



KWR 2017.103 | December 2017

Screening *Leptospira* en de bron in zwemwateren

Screening *Leptospira* en de bron in zwemwateren

KWR 2017.103 | December 2017

Opdrachtnummer

401975

Projectmanager

Edwin Kardinaal

Opdrachtgever

RWS-WVL

Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

Auteur(s)

Elmar Becker (UvA/KWR)

Ahmed Ahmed & Marga Goris (AMC-NRL)

Bart Wullings & Edwin Kardinaal (KWR)

Verzonden aan

Hans Ruiter (RWS-WVL)

Jaar van publicatie
2017

Meer informatie

dr. E. Kardinaal
T 06-54290049
E Edwin.Kardinaal@kwrwater.nl

Postbus 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 2017 © 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.

Samenvatting

Leptospirose wordt verondersteld de meest voorkomende zoönose (i.e. ziekte die van dier op mens wordt overgedragen) wereldwijd te zijn en wordt veroorzaakt door bacteriën van het geslacht *Leptospira* (Levett, 2001). Overdracht op mensen gebeurt doorgaans door directe of indirecte blootstelling (e.g. via geïnfecteerd water) aan urine van geïnfecteerde dieren. Besmetting kan bij mensen leiden tot een breed scala aan symptomen variërend van griepachtige verschijnselen tot het ontwikkelen van de ziekte van Weil

In het jaar 2014 was in Nederland de incidentie 0.57 per 100.000 inwoners (Pijnacker et al., 2016). Dat was aanzienlijk hoger dan de 0.25 per 100.000 gevallen die in de periode 1925-2008 werden waargenomen (Goris, Boer, Duarte, Kliffen, & Hartskeerl, 2013). Ongeveer 60% van de Nederlandse gevallen kan in verband worden gebracht aan contact met water, hetgeen impliceert dat dit de belangrijkste route van besmetting is (Pijnacker et al., 2016).

Recentelijk is een methode om pathogene *Leptospira* in oppervlaktewater te detecteren ontwikkeld. Met deze methode kan de aanwezigheid van pathogene *Leptospira* in zwermwatermonsters aangetoond worden. Een eerste screening van zwemwateren heeft laten zien dat gemiddeld in 16% van de monsters daadwerkelijk DNA materiaal afkomstig van leptospiren aangetoond kon worden. De vraag is echter wat de bron is van dergelijke positieve waarnemingen. Knaagdieren en, specifiek, de bruine rat (*Rattus norvegicus*), worden algemeen erkend als belangrijke besmettingsbron. In Nederland is ongeveer 30% van de bruine ratten geïnfecteerd met ziekteverwekkende *Leptospira* spp.

Door het detecteren van in het milieu voorkomend (o.a. ratten) DNA (ook wel environmental (e)DNA genoemd), kan snel, op grote schaal en op niet-invasieve wijze het voorkomen van dergelijke organismen in het water aangetoond worden.

Tot dusver is het onvoldoende bekend hoe de aanwezigheid van *Leptospira* in zwemwater verband houdt met de aanwezigheid van de bruine rat. In dit rapport is de ontwikkeling van een eDNA methode beschreven waarmee de aanwezigheid van de bruine rat in oppervlaktewater aangetoond kan worden. Vervolgens is de ruimtelijke samenhang tussen het voorkomen van *Leptospira* en de bruine rat in beeld gebracht.

De eDNA methode voor bruine ratten is van toepassing gebleken op tal van monsters afkomstig van officiële zwembadlocaties. In meerdere monsters zijn zowel DNA sporen van bruine ratten als pathogene *Leptospira* aangetroffen, waarmee de bron voor het voorkomen van de Leptospiren verklaard lijkt. Anderzijds zijn er ook situaties waargenomen waar één van beide organismen aangetoond zijn. Een verklaring voor het alleen voorkomen van *Leptospira* is de mogelijke aanwezigheid van een andere bron dan de bruine rat. Een verklaring voor het wel aantonen van de aanwezigheid van de bruine rat zonder dat er *Leptospira* aangetoond zijn, is het feit dat circa 30% van de Nederlandse rattenpopulatie drager is van de pathogene bacterie.

De ontwikkelde methode kan waterbeheerders ondersteunen bij het gericht zoeken naar bronnen van leptospiren en de bestrijding daar op afstemmen.

Inhoud

Samenvatting	2
1 Inleiding	6
2 Een nieuw DNA-instrument voor het opsporen van ziekte van Weil bacteriën en de bron in oppervlaktewater	8
2.1 Inleiding	8
2.2 Materiaal en methode	10
2.3 Resultaten	11
2.4 Discussie en Conclusie	13
3 Detection of brown rat (<i>Rattus norvegicus</i>) in Dutch surface waters using eDNA to determine a link with pathogenic <i>Leptospira</i>	14
3.1 Introduction	14
3.2 Materials and Methods	16
3.2.1 Experimental design	16
3.2.2 Detection of potential contamination during filtration and sampling	17
3.2.3 Water filtration and eDNA extraction	17
3.2.4 Real-time quantitative PCR	18
3.3 Results	20
3.3.1 Experiment 1: screening survey of 13 bathing sites	20
3.3.2 Experiment 2: Local distribution of pathogenic <i>Leptospira</i> and brown rat eDNA	22
3.3.3 Effect of filtered volume on detection rate of pathogenic <i>Leptospira</i> and brown rat eDNA	22
3.4 Discussion	23
3.4.1 Sampling sites and the importance of site selection	23
3.4.2 Filtered volume and sampling strategy important for detection chances	24
3.4.3 Knowledge gaps and future research	26
3.4.4 Conclusions	26
Literature	27

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

Nederlandse oppervlaktewateren worden voornamelijk door de bruine ratten besmet met de pathogene *Leptospira*, de veroorzaker van de ziekte van Weil. Besmetting vindt plaats door de urine van geïnfecteerde ratten. In Nederland zijn de laatste jaren ernstige ziektegevallen van de ziekte van Weil gerapporteerd, waarbij recreanten die in contact hadden gestaan met besmet oppervlaktewater geïnfecteerd zijn geraakt met pathogene leptospiren.

