



Ciska Schets, RIVM

Lianne de Heer, RIVM

Erik Koppenaar, Waterschap Vallei en Veluwe i.o.

Ana Maria de Roda Husman, RIVM

Q-koorts-bacterie in afvalwater op rioolwaterzuiveringsinstallaties

Onderzoek in opdracht van STOWA op vier rioolwaterzuiveringsinstallaties in het gebied waar in 2007-2010 de Q-koortsepidemie heerste, toonde aan dat DNA van de bacterie die Q-koorts veroorzaakt (*Coxiella burnetii*) in lage concentraties in influent en actief slib op deze rwzi's aanwezig was. DNA van *C. burnetii* in deze matrices kan duiden op de aanwezigheid van levende en/of dode bacteriën. Bij de behandeling van afvalwater in rwzi's worden aerosolen gevormd. Daarin kunnen ziekteverwekkende micro-organismen uit het afvalwater aanwezig zijn, zoals *C. burnetii*. Rwzi-medewerkers kunnen hier tijdens hun werkzaamheden aan blootgesteld worden. Op basis van de resultaten is een kwantitatieve inschatting van het gezondheidsrisico niet mogelijk, maar de lage aangetoonde concentraties *C. burnetii* DNA in afvalwater en het ten einde lopen van de Q-koortsepidemie en daarmee de belasting van rwzi's, maken het aannemelijk dat het gezondheidsrisico gering is voor personen die aan aerosolen op rwzi's worden blootgesteld.

In 2007 begon in Nederland een grote epidemie van Q-koorts¹⁾. Q-koorts is een zoönose: een ziekte die van dieren kan worden overbracht op mensen. De ziekte wordt veroorzaakt door de bacterie *Coxiella burnetii*^{2),3)}. In totaal werden van 2007 tot en met 2010 meer dan 4000 mensen ziek, vooral in Noord-Brabant, Gelderland en Limburg^{1),4)}. In deze provincies vindt intensieve geitenhouderij plaats¹⁾.

In Nederland vormen geiten en schapen de belangrijkste besmettingsbron voor de mens, maar ook koeien, huisdieren, wild en vogels kunnen besmet zijn. Besmette dieren vertonen meestal geen symptomen, buiten het optreden van abortussen en vroeggeboorten. Besmette dieren scheiden de bacterie uit met urine, feces, vruchtwater en placentaweefsel^{2),5)}. Mensen kunnen besmet raken doordat ze direct in contact komen met (de ingedroogde uitscheidingsproducten van) besmette dieren⁶⁾, maar ook door het inademen van stofdeeltjes of aerosolen (kleine druppeltjes water in de lucht) met de bacterie²⁾. *C. burnetii* is zeer infectieus, er is slechts een lage dosis nodig om een infectie te veroorzaken³⁾. 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^{1),3),5)}.

Om de Q-koortsepidemie een halt toe te roepen, zijn verschillende maatregelen genomen⁷⁾. Het periodiek testen van de melk van alle melkgeiten- en melkschapenbedrijven op de aanwezigheid van *C. burnetii* (de zogenaamde tankmelkmonitor) en een verplichte vaccinatie voor alle melkgeiten en -schapen zijn nog van kracht. In september 2011 zijn de overige maatregelen tegen Q-koorts versoepeld op basis van advies van deskundigen en omdat alle melkgeiten en -schapenbedrijven aan de vaccinatieplicht hadden voldaan.

Bij de behandeling van afvalwater in rwzi's worden zuiveringstechnieken toegepast waarbij aerosolen gevormd worden, bijvoorbeeld tijdens het beluchten van actief slib. Deze aerosolen kunnen ziekteverwekkende micro-organismen afkomstig uit het afvalwater bevatten. Medewerkers van rwzi's worden in verschillende mate aan aerosolen blootgesteld, afhankelijk van de aard, frequentie en duur van hun werkzaamheden⁸⁾. Wanneer afvalwater van besmette geitenhouderijen op het riool wordt geloosd, kan *C. burnetii* in het afvalwater en aerosolen op rwzi's terecht komen. Als medewerkers hieraan worden blootgesteld vormt dit voor hen een mogelijk gezondheidsrisico. Het RIVM onderzocht in opdracht van STOWA of erfelijk materiaal (DNA) van de bacterie aanwezig was in afvalwater op rwzi's in het

gebied waar de Q-koortsepidemie heerste. DNA van *C. burnetii* in afvalwatermonsters kan duiden op de aanwezigheid van levende of dode bacteriën.

