Op basis van deze en eerdere (1) resultaten is te verwachten dat deze methoden van waarde kunnen zijn voor de volgende situaties:

- *Bronopsporing*

Vanwege de specificiteit van de verschillende diergroep-specifieke DNA-merkers wordt, met het aantonen van deze merkers, een sterke aanwijzing verkregen voor de aanwezigheid van fecaal materiaal afkomstig van een bepaalde diersoort. Vanwege de hoge concentratie specifieke DNA-merkers in de feces van herkauwers, mensen en runderen is te verwachten dat fecale verontreinigingen veroorzaakt door deze diergroepen zeer gevoelig kunnen worden aangetoond en geïdentificeerd. De concentratie hond- en vogel-specifieke DNA-merkers in de feces aanmerkelijk lager zodat verwacht wordt dat fecale verontreinigingen die veroorzaakt zijn door deze diergroepen minder gevoelig kunnen worden aangetoond en geïdentificeerd. In de drinkwatersector kunnen er situaties optreden waarbij kennis over de herkomst van een fecale besmetting kan helpen problemen op te lossen en/of risico's beter in te schatten:

- Calamiteiten (fecale besmettingen van drinkwater): bij het aantreffen van fecale besmettingen in het afgeleverde water, water tijdens distributie of grondwater uit kwetsbare winputten kan kennis over de bron van de besmetting helpen om snel gerichte maatregelen te nemen.
- Calamiteiten (ingrepen in het leidingnet, leidingbreuken): het identificeren van de bron van vervuiling bij besmettingen t.g.v. ingrepen in het leidingnet kan gebruikt worden als onderzoekstool om inzicht te verkrijgen in de mogelijkheden voor verbetering van de procedures voor het uitvoeren van de werkzaamheden.

De mogelijkheden van deze toepassing worden in het BTO onderzoek van 2014/2015 (HV1) in meer detail onderzocht door analyses uit te voeren op water- en grondmonsters die verzameld worden tijdens ingrepen in het leidingnet.

- Risicoschatting: kennis over de fecale besmettingsbron is van waarde voor het nauwkeuriger kunnen inschatten van besmettingsrisico's. Momenteel is daarbij

vooral de vraag van wel/geen aanwezigheid van humaan fecaal materiaal waaruit geconcludeerd kan worden dat er wel/geen humane virussen aanwezig kunnen zijn relevant. Mogelijk dat de waarde van identificatie van de besmettingsbron(nen), met het beschikbaar komen van meer en betrouwbaarder informatie over de aanwezigheid van pathogenen in verschillende besmettingsbronnen, van meer waarde kan gaan worden voor het inschatten van besmettingsrisico's bij het uitvoeren van AMVD's.

○ *Kwaliteitscontrole*

Vanwege de hoge concentratie diergroep-specifieke DNA-merkers in de feces van de betreffende diersoorten is te verwachten dat deze merkers zeer gevoelig en snel te detecteren zijn. De mogelijkheden en beperkingen bij toepassing voor kwaliteitscontrole:

- Gevoelige detectie:
 - Concentratie van de merkers die specifiek zijn voor "herkauwers", runderen, en mensen is in feces hoger dan de concentratie DNA van *E. coli* en enterococcen.
 - Door lagere concentratie van specifieke merkers in feces van vogels en honden is detectie van fecale verontreinigingen door deze diergroepen met lagere gevoeligheid.
- Snelle detectie: resultaat binnen enkele uren na aankomst van het monster op het laboratorium. Dit een eigenschap van qPCR technieken en niet specifiek van het toepassen van diergroep-specifieke fecale merkers.
- Niet volledig: voor een aantal diergroepen (mensen, herkauwers, runderen, varkens, vogels, honden) zijn er methoden beschikbaar maar hiermee wordt dekking verkregen van een groot deel van de relevante maar niet van alle "fecale vervuilers". Om fecale vervuiling van "alle" relevante vervuilers te kunnen aantonen zullen meerdere PCR-reacties uitgevoerd moeten worden. Er zal zorgvuldig moeten worden bepaald voor welke diersoorten er merkers beschikbaar dienen te zijn.
- Beter inzicht in mogelijke risico's: doordat er, met het aantonen van diergroep-specifieke merkers, informatie wordt verkregen over de herkomst van de fecale besmetting wordt er (t.o.v. *E. coli*/enterococcen) meer informatie verkregen over de mogelijke risico's (o.a. wel/geen humane virussen).
- Geen informatie over de levensvatbaarheid van de aangetoonde organismen. In veel gevallen is dit bij het beoordelen van de kwaliteit geen belangrijk issue: de aanwezigheid van fecaal materiaal vormt, onafhankelijk van de levensvatbaarheid van de aangetoonde organismen, een potentieel risico. De incubatie experimenten in dit onderzoek laten bovendien zien dat het verschil in snelheid waarmee kweekbare *E. coli* cellen verdwijnen en de snelheid waarmee DNA-merkers verdwijnen beperkt is. Het is dus niet te verwachten dat zeer oude fecale verontreinigingen aangetoond kunnen worden met het toepassen van dierspecifieke DNA-merkers.
- Er is nog geen wettelijk kader voor toepassing van deze nieuwe merkers als alternatieve indicatoren voor fecale verontreiniging. Momenteel zijn er veelbelovende activiteiten gaande waarmee wettelijke acceptatie voor het toepassen van RT-PCR methoden voor detectie van de "traditionele" indicatororganismen (*E. coli*/enterococcen) dichterbij komen. Het aantonen van geheel andere indicatororganismen met PCR gaat nog een stap verder zodat wettelijke acceptatie hiervoor niet op korte termijn te verwachten is.

5 Literatuur

1. L. Heijnen, K. Learbuch, Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen *BTO rapport BTO 2013.014*, (2013).
2. L. Heijnen, E. Kardinaal, DNA analyse fecale verontreinigingen: 2013. *KWR Rapport i.o.v. RWS KWR 2014.005*, (2013).
3. L. Heijnen *et al.*, Fecale verontreiniging in zwemwater identificeren met DNA-merkers. *H2O April 2014*, (2014).
4. L. Heijnen, Pathogenen in de mest van grazers. *KWR Rapport i.o.v. Waternet*, (2009).
5. I. Leenen, M. Maessen, L. Heijnen, E. Kardinaal, Bronanalyse zwemwater m.b.v. dna-technieken: bepalen bijdrage van vogels, mensen en dieren aan de zwemwaterkwaliteit. Een overzicht van ervaringen en mogelijkheden om vogels te weren. *Rapport Grontmij/KWR i.o.v. RWS*, (2013).
6. S. Sieftring, M. Varma, E. Atikovic, L. Wymer, R. A. Haugland, Improved real-time PCR assays for the detection of fecal indicator bacteria in surface waters with different instrument and reagent systems. *J Water Health* **6**, 225 (Jun, 2008).
7. L. K. Dick, K. G. Field, Rapid estimation of numbers of fecal Bacteroidetes by use of a quantitative PCR assay for 16S rRNA genes. *Applied and environmental microbiology* **70**, 5695 (Sep, 2004).
8. A. E. Bernhard, 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. *Applied and environmental microbiology* **66**, 4571 (Oct, 2000).
9. S. Seurinck, T. Defoirdt, W. Verstraete, S. D. Siciliano, 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* **7**, 249 (Feb, 2005).
10. R. A. Haugland, S. C. Sieftring, L. J. Wymer, K. P. Brenner, A. P. Dufour, Comparison of Enterococcus measurements in freshwater at two recreational beaches by quantitative polymerase chain reaction and membrane filter culture analysis. *Water Res* **39**, 559 (Feb, 2005).
11. O. C. Shanks *et al.*, Performance of PCR-based assays targeting Bacteroidales genetic markers of human fecal pollution in sewage and fecal samples. *Environ Sci Technol* **44**, 6281 (Aug 15, 2010).
12. S. Mieszkin, J. F. Yala, R. Joubrel, M. Gourmelon, 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* **108**, 974 (Mar, 2010).
13. M. Gourmelon *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* **44**, 4812 (Sep, 2010).
14. O. C. Shanks *et al.*, Quantitative PCR for detection and enumeration of genetic markers of bovine fecal pollution. *Applied and environmental microbiology* **74**, 745 (Feb, 2008).
15. O. C. Shanks *et al.*, Performance assessment PCR-based assays targeting bacteroidales genetic markers of bovine fecal pollution. *Applied and environmental microbiology* **76**, 1359 (Mar, 2010).
16. H. C. Green, L. K. Dick, B. Gilpin, M. Samadpour, K. G. Field, Genetic markers for rapid PCR-based identification of gull, Canada goose, duck, and chicken fecal contamination in water. *Applied and environmental microbiology* **78**, 503 (Jan, 2012).
17. L. Heijnen, G. Medema, Method for rapid detection of viable Escherichia coli in water using real-time NASBA. *Water Res* **43**, 3124 (Jul, 2009).