Het Nationaal Referentielaboratorium voor Leptospirosen (NRL) bevestigde in de periode 2010-2013 gemiddeld 13 autochtone leptospirosegevallen per jaar. In 2014 werd er een toename gezien (60 autochtone leptospirosegevallen; waarvan 35 oppervlaktewater gerelateerd). Ook in 2015 werd deze verheffing waargenomen (43 autochtone gevallen; waarvan 19 oppervlaktewater gerelateerd). In 2016 zien we een soortgelijk patroon. Ook in de buurlanden (Duitsland, België, Frankrijk) werd een soortgelijk patroon geobserveerd. De vraag is waardoor deze toename veroorzaakt wordt. Is er een mogelijk een relatie met de zachtere winters waardoor er meer knaagdieren en/of meer leptospiren zijn?

Recentelijk hebben NRL en KWR gewerkt aan de optimalisatie van een kwantitatieve DNA methode voor de opsporing van pathogene leptospiren in oppervlaktewater. Een brede screening van enkele honderden monsters afkomstig van zwemwaterlocaties, waarvan RWS de waterkwaliteitsbeheerder is, laat zien dat er op diverse zwemwaterlocaties meerdere positieve monsters aangetroffen zijn. De vraag die rijst is wat deze positieve uitkomsten te betekenen hebben. Betekenen ze een verhoogd risico voor het oplopen van de ziekte van Weil op de bewuste locaties? En hebben de resultaten enig verband met het voorkomen van (bruine) ratten?

Met name de tweede vraag zal nu onderdeel zijn van dit aanstaande onderzoek:

- Is er een verband tussen de aanwezigheid van pathogene leptospiren in het oppervlaktewater en aanwezigheid van ratten of andere knaagdieren?

1.2 Aanpak

Dit project is een samenwerking tussen KWR Watercycle Research Institute, Universiteit van Amsterdam en AMC-Nationaal Referentielaboratorium voor Leptospirose. In nauwe

samenwerking is gewerkt aan de ontwikkeling van een qPCR methode voor de detectie van de bruine rat in oppervlaktewater. Aansluitend is de methode toegepast op monsters afkomstig van zwemwaterlocaties waarvan RWS de waterkwaliteitsbeheerder is. In dezelfde monsters is ook de eerder ontwikkelde qPCR methode gericht op pathogene *Leptospira* bacteriën toegepast. Zodoende is een beeld ontstaan van het voorkomen van de leptospiren in relatie tot hun voornaamste bron: de bruine rat. Naast het mee liften op de reguliere zwemwatermonitoring van RWS is op een tweetal locaties onderzocht hoe het DNA van de bruine rat en het voorkomen van de leptospiren in de ruimte verspreid is. Daartoe is op 1 dag op meerdere punten water verzameld op die zelfde zwemwaterlocaties.

De resultaten van de onderzoeken zijn opgeschreven voor een artikel van Water Matters (hoofdstuk 2) en iets meer uitgebreid in een master thesis voor de studie Freshwater & Marine Biology van de Universiteit van Amsterdam (hoofdstuk 3). Beide documenten vormen de basis voor dit rapport.

2 Een nieuw DNA-instrument voor het opsporen van ziekte van Weil bacteriën en de bron in oppervlaktewater

Dit hoofdstuk is de weerslag van een artikel voor Water Matters zoals dat in voorjaar 2018 gepubliceerd zal worden.

Auteurs:

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 Ruiters (Rijkswaterstaat-WVL), Bart Wullings en Edwin Kardinaal (KWR Watercycle Research Institute)

2.1 Inleiding

Sinds het jaar 2014 is het aantal ziektegevallen van Leptospirose in Nederland toegenomen naar 0.57 per 100.000 inwoners, een drievoudige toename t.o.v. 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 zogenaamde zoönose. De ziekte wordt veroorzaakt door spiraalvormige bacteriën van het geslacht *Leptospira*. Overdracht op mensen gebeurt doorgaans door directe of indirecte blootstelling (e.g. 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 hetgeen gepaard kan gaan met o.a. geelzucht, en ernstige nier- en longproblemen, met mogelijk dodelijke afloop.

Circa 60% van de besmettingen in Nederland kan in verband worden gebracht met watercontact, dit is dus de belangrijkste route van besmetting. De piek van de besmettingen ligt in de zomermaanden. De belangrijkste redenen hiervoor zijn de verhoogde blootstelling als gevolg van meer (zwem)recreatie, het langer kunnen overleven van leptospiren in het opgewarmde water en de verhoogde activiteit van de verspreiders van deze ziekteverwekkende bacteriën.

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% van de monsters DNA-materiaal van leptospiren bevatte. Dit percentage verschilde sterk per locatie, met een aantal uitschieters tot 40%. Echter, de bron van dergelijke positieve waarnemingen is onbekend. Knaagdieren en, specifiek, de bruine rat (*Rattus norvegicus*), worden algemeen erkend als belangrijkste drager van leptospiren. De *Leptospira* soort die bruine ratten verspreiden is een van de soorten waar mensen erg ziek van kunnen worden. In Nederland is naar schatting 30% van de bruine ratten geïnfecteerd met ziekteverwekkende *Leptospira* spp. Het 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, ook een beeld te vormen van de mogelijke bronnen is er recentelijk een methode ontwikkeld die DNA dat de bruine rat achterlaat in het milieu (zogenaamde environmental DNA = eDNA) op te sporen. Door dit eDNA van de bruine rat te detecteren, kan relatief snel, op grote schaal en op niet invasieve wijze het voorkomen van de bruine rat in oppervlaktewater worden aangetoond en gemonitord.