***Coxiella burnetii* in afvalwater Monsterlocaties en bemonstering**

Op vier rwzi's in gebieden waar in 2008 en 2009 clusters ontstonden van patiënten

Melkinstallatie op geitenhouderij.



met Q-koorts in de buurt van geitenhouderijen, werden monsters van het afvalwater genomen. Rwwi Chaam ontvangt het melkspoelwater (het water waarmee de melkinstallatie na gebruik wordt gespoeld) van één geitenbedrijf, evenals rwwi Druuten. Rwwi Vinkel ontvangt al het afvalwater van één geitenbedrijf en het melkspoelwater van een tweede bedrijf, terwijl rwwi Dongemond al het hoofd- en naspooelwater van één geitenbedrijf ontvangt. Ten tijde van het onderzoek waren deze geitenbedrijven met Q-koorts besmet.

Van maart tot en met juli 2011 werden op deze rwwi's negen keer monsters genomen van het influent en van het actief slib uit (één van) de beluchtingstank(s). Wanneer met *C. burnetii* besmet afvalwater binnenkomt, is hier de kans het grootst om *C. burnetii* te detecteren. Van het influent werden monsters genomen uit de mengvaten waarin debietproportioneel 24-uurs monsters werden opgevangen. In de beluchtingstank wordt het voorbezonden afvalwater gemengd met actief slib. De beluchtingstank wordt belucht, waarbij aerosolen ontstaan. In de nabijheid van open beluchtingstanks is de blootstelling aan ziekteverwekkers of stoffen uit het afvalwater (via aerosolen) het grootst⁹. In deze studie is de aanwezigheid van *C. burnetii* in influent en actief slib uit de beluchtingstanks onderzocht.

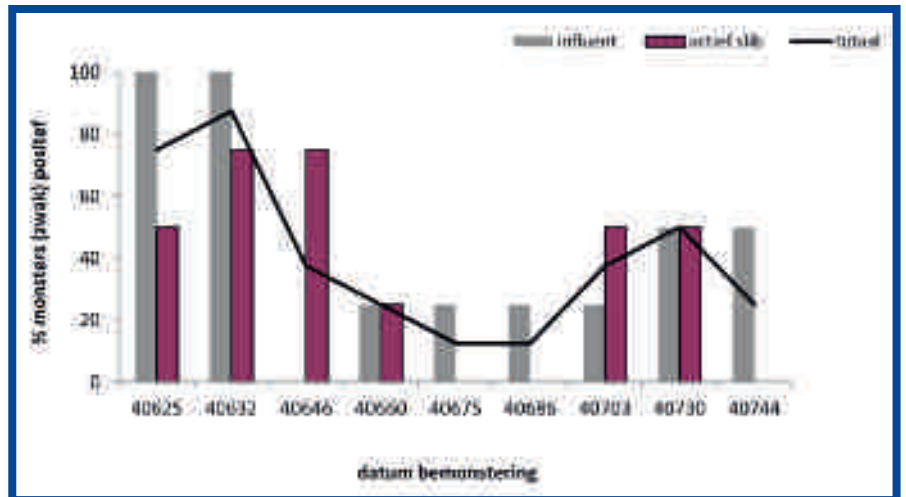
Analyses

Uit de monsters van het influent en het actief slib werd DNA geïsoleerd met behulp van een standaard NucliSens Magnetische DNA extractie. Het verkregen DNA werd onderzocht op de aanwezigheid van *C. burnetii* door middel van een multiplex real-time PCR (Polymerase Chain Reaction)-test^{9,10}. Deze detecteert twee stukken DNA die specifiek zijn voor *C. burnetii*: *com1* en *IS1111*. *IS1111* komt meerdere keren voor in het genoom van *C. burnetii*, in tegenstelling tot *com1*, dat slechts één keer voorkomt. Hierdoor zal in positieve monsters altijd meer van *IS1111* aanwezig zijn dan van *com1* en wordt er voor *IS1111* dus sneller een positief signaal verkregen. Een monster met alleen een positief signaal voor *IS1111* werd als 'zwak positief' gescoord: in het monster was weinig DNA van *C. burnetii* aanwezig. Een monster met een positief signaal voor *IS1111* én *com1* werd als 'positief' gescoord. In dergelijke monsters was meer *C. burnetii* DNA aanwezig. Monsters werden 'negatief' gescoord wanneer er geen positieve signalen werden gevonden voor beide stukken *C. burnetii* DNA.

Resultaten

Influent en actief slib

In ongeveer 40 procent van alle monsters op de onderzochte rwwi's is DNA van *C. burnetii* aangetroffen. In vrijwel alle gevallen werd met PCR alleen een positief signaal voor *IS1111* gevonden. In deze monsters was een lage concentratie *C. burnetii* DNA aanwezig. Ze werden als 'zwak positief' gescoord. In slechts één monster (influent rwwi Vinkel, juli 2011) werd een positief signaal voor zowel *IS1111* als *com1* gevonden; dit monster werd als 'positief' bestempeld. DNA van *C. burnetii* werd het vaakst gevonden in monsters



Afb. 1: Het percentage monsters van het influent en het actief slib uit beluchtingstanks op rwwi's waarin gedurende de onderzoeksperiode van maart tot en met juli 2011 DNA van *C. burnetii* werd aangetoond; per datum werden vier monsters van het influent en vier monsters uit beluchtingstanks onderzocht, afkomstig van vier verschillende rwwi's.

van rwwi Chaam (n = 11/18; 61%), gevolgd door rwwi Dongemond (n = 8/18; 44%). In monsters van rwwi Vinkel en rwwi Druuten werd het minst vaak DNA van *C. burnetii* gevonden (beiden n = 5/18; 28%). DNA van *C. burnetii* werd in 44% (n = 16/36) van de influentmonsters aangetoond en in 36% (n = 13/36) van de monsters uit de beluchtingstanks.

Lammerseizoen

In de monsters die in maart 2011 werden genomen, werd in vergelijking met de overige maanden (april-juli), het meest frequent DNA van *C. burnetii* aangetroffen (zie afbeelding 1). Deze periode valt samen 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. Het geitenbedrijf dat afvalwater loosde op rwwi Druuten, kwam

in juli 2011 niet meer voor op de lijst met besmette bedrijven (normlijst Q-koorts van 5 januari jl.) evenals één van de twee bedrijven die afvalwater loosden op rwwi Vinkel. 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 rwwi Druuten. De stijging in het aantal positieve monsters vanaf de bemonstering in juni komt grotendeels voor rekening van rwwi Chaam. Uit de normlijst Q-koorts blijkt dat in mei en juni 2011 een geitenhouderij in Galder en in Strijbeek met Q-koorts besmet zijn geraakt. Deze plaatsen liggen dicht bij Chaam, maar lozen hun afvalwater niet direct op rwwi Chaam.

Discussie

Lage concentraties

In influent en actief slib op de onderzochte rwwi's is DNA van *C. burnetii* in lage concentraties aangetroffen. In eerdere studies tijdens de Q-koortsuitbraak werd *C. burnetii* DNA aangetoond in vaginaalwaps, feces en melk van geiten en schapen op besmette

Beluchtingstank op een rioolwaterzuiveringsinstallatie.



bedrijven en stof op oppervlakken op deze bedrijven^{9),11)}. De concentratie *C. burnetii* DNA in deze monsters was (aanzienlijk) hoger dan in de monsters uit de huidige studie. 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-koortsepisode een halt toe te roepen. In 2011 zijn maar weinig humane gevallen van Q-koorts geregistreerd in vergelijking tot de jaren daarvoor. Ook de normlijst Q-koorts laat zien dat het aantal *C. burnetii* positieve bedrijven gedurende 2011 is gedaald.

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. *C. burnetii* overleeft lang (maanden tot jaren) in het milieu⁹⁾ en wordt waarschijnlijk in belangrijke mate verspreid met aerosolen en stofdeeltjes via de lucht^{3),12)}. De tijdens de Q-koorts epidemie genomen maatregelen zijn er zoveel mogelijk op gericht geweest verspreiding van de bacterie naar het milieu te voorkomen, bijvoorbeeld door een mestuitleververbod en een verbod op het transport van dieren⁷⁾. Vanwege de veelheid aan mogelijke verspreidingsroutes, onder andere via stof, grond, huid van dieren, wol, bont, ongepasteuriseerde melkproducten⁵⁾ en afvalwater van geitenhouderijen, is het aannemelijk dat DNA van *C. burnetii* in lage concentraties wijdverspreid gedetecteerd kan worden. 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 fijnstof¹³⁾.

Gezondheidsrisico

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. Het met PCR gedetecteerde DNA kan zowel van levende als van dode bacteriën afkomstig zijn; in het laatste geval kunnen de bacteriën geen infectie of ziekte veroorzaken. Bovendien zullen niet alle potentieel levende bacteriën vanuit het influent of de beluchtingstank in aerosolen terechtkomen en maakt het afvalwater van geitenbedrijven dat binnenkomt bij rwzi's slechts een deel uit van een grotere stroom afvalwater. Door verdunning (en mogelijk inactivatie) 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.

Toekomst

Op basis van de in deze studie gegeneerde gegevens is geen kwantitatieve inschatting van het gezondheidsrisico mogelijk. De verkregen resultaten, de hoge vaccinatiegraad van de melkgeiten en -schapen en het ten einde lopen van de Q-koortsepisode als gevolg van de genomen maatregelen geven geen aanleiding tot het doen van vervolgonderzoek waarin aerosolen worden onderzocht en het risico op besmetting met *C. burnetii* voor medewerkers van rwzi's wordt gekwantificeerd.

Mocht de Q-koorts epidemie in Nederland ooit weer opblazen, dan is het zinvol om het afvalwater op rwzi's die afvalwater van besmette geitenhouderijen ontvangen te onderzoeken en vast te stellen of 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 zinvol een risicoschattingstraamwerk voor blootstelling aan pathogenen in aerosolen op te stellen, 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. Hoewel detectie van *C. burnetii* in afvalwater mogelijk is met de in deze studie geoptimaliseerde methoden, is het van belang technieken waarmee onderscheid gemaakt kan worden tussen levende en dode bacteriën, zoals celkweek of een levensvatbaarheids-PCR, te ontwikkelen en te optimaliseren en gebruik van apparatuur voor bemonstering van aerosolen op rwzi's te optimaliseren en valideren.

LITERATUUR

- 1) Delsing C., B. Kullberg en C. Bleeker-Rovers (2010). Q fever in the Netherlands from 2007 to 2010. *The Journal of Medicine* nr. 12, pag. 382-387.
- 2) Maurin M. en D. Raoult (1999). Q Fever. *Clinical Microbiology Reviews* nr. 4, pag. 518-553.
- 3) Raoult D., T. Marrie en J. Mege (2005). Natural history and pathophysiology of Q fever. *Lancet Infectious Diseases* nr. 5, pag. 219-226.
- 4) Schimmer B., D. Notermans, M. Harms, J. Reimerink, J. Bakker, P. Schneeberger, L. Mollema, P. Teunis, W. van Pelt en Y. van Duynhoven (2011). Low seroprevalence of Q fever in the Netherlands prior to a series of large outbreaks.
- 5) LCI (2011). Richtlijn infectieziektenbestrijding A78: Q-koorts.
- 6) Whelan J., B. Schimmer, A. de Bruin, M. van Beest Holle, W. van der Hoek en R. ter Schegget (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* nr. 11, pag. 1-7.
- 7) Roest H., L. Hogerwerf, R. van der Brom, T. Oomen, J. van Steenbergen, M. Nielen en P. Vellema (2011). Q-koorts in Nederland: stand van zaken, resultaten van veterinair onderzoek en verwachtingen voor komende jaren. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde* nr. 5, pag. 340-343.
- 8) Medema G-J., D. Koot en A. Brouwer (2002). Risico van blootstelling aan *Legionella* op rwzi's. STOWA. Rapport 2002-16.
- 9) De Bruin A., A. de Groot, L. de Heer, J. Bok, P. Wielinga, M. Hamans, B. van Rotterdam en I. Janse (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* nr. 18, pag. 6516-6523.
- 10) Schets C., L. de Heer, H. van den Berg en A. de Bruin (2012). Q-koorts bacterie (*Coxiella burnetii*) in afvalwater op rioolwaterzuiveringsinstallaties. STOWA. Rapport 2012-03.
- 11) De Bruin A. en B. van Rotterdam (2009). A query for *Coxiella* in veterinary and environmental matrices. Letter report 330291003. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu.
- 12) Astobiza I., J. Barandika, F. Ruiz-Fons, A. Hurtado, I. Povedano, R. Juste en A. García-Pérez (2011). *Coxiella burnetii* shedding and environmental contamination at lambing in two highly naturally-infected dairy sheep flocks after vaccination. *Research in Veterinary Science* nr. 3, pag. 58-63.
- 13) Heederik D. en C. IJzermans (red.) (2011). Mogelijke effecten van intensieve veehouderij op de gezondheid van omwonenden. IRAS Universiteit Utrecht, NIVEL, RIVM.

