

**- Overleving van *Coxiella burnetii* in geitenmest –
Eindrapportage**

Auteurs:

Hendrik-Jan Roest en Annemieke Dinkla (Centraal Veterinair Instituut van Wageningen UR)

Bart van Rotterdam en Arnout de Bruin (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu)

Daan Dercksen en Piet Vellema (Gezondheidsdienst voor Dieren)

Datum en versie:

31 mei 2011, eindrapport

Rapportnummer: 11/CVI0212

Inhoud

Inhoud	2
1 VOORWOORD	3
2 INLEIDING	4
2.1 Doelstelling	5
3 MATERIAAL EN METHODEN	6
3.1 Geselecteerde bedrijven.....	6
3.2 Metingen en monsternamen op geselecteerde bedrijven.....	6
3.2.1 Temperatuurmetingen.....	6
3.2.2 Monsternamen voor kweek en PCR	7
3.3 Gebruikte laboratoriummethoden	8
3.3.1 Opwerking en DNA extractie van geitenmest	8
3.3.2 Detectie van <i>C. burnetii</i> door middel van PCR.....	8
3.3.3 Detectie van <i>C. burnetii</i> door middel van kweek:.....	9
3.3.4 Bepaling karakteristieken mest	9
3.4 Bepaling van de decimale reductietijd (DRT) of wel de D-waarde.....	10
3.4.1 Bepaling van de overleving in PBS.....	11
3.4.2 Bepaling van de overleving in PBS met 0,9 gram ureum per 50 ml	11
3.4.3 Bepaling van de overleving in PBS met 0,9 gram ammoniak per 50 ml.....	11
3.4.4 Bepaling van de overleving in geitenmestextract.....	11
3.4.5 Bepaling van de decimale reductietijd.....	11
4 RESULTATEN.....	12
4.1 Temperatuurverloop in opgeslagen geitenmest.....	12
4.2 Kwantificering van de hoeveelheid <i>Coxiella burnetii</i> in geitenmest via PCR.....	14
4.3 Kweek uit geitenpotstalmest.....	15
4.4 Bepaling van de karakteristieken van geitenpotstalmest.....	16
4.5 Decimale reductietijd van <i>Coxiella burnetii</i>	16
5. Discussie en conclusies	19
6. Referenties	22
7. Appendix.....	23
7.1 Opwerking van DNA van <i>C. burnetii</i> voor de PCR.....	23
7.2 Opwerking van <i>C. burnetii</i> voor de kweek.....	23

1 VOORWOORD

In deze eindrapportage van het project 'Overleving van *Coxiella burnetii* in geitenmest' worden de resultaten gepresenteerd van het project. Het project is gestart in het najaar van 2009 en in mei 2011 zijn de laatste experimenten uitgevoerd.

Het project is een samenwerkingsverband tussen de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD), het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) en het Central Veterinary Institute, part of Wageningen UR (CVI) en is uitgevoerd in opdracht van het ministerie van Economische zaken, Landbouw & Innovatie (EL&I), voorheen het ministerie van Landbouw, Natuur en Voedselkwaliteit (LNV).

Deze eindrapportage presenteert de verkregen resultaten. De auteurs willen de geitenhouders die aan het project hebben deelgenomen hartelijk bedanken voor hun bereidheid tot medewerking. Zonder hun bijdrage zou het niet mogelijk zijn om dit project in de volle omvang vanuit de praktijk te kunnen uitvoeren. Juist door de koppeling van de laboratoriumresultaten aan de praktijksituatie kunnen de resultaten in perspectief worden gezet.

Hendrik-Jan Roest
projectleider

2 INLEIDING

Coxiella burnetii is een obligaat intracellulaire Gram-negatieve bacterie die bij mens en dier Q-koorts kan veroorzaken. Q-koorts is een zoönose waarbij dieren, met name landbouwhuisdieren, het reservoir zijn voor ziekte bij de mens. Sinds 2005 worden klinische symptomen van Q-koorts gezien bij Nederlandse melkgeiten en melkschapen in de vorm van abortus. Tussen 2007 en 2010 zijn jaarlijks uitbraken van Q-koorts gezien bij mensen in Nederland. In Nederland worden melkgeiten als belangrijkste bron voor Q-koorts bij mensen beschouwd. Deze hypothese is gebaseerd op de overlap in gebieden waar Q-koorts bij melkgeiten en mensen voorkomt en de chronologische opvolging eerst abortusgevallen bij geiten worden waargenomen en daarna humane gevallen (1-6). Resultaten van genetische typering van *C. burnetii* versterken deze bronhypothese (7, 8).

Abortus is het voornaamste symptoom van Q-koorts bij geiten. Met de geaborteerde vrucht, vruchtvliezen en vruchtwater komen zeer veel Q-koorts bacteriën o.a. in de potstalmest en de lucht terecht. Ook bij een normale geboorte van met *C. burnetii* geïnfecteerde geiten komen Q-koorts bacteriën in de potstalmest terecht. Deze hoeveelheid is echter lager in vergelijking met abortus maar bij grote aantallen normaal lammerende geiten kunnen toch substantiële hoeveelheden Q-koorts bacteriën in de potstalmest terecht komen (9).

Om het aantal humane gevallen van Q-koorts te beperken zijn in juni 2008 maatregelen afgekondigd. Deze bestonden uit een meldingsplicht van Q-koorts bij melkgeiten en melkschapen en uit hygiëne maatregelen. Een van de onderdelen van deze aanvullende maatregelen betrof de mest. Afhankelijk van de Q-koortsstatus van het bedrijf moet de mest in de stal blijven en/of afgedekt worden opgeslagen op de locatie waar de mest is geproduceerd. De achtergrond van deze opslag is het afdoden van de mogelijkwerwijs in de mest aanwezige *C. burnetii* bacteriën door composteringprocessen. De lengte van de perioden is gebaseerd op gegevens uit de literatuur, echter deze gegevens zijn vrij oud en de matrix was variabel (10, 11). Feitelijk is er weinig bekend over de overleving van *C. burnetii* in potstalmest afkomstig van geiten. Om meer inzicht te verkrijgen in de overleving van *C. burnetii* in geitenmest is het project: "Overleving van *Coxiella burnetii* in geitenmest" geïnitieerd.

In dit project is de afname van het aantal bacteriën in geitenmest bestudeerd onder omstandigheden zoals die zich in opgeslagen geitenmest voordoen. De afname van het aantal bacteriën bij verschillende temperaturen wordt weergegeven door middel van de decimale reductietijd (DRT of D-waarde). De DRT is de tijd die nodig is om het aantal bacteriën met een factor 10 te laten afnemen bij een bepaalde temperatuur. In dit onderzoek is de DRT voor *C. burnetii* in geiten potstalmest bij verschillende temperaturen bepaald. Uit de literatuur is bekend dat *C. burnetii* lang in de omgeving kan overleven (12).

De overleving van *C. burnetii* is afhankelijk van matrix en temperatuur en kan sterk variëren. Een complicerende factor in het geval van *C. burnetii* is dat deze bacterie zowel dieren als mensen kan infecteren (dit wordt een zoonose genoemd). Daardoor mag alleen onder speciale

veiligheidscondities met *C. burnetii* gewerkt worden (zogenaamde Biosafety Level 3 condities). Tevens is *C. burnetii* een intracellulaire bacterie; dit stelt speciale eisen aan de kweekmethode. In dit project is gebruik gemaakt van een celkweekstelsel voor *C. burnetii* dat gebruik maakt van Buffalo Green Monkeycellen (BGM-cellen). Hiermee kunnen levende kiemen van *C. burnetii* worden aangetoond. Door een verdunningsreeks van het monster in te zetten kan de concentratie van levende *C. burnetii* bacteriën in het monster worden bepaald. Door bij opeenvolgende metingen steeds dezelfde verdunningsreeks in te zetten kan het verloop van de concentratie verandering worden gemeten. Hieruit is de DRT te berekenen.

2.1 Doelstelling

- a. Bepalen van het temperatuursverloop in opgeslagen geitenmest
- b. Kwantificering van de hoeveelheid Q-koorts bacteriën in geitenpotstalmest
- c. Bepaling van de DRT van *C. burnetii* in geitenpotstalmest
- d. Bepaling van de overlevingsduur van *C. burnetii* in geitenpotstalmest onder praktijkomstandigheden

3 MATERIAAL EN METHODEN

3.1 Geselecteerde bedrijven

Voor dit project zijn twee bedrijven geselecteerd die een historie van Q-koorts hadden en die op het moment van de proef nog steeds Q-koorts positief waren:

Bedrijf A: Bij de start van de meting op 28-10-2009 waren er op dit melkgeitenbedrijf aanwezig: 1451 melkgeiten, 845 opfoklammeren en 209 bokken (waarvan 90 bokken minder dan 10 kg). Het bedrijf is in Noord-Brabant gelegen en de geiten worden altijd binnen gehuisvest. Het bedrijf heeft een abortushistorie ten gevolge van Q-koorts en is op 17-12-2009 op basis van tankmelkonderzoek officieel besmet verklaard en op 6 januari 2010 geruimd.

Bedrijf B: Bij de start van de meting op 14-12-2009 waren er op dit melkgeitenbedrijf 1012 melkgeiten, 540 opfoklammeren en 16 bokken aanwezig. Het bedrijf is in Noord-Brabant gelegen en de geiten worden altijd binnen gehuisvest. Het bedrijf heeft een abortushistorie ten gevolge van Q-koorts en is op 12-11-2009 op basis van tankmelkonderzoek officieel besmet verklaard en op 30 december 2009 geruimd.

3.2 Metingen en monsternamen op geselecteerde bedrijven

3.2.1 Temperatuurmetingen

De temperatuurmetingen zijn verricht met speciaal voor dit project door Peekel Instrumenten B.V ontwikkelde meetlansen (foto 1 en www.peekel.nl). Er is gebruik gemaakt van geijkte meetapparatuur waarmee een continue temperatuurmeting mogelijk was op verschillende diepten in de mesthoop. De continue data zijn verwerkt met SignaSoft 6000 waarmee een grafische weergave van het temperatuurverloop in de tijd mogelijk was.



Foto 1: Meetlans zoals gebruikt voor het meten van de temperatuur in de mesthoop (foto Daan Dercksen, Gezondheidsdienst voor Dieren)

3.2.2 *Monstername voor kweek en PCR*

De mestmonsters voor kweek en PCR uit de potstal en de mesthoop zijn steeds op 3 verschillende diepten genomen.

In de uitgangssituatie in de potstal waar de geiten liepen op de dag van uitmesten zijn de mestmonsters genomen op:

1. 0 – 2 cm diepte
2. 18-20 cm diepte
3. 38- 40 cm diepte

In de mesthoop na uitmesten zijn de mestmonsters genomen op:

1. 0 -20 cm diepte (boven)
2. 90- 100 cm diepte (midden)
3. 190- 200 cm diepte (diep)

3.3 Gebruikte laboratoriummethoden

3.3.1 Opwerking en DNA extractie van geitenmest

Om de hoeveelheid *C. burnetii* DNA in geitenmest te kunnen bepalen wordt 10 gram geitenmest afgewogen en gehomogeniseerd met PBS (Phosphate Buffered Saline). Daarna wordt het totaal aan DNA in het monster geëxtraheerd m.b.v. twee verschillende NucliSens DNA-extractie protocollen (Biomérieux). Deze protocollen verschillen in de verhoudingen tussen mest en lysisbuffer en de hoeveelheid toegevoegd Proteinase K, een enzym dat PCR-inhibitie kan verminderen. Het aanwezige *C. burnetii* DNA wordt gedetecteerd m.b.v. PCR. De protocollen voor opwerking, DNA-extractie en PCR worden beschreven in de appendix (7.1).

3.3.2 Detectie van *C. burnetii* door middel van PCR

DNA verkregen uit mestmonsters werd onderzocht op de aanwezigheid van *C. burnetii* DNA via een kwantitatieve multiplex real-time PCR-assay voor dit organisme. Deze PCR-assay is al beschreven¹ en is aangepast ter verbetering van de gevoeligheid.

De PCR detecteert twee targetsequenties voor *C. burnetii* (*com1* en *IS1111*) in combinatie met een targetsequentie voor *B. thuringiensis* (*cry1*), de interne proces controle.

De PCR-assays werden uitgevoerd op een Roche Lightcycler 480 (Roche Diagnostics Nederland B.V, Almere, the Netherlands). Per test werd 3 µl DNA monster gebruikt en de monsters werden onverdund, 10 keer verdund en 100 keer verdund getest om het effect van PCR-inhibitie te reduceren.

De uitslagen van kwantitatieve real-time PCR voor een targetsequentie worden uitgedrukt in Cq-waarden (quantification cycle). Deze Cq-waarde geeft het aantal PCR-cycli weer dat nodig is om een targetsequentie in een monster te kunnen detecteren. De grootte van de Cq-waarde is omgekeerd evenredig met de hoeveelheid van het gedetecteerde DNA: hoe meer PCR-cycli er nodig zijn om een targetsequentie te amplificeren (hogere Cq-waarden), hoe minder DNA er in het begin in het monster aanwezig was. Deze Cq waarden kunnen worden gebruikt om tot een inschatting te komen van het aantal organismen dat aanwezig was in een monster.

PCR-inhibitie is een onderbelicht probleem binnen de PCR-diagnostiek en beïnvloedt de kwantificatie. PCR-inhibitie wordt veroorzaakt door mee geëxtraheerde stoffen tijdens DNA extractie procedures die de PCR-reactie negatief kunnen beïnvloeden. Dit kan resulteren in een verhoging van de Cq waarden voor targetsequenties wat resulteert in een onderschatting van de hoeveelheid organismen in een monster. Naast toevoegingen van PCR-inhibitie reducerende stoffen tijdens DNA-extractie (Proteinase K) werden verdunningen van het monster meegenomen om het effect van deze PCR-inhiberende stoffen te reduceren. Het te detecteren DNA van het te detecteren organisme wordt echter ook verminderd. De mate van PCR-inhibitie van een monster kan bepaald worden aan de hand van de verschillen in Cq waarden voor de interne proces controle targetsequentie (Cq_{*cry1* monster}) en de positieve controle (Cq_{*cry1* p.c.}), volgens de formule:

¹ De Bruin, A. A. de Groot, J. Bok, M. Hamans, B.J. Rotterdam, P.R. Wielinga & I. Janse. Detection of *Coxiella burnetii* in complex matrices during Q fever outbreaks in the Netherlands using a novel multiplex qPCR. *submitted to Applied and Environmental Microbiology*.

$$\Delta Cq = Cq_{cry1 \text{ monster}} - Cq_{cry1 \text{ p.c.}}$$

De verkregen waarde ΔCq is een maat voor PCR-inhibitie voor het monster. Deze ΔCq waarde werd afgetrokken van de gemeten Cq waarden voor de *C. burnetii* targetsequenties *com1* ($Cq_{com1 \text{ monster}}$) en *IS1111* ($Cq_{IS1111 \text{ monster}}$). Op deze manier werd gecorrigeerd voor PCR inhibitie. Een belangrijke aanname hierbij is dat PCR inhibitie op alle targetsequenties hetzelfde is. Vervolgens werd de hoeveelheid *C. burnetii* bacteriën per monster gekwantificeerd aan de hand van een DNA standaard voor *C. burnetii* (Vircell, MBC018). Er is gekozen voor een correctie van de Cq waarden van de *C. burnetii* targetsequenties per monster via de interne proces controle, in plaats van het gebruik van een *C. burnetii* DNA standaard gemaakt in de matrix (in dit geval geitenmest). Dit is gedaan omdat PCR-inhibitie per monster zeer kan variëren. Een standaard van *C. burnetii* DNA gemaakt met als achtergrond de matrix waaruit het DNA is geïsoleerd corrigeert niet voor deze individuele verschillen per monster.

De hoeveelheid *C. burnetii* DNA werd uitgedrukt in aantal kopieën *com1* per gram mest. De targetsequentie *com1* komt één keer in het *C. burnetii* genoom voor en kan dus direct gerelateerd worden aan het aantal bacteriën (één kopie *com1* = één *C. burnetii* bacterie). Dit in tegenstelling tot targetsequentie *IS1111*, die meerdere keren in het genoom kan voorkomen. Het aantal kopieën is stamafhankelijk en varieert van zeven kopieën per genoom tot 110 kopieën per genoom, per stam (13). Wanneer men geen informatie heeft over de gedetecteerde *C. burnetii* stam in een monster is kwantificatie aan de hand van targetsequentie *IS1111* niet accuraat. Daarnaast moet men dan aannemen dat elke kopie van het target ook daadwerkelijk geamplificeerd wordt en dat de amplificatie frequentie gelijk is voor elke kopie. De targetsequentie *IS1111* geeft echter kwalitatief wel een gevoeliger indicatie voor de aanwezigheid van *C. Burnetii*.

3.3.3 Detectie van *C. burnetii* door middel van kweek:

De kweek bestaat net als bij de PCR uit een vooropwerking en de daadwerkelijke kweek. In de vooropwerking wordt de mest gemengd met PBS om zo veel mogelijk bacteriën in oplossing te krijgen. Daarna worden de grovere delen verwijderd door middel van het zeven van de suspensie. Verdere verwijdering van contaminerende bacteriën en stoffen vindt plaats door middel van het filtreren door uiteindelijk 45 μm filters en wassen met PBS. Het protocol van de vooropwerking en de kweek staat vermeld in de appendix (7.2). Dit protocol is tevens toegepast ter controle van de methode om *C. burnetii* uit mest te kweken. Daartoe is mest beënt met de NM stam en met CbNL01 in de concentratie 10^5 per ml. Na beënting is direct uit deze mest gekweekt. Tevens is een aanvullend experiment gedaan met beënte geitenpotstalmest. In deze beënte potstalmest is direct en na 48 uur *C. burnetii* teruggekweekt. Dit experiment is uitgevoerd met de NM stam in de concentratie 10^8 per ml. De potstalmest is in principe bij kamertemperatuur bewaard maar er heeft enige compostering plaatsgevonden. Met dit experiment is geprobeerd om de praktijksituatie na te bootsen.

3.3.4. Bepaling karakteristieken mest

Het bepalen van de karakteristieken van de mest, zoals pH, totaal stikstofgehalte, ammoniakaal stikstof gehalte, droge stofgehalte en AS gaf problemen omdat de *C. burnetii* positieve mest van de geselecteerde bedrijven niet onderzocht kon worden uit veiligheidsoverwegingen. Daarom is de samenstelling uit handboeken verkregen (Handboek Meststoffen, 2000).

3.4 Bepaling van de decimale reductietijd (DRT) of wel de D-waarde

De decimale reductietijd in een aantal matrixen is bepaald voor de *C. burnetii* referentiestam Nine Mile (NM). De NM-stam is goed te kweken op BGM cellen, groeit snel en is goed detecteerbaar. De in Nederland meest voorkomende geitenstam, CbNL01 (8), groeit zoveel langzamer dat het niet mogelijk bleek om de proeven in de gebruikte opzet met deze stam uit te voeren. Voor de NM-stam is de DRT bepaald in de volgende matrixen:

1. PBS
2. PBS met 0,9 gram ureum per 50 ml (1,8% w/v)
3. PBS met 0,9 gram ammoniak per 50 ml (1,8% w/v)
4. geitenmest extract

De DRT is bepaald door de detectielimiet van de NM-stam te bepalen voor de gebruikte opwerkmethoden en deze te vergelijken vóór (beginconcentratie) en na (eindconcentratie) de behandeling. De uitgangconcentratie van de NM-stam is 1×10^5 *C. burnetii*-bacteriën, gebaseerd op de door het CVI gebruikten real time PCR (8) met de toevoeging van primers en probe voor het single copy gen dat codeert voor een hypothetisch eiwit, gestandaardiseerd met een standaardconcentratie *C. burnetii* (Adiavet). Kwantificering van de groei na behandeling is uitgevoerd door het behandelde materiaal uit te verdunnen en van daaruit te kweken. Dit is in triplo uitgevoerd.

Voor het bepalen van de DRT zijn de tijd- en temperatuurcombinaties gebruikt zoals aangegeven in Tabel 1.

Tabel 1. Gebruikte tijd- en temperatuurcombinaties voor het bepalen van de DRT.

	Temperatuur			
Tijd	60°C	65°C	70°C	72°C
5 sec			NM/CbNL01	NM/CbNL01
10 sec			NM/CbNL01	NM/CbNL01
15 sec			NM/CbNL01	NM/CbNL01
3 min	NM/CbNL01	NM/CbNL01		
6 min	NM/CbNL01	NM/CbNL01		
9 min	NM/CbNL01	NM/CbNL01		

Voor het bepalen van de beginconcentratie werd een decimale verdunningsreeks gemaakt, van onverdund materiaal tot een verdunning van 10^6 . Van deze verdunningsreeks werd de detectiegrens bepaald door middel van kweek. Hiervoor werd in triplo 100 µl *C. burnetii* verdunning gebracht op 50% confluentie gegroeide Buffalo Green Monkey (BGM) cellen. Deze worden geïncubeerd gedurende 2 weken bij 37°C. Medium wordt twee keer per week ververs. Voor de NM-stam wordt de

groei in kweek bepaald door middel van de Immunofluorescentie test (IFT) en door middel van de PCR (8).

3.4.1 *Bepaling van de overleving in PBS*

Voor het bepalen van de overleving van *C. burnetii* in PBS werd vier maal 100 µl *C. burnetii* NM-stam verhit volgens de aangegeven tijd- en temperatuurcombinaties. Na verhitting volgde direct een koelstap van 4 minuten bij 4 °C. Drie slide flasks (SF) werden beënt met 100 µl van deze behandelde *C. burnetii* suspensie. Van de overblijvende 100 µl *C. burnetii* suspensie wordt een verdunningsreeks gemaakt. Van elke verdunning worden drie SF beënt met 100 µl.

3.4.2 *Bepaling van de overleving in PBS met 0,9 gram ureum per 50 ml*

Het opwerken gaat op dezelfde manier als bij PBS zonder ureum, echter na de behandeling en afkoeling wordt de oplossing twee keer gewassen door de oplossing twee maal te centrifugeren gedurende 10 minuten bij 14000 g en de pellet te resuspenderen in medium.

3.4.3 *Bepaling van de overleving in PBS met 0,9 gram ammoniak per 50 ml*

Dit wordt uitgevoerd zoals aangegeven onder 3.4.2 maar dan met ammoniak.

3.4.4 *Bepaling van de overleving in geitenmestextract*

Er wordt een geitenpotstalmestextract gemaakt door 9,5 gram potstalmest te suspenderen in 28,5 ml PBS. Hiermee wordt een werkverdunding gemaakt met 1×10^5 *C. burnetii*. Deze suspensie wordt verder behandeld zoals aangegeven onder 3.4.2.

3.4.5 *Bepaling van de decimale reductietijd.*

De decimale reductietijd (DRT) is bepaald door de beginconcentratie te delen door de eindconcentratie, daarvan de 10-logaritme te nemen en te verrekenen met de tijdsduur waarin het concentratieverschil is ontstaan. Dit resulteert in de volgende formule (14):

$$DRT = \frac{t_2 - t_1}{{}^{10}\text{LOG}\left(\frac{[begin]}{[eind]}\right)}$$

waarin:

$t_2 - t_1$ = de tijdsduur waarin de concentratieverandering heeft plaatsgevonden

${}^{10}\text{LOG}\left(\frac{[begin]}{[eind]}\right)$ = de decimale reductie van de beginconcentratie naar de eindconcentratie

De DRT geeft de decimale reductie per tijdseenheid weer bij een bepaalde temperatuur. De DRT wordt ook wel de D-waarde genoemd. Door de 10-logaritme van de triplometing van de DRT uit te zetten tegen de temperatuur waarbij deze DRT geldt moet een rechte lijn ontstaan. Deze lijn beschrijft de relatie tussen de 10-logaritme van de DRT en de temperatuur. Bij de gegeven matrix kan op deze manier de DRT worden uitgerekend bij een gegeven temperatuur.

4 RESULTATEN

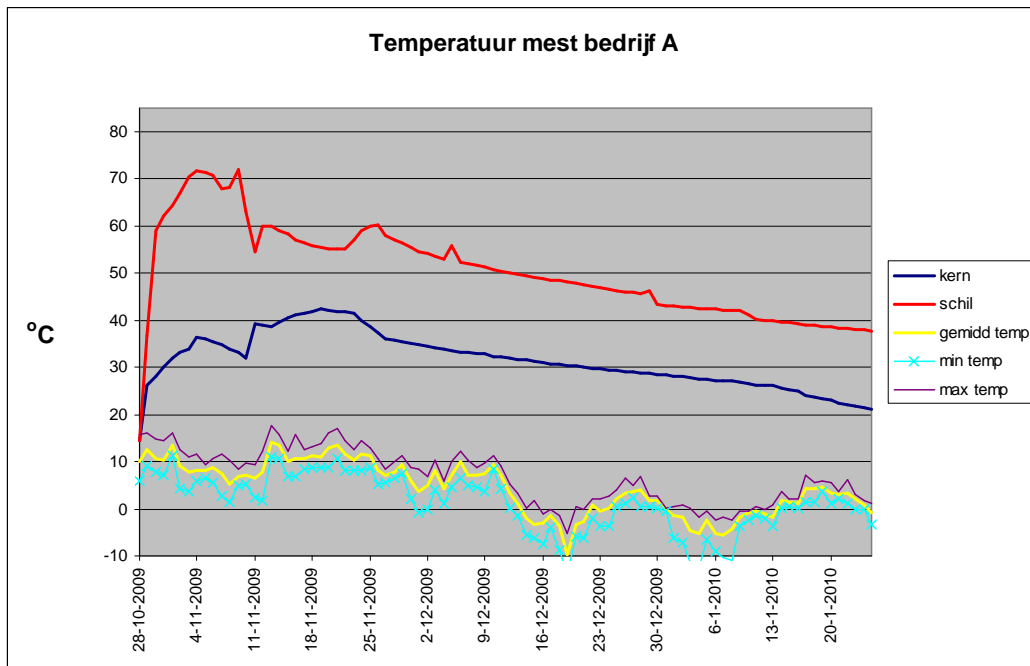
4.1 Temperatuurverloop in opgeslagen geitenmest

Het temperatuurverloop in de opgeslagen geitenmest voor bedrijf A en bedrijf B is in Figuren 1 en 2 weergegeven. De rode lijn geeft het temperatuurverloop weer van de buitenste laag van de mesthoop, de blauwe lijn geeft het temperatuurverloop weer van de kern van de mesthoop. De gele, paarse en lichtblauwe lijnen geven het temperatuurverloop van de buitentemperatuur weer.

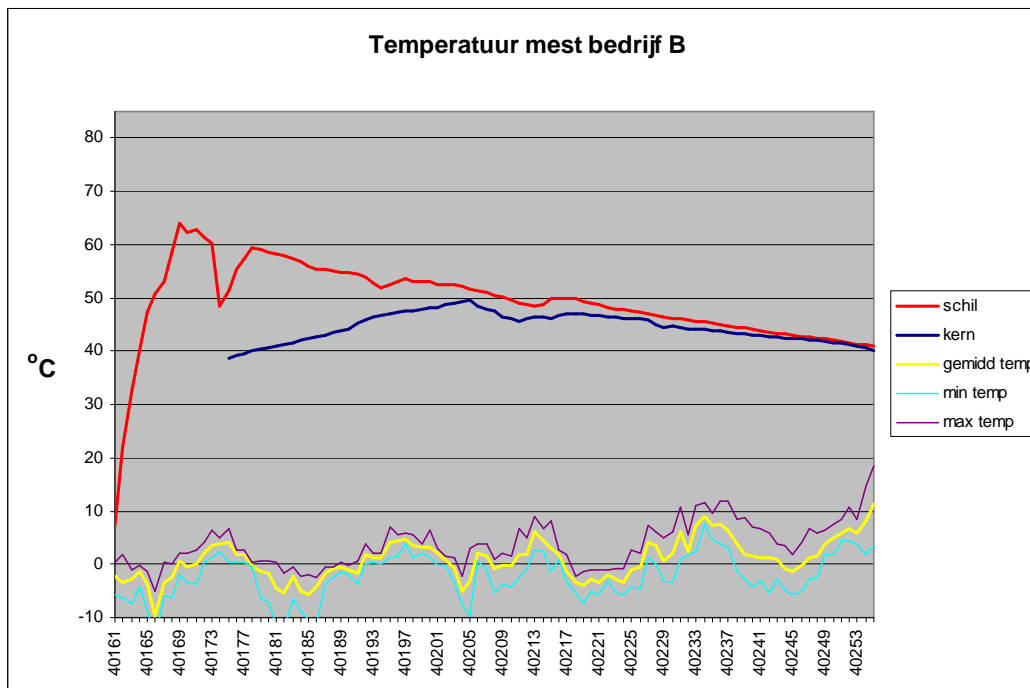
Uit de figuren blijkt dat bij bedrijf A de temperatuur in de buitenste laag van de mesthoop, de zogenaamde schil, snel stijgt tot een piekwaarde van 72 °C. Een temperatuur van boven de 60 °C wordt gedurende ongeveer 12 dagen behouden. Bij bedrijf B vindt er een iets minder snelle stijging plaats, tot een piekwaarde van 64 °C, waarna gedurende 5 dagen de temperatuur van boven de 60 °C wordt gehandhaafd. De kerntemperaturen stijgen minder snel en bereiken minder hoge temperaturen: 40 °C voor bedrijf A en 50 °C voor bedrijf B. Bij bedrijf A is de temperatuur van de kern gedurende 10 dagen boven de 40 °C.

Compostering is een aerob proces. In de schil van de mesthoop zal voldoende zuurstof binnen kunnen dringen om de compostering op gang te brengen en te continueren. Tijdens dit proces wordt warmte geproduceerd. In de kern zal de zuurstofconcentratie lager zijn waardoor er minder compostering plaatsvindt resulterend in een lagere temperatuurstijging in vergelijking met de schil. De compostering zal afnemen met het afnemen van de zuurstofspanning waardoor ook de warmteontwikkeling van schil naar kern zal afnemen. Er zal een temperatuurgradiënt ontstaan van schil naar kern. Algemeen wordt aangegeven dat de structuur van geitenmest zodanig is dat tot op 1,5 meter voldoende zuurstof vanaf de buitenrand aangetrokken kan worden voor compostering, maar heel veel onderzoek is hiernaar niet uitgevoerd.

Figuur 1. Temperatuurverloop in de mesthoop van bedrijf A.



Figuur 2. Temperatuurverloop in de mesthoop van bedrijf B.



4.2 Kwantificering van de hoeveelheid *Coxiella burnetii* in geitenmest via PCR

In een eerste studie is de hoeveelheid *C. burnetii* DNA in mest van bedrijf A nader onderzocht door middel van de PCR. De verschillen tussen de twee DNA extractieprotocollen bleken marginaal en verdunning van het geëxtraheerde DNA met een factor 10 gaven de beste resultaten om een goede indicatie te krijgen van de hoeveelheid *C. burnetii* DNA in een geitenmestmonster (Tabel 2).

Aan de hand van de PCR resultaten kunnen de aantallen aanwezige *C. burnetii* bacteriën gekwantificeerd worden, zoals aangegeven in de sectie materiaal en methode. De kwantificering van een groot aantal monsters uit de mesthopen van bedrijf A en bedrijf B staan weergegeven in Tabel 2.

Tabel 2: Kwantificering van *C. burnetii* DNA per gram geitenmest voor bedrijf A en B.

Bedrijf	Beschrijving	Monstername datum	<i>com1</i> copies / g manure	
			Mean	SD
A	Diep (D77)	13-1-2010	1.92E+03	
	Boven- dag 56	9-12-2009	1.83E+04	
	Diep- dag 56	9-12-2009	2.32E+04	
	Pot- Diep (D42)	9-12-2009	7.11E+04	
	Pot- Midden (D42)	9-12-2009	1.24E+05	7.17E+04
	Midden- dag 28	25-11-2009	Negatief	
	Pot-Boven (D42)	9-12-2009	Negatief	
	Diep (D42)	9-12-2009	Negatief	
	Midden- dag 56	9-12-2009	Negatief	
	Diep (D77)	13-1-2010	Negatief	
	Diep (D77)	13-1-2010	Niet kwantificeerbaar	
	Diep (D77)	13-1-2010	Niet kwantificeerbaar	
	Diep- dag 91	27-1-2010	Niet kwantificeerbaar	
	Boven- dag 28	25-11-2009	Positief, niet kwantificeerbaar	
	Diep- dag 28	25-11-2009	Positief, niet kwantificeerbaar	
	Boven (D42)	9-12-2009	Positief, niet kwantificeerbaar	
	Midden (D42)	9-12-2009	Positief, niet kwantificeerbaar	
	Boven (D77)	13-1-2010	Positief, niet kwantificeerbaar	
	Midden (D77)	13-1-2010	Positief, niet kwantificeerbaar	
	Diep (D77)	13-1-2010	Positief, niet kwantificeerbaar	
	Boven- dag 91	27-1-2010	Positief, niet kwantificeerbaar	
	Midden- dag 91	27-1-2010	Positief, niet kwantificeerbaar	
B	Pot-Boven	14-12-2009	7.10E+07	4.88E+06
	Pot-Midden	14-12-2009	1.46E+07	1.65E+07
	Pot-Diep	14-12-2009	1.16E+04	
	Boven (D7)	21-12-2009	1.13E+04	9.25E+02
	Mesthoop-Midden	14-12-2009	1.14E+04	3.54E+03
	Mesthoop-Diep	14-12-2009	1.49E+04	4.69E+03
	Boven (D44)	27-1-2010	2.73E+04	1.66E+04
	Diep (D14)	28-12-2009	7.67E+04	5.91E+03
	Midden (D14)	28-12-2009	1.47E+05	

Midden (D7)	21-12-2009	8.57E+05	
Diep (D30)	13-1-2010	1.14E+06	3.86E+05
Diep (D57)	9-2-2010	3.10E+06	1.13E+06
Diep (D7)	21-12-2009	Negatief	
Boven (D14)	28-12-2009	Negatief	
Boven (D30)	13-1-2010	Negatief	
Midden (D30)	13-1-2010	Negatief	
Mesthoop-Boven (D44)	27-1-2010	Negatief	
Mesthoop-Midden (D44)	27-1-2010	Negatief	
Mesthoop-Diep (D44)	27-1-2010	Negatief	
Boven (D57)	9-2-2010	Negatief	
Midden (D57)	9-2-2010	Negatief	
Mesthoop-Boven	14-12-2009	Positief, niet kwantificeerbaar	
Pot-Midden (D44)	27-1-2010	Positief, niet kwantificeerbaar	
Pot-Diep (D44)	27-1-2010	Positief, niet kwantificeerbaar	

D = dagen na start monstername

De gedetecteerde hoeveelheid DNA van *C. burnetii* is equivalent aan 1×10^3 tot 1×10^5 bacteriën per gram mest voor bedrijf A en equivalent aan 1×10^4 tot 1×10^7 bacteriën per gram mest voor bedrijf B. De standaarddeviatie van de kwantificering varieert van 10^2 tot 10^7 .

Tevens kan uit deze gegevens worden geconcludeerd dat in alle lagen van de mesthoop ongeveer evenveel DNA van *C. burnetii* is gevonden. Op bedrijf B is het aantal bacteriën gemeten naar de hoeveelheid DNA op een aantal plaatsen in de mesthoop ongeveer een factor 10^3 hoger dan bij bedrijf A. *Coxiella burnetii* lijkt niet homogeen verdeelt te zijn over de mesthoop in tijd en plaats, op verschillende tijdstippen worden zowel negatieve als positieve resultaten gevonden.

4.3 Kweek uit geitenpotstalmest

Gegeven de gevonden concentraties van *C. burnetii* DNA in de potstalmest zou het mogelijk moeten zijn om *C. burnetii* uit potstalmest te kweken. Dit bleek echter niet mogelijk te zijn. Herhaalde pogingen met monsters van de potstalmest met de grootste *C. burnetii* DNA hoeveelheid leverde geen positief kweekresultaat op. Dit zou veroorzaakt kunnen worden door een methodologisch probleem in de kweek, gebrek aan gevoeligheid van de kweek of doordat er geen levende *C. burnetii* bacteriën in de potstalmest aanwezig waren. Om de methodologische problemen uit te sluiten is vervolgens *C. burnetii* toegevoegd aan geitenpotstalmest in de concentratie 1×10^5 per ml. Uit de resultaten bleek dat zowel de NM stam als de veldstam CbNL01 van *C. burnetii* gekweekt kan worden uit potstalmest. Het methodologische probleem is daarmee uitgesloten en dit onderzoek toont tevens aan dat de gevoeligheid van het kweek systeem voldoende is om *C. burnetii* in de potstalmest van de onderzochte bedrijven te kunnen aantonen. Dit is bevestigd door de resultaten van het tweede experiment waarbij de NM stam van *C. burnetii* werd toegevoegd aan potstalmest. Zowel direct als na 48 uur kon *C. burnetii* gekweekt worden uit potstalmest.

4.4 Bepaling van de karakteristieken van geitenpotstalmest

De samenstelling van de potstalmest zoals verkregen uit het Handboek Meststoffen (2000) per 1000 kg mest: 8,5 kg stikstof totaal, 5,9 kg organische stikstof, 26,5% droge stof gehalte met een pH van gemiddeld 8,7.

4.5 Decimale reductietijd van *Coxiella burnetii*

De resultaten van de gemeten DRT van de NM-stam in de verschillende matrixen staan vermeld in Tabellen 4, 5 en 6.

Tabel 4: DRT van NM in PBS bij verschillende temperaturen.

temperatuur (°C)	gemiddelde DRT (sec) over 3 meting en	standaard deviatie
72	4,29	0,71
70	3,25	0,10
65	30,00	0,00
60	66,00	22,45

Tabel 5: DRT van NM in PBS met 1,8 % ureum bij verschillende temperaturen.

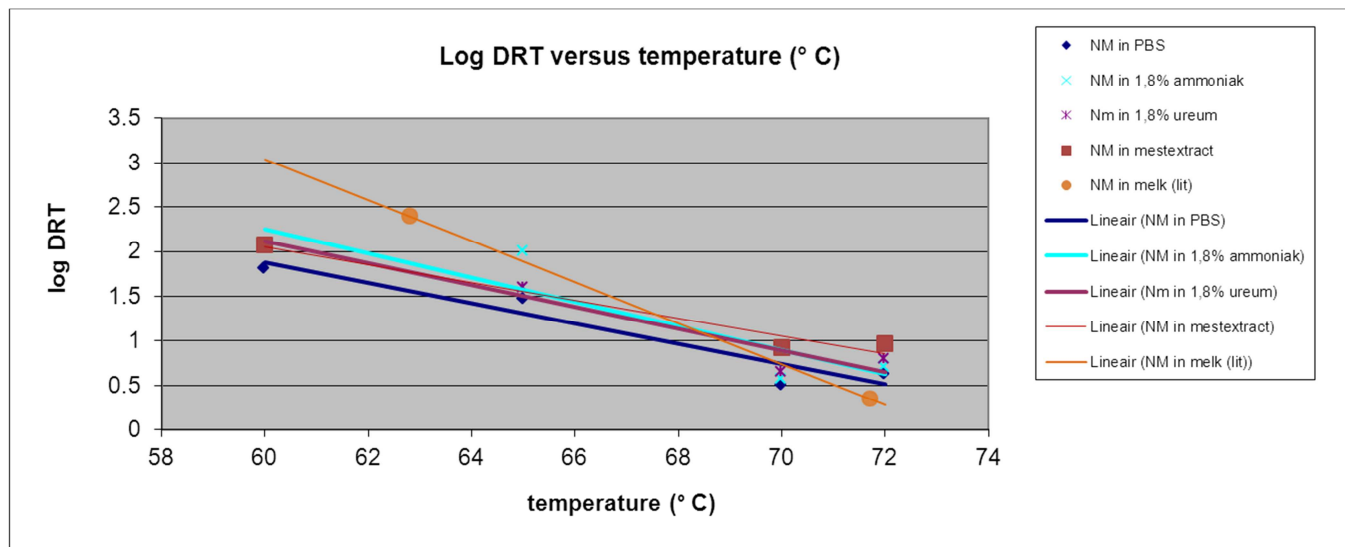
1,8% ureum		
temperatuur (°C)	gemiddelde DRT (sec) over 3 meting en	standaard deviatie
72,00	6,27	3,05
70,00	4,56	2,38
65,00	40,00	20,00
60,00	123,73	48,12

Tabel 6: DRT van NM in PBS met 1,8% ammoniak bij verschillende temperaturen.

1,8% ammoniak		
temperatuur (°C)	gemiddelde DRT (sec) over 3 meting en	standaard deviatie
72,00	5,15	2,65
70,00	3,81	1,69
65,00	102,19	51,09
60,00	113,11	43,94

De decimale reductietijd neemt logaritmisches toe met het dalen van de temperatuur. Door de 10-logaritme van de DRT uit te zetten tegen de tijd moet een rechte lijn ontstaan die het verband weergeeft tussen de $^{10}\log DRT$ en de tijd. Dit is weergegeven in Figuur 3.

Figuur 3. De 10^{\log} van de DRT versus de tijd voor NM, NM in 1,8% ammoniak, NM in 1,8% ureum, NM in potstalmest en melk zoals uit de literatuur bekend (5, 6).



Uit bovenstaande grafieken kunnen de formules worden afgeleid voor het bepalen van de DRT voor NM in verschillende matrices. Deze formules staan in onderstaande tabel weergegeven, tevens kan hieruit de formule voor de DRT worden verkregen als zijnde de inverse van de 10^{\log} DRT.

Tabel 7. Afgeleide formules van de DRT versus de temperatuur.

	$10\log DRT =$	$DRT =$
NM in PBS	$-0,1139x + 8,7138$	$10^{(-0,1139x + 8,7138)}$
NM ammoniak	$-0,1355x + 10,383$	$10^{(-0,1355x + 10,383)}$
NM ureum	$-0,1222x + 9,4457$	$10^{(-0,1222x + 9,4457)}$
NM potstalmest	$-0,0996x + 8,0317$	$10^{(-0,0996x + 8,0317)}$
MN, melk, literatuur	$-0,2304x + 16,866$	$10^{(-0,2304x + 16,866)}$

Met behulp van de formules uit Tabel 7 kan de DRT bij verschillende temperaturen bepaald worden. Dit is weergegeven in Tabel 8.

Tabel 8. De DTR in seconden bij verschillende temperaturen voor NM in verschillende matrices.

temperature (° C)	DRT (sec)					
	NM in PBS	3262 in PBS	NM in 1,8% ammonia	NM in 1,8% urea	NM in potstalmest	Nm in melk, literatuur
20	$10^{(-0,1139x + 8,7138)}$	$10^{(-0,1527x + 11,345)}$	$10^{(-0,1355x + 10,383)}$	$10^{(-0,1222x + 9,4457)}$	$10^{(-0,0996x + 8,0317)}$	$10^{(-0,2304x + 16,866)}$
20	2727721,33	195433945,58	47097732,64	10039220,66	1095721,04	1811340092619,61
30	198061,47	5807644,18	2079696,69	602143,50	110585,96	8994975815,30
40	14381,36	172583,79	91833,26	36116,03	11160,92	44668359,22
50	1044,24	5128,61	4055,09	2166,21	1126,42	221819,64
60	75,82	152,41	179,06	129,93	113,68	1101,54
70	5,51	4,53	7,91	7,79	11,47	5,47
80	0,40	0,13	0,35	0,47	1,16	0,03

DRT = Decimal reduction time

NM = Nine Mile reference strain of *Coxiella burnetii*

cursieve data zijn de berekende data buiten het meetbereik van de experimenten

niet cursieve data zijn de berekende data binnen het meetbereik van de experimenten

Tabel 9: De DRT in uren bij verschillende temperaturen voor NM in verschillende matrices.

temperature (° C)	DRT (uur)				Nm in melk, literatuur
	NM in PBS	NM in 1,8% ammonia	NM in 1,8% urea	NM in potstalmest	
20	757,70	13082,70	2788,67	304,37	503150025,73
30	55,02	577,69	167,26	30,72	2498604,39
40	3,99	25,51	10,03	3,10	12407,88
50	0,29	1,13	0,60	0,31	61,62
60	0,02	0,05	0,04	0,03	0,31

DRT = Decimal reduction time

NM = Nine Mile reference strain of *Coxiella burnetii*

cursieve data zijn de berekende data buiten het meetbereik van de experimenten

niet cursieve data zijn de berekende data binnen het meetbereik van de experimenten

5. Discussie en conclusies

Dit onderzoeksproject is uitgevoerd in een samenwerkingsverband tussen de Gezondheidsdienst voor Dieren (GD), het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) en het Central Veterinary Institute, part of Wageningen UR (CVI). Binnen dit onderzoek is gebruik gemaakt van de specifieke expertises van de verschillende deelnemers. De GD heeft daarbij het veldwerk gedaan door het meten van het temperatuurverloop in geitenmest op twee bedrijven en het verzamelen van de mestmonsters. Het RIVM heeft door middel van de PCR, *C. burnetii* DNA in de mestmonsters aangetoond en de hoeveelheid DNA gekwantificeerd zodat ook aangegeven kon worden hoeveel *C. burnetii* bacteriën in de mest moeten hebben gezeten. Het CVI heeft het kweekwerk en het bepalen van de DRT uitgevoerd. Een aantal technieken werd voor het eerst op mest toegepast of op grotere schaal uitgevoerd. Met name de extractie van DNA uit de mest, het kwantificeren van het aantal bacteriën in de mest en het kweken van *C. burnetii* uit de mest moest geoptimaliseerd worden. De experimenten zijn uitgevoerd met de Nine Mile referentie stam,; het Nederlandse veldisolaat groeide te langzaam en in onvoldoende hoeveelheden om betrouwbare resultaten te genereren. Deze moeilijkheden hebben het project vertraagd.

De temperatuur die in de potstal in de mest gemeten is, is relatief laag en ligt in de in deze studie onderzochte potstallen tussen de 10° en 20 °C. Dit is lager dan aanvankelijk, op grond van de verwachte compostering in de potstal, werd verwacht en dit zal mede afhankelijk zijn van de buitentemperatuur die tijdens de metingen tussen de 0° en 10 °C lag. In de potstal wordt de mest met stro mogelijk te vast aangedrukt door de aanwezige dieren zodat zuurstof niet in de mestlaag kan doordringen. Als van de mest een hoop gemaakt wordt stijgt de temperatuur in de schil van de hoop binnen enkele dagen tot een maximum. Voor bedrijf A lag dit maximum boven de 70 °C en voor bedrijf B boven de 60 °C. In de kern van de mesthoop worden temperaturen bereikt van boven de 40 °C.

Compostering is een aerob proces. In de schil van de mesthoop zal voldoende zuurstof aanwezig zijn of binnen kunnen dringen om de compostering op gang te brengen en te continueren. Tijdens dit proces wordt warmte geproduceerd. In de kern zal de zuurstofconcentratie geringer zijn waardoor minder compostering plaatsvindt en de temperatuur ter plekke minder hoog ligt dan in de schil. De compostering zal afnemen met het afnemen van de zuurstofconcentratie waardoor ook de warmteontwikkeling van schil naar kern zal afnemen. Er zal een temperatuurgradiënt ontstaan van schil naar kern. In handboeken wordt aangegeven dat de structuur van geitenmest voldoende is om tot op 1,5 meter vanaf de buitenkant voldoende zuurstof aan te trekken voor compostering.

In de potstalmest en in de opgeslagen composterende mest van een Q-koorts positief geitenbedrijf kan DNA van *C. burnetii* worden aangetoond. De hoeveelheid aangetoond DNA van *C. burnetii* komt overeen met 10^2 tot 10^7 bacteriën per gram mest. In alle lagen van de opgeslagen mest is het bacteriële DNA aan te tonen echter de hoeveelheid varieert en in een aantal monsters is geen *C. burnetii* DNA aangetoond. Gezien de aantallen bacteriën die door middel van de PCR in de mest aangetoond zijn zou het mogelijk moeten zijn om *C. burnetii* uit de mest te kweken. Dit is echter niet gelukt. Dit zou kunnen komen door een methodologisch probleem, onvoldoende gevoeligheid van de kweekmethode mogelijk mede veroorzaakt door de groeieigenschappen van betreffende *C. burnetii*

stam maar ook door de afwezigheid van levende *C. burnetii* bacteriën. Via ent-experimenten is aangetoond dat het technisch mogelijk is om *C. burnetii* uit mest te kweken. Tevens is de methode gevoelig genoeg om 10^5 *C. burnetii* aan te kunnen tonen. Hieruit kan geconcludeerd worden dat de negatieve kweekresultaten veroorzaakt worden door de afwezigheid van levende *C. burnetii* in de mest.

De DRT is bepaald aan de hand van metingen in triplo. De DRT is afhankelijk van de matrix waarin *C. burnetii* zich bevindt. De in deze studie gevonden waarden voor de DRT liggen globaal in dezelfde orde van grootte voor de verschillende temperaturen. Grotere verschillen ontstaan buiten het temperatuurbereik van deze studie (60° tot 72 °C). In de literatuur is weinig bekend over de DRT van *C. burnetii*. Er is slechts één oorspronkelijk artikel gevonden dat betrekking heeft op de DRT van *C. burnetii* (11). De bepaling van de DRT is daarbij uitgevoerd in melk. Een recenter artikel gebruikt deze gegevens voor een discussie over de pasteurisatie van melk (15). De gegevens die in het artikel worden genoemd voor de hogere temperaturen, tussen 60 en 70 °C, komen overeen met de in dit onderzoek gevonden waarden. Als de gegevens worden geëxtrapoleerd naar lagere temperaturen ontstaan grotere verschillen waarbij de door ons gevonden DRT korter is dan die in de literatuur is weergegeven. Dit kan mogelijk verklaard worden uit het gegeven dat er in de studie van Cerf *et al.* slechts 2 meetpunten zijn gebruikt, terwijl in dit project 4 meetpunten zijn gebruikt waardoor een nauwkeuriger bepaling van de DRT mogelijk is.

Aan de hand van het verloop van de temperatuur in een mesthoop gedurende een bepaalde tijd, het aantal aanwezige bacteriën en de DRT kan grofweg bepaald worden of er voldoende afdoding plaatsvindt van *C. burnetii*. De DRT bij 40 °C is in het door ons berekende ongunstigste geval afgerond 26 uur. Elke 26 uur vindt er dan een reductie van het aantal bacteriën met een factor 10 plaats. Uitgaande van 10^7 *C. burnetii* zal het aantal tot vrijwel nihil gereduceerd zijn in 182 uur (7 x 26 uur). Uit onze metingen blijkt dat de kern gedurende minimaal 10 dagen (240 uur) boven de 40 °C zal zijn. In deze periode zullen vrijwel alle *C. burnetii* bacteriën worden afgedood. De DRT bij 60 °C is in het door ons berekende ongunstigste geval 179 s. Elke 179 s vindt er dan een reductie van het aantal bacteriën plaats met een factor 10. Uitgaande van 10^7 *C. burnetii* zal het aantal tot nihil gereduceerd zijn in 1253 s (7 x 179). Uit onze metingen blijkt dat de schil gedurende minimaal 5 dagen (432000 s) boven de 60 °C blijft. In deze periode zullen vrijwel alle aanwezige *C. burnetii* bacteriën worden afgedood.

Samenvattend kunnen de volgende conclusies worden getrokken:

1. De temperatuur van de mest in de potstal is relatief laag, ongeveer 10 tot 20 °C. Dit is lager dan aanvankelijk, op grond van de verwachte compostering in de potstal, werd verwacht.
2. In een mesthoop vindt compostering plaats en daarbij loopt de temperatuur in de schil snel op en bereikt na enkele dagen een maximum. Daarbij is het belangrijk dat er voldoende zuurstof voor compostering aanwezig is.
3. De temperatuur in de schil van de mesthoop blijft boven de 60 °C gedurende ongeveer 12 dagen voor bedrijf A en gedurende 5 dagen voor bedrijf B.

4. De temperatuur in de kern loopt langzamer op dan in de schil, maar blijft vervolgens gedurende meerdere weken op de uiteindelijk bereikte temperatuur.
5. De temperatuur van de kern stijgt tot boven de 40 °Celsius gedurende 10 dagen voor bedrijf A en gedurende langere tijd voor bedrijf B.
6. Het DNA van *C. burnetii* kan in alle lagen van de mesthoop worden aangetoond.
7. Het aantal *C. burnetii* bacteriën per gram mest varieert van 10^2 tot 10^7 .
8. In de mest konden geen levende *C. burnetii* bacteriën worden aangetoond.
9. De DRT varieert enigszins per matrix waarbij in aanwezigheid van ammoniak, ureum en mestextract de DRT iets verlengd wordt ten opzichte van PBS. De achtergrond hiervan is niet bekend.
10. De DRT is kort genoeg om binnen de tijdsduur waarin de gemeten temperaturen in de mesthoop worden gehandhaafd alle mogelijk aanwezige levensvatbare *C. burnetii* bacteriën te kunnen afdoden.

6. Referenties

1. Karagiannis I, Morroy G, Rietveld A, Horrevorts AM, Hamans M, Francken P, et al. Q fever outbreak in the Netherlands: a preliminary report. *Euro Surveill.* 2007 Aug;12(8):E070809 2.
2. Karagiannis I, Schimmer B, Van Lier A, Timen A, Schneeberger P, Van Rotterdam B, et al. Investigation of a Q fever outbreak in a rural area of The Netherlands. *Epidemiol Infect.* 2009 Sep;137(9):1283-94.
3. Roest HI, Tilburg JJ, van der Hoek W, Vellema P, van Zijderveld FG, Klaassen CH, et al. The Q fever epidemic in The Netherlands: history, onset, response and reflection. *Epidemiol Infect.* 2011 Jan;139(1):1-12.
4. Schimmer B, Ter Schegget R, Wegdam M, Zuchner L, de Bruin A, Schneeberger PM, et al. 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.* 2010;10:69.
5. van der Hoek W, Dijkstra F, Schimmer B, Schneeberger PM, Vellema P, Wijkmans C, et al. Q fever in the Netherlands: an update on the epidemiology and control measures. *Euro Surveill.* 2010;15(12).
6. Van Steenberghe JE, Morroy G, Groot CA, Ruijckes FG, Marcelis JH, Speelman P. [An outbreak of Q fever in The Netherlands--possible link to goats]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde.* 2007 Sep 8;151(36):1998-2003.
7. Klaassen CH, Nabuurs-Franssen MH, Tilburg JJ, Hamans MA, Horrevorts AM. Multigenotype Q fever outbreak, the Netherlands. *Emerging infectious diseases.* 2009 Apr;15(4):613-4.
8. Roest HI, Ruuls RC, Tilburg JJ, Nabuurs-Franssen MH, Klaassen CH, Vellema P, et al. Molecular Epidemiology of *Coxiella burnetii* from Ruminants in Q Fever Outbreak, the Netherlands. *Emerging infectious diseases.* 2011 Apr;17(4):668-75.
9. Arricau-Bouvery N, Rodolakis A. Is Q fever an emerging or re-emerging zoonosis? *Vet Res.* 2005 May-Jun;36(3):327-49.
10. Badudieri B. Q fever: a zoonosis. *Adv Vet Sci.* 1959(5):81-154.
11. Enright JB, Salder WW, Thomas RC. Pasteurization of milk containing the organism of Q fever. *American Journal of Public Health.* 1957;47:695-700.
12. Rustscheff S, Norlander L, Macellaro A, Sjostedt A, Vene S, Carlsson M. A case of Q fever acquired in Sweden and isolation of the probable ethiological agent, *Coxiella burnetii* from an indigenous source. *Scand J Infect Dis.* 2000;32(6):605-7.
13. Klee SR, Ellerbrok H, Tyczka J, Franz T, Appel B. Evaluation of a real-time PCR assay to detect *Coxiella burnetii*. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2006 Oct;1078:563-5.
14. Bears RE, Girard KF. The effect of pasteurization on *Listeria monocytogenes*. *Can J Microbiol.* 1958 Feb;4(1):55-61.
15. Cerf O, Condron R. *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiol Infect.* 2006 Oct;134(5):946-51.

7. Appendix

7.1 Opwerking van DNA van *C. burnetii* voor de PCR

Voorbehandeling:

- 10 gram mest in 50 ml Greiner buis plus 30 ml PBS.
 - Bij kleinere hoeveelheden mest is minder PBS toegevoegd.
- homogeniseer de buizen voor 2 uur bij 10 rpm.
- Centrifugeer bij 2000 RPM voor 10 minuten (afdraaien grove delen).
- Supernatant word overgebracht in 50 ml Greiner buizen en bewaard bij 4°C.

Gemodificeerd NucliSens protocol 1

- 100 µl supernatant + 130 µl lysisbuffer + 20 µl proteinase K + 50 µl *B. thuringiensis* sporen ($1,2 \times 10^5$).
- Incubatie: 10 minuten bij 65°C (voor optimale activiteit van proteinase K).
- Incubatie: 10 minuten bij 95°C (lysis voor lastig te lyseren bacteriën).

Gemodificeerd NucliSens protocol 2

- 500 µl supernatant + 650 µl lysisbuffer + 40 µl proteinase K + 50 µl *B. thuringiensis* sporen ($1,2 \times 10^5$).
- Incubatie: 10 minuten bij 65°C (voor optimale activiteit van proteinase K).
- Incubatie: 10 minuten bij 95°C (lysis voor lastig te lyseren bacteriën).

Hierna worden de monsters volgens het standaard NucliSense DNA extractie protocol van RIVM verder behandeld en volgt een screening met de Q-PCR voor *C. burnetii* (met 3 µl DNA template van de te testen onverdunde monsters en 10X en 100x verdunningen).

7.2 Opwerking van *C. burnetii* voor de kweek

De voorbehandeling vond als volgt plaats.

- 2 gr potstalmest in 10 ml PBS 13
- 10 minuten schudden op het schudplateau (max) en laat de suspensie vervolgens 30 minuten uitzakken
- Supernatant 10 minuten afdraaien bij 1200 rpm
- Supernatant filtreren over een cell stainer ('theezeefje'), 1,2 µm filter en vervolgens door een 0,45 µm filter
- Filtraat 5 min centrifugeren bij 15.000g
- Pellet resuspenderen in 1 ml medium (Earl's Minimal Essential Medium met Fetal Bovine Serum, L-glutamine en non essential aminoacids)
- Herhaal deze wasstap nog twee keer
- Resuspendeer pellet in 100µl medium en ent dit op een SF met BGM cellen
- De kweek werd na 24 uur beoordeeld, indien verontreiniging plaatsvond werden de SF bij -80° Celsius ingevroren, ontdooid en opnieuw gefiltreerd en gewassen waarna het filtraat opnieuw op BGM cellen werd gezet.
- Kweek vond verder plaats volgens het standaardprotocol². Bevestiging van een positieve kweek vond plaats door middel van een Immunofluorescentie kleuring en via PCR.

² H.I.J. Roest, A. Dinkla, D. Frangoulidis, W. Wouda, P. Vellema, A. Horrevorts, M. Nabuurs, P. Sturm, C.H.W. Klaassen, F.G. van Zijderfeld. Isolation of *Coxiella burnetii* strains from clinical material from humans and small ruminants originating from the Netherlands. Voorjaarsvergadering van de NVMM, Papendal, Arnhem, The Netherlands 20-21 april 2010