Het hier beschreven onderzoek omvatte drie doelen: i) de ontwikkeling van een eDNA methode voor het detecteren van de bruine rat in oppervlaktewater, ii) het screenen van oppervlaktewatermonsters om pathogene *Leptospira* en de waarschijnlijke bron, de bruine rat, aan te tonen in de tijd, en iii) inzicht verkrijgen 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) bij kunnen dragen aan betere bescherming van zwemmers en overige recreanten.

2.2 Materiaal en methode

Ontwikkeling eDNA methode voor bruine rat

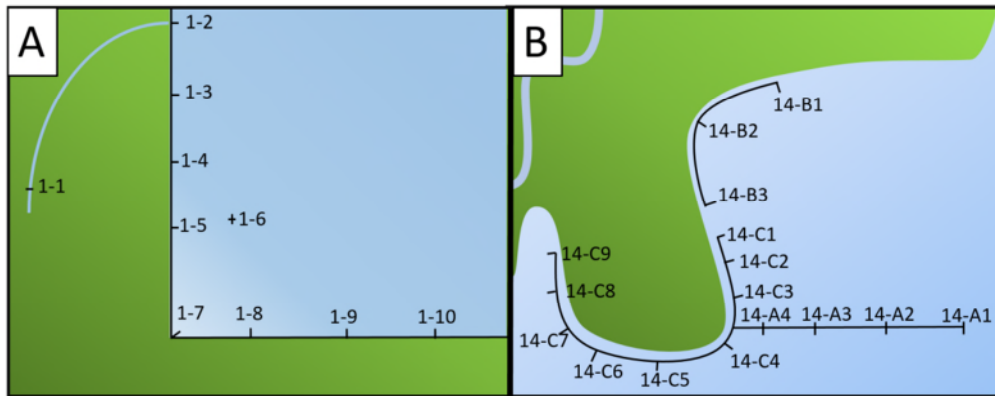
Voor het screenen van oppervlaktewater op het voorkomen van leptospiren is gebruik gemaakt van een eerder ontwikkelde set DNA-primers (zie ook H2O online, 21 aug 2017). Voor het screenen op bruine rat is een set DNA-primers met probe ontwikkeld die zich richt op het cytochroom-B-gen. Deze set is speciaal ontworpen om maximale specificiteit voor het cytochroom-B-gen van de bruine rat te hebben en om geen andere soorten 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 zwembadlocaties. Monsternamen vond, afhankelijk van de locatie, tweewekelijks of maandelijks plaats van mei tot eind september. Deze periode besloeg daarmee het zwembadseizoen en de samenhangende piek van leptospirose gevallen. In totaal zijn er voor de screening in de tijd 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 2.1-A) zijn 10 monsters genomen, op deze locatie zijn eerder hoge waarden voor leptospiren gevonden. Op locatie 14 (figuur 2.1-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-huisvoorschrift.



FIGUUR 2.1 . GRAFISCHE WEERGAVE VAN LOCATIE 1 (A) EN 14 (B) MET DE MONSTERNAME PUNTEN.

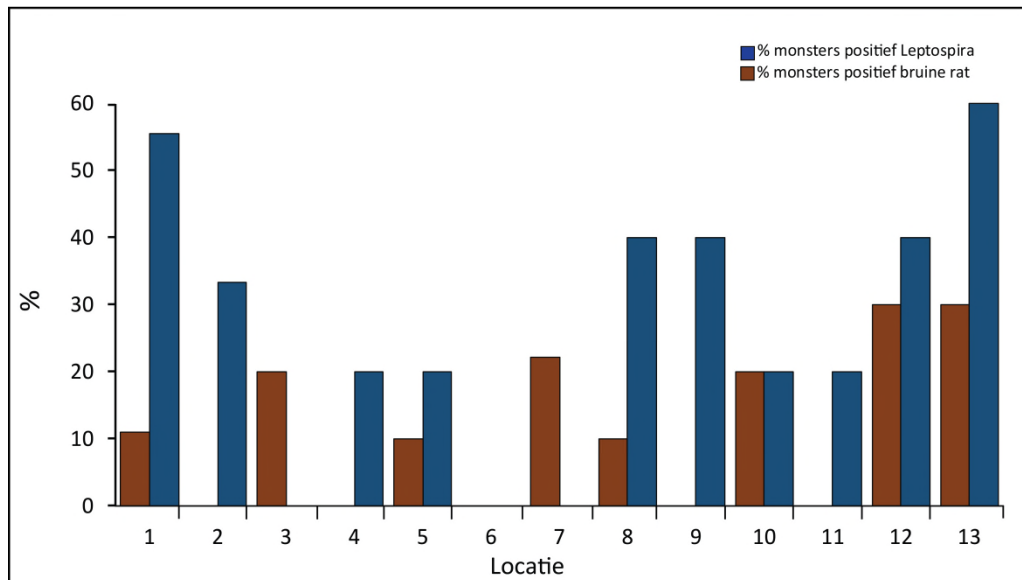
2.3 Resultaten

Detectie van bruine rat eDNA

Met het hier ontwikkelde eDNA-instrument is het mogelijk om de bruine rat te detecteren in oppervlaktewater, in 15.1% van de gescreende werd namelijk eDNA van de bruine rat aangetoond. Monsters van locaties 12 en 13 waren het vaakst positief, namelijk 30% (figuur 2.2). 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% pathogene *Leptospira* gedetecteerd. Bij locatie 1 en 13 waren respectievelijk 55.6 en 60.0% 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 2.2).