18. L. Heijnen, E. Kardinaal, B. Wullings, Robuustheid van qPCR technieken voor de analyse van zwemwater. *KWR Rapport i.o.v. RWS Waterdienst*, (2012).
19. J. M. Caldwell, J. F. Levine, Domestic wastewater influent profiling using mitochondrial real-time PCR for source tracking animal contamination. *J Microbiol Methods* **77**, 17 (Apr, 2009).
20. L. K. Dick, M. T. Simonich, K. G. Field, Microplate subtractive hybridization to enrich for bacteroidales genetic markers for fecal source identification. *Applied and environmental microbiology* **71**, 3179 (Jun, 2005).
21. B. J. Kildare *et al.*, 16S rRNA-based assays for quantitative detection of universal, human-, cow-, and dog-specific fecal Bacteroidales: a Bayesian approach. *Water Res* **41**, 3701 (Aug, 2007).
22. A. Schriewer *et al.*, Performance evaluation of canine-associated Bacteroidales assays in a multi-laboratory comparison study. *Water Res* **47**, 6909 (Jul 5, 2013).
23. V. Iyengar, G. P. Albaugh, A. Lohani, P. P. Nair, Human stools as a source of viable colonic epithelial cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **5**, 2856 (Oct, 1991).
24. A. Martellini, P. Payment, R. Villemur, Use of eukaryotic mitochondrial DNA to differentiate human, bovine, porcine and ovine sources in fecally contaminated surface water. *Water Res* **39**, 541 (Feb, 2005).
25. H. Andreasson, U. Gyllensten, M. Allen, Real-time DNA quantification of nuclear and mitochondrial DNA in forensic analysis. *Biotechniques* **33**, 402 (Aug, 2002).
26. N. M. Vuong *et al.*, Fecal source tracking in water using a mitochondrial DNA microarray. *Water Res* **47**, 16 (Jan 1, 2013).
27. P. W. van der Wielen, G. Medema, Unsuitability of quantitative Bacteroidales 16S rRNA gene assays for discerning fecal contamination of drinking water. *Applied and environmental microbiology* **76**, 4876 (Jul, 2010).
28. L. K. Dick, E. A. Stelzer, E. E. Bertke, D. L. Fong, D. M. Stoeckel, Relative Decay of Bacteroidales Microbial Source Tracking Markers and Cultivated *Escherichia coli* in Freshwater Microcosms. *Applied and environmental microbiology* **76**, 3255 (2010).
29. A. Korajkic *et al.*, Differential Decay of Enterococci and *Escherichia coli* Originating from Two Fecal Pollution Sources. *Applied and environmental microbiology* **79**, 2488 (2013).
30. W. A. M. Hijnen, A. T. Lugtenberg, H. Ruiters, R. R. J. Vink, G. Medema, Decay rate index for *E. coli* and enterococci in fresh and salt bathing waters. *WQTC conference*, (2007).
31. A. Oladeinde *et al.*, Decay of fecal indicator bacterial populations and bovine-associated source-tracking markers in freshly deposited cow pats. *Applied and environmental microbiology* **80**, 110 (2014).
32. P. W. J. J. Wielen, Het gebruik van alternatieve indicatororganismen voor de detectie van fecale verontreinigingen in water. *BTO rapport*, (2008, 2008).

