

iStockphoto



AUTEURS



Elmar Becker
(KWR Watercycle
Research Institute/
University of
Amsterdam)



Hans Ruiter
(Rijkswaterstaat-
WVL) Amsterdam)



Ahmed Ahmed en Marga Goris
(OIE and National Collaborating Centre for
Reference and Research on Leptospirosis,
AMC, Amsterdam)



Bart Wullings en Edwin Kardinaal
(KWR Watercycle Research Institute)



NIEUW DNA-INSTRUMENT VOOR OPSPOREN VAN ZIEKTE VAN WEIL BACTERIËN EN DE BRON IN OPPERVLAKTEWATER

Met nieuw ontwikkelde (e)DNA-methodes is het mogelijk de aanwezigheid van pathogene *Leptospira* en de bruine rat in oppervlaktewatermonsters aan te tonen. Door per locatie meerdere monsters te nemen kan de bron nauwkeurig worden bepaald.

Sinds het jaar 2014 is het aantal ziektegevallen van Leptospirose in Nederland toegenomen naar 0.57 per 100.000 inwoners, een drievoudige toename ten opzichte van de periode 2010-2013. Deze zorgwekkende trend is ook gesignaleerd in buurlanden en is de afgelopen jaren (2014-2016) onverminderd hoog gebleven.

Leptospirose is wereldwijd een van de meest voorkomende van dier op mens overdraagbare ziektes, een zogenoemde zoönose. De ziekte wordt veroorzaakt door spiraalvormige bacteriën van het geslacht *Leptospira*. Overdracht op mensen gebeurt doorgaans door directe of indirecte blootstelling (bijv. via besmet water) aan urine van geïnfecteerde dieren en resulteert wereldwijd in meer dan één miljoen ernstige ziektegevallen per jaar. Besmetting kan bij mensen leiden tot een breed scala aan symptomen variërend van griepachtige verschijnselen tot het ontwikkelen van de ziekte van Weil wat gepaard kan gaan met o.a. geelzucht en ernstige nier- en longproblemen, met mogelijk dodelijke afloop.

Circa 60 procent van de besmettingen in Nederland kan in verband worden gebracht met watercontact, dit is dus de belangrijkste bron van besmetting. De piek van de besmettingen ligt in de zomermaanden. De belangrijkste redenen hiervoor zijn verhoogde blootstelling door meer (zwem)recreatie, langere overlevingskansen van leptospiren in het opgewarmde water en verhoogde activiteit van de verspreiders van deze ziekteverwekkende bacteriën.

Eerste screening

Recentelijk is een DNA-methode ontwikkeld om pathogene *Leptospira* bacteriën in oppervlaktewater aan te tonen (H2O online, 21 aug 2017). Een eerste screening van monsters afkomstig van zwemwaterlocaties liet zien dat gemiddeld 16 procent van de monsters DNA-materiaal van leptospiren bevatte. Dit percentage verschilde sterk per locatie, met een aantal uitschieters tot 40 procent. Echter, de bron van dergelijke positieve waarnemingen is onbekend. Knaagdieren en, specifiek, de bruine rat (*Rattus norvegicus*), worden algemeen gezien als belangrijkste drager van leptospiren. De *Leptospira* soort die bruine ratten verspreiden is een van de varianten waar mensen erg ziek van kunnen worden. In Nederland is naar schatting 30 procent van de bruine ratten geïnfecteerd met ziekteverwekkende *Leptospira* spp. Vangen en monitoren van ratten is specialistisch en omslachtig werk dat speciale training vereist en bovendien met aanzienlijke kosten gepaard gaat.

Om, naast het aantonen van leptospiren in water, een beeld te vormen van mogelijke bronnen is recentelijk een methode ontwikkeld om het DNA op te sporen dat de bruine rat achterlaat in het milieu (zogenoemde environmental DNA = eDNA). Door eDNA van de bruine rat te detecteren, kan relatief snel, op grote schaal en op niet invasieve wijze de aanwezigheid van deze rat in oppervlaktewater worden aangetoond en gemonitord.

Het hier beschreven onderzoek omvatte drie doelen: i) de ontwikkeling van een eDNA methode voor detecteren van de bruine rat in oppervlaktewater,

Tabel 1. Lijst van soorten waarop aangetoond dat de primer-set geen andere soorten dan de bruine rat kan detecteren (aangegeven door het ontbreken [-] van een test waarde [Cq])

| Soort (gewone naam) | Cq waarde |
|--|-----------|
| <i>Rattus rattus</i> (zwarte rat) | - |
| <i>Mus musculus</i> (gewone huismuis) | - |
| <i>Crocidura russala</i> (huisspitsmuis) | - |
| <i>Oryctolagus cuniculus</i> (konijn) | - |
| <i>Bos taurus</i> (koe) | - |
| <i>Equus caballus</i> (paard) | - |
| <i>Anas platyrhynchos</i> (eend) | - |
| <i>Gallus gallus</i> (kip) | - |

ii) screenen van oppervlaktewatermonsters om pathogene *Leptospira* en de waarschijnlijke bron, de bruine rat, aan te tonen in de tijd, en iii) inzicht krijgen in de ruimtelijke verspreiding van leptospiren en de bruine rat op lokale schaal.

Met behulp van deze DNA-methodes kunnen (locatie) beheerders de kans van besmetting met pathogene *Leptospira* inschatten en beoordelen of maatregelen tegen potentiële bronnen (bijv. bruine rat) kunnen bijdragen aan betere bescherming van zwemmers en overige recreanten.

MATERIAAL EN METHODE

Ontwikkeling eDNA methode voor bruine rat

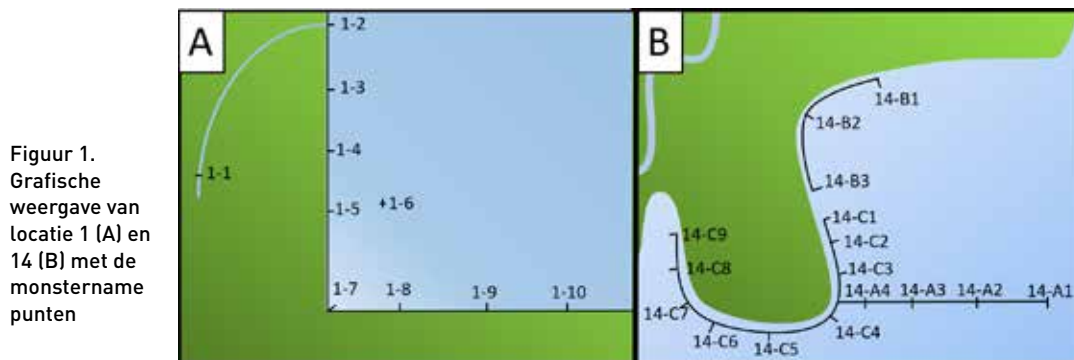
Voor het screenen van oppervlaktewater op de aanwezigheid van leptospiren is gebruik gemaakt van een eerder ontwikkelde set DNA-primers (H2O online, 21 aug 2017). Voor de screening op de aanwezigheid van de bruine rat is een set DNA-primers met probe ontwikkeld die zich richt op het cytochroom-B-gen. Deze set is speciaal ontworpen om specifiek het cytochroom-B-gen van de bruine rat te detecteren. De selectiviteit van de primer-set is geverifieerd door deze te testen met DNA van verschillende diersoorten (tabel 1), waaronder nauwe en minder nauwe verwanten van de bruine rat.

Experimentele opzet screening

Met behulp van de hier beschreven eDNA-methode zijn oppervlaktewater monsters gescreend op het voorkomen van de bruine rat en pathogene *Leptospira*. Deze watermonsters zijn genomen in het kader van monitoring van Rijkswaterstaat naar fecale verontreiniging en schadelijke algen op officiële zwemwaterlocaties. Monsternamen, locatie, tweewekelijks of maandelijks plaats

Speuren naar
Leptospira

28



Figuur 1.
Grafische
weergave van
locatie 1 (A) en
14 (B) met de
monsternamen
punten

van mei tot eind september. Deze periode besloeg daarmee het zwemseizoen en de samenhangende piek van leptospirose gevallen. In totaal zijn er voor de screening van 13 locaties 86 monsters geanalyseerd.

Twee locaties zijn gedetailleerder onderzocht, hier zijn meerdere monsters genomen om het verband tussen *Leptospira* en de bruine rat op lokale (ruimtelijke) schaal te bepalen. Daarnaast kan hiermee gekeken worden wat het effect van monsternamenstrategie is op de detectiekans van beide soorten.

Op locatie 1 (figuur 1-A) zijn 10 monsters genomen, op deze locatie zijn eerder hoge waarden voor leptospiren gevonden. Op locatie 14 (figuur 1-B, niet opgenomen in de hierboven genoemde screening) zijn 16 monsters genomen, na een uitbraak van leptospirose in 2015 zijn hier beheersmaatregelen geïmplementeerd om de rattenpopulatie terug te dringen.

Van alle monsters is 100-250 ml water gefiltreerd. Vervolgens is het DNA geïsoleerd volgens KWR-voorschrift.

RESULTATEN

Detectie van bruine rat eDNA

Met het hier ontwikkelde eDNA-instrument is het mogelijk de bruine rat te detecteren in oppervlaktewater, in 15,1 procent van de gescreende monsters werd namelijk eDNA van de bruine rat aangetoond. Monsters van locaties 12 en 13 waren het vaakst positief, namelijk 30 procent (figuur 2). Op locaties 2, 4, 6, 9 en 11 werd gedurende de gehele onderzoeksperiode geen eDNA van de bruine rat gedetecteerd.

Detectie van pathogene *Leptospira*

Van de gescreende monsters is in 34,9 procent pathogene *Leptospira* gedetecteerd. Bij locatie 1 en 13 waren respectievelijk 55,6 en 60,0 procent van de monsters positief voor pathogene *Leptospira*. Van de 13 onderzochte locaties zijn er bij drie de gehele periode geen leptospiren gedetecteerd, dit waren locatie 3, 6 en 7 (figuur 2).

Gezamenlijk voorkomen van *Leptospira* en bruine rat eDNA

Op zes locaties zijn sporen van zowel pathogene *Leptospira* als bruine rat aangetoond, dit waren locaties 1, 5, 8, 10, 12 en 13. Van de monsters die positief waren voor sporen van de bruine rat was ruim de helft gelijktijdig positief voor *Leptospira*. Dit betrof 8,15 procent van alle geanalyseerde monsters.

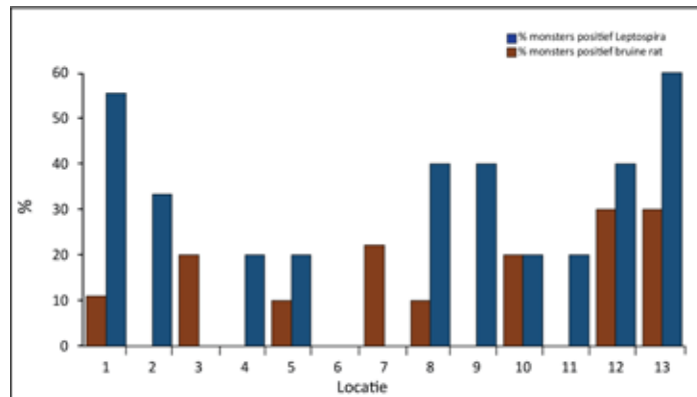
Lokale verspreiding van *Leptospira* en bruine rat eDNA

Twee locaties zijn intensief bemonsterd, 1 en 14. Op locatie 1 (figuur 1-A) zijn tien watermonsters genomen, drie daarvan testte positief op leptospiren (namelijk: 1-2, 1-6 en 1-10) en twee op de bruine rat (namelijk: 1-1 en 1-8), geen enkel monster was echter tegelijk voor beide positief. De monsternamen lagen maximaal vijftig meter uit elkaar. Op locatie 14 (figuur 1-B) was geen van de monsters positief voor de bruine rat, vier monsters waren positief voor leptospiren: 14-C1, 14-C3, 14-C8 en 14-C9.

DISCUSSIE EN CONCLUSIE

Met de beschreven DNA-methodes is gescreend op het voorkomen van leptospiren en de bruine rat in watermonsters afkomstig van zwemwaterlocaties

Figuur 2. Percentage positieve monsters voor de bruine rat (bruine balken) en *Leptospira* (blauwe balken) per locatie.



waarvan RWS de waterkwaliteitsbeheerders is. Zowel leptospiren als de bruine rat zijn aangetoond in een aanzienlijk aantal monsters. Dit duidt erop dat de bruine rat op deze locaties de waarschijnlijke bron van leptospiren is.

In het oog springen de gevallen waarbij wel *Leptospira* en niet de bruine rat, of omgekeerd, zijn aangetroffen. Het eerste zou verklaard kunnen worden doordat de rattenpopulatie op die plekken niet besmet is met leptospiren - geschat wordt dat ongeveer 30 procent van de Nederlandse ratten besmet is. Het tweede zou veroorzaakt kunnen zijn doordat er een andere verspreider is van de leptospiren dan de bruine rat, zoals andere knaagdieren of vee. Verder onderzoek om andere bronnen dan de bruine rat op te sporen zou hier antwoord op kunnen geven. Hiervoor zou gebruik gemaakt kunnen worden van bestaande DNA-merkers voor diverse diergroepen, zoals die gebruikt worden ten behoeve van de bronopsporing van fecale verontreiniging (zie ook Heijnen *et al*, 2014, H2O-online). Ook het nauwkeuriger bepalen van de specifieke soort van *Leptospira* zou alternatieve verspreiders aan kunnen wijzen.

Bij het huidige onderzoek waren de gefilterde volumes water klein (100-250 ml). Het nemen van grotere volumes of het combineren van meerdere kleine volumes van een locatie zou de detectiekans aanzienlijk vergroten. Een voorbeeld hiervan is de fijnmazige monsternamestrategie zoals toegepast op locatie 1 en 14. Een bijkomend voordeel van intensievere bemonstering van een locatie is dat in sommige gevallen de bron vrij nauwkeurig opgespoord kan worden waarna gerichte beheersmaatregelen kunnen worden toegepast.

Elmar Becker
(KWR Watercycle Research Institute/University of Amsterdam)

Ahmed Ahmed

Marga Goris

(OIE and National Collaborating Centre for Reference and Research on Leptospirosis, AMC, Amsterdam)

Hans Ruiter

(Rijkswaterstaat-WVL)

Bart Wullings

Edwin Kardinaal

(KWR Watercycle Research Institute)

SAMENVATTING

Het is met de ontwikkelde (e)DNA-methodes mogelijk om de aanwezigheid van leptospiren en de bruine rat in oppervlaktewatermonsters aan te tonen. Uit het huidige onderzoek blijkt echter ook dat de sporen van de bruine rat en leptospiren zowel gezamenlijk als los van elkaar waargenomen kunnen worden. Door per locatie meerdere monsters te combineren kan een nauwkeurig beeld van de bron worden opgebouwd, hiermee kunnen specifieke beheersmaatregelen goed onderbouwd en gericht worden gedefinieerd.

Speuren naar
Leptospirosa