

RIVM rapport 330200 001/2004

Humane virussen in de Maas

A.M. de Roda Husman en H.A.M. Ketelaars

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van RIWA-Maas, Postbus 61, 4250 DB
Werkendam, in het kader van project 330200, Drinkwaterkwaliteit.

RIVM, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, telefoon: 030 - 274 91 11; fax: 030 - 274 29 71

Abstract

Noro- and rotaviruses are the most important gastroenteritis agents in the Netherlands. Numerous outbreaks of viral gastroenteritis have been described in part associated with exposure to contaminated drinking water. Until recently methods for the detection of these viruses in water were unavailable. The available virus data, though limited, were compiled and analysed for the Maas, the leading river in supplying Dutch drinking water for the past 25 years.

In the years 1999-2002, the presence of noro- and rotaviruses in surface waters of the Maas catchment was studied using recently developed molecular techniques at three different locations for drinking water production, the Lateraalkanaal, the Beatrixkanaal and the Bergse Maas. In addition, samples were analysed for the presence of the classic cultivable entero- and reoviruses and the somatic and F-specific bacteriophages. In 41% and 3% of the 29 source water samples respectively noro- and rotavirus-RNA were detected. Most positive samples were derived from the Lateraalkanaal, the least from the Beatrixkanaal. The average concentration norovirus-RNA (74 (4-659) pcr detectable units per liter (pdu/l) in the Maas catchment was substantially higher than found for the other viruses. In part this may be explained by the use of molecular methods since no sensitive cell-line is available for norovirus culture. Rotavirus-RNA was detected once in 29 samples (average 5 (0.3-43) pdu/l). Average concentrations of infectious enteroviruses and reoviruses respectively were 2 (1-2) and 0.3 (0.2-0.5) plaque forming units (pfu) per liter for the Maas catchment. As previously shown for enteroviruses, noroviruses tend to be detected mainly in winter. Whether the norovirus variations in winter consists of narrow peaks in the surface water from discharges of (un)treated sewage highly contaminated with viruses is yet unclear. These peak concentrations may hold a major challenge for the water treatment processes. From the source water concentrations and the acceptable risk of less than one infection in 10,000 persons per year as outlined in the current Dutch drinking water law the required virus reduction by treatment may be calculated. From our data concerning virus concentrations in the Maas catchment it was shown that the efficacy of treatment with regard to norovirus reduction in source waters for drinking water production needs to be higher than previously assumed for entero- and reoviruses. The ratio between numbers of infectious virus particles detected in the water and the numbers of virus RNA containing particles in the same sample needs to be assessed.

Voorwoord

Ten behoeve van RIWA-Maas is een inventarisatie van de beschikbare gegevens over virussen in de Maas en hun potentiële bronnen uitgevoerd. Gegevens uit eerder uitgevoerd en vastgelegd onderzoek in opdracht van de waterbedrijven WBB (De Roda Husman et al. 2003a), Brabant Water, voorheen WOB, (Medema 2000) en WML (Hoeijmakers en De Roda Husman 2001) werden hiervoor met toestemming van de opdrachtgevers gebruikt.

Inhoud

Samenvatting 5

- 1. Inleiding 6
 - 1.1 Wetgeving 6
 - 1.2 Wateroverdraagbare pathogene virussen 6
 - 1.3 Detectie van virussen in water 8
 - 1.4 Mogelijke bronnen van humane virussen 10
 - 1.5 Doel van het onderzoek 11
- 2. Materiaal en Methoden 13
 - 2.1 Onderzoekperiode en locaties 13
 - 2.2 Monsterneming 14
 - 2.3 Detectie van virussen 14
- 3 Resultaten 16
 - 3.1 Virussen in het Maasstroomgebied 16
 - 3.2 Seizoensvariatie 18
- 4 Discussie 19
 - 4.1 Noro- en rotavirussen 19
 - 4.2 Entero- en reovirussen 21
- 5 Onderzoeksaanbevelingen 25

Dankwoord 27

Literatuur 28

Bijlage 1 Lijst met afkortingen 32

Bijlage 2 Ruwe data 33

Samenvatting

Noro- en rotavirussen behoren tot de voornaamste verwekkers van gastro-enteritis in Nederland. Talloze uitbraken van virale gastro-enteritis zijn beschreven waarvan een deel geassocieerd werd met blootstelling aan besmet drinkwater. Tot enkele jaren geleden waren er echter geen methoden beschikbaar om deze virussen in water aan te tonen. De beschikbare gegevens, hoewel beperkt, zijn verzameld en geanalyseerd voor de Maas, al 25 jaar de belangrijkste rivier voor de Nederlandse drinkwatervoorziening.

In de jaren 1999-2002 zijn bij drie verschillende innamepunten, te weten het Lateraalkanaal, het Beatrixkanaal en de Bergse Maas, voor drinkwaterproductie in het Maasstroomgebied gegevens verzameld over de aanwezigheid van rota- en norovirussen met behulp van de recent ontwikkelde, moleculaire detectiemethoden. Daarnaast werd ook de aanwezigheid van de klassieke kweekbare entero- en reovirussen onderzocht en de bacterievirussen somatische en F-specifieke fagen. In 41% en 3% van de in totaal 29 monsters innamewater werd respectievelijk noro- en rotavirus-RNA aangetroffen. De meeste positieve monsters waren afkomstig van het Lateraalkanaal, de minste van het Beatrixkanaal. De gemiddelde concentratie norovirus-RNA (74 (4-659) pcr detecteerbare units per liter (pdu/l) in het Maasstroomgebied was aanmerkelijk hoger dan voor de andere virussen werd gevonden. Een gedeeltelijke verklaring zou kunnen zijn dat norovirussen met moleculaire methoden werden aangetoond aangezien (nog) geen gevoelige celllijn bekend is. Rotavirus-RNA werd in één van de 29 monsters water aangetroffen (gemiddelde concentratie 5 (0.3-43) pdu/l). De gemiddelde concentraties infectieuze enterovirussen en reovirussen waren respectievelijk 2 (1-2) and 0.3 (0.2-0.5) plaque vormende units (pvu) per liter voor het Maasstroomgebied. Norovirussen lijken net als enterovirussen vooral in de winter in water te worden aangetroffen. De piekverontreinigingen van het oppervlaktewater afkomstig van lozingen van (on)gezuiverd afvalwater besmet met virussen vormen een mogelijk probleem voor de drinkwaterzuivering.

Uit de virusconcentraties in het ruwe water en het gestelde acceptabele infectierisico van minder dan één per 10.000 personen per jaar moet volgens het huidige Nederlandse Waterleidingbesluit de benodigde virusreductie door zuiveringsstappen berekend worden. Uit de verzamelde virusgegevens betreffende het Maasstroomgebied is gebleken dat het benodigde zuiveringsrendement voor norovirussen hoger ligt dan eerder werd aangenomen voor de entero- en reovirussen. De ratio tussen de aantallen infectieuze virusdeeltjes en de aantallen virus-RNA bevattende deeltjes zal moeten worden onderzocht.

1. Inleiding

1.1 Wetgeving

Eén van de belangrijkste bedreigingen voor betrouwbaar drinkwater is de aanwezigheid van pathogene micro-organismen. In de EU-richtlijn van 1998 betreffende de kwaliteit van voor menselijke consumptie bestemd water (98/83/EC) staat daarom expliciet vermeld dat deze niet in zodanige hoeveelheden in het water mogen voorkomen dat een gevaar voor de volksgezondheid ontstaat. In het op 9 februari 2001 in werking getreden Nederlandse Waterleidingbesluit is voor enkele micro-organismen een meetverplichting voor het ruwe water opgenomen (Anonymus, 2001). Tevens is hierin opgenomen dat de eigenaar die gebruik maakt van oppervlaktewater voor drinkwaterproductie op basis van gemeten aantallen in het ruwe water en de verwijderingscapaciteit van de zuivering een risicoanalyse dient uit te voeren om aan te tonen dat de gehalten van deze pathogenen in drinkwater zo laag zijn dat het risico lager is dan 1 infectie per 10.000 personen per jaar. Deze toetsing dient in ieder geval uitgevoerd te worden voor de (entero)virussen en de protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia*. Voor de twee laatst genoemde organismen is in de afgelopen 10 jaar veel ervaring opgedaan met het opzetten van een risicoanalyse. Voor virussen is veel minder informatie beschikbaar.

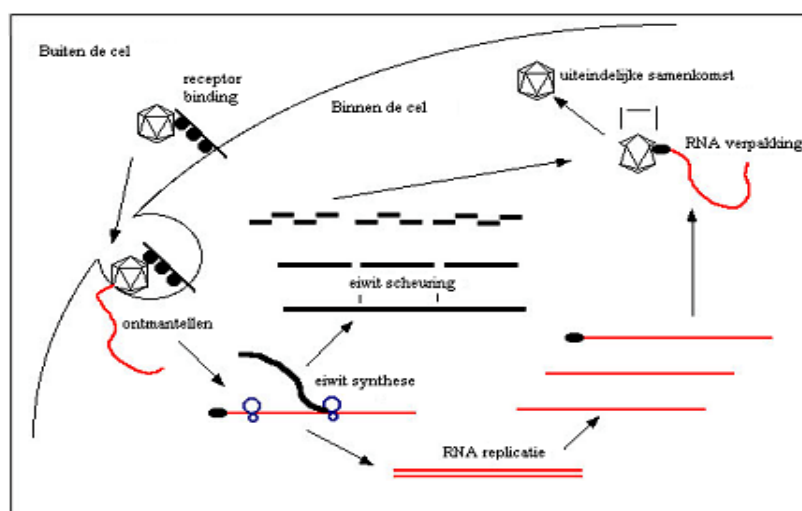
Tabel 1.1. Enterale virussen. De in deze studie onderzochte virussen zijn onderstreept.

Familie	Genus	Virus
Picornaviridae	<u>Enterovirus</u> (EV)	Poliomyelitisvirussen 1-3
		Coxsackievirussen A/B
		ECHO-virus
		Enterovirus 70-71
		Humaan Enterovirus 68-71
Reoviridae	Hepatovirus	Hepatitis A-virus (HAV)
	<u>Orthoreovirus</u> (ReoV)	Reovirus 1-3
	<u>Rotavirus</u> (HRV)	Rotavirus A-C
Caliciviridae	Sapovirus	Prototype Sapporo
	<u>Norovirus</u> (NoV)	GGI prototype Norwalk
		GGII prototype Lordsdale
Hepatitis E-achtige virussen		Hepatitis E virus (HEV)
Astroviridae	Astrovirus	Humaan Astrovirus (HAstV) 1-5
Adenoviridae	Mastadenovirus	Humaan Adenovirus (HAdV) 1-47
Nidoviridae	Coronavirus	Severe Acute Respiratory Syndrome (SARS) virus

1.2 Wateroverdraagbare pathogene virussen

Virussen die via water overgedragen kunnen worden (Tabel 1.1), behoren tot de grote groep van enterale virussen die worden uitgescheiden in feces (De Roda Husman 2001). Bovendien zijn wateroverdraagbare virussen veelal klein (ongeveer 30 nanometers) zonder envelop waardoor zij relatief stabiel zijn in water. De eigenschappen van de verschillende virussen zijn opgeslagen als enkelstrengs RNA, bijv. calicivirussen, dubbelstrengs RNA, bijv. rotavirussen of enkelstrengs dan wel dubbelstrengs DNA, bijv. adenovirussen. De virussen

infecteren gastheercellen in het maag-darmstelsel na binding aan een specifieke receptor op het oppervlak van de cel (Figuur 1.1). Na infectie kan het genetisch materiaal van het virus vermenigvuldigd worden in de aanwezigheid van gastheerfactoren. Het nieuw gevormde virus RNA of DNA wordt vervolgens verpakt in de virale kapsels waarna de complete virusdeeltjes vrijkomen uit de gastheercel door ontspruiten van virusdeeltjes, bijv. hepatitis A virussen, na versmelting van virus en gastheermembraan of openbreken van de gastheercel zoals bij rota- en reovirussen. Ook enterovirussen komen vrij na lysis van de cel met een typische vermeerdering van 25.000 tot 100.000 virusdeeltjes per cel. De hier besproken enterale virussen infecteren de mens die als gevolg van deze virale infectie ziek kan worden. Het vermeerderingsproces van deze virussen verloopt gastheerafhankelijk, wat betekent dat zij zich niet in het water kunnen vermenigvuldigen.