FIGUUR 2.2. PERCENTAGE POSITIEVE MONSTERS VOOR DE BRUINE RAT (BRUINE BALKEN) EN *LEPTOSPIRA* (BLAUWE BALKEN) PER LOCATIE.

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 8.15% van alle geanalyseerde monsters.

Lokale verspreiding van *Leptospira* en bruine rat eDNA

Twee locaties zijn intensief bemonsterd, 1 en 14. Op locatie 1 (figuur 2.1-A) zijn 10 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 50 meter uit elkaar. Op locatie 14 (figuur 2.1-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.

2.4 Discussie en Conclusie

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

Conclusie

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 meerder monsters te combineren kan een nauwkeurig beeld van de bron worden opgebouwd, hiermee kunnen specifieke beheersmaatregelen goed onderbouwd en gericht worden gedefinieerd.

3 Detection of brown rat (*Rattus norvegicus*) in Dutch surface waters using eDNA to determine a link with pathogenic *Leptospira*

Dit hoofdstuk is de weerslag van de master thesis zoals die in december 2017 afgerond is in het kader van de master studie Freshwater & Marine Biology van de Universiteit van Amsterdam.

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

3.1 Introduction

In the year 2014 the Dutch incidence of human leptospirosis was 0.57 per 100.000 inhabitants (Pijnacker et al., 2016). A three-fold increase compared to the period 2010-2013, which was also observed in neighbouring countries and which has been sustained in the recent period (i.e. 2014-2016; Goris, Boer, Duarte, Kliffen, & Hartskeerl, 2013). Globally, leptospirosis is presumed to be the most widespread zoonotic disease. It is caused by spirochetes of the genus *Leptospira* (Levett, 2001). Transmission to humans usually occurs through direct or indirect contact (e.g. via contaminated water) with urine of infected animals – commonly called a maintenance host – and results in an estimated 1.03 million cases worldwide (Costa et al., 2015).

In humans, infection can cause a wide range of symptoms ranging from subclinical to severe, with multiple organ failure and often lethal results (Levett, 2001; Mayer-Scholl *et al.*, 2014). The genus *Leptospira* contains 22 species and can functionally be divided into a group that is pathogenic containing 10 species, an intermediately group containing 5 species and a saprophytic non-pathogenic group that is commonly found in fresh water and contains 7 species (Picardeau, 2017). More than 300 different serovars are recognized that can have specific host preferences. All mammals and even some reptiles can harbour pathogenic *Leptospira* and many organisms can be carrier with no or few detrimental effects (Barragan, Olivas, Keim, & Pearson, 2017). Infection of a maintenance host usually results in no or mild symptoms while leptospire are continuously excreted via urine over long periods of time.

Because, subsequently, other animals get infected an infection reservoir is formed (Mayer-Scholl *et al.*, 2014).

In 2014, two-thirds of the Dutch autochthonous cases could be attributed to contact with surface waters, indicating that this is the most important infection pathway (Pijnacker *et al.*, 2016). Recently, a qPCR method for detecting pathogenic *Leptospira* in surface water samples targeting the lipL32 gene has been developed. With this method, samples from surface water bathing locations in the Netherlands were screened for the presence of pathogenic *Leptospira*, about 16% of the samples tested positive for pathogenic *Leptospira*. Moreover, a temporal pattern emerged with a peak concentration of *Leptospira* DNA detected during summer and early fall, coinciding with the peak of Dutch leptospirosis cases (Kardinaal, 2016).

Higher winter survival of rodents and, specifically, the brown rat (*Rattus norvegicus*), has been suggested as a cause for the recent rise in Dutch leptospirosis cases (Pijnacker *et al.*, 2016). Brown rats are the carrier of serogroup Icterohaemorrhagiae (Picardeau, 2017). In the period 1925 to 2008, this was the main infecting serogroup, to which about 70% of the cases of autochthonous leptospirosis could be attributed (Goris, Boer, *et al.*, 2013). This serogroup is also responsible for the most severe symptoms and necessitated the most hospital care (Goris, Kikken, *et al.*, 2013).

In 2015, two brown rat populations in the Netherlands had a *Leptospiral* prevalence of about 40 to 50% (Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Staat van Zoönose 2015, 2016). Similar numbers have been observed in neighbouring countries such as France and Germany: 34.7% and 21.3%, respectively (Aviat *et al.*, 2009; Runge *et al.*, 2013). However, very little is known about how the presence of potential hosts, such as the brown rat, affects the presence of pathogenic *Leptospira* on a local scale. The detection and, if present, monitoring of hosts such as the brown rat can be costly and time consuming, especially when they are present at low densities. Therefore, a quick and cost effective method for the detection and subsequent monitoring of hosts such as the brown rat is needed.

All animals release small quantities of DNA into their environment in the form of, for instance, urine, faeces or skin-cells which can persist for days to weeks in surface water (Barnes *et al.*, 2014). This form of environmental (e)DNA has been employed for the rapid and non-invasive detection and monitoring of (semi)-aquatic animals that have recently been in contact with water (Rees, Maddison, Middleditch, Patmore, & Gough, 2014; Schlegel *et al.*, 2012). An often used target of eDNA studies is the mitochondrial cytochrome b gene because it is present in high numbers and it may be protected from degradation inside the organelle (Barbosa *et al.*, 2013; Galan, Pagès, & Cosson, 2012).

