

KWR | December 2015

Bronopsporing fecale verontreiniging op zwemwaterlocaties Burgumer Mar en De Kuilart, met behulp van DNA technieken

KWR 2015.101

Bronopsporing fecale verontreiniging op zwemwaterlocaties Burgumer Mar en De Kuilart, met behulp van DNA technieken

KWR | December 2015

Opdrachtnummer

401164

Rapportnummer

KWR 2015.101

Projectmanager

E. Kardinaal

Opdrachtgever

Wetterskip Fryslân

Auteur(s)

E. Kardinaal

Verzonden aan

Richard Feenstra

Jaar van publicatie
2015

Meer informatie

T 030-6069711
E edwin.kardinaal@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

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



KWR | December 2014 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Inhoud

Inhoud	2
1 Inleiding	3
1.1 Opsporen van bronnen	3
1.2 Zwemwaterkwaliteit niet op orde	3
2 Methoden & aanpak	4
2.1 Watermonsters	4
2.2 Filtratie	4
2.3 DNA analyse	4
3 Bronopsporing met behulp van DNA-technieken: resultaten	5
3.1 De opbrengst van de inhibitie- en rendementscontrole (IC)	5
3.2 Resultaten van de DNA analyse	5
4 Vergelijking met zwemwater parameters	6
4.1 Zwemwater parameters Burgumer Mar	6
4.2 Zwemwater parameters de Kuilart	7
5 Conclusies	9
6 Referenties	10
Bijlage I	DNA analyse: extractie, qPCR en rendement

1 Inleiding

1.1 Opsporen van bronnen

De beoordeling van zwemwaterlocaties vindt plaats op basis van periodieke metingen van de concentratie *E. coli* en intestinale enterococci in het water. Deze indicatorbacteriën komen algemeen voor in darmen van warmbloedige dieren en geven daarom een indruk van de concentratie fecaal materiaal in water en daarmee van de potentiële aanwezigheid van ziekteverwekkende micro-organismen. Bekende bronnen van fecale verontreiniging in oppervlaktewater zijn onder andere de aanwezigheid van (water)vogels, vervuiling door recreanten, afspoeling van agrarisch gebied, effluentlozing door RWZI's, overstorten uit rioolwater- of hemelwaterriolering, aanwezigheid van wilde fauna en afspoeling van hondenfeces. Om gericht maatregelen te treffen is het van belang inzicht te hebben in de bronnen van fecale besmetting per zwemwaterlocatie.

De standaard zwemwaterparameters (*E. coli* en intestinale enterococci) geven geen inzicht in de herkomst van de vervuilingsbronnen op een (zwemwater)locatie. Recentelijk zijn daarom specifieke DNA-methoden ontwikkeld en toegepast waarmee fecale verontreinigingen, afkomstig van verschillende diergroepen, zijn te onderscheiden op basis van diergroepspecifieke fecale bacteriën (Geerlings, 2015; Heijnen & Learbuch, 2012; Heijnen *et al.*, 2014). Daarbij worden in het water aanwezige DNA-fragmenten van deze diergroepspecifieke bacteriën selectief vermeerderd en gekwantificeerd (met behulp van qPCR). De volgende diergroepen kunnen met de DNA methodiek onderscheiden worden: mensen, vogels, varkens, herkauwers (als groep), runderen (uit de groep van herkauwers), paarden en honden.

1.2 Zwemwaterkwaliteit niet op orde

In het beheergebied van Wetterskip Fryslân zijn enkele zwemwaterlocaties waarvan de zwemwaterkwaliteit niet altijd voldoet aan de kwaliteitseisen zoals vastgelegd in de Europese zwemwaterrichtlijn (EEA, 2015). Op een tweetal van dergelijke locaties valt de zwemwaterkwaliteit volgens de Europese beoordeling in de categorie "slecht" (voor Burgumer Mar) of "aanvaardbaar" (voor de Kuilart). Het is voor Wetterskip Fryslân van belang om de belangrijkste bronnen die bijdragen aan de overschrijdingen van de EU normen goed in beeld te hebben. Zodoende kunnen gerichte maatregelen geformuleerd worden en kan het Wetterskip in gesprek met betrokken partijen.

Het doel van het huidige onderzoek is om te achterhalen wat de voornaamste bron van fecale verontreiniging is die bijdraagt aan verhoogde concentraties (leidend tot overschrijdingen) van de fecale parameters *E. coli* en enterococci zoals die eerder dit badseizoen 2015 op de locaties Burgumer Mar en de Kuilart zijn geconstateerd.

2 Methoden & aanpak

2.1 Watermonsters

Gedurende de periode 25 mei t/m 14 september 2015 zijn door het Wetterskip Fryslân watermonsters genomen op de zwemwaterlocaties Burgumer Mar en de Kuilart. De monsters zijn vervolgens afgeleverd bij het laboratorium van WLN in Glimmen. In totaal zijn 18 (9 stuks op iedere locatie) watermonsters verzameld en onderzocht met de DNA-technieken (qPCR). De monsters zijn op hetzelfde moment genomen als de reguliere zwemwaterbemonstering om zo een goede vergelijking van de DNA resultaten met de kweekgegevens van *E. coli* en intestinale enterococci mogelijk te maken.

2.2 Filtratie

Binnen 48 uur na monsternamen is een volume van 100 ml van elk monster, onder vacuüm, gefiltreerd over een polycarbonaat membraanfilter (Track-edge filters, Sartorius) met een porie-grootte van 0,2 µm en een doorsnede van 4,5 cm. Vervolgens is het DNA geïsoleerd en gezuiverd. Deze activiteit is uitgevoerd in het laboratorium van WLN, in Glimmen.

2.3 DNA analyse

De DNA analyse is op te splitsen in een aantal stappen: DNA isolatie, DNA analyse (m.b.v. qPCR) en kwaliteitscontrole. Zowel voor de DNA isolatie als voor de qPCR analyses is gebruik gemaakt van KWR werkvoorschriften, voor details van deze stappen wordt verwezen naar Bijlage I. De kwaliteitscontrole bevat twee onderdelen, in de analyse wordt gebruik gemaakt van een interne controle zodat zicht ontstaat op de efficiëntie van de DNA extractie en de qPCR analyse. De uitkomsten van de PCR analyse worden gecorrigeerd voor het rendement van deze interne controle (zie Bijlage I). De tweede controle wordt uitgevoerd doordat een collega laborant alle gerapporteerde uitkomsten controleert op juistheid. Ook de controlestappen zijn vastgelegd in KWR werkvoorschriften.

3 Bronopsporing met behulp van DNA-technieken: resultaten

3.1 De opbrengst van de inhibitie- en rendementscontrole (IC)

Om te bepalen of de oppervlaktewatermonsters van de locaties Burgumer Mar en de Kuilart geschikt waren voor qPCR analyse is de opbrengst van de IC bepaald in elk monster. Van de 7 geanalyseerde monsters was de opbrengst van de IC in alle monsters op orde. Deze uitkomst geeft aan dat de watermonsters afkomstig van deze zwemwaterlocatie zich goed lieten behandelen.

3.2 Resultaten van de DNA analyse

In de onderstaande tabel zijn de resultaten van de DNA analyse gepresenteerd. De aangetroffen concentraties van DNA kopieën van de diverse merkers voor fecale verontreinigingsbronnen zijn regelmatig beneden de detectielimiet (aangegeven met een '<' teken in de tabel).

Op de locatie Burgumer Mar is driemaal een positief signaal aangetoond voor humaan *Bacteroides* en eenmaal een positieve reactie voor herkauwer (Tabel 1a). Op locatie de Kuilart is eveneens in alle monsters een positief signaal aangetoond voor humaan *Bacteroides*. Op 7 september is ook een positief signaal voor herkauwer aangetoond (Tabel 1b). Op beide locaties zijn geen DNA sporen voor vogels en honden aangetroffen.

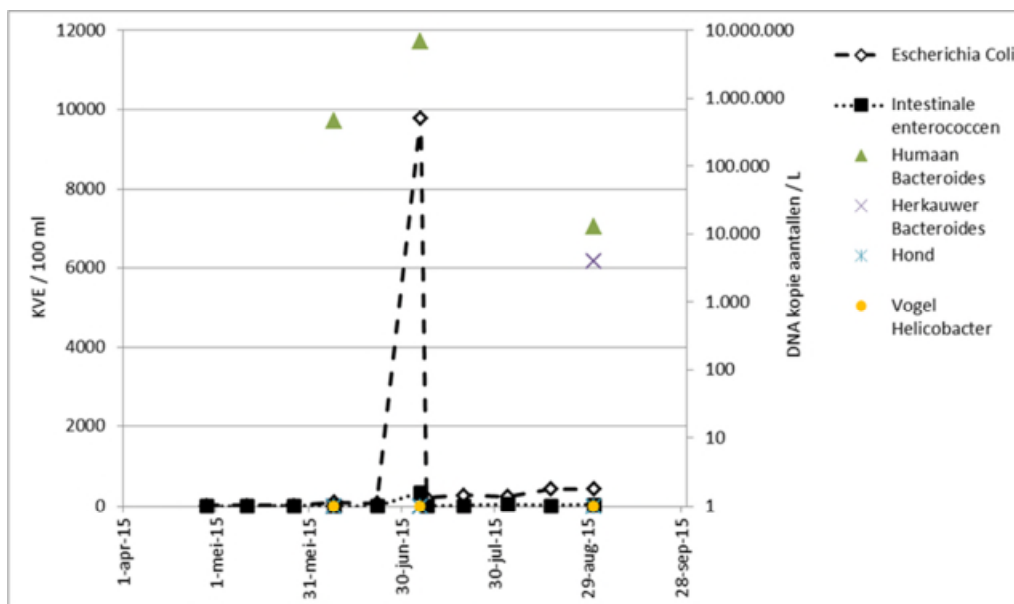
TABEL 1. RESULTATEN VAN DE Q-PCR ANALYSE VOOR DE BRONOPSPORING VAN FECALE VERONTREINIGING OP DE ZWEMWATERLOCATIES BURGUMER MAR EN DE KUILART. DE CONCENTRATIES ZIJN UITGEDRUKT IN DNA KOPIE AANTALLEN PER LITER. DE VETGEDRUKTE GETALLEN ZIJN POSITIEVE WAARNEMINGEN. DE OVERIGE GETALLEN ZIJN ONDER DE DETECTIELIMIET. DE DETECTIELIMIET IS HET RESULTAAT VAN DE DNA ANALYSE, DE HOEVEELHEID GEFILTREERD WATER EN HET RENDEMENT (ZIE BIJLAGE I).

A) Burgumer Mar				
Monsterdatum	Humaan Bacteroides	Herkauwer Bacteroides	Hond	Vogel Helicobacter
8-6-2015	4,60E+05	<1,6E+03	<1,6E+03	<7,8E+03
6-7-2015	6,90E+06	<1,4E+03	<1,4E+03	<7,0E+03
31-8-2015	1,30E+04	4,00E+03	<1,2E+03	<6,0E+03
B) De Kuilart				
Monsterdatum	Humaan Bacteroides	Herkauwer Bacteroides	Hond	Vogel Helicobacter
15-6-2015	2,40E+05	<1,7E+03	<1,7E+03	<8,3E+03
13-7-2015	4,50E+05	<1,4E+03	<1,4E+03	<7,1E+03
27-7-2015	4,10E+05	<1,9E+03	<1,9E+03	<9,5E+03
7-9-2015	2,20E+04	7,30E+03	<1,5E+03	<7,4E+03

4 Vergelijking met zwemwater parameters

4.1 Zwemwater parameters Burgumer Mar

In Figuur 4.1 zijn de gegevens van de DNA analyses en de beide zwemwater parameters *E. coli* en intestinale enterococci weergegeven voor de locatie Burgumer Mar. Op de locatie is gedurende de onderzoeksperiode eenmaal een overschrijding van de signaalwaarde (1800 kve/100ml) van *E. coli* geconstateerd (6 juli). Er is geen overschrijding van de enterococci signaalwaarde (400 kve/100ml) geconstateerd, wel een verhoogde concentratie van 360 KVE / 100 ml (ook op 6 juli). Op het moment van de *E. coli* overschrijding van 6 juli zijn er van de onderzochte merkers alleen DNA kopieën aangetoond voor humaan *Bacteroides*. Later in het seizoen op 31 augustus 2015 zijn ook DNA kopieën aangetroffen van herkauwers. Deze waarneming viel niet samen met een verhoging in de concentraties *E. coli* en/of enterococci.



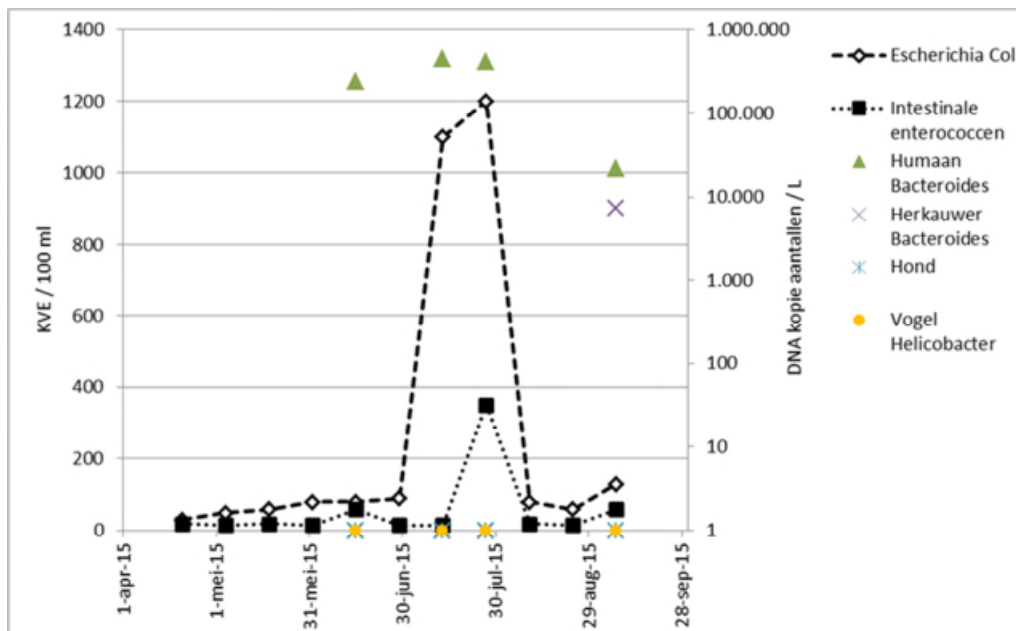
FIGUUR 4.1. MEETWAARDEN VOOR *E. COLI* EN ENTEROCOCCEN OP LOCATIE BURGUMER MAR, EN DE BIJBEHOORENDE POSITIEVE DNA RESULTATEN VAN POTENTIËLE FECALE BRONNEN. DE CONCENTRATIES *E. COLI* EN INTESTINALE ENTEROCOCCEN ZIJN UITGEDRUKT IN KVE / 100 ML. DE CONCENTRATIES AAN MERKERS VAN DE BRONNEN ZIJN UITGEDRUKT IN DNA KOPIE AANTALLEN / L.

In het zwemwaterprofiel van deze locatie (Wetterskip Fryslân, 2009/2015) worden met name bronnen genoemd die duiden op mogelijke fecale verontreiniging van humane herkomst, zoals overstorten, aanwezigheid van effluent van een RWZI, aanwezigheid van een jachthaven en huishoudelijk afvalwater. Ook veehouderij wordt als mogelijke bron genoemd. De DNA analyse laat zien dat met name de bronnen van humane herkomst op de locatie aangetoond worden en verantwoordelijk kunnen worden gehouden voor de overschrijding van de zwemwaterparameter *E. coli*. Welk van de humane bronnen dan (het meest) verantwoordelijk is voor de vervuiling op de zwemwaterlocatie valt moeilijk te zeggen. Wel is op 6 juli nabij de locatie (KNMI locatie Bergumerdam) een behoorlijke hoeveelheid neerslag

gevallen (15,1 mm, KNMI). Afhankelijk van het tijdbestek waarin die hoeveelheid neerslag valt kan een overstort wel of niet in werking treden, dit verdient nader onderzoek op de locatie.

4.2 Zwemwater parameters de Kuilart

In Figuur 4.2 zijn de gegevens van de DNA analyses en de beide zwemwater parameters *E. coli* en intestinale enterococcen weergegeven voor de locatie de Kuilart. Op de locatie is gedurende de onderzoeksperiode geen overschrijding van de signaalwaarde (1800 kve/100ml) van *E. coli* geconstateerd. Wel was er op 13 en 27 juli sprake van verhoogde *E. coli* concentraties van respectievelijk 1100 en 1200 KVE / 100ml. Op 27 juli was ook de concentratie aan intestinale enterococcen verhoogd: 350 KVE / 100ml. Net als bij de locatie Burgumer Mar is ook op locatie de Kuilart sprake van hoge DNA concentraties die duiden op de aanwezigheid van een fecale bron van humane herkomst. De hoge concentraties vallen samen met de hoge concentraties aan *E. coli*. Op 7 september is er nog wel een hoge concentratie herkauwer DNA aangetoond. Deze piek viel niet samen met een verhoging van de concentraties in zwemwaterparameters.



FIGUUR 4.2. MEETWAARDEN VOOR *E. COLI* EN ENTEROCOCCEN OP LOCATIE DE KUILART, EN DE BIJBEHORENDE POSITIEVE DNA RESULTATEN VAN POTENTIËLE FECALE BRONNEN. DE CONCENTRATIES *E. COLI* EN INTESTINALE ENTEROCOCCEN ZIJN UITGEDRUKT IN KVE / 100 ML. DE CONCENTRATIES AAN MERKERS VAN DE BRONNEN ZIJN UITGEDRUKT IN DNA KOPIE AANTALLEN / L.

In de actualisatie van het zwemwaterprofiel van deze locatie (Wetterskip Fryslân, 2015) wordt de invloed van een aantal potentiële bronnen van fecale herkomst als belangrijk bestempeld: (recreatie)vaart, gevolgd door bezoekers, vogels en honden. Op basis van het zwemwaterprofiel van 2010 (Wetterskip Fryslân) is er sprake van een overstort in de invloedssfeer van het omliggende water, is er sprake van veel recreatievaart en loost een poldergemaal op het Johan Frisokanaal. Dit duidt in potentie dus op fecale verontreiniging van humane herkomst en eventueel van vee. Op basis van de DNA resultaten is de invloed van vee en vogels niet aangetoond. Wel is er, in overeenstemming met de actualisatie van het zwemwaterprofiel, duidelijk sprake van een humane bron. In elk monster dat geanalyseerd werd, zijn DNA kopieën aangetroffen van humaan *Bacteroides*. Wat exact de herkomst van de humane bron is, kan niet met precisie aangegeven worden, zo was het rond

13 juli redelijk droog (1,8 mm) terwijl er rond de monsternamen van 27 juli behoorlijk wat neerslag gevallen is (ca. 22 mm voorafgaand aan de bemonstering, KNMI station Stavoren). Bij hoge neerslagintensiteit kunnen overstorten in werking treden en kan er afspoeling van weiden en wegen plaatsvinden waardoor bronnen als een piek terecht kunnen komen in het oppervlaktewater.

5 Conclusies

In de maanden mei tot en met september 2015 is op de locaties Burgumer Mar en de Kuilart, waarvan Wetterskip Fryslân de waterkwaliteitsbeheerder is, met behulp van DNA technieken onderzoek gedaan naar de herkomst van fecale verontreiniging. In totaal zijn 18 monsters verzameld waarvan er 7 zijn geanalyseerd. De gerealiseerde rendementen van de DNA reactie in alle monsters waren goed. Op basis van de DNA gegevens kan een goede inschatting van de herkomst van de fecale verontreiniging gemaakt worden.

De onderzochte potentiële bronnen waren humaan, herkauwers, honden en vogels. Met behulp van de DNA techniek zijn de bronnen humaan en herkauwers aangetoond. De DNA merkers voor honden en vogels zijn niet aangetroffen. De aangetroffen bronnen kunnen bijdragen aan een verslechtering van de zwemwaterkwaliteit op de onderzochte locaties.

De DNA merkers voor verontreiniging van *humane* oorsprong werden op beide locaties het vaakst aangetroffen (7 van de 7 monsters). DNA merker voor *herkauwers* werd eenmaal aangetroffen. Het monsternameprogramma van dit onderzoek sloot aan bij de reguliere monstername voor de zwemwaterkwaliteit. Zodoende kan een goede vergelijking gemaakt worden met de indicatororganismen *E. coli* en enterococci en de DNA resultaten. De resultaten laten een duidelijke match zien tussen de piekconcentraties van indicatororganismen en de piekconcentraties van de DNA merkers. De concentraties van de DNA merkers voor *humaan* zoals aangetroffen op de locaties zijn in vergelijking met concentraties zoals die elders op zwemwaterlocaties in Nederland aangetroffen worden hoog, met name op de locatie Burgumer Mar. Het is dan ook zeer waarschijnlijk dat deze bronnen op deze locaties leiden tot overschrijding van de normen zoals die voor zwemwaterparameters gedefinieerd zijn.

De aangetoonde concentraties van de DNA merker *herkauwer* (Burgumer Mar en de Kuilart) zijn, in vergelijking met concentraties zoals gevonden op andere zwemwaterlocaties in Nederland, laag. Zoals ook uit de *E. coli* concentraties blijkt is het niet waarschijnlijk dat de aanwezigheid van deze bron geleid heeft tot overschrijdingen.

Op beide locaties zijn een overschrijding / verhogingen van concentraties in zwemwaterparameters aangetroffen. In beide gevallen lijken de *humane* bronnen het meest voor de hand liggende bron die verantwoordelijk is voor de beperkte zwemwaterkwaliteit. Om de bronnen verder aan te kunnen wijzen zouden aanvullende metingen gedaan kunnen worden in de richting van de potentiële bron (trajectmeting). Bovendien zouden eventuele overstorten gemonitord kunnen worden op wanneer en hoeveel water er in de buurt van de zwemwaterlocatie gespuid wordt. Mogelijk dat nieuwe DNA technieken in staat zijn om aan de hand van een brede analyse van de bacteriesoortensamenstelling (zogenaamde NGS methodiek) de bron verder te identificeren.

6 Referenties

EEA (European Environment Agency). (2015). European bathing water quality in 2014. ISBN: 978-92-9213-640-6.

Geerlings S. (2015). qPCR methoden voor het opsporen van paarden als bron van fecale verontreinigingen en eDNA van de kleine modderkruiper. Stage rapport 2015.

Heijnen, L., K. Learbuch. (2012). Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen. *BTO rapport* BTO 2013.014.

Heijnen L., K. Learbuch, I. Leenen, S. Rotteveel, H. Ruiten, E. Kardinaal. (2014). Fecale verontreiniging in zwemwater identificeren met DNA-merkers. H2O-Online (15 april 2014).

KNMI: http://projects.knmi.nl/klimatologie/monv/reeksen/select_rr.html

Wetterskip Fryslân. (2015). Actualisatie Zwemwaterprofiel Bergumer Mar.

Wetterskip Fryslân. (2010). Zwemwaterprofiel Bergumer Mar.

Wetterskip Fryslân. (2015). Actualisatie Zwemwaterprofiel de Kuilart.

Wetterskip Fryslân. (2009). Zwemwaterprofiel de Kuilart.

Bijlage I DNA analyse: extractie, qPCR en rendement

Isolatie van DNA

Voor isolatie van DNA uit de op de filters geconcentreerde organismen is de PowerBiofilm Kit van de firma MoBio gebruikt (KWR werkvoorschrift LMB 069). Eerst zijn de filters opgevouwen en overgebracht naar bead-bead buisjes (met hierin keramische beads van verschillend formaat). Lysis buffer, met hierin een bekende hoeveelheid IC-DNA (Interne controle voor meten van inhibitie en opbrengst, zie 2.5), is aan elk filter toegevoegd en de buisjes (met filter in lysis buffer) zijn 10 minuten bij 65°C geïncubeerd. Een bead-bead stap, waarbij de buisjes zeer krachtig worden geschud waardoor de keramische beads met grote snelheid door de vloeistof worden bewogen, zorgt in combinatie met de lysis buffer voor het openbreken van de cellen en het vrijkomen van (o.a.) het DNA. Na deze bead-bead stap zijn de buisjes ingevroren (-20°C) totdat verder gegaan werd met de zuivering van het DNA. Voor het zuiveren van het DNA is gebruik gemaakt van de affiniteitszuivering met extractiekolommen van de PowerBiofilm Kit. Na een aantal “wasstappen” is het DNA uit elk monster geëluëerd in een volume van 200 µl. De opbrengst van de isolatieprocedure is bepaald door meting van het IC-DNA (2.5).

qPCR methoden

De polymerase ketting reactie (PCR) is een enzymatische reactie waarmee, onder invloed van nauwkeurig gecontroleerde temperatuurwisselingen (cycli), een kenmerkend DNA-fragment (merker) tot hoge aantallen wordt vermenigvuldigd. Met behulp van korte synthetische DNA-moleculen (primers) met een DNA-volgorde (sequentie) die zeer specifiek is voor een bepaald bacterietype kan in de PCR een DNA-fragment van dit bacterietype selectief worden vermenigvuldigd. Bij Real-time PCR wordt tijdens de reactie de vorming van deze kenmerkende DNA-fragmenten on-line gevolgd. De gevormde fragmenten worden gedetecteerd met een synthetische DNA-probe die is gelabeld met een fluorescente kleurstof. Het aantal cycli waarbij het DNA-signaal boven de detectiegrens uitkomt (“quantification cycle” of Cq-waarde) is een maat voor de DNA-concentratie in het monster. De Cq-waarden van de referentiemonsters worden gebruikt voor berekening van een ijklijn. Deze ijklijn vormt vervolgens de basis voor het kwantificeren van de verschillende merkers in de monsters. Voor de detectie van fecale verontreinigingen van humane oorsprong of van herkauwers (indicierend voor een besmetting afkomstig van agrarisch achterland) is gebruik gemaakt van merkers van voor deze bronnen specifieke darmbacteriën van het geslacht *Bacteroides*. Daarnaast is ook een *Bacteroides* merker toegepast die in algemene zin een indicatie geeft voor een fecale verontreiniging. Voor het detecteren van fecale verontreinigingen van vogels is gebruik gemaakt van de zogenaamde GFD-merker waarmee een kenmerkend fragment van *Helicobacter* bacteriën wordt aangetoond (Heijnen en Learbuch, 2012). Voor het detecteren van fecale verontreinigingen van honden is gebruik gemaakt van een merker waarmee een kenmerkend fragment van de hond wordt aangetoond (mitochondriaal-DNA van hondencellen: het ND5 gen).

Rendement van de PCRreactie met behulp van IC-DNA

Het rendement van de DNA-isolatie en de eventuele aanwezigheid van remmende stoffen in het DNA van de monsters is bepaald door aan elk monster een interne controle (IC) toe te voegen en hiervan de opbrengst te bepalen. Het IC-DNA bestaat uit een suspensie met een bekende hoeveelheid plasmide-DNA. Dit plasmide-DNA bevat een uniek DNA-fragment dat niet aanwezig is in watermonsters. Voor detectie van dit unieke fragment zijn primers en een probe ontworpen. Met deze primers en probe is het mogelijk om het unieke DNA-fragment te amplificeren en kwantitatief te detecteren. Door dit plasmide-DNA aan elk monster toe te voegen en de concentratie ervan (na extractie van DNA) te bepalen en te vergelijken met

eenzelfde hoeveelheid plasmide-DNA dat geen extractiestap heeft ondergaan is het mogelijk om de opbrengst van de isolatie-procedure te bepalen en een indruk te krijgen van de eventuele aanwezigheid van stoffen die de PCR-reactie remmen. Aan de hand van de gemeten opbrengst van de isolatie-procedure (m.b.v. het IC-DNA) zijn de meetwaarden van elk individueel monster gecorrigeerd voor verlies van DNA door de extractiemethode.

Bij een rendementspercentage tussen 1 en 5% kunnen geen betrouwbare absolute aantallen DNA kopieën worden bepaald, en beperkt het analyse resultaat zich tot de conclusie dat een organisme aan- of afwezig was in het monster. Bij een rendement van 1% of lager kunnen geen conclusies meer worden getrokken.

Indien in een analyse een waarde voor het aantal DNA kopieën werd gevonden die beneden de detectielimiet lag, wordt dit in de hierna volgende tabellen aangegeven met een '<' teken voor de getalswaarde die door het laboratorium werd gerapporteerd na de boven beschreven correctie voor het gemeten rendement van de analyse.