Figuur 1.1. Virusreproductie.

Water kan besmet raken met deze virussen doordat feces van geïnfecteerde individuen in het water terecht komt. Enterale virussen kunnen in tegenstelling tot respiratoire virussen relatief resistent zijn tegen inactivatie door variaties in temperatuur en pH, maar zijn relatief gevoelig voor uitdroging. Hierdoor kunnen enterale virussen goed overleven in water en op bepaalde typen voedsel, vooral als dit koel en vochtig bewaard wordt. In de Verenigde Staten werd vastgesteld dat norovirussen (voorheen Norwalk-achtige calicivirussen (NLV) of small round-structured virussen (SRSV)), rotavirussen, astrovirussen en hepatitis A-virussen de belangrijkste nieuwe virale voedselpathogenen zijn van de afgelopen 30 jaar (Tauxe 2002). De meeste van de humane enterale virussen veroorzaken gastro-enteritis klachten, zoals diarree, braken en koorts. Dit betreft met name de noro-, de astro- en de rotavirussen (Tabel 1.2). Andere wateroverdraagbare virussen veroorzaken ernstigere klachten, zoals hersenvliesontsteking (meningitis) die geassocieerd is met entero- en reovirusinfecties (Johansson et al. 1996) of geelzucht (hepatitis) (Koff 1998) dat door de enterale hepatitis virussen (hepatitis virustype A, E en F) veroorzaakt kan worden. De poliovirussen, ook behorend tot de enterovirussen, kunnen in het ernstigste geval zelfs kinderverlamming

(poliomyelitis) veroorzaken. Infectie met adenovirussen kan behalve gastro-enteritis ook oogontsteking (conjunctivitis) of keelontsteking (faryngitis) tot gevolg hebben.

De verspreiding van enterale virussen is wereldwijd, hoewel niet alle virussen endemisch zijn in alle gebieden. Calicivirussen komen veelal epidemisch voor als gevolg van uitbraken na persoon-tot-persoon transmissie of transmissie via voedsel. Dit geldt waarschijnlijk ook voor hepatitis A-virussen (HAV) die ook door homoseksueel contact worden overgedragen. Bovendien worden HAV in Nederland geïntroduceerd door infecties die in het buitenland zijn opgelopen (Bruisten et al. 2001). Enterovirussen circuleren het gehele jaar in de populatie, met pieken van ernstigere enterovirusinfecties die worden gemeld bij de huisarts in de zomerperiode (Schijven et al. 1995).

Tabel 1.2. Wateroverdraagbare virale aandoeningen.

Gastro-enteritis	Meningitis	Hepatitis
Norovirussen	Coxsackievirussen	Hepatitis A-virussen
Sapovirussen	ECHO-virussen	Hepatitis E-achtige virussen
Rotavirussen	Poliovirus 1-3	
Enterovirussen	Reovirussen	Conjunctivitis
Adenovirussen		Adenovirussen
Astrovirussen	Poliomyelitis	ECHO-virussen
Coronavirussen	Poliovirus 1-3	

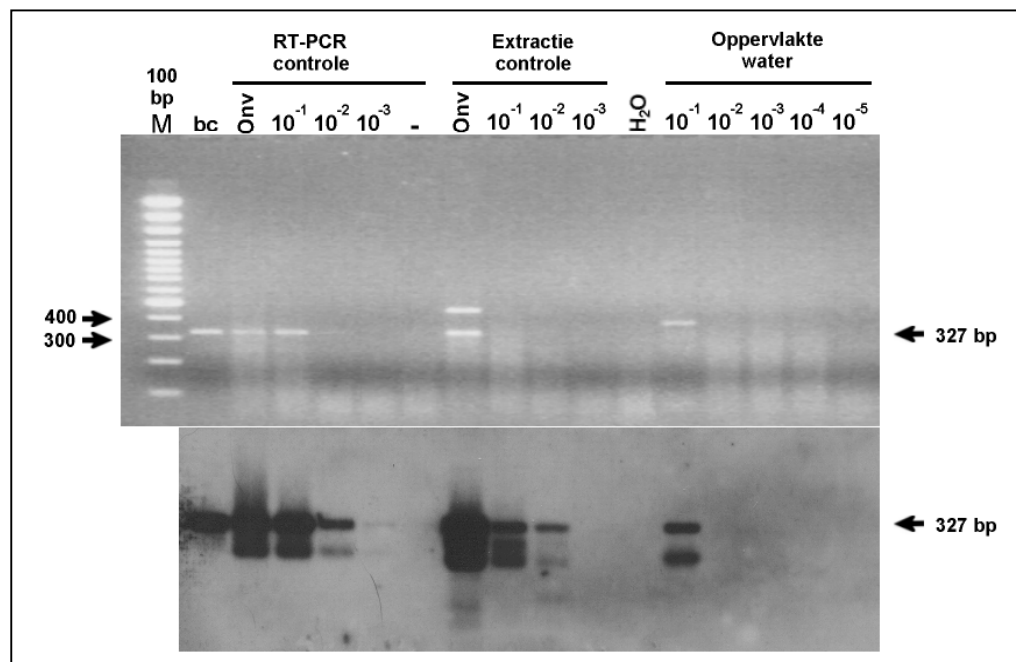
Tallose uitbraken van virale gastro-enteritis en hepatitis zijn beschreven gerelateerd aan met rioolwater besmette schelpdieren of besmet drink- of recreatiewater (Hejkal et al. 1982; Kaplan et al. 1982; Xu et al. 1992; Beller et al. 1997; Brugha et al. 1999; Kukkula et al. 1999; Hafliger et al. 2000; Sundkvist et al. 2000). In Finland wordt het aandeel gastro-enteritis explosies dat aan voedsel en/ of water gerelateerd was geschat op 24% (Lopman et al. 2003). In Nederland is dat aandeel 17% (Lopman, persoonlijke communicatie), maar net als in Finland is vooralsnog onbekend of, en zo ja in welke mate, de populatie via water wordt blootgesteld aan enterale virussen die ziekteverwekkend zijn voor de mens. Wel is bekend dat in Nederland jaarlijks 4 miljoen gastro-enteritis episodes worden doorgemaakt al dan niet veroorzaakt door contact met geïnfecteerde personen of dieren, besmet voedsel of water (De Wit et al. 2001a). Ongeveer 200.000 Nederlanders bezoeken jaarlijks voor hun gastro-enteritis klachten de huisarts (De Wit et al. 2001b). De Wit et al. (2001a,b) lieten zien dat calicivirussen, zowel noro- als sapovirussen, en rotavirussen tot de belangrijkste gastro-enteritis verwekkers in Nederland behoren. Rotavirussen als veroorzaker van gastro-enteritis is met name het geval bij kleine kinderen. Norovirussen komen verdeeld voor over alle leeftijdsgroepen.

1.3 Detectie van virussen in water

Virussen worden in veel lagere concentraties in water aangetroffen dan in feces. Dit bemoeilijkt virus detectie in water. Deze virussen zijn echter vanwege hun hoge infectiviteit (Teunis et al. 1996) ook in deze lage concentraties relevant voor de volksgezondheid. Voor ongezuiverd rioolwater kan volstaan worden met monsters van één liter water of minder,

maar om virussen te kunnen aantonen in gezuiverd oppervlaktewater is het vaak nodig om honderden liters water te onderzoeken. Concentrerings van omvangrijke tot analyseerbare volumes water kan worden bewerkstelligd met behulp van negatieve membraanfiltratie (Van Olphen et al. 1984). Hiertoe worden zouten toegevoegd aan negatief geladen virusdeeltjes in het water waardoor positief geladen complexen worden gevormd. Deze complexen binden aan de negatief geladen filters waardoor een 100-voudige volumereductie kan worden bereikt. Verdere concentratie tot slechts enkele tientallen milliliters kan worden bereikt door een additionele ultrafiltratiestap. Hierbij wordt gebruik gemaakt van filters met een dusdanig kleine poriëgrootte dat zelfs de uiterst kleine virusdeeltjes (~30 nm) deze filters niet kunnen passeren.

Figuur 1.2. RT-PCR-producten afkomstig van tienvoudige virus-RNA-verdunningen die zichtbaar gemaakt zijn met behulp van fluorescentie agarosegel-electroforese en na hybridisatie met een specifieke probe.



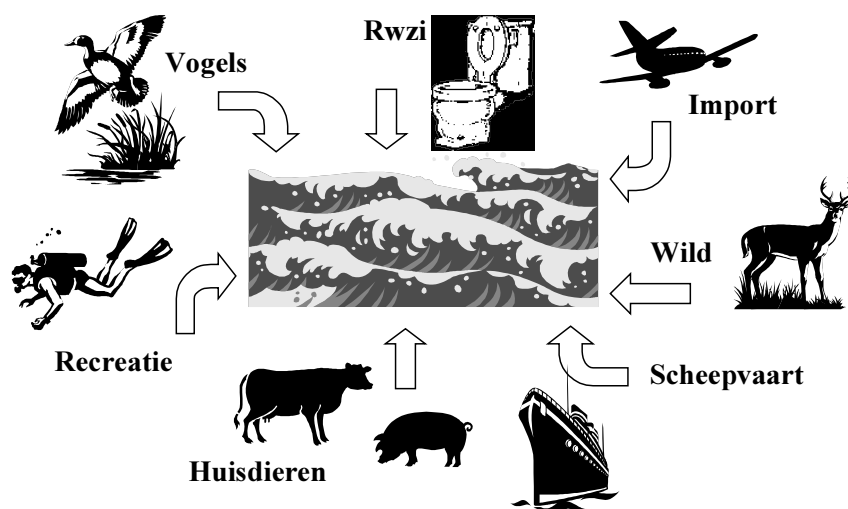
M: 100 bp (100-1400 bp) marker; bc: blotcontrole; RT-PCR controle: positieve controle met toevoeging van een norovirus-bevattend fecesmonster onverdund, 10^{-1} , 10^{-2} en 10^{-3} ; - : negatieve controles zonder toevoeging van RNA; Extractiecontrole: positief fecesmonster onverdund, 10^{-1} , 10^{-2} en 10^{-3} ; H₂O: negatieve controle met toevoeging van steriel water; Oppervlaktewater: onverdund, 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} en 10^{-5} .