This study describes the development of a qPCR-based method for detecting and monitoring brown rats using to elucidate the relation between pathogenic *Leptospira* and their hosts in Dutch surface waters. Using this method, surface water samples from 13 bathing sites that border lake IJssel will be analysed for the presence of pathogenic *Leptospira* and brown rats. The bathing sites were selected because high copy numbers of pathogenic *Leptospira* were detected here by (Kardinaal, 2016). Depending on the location, the samples will be taken biweekly or monthly during the 2017 bathing season (May-September 2017). This period spans the annual peak of both the recreational use of the bathing sites, the amount of leptospires observed to be present in the water as well as cases of leptospirosis reported. To determine the effect of sampling strategy on the detection rates of both brown rat eDNA and pathogenic *Leptospira* and to determine how leptospires and brown rat eDNA presence is spread on a local scale, two sites will be sampled more intensively. It is expected that locations where pathogenic *Leptospira* are detected will also test positive for the presence of brown rat eDNA.

3.2 Materials and Methods

3.2.1 Experimental design

Experiment 1: Screening survey of 13 bathing sites

To determine the relation of co-occurrence between pathogenic *Leptospira* and brown rats, 86 surface water samples from 13 bathing sites (Bijlage II) from the north-west of the Netherlands were analysed. These bathing sites are included in a monitoring program of Rijkswaterstaat (RWS; part of the Dutch ministry of Infrastructure and Environment) that aims to assess water quality using metrics for faecal contamination and harmful algae. The sites were selected because pathogenic *Leptospira* were detected in a previous screening of RWS bathing sites by (Kardinaal, 2016). Depending on location, samples were taken biweekly or monthly from May through to September, coinciding with both the peak in recreational use of these sites as well as annual leptospirosis cases. The temporal dynamics of both pathogenic *Leptospira* and brown rat eDNA are investigated in locations for which at least eight of ten samples are taken. These are locations: 1, 5, 7, 8, 9, 10, 12 and 13.

The samples, taken by a professional sampler, consisted of a single sample (0.5L) of surface water collected in a sterile plastic bottle and was kept cool. For every bathing site the location where the sample was taken was the same throughout the sampling period and at approximately the same time during the day.

Experiment 2: Intensive sampling two locations

To determine the spatial characteristics of *Leptospira* and brown rat eDNA on a local scale, two locations were chosen where more intensive sampling was done. Location 1 (fig. 3.1A) borders lake Marken (the Netherlands) and was chosen because during a previous screening high copy numbers of pathogenic *Leptospira* were observed while no obvious source could be determined (Kardinaal, 2016). On this site 10 samples were taken. Location 14 (fig. 3.1B) was selected because in 2015 there were 4 cases of Leptospirosis after which new management strategies were implemented to control the brown rat population. On this location 16 water samples were taken. Samples 14-B1-3 and 14-C1-9 were taken close to the shore and reed beds and this constitutes likely habitat for brown rats. Samples 14-A1-A4 were taken from more than a 100 m from the shore (i.e. A1) to gradually closer (i.e. A4).

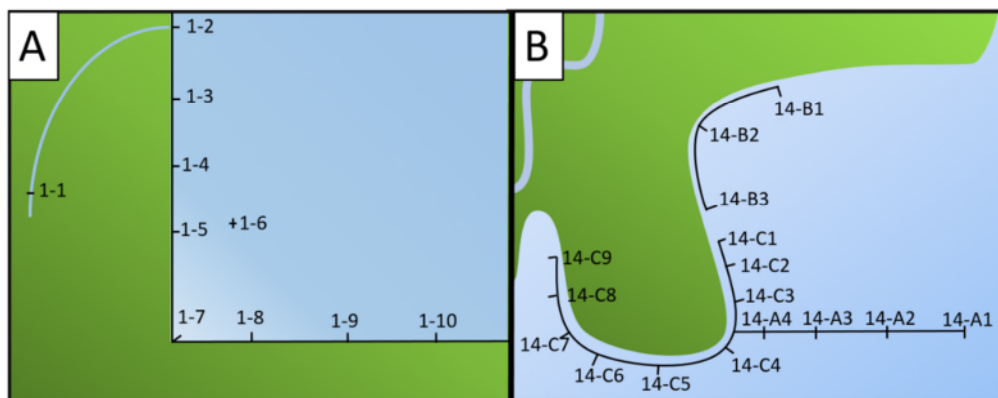


FIGURE 3.1. GRAPHICAL OVERVIEW OF LOCATION 1 (A) AND 14 (B) AND THE SAMPLING SITES.

3.2.2 Detection of potential contamination during filtration and sampling

In order to identify potential contamination, a filtration control (FC) consisting of 100 ml of nucleotide-free ultrapure water that was handled identically to regular samples, was included during each round of filtration. To detect potential contamination during the more intensive sampling of locations 1 and 14, a number of field blanks (FB) was included. The FB consisted of a closed sampling bottle filled with 100 ml nucleotide-free ultrapure water which was taken into the field, submerged in the water and kept in the same cooler as regular samples. All subsequent handling and analyses were identical to regular samples.

3.2.3 Water filtration and eDNA extraction

The samples for the screening study were kept at 4°C until filtration and freezing which took place within 72 hours, the samples taken for the more intensive sampling were kept in a

cooler with ice and filtrated and frozen within 24 hours. To isolate the DNA, samples were filtered in duplicate (50 to 350 ml depending on filtration speed) on 47 mm polycarbonate Track-Etch Membrane filters with 0.2 µm pore size (Sartorius AG, Goettingen, Germany) on a vacuum filtration setup in a separate PCR product-free room. After filtration, iron-compounds, that can potentially inhibit further reactions, were removed by washing the filter with ammonium oxalate (0.5 M, pH: 3.0) followed by phosphate buffered saline (PBS). Each individual filter was then transferred to a 2 ml PowerBiofilm™ bead beat tube for DNA extraction. Filtration setups were carefully cleaned with a nucleotide removing reagent and rinsed with ethanol followed by ultrapure water to prevent contamination.

DNA extraction was carried out using the PowerBiofilm® DNA Isolation kit (MO BIO inc., Carlsbad, USA) according to the manufacturer's protocol. To each PowerBiofilm™ bead beat tube, 350 µl of lysis reagent and 100 µl of chaotrophic agent were added. Subsequently, in order to later determine the efficiency of the isolation, an internal control (IC) was added. The IC consisted of 10 µl of a solution containing 3·10⁴ copy/µl of plasmid, which has been shown not to interfere with analyses carried out later. Next, the samples were incubated at 65°C for 10 minutes followed by homogenization of the samples in a PowerLyzer® 24 machine for 30 seconds at 5000 rpm. The homogenized samples were then stored at -20°C until further DNA isolation. After thawing, subsequent DNA isolation was carried out according to the manufacturers protocol. The DNA was finally eluted in 100 µl of nuclease-free water and frozen at -20°C until further analyses.

3.2.4 Real-time quantitative PCR

A reference database of cytochrome b (cyt b) sequences of representatives from 35 common aquatic and non-aquatic animal species from the Netherlands was constructed in the software package Bionumerics 7.6 (Applied Mathematics, France). The cyt b sequences were downloaded from GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). Using this database, six primer pairs were manually designed (Bijlage III) on the consensus sequence of 48 *R. norvegicus* cyt b sequences so that they included a maximum number of mismatches (at least three in the '3-end) with the cyt b sequence of the closest endemic relatives of the brown rat (i.e. *Rattus rattus* and *Mus musculus*), as well as other rodent and animal cyt b sequences. Furthermore, all primer pairs were checked for specificity in silico using BLAST (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Additional criteria for primer design were: a melting temperature (T_m) of ~60 °C, a length of 18-23 nt, a GC content between 40 and 60%, lack of self-complementarity and either a G or a C at each end.

Each primer pair was evaluated for specificity and amplifying performance by qPCR with SyBR-green dye. For the two best performing primer pairs a TaqMan probe was designed according to the following criteria: a length of 20-30 bp, close proximity to the binding site of each primer, but not overlapping, a T_m of ~5 °C higher than the associated primer pair, a

GC content of 40-60% with no G at the 5' end in order to prevent quenching, maximum number of mismatches with *R. norvegicus* closest endemic relatives (i.e. *R. rattus* and *M. musculus*), especially in the first 5 bases of the 5' end (because DNA polymerase has 5' to 3' end activity) and a lack of self-complementarity and secondary structure. Selectivity of RnCytB was shown by testing the assay with DNA from a number of species common in the Netherlands (table 3.1).

TABLE 3.1 THE RNCYTB QPCR ASSAY WAS TESTED FOR SELECTIVITY WITH GENETIC MATERIAL FROM A NUMBER OF DIFFERENT SPECIES COMMONLY FOUND IN THE NETHERLANDS. THE LACK OF CQ-VALUE INDICATES THAT NO AMPLIFICATION OCCURRED.

Species (common name)	Cq-value
<i>Rattus rattus</i> (black rat)	NA
<i>Mus musculus</i> (common mouse)	NA
<i>Crocidura russala</i> (house shrew)	NA
<i>Oryctolagus cuniculus</i> (European rabbit)	NA
<i>Bos taurus</i> (cow)	NA
<i>Equus caballus</i> (horse)	NA
<i>Anas platyrhynchos</i> (mallard duck)	NA
<i>Gallus gallus</i> (chicken)	NA

The RnCytB assay was checked not to interfere with either the lipL32 assay or the internal control assay using OligoCalc (Oligonucleotide Properties Calculator, n.d.). After optimization the PCR protocol consisted of 5 minutes at 95 °C, then 45 repeats of 15s at 95°C, 30 s at 60°C concluded by a cooling step of 1 minute at 20°C. The samples were analysed separately for the presence of pathogenic *Leptospira* and brown rat but each reaction was analysed for the IC. Each reaction, with a total volume of 25 µl, contained 10µl of sample, 12.5 µl of 2x LightCycler® 480 Probes Master (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), 0.5 µl of 10µM of both forward and reverse primers (final concentration 0.2 µM) and 0.25 µl of 10 µM of probe (final concentration 0.1 µM), and the same amounts for the IC.

Each sample was analysed in duplicate and scored as positive if one or both of the duplicates showed a Cq value below the cut-off for the respective target. For each positive sample the quantification curve was manually inspected to verify actual amplification. Fluorescence drift correction was applied and Cq values were calculated using the regression option.

In order to quantify the number of gene copies present in the sample, a standard curve was constructed using a serial dilution (2.5-2.5·10⁴ copy/ml) of a custom gBlock gene fragment. The gBlock contained the sequence of the products of the RnCytB, lipL32 and IC assays. The cut off for the RnCytB assay was determined to be Cq41, the analytical sensitivity at this point is 0.8 copy/μl. The cut-off for the lipL32 assay was Cq40 (A. Ahmed, personal communication).

The isolation efficiency data did not meet the assumption of normality and heteroscedasticity, and was log transformed. The non-parametric Welch F test and Mann-Whitney pairwise test were used to test whether the differences in isolation efficiency were significant for the different filtered volume groups. Data analyses were done in PAST 3.06 (Hammer, Harper, & Ryan, 2001).

3.3 Results

3.3.1 Experiment 1: screening survey of 13 bathing sites

Using the currently developed eDNA-assay, the presence of brown rat could be detected in 15.1% of all screened samples. Locations 12 and 13 (fig. 3.2) had the highest number of positive samples, both 30 %. In samples from locations 2, 4, 6, 9 and 11 no brown rat eDNA was detected during the studied period. No pathogenic *Leptospira* or brown rat eDNA was detected in any FC or FB. In 34.9% of all samples pathogenic *Leptospira* were detected (fig. 3.2). In three sites, namely 3, 6 and 7, no pathogenic *Leptospira* were detected throughout the period studied. At locations 1 and 13 leptospire were present in 55.6 and 60.0% of the samples, respectively.

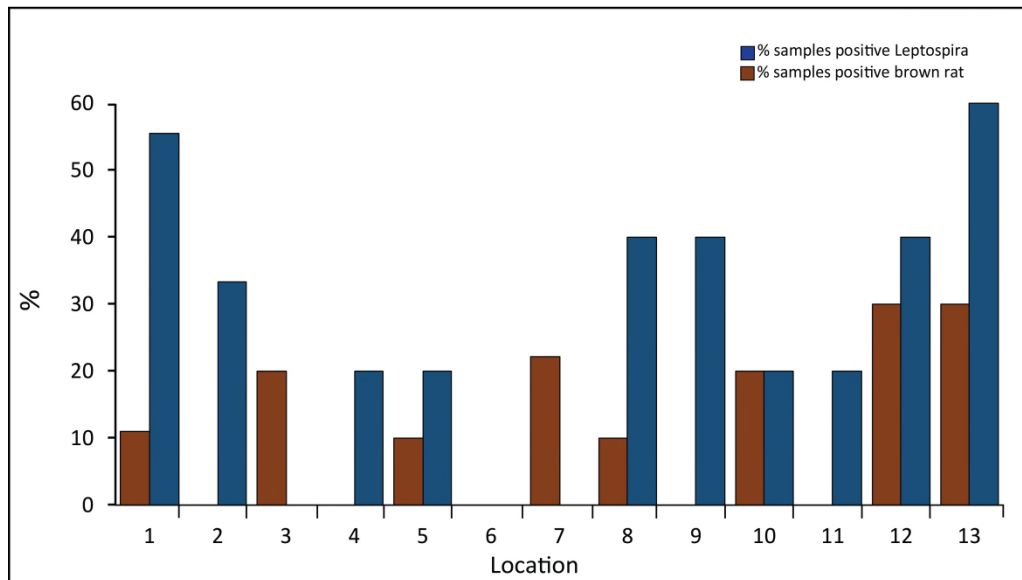


FIGURE 3.2. PERCENTAGE OF SAMPLES POSITIVE FOR BROWN RAT EDNA (BROWN BARS) AND PATHOGENIC *LEPTOSPIRA* (BLUE BARS) FOR EACH LOCATION.

Co-occurrence of pathogenic Leptospira and brown rat eDNA

In six locations both pathogenic *Leptospira* and brown rat eDNA were detected, these were locations 1, 5, 8, 10, 12 and 13 (fig. 3.2). In 8.14% of the samples, pathogenic *Leptospira* and brown rat eDNA were detected simultaneously. No *Leptospira* DNA was detected in any field control or filter blanc.

Temporal dynamics of Leptospira and brown rat eDNA

The temporal dynamics of both pathogenic *Leptospira* and brown rat eDNA were investigated in the locations for which a sample was taken on at least eight of ten sampling days (locations: 1, 5, 7, 8, 9, 10, 12 and 13; fig. 3.3). The amount of brown rat eDNA was highly variable during the studied period, the average *cyt b* gene copy number was 686.56 ± 480.38 c/l (average \pm SE). The highest values were recorded 1433 c/l (6-5-2017, n=1) and 2356.53 ± 1360.54 c/l on 24-7-2017. On two sampling dates no brown rat eDNA was detected: 10-7-2017 and 4-9-2017.

The average number of pathogenic *Leptospira* lipL 32 gene copies was 49.05 ± 10.53 c/l. This peaked at the end of July with the highest on 24-7-2017 being 119.73 ± 59.86 c/l ($n=3$). On 29-5-2017, 8-8-2017 and 4-9-2017 no pathogenic *Leptospira* were detected.

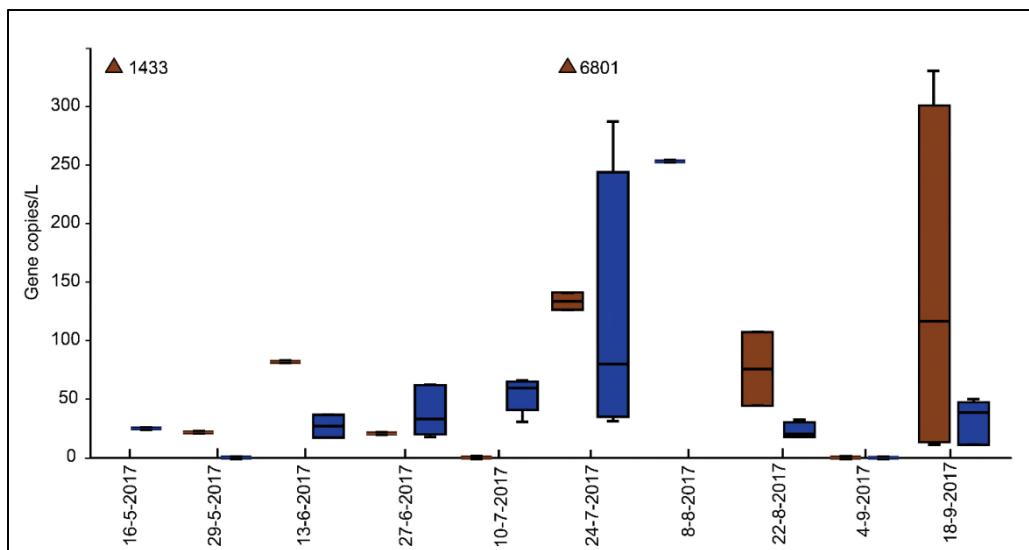


FIGURE 3.3 BOXPLOT SHOWING GENE COPIES PER LITER (C/L) FOR BROWN RAT (CYT B; BROWN BARS) AND PATHOGENIC LEPTOSPIRA (LIPL 32; BLUE BARS) FOR EACH SAMPLING DATE. ONLY LOCATIONS WHERE AT LEAST EIGHT OF TEN SAMPLES WERE TAKEN ARE INCLUDED (I.E. LOCATIONS: 1, 5, 7, 8, 9, 10, 12 AND 13). THE BROWN RAT CYT B COPY NUMBER WAS 1433 AND 6801 C/L ON 16-5-2017 AND 24-7-2017, RESPECTIVELY, INDICATED BY AN UPWARD POINTING ARROWHEAD.

3.3.2 Experiment 2: Local distribution of pathogenic *Leptospira* and brown rat eDNA

Two locations were sampled more intensively, 1 and 14. In location 1, three of the ten samples contained pathogenic *Leptospira*, these were 1-2, 1-6 and 1-10 (fig. 3.1A). Two samples harboured brown rat eDNA, 1-1 and 1-8. Of the 16 samples taken at location 14, four contained pathogenic *Leptospira*, these were 14-C1, 14-C3, 14-C8 and 14-C9 (fig. 3.1B). No brown rat eDNA was detected at location 14.

3.3.3 Effect of filtered volume on detection rate of pathogenic *Leptospira* and brown rat eDNA

The average volume filtered was 155 ml (range: 50-500ml). The percentage of samples that was positive for pathogenic *Leptospira* was constant across the four groups of filtered volume (average: $25.3\% \pm 1.98$, table 4). The percentage of samples positive for brown rat

eDNA was lowest for samples that consisted of less than 100 ml (7.81%, table 3.2), and highest in samples when 200 ml was filtered (27.27%, table 3.2). The efficiency of DNA isolation decreased slightly with larger amounts filtered however this decrease was not significant (Mann Whitney pairwise comparison), except for the 150 ml group which was significantly lower than the >300 ml group ($p=0.0377$, Mann-Whitney pairwise with Bonferroni correction).

TABLE 3.2. PERCENTAGE OF POSITIVE SAMPLES PER FILTERED VOLUME.

Volume of sample analysed (ml)	<100	150	200	250
N (samples analysed)	64	51	11	4
Percentage positive for brown rat (N)	7.81% (5)	17.65% (9)	27.27% (3)	0% (0)
Percentage positive for <i>Leptospira</i> (N)	23.44% (15)	25.49% (13)	27.27% (3)	25% (1)

3.4 Discussion

This study describes the development of a method to detect brown rat presence in surface waters. Using this method, 13 locations were screened for the presence of brown rats as well as pathogenic *Leptospira* during the period May through to the end of September 2017. Also, intensive sampling was done at two locations where the spatial characteristics of pathogenic *Leptospira* and brown rat eDNA were determined.

Brown rat eDNA as well as pathogenic *Leptospira* DNA were detected, showing the efficacy of the method currently described and its use in screening and monitoring applications. Bathing sites that were positive for leptospires at one time-point during the studied period were likely to also harbour brown rat eDNA. In about half of the samples that tested positive for the presence of brown rat eDNA pathogenic *Leptospira* could also be detected simultaneously. Therefore, on the sites where both brown rat eDNA and pathogenic *Leptospira* were detected, the brown rat is the likely source. To causally identify brown rats as the source of leptospires in a certain location requires proof of renal carriage of leptospires in brown rats. This would necessitate the analysis of brown rat kidney tissue, for which the animals would need to be caught.

3.4.1 Sampling sites and the importance of site selection

Sample site selection is highly important in screening studies as it will impact the eventual results. In other words, biased sampling site selection will ultimately lead to biased results. The aim of this study was to determine a link between pathogenic *Leptospira* and brown rat

presence. Therefore, the RWS sites included in the screening were sites that repeatedly showed pathogenic *Leptospira* presence in a previous screening in the years 2015 and 2016 (Kardinaal, 2016). This means that the percentage of bathing locations positive for *Leptospira* is not representative for bathing location in the Netherlands in general, but more likely an overestimation. Because brown rats are the likely host of pathogenic *Leptospira*, it is probable that the percentage of locations positive for the presence of brown rats is also not representative for Dutch bathing sites.

3.4.2 Filtered volume and sampling strategy important for detection chances

For eDNA studies, while highly dependent on local conditions, detection chances increase with larger sample volumes filtered (Rees *et al.*, 2014). The average volume of sample filtered in this study was small, this was caused by low filtration speeds. Filtration speeds are influenced by the amount of suspended solids in the sample, pumping pressure of the filtration setup as well as the diameter and pore size of the filter. The filter used in this study was a 0.2 μm pore size 47mm polycarbonate filter. Suspended solids were visible in certain samples (data not shown) which likely decreased the amount of sample that could be filtered. Takahara *et al.* (2012) also targeted the cytochrome b gene, in their study of common carp in an eDNA in artificial ponds as well as a natural lagoon. The authors were able to filter up to 2 l of water by using polycarbonate filters with a pore size of either 3 μm or 0.8 μm pre-filtered using 12 μm polycarbonate filters. Takahara *et al.* (2012) note that similar results were obtained and thus preferred the less laborious method utilizing a single 3 μm pore size filter. This suggests that a filter with a larger pore size may be preferable due to the larger amount of sample that can be filtered. However, the effects on the retention by the filter of pathogenic *Leptospira* should be further investigated. Gorsis *et al.* (2016) investigated whether detection chances of pