

# Q-KOORTS-BACTERIE (COXIELLA BURNETII) IN AFVALWATER OP RIOOLWATERZUIVERINGS-INSTALLATIES



RAPPORT

2012  
03

Q-KOORTS-BACTERIE (COXIELLA BURNETII) IN AFVALWATER  
OP RIOOLWATERZUIVERINGSINSTALLATIES

**RAPPORT**

2012

**03**

ISBN 978.90.5773.552.3



Publicaties van de STOWA kunt u bestellen op [www.stowa.nl](http://www.stowa.nl)

# COLOFON

UITGAVE Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer  
Postbus 2180  
3800 CD Amersfoort

AUTEURS Dr. Ing. F.M. Schets, RIVM  
Ing. D.N. de Heer, RIVM  
Ing. H.H.J.L. van den Berg, RIVM  
Dr. A. de Bruin, RIVM

## MET MEDEWERKING VAN

Rene Aarts (rwzi Chaam)  
Piet Cornelissen (rwzi Druten)  
Harold Brouwer (rwzi Druten)  
Herman Limberger (rwzi Dongemond)  
Alex Hop (rwzi Dongemond)  
Bas van Boxel (rwzi Vinkel)

## BEGELEIDINGSCOMMISSIE

Drs. E. Koppenaal, voorzitter (Waterschap Veluwe)  
Ing. H. de Vent (Waterschap Aa en Maas; niet op de foto)  
W. Schigt (Waterschap Aa en Maas)  
Ir. Ing. H. Tamerus (Waterschap de Dommel)  
Ir. W. Legemaat (Waterschap Regge en Dinkel)  
T. Lapré (Waternet)  
Prof. Dr. Ir. D. Heederik (IRAS; niet op de foto)  
Ir. C.A. Uijterlinde (Stowa)



FOTO OMSLAG F.M. Schets

DRUK Kruyt Grafisch Adviesbureau

STOWA STOWA 2012-03

ISBN 978.90.5773.552.3

**COPYRIGHT** De informatie uit dit rapport mag worden overgenomen, mits met bronvermelding. De in het rapport ontwikkelde, dan wel verzamelde kennis is om niet verkrijgbaar. De eventuele kosten die STOWA voor publicaties in rekening brengt, zijn uitsluitend kosten voor het vormgeven, vermenigvuldigen en verzenden.

**DISCLAIMER** Dit rapport is gebaseerd op de meest recente inzichten in het vakgebied. Desalniettemin moeten bij toepassing ervan de resultaten te allen tijde kritisch worden beschouwd. De auteurs en STOWA kunnen niet aansprakelijk worden gesteld voor eventuele schade die ontstaat door toepassing van het gedachtegoed uit dit rapport.

# SAMENVATTING

In 2007 begon in Nederland een grote uitbraak van Q-koorts. Q-koorts is een zoönose, een ziekte van dieren die besmettelijk is voor mensen. De ziekte wordt veroorzaakt door de bacterie *Coxiella burnetii*. In totaal werden in de jaren 2007-2010 meer dan 4000 mensen ziek, vooral in de provincies Noord-Brabant, Gelderland en Limburg. In deze provincies vindt intensieve geitenhouderij plaats. In Nederland zijn geiten en schapen de belangrijkste smettingsbron voor de mens, maar ook koeien, huisdieren, wild en vogels kunnen besmet zijn. Besmette dieren vertonen meestal geen symptomen, behalve het optreden van abortussen en vroeggeboorten. Geïnfecteerde dieren scheiden de bacterie uit met urine, feces, vruchtwater en placentaweefsel. Om de Q-koorts epidemie een halt toe te roepen zijn verschillende maatregelen genomen. Het periodiek testen van de melk van alle melkgeiten- en melkschapebedrijven op de aanwezigheid van *C. burnetii* (de zogenaamde tankmelkmonitor) en een verplichte vaccinatie voor alle melkgeiten en -schapen zijn maatregelen die in 2011 nog steeds van kracht zijn. De meeste geïnfecteerde mensen krijgen geen symptomen, sommigen krijgen milde griepachtige verschijnselen met koorts en bij enkelen heeft de ziekte een ernstig verloop of treden chronische klachten op.

Mensen kunnen besmet raken doordat ze direct in contact komen met besmette dieren, maar ook door het inademen van stofdeeltjes of aerosolen (kleine druppeltjes water in de lucht) met de bacterie. In rioolwaterzuiveringsinstallaties (rwzi's) worden aerosolen gevormd, bijvoorbeeld tijdens het beluchten van actief slib. Wanneer afvalwater van besmette geitenhouderijen op het riool wordt geloosd, kan *C. burnetii* in het afvalwater en aerosolen op rwzi's terecht komen en mogelijk een gezondheidsrisico voor medewerkers vormen. In deze studie is onderzocht of erfelijk materiaal (DNA) van de bacterie aanwezig was in afvalwater op rwzi's in het gebied waar de Q-koorts epidemie zich concentreerde. DNA van *C. burnetii* in monsters afvalwater kan duiden op de aanwezigheid van levende of dode bacteriën. Van maart tot en met juli 2011 werden op vier rwzi's negen keer monsters genomen van het influent en van het actief slib uit (een van ) de beluchtingstank(s). Rwzi Chaam ontvangt het spoelwater van de melkinstallatie van één geitenbedrijf, evenals rwzi Druten. Rwzi Vinkel ontvangt al het afvalwater van één geitenbedrijf en het melkspoelwater van een tweede bedrijf, terwijl rwzi Dongemond al het hoofd- en naspoelwater van één geitenbedrijf ontvangt. Ten tijde van het onderzoek waren deze geitenbedrijven met Q-koorts besmet.

In 39% van de monsters influent en actief slib op de onderzochte rwzi's is DNA van *C. burnetii* aangetroffen, vrijwel altijd in lage concentraties. DNA van *C. burnetii* werd het vaakst gevonden in monsters van rwzi Chaam (n=11/18; 61%), gevolgd door rwzi Dongemond (n=8/18; 44%). In monsters van rwzi Vinkel werd het minst vaak DNA van *C. burnetii* gevonden (n=4/18; 22%), gevolgd door rwzi Druten (n=5/18; 28%). DNA van *C. burnetii* werd in 44% (n=16/36) van de monsters influent aangetoond en in 36% (n=13/36) van de monsters uit de beluchtingstanks. Het hoogste percentage besmette monsters werd in maart 2011 gevonden, samenvallend met het lammerseizoen, waarin besmette geiten tijdens het lammeren grote hoeveelheden *C. burnetii* uitscheiden. Het laagste percentage besmette monsters werd in mei 2011 gevonden, dit zou kunnen samenhangen met het ten einde lopen van het lammerseizoen, maar ook met voortgaande vaccinatie.

Doordat geen referentiemonsters in Q-koorts-vrije gebieden onderzocht zijn, kan niet met zekerheid gezegd worden of de aangetroffen hoeveelheden *C. burnetii* DNA uit afvalwater van met Q-koorts besmette geitenhouderijen afkomstig zijn, of dat dit het normale achtergrondniveau van dit DNA in het milieu is. Echter, vanwege de lage concentraties *C. burnetii* DNA die in 2011 in afvalwater op rwzi's gemeten zijn, is het aannemelijk dat het gezondheidsrisico voor personen die met aerosolen op rwzi's in aanraking komen gering is. Deze lage concentraties en het ten einde lopen van de Q-koorts epidemie in Nederland als gevolg van de genomen maatregelen maken het niet zinvol om een vervolgstudie uit te voeren waarin aerosolen worden onderzocht en het risico op besmetting met *C. burnetii* voor medewerkers en omwonenden van rwzi's wordt gekwantificeerd.

Deze studie heeft een methode opgeleverd waarmee *C. burnetii* DNA in monsters afvalwater op rwzi's gedetecteerd kan worden met aandacht voor remming en opbrengst in dergelijke complexe matrices. Mocht de Q-koorts epidemie in Nederland ooit weer opblazen, dan is het zinvol om afvalwater en aerosolen te onderzoeken op rwzi's die lozingen van besmette geitenhouderijen ontvangen en vast te stellen of er via deze route een verhoogd risico op infectie bestaat voor medewerkers en omwonenden van rwzi's of op verdere verspreiding naar het omliggende milieu.

# DE STOWA IN HET KORT

De Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer, kortweg STOWA, is het onderzoeksplatform van Nederlandse waterbeheerders. Deelnemers zijn alle beheerders van grondwater en oppervlaktewater in landelijk en stedelijk gebied, beheerders van installaties voor de zuivering van huishoudelijk afvalwater en beheerders van waterkeringen. Dat zijn alle waterschappen, hoogheemraadschappen en zuiveringsschappen en de provincies.

De waterbeheerders gebruiken de STOWA voor het realiseren van toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk juridisch en sociaal-wetenschappelijk onderzoek dat voor hen van gemeenschappelijk belang is. Onderzoeksprogramma's komen tot stand op basis van inventarisaties van de behoefte bij de deelnemers. Onderzoekssuggesties van derden, zoals kennisinstituten en adviesbureaus, zijn van harte welkom. Deze suggesties toetst de STOWA aan de behoeften van de deelnemers.

De STOWA verricht zelf geen onderzoek, maar laat dit uitvoeren door gespecialiseerde instanties. De onderzoeken worden begeleid door begeleidingscommissies. Deze zijn samengesteld uit medewerkers van de deelnemers, zonedig aangevuld met andere deskundigen.

Het geld voor onderzoek, ontwikkeling, informatie en diensten brengen de deelnemers samen bijeen. Momenteel bedraagt het jaarlijkse budget zo'n 6,5 miljoen euro.

U kunt de STOWA bereiken op telefoonnummer: 033 - 460 32 00.

Ons adres luidt: STOWA, Postbus 2180, 3800 CD Amersfoort.

Email: [stowa@stowa.nl](mailto:stowa@stowa.nl).

Website: [www.stowa.nl](http://www.stowa.nl)

# SUMMARY

From 2007 to 2010, the Netherlands faced a large outbreak of Q-fever, a zoonosis caused by the bacterium *Coxiella burnetii*. In this period, over 4000 persons contracted the disease, mostly in the south-eastern part of the country where large goat dairy farms concentrate. In the Netherlands, goats and sheep are the main reservoir, but cattle, pets, wildlife and birds may also be infected. Infected animals shed the bacterium with their urine, feces and birth products, and are generally asymptomatic except for abortion and prematurity. Various measures were taken to stop the epidemic, of which regular checks of milk from goat and sheep dairy farms, and required vaccination of all milk producing goats and sheep are still in force in 2011.

Human infections may occur through direct contact with infected animals, or through inhalation of dust particles or aerosols containing the bacterium. The aerosol formation during active sludge aeration at sewage water treatment plants (swtpts) is well known. Discharge of waste water from contaminated goat farms may result in the presence of *C. burnetii* in waste water and aerosols at swtpts which may pose a health risk for swtp workers. We studied the presence of *C. burnetii* DNA in waste water at four swtpts in the Q-fever epidemic area by using a multiplex real-time PCR targeting the *C. burnetii* *IS1111* and *com1* genes. Sewage influent and aeration tank samples were taken in March-July 2011; each swtp was sampled nine times. The selected swtpts received waste water from Q-fever contaminated goat farms.

Thirty-nine percent of the influent and active sludge samples contained *C. burnetii* DNA; concentrations were generally low, with only the *IS1111* target positive. Percentage positive samples per swtp were 22-61%. *C. burnetii* DNA was detected in 44% (n=16/36) of the influent samples and in 36% (n=13/36) of the active sludge samples from the aeration tanks. Positive samples were most frequent in March 2011, coinciding with the lambing season, when contaminated goats shed large numbers of *C. burnetii* while giving birth. Positive samples were least frequent in May 2011, possibly related to the ending of the lambing season.

Since no samples from Q-fever free areas were examined, it is not certain whether the detected low levels of *C. burnetii* DNA originate from contaminated goat farms or display the normal background level of this DNA in the environment in the Netherlands. However, the low concentrations detected in waste water at swtpts, indicate that a low health risk for swtp workers is plausible. Our findings and the extinction of the Q-fever epidemic as a result of effective measures, make a follow up study examining aerosols at swtpts and quantifying health risk for swtp workers not opportune at this moment. Whenever the Q-fever epidemic in the Netherlands blazes again, it is recommended to establish whether swtpts receiving waste water from contaminated goat farms contribute to human infections and the spread of *C. burnetii* to the environment. The method generated in this study may be used to start rapid monitoring for *C. burnetii* DNA in complex matrices.

# DE STOWA IN BRIEF

The Foundation for Applied Water Research (in short, STOWA) is a research platform for Dutch water controllers. STOWA participants are all ground and surface water managers in rural and urban areas, managers of domestic wastewater treatment installations and dam inspectors.

The water controllers avail themselves of STOWA's facilities for the realisation of all kinds of applied technological, scientific, administrative legal and social scientific research activities that may be of communal importance. Research programmes are developed based on requirement reports generated by the institute's participants. Research suggestions proposed by third parties such as knowledge institutes and consultants, are more than welcome. After having received such suggestions STOWA then consults its participants in order to verify the need for such proposed research.

STOWA does not conduct any research itself, instead it commissions specialised bodies to do the required research. All the studies are supervised by supervisory boards composed of staff from the various participating organisations and, where necessary, experts are brought in.

The money required for research, development, information and other services is raised by the various participating parties. At the moment, this amounts to an annual budget of some 6,5 million euro.

For telephone contact number is: +31 (0)33 - 460 32 00.

The postal address is: STOWA, P.O. Box 2180, 3800 CD Amersfoort.

E-mail: [stowa@stowa.nl](mailto:stowa@stowa.nl).

Website: [www.stowa.nl](http://www.stowa.nl).



# Q-KOORTS-BACTERIE (COXIELLA BURNETII) IN AFVALWATER OP RIOOLWATERZUIVERINGS- INSTALLATIES

## INHOUD

	SAMENVATTING	
	STOWA IN HET KORT	
	SUMMARY	
	STOWA IN BRIEF	
<b>1</b>	<b>INLEIDING</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>COXIELLA BURNETII IN AFVALWATER</b>	<b>3</b>
<b>2.1</b>	<b>ONDERZOEKS- EN BEMONSTERINGSLOCATIES: KEUZE EN MOTIVATIE</b>	<b>3</b>
<b>2.2</b>	<b>BEMONSTERING: FREQUENTIE EN TECHNIEK</b>	<b>4</b>
<b>2.3</b>	<b>ANALYSES</b>	<b>4</b>
2.3.1	HET OPWERKEN VAN MONSTERS	4
2.3.2	MOLECULAIRE DETECTIE VAN <i>C. BURNETII</i>	5
<b>3</b>	<b>ANALYSERESULTATEN</b>	<b>9</b>
<b>4</b>	<b>DISCUSSIE</b>	<b>13</b>
<b>5</b>	<b>CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN</b>	<b>17</b>
<b>6</b>	<b>LITERATUUR</b>	<b>18</b>
	BIJLAGEN	20
1	LUCHTFOTO'S VAN DE ONDERZOCHE RWZI'S	21
2	RUWE DATA RWZI CHAAM	23
3	RUWE DATA RWZI DRUTEN	24
4	RUWE DATA RWZI VINKEL	25
5	RUWE DATA RWZI DONGEMOND	26

# 1

## INLEIDING

In 2007 werd Nederland geconfronteerd met het begin van een grote uitbraak van Q-koorts, met in totaal in de jaren 2007-2010 meer dan 4000 gemelde humane gevallen (Delsing et al. 2010; Schimmer et al. 2011). De uitbraak concentreerde zich vooral in de provincies Noord-Brabant, Gelderland en Limburg. In deze provincies vindt intensieve geitenhouderij plaats (Delsing et al. 2010). Onderzoek van een cluster patiënten in 2008 toonde een rechtstreeks verband met een geitenboerderij waar een abortusstorm onder de dieren woedde tengevolge van Q-koorts. Uit dit onderzoek bleek het risico op infectie 31 (95% betrouwbaarheidsinterval 16-59) keer zo groot te zijn voor mensen die binnen een straal van 2 km van een geitenboerderij woonden dan voor mensen die er meer dan 5 km vandaan woonden (Schimmer et al. 2010).

Q-koorts is een zoonose (ziekte van dieren die besmettelijk is voor de mens) die veroorzaakt wordt door de bacterie *Coxiella burnetii* (Maurin & Raoult 1999; Raoult et al. 2005). In Nederland zijn geiten en schapen de belangrijkste besmettingsbron voor de mens, maar ook koeien, huisdieren, wild en vogels kunnen besmet zijn. Behalve abortussen en vroeggeboorten, vertonen geïnfecteerde dieren meestal geen symptomen. Geïnfecteerde dieren scheiden de bacterie uit met urine en feces, en vooral bij de geboorte van hun jongen in zeer grote aantallen in het vruchtwater en het placentaweefsel (Maurin & Raoult 1999; LCI 2011). Door uitdroging van deze dierlijke excreta kan de bacterie, die zeer goed bestand is tegen uitdroging (Kazar 2005), via de lucht met stofdeeltjes verspreid worden naar het omliggende milieu en de mens besmetten wanneer deze de besmette stofdeeltjes inademt. De mens kan ook besmet raken door direct contact met (de ingedroogde uitscheidingsproducten van) besmette dieren (Whelan et al. 2011). *C. burnetii* is zeer infectieus, er is slechts een lage dosis nodig om een infectie te veroorzaken (Raoult et al. 2005).

De meeste humane infecties (60%) verlopen zonder symptomen (Raoult et al. 2005) en wanneer wel symptomen optreden zijn dit weinig specifieke milde griepachtige verschijnselen met koorts. In weinig gevallen (2-5%) heeft de acute fase (vroeg infectie) van de ziekte een ernstig verloop. In Nederland heeft ongeveer 25% van de Q-koorts patiënten last van het post-Q-koorts vermoeidheidssyndroom. Bij een klein percentage geïnfecteerden (1-2%) ontwikkelt zich na de acute fase een chronische infectie, dit kan maanden tot jaren later zijn en een chronische infectie kan ook ontstaan na een asymptomatische acute fase. Endocarditis (ontsteking van de hartkleppen) is de meest voorkomende uiting van chronische Q-koorts. (Raoult et al. 2005; Delsing et al 2010; Limonard et al. 2010; LCI 2011).

Om de Q-koorts epidemie in Nederland een halt toe te roepen is een aantal maatregelen genomen. In het najaar van 2008 werd Q-koorts een meldingsplichtige dierziekte (voor melkgeiten- en melkschapenbedrijven met meer dan 50 dieren), werd een verbod op verspreiding van de mest van geïnfecteerde bedrijven afgekondigd en werd vaccinatie van alle niet-drachtige geiten op bedrijven in de besmette regio verplicht. Vaccinatie doet de infectie niet verdwijnen, maar vermindert de massale uitscheiding van *C. burnetii* door geïnfecteerde dieren (Hogerwerf et al. 2011). In 2009 werd gestart met het periodiek testen van

de melk van alle melkgeiten- en melkschapebedrijven op de aanwezigheid van *C. burnetii* (de zogenaamde tankmelkmonitor) en op het hoogtepunt van de epidemie werden alle drachtige dieren op geïnfecteerde bedrijven geruimd en gold er voor die bedrijven een fokverbod. In 2010 werd een verplichte vaccinatie voor alle melkgeiten en -schape ingesteld (Roest et al. 2011). De vaccinatieplicht gold eveneens in 2011. In september 2011 werden de maatregelen tegen Q-koorts versoepeld op basis van advies van deskundigen en omdat alle melkgeiten en -schapebedrijven aan de vaccinatieplicht hadden voldaan ([www.qkoortsinnederland.nl](http://www.qkoortsinnederland.nl), 14-10-2011).

Humane infecties met *C. burnetii* kunnen worden veroorzaakt door inhalatie van de bacterie, door inademen van stofdeeltjes waaraan de bacterie gehecht is, maar ook door inademen van aerosolen waarin de bacterie zich bevindt (Maurin & Raoult 1999). Aerosolen bestaan uit kleine druppeltjes water die zich via de lucht verspreiden. Bij de behandeling van afvalwater in rioolwaterzuiveringsinstallaties (rwzi's) worden verschillende zuiveringstechnieken toegepast waarbij aerosolen gevormd worden. Eerder Stowa-onderzoek toonde aan dat op veel plaatsen op rwzi's aanzienlijke aerosolvorming optrad. Uit dit onderzoek bleek dat rwzi-medewerkers in verschillende mate aan deze aerosolen werden blootgesteld, afhankelijk van de frequentie en duur van hun werkzaamheden op deze plaatsen (Medema et al. 2002). De aerosolen kunnen pathogene micro-organismen afkomstig uit het afvalwater bevatten. Wanneer bijvoorbeeld afvalwater van besmette geitenhouderijen op het riool wordt geloosd, kan *C. burnetii* in het door rwzi's te behandelen afvalwater terecht komen. Er is weinig bekend over de aanwezigheid van *C. burnetii* in afvalwater en aerosolen van rwzi's en mogelijke gezondheidsrisico's voor rwzi-medewerkers die door inademen van deze aerosolen worden blootgesteld aan pathogenen zoals *C. burnetii*. Het risico op het oplopen van een infectie met Legionella, een eveneens via aerosolen overdraagbaar pathogeen, bleek gering als gevolg van de lage Legionella-concentraties in afvalwater (Medema et al. 2002).

In deze studie is vastgesteld of de beschikbare analytische methoden geschikt waren om de aanwezigheid van *C. burnetii* in de complexe matrix 'afvalwater op rwzi's' te bepalen en is onderzocht of DNA van de bacterie aanwezig was in afvalwater op rwzi's in het gebied waar de Q-koorts epidemie zich concentreerde. Deze informatie kan inzicht geven in de mogelijke rol van afvalwater op rwzi's bij de transmissie van *C. burnetii* naar medewerkers en omwonenden van rwzi's.

# 2

## COXIELLA BURNETII IN AFVALWATER

### 2.1 ONDERZOEKS- EN BEMONSTERINGSLOCATIES: KEUZE EN MOTIVATIE

Binnen deze studie werden monsters afvalwater genomen op rwzi's in gebieden waar in 2008 en 2009 clusters ontstonden van patiënten met Q-koorts in de buurt van geitenhouderijen.

De selectiecriteria die voor het opnemen van rwzi's in de studie gehanteerd werden waren:

- 1 de rwzi dient afvalwater van een of meerdere geitenhouderijen te ontvangen,
- 2 de betreffende geitenhouderij(en) dien(t)(en) positief voor *C. burnetii* te zijn in de tankmelk-monitor,
- 3 de rwzi dient het afvalwater van een betrekkelijk kleine gemeenschap te behandelen omdat dit de verdunningsfactor van het afvalwater van de geitenhouderij(en) verkleint en de kans op detectie van eventueel aanwezige *C. burnetii* vergroot.

De volgende vier rwzi's voldeden aan deze criteria:

- 1 rwzi Chaam, Chaam (Waterschap Brabantse Delta)
- 2 rwzi Druten, Druten (Waterschap Rivierenland)
- 3 rwzi Vinkel, Vinkel (Waterschap Aa en Maas)
- 4 rwzi Dongemond, Oosterhout (Waterschap Brabantse Delta)

Rwzi Chaam ontvangt het melkspoelwater (het water waarmee de melkinstallatie na gebruik wordt gespoeld) van één geitenbedrijf, evenals rwzi Druten. Rwzi Vinkel ontvangt al het afvalwater van één geitenbedrijf en het melkspoelwater van een tweede bedrijf, terwijl rwzi Dongemond al het hoofd- en naspoelwater van één geitenbedrijf ontvangt. Luchtfoto's van de geselecteerde rwzi's zijn opgenomen in Bijlage 1.

Op de geselecteerde rwzi's (Tabel 1) werden monsters genomen van het influent en van het actief slib uit (één van) de beluchtingstank(s). Het influent is het onbehandelde afvalwater dat de rwzi binnenkomt; wanneer met *C. burnetii* besmet afvalwater binnenkomt, is hier de kans het grootst om *C. burnetii* te detecteren. Van dit influent wordt middels een geautomatiseerd systeem met regelmatige tijdsintervallen gedurende 24 uur een klein monster genomen dat wordt opgevangen in een mengvat. Zo ontstaat een debiet-proportioneel homogeen 24-uurs monster waarin concentratiepieken tengevolge van bijvoorbeeld piekbelasting of weersomstandigheden worden opgevangen. Voor dit onderzoek werd op alle rwzi's een monster genomen uit de mengvaten met influent. In de beluchtingstank wordt het influent gemengd met actief slib waarin onder andere bacteriën en enzymen aanwezig zijn. Om het actief slib proces zo effectief mogelijk te laten verlopen wordt belucht. Tijdens de beluchting ontstaan aerosolen en eerder onderzoek heeft aangetoond dat rwzi-medewerkers in de nabijheid van de beluchtingstank het meest worden blootgesteld aan pathogenen of stoffen uit het afvalwater (Medema et al. 2002). In de hier beschreven studie is ervoor gekozen om eerst vast te stellen of *C. burnetii* in influent en actief slib uit de beluchtingstanks kon worden aangetoond. Afhankelijk van de uitkomsten van deze studie kan in een vervolgstudie onderzoek worden uitgevoerd naar de aanwezigheid van *C. burnetii* in aerosolen.

TABEL 1 KARAKTERISTIEKEN VAN DE ONDERZOCHE RIPOOLWATERZUIVERINGSINSTALLATIES (RWZI'S)

rwzi	type	biologische capaciteit i.e.*/dag	hydraulische capaciteit RWA m <sup>3</sup> /uur
Chaan	actief slib	8.450	220
Druten	actief slib	49.000	1.700
Vinkel	actief slib	62.000	2.250
Dongemond	voorbezinking; actief slib	160.000	6.000

\* à 136 gr. Totaal Zuurstof Verbruik (TZV)

## 2.2 BEMONSTERING: FREQUENTIE EN TECHNIEK

Van maart tot en met juli 2011 werden de onder 2.1 genoemde rwzi's elk negen keer bemonsterd. Per keer werden per rwzi steekmonsters van het actief slib uit een beluchtingstank genomen en werden monsters van het influent afgetapt uit het vat waarin 24-uurs monsters werden opgevangen. De monstervolumes bedroegen 500 ml. De bemonstering vond plaats conform NEN-EN-ISO 19458 (Anonymous 2007). De monsters werden direct na bemonstering in een koelbox met smeltend ijs of koelelementen geplaatst en gekoeld naar het RIVM vervoerd. De monsters werden binnen 24-48 uur na bemonstering geanalyseerd.

## 2.3 ANALYSES

### 2.3.1 HET OPWERKEN VAN MONSTERS

De monsters van het influent en het actief slib uit de beluchtingstank werden binnen 5 tot 7 uur na monsternamen in lysisbuffer (NucliSENS easyMAG, BioMerieux, nr. 280134) gebracht volgens onderstaand verdunningsschema:

5 ml influent of actief slib uit beluchtingstank + 20 ml lysisbuffer

1 ml influent of actief slib uit beluchtingstank + 9 ml lysisbuffer

0,2 ml influent of actief slib uit beluchtingstank + 4,5 ml lysisbuffer

De monsters werden overnacht bij 4 °C in de lysisbuffer bewaard. Vervolgens werd aan alle monsters als interne procescontrole 50 µl van een sporensuspensie van *Bacillus thuringiensis* toegevoegd; deze sporensuspensie bevatte  $1.5 \times 10^5$  sporen per 50 µl (Raven Labs, bioTrading Benelux B.V., Mijdrecht; nr. 29730). Deze interne controle diende als controle van de DNA-isolatie en ter vaststelling van de aanwezigheid van de methode remmende stoffen in het monster. Na mengen bleven de monsters 10 minuten bij kamertemperatuur staan om de grove delen te laten uitzakken. Vervolgens werd de bovenstaande vloeistof overgegoten in een schone buis en werd per buis 50 µl silica bolletjes (NucliSENS, easyMAG, Magnetic Silica, BioMerieux, nr. 280133) toegevoegd. Op alle monsters werd een standaard NucliSens Magnetische DNA extractie (BioMerieux) uitgevoerd volgens de instructies van de fabrikant: de vloeistof werd echter na de eerste wasstap met wasbuffer 2 overgebracht naar een schoon buisje. Het verkregen DNA werd opgeslagen bij -20 °C voor latere controle op de aanwezigheid van *C. burnetii* (zie 2.3.2).

Om informatie te verkrijgen over de efficiëntie waarmee DNA van *C. burnetii* uit afvalwater werd geïsoleerd, werd op elke locatie eenmalig aan eenzelfde verdunningsreeks van de monsters afvalwater, zoals onder 2.3.1. beschreven, geïnactiveerde *C. burnetii* toegevoegd. Aan elk monster werd 25 µl celkweekmedium geïnfecteerd met *C. burnetii* (Nine Mile strain RSA 493) toegevoegd. Het geïnfecteerde celkweekmedium werd vooraf in een BSL-3 laboratorium

(Biosafety Level 3 laboratorium waarin het één na hoogste niveau van voorzorgs- en veiligheidsmaatregelen geldt) geïnactiveerd door gedurende 30 minuten te verhitten bij 100 °C. De monsters afvalwater met toegevoegde *C. burnetii* werden verder behandeld zoals beschreven onder 2.3.1 en 2.3.2.

FIGUUR 1

BELUCHTINGSTANK RWZI CHAAM (FOTO: D.N. DE HEER)



### 2.3.2 MOLECULAIRE DETECTIE VAN *C. BURNETII*

Het uit de monsters influent en actiefslib verkregen DNA werd onderzocht op de aanwezigheid van *C. burnetii* DNA door middel van een multiplex real-time PCR (Polymerase Chain Reaction) assay. Dit DNA kan zowel van levende als van dode bacteriën afkomstig zijn, het onderscheid hiertussen kan deze PCR niet maken. De PCR detecteert twee targetsequenties specifiek voor *C. burnetii* (*com1* en *IS1111*) in combinatie met een targetsequentie specifiek voor *B. thuringiensis* (*cry1*), de interne procescontrole. Het target *IS1111* is een multi copy target en komt meerdere keren voor in het genoom van *C. burnetii*, in tegenstelling tot het target *com1* dat een single copy target is en slechts één keer voorkomt in het genoom van *C. burnetii*. Hierdoor zal in positieve monsters altijd meer van het target *IS1111* aanwezig zijn dan van het target *com1* en zullen de Cp-waarden (Crossing point; de PCR-cyclus waarbij de target boven de detectiegrens komt) voor *IS1111* altijd lager zijn dan de Cp-waarden voor *com1*. Bij hogere concentraties van een target zijn minder PCR cycli nodig om een detecteerbaar signaal te krijgen, dit resulteert in een lage Cp-waarde.

De PCR assays werden uitgevoerd op een Roche Lightcycler 480 machine (Roche Diagnostics Nederland B.V, Almere). Per test werd 3 µl van het onverdunde DNA gebruikt. Wanneer remming van de PCR optrad, werd het DNA 10 keer verdund getest. De gebruikte primers en probes zijn weergegeven in Tabel 2, de samenstelling van het reactiemengsel in Tabel 3. Het PCR-programma bestond uit een denaturatiestap van 5 min bij 95 °C, gevolgd door 50 cycli van 5 sec bij 94 °C en 35 sec bij 60 °C voor hechting van de primers (annealing) en verlenging van de DNA-keten (elongatie), en een afkoelstap van 30 sec bij 50 °C (De Bruin et al. 2011).

Naast de genoemde interne controle werd tevens een DNA-isolatie controle meegenomen die alleen bestond uit *B. thuringiensis* sporen (50 µl,  $1.5 \times 10^5$  sporen). De Cp-waarde van deze controle werd vergeleken met de Cp-waarden van de monsters. Wanneer de Cp-waarden van de monsters hoger waren dan die van de DNA-isolatie controle, was sprake van remming door in de betreffende monsters aanwezige stoffen. Van monsters waarin gemiddeld meer dan 3 cycli remming van de PCR optrad, werd een 10-voudige verdunning ingezet om de remmende stoffen kwijt te raken.

Wanneer in een monster alleen een positief signaal voor target *IS1111* gemeten werd, in combinatie met een positief signaal voor de interne controle, werd het monster 'zwak positief' gescoord. Hiermee werd aangegeven dat er weinig DNA van *C. burnetii* in het monster aanwezig was. Wanneer daarnaast ook een positief signaal voor target *com1* gemeten werd, werd het monster 'positief' gescoord. In dergelijke monsters was meer *C. burnetii* DNA aanwezig. Wanneer geen positief signaal voor de interne controle wordt verkregen, kan dit erop duiden dat de DNA-isolatie uit het betreffende monster niet goed is gegaan; in dergelijke gevallen werd het resultaat als 'twijfelachting' gescoord en werd de analyse herhaald. Indien de Cp-waarden van *IS1111* en *com1* heel laag waren (d.w.z. een hoge concentratie *C. burnetii* DNA aanwezig) en er geen positief signaal voor de interne controle werd gemeten, werden de betreffende monsters alsnog 'positief' gescoord, omdat het niet aannemelijk is dat de Cp-waarden zijn ontstaan door een besmetting van buitenaf. Monsters werden negatief gescoord wanneer er geen positieve signalen werden gevonden voor beide *C. burnetii* targets, maar wel een positief signaal voor de interne controle.

TABEL 2

PRIMERS EN PROBES GEBRUIKT VOOR DE DETECTIE VAN *COXIELLA BURNETII* DNA IN MONSTERS AFVALWATER (DE BRUIN ET AL. SUBMITTED A)

primer	basenpaarvolgorde	fabrikant
sIS1pri_f	CGGGTTAAGCGTGCTCAGTAT	Biologio
sISpri_r	TCCACACGCTTCCATCACAC	Biologio
scompri_f	AGCAGCCGCTAAACAAGGAAAAT	Biologio
scompri_r	GTTCTGATAATTGGCCGTCGACAC	Biologio
sBtpri_f	AGTTCGTGTCTGCCGGGTC	Biologio
sBtpri_r	CATGAATGGTTACGCAACCTTCT	Biologio
probe		
Tqpro_sBT (Cy5)	ATC CCT CCT TGT ACG CTG TGA CAC GAA GGA- BHQ2	Metabion
Tqpro_sIS1 (FAM)	AGC CCA CCT TAA GAC TGG CTA CGG TGG AT- BHQ1	Biologio
Tqpro_scom (JOE)	ATG CTT TCC ACG ACG CGC TGC TC- BHQ1	Biologio

FIGUUR 2

BELUCHTINGSTANK RWZI DRUTEN (FOTO: D.N. DE HEER)



TABEL 3

PRIMER EN PROBEMIX (10X GECONCENTREERD) GEBRUIKT VOOR DE DETECTIE VAN *COXIELLA BURNETII* DNA IN MONSTERS AFVALWATER

component	volume
primers (forward & reverse) (100 $\mu$ M) (6x)	4 $\mu$ l per primer
Tqpro_Bt / Cy5 (100 $\mu$ M)	4 $\mu$ l
Tqpro_IS1 / FAM (100 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
Tqpro_com / JOE (100 $\mu$ M)	2 $\mu$ l
TE-buffer	168 $\mu$ l
<b>totaal volume</b>	<b>200 <math>\mu</math>l</b>



FIGUUR 3

MELKINSTALLATIE OP MELKGEITENHOUDERIJ (FOTO: F.M. SCHETS)



## 3

## ANALYSERESULTATEN

In een aantal monsters van het influent en uit de beluchtingstanks op de onderzochte rwzi's werd DNA van *C. burnetii* aangetoond (n=28/72; 39%). In vrijwel alle gevallen werd met PCR alleen een positief signaal voor target *IS1111* gevonden en waren de Cp-waarden relatief hoog. Dit betekent dat in deze monsters slechts een lage concentratie *C. burnetii* DNA aanwezig was. In slechts één monster (influent rwzi Vinkel) werd een positief signaal voor zowel het *IS1111* als het *com1* target gevonden, maar ook hier waren de Cp-waarden relatief hoog. In de Tabellen 4 t/m 7 is voor elke onderzochte rwzi het resultaat per monster aangegeven. Positieve monsters werden het vaakst gevonden op rwzi Chaam (n=11/18; 61%), gevolgd door rwzi Dongemond (n=8/18; 44%); op rwzi Vinkel werd het geringste aantal positieve monsters gevonden (n=4/18; 22%), gevolgd door rwzi Druten (n=5/18; 28%). DNA van *C. burnetii* werd in 44% (n=16/36) van de monsters influent aangetoond en in 36% (n=13/36) van de monsters uit de beluchtingstanks. In Figuur 4 is weergegeven hoe de positieve monsters verdeeld zijn over de bemonsteringdagen. Het hoogste percentage positieve monsters (influent en actief slib uit de beluchtingstanks samengevoegd) werd in maart 2011 gevonden, het laagste percentage in mei 2011. De ruwe analysegegevens zijn opgenomen in Bijlagen 2 t/m 5.

TABEL 4

DE AANWEZIGHEID VAN *COXIELLA BURNETII* DNA IN MONSTERS INFLUENT EN MONSTERS ACTIEF SLIB UIT DE BELUCHTINGSTANK OP RWZI CHAAM

datum bemonstering	influent	beluchtingstank
23-03-2011	zwak positief <sup>1</sup>	zwak positief <sup>1</sup>
30-03-2011	zwak positief <sup>1</sup>	zwak positief <sup>1</sup>
13-04-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>
27-04-2011	negatief <sup>2</sup>	zwak positief <sup>1</sup>
12-05-2011	zwak positief <sup>1</sup>	negatief <sup>2</sup>
23-05-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>
09-06-2011	zwak positief <sup>1</sup>	zwak positief <sup>1</sup>
06-07-2011	zwak positief <sup>1</sup>	zwak positief <sup>1</sup>
20-07-2011	zwak positief <sup>1</sup>	negatief <sup>2</sup>

<sup>1</sup> alleen een positief signaal voor *C. burnetii* target *IS1111*

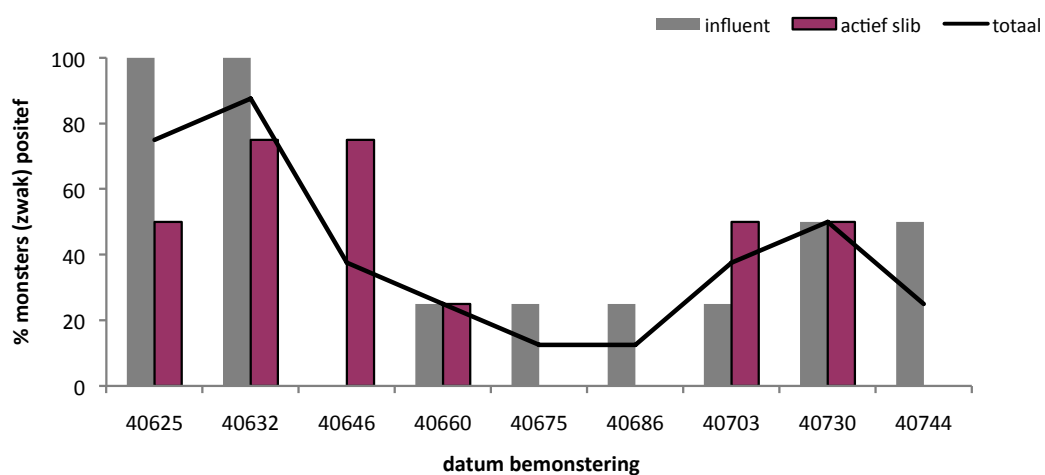
<sup>2</sup> geen *C. burnetii* DNA aangetoond; geen signaal voor *C. burnetii* targets *IS1111* en *com1*

TABEL 5 DE AANWEZIGHEID VAN *COXIELLA BURNETII* DNA IN MONSTERS INFLUENT EN MONSTERS ACTIEF SLIB UIT DE BELUCHTINGSTANK OP RWZI DRUTEN

datum	influent	beluchtingstank
23-03-2011	zwak positief <sup>1</sup>	negatief <sup>2</sup>
30-03-2011	zwak positief <sup>1</sup>	zwak positief <sup>1</sup>
13-04-2011	negatief <sup>2</sup>	zwak positief <sup>1</sup>
27-04-2011	zwak positief <sup>1</sup>	negatief <sup>2</sup>
12-05-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>
23-05-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>
09-06-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>
06-07-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>
20-07-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>

<sup>1</sup> alleen een positief signaal voor *C. burnetii* target *IS1111*

<sup>2</sup> geen *C. burnetii* DNA aangetoond; geen signaal voor *C. burnetii* targets *IS1111* en *com1*

FIGUUR 4 HET PERCENTAGEN MONSTERS INFLUENT EN ACTIEF SLIB UIT BELUCHTINGSTANKS OP RWZI'S WAARIN GEDURENDE DE ONDERZOEKSPERIODE VAN MAART TOT EN MET JULI 2011 DNA VAN *C. BURNETII* WERD AANGETOOND; PER DATUM WERDEN VIER MONSTERS INFLUENT EN VIER MONSTERS UIT BELUCHTINGSTANKS ONDERZOCHT

TABEL 6

DE AANWEZIGHEID VAN *COXIELLA BURNETII* DNA IN MONSTERS INFLUENT EN MONSTERS ACTIEF SLIB UIT DE BELUCHTINGSTANK OP RWZI VINKEL

datum	influent	beluchtingstank
23-03-2011	zwak positief <sup>1</sup>	negatief <sup>2</sup>
30-03-2011	zwak positief <sup>1</sup>	negatief <sup>2</sup>
13-04-2011	negatief <sup>2</sup>	zwak positief <sup>1</sup>
27-04-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>
12-05-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>
23-05-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>
09-06-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>
06-07-2011	zwak positief <sup>1</sup>	negatief <sup>2</sup>
20-07-2011	positief <sup>3</sup>	negatief <sup>2</sup>

<sup>1</sup> alleen een positief signaal voor *C. burnetii* target *IS1111*<sup>2</sup> geen *C. burnetii* DNA aangetoond; geen signaal voor *C. burnetii* targets *IS1111* en *com1*<sup>3</sup> een positief signaal voor *C. burnetii* targets *IS1111* en *com1*

FIGUUR 5

BELUCHTINGSTANK RWZI VINKEL (FOTO: D.N. DE HEER)



TABEL 7

DE AANWEZIGHEID VAN *COXIELLA BURNETII* DNA IN MONSTERS INFLUENT EN MONSTERS ACTIEF SLIB UIT DE BELUCHTINGSTANK OP RWZI DONGEMOND

datum	influent	beluchtingstank
23-03-2011	zwak positief <sup>1</sup>	zwak positief <sup>1</sup>
30-03-2011	zwak positief <sup>1</sup>	zwak positief <sup>1</sup>
13-04-2011	negatief <sup>2</sup>	zwak positief <sup>1</sup>
27-04-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>
12-05-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>
23-05-2011	zwak positief <sup>1</sup>	negatief <sup>2</sup>
09-06-2011	negatief <sup>2</sup>	zwak positief <sup>1</sup>
06-07-2011	negatief <sup>2</sup>	zwak positief <sup>1</sup>
20-07-2011	negatief <sup>2</sup>	negatief <sup>2</sup>

<sup>1</sup> alleen een positief signaal voor *C. burnetii* target IS1111

<sup>2</sup> geen *C. burnetii* DNA aangetoond; geen signaal voor *C. burnetii* targets IS1111 en com1

FIGUUR 6

## BELUCHTINGSTANK RWZI DONGEMOND (FOTO: D.N. DE HEER)



## 4

## DISCUSSIE

In 39% van de monsters influent en actief slib uit de beluchtingstank op de onderzochte rwzi's is DNA van *C. burnetii* aangetroffen. In de meeste gevallen werd met PCR een hoge Cp-waarde (34-39) voor target *IS1111* gevonden, wat betekent dat een groot aantal PCR-cycli nodig was om een detecteerbaar signaal te genereren doordat de concentratie van het *C. burnetii* DNA in de monsters laag was. Controles toonden aan dat de hoge Cp-waarden niet het resultaat waren van remming van de methode. In eerdere studies tijdens de Q-koorts uitbraak werd *C. burnetii* DNA aangetoond in vaginaalwaps, feces en melk van geiten en schapen op besmette bedrijven en stof op oppervlakken op deze bedrijven (De Bruin & Van Rotterdam 2009; De Bruin et al. 2011). Er werd een positief signaal voor targets *IS1111* en *com1* gevonden; de Cp-waarden voor deze targets lagen tussen 27 en 34 (De Bruin et al. *submitted b*), wat aangeeft dat de concentratie *C. burnetii* DNA in deze monsters (aanzienlijk) hoger was dan in de monsters uit de huidige studie.

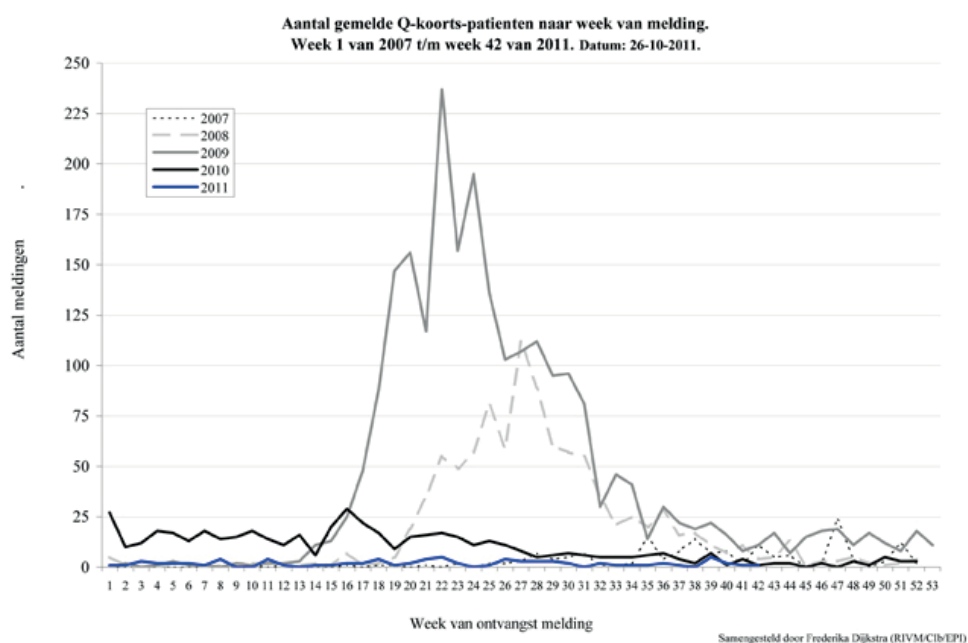
Bij de opzet van de studie is er voor gekozen alleen monsters te nemen in het met Q-koorts besmette deel van Nederland. De kans om buiten dit gebied DNA van *C. burnetii* aan te treffen in influent en actief slib uit beluchtingstanks op rwzi's werd als gering geschat en daarnaast speelden budgettaire en logistieke redenen een rol. Als gevolg van deze keuze is niet duidelijk of de lage concentratie *C. burnetii* DNA in de onderzochte monsters het achtergrondniveau in het milieu weerspiegelt of een verhoging in monsters afvalwater weergeeft ten gevolge van lozingen van Q-koorts besmette geitenhouderijen. Aanwijzingen voor een mogelijk achtergrondniveau van *C. burnetii* DNA werden in 2010 verkregen toen lage concentraties DNA van *C. burnetii* regelmatig werden gevonden in monsters fijnstof (Heederik & IJzermans 2011). Monsters genomen op rwzi's in gebieden waar nauwelijks humane gevallen van Q-koorts en Q-koorts besmette geitenhouderijen worden aangetroffen, zoals het waddengebied, Friesland of Zeeland, hadden hierin enig inzicht kunnen geven<sup>1</sup>. Dit had echter een aanzienlijke onderzoeksinspanning gevergd.

*C. burnetii* overleeft lang (maanden tot jaren) in het milieu (LCI 2011) en wordt waarschijnlijk in belangrijke mate verspreid met aerosolen en stofdeeltjes via de lucht (Raoult et al. 2005; Astobiza et al. 2011). De in Nederland tijdens de Q-koorts epidemie genomen maatregelen zijn er zoveel mogelijk op gericht geweest verspreiding van de bacterie naar het milieu via deze en andere routes te voorkomen, bijvoorbeeld door een mestuitrijverbod en een verbod op het transport van dieren (Roest et al. 2011). Vanwege de veelheid aan mogelijke verspreidingsroutes, onder andere via stof, grond, huid van dieren, wol, bont, ongepasteuriseerde melkproducten (LCI 2011) en afvalwater van geitenhouderijen, is het aannemelijk dat DNA van *C. burnetii* in lage concentraties wijdverspreid gedetecteerd kan worden. Daarbij moet in aanmerking genomen worden dat het met PCR gedetecteerde DNA zowel van levende als van dode bacteriën afkomstig kan zijn. In het laatste geval vormt het *C. burnetii* DNA geen gezondheidsrisico.

1 [http://rivm.nl/Bibliotheek/Wetenschappelijk/Kaarten/Infectieziekten/Kaart\\_gemelde\\_Q\\_koortspatiënten\\_2011](http://rivm.nl/Bibliotheek/Wetenschappelijk/Kaarten/Infectieziekten/Kaart_gemelde_Q_koortspatiënten_2011), 19-10-2011;  
<http://www.vwa.nl/onderwerpen/dierziekten/dossier/q-koorts/kaart-met-overzicht-van-besmette-bedrijven>, 19-10-2011

Vanwege de lage concentraties *C. burnetii* DNA die in 2011 in afvalwater op rwzi's gemeten zijn, is het niet aannemelijk dat het gezondheidsrisico voor personen die met aerosolen op rwzi's in aanraking komen groot is. Zoals aangegeven, zal niet al het gedetecteerde DNA van levende bacteriën afkomstig zijn en een gezondheidsrisico vormen, en niet alle potentieel levende bacteriën vanuit het influent of de beluchtingstank zullen in aerosolen terecht komen. Bovendien maakt het afvalwater van geitenbedrijven, dat binnenkomt bij rwzi's, slechts een deel uit van een grotere stroom afvalwater. Door verdunning zal de concentratie *C. burnetii* in influent en de beluchtingstanks lager zijn dan in het afvalwater wat het geitenbedrijf verlaat. Deze verdunning verkleint de kans om aanwezig *C. burnetii* DNA te detecteren, maar vermindert eveneens de kans op blootstelling.

FIGUUR 7 EPIDEMISCHE CURVE VAN DE Q-KOORTS UITBRAAK IN NEDERLAND (BRON: RIVM<sup>2</sup>)



De hoeveelheid aerosolen die iemand binnenkrijgt houdt verband met de aard en de duur van de werkzaamheden die iemand in de nabijheid van de aerosolvormende processen verricht (Medema et al. 2002). Op basis van de in deze studie gegenereerde gegevens is geen kwantitatieve inschatting van het gezondheidsrisico mogelijk. Echter, de verkregen resultaten (Figuur 4), de hoge vaccinatiegraad van de melkgeiten en -schape en de epidemische curve van het aantal humane Q-koorts gevallen (Figuur 7) geven geen aanleiding tot het doen van vervolgonderzoek waarin het risico op besmetting met *C. burnetii* voor medewerkers van rwzi's wordt gekwantificeerd op basis van aanvullende metingen.

Het opstellen van een risicoschattingsraamwerk voor blootstelling aan pathogenen in aerosolen is echter zinvol, en kan bijvoorbeeld aan de hand van scenario's op basis van geschatte concentraties in hoog epidemische tijden. Een dergelijk raamwerk is behalve voor *C. burnetii* ook toepasbaar voor andere pathogenen die met afvalwater rwzi's kunnen bereiken en door verspreiding met aerosolen een potentieel risico vormen voor medewerkers en omwonenden.

2 [http://rivm.nl/Onderwerpen/Ziekten\\_Aandoeningen/Q/Q\\_koorts](http://rivm.nl/Onderwerpen/Ziekten_Aandoeningen/Q/Q_koorts), 21-11-2011

De gedetecteerde lage concentraties *C. burnetii* DNA in het afvalwater op de onderzochte rwzi's zijn waarschijnlijk het gevolg van de effectiviteit van de genomen maatregelen om de Q-koorts epidemie een halt toe te roepen. Uit de epidemische curve blijkt dat er in 2011 maar weinig humane gevallen van Q-koorts zijn geregistreerd in vergelijking tot de jaren daarvoor (Figuur 7). Het is niet te zeggen of dit het gevolg is van het ruimen van geïnfecteerde drachtige dieren of van de vaccinatie van melkgeiten en -schapen. Ook uit de in juli 2011 gepubliceerde versie van de tankmelkmonitor blijkt dat er een verschuiving heeft plaatsgevonden in het aantal *C. burnetii* positieve bedrijven in vergelijking tot de in januari 2011 gepubliceerde lijst, waarop de onderzoeksplanning en de selectie van rwzi's is gebaseerd.

FIGUUR 8 MET Q-KOORTS BESMETTE GEITEN- EN SCHAPENHOUDERIJEN (BRON: VWA<sup>3</sup>)



3 <http://www.vwa.nl/onderwerpen/dierziekten/dossier/q-koorts/kaart-met-overzicht-van-besmette-bedrijven,28-12-2011>



Er is een aantal bedrijven van de lijst verwijderd en er zijn enkele nieuwe bedrijven toegevoegd; per saldo is het aantal positieve bedrijven gedaald. De situatie in december 2011 is weergegeven in Figuur 8. Het geitenbedrijf dat afvalwater loosde op rwzi Druten kwam in juli 2011 niet meer voor op de lijst, evenals één van de twee bedrijven die afvalwater loosden op rwzi Vinkel. De geitenbedrijven die afvalwater lozen op rwzi Chaam en rwzi Dongemond kwamen nog steeds op de lijst voor. Het wegvallen van een positief bedrijf verklaart mogelijk het feit dat er vanaf eind mei 2011 geen *C. burnetii* DNA meer is aangetroffen in monsters van rwzi Druten.

In de monsters die in maart werden genomen werd het meest frequent DNA van *C. burnetii* aangetroffen. Deze periode valt samen met het lammerseizoen, waarin besmette geiten tijdens de partus grote hoeveelheden *C. burnetii* uitscheiden. In de maanden april en mei werd een gering aantal positieve monsters gevonden, wat zou kunnen samenhangen met het ten einde lopen van het lammerseizoen. De stijging in het aantal positieve monsters vanaf de bemonstering in juni komt grotendeels voor rekening van rwzi Chaam. Uit de lijst met besmette bedrijven (normlijst Q-koorts) blijkt dat in mei en juni een geitenhouderij in Galder en in Strijbeek met Q-koorts besmet zijn geraakt. Deze plaatsen liggen dicht bij Chaam, maar lozen hun afvalwater niet op rwzi Chaam.

Het onderzoek heeft een methode opgeleverd die, door diverse aanpassingen en optimalisatiestappen, geschikt is voor detectie van DNA van *C. burnetii* in de moeilijke matrices influent en actief slib op rwzi's. De hier beschreven methode maakt het mogelijk om in een situatie waarin de Q-koorts epidemie weer opblaait snel met monitoring te starten.

FIGUUR 9

MELKGEITEN IN EEN POTSTAL (FOTO: F.M. SCHETS)



# 5

## CONCLUSIES EN AANBEVELINGEN

- Het DNA van *C. burnetii* is in lage concentraties aangetroffen in influent en actief slib op vier rwzi's in Noord-Brabant en Gelderland. Doordat geen referentiemonsters in Q-koorts-vrije gebieden onderzocht zijn, is niet duidelijk of de gedetecteerde concentraties het achtergrondniveau in het milieu weerspiegelen of een verhoging ten gevolge van de lozing van afvalwater van met Q-koorts besmette geitenhouderijen weergeven.
- Vanwege de lage concentraties *C. burnetii* DNA die in 2011 in afvalwater op rwzi's gemeten zijn, is het aannemelijk dat het gezondheidsrisico voor personen die met aerosolen op rwzi's in aanraking komen laag is, maar op basis van de verkregen resultaten was kwantificering van een potentieel gezondheidsrisico niet mogelijk.
- De verkregen resultaten en het ten einde lopen van de Q-koorts epidemie in Nederland als gevolg van de genomen maatregelen maken het vooralsnog niet zinvol een vervolgstudie uit te voeren waarin het risico op besmetting met *C. burnetii* voor medewerkers en omwonenden van rwzi's wordt gekwantificeerd op basis van de huidige en aanvullende metingen.
- De studie heeft een methode opgeleverd waarmee *C. burnetii* DNA in monsters afvalwater op rwzi's gedetecteerd kan worden met aandacht voor remming en opbrengst in dergelijke complexe matrices. Waardevolle aanvullingen op deze methode zijn: de ontwikkeling en optimalisatie van technieken waarmee onderscheid gemaakt kan worden tussen levende en dode bacteriën, zoals celweek of een levensvatbaarheids-PCR.
- Optimalisatie en validatie van de bemonsteringsprocedure maakt het mogelijk om aerosolen op rwzi's te bemonsteren, bijvoorbeeld door gebruik van andere bemonsteringsapparatuur.
- Mocht de Q-koorts epidemie in Nederland ooit weer oplaaien, dan is het zinvol om het afvalwater op rwzi's die afvalwater van besmette geitenhouderijen ontvangen te onderzoeken en vast te stellen of er via deze route een verhoogd risico op infectie bestaat voor medewerkers en omwonenden van rwzi's of op verdere verspreiding naar het omliggende milieu. Ter voorbereiding hierop is het eveneens zinvol een risicoschattingstraamwerk voor blootstelling van pathogenen in aerosolen op te stellen.

# 6

## LITERATUUR

- Anonymous. 2007. NEN-EN-ISO 19458 Water quality - Sampling for microbiological analysis (ISO 19458:2006,IDT). Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.
- Astobiza I, Barandika JF, Ruiz-Fons F, Hurtado A, Povedano I, Juste RA, García-Pérez AL. 2011. *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Research in Veterinary Science* 91(3): e58-63.
- De Bruin A, Van Rotterdam BJ. 2009. A query for *Coxiella* in veterinary and environmental matrices. Letter report 330291003. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.
- De Bruin A, De Groot A, De Heer L, Bok J, Wielinga PR, Hamans M, Van Rotterdam BJ, Janse I. 2011. Detection of *Coxiella burnetii* in complex matrices by using multiplex quantitative PCR during a major Q fever outbreak in The Netherlands. *Applied and Environmental Microbiology* 77 (18): 6516-6523.
- De Bruin A, Koning M, De Heer L, Van der Plaats RQJ, B.J. Van Rotterdam BJ, Janse I. Detection of *Coxiella burnetii* in the environment during and after a large Q fever epidemic in the Netherlands. Submitted to *Journal of Applied Microbiology*, 2011a.
- De Bruin A, Van der Plaats RQJ, De Heer L, Paauwe R, Schimmer B, Vellema P, Van Rotterdam BJ, Van Duynhoven YTHP. Detection of *Coxiella burnetii* on small ruminant farms during a Q fever outbreak in the Netherlands. Submitted to *Applied and Environmental Microbiology*, 2011b.
- Delsing CE, Kullberg BJ, Bleeker-Rovers CP. 2010. Q fever in the Netherlands from 2007 to 2010. *The Journal of Medicine* 68 (12): 382-387.
- Heederik DJJ, IJzermans CJ (redactie). Mogelijke effecten van intensieve veehouderij op de gezondheid van omwonenden. IRAS Universiteit Utrecht, NIVEL, RIVM, 7 juni 2011.
- Hogerwerf L, van den Brom R, Roest HIJ, Bouma A, Vellema P, Pieterse M, Dercksen D, Nielen M. 2011. Reduction of *Coxiella burnetii* prevalence by vaccination of goats and sheep, the Netherlands. *Emerging Infectious Diseases* 17 (3): 379-386.
- Kazar J. 2005. *Coxiella burnetii* infection. *Annals New York Academy of Sciences* 1063: 105-114.
- LCI. 2011. Richtlijn infectieziektenbestrijding A78: Q-koorts.
- Limonard GJ, Peters JB, Nabuurs-Franssen MH, Weers-Pothoff G, Besselink R, Groot CA, Dekhuijzen PN, Vercoulen JH. 2010. Detailed analysis of health status of Q fever patients 1 year after the first Dutch outbreak: a case-control study. *QJM* 103 (12): 953-958.
- Maurin M, Raoult D. 1999. Q Fever. *Clinical Microbiology Reviews* 12 (4): 518-553.
- Medema GJ, Koot D, Brouwer A. 2002. Risico van blootstelling aan Legionella op rwzi's. Stowa rapport 2002-16. Stowa, Utrecht.
- Raoult D, Marrie TJ, Mege JL. 2005. Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infectious Diseases* 5: 219-226.

Roest HIJ, Hogerwerf L, van der Brom R, Oomen T, van Steen Bergen JE, Nielen M, Vellema P. 2011. Q-koorts in Nederland: stand van zaken, resultaten van veterinaire onderzoek en verwachtingen voor komende jaren. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* 136 (5): 340-343.

Schimmer B, ter Schegget R, Wegdam M, Züchner L, de Bruin A, Schneeberger PM, Veenstra T, Vellema P, van der Hoek W. 2010. The use of a geographic information system to identify a dairy goat farm as the most likely source of an urban Q-fever outbreak. *BMC Infectious Diseases* 10 (69): [www.biomedcentral.com/1471-2334/10/69](http://www.biomedcentral.com/1471-2334/10/69).

Schimmer B, Notermans D, Harms MG, Reimerink JHJ, Bakker J, Schneeberger P, Mollema L, Teunis P, van Pelt W, van Duynhoven Y. 2011. Low seroprevalence of Q fever in the Netherlands prior to a series of large outbreaks. *Epidemiology and Infection* doi:10.1017/S0950268811000136.

Whelan J, Schimmer B, De Bruin A, Van Beest Holle MR, Van der Hoek W, Ter Schegget R. 2011. Visits on 'lamb-viewing days' at a sheep farm open to the public was a risk factor for Q fever in 2009. *Epidemiology and Infection* 11:1-7. [Epub ahead of print]

# BIJLAGEN

BIJLAGE 1

# LUCHTFOTO'S VAN DE ONDERZOCHE TE RWZI'S

**RWZI CHAAM (FOTO: WATERSCHAP BRABANTSE DELTA)**



**RWZI DRUTEN (FOTO: WATERSCHAP RIVIERENLAND)**



**RWZI VINKEL (FOTO: WATERSCHAP AA EN MAAS)**



**RWZI DONGEMOND (FOTO: WATERSCHAP BRABANTSE DELTA)**



## BIJLAGE 2

## RUWE DATA RWZI CHAAM

datum		target				remming	resultaat
		IS1111	IS1111	Com1	Com1		
23-3-2011	influent 5 ml	35,5*	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	35.64	36.14	-	-	-	zwak positief
	influent 0,2 ml	33.83	33.94	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 5 ml (10x)**	34.31	-	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	35.84	-	negatief
30-3-2011	influent 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	34.72	35.16	-	-	-	zwak positief
	influent 0,2 ml	-	36.77	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 1 ml	34,34*	35.08	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
13-4-2011	influent 5 ml	-	-	-	-	+	twijfelachtig
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml (homogeen)	-	n.d.	-	n.d.	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml (uitgezakt)	-	n.d.	-	n.d.	-	negatief
	beluchtingstank 1 ml (homogeen)	-	n.d.	-	n.d.	+	twijfelachtig
	beluchtingstank 1 ml (uitgezakt)	-	n.d.	-	n.d.	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (homogeen) (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (uitgezakt)	-	n.d.	-	n.d.	-	negatief
27-4-2011	influent 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	15,26*	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml (10x)	-	31.29	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	37.05	-	-	-	-	zwak positief
12-5-2011	influent 5 ml (10x)	-	40.23	-	-	-	zwak positief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
23-5-2011	influent 5 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
9-6-2011	influent 5 ml	-	38.52	-	-	-	zwak positief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml	35.19	36.87	-	-	+	zwak positief
	beluchtingstank 0,2 ml	-	36.70	-	-	-	zwak positief
6-7-2011	influent 5 ml	-	36.89	-	-	-	zwak positief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml	36.00	-	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
20-7-2011	influent 5 ml	37.62	36.71	-	-	-	zwak positief
	influent 1 ml	37.31	36.6	-	-	-	zwak positief
	influent 0,2 ml	-	36.66	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 5 ml (10x)	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief

\* systeem fout of onbetrouwbare curve

\*\* (10x): monster 10 x verdund

n.d.: niet getest

zwak positief: alleen een positief signaal voor *C. burnetii* target IS1111negatief: geen *C. burnetii* DNA aangetoond

twijfelachtig: onbetrouwbaar resultaat ivm remming



## BIJLAGE 3

## RUWE DATA RWZI DRUTEN

datum		target				remming	resultaat
		IS1111	IS1111	Com1	Com1		
23-3-2011	influent 5 ml	32.9	32.85	-	-	-	zwak positief
	influent 1 ml	34.24	34.10	-	-	-	zwak positief
	influent 0,2 ml	35.16	34.79	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 5 ml (10x)**	-	-	-	-	+	twijfelachtig
	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	-	-	-	+	negatief
30-3-2011	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	36.52	-	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 5 ml (10x)	-	36.22	-	-	+	twijfelachtig
13-4-2011	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	36.02	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 5 ml	-	-	-	-	+	twijfelachtig
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
27-4-2011	beluchtingstank 5 ml (homogeen)	-	n.d.	-	n.d.	+	twijfelachtig
	beluchtingstank 5 ml (uitgezakt)	-	n.d.	-	n.d.	-	negatief
	beluchtingstank 1 ml (homogeen) (10x)	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml (uitgezakt)	37.00	n.d.	-	n.d.	-	zwak positief
	beluchtingstank 0,2 ml (homogeen) (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (uitgezakt)	-	n.d.	-	n.d.	-	negatief
	influent 5 ml (10x)	-	37.32	-	-	-	zwak positief
12-5-2011	influent 1 ml	36.75	36.32	-	-	-	zwak positief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	+	twijfelachtig
	beluchtingstank 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
23-5-2011	influent 5 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	+	twijfelachtig
	beluchtingstank 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
9-6-2011	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 5 ml	-	37,91*	-	-	-	negatief
	influent 1 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
6-7-2011	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 5 ml	-	-	-	-	+	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
20-7-2011	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml (10x)	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 5 ml	-	-	-	-	-	negatief

\* systeem fout of onbetrouwbare curve

\*\* (10x): monster 10 x verdund

n.d.: niet getest

zwak positief: alleen een positief signaal voor *C. burnetii* target IS1111negatief: geen *C. burnetii* DNA aangetoond

twijfelachtig: onbetrouwbaar resultaat ivm remming

## BIJLAGE 4

## RUWE DATA RWZI VINKEL

datum		target				remming	resultaat
		IS1111	IS1111	Com1	Com1		
23-3-2011	influent 5 ml	34.19	34.46	-	-	-	zwak positief
	influent 1 ml	35.63	34.85	-	-	-	zwak positief
	influent 0,2 ml	36.49	36.59	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 5 ml (10x)**	36.02	-	-	-	+	twijfelachtig
	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	-	-	-	+	twijfelachtig
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	+	negatief
30-3-2011	influent 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	37.13	-	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
13-4-2011	influent 5 ml	-	-	-	-	+	twijfelachtig
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml (homogeen)	-	n.d.	-	n.d.	+	twijfelachtig
	beluchtingstank 5 ml (uitgezakt)	-	n.d.	-	n.d.	-	negatief
	beluchtingstank 1 ml (homogeen) (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 1 ml (uitgezakt)	-	n.d.	-	n.d.	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (homogeen) (10x)	33.96	35.64	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 0,2 ml (uitgezakt)	-	n.d.	-	n.d.	-	negatief
27-4-2011	influent 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	+	twijfelachtig
	beluchtingstank 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
12-5-2011	influent 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
23-5-2011	influent 5 ml	-	-	-	-	+	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
9-6-2011	influent 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
6-7-2011	influent 5 ml (10x)	36.56	37.7	-	-	-	zwak positief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
20-7-2011	influent 5 ml (10x)	35.79	34.83	-	-	-	zwak positief
	influent 1 ml	34.34	35.68	-	36.79	-	positief
	influent 0,2 ml	37.14	-	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 5 ml (10x)	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief

\*\* (10x): monster 10 x verdund

n.d.: niet getest

twijfelachtig: onbetrouwbaar resultaat ivm remming

zwak positief: alleen een positief signaal voor *C. burnetii* target IS1111negatief: geen *C. burnetii* DNA aangetoondpositief: positief signaal voor *C. burnetii* target IS111 en Com1

## BIJLAGE 5

## RUWE DATA RWZI DONGEMOND

datum		target			remming	resultaat	
		IS1111	IS1111	Com1			
23-3-2011	influent 5 ml (steekproef, geen 24-uurs)	35.71	-	-	-	zwak positief	
	influent 1 ml (steekproef, geen 24-uurs)	36.07	-	-	36.55	zwak positief	
	influent 0,2 ml (steekproef, geen 24-uurs)	36.46	-	-	-	zwak positief	
	beluchtingstank 5 ml (10x)**	32,56*	-	-	-	+	twijfelachtig
	beluchtingstank 1 ml	35.70	-	-	-	+	zwak positief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	33,43*	33.30	-	-	-	zwak positief
30-3-2011	influent 5 ml (10x)	36.19	-	-	-	zwak positief	
	influent 1 ml	-	-	-	-	negatief	
	influent 0,2 ml	33.24	33.47	-	-	zwak positief	
	beluchtingstank 5 ml (10x)	35.49	-	-	-	zwak positief	
	beluchtingstank 1 ml	-	35.07	-	-	-	zwak positief
	beluchtingstank 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
13-4-2011	influent 5 ml	-	-	-	-	+	twijfelachtig
	influent 1 ml	-	-	-	-	+	twijfelachtig
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml (homogeen)	34.10	n.d.	-	n.d.	-	zwak positief
	beluchtingstank 5 ml (uitgezakt)	-	n.d.	-	n.d.	-	negatief
	beluchtingstank 1 ml (homogeen) (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 1 ml (uitgezakt)	39.74	n.d.	-	n.d.	-	zwak positief
	beluchtingstank 0,2 ml (homogeen)	-	n.d.	-	n.d.	-	negatief
27-4-2011	beluchtingstank 0,2 ml (uitgezakt)	-	n.d.	-	n.d.	-	negatief
	influent 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	34,97*	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml	-	-	-	-	+	negatief
12-5-2011	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
23-5-2011	beluchtingstank 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 5 ml (steekproef, geen 24-uurs)	39.38	-	-	-	+	zwak positief
	influent 1 ml (steekproef, geen 24-uurs)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml (steekproef, geen 24-uurs)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml (10x)	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml	-	-	-	-	+	negatief
9-6-2011	beluchtingstank 0,2 ml	-	-	-	-	+	negatief
	influent 5 ml (10x)	-	-	-	-	+	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	37.73	-	-	-	zwak positief
6-7-2011	beluchtingstank 0,2 ml	-	-	-	-	+	negatief
	influent 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 1 ml	35.91	35.36	-	-	+	zwak positief
20-7-2011	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	influent 5 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 1 ml	-	-	-	-	-	negatief
	influent 0,2 ml	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 5 ml (10x)	-	-	-	-	-	negatief
	beluchtingstank 1 ml (10x)	-	-	-	-	+	negatief
	beluchtingstank 0,2 ml (10x)	-	-	-	-	+	negatief

\* systeem fout of onbetrouwbare curve

zwak positief: alleen een positief signaal voor *C. burnetii* target IS1111

\*\* (10x): monster 10 x verdund

negatief: geen *C. burnetii* DNA aangetoond