Sommige enterale virussen, zoals poliovirus, zijn kweekbaar omdat bepaalde cellijnen gevoelig zijn voor infectie met deze virussen afkomstig uit het geënte concentraat (Dahling and Wright 1986). Voor andere belangrijke virale gastro-enteritis verwekkers, zoals norovirussen, zijn nog geen infecteerbare cellijnen bekend. Sinds enkele jaren zijn methoden beschikbaar waarmee in plaats van het infectieuze virusdeeltje, het genetische materiaal, dus RNA of DNA, van elk willekeurig micro-organisme moleculair kan worden aangetoond. Toepassing van deze moleculaire technieken op concentraat bleek echter niet efficiënt te verlopen, dus werd de ultrafiltratiestap vervangen door een ander concentratieproces: Twee-fasen scheiding met behulp van dextraan en polyethyleenglycol (Lodder et al. 2000).

Toevoeging van silicaballetjes zorgt voor binding en isolatie van het virus-RNA (Boom et al. 1990), waarvan tienvoudige verdunningen enzymatisch worden omgezet in het zogenaamde copy (c) DNA. Het cDNA kan worden vermenigvuldigd tot aantoonbare hoeveelheden met behulp van de “polymerase chain reaction” (PCR). De gegenereerde PCR-producten worden middels agarosegel-electroforese op grootte gescheiden en door toepassing van ethidiumbromide gevisualiseerd (Figuur 1.2). Bevestiging van de specificiteit van de PCR-producten geschiedt door binding van een met fluorescentie gelabeld fragment aan de virussequentie. Virusconcentraties worden berekend door de aan- of afwezigheid te bepalen in (tienvoudige) verdunningsreeksen.

Een alternatief is de detectie van infectieuze bacterievirussen, de zogenaamde bacteriofagen, als indicator-organismen voor humane pathogene virussen. De verscheidenheid aan bacteriofagen is groot, gedeeltelijk bepaald door de verscheidenheid aan gastheerbacteriën. De bacteriofagen kunnen worden verdeeld in verschillende groepen met als voornaamste de somatische colifagen, de F-specifieke fagen en de *Bacteroides* fagen. De somatische colifagen komen in vergelijking met de andere bacteriofagen in de hoogste aantallen voor in Nederlandse oppervlaktewateren. Echter, de F-specifieke fagen zullen eerder een bacterie van humane dan van animale oorsprong als gastheer hebben wat deze fagen tot de meest geschikte indicatoren maakt. Deze kunnen in minder tijd en met beperktere middelen worden aangetoond. Gebleken is dat detectie van bacteriofagen goed kan worden toegepast voor het bepalen van het functioneren van zuiveringsstappen in de drinkwaterbereiding. Ze zijn echter minder geschikt als indicator van de grondstofkwaliteit (Havelaar 1993).

Figuur 1.3. Routes voor fecale besmetting van oppervlaktewater.



1.4 Mogelijke bronnen van humane virussen

Oppervlaktewateren kunnen op uiteenlopende wijzen besmet raken met enterale virussen (Figuur 1.3). De belangrijkste bron is het (on)gezuiverde rioolwater dat in binnen- en buitenland op het oppervlaktewater wordt geloosd. Nederland heeft één van de hoogste

dekkingsgraden van de wereld voor wat betreft aansluiting op een rioolwaterzuiveringsinstallatie (rwzi). Vanwege de hogere aantallen ongezuiverde lozingen in de ons omringende landen is import vanuit het buitenland de belangrijkste bron van enterovirussen in rivierwater (Hoogenboezem 2001; Rutjes en De Roda Husman 2004). Naast overstorten dragen lozingen van ongezuiverd afvalwater door de beroepsvaart, maar ook door pleziervaart en woonboten, bij aan de virale besmetting van oppervlaktewateren. Lozingen van gezuiverd rioolwater vanuit zuiveringsinstallaties zullen leiden tot verhoogde virale belasting van oppervlaktewater, doordat deze zuiveringen veelal niet gedimensioneerd zijn voor virusverwijdering (Hoogenboezem 2001). Ook zouden watersporters, die een symptomatische dan wel asymptomatische infectie doorlopen, het water direct viraal kunnen besmetten door verlies van urine en feces.

Een andere mogelijke virale besmettingsbron van het oppervlaktewater is de afspoeling van mest (Hoogenboezem 2001). Recent is aangetoond dat landbouwhuisdieren, zoals varkens en runderen, geïnfecteerd kunnen zijn met norovirussen of andere enterale virussen. Het RNA van norovirussen dat bij varkens kon worden aangetoond vertoonde grotere overeenkomsten met het RNA van humane norovirussen (Van der Poel, persoonlijke mededeling) dan met norovirus-RNA gevonden bij runderen (Van der Poel et al. 2000). Zoönotische transmissie, dus overdracht van dier naar mens, hoewel niet bewezen, is waarschijnlijker naarmate de virussequenties meer op elkaar lijken. Hepatitis E-virus (HEV)-RNA-sequenties aangetoond bij varkens bleken ook nauw verwant te zijn aan HEV-RNA-sequenties afkomstig van mensen (Van der Poel et al. 2001). Bovendien werden in deze studie op 22% van de varkensbedrijven in Nederland HEV-sequenties aangetoond in gepoolde fecesmonsters. Deze animale virussen zouden door afspoeling van mest in het oppervlaktewater terecht kunnen komen van waaruit ze de mens weer zouden kunnen infecteren. Naast landbouwhuisdieren kunnen ook kleine huisdieren, wild, zoals herten en watervogels, het oppervlaktewater fecaal belasten en op deze wijze zoönotische virussen verspreiden. Infecties met calicivirussen leidend tot gastro-enteritis zijn aangetoond in kat, hond, konijn, nerts en zeeleeuw (Smith et al. 1998). Het kattecalicivirus is aangetroffen in een hond met diarree (Pratelli et al. 2000), maar verder is nog onbekend of deze animale virussen andere dieren of zelfs de mens kunnen infecteren.

1.5 Doel van het onderzoek

Tot voor enkele jaren werden entero- en reovirussen gemeten in een beperkt aantal projecten. Voor allerlei andere (zeer infectieuze en veel voorkomende) virustypen was geen bepalingsmethode beschikbaar. Momenteel zijn voor de humaan pathogene rota- en norovirussen die het merendeel van de gastro-enteritis gevallen in Nederland veroorzaken, moleculair biologische technieken beschikbaar waardoor de virussen in watermonsters kunnen worden aangetoond.

Aangezien de Maas al 25 jaar de belangrijkste rivier is voor de Nederlandse drinkwatervoorziening worden hoge eisen aan de kwaliteit gesteld (Volz et al. 2002). In totaal zijn meer dan 5 miljoen mensen in het Maasstroomgebied voor hun drinkwatervoorziening aangewezen op de Maas. Derhalve zijn in dit rapport de meetgegevens

geïnterviewd waarbij behalve entero- en reovirussen tevens rota- en norovirussen in het stroomgebied van de Maas zijn bepaald met de beschikbaar gekomen methoden. Dit om vast te kunnen stellen in welke mate de Maas verontreinigd is met specifieke humaan pathogene virussen. Analyse van de meetgegevens heeft geleid tot een aantal bevindingen waaronder vaststelling van een aantal hiaten in de kennis nodig voor de wettelijk vereiste kwantitatieve risicoanalyse. Deze zijn tezamen met aanbevelingen voor toekomstig onderzoek in dit rapport opgenomen.

2. MATERIAAL EN METHODEN

2.1 Onderzoekperiode en locaties

De rivier de Maas ontspringt in Frankrijk en heeft een lengte van 850 km. De afvoer van deze regenrivier varieert van 1 tot 3.000 m³/s. Het gehele Maasstroomgebied beslaat 33.000 km² oppervlakte met 7,7 miljoen inwoners. Waterleidingmaatschappij Limburg (WML), Brabant Water (BW; voorheen Waterleidingmaatschappij Oost-Brabant) en Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch (WBB) hebben virusanalyses laten uitvoeren omdat ze (potentieel) water uit de Maas onttrekken voor de productie van drinkwater en/ of huishoudwater. Om de concentraties in de ruwwaterbron vast te kunnen stellen zijn monsters water verzameld bij de innamepunten van de WML, BW en WBB, respectievelijk het Lateraalkanaal bij Linne-Buggenum, het Beatrixkanaal bij Meerhoven en de Bergse Maas bij Keizersveer (Figuur 2.1).

Figuur 2.1. Bemonsteringspunten in het Maasstroomgebied aangegeven met dichte driehoekige symbolen: Van links naar rechts Bergse Maas (WBB), Beatrixkanaal (BW) en Lateraalkanaal (WML); ■ : Verstedelijking; — : Rivieren.



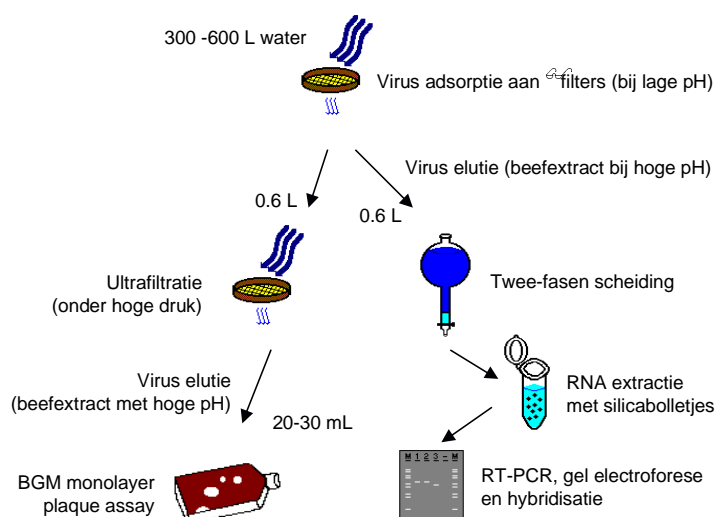
De geanalyseerde virusgegevens zijn in de jaren 1999 tot en met 2002 verkregen (Tabel 3.1). In het winterseizoen '99/ '00 werd het Lateraalkanaal zes maal bemonsterd voor WML en het Beatrixkanaal vier maal voor Brabant Water (voormalig WOB). In 2001 werd de Bergse Maas waaruit WBB water inneemt voor drinkwaterproductie 13 maal bemonsterd.

2.2 Monsterneming

Monsterneming werd verricht zoals beschreven in RIVM SOP MGB/ M154. De hierop volgende concentratie van monsters water en de detectie van virussen met behulp van celkweek- en moleculaire technieken is in Figuur 2.2 schematisch weergegeven.

Oppervlaktewater werd bemonsterd door 300 liter water ter plaatse te filteren met behulp van een conventionele filter adsorptie-elutiemethode waarbij magnesiumchloride gebruikt werd voor binding van het virus aan het filter bij lage pH (3,8). Elutie van virussen van de filters werd gedaan met behulp van beefextract bij hoge pH (9,0). Het uiteindelijke precipitaat werd opgelost en op neutrale pH gesteld waarna dit eluaat gesplitst werd ten behoeve van detectie van kweekbare en niet-kweekbare virussen.

Figuur 2.2. Schematische weergave van de concentratie van monsters water en de detectie van virussen met behulp van celkweek- en moleculaire technieken.



2.3 Detectie van virussen

Voor detectie van kweekbare virussen zoals bacteriofagen en entero- en reovirussen werd tweederde deel van het eluaat met behulp van ultrafiltratie verder geconcentreerd. Met behulp van een beefextract-oplossing werden de bacteriofagen en entero- en reovirussen van het filter gespeld. De geschikte gastheerbacterie werd blootgesteld aan een bepaald deel van dit concentraat. In de aanwezigheid van F-specifieke dan wel somatische bacteriofagen werden na overnachtkweek telbare plaques zichtbaar in het bacteriedek. Ten behoeve van het aantonen van entero- en reovirussen werd een deel van het concentraat op gevoelige apeniercellen geënt. Eventueel opgetreden entero- of reovirusinfecties worden zichtbaar gemaakt met behulp van neutraal rood waardoor virusplaques oplichten in het celdek. De plaques gevormd door infectie met bacteriofagen dan wel entero- en reovirussen werden geteld en de virusconcentratie in het monster werd berekend uit het geanalyseerde volume en het aantal getelde virusplaques. De opbrengst van de tweetraps-filtratie werd berekend door

de bacteriofaagconcentraties in de Bergse Maas zowel direct in water als indirect na concentratie te bepalen (De Roda Husman et al. 2003a).

Voor niet-kweekbare norovirussen en moeilijk kweekbare rotavirussen berust de detectie op moleculair biologische technieken zoals de polymerase ketting reactie (PCR). De eerder beschreven methode wordt hieronder kort toegelicht (Lodder et al. 2000). De ultrafiltratiestap wordt niet toegepast en de virussen uit het eluaat worden verder geconcentreerd met behulp van twee-fasenscheiding. De twee-fasenmethode is gebaseerd op de selectieve verdeling van virussen tussen twee niet-mengbare fasen. Aan eenderde deel van het eluaat werd toegevoegd 1% (w/v) Dextraan T40, 10% (w/v) PEG 6000, 0,2 M NaCl en 10 mM fosfaatbuffer (pH 7,2) en dit mengsel werd 1 uur bij 4 °C geschud. Het monster werd daarna overgebracht naar een scheidrechter, waarin het overnacht bleef staan bij 4 °C. Na deze scheiding werden de onderste fase en interfase opgevangen. De monsters werden opgeschoond met spin-kolom-gel-chromatografie en vervolgens geconcentreerd door ultrafiltratie. Viraal RNA werd geïsoleerd door binding aan silicaboolletjes, gevolgd door wasstappen om het RNA van remmende factoren te ontdoen. Het geïsoleerde RNA werd verdund tot 10^{-5} in tienvoudige verdunningsstappen. Het RNA werd omgezet tot cDNA met behulp van het enzym reverse transcriptase (RT) waarna amplificatie plaatsvond met een thermostabiel polymerase in de PCR. De RT-PCR-producten konden door middel van agarosegel-electroforese en hybridisatie van de RT-PCR-producten met behulp van een fluorescentie gelabelde probe worden gevisualiseerd. Een norovirus-positief fecesmonster werd meegenomen als controle op de RNA-extractie, RT-stap en PCR. RNase-vrij water werd gebruikt als negatieve controle. De efficiëntie van de hybridisatie werd gecontroleerd door een standaard (zogenaamde blotcontrole) aan te brengen op de agarosegel bestaande uit PCR-producten die eerder een positief signaal gaven.

De virusconcentratie in het onverdunde monster kan als “most probable number” berekend worden door gebruik te maken van aan- of afwezigheid van een positief signaal in de verschillende verdunningen van het RNA. Aangenomen wordt dat de monsters die negatief zijn geen RNA bevatten. Door aan te nemen dat het virale RNA random in de goed gemengde oplossing verdeeld is, wordt het gebruik van een Poisson verdeling gerechtvaardigd en kan met behulp van de maximum likelihood methode het aantal deeltjes in het onverdunde RNA monster geschat worden (Mood et al. 1974). Het aantal PCR detecteerbare units (pdu's) in het oorspronkelijke watermonster kan vervolgens berekend worden door dit aantal te delen door het onderzochte volume. Het betrouwbaarheidsinterval geeft de 2,5% en 97,5% grenzen van de geschatte concentratie aan.

3. RESULTATEN

3.1 Virussen in het Maasstroomgebied

In de periode van 1999 – 2002 zijn in opdracht van de WML, BW en WBB virusconcentraties vastgesteld in de respectievelijke ruwwaterbronnen het Lateraalkanaal bij Linne-Buggenum, het Beatrixkanaal bij Meerhoven en de Bergse Maas bij Keizersveer. In 5/6 (83%) van de onderzochte monsters genomen van het Lateraalkanaal konden norovirus-PCR-detecteerbare units (pdu) worden aangetoond (Tabel 3.1). Voor het Beatrixkanaal was dit in 2 van de 10 (20%) monsters het geval en voor 5 van de 13 (38%) Bergse Maasmonsters. In totaal werd in 41% van de monsters norovirus-RNA aangetroffen. Rotavirus-RNA werd aangetoond in slechts één van de in totaal 29 (3,5%) monsters te weten in één monster van het Lateraalkanaal. Infectieuze reovirussen werden gedetecteerd in 22/29 (76%) monsters water waarbij de 6 negatieve monsters alle afkomstig waren van het Beatrixkanaal. F-specifieke bacteriofagen werden ook in 28 van de 29 (97%) monsters aangetoond. In alle monsters (100%) konden infectieuze enterovirussen worden aangetoond. Somatische colifagen werden ook in alle 29 (100%) monsters aangetoond.

Tabel 3.1. Virussen in Maaswater (aantallen positieve monsters en % van totaal).

WLB	WML	BW	WBB	Totaal
Innamepunt	Heel	Meerhoven	Keizersveer	
Water	Lateraalkanaal	Beatrixkanaal	Bergse Maas	
Jaar	1999-2000	1999-2002	2001	
N_{totaal}	6	10	13	29
NoV	5 (83%)	2 (20%)	5 (38%)	12 (41%)
HRV	1 (17%)	0 (0%)	0 (0%)	1 (3,5%)
ReoV	6 (100%)	3 (30%)	13 (100%)	22 (76%)
EV	6 (100%)	10 (100%)	13 (100%)	29 (100%)
SCF	6 (100%)	10 (100%)	13 (100%)	29 (100%)
FSPF	6 (100%)	9 (90%)	13 (100%)	28 (97%)

WLB: Waterleidingbedrijf; N: aantal metingen; NoV: Norovirussen; HRV: Humane rotavirussen; ReoV: Reovirussen; EV: Enterovirussen; SCF: Somatische colifagen; FSPF: F-specifieke fagen.

De hoogste norovirus-RNA-concentratie (673 pdu/l) werd gemeten in een monster van het Lateraalkanaal. De hoogste gemiddelde waarde van 270 pdu/l voor norovirus-RNA werd ook gevonden in dit deel van de Maas (Tabel 3.2). In de Bergse Maas en het Beatrixkanaal waren de gemiddelde waarden respectievelijk 39 en 1 pdu/l. De gemiddelde concentratie norovirus-RNA bij de drie locaties in het Maasstroomgebied was 74 pdu/l. Rotavirus-RNA werd slechts in één van de 29 monsters water van het Maasstroomgebied aangetoond, namelijk in het Lateraalkanaal, in een gemiddelde concentratie van 5 pdu/l.

Wat betreft de enterovirussen werd de hoogste concentratie gemeten in het Beatrixkanaal (15 plaque vormende units (pvu)/l). De hoogste gemiddelde waarde van 3 pvu enterovirussen per liter werd gevonden in het Beatrixkanaal ten opzichte van 2 pvu/l in het Lateraalkanaal en 0,3 pvu/l in de Bergse Maas (Tabel 3.2). De reovirusconcentraties lagen in

dezelfde range met gemiddelde waarden voor de drie locaties variërend tussen 0,1 en 0,8 pvu/l. De gemiddelde enterovirusconcentraties voor het Maasstroomgebied waren een factor 10 hoger dan de reovirusconcentraties (respectievelijk 2 en 0,3 pvu/l).

Tabel 3.2. Virusconcentraties in Maaswater.

Water	Lateraalkanaal	Bergse Maas	Beatrixkanaal	Maasstroomgebied
	Gemiddelde (95% betrouwbaarheidsinterval)			
NoV (pdu ¹ /l ²)	270 (17-2.407)	39 (2-350)	1 (0,04-13)	74 (4-659)
HRV (pdu/l)	22 (1-201)	0 (0-0,8)	0 (0-3)	5 (0,3-43)
ReoV (pvu ³ /l)	0,8 (0,4-1)	0,3 (0,2-0,4)	0,1 (0,09-0,2)	0,3 (0,2-0,5)
EV (pvu/l)	2 (2-3)	0,3 (0,2-0,4)	3 (2-3)	2 (1-2)
SCF (pvu/l)	16.862 (14.746-19.185)	5.843 (5.038-6.737)	168.109 (147.981-190.005)	64.076 (56.337-72.508)
FSPF (pvu/l)	3.717 (3.169-4.331)	1.756 (1.529-2.005)	4.321 (3.659-5.064)	3.046 (2.603-3.541)

¹pdu: PCR-detecteerbare units; ²l Liter; ³pvu: plaque-vormende units; NoV: Norovirussen; HRV: Humane rotavirussen; ReoV: Reovirussen; EV: Enterovirussen; SCF: Somatische colifagen; FSPF: F-specifieke fagen.

De gemiddelde concentratie norovirus-RNA in het Maasstroomgebied was aanmerkelijk hoger (74 pdu/l) dan voor rotavirus-RNA (5 pdu/l), de infectieuze enterovirussen (2 pvu/l) en reovirussen (0,3 pvu/l) (Tabel 3.2) respectievelijk een factor 16, 47 en 223 hoger. De aantallen norovirussen waren significant gecorreleerd met de aantallen reovirussen, maar niet met rotavirussen of enterovirussen (Tabel 3.3). De aantallen rotavirussen waren niet significant gecorreleerd met andere virussen.

Tabel 3.3 Correlaties tussen de virusconcentraties.

	NoV	HRV	ReoV	EV	SCF	FSPF
NoV	1					
HRV	0,30	1				
ReoV	0,41*	-0,025	1			
EV	0,11	0,032	-0,024	1		
SCF	-0,088	-0,038	-0,13	0,11	1	
FSPF	0,11	0,10	-0,044	0,61**	-0,060	1

* p<0,05; **p<0,0005; NoV: Norovirussen; HRV: Humane rotavirussen; ReoV: Reovirussen; EV: Enterovirussen; SCF: Somatische colifagen; FSPF: F-specifieke fagen.

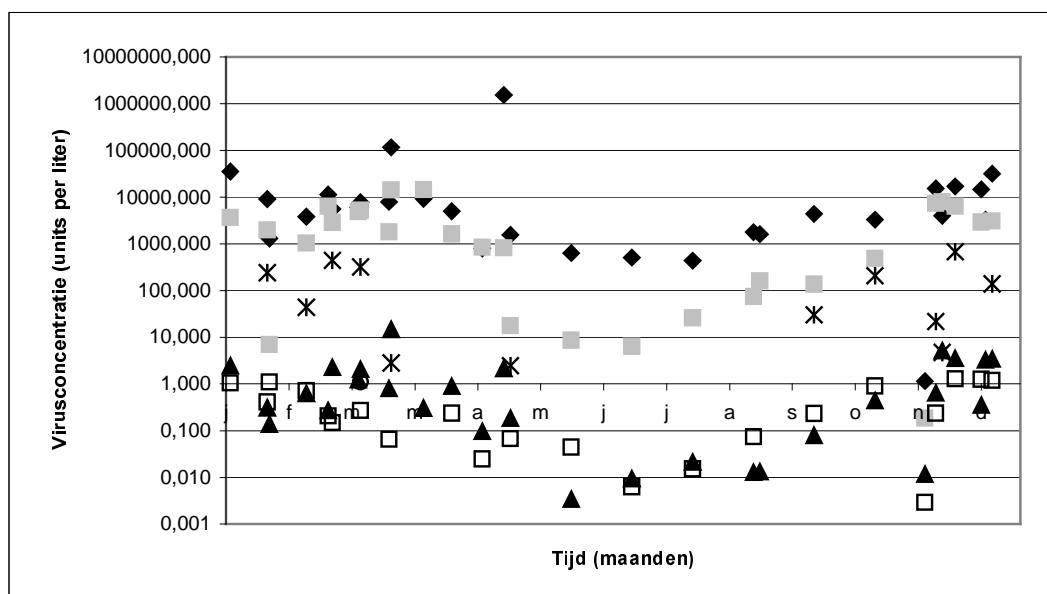
De concentraties somatische colifagen waren zonder uitzondering hoger dan de concentraties F-specifieke fagen. Pearson correlaties lieten zien dat de aantallen F-specifieke fagen significant gecorreleerd waren met de aantallen enterovirussen, maar niet met de andere

virussen (Tabel 3.3). Er werd geen verband gevonden tussen de gehalten somatische fagen en de gehalten van de andere virussen.

3.2 Seizoensvariatie

Bekend is dat enterovirusinfecties in de humane populatie vooral in de zomer voorkomen (Schijven et al. 1995). De hogere temperaturen en het hogere aantal zonuren in de zomer zorgen voor meer virusinactivatie. Om de eventuele seizoensvariaties te kunnen vaststellen voor het Maasstroomgebied werden alle virusmeetresultaten uitgezet in maanden ongeacht het jaar waarin gemeten werd (Figuur 3.1). De meeste meetresultaten werden gegenereerd in de koudere maanden, te weten 66% (19/29) van de monsternemingsdagen vielen in de periode oktober – maart. De infectieuze enterovirussen vertoonden de hoogste waarden aan het begin van de winter en aan het begin van het voorjaar. In de maanden april – september lag de gemiddelde concentratie ongeveer één \log_{10} -eenheid lager dan gemiddeld over de winterperiode.

Figuur 3.1. Virusconcentraties in de tijd. Somatische (zwart) en F-specifieke (wit) fagen zijn weergegeven met vierkantjes, de reo- (zwart) en enterovirussen (wit) met driehoekjes, de norovirussen met sterretjes en de rotavirussen met open cirkels.



Van de 19 monsters genomen in de wintermaanden bevatten 11 (58%) norovirus-RNA. In slechts één van de 10 (10%) monsters genomen in de periode april – september werd norovirus-RNA aangetoond. In de zomerperiode lag het gemiddelde gehalte ongeveer twee \log_{10} -eenheden lager dan in de winter.

4. DISCUSSIE

4.1 Noro- en rotavirussen

Het Nederlands waterleidingbesluit vereist een kwantitatieve infectierisicoschatting voor (entero)virussen. Hoe goed het infectierisico kan worden gekarakteriseerd hangt echter af van de kwantiteit en kwaliteit van de beschikbare gegevens. In de jaren 1999-2002 zijn bij drie verschillende innamepunten voor drinkwaterproductie in het Maasstroomgebied gegevens verzameld over de aanwezigheid van rota- en norovirussen met behulp van de recent ontwikkelde, moleculaire detectiemethoden. Daarnaast werd ook de aanwezigheid van de klassieke kweekbare entero- en reovirussen onderzocht en de bacterievirussen somatische en F-specifieke fagen.

Noro- en rotavirussen behoren tot de voornaamste gastro-enteritis verwekkers in Nederland. In 41% van de 29 monsters innamewater genomen uit de Maas in de jaren 1999-2001 werd norovirus-RNA aangetroffen in vergelijking met slechts één rotavirus-RNA positief monster. Eén verklaring voor het lagere aantal rotavirus-positieve monsters in vergelijking met norovirussen zou kunnen zijn dat de rotavirussen met name gastro-enteritis bij kleine kinderen veroorzaken, terwijl norovirus-infecties alle leeftijdsgroepen treffen. In water zouden rotavirussen dientengevolge minder worden aangetroffen aangezien de meeste virussen in de luiers terecht zullen komen die worden verbrand met het vaste afval. Norovirussen zullen veelal via lozing van (on)gezuiverd rioolwater het oppervlaktewater besmetten.

In de Rijn bij Lobith werd in 2002 in een vergelijkbaar percentage monsters norovirus-RNA aangetroffen, te weten 40% (De Roda Husman et al. 2004). Rotavirus-RNA werd in drie van de 10 onderzochte monsters van de Rijn aangetroffen terwijl slechts één van de 29 monsters water van de Maas rotavirus-RNA positief was. Mogelijke verklaringen zijn de lage aantallen geteste monsters en de toegepaste methode. Vanaf 2002 werd voor de detectie van rotavirussen een ander protocol toegepast (Villena et al. 2003) dan in de jaren ervoor (Husain et al. 1995; Lodder et al. 1999). De monsters genomen uit de Maas in de jaren 1999-2001 zoals beschreven in dit rapport zijn derhalve met het protocol van Husain et al. (1995) geanalyseerd terwijl de monsters van de Rijn volgens het protocol van Villena et al. (2003) zijn onderzocht. Screening van de monsters uit de Rijn met het protocol volgens Husain et al. (1995) en Villena et al. (2003) liet zien dat respectievelijk in geen en één van de eerste vijf monsters rotavirus RNA aangetoond kon worden. Toepassing van deze protocollen op additionele monsters rioolwater en oppervlaktewater liet een duidelijke verbetering zien in de gevoeligheid waarmee rotavirus-RNA in water kon worden aangetoond (Rutjes en De Roda Husman 2004).

De concentraties RNA-bevattende deeltjes werden in de voorgaande studies berekend aan de hand van de aan- of afwezigheid van virus-RNA behulp van een PCR-methode op tienvoudige RNA-verdunningen en de detectiegrens van de methode (Medema 2000; Hoeijmakers en De Roda Husman 2001; De Roda Husman et al. 2003a). Toepassing van deze methode veroorzaakt echter een zekere onzekerheid in de berekening van de

virusconcentratie. Recentelijk zijn kwantitatieve PCR-methoden ontwikkeld voor de detectie van HIV en HCV in bloed maar (nog) niet voor de detectie van entero-, rota- en norovirussen in water (Rutjes en De Roda Husman 2004). Hierbij wordt uitgegaan van de eerste amplificatiecyclus als maat voor de hoeveelheid oorspronkelijk aanwezige RNA- of DNA-bevattende deeltjes ten opzichte van een interne standaard. De specificiteit van de aangetoonde PCR-producten kan worden geconfirmeerd door smeltcurves van de specifieke en geijkte PCR-producten te volgen. De concentratie RNA- of DNA-bevattende deeltjes kan op deze manier zonder verdunningen van het RNA of DNA te maken bepaald worden. Een groot probleem bij de ontwikkeling van kwantitatieve detectiemethoden voor wateroverdraagbare pathogenen blijft de concentratie van de watermonsters voorafgaand aan de detectie met PCR.

Voor wat betreft de detectiegrens van de RT-PCR zoals toegepast voor de norovirussen, deze werd in 1995 vastgesteld op 30 intacte virusdeeltjes door de virusconcentratie in een fecesmonster te tellen met behulp van elektronenmicroscopie en vervolgens verdunningen in de RT-PCR te testen (Koopmans et al. 2000). Echter, norovirusrepliatie geeft aanleiding tot veranderingen in het genomisch materiaal van het virus waardoor nieuwe virusvarianten kunnen ontstaan die soms de potentie hebben de op dat moment dominante variant te verdringen. De eerder bepaalde detectiegrens werd vastgesteld voor de norovirusvariant Gillington. Echter, in de periode 1998-1999 was Lordsdale de belangrijkste norovirusvariant (Lodder et al. 1999) en in de periode 2000-2001 werd GGIIb het meest aangetroffen in Nederland (Van den Berg et al. 2004). Aangezien de detectiegrens voor deze virussen iets zal verschillen en deze virussen veranderen is het beter om van een kans op detectie uit te gaan (Evers en Groennou 1999). Aangenomen wordt dat een positief signaal inhoudt dat tenminste één RNA bevattend virusdeeltje aanwezig was in het oorspronkelijke monster en dat de monsters die alleen negatieve signalen geven geen RNA bevatten. De virusconcentratie in het monster kan dan als "most probable number" berekend worden door gebruik te maken van aan- of afwezigheid van een positief signaal in de verschillende verdunningen van het RNA. Door aan te nemen dat het virale RNA random in de oplossing verdeeld is, wordt het gebruik van een Poisson verdeling gerechtvaardigd en kan met behulp van de maximum likelihood methode het aantal deeltjes in het onverdunde RNA monster geschat worden. Het aantal PCR detecteerbare units (pdu's) in het oorspronkelijke watermonster kan vervolgens berekend worden door dit aantal te delen door het onderzochte volume. Het betrouwbaarheidsinterval geeft de 2,5% en 97,5% grenzen van de geschatte concentratie aan. Het is belangrijk om voor eventuele remming van de PCR door uit het water meegeconcentreerde deeltjes te controleren. Hiertoe dient een interne controle gemaakt te worden, bijvoorbeeld door RNA te maken van een ongerelateerd DNA template dat de betreffende primerlocaties bevat (Pinelli et al. 1999).

De gemiddelde concentratie norovirus-RNA-bevattende deeltjes gevonden voor het Maasstroomgebied was ongeveer $2 \log_{10}$ -eenheden hoger dan voor de infectieuze reovirussen en enterovirussen. Het verschil kan enerzijds verklaard worden doordat de norovirussen moleculair werden aangetoond terwijl de infectieuze entero- en reovirussen met behulp van celkweek werden aangetoond. De plaque methoden blijven de beste kwantitatieve methoden voor detectie van infectieuze virussen in water, maar zijn niet beschikbaar voor de

norovirussen en bovendien tijdrovend en arbeidsintensief. Moleculaire methoden zijn, hoewel door vermeerdering van het aan te tonen virus-RNA erg gevoelig en specifiek, (nog) niet bruikbaar voor het aantonen van infectiviteit. Vergelijking van het aantal infectieuze poliovirusdeeltjes aangetoond met behulp van celkweek en het aantal met PCR aangetoonde poliovirus-RNA-deeltjes liet zien dat de aanwezigheid van één infectieus deeltje gepaard kan gaan met 100 niet-infectieuze deeltjes. Aangezien geen celkweek-technieken beschreven zijn voor humane calicivirussen, zoals norovirussen, is deze ratio niet bekend voor deze virussen. Echter, het kweken van animale calicivirussen is wel mogelijk. Vergelijking van detectie met RT-PCR en celkweek zou kunnen worden uitgevoerd met deze animale virussen als indicatie voor de humane norovirussen. Verder kunnen de animale calicivirussen gebruikt worden om de effectiviteit van zuiveringsprocessen, bijv. desinfectie met ultraviolette straling, te evalueren als indicator voor humane norovirussen (De Roda Husman et al. 2003b). Uit een eerdere studie bleken de gemiddelde concentraties *Cryptosporidium* en *Giardia* (oö)cysten in de Maas stroomafwaarts lager te worden (Hoogenboezem et al. 2001). De laagste norovirus-RNA-concentratie werd echter gemeten in het Beatrixkanaal, de locatie die meer stroomafwaarts is gelegen dan het Lateraalkanaal. Deze gegevens duiden naast aanvoer vanuit het buitenland op een duidelijke toevoer vanuit Nederlandse bronnen. Mogelijk is het aandeel virussen uit het buitenland minder belangrijk dan het aandeel virussen dat stroomafwaarts in Nederland wordt geloosd op de Maas. Bronnen voor virale besmetting van oppervlaktewater zijn directe en indirecte lozingen van ongezuiverd en gezuiverd rioolwater uit binnen- en buitenland en afspoeling van mest van landbouwgrond. Het is voornamelijk onbekend in welke mate norovirussen en rotavirussen vanuit het buitenland via de Maas worden aangevoerd. Metingen in de Maas bij Eijsden waar de rivier Nederland binnenstroomt zouden hierover meer duidelijkheid kunnen geven. Typeringen van norovirussen uit het Maasstroomgebied met sequentieanalyse kunnen informatie geven over de bron als tevens norovirussen afkomstig uit rioolwater en overstorten worden getypeerd en hiermee kunnen worden vergeleken.

4.2 Entero- en reovirussen

De hoogste gemiddelde concentraties entero- en reovirussen in het Maasstroomgebied werden aangetroffen in respectievelijk het Beatrixkanaal en het Lateraalkanaal. Lagere waarden werden gevonden in de Bergse Maas. In vergelijking in 1997-1998 werden 14 monsters uit de Maas bij Eijsden onderzocht op de aanwezigheid van entero- en reovirussen (Hoogenboezem et al. 2001). De gemiddelde waarden waren hier respectievelijk 0,5 en 1,6 pvd/l dus lager dan in het Lateraalkanaal en het Beatrixkanaal maar hoger dan bij Keizersveer. Voor de noro- en rotavirussen zijn de concentraties in de Maas bij Eijsden niet bekend.

Kweekmethoden geven in tegenstelling tot moleculaire methoden informatie over de aanwezigheid van infectieuze virussen in water. Verschillende cellen zijn door aanwezigheid van specifieke receptoren op hun membraan gevoelig voor verschillende virustypen. Van de gebruikte cellijn moet nauwkeurig beschreven zijn welke virussen de cellen kunnen infecteren om van een plaque te weten of deze door een humaan pathogeen virus gevormd is.

Voor de BGM cellijn is beschreven dat deze geïnfecteerd kunnen worden met verschillende humane enterovirussen, te weten coxsackievirustypen A7, A9, A16 en B1-5, echovirustypen 2, 4, 5, 7, 11-15, 17, 19, 21, 24, 25, 27 en poliovirustypen 1-3, en reovirustypen 1-3 (Dahling and Wright 1986). Deze virussen kunnen gastro-enteritis, hersen(vlies)ontsteking of kinderverlamming veroorzaken. Moleculaire methoden zijn geschikt voor snelle en specifieke detectie van humane virussen in water. Een combinatie van kweek- en moleculaire methoden zou uitkomst kunnen bieden door initiële screening van water met snelle PCR-methode bij positieve uitslag gevolgd door beschikbare kweekmethoden (Rutjes en De Roda Husman 2004). Voor rota- en hepatitis A-virussen zouden mogelijk kweekmethoden kunnen worden ontwikkeld aangezien publicaties over gevoelige cellijnen inmiddels verschenen zijn. Of dit tot betrouwbare plaque telmethoden zal kunnen leiden zoals voor BGM cellen het geval is, zal nog moeten blijken, aangezien niet elke cellijn geschikt is om in het strikte monolayer plaque assay regime te passen. Een goed alternatief voor enterovirussen is de zogenaamde celkweek-PCR methode waarbij na één of twee replicatiecycli in gevoelige cellen een PCR wordt uitgevoerd voor snelle en gevoelige detectie van infectieuze virussen in water (Greening et al. 2002). Echter, humane calicivirussen, met name de norovirussen, zijn vooralsnog niet kweekbaar, waardoor PCR methoden zullen moeten worden toegepast. Bovendien zijn moleculaire methoden veel sneller and goedkoper dan kweekmethoden. Kweekmethoden geven echter betrouwbaardere schattingen van de virusconcentraties voor het infectierisico door consumptie van drinkwater dan moleculaire methoden. Kennis over de infectiviteit van virussen leidt vervolgens tot de vraag of infectie tot ziekte zal leiden en of in Nederland daadwerkelijk watergerelateerde aandoeningen voorkomen. Aan de hand van virustypering bij uitbraken van gastro-enteritis en hepatitis kan onderzocht worden of deze al dan niet watergerelateerd zijn. Een dergelijk onderzoek is vorig jaar uitgevoerd in Bokrijk (België) vanwege klachten van gastro-enteritis bij honderden schoolkinderen (Hoebe et al. 2002; 2004). Dezelfde norovirusvariant werd aangetoond in feces van zieke kinderen als ook in het water van een speelfontein. Een andere explosie geassocieerd aan met huishoudwater besmet drinkwater vond plaats aan het einde van 2001 in Utrecht. Door onderdruk in het drinkwaternet en een open verbinding met huishoudwater werden bewoners blootgesteld aan het minder gezuiverde huishoudwater wat naar alle waarschijnlijkheid heeft geleid tot een verhoogde incidentie aan maagdar- en huidklachten (Fernandes et al. 2004). De toegepaste moleculaire methoden voor de detectie van rota- en norovirussen zijn specifiek voor de humane typen en varianten (Vinje and Koopmans 1996; Husain et al. 1995). Dit betekent dat in principe geen virussen werden aangetoond met een gastheer anders dan de mens. Eerder onderzoek heeft aangetoond dat behalve onder mensen, ook onder kleine huisdieren, kat en hond, en landbouwhuisdieren, zoals rund en varken, calicivirussen circuleren (Sugieda et al. 1998; Pratelli et al. 2000; Van der Poel et al. 2001). Er bestaan aanwijzingen dat sommige van deze animale virussen zoönotisch zouden kunnen zijn (ziekteverwekkend voor de mens). De geanalyseerde RNA-sequenties uit mens en dier verschilden zeer weinig van elkaar wat duidt op mogelijke overdracht van de ziekteverwekkende virussen. Echter, het ultieme bewijs voor infectie en ziekte door infectie bij de mens door zoönotische virussen kan alleen worden geleverd in ethisch lastige studies waarbij vrijwilligers deze virussen krijgen toegediend. In Nederland zijn deze studies

ondoenlijk vanwege de vereisten aan de veiligheid. Nader onderzoek naar de mogelijk zoönotische virussen in water moet uitwijzen of het totale aantal pathogene virussen in oppervlaktewater onderschat wordt als alleen de humane virusvarianten worden aangetoond. Onderzoek naar *Cryptosporidium*, *Giardia* en enterovirussen heeft uitgewezen dat afspoeling van mest van landbouwhuisdieren en lozing van dierlijk afvalwater van belang zijn (Hoogenboezem et al. 2001). Ook weten we dat hepatitis E-, noro- en rotavirussen in hoge mate kunnen circuleren onder varkens en runderen. Het aantonen van deze virussen in bijvoorbeeld dierlijke mest en afvalwater zou dus tot meer inzicht kunnen leiden in welke mate het oppervlaktewater belast wordt.

Detectie van virussen in water eist veel meer van de gevoeligheid van technieken dan virusdetectie in bijvoorbeeld fecesmonsters waarin veel hogere virusconcentraties aanwezig zijn. Dit geldt ook voor gevoelige methoden zoals PCR. Met de identificatie van RNA- en DNA- sequenties van steeds meer virusvarianten kunnen de benodigde primers steeds beter worden geselecteerd binnen de complete virussequenties. Bovendien kunnen geconserveerde gebieden in het genetisch virusmateriaal worden geselecteerd voor hele gevoelige screenings-PCR's terwijl juist variabele gedeelten worden uitgekozen voor typering. Deze ontwikkelingen hebben geleid tot implementatie van nieuwe PCR's voor de detectie van zowel rota- als norovirussen (Vennema et al. 2002; Villena et al. 2003). In de onderhavige studie waarin de virusconcentraties in de Maas van 1999 – 2001 zijn vastgesteld, werden nog de minder gevoelige methoden toegepast. Aangezien het mogelijk is virus-RNA te bewaren kunnen dezelfde monsters met de oude en nieuwe methoden vergeleken worden. Deze monsters lijken geschikt om met beide methoden te analyseren vanwege de wisselende aan- en afwezigheid van rota- en norovirussen op de verschillende locaties. Mogelijk wordt met de nieuwe methoden een nog betere indruk verkregen over de hoeveelheid en de typen noro- en rotavirussen in de Maas.

Een mogelijke seizoensvariatie zou naast die voor enterovirussen ook voor noro- en rotavirussen kunnen bestaan in oppervlaktewater vanwege de overeenkomstige omstandigheden zoals verblijftijd, temperatuur en zonlicht. De aantallen metingen die in deze studie zijn uitgevoerd in oppervlaktewater van het Maasstroomgebied in de zomerperiode zijn echter te laag en verdeeld over te veel verschillende locaties om hier conclusies uit te trekken. Naast uitgebreide meetseries in het oppervlaktewater kunnen regelmatige bepalingen in rioolwater inzicht verschaffen in het seizoensvoorkomen. Daarnaast zijn gegevens over de inactivatiesnelheden van noro- en rotavirussen van belang voor de interpretatie van seizoensvariatie van deze virussen in innamewater. Deze eerste waarnemingen wijzen erop dat piekverontreinigingen een belangrijke rol zouden kunnen spelen bij het gezondheidsrisico van virussen in drinkwater. Kennis over de frequentie en de duur van het optreden van piekverontreinigingen is van belang bij het bepalen van de maximale belasting van de zuivering en inzicht in het voorkómen van piekverontreinigingen.

De resultaten voor de aantallen virus-RNA-bevattende en virusplaque-vormende deeltjes laat het optreden van pieken zien. Dit zou het resultaat kunnen zijn van bijvoorbeeld verschillen in virusbelasting, inactivatie en het loslaten van virussen die reversibel aan sediment gebonden waren. De virusdeeltjes die door de beschreven bronnen in het oppervlaktewater terecht kunnen komen, zullen zich onder bepaalde omstandigheden hechten aan andere

deeltjes waardoor ze uitzakken naar de waterbodem (Gerba 1984; Ferguson et al. 2003). Virussen kunnen zich hierdoor ophopen in het sediment. Een deel van de virusdeeltjes zal geïnactiveerd raken terwijl een ander deel onder veranderende omstandigheden in het waterig milieu weer los zal laten waardoor mogelijk piekverontreinigingen kunnen ontstaan (Schijven et al. 2003). Om deze piekverontreinigingen in kaart te kunnen brengen moet een speciaal meetprogramma worden opgesteld.

Piekverontreinigingen stellen nog hogere eisen aan de efficiëntie van de zuiveringstrein dan de gemiddelde virusconcentraties. Uitgaande van de virusconcentraties in het af te leveren water van de WBB in 2001 (De Roda Husman et al. 2003) werd een benodigd zuiveringsrendement berekend voor norovirussen van 7,7 log₁₀-eenheden. Ervan uitgaande dat slechts één van elke honderd deeltjes infectieus was, werd nog 5,5 log₁₀-eenheden reductie vereist om van het afgeleverde water betrouwbaar drinkwater te maken. Echter, deze relatie zou ook lager kunnen zijn. Het benodigde zuiveringsrendement zal dan minimaal 5,5 en maximaal 7,7 log₁₀-eenheden zijn. Hiertoe werd de dosis-respons relatie zoals bekend voor rotavirussen gehanteerd omdat de specifieke relatie voor norovirussen vooralsnog onbekend is. Een gemiddelde zuivering bestaande uit opslag in open bekkens, coagulatie, snelle zandfiltratie en chloor desinfectie zal mogelijk een virusreductie van 4 tot 8,5 log₁₀-eenheden opleveren (Medema en Theunissen 1996). Er bestaat dus grote onzekerheid over voldoende reductie in de zuivering met betrekking tot verwijdering en/ of inactivatie van humane pathogene virussen.

Naast kennis over de ruwwaterkwaliteit met wetenschap over de infectiviteit en menspathogeniciteit van de virussen zijn veel andere gegevens nodig om een betrouwbare infectierisicoschatting voor virussen te kunnen uitvoeren. De effectiviteit van toegepaste zuiveringsstappen op de inactivatie dan wel verwijdering van virussen is van belang als ook de specifieke dosis-respons relaties, opbrengsten van de detectiemethoden en de invloed van onzekerheden en variaties op berekening van het infectierisico. Hier zal de komende jaren nog de nodige inspanning geleverd moeten worden.

5. ONDERZOEKSAANBEVELINGEN

Uit de conclusies kunnen aanbevelingen voor epidemiologisch, methodologisch en biologisch vervolgonderzoek geëxtraheerd worden.

- 1) Het bepalen van de ratio tussen infectieuze en RNA-bevattende virussen met behulp van niet-ziekteverwekkende en kweekbare virussen is één van de belangrijkste onderzoeksvragen die op korte termijn beantwoord zal moeten worden om een realistische risicoschatting te kunnen uitvoeren voor virussen.
- 2) Het ontwikkelen en toepassen van kwantitatieve PCR-methoden voor noro- en rotavirussen zal mogelijk een betrouwbaarder beeld geven van de ruwwaterconcentraties RNA-bevattende virusdeeltjes dan semi-kwantitatieve PCR zoals tot nog toe werd toegepast. Bovendien zal dit leiden tot een snellere en kosten-effectievere methode voor de detectie van virussen in water voor de waterbedrijven.
- 3) Vergelijking van PCR methoden met oude en nieuw ontwikkelde primers en probes voor het aantonen van norovirussen en rotavirussen kan worden uitgevoerd op de bewaarde monsters van het Maaswater uit onderhavige studie.
- 4) Virusbepalingen in de Maas bij Eijsden moeten uitwijzen of import een belangrijke bron is voor noro- en rotavirussen. Deze gegevens kunnen door Belgische waterbedrijven gebruikt worden om een indruk te krijgen van de virusbelasting op hun zuiveringen. Andere mogelijke bronnen die onderzocht zouden moeten worden zijn (on)gezuiverde lozingen van rwzi's stroomopwaarts van innamepunten. Deze activiteit ligt op het pad van RIWA-Maas.
- 5) Naast noro- en rotavirussen kunnen ook sapo- en hepatitis E-virussen ziekte veroorzaken bij de mens. Indien met moleculaire methoden deze virussen kunnen worden aangetoond in afvalwater maar ook oppervlaktewater zal met kweekmethoden moeten worden aangetoond of deze virussen daadwerkelijk infectieus zijn. Voor de humane norovirussen is vooralsnog geen gevoelige cellijn bekend maar aangezien animale calicivirussen oorspronkelijk geïsoleerd uit kat en hond wel kunnen worden gekweekt zal mogelijk in de toekomst ook voor humane calicivirussen een kweekstelsel kunnen worden ontwikkeld.
- 6) Het aandeel watergerelateerde aandoeningen in Nederland moet worden onderzocht. Dit onderzoek moet worden gestimuleerd vanuit de wetgevende en toezichthoudende overheden.
- 7) Het vaststellen van de omvang van het optreden van piekverontreinigingen met ziekteverwekkende virussen is een primaire zorg voor waterleidingbedrijven vanwege mogelijkheden voor preventieve bedrijfsvoering. Ad-hoc metingen van deze virussen in rioolwater bij hevige regenval stroomopwaarts van innamepunten voor drinkwaterproductie zou kunnen bijdragen aan de kennis over het moment van optreden van piekverontreinigingen.
- 8) Het vaststellen van zuiveringsrendementen bij bedrijven met betrekking tot de reductie van virusgehalten is van groot belang voor de risicoanalyse. Een gezamenlijke inspanning

vanuit de sector zal leiden tot een snellere toename van kennis op dit gebied. Ook op het gebied van het vaststellen van de ruwwaterkwaliteit zal een gezamenlijk onderzoeksprogramma meer opleveren dan de individuele inspanning vanuit één bedrijf.

- 9) In het huidige Waterleidingbesluit is opgenomen dat het infectierisico bepaald zal moeten worden voor enterovirussen en indien bekend ook voor andere risicovolle micro-organismen. Het acceptabele risiconiveau wat daarbij gehanteerd wordt is maximaal 1 infectie per 10.000 personen per jaar. Een dergelijke kwantitatieve microbiologische infectierisicoschatting heeft alleen waarde indien de onzekerheden en variatie in het berekende infectierisico kunnen worden aangegeven. Hier ligt duidelijk een rol voor de VROM Inspectie en het RIVM.

Dankwoord

Dit project is door het RIVM uitgevoerd in opdracht van de RIWA Maas. De auteurs zijn dankbaar voor het analyseren van de gegevens door Willemijn Lodder, Harold van den Berg en Ria de Bruin van de Watervirologie groep van het Microbiologisch Laboratorium voor Gezondheidsbescherming van het RIVM. Arie Havelaar en Peter Teunis wordt dank gezegd voor het kritisch lezen van het rapport.

Literatuur

- Anonymus. Besluit tot wijziging van het Waterleidingbesluit. Staatsblad van het Koninkrijk der Nederlanden. Den Haag; 2001.
- Beller M, Ellis A, Lee SH, Drebot MA, Jenkerson SA, Funk E, Sobsey MD, Simmons III OD, Monroe SS, Ando T, Noel J, Petric M, Middaugh JP, Spika JS. Outbreak of viral gastroenteritis due to a contaminated well. *JAMA* 1997;278: 563-568.
- Berg HHJL van den, Lodder WJ, Poel WHM van der, Vennema H, Roda Husman AM de. Genetic diversity of noroviruses in sewage. *Appl Environ Microbiol* 2004.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim van Dillen PM, Noordaa JSO van der. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 1990;28:495-503.
- Brugha R, Vipond IB, Evans MR, Sandifer QD, Roberts RJ, Salmon RL, Caul EO, Mukerjee AK. A community outbreak of food-borne small round-structured virus gastroenteritis caused by a contaminated water supply. *Epidem Infect* 1999;122:145-154.
- Bruisten SM, Steenberg JE van, Pijl AS, Niesters HGM, Doornum GJJ van, Coutinho RA. Molecular epidemiology of hepatitis A virus in Amsterdam, the Netherlands. *J Med Virol* 2001;63:88-95.
- Dahling DR, Wright BA. Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environment. *Appl Env Microbiol* 1986;51:790-812.
- Evers EG, Groenou JT. Berekening van de verwijdering van micro-organismen bij de bereiding van drinkwater. RIVM rapport 734301 016 1999.
- Ferguson CM, Roda Husman AM de, Altavilla N, Deere DA, Ashbolt NA. Fate and transport of pathogens into surface waters of watersheds. *Crit Rev Environ Sci Techn* 2003.
- Fernandes TMA, Schout C, Roda Husman AM de, Eilander A, Vennema H, Duynhoven YTHP van. Accidental contamination of drinking water with partially treated water associated with gastroenteritis in the Netherlands. *Epidemiol Inf* 2004.
- Gerba CP. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv Appl Microbiol* 1984;30:133-168.
- Greening GE, Hewitt J, Lewis GD. Evaluation of integrated cell culture-PCR (C-PCR) for virological analysis of environmental samples. *J Appl Microbiol* 2002;93:745-750.
- Hafliger D, Hubner P, Luthy J. Outbreak of viral gastroenteritis due to sewage-contaminated drinking water. *Int J Food Microbiol* 2000;54:123-126.
- Havelaar AH. Bacteriophages as models of human enteric viruses in the environment: Although imperfect, phages can act as sentinels for a safer water supply. *ASM News* 1993;59(12):614-619.

- Hejkal TW, Keswick BH, LaBelle RL, Gerba CP, Sanchez Y, Dreesman G, Hafkin B, Melnick JL. Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastroenteritis and infectious hepatitis. *JAWWA* 1982;74:318-321.
- Hoebe CIPA, Vennema H, Roda Husman AM de, Duynhoven YTHP van. Unieke watergerelateerde Norwalk-outbreak. *Infectieziekten Bulletin* 2002;13:432-433.
- Hoebe CIPA, Vennema H, Roda Husman AM de, Duynhoven YTHP van. Norovirus outbreak among primary school children who had played in a recreational water fountain. *J Infect Dis* 2004.
- Hoeymakers RTG en Roda Husman AM de. Virusonderzoek Lateraalkanaal. Waterproductiebedrijf Heel. Kiwa rapport 2001;KOA 01.012.
- Hoogenboezem W, Ketelaars HAM, Medema GJ, Rijs GBJ, Schijven JF. Cryptosporidium en Giardia: Voorkomen in rioolwater, mest en oppervlaktewater met zwem- en drinkwaterfunctie. 2001. RIWA/RIVM/RIZA rapport. ISBN 9036953324.
- Husain M, Seth P, Broor S. Detection of group A rotavirus by reverse transcriptase and polymerase chain reaction in faeces from children with acute gastroenteritis. *Arch Virol* 1995;140:1225-1233.
- Johansson PJ, Sveger T, Ahlfors K, Ekstrand J, Svensson L. Reovirus type 1 associated with meningitis. *Scand J Infect Dis* 1996;28:117-120.
- Kaplan JE, Goodman RA, Schonberger LB, Lippy EC, Gary GW. Gastroenteritis due to Norwalk virus: An outbreak associated with a municipal water system. *J Infect Dis* 1982;146:190-197.
- Koff RS. Hepatitis A. *Lancet* 1998;351:1643-1649.
- Koopmans MPG, Vinje J, Wit MAS de, Leenen EJTM, Poel WHM van der, Duynhoven YTHP van. Human enteric caliciviruses in the Netherlands. *J Infect Dis* 2000;181:S262-S269.
- Kukkula M, Maunula L, Silvennoinen E, Bonsdorff CH von. Outbreak of viral gastroenteritis due to drinking water contaminated by Norwalk-like viruses. *J Infect Dis* 1999;180:1771-1776.
- Lodder WJ, Vinje J, Heide R van de, Roda Husman AM de, Leenen EJTM, Koopmans MPG. Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. *Appl Environ Microbiol* 1999;65(12):5624-5627.
- Lodder WJ, Vinje J, Heide R van de, Roda Husman AM de, Koopmans MPG, Leenen EJTM. Detectie van Norwalk-like calicivirussen en rotavirussen in rioolwater in relatie tot explosies van gastro-enteritis. RIVM rapport 289202 025 2000.
- Lopman BA, Reacher MH, Duynhoven YTHP van, Hanon FX, Brown D, Koopmans M. Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000. *Emerg Infect Dis* 2003;9:90-96.
- Medema GJ, Theunissen JJH. Eliminatie van virussen, Cryptosporidium en Giardia door drinkwaterzuiveringsprocessen. RIVM rapport 289202 016 1996.

- Medema GJ. Pathogene micro-organismen in het Beatrixkanaal 2000.
- Mood M, Graybill FA, Boes DC. Introduction to the theory of statistics. Singapore, McGraw-Hill Book Company. 1974.
- Olphen M van, Kapsenberg JG, Baan E van de, Kroon WA. Removal of enteric viruses from surface water at eight waterworks in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol* 1984;47:927-932.
- Pinelli E, Kaaij SY van der, Broeren CP, Ruitenbergh EJ, Rutten VP. Measurement of dog cytokines by reverse transcription-quantitative competitive polymerase chain reaction. *Immunogen* 1999;49(7-8):696-699.
- Poel WHM van der, Vinje J, Heide R van der, Herrera MI, Vivo A, Koopmans MPG. Norwalk-like calicivirus genes in farm animals. *Emerg Infect Dis* 2000;6(1):36-41.
- Poel WHM van der, Verschoor F, Heide R van der, Herrera MI, Vivo A, Kooreman M, Roda Husman AM de. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2001;7:970-976.
- Pratelli A, Greco G, Camero M, Corrente M, Normanno G, Buonavoglia C. Isolation and identification of a calicivirus from a dog with diarrhoea. *New Microbiol* 2000;23:257-260.
- Roda Husman AM de. Virussen in H₂O. *H₂O* 2001;34(8):18-20.
- Roda Husman AM de, Ketelaars HAM, Medema GJ. Microbiologische kwaliteit van het ingenomen en afgeleverde water van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch - 2001. RIVM rapport 330200 002 2003a.
- Roda Husman AM de, Bijkerk P, Lodder WJ, Berg HHJL van den, Pribil W, Cabaj A, Gehringer P, Duizer E, Sommer R. Calicivirus inactivation by non-ionising (UV-253.7 nm) and ionising (gamma) radiation. Abstract IUVA Vienna Austria 2003b.
- Roda Husman AM de, Penders EJM, Krom AP, Bakker GL, Hoogenboezem W. Viruses in the Rhine. RIVM report 330200 003 2004.
- Rutjes SA, Roda Husman AM de. Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001. RIVM rapport 330000 007 2004.
- Schijven JF, Annema JA, Nijs ACM de, Theunissen JJH, Medema GJ. Enterovirussen in het oppervlaktewater in Nederland - Emissie en verspreiding berekend. RIVM rapport 289202 006 1995.
- Schijven JF, Bruin HAM de, Hassanizadeh SM, Roda Husman AM de. Bacteriophages and clostridium spores as indicator organisms for removal of pathogens by passage through saturated dune sand. *Water Res* 2003;37:2186-2194.
- Smith AW, Skilling DE, Cherry N, Mead JH, Matson DO. Calicivirus emergence from ocean reservoirs: Zoonotic and interspecies movements. *Emerg Infect Dis* 1998;4:13-19.
- Sugieda M, Nagaoka H, Kakishima Y, Ohshita T, Nakamura S, Nakajima S. Detection of Norwalk-like virus genes in the caecum contents of pigs. *Arch Virol* 1998;143:1215-

1221.

- Sundkvist T, Hamilton GR, Hourihan BM, Hart IJ. Outbreak of hepatitis A spread by contaminated drinking glasses in a public house. *Commun Dis Public Health* 2000;3:60-62.
- Tauxe RV. Emerging foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol* 2002;78:31-41.
- Teunis PFM, Heijden OG van der, Giessen JWB van der, Havelaar AH. The dose-response relation in human volunteers for gastrointestinal pathogens. RIVM report 284550 002 1996.
- Vennema H, Bruin E de, Koopmans M. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol* 2002;25:233-235.
- Villena C, El-Senousy WM, Abad FX, Pinto RM, Bosch A. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: Emergence of unusual genotypes. *Appl Environ Microbiol* 2003;69:3919-3923.
- Vinje J, Koopmans MPG. Molecular detection and epidemiology of small round-structured viruses in outbreaks of gastroenteritis in the Netherlands. *J Infect Dis* 1996;174:610-615.
- Volz J, Ketelaars H, Wagenvoort A. 50 jaar Maaswaterkwaliteit – Een overzicht. *H₂O* 2002;3:21-26.
- Wit MAS de, Koopmans MPG, Kortbeek LM, Wannet WJB, Vinje J, Leusden F van, Bartelds AIM, Duynhoven YTHP van. Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands, incidence and etiology. *Am J Epidemiol* 2001a;154:666-674.
- Wit MAS de, Koopmans MPG, Kortbeek LM, Leeuwen WJ van, Bartelds AIM, Duynhoven YTHP van. Gastroenteritis in sentinel general practices in the Netherlands. *Emerg Infect Dis* 2001b;1:82-91.
- Xu ZY, Li ZH, Wang JX, Xiao ZP, Dong DX. Ecology and prevention of a shellfish-associated hepatitis A epidemic in Shanghai, China. *Vaccine* 1992;10:S67-S68.

Bijlage 1 Lijst met afkortingen

BW – Brabant Water

cDNA – copy deoxynucleïnezuur

EV – Enterovirussen

FSPF – F-specifieke fagen

GLP – “Good Laboratory Practice”

HAV – Hepatitis A-virussen

HEV – Hepatitis E-virussen

MGB – Microbiologisch Laboratorium voor Gezondheidsbescherming

ml – milliliter

MPN – Most Probable Number

NLV – “Norwalk-like” virussen

NoV – Norovirussen (voorheen NLV)

PAK – Polycyclische Aromatische Koolwaterstoffen

Pdu – PCR-detecteerbare units

PEG – Polyethyleenglycol

PCR – “polymerase chain reaction”

Pvu – plaque-vormende units

ReoV – “Respiratory enteric orphan” virussen

RNA – Ribonucleïnezuur

RIVM – Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu

RT-PCR – “Reverse transcriptase-polymerase chain reaction”

RV - Rotavirussen

SCF - Somatische colifagen

SOP – “Standard operating procedure”

SRSV – “Small Round-Structured Viruses”

WBB - Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch

WOB – Waterleidingmaatschappij Oost-Brabant

WML - Waterleiding Maatschappij Limburg

Bijlage 2 Ruwe data

A. Bacteriofaag- en virusbepalingen in geconcentreerd innamewater uit de Bergse Maas bij Keizersveer.

Parameter	F-specifieke fagen		Somatische fagen		Enterovirussen		Reovirussen		Norovirussen		Rotavirussen	
Laboratorium	RIVM		RIVM		RIVM		RIVM		RIVM		RIVM	
Kenmerk	Telling	Volume	Telling	Volume	Telling	Volume	Telling	Volume	Verdunning	Volume	Verdunning	Volume
Eenheid	Aantal	liter	Aantal	liter	Aantal	liter	Aantal	liter	Positief	liter	Positief	liter
Datum												
22-1-01	626	0,31	260	0,029	28	90,2	37	90,2	1E-2	1,1	Negatief	2,5
19-2-01	185	0,029	331	0,029	53	197,4	41	197,4	Negatief	1,0	Negatief	2,5
19-3-01	380	0,21	165	0,021	49	61,0	4	61,0	Negatief	0,69	Negatief	1,7
17-4-01	720	0,44	217	0,043	34	38,0	9	38,0	Negatief	1,3	Negatief	3,2
14-5-01	46	2,6	40	0,026	33	177,4	12	177,4	Onverdund	0,93	Negatief	2,5
11-6-01	283	33,0	42	0,066	1	293,6	13	293,6	Negatief	1,2	Negatief	2,8
9-7-01	286	44,5	857	1,7	3	318,6	2	318,6	Negatief	1,2	Negatief	2,8
6-8-01	1299	49,8	160	0,36	7	328,7	5	328,7	Negatief	0,77	Negatief	1,9
3-9-01	249	3,4	55	0,031	4	328,1	23	328,1	Negatief	0,78	Negatief	1,9
1-10-01	452	3,3	130	0,030	25	313,3	73	313,3	1E-1	0,84	Negatief	2,0
29-10-01	200	0,41	136	0,041	63	142,4	129	142,4	1E-2	1,2	Negatief	2,9
26-11-01	131	0,018	299	0,020	60	93,0	22	93,0	1E-1	1,2	Negatief	2,8
17-12-01	256	0,088	128	0,0087	34	96,5	121	96,5	Negatief	0,97	Negatief	2,3

B. Bacteriofaag- en virusbepalingen in geconcentreerd innamewater uit het Lateraalkanaal bij Heel.

Parameter	F-specifieke fagen		Somatische fagen		Enterovirussen		Reovirussen		Norovirussen		Rotavirussen	
Laboratorium	RIVM		RIVM		RIVM		RIVM		RIVM		RIVM	
Kenmerk	Telling	Volume	Telling	Volume	Telling	Volume	Telling	Volume	Verdunning	Volume	Verdunning	Volume
Eenheid	Aantal	liter	Aantal	liter	Aantal	liter	Aantal	liter	Positief	liter	Positief	liter
Datum												
6-12-99	91	0,014	267	0,016	65	18,4	24	18,4	1E-2	0,38	Negatief	0,91
22-12-99	194	0,062	198	0,0062	29	8,4	10	8,4	1E-1	0,18	Negatief	0,44
5-1-00	379	0,10	363	0,010	35	14,3	15	14,3	Negatief	0,32	Negatief	0,78
9-2-00	239	0,23	87	0,023	26	42,0	30	42,0	1E-1	0,58	Negatief	1,4
21-2-00	351	0,12	67	0,012	31	13,5	2	13,5	1E-2	0,58	Negatief	1,4
6-3-00	120	0,023	198	0,025	61	29,6	8	29,6	1E-2	0,80	1E-2	1,9

C. Bacteriofaag- en virusbepalingen in geconcentreerd innamewater uit het Beatrixkanaal bij Meerhoven.

Parameter	F-specifieke fagen		Somatische fagen		Enterovirussen		Reovirussen		Norovirussen		Rotavirussen	
Laboratorium	RIVM		RIVM		RIVM		RIVM		RIVM		RIVM	
Kenmerk	Telling	Volume	Telling	Volume	Telling	Volume	Telling	Volume	Verdunning	Volume	Verdunning	Volume
Eenheid	Aantal	liter	Aantal	liter	Aantal	liter	Aantal	liter	Positief	liter	Positief	liter
Datum												
11-5-99	149	0,18	254	0,00017	28	13,0	0	13,0	Negatief	0,45	Negatief	1,1
6-9-99	341	2,1	336	0,21	2	151,9	0	151,9	Negatief	0,42	Negatief	1,0
29-11-99	144	0,018	80	0,020	76	14,5	0	14,5	Onverdund	0,48	Negatief	1,3
20-3-00	268	0,019	220	0,0019	83	5,6	0	5,6	Onverdund	0,81	Negatief	2,2
5-3-01	175	0,036	241	0,040	43	34,7	0	34,7	Negatief	1,2	Negatief	3,0
4-4-01	86	0,0060	55	0,0060	26	85,0	0	85,0	Negatief	0,51	Negatief	1,2
1-5-01	215	0,26	205	0,26	31	321,6	8	321,6	Negatief	1,0	Negatief	2,4
21-11-01	6	32,1	31	26,9	4	338,9	1	338,9	Negatief	1,1	Negatief	2,6
19-12-01	0	50,0	65	0,020	58	17,7	0	17,7	Negatief	1,2	Negatief	2,8
23-1-02	107	15,2	75	0,057	16	115,5	128	115,5	Negatief	0,042	Negatief	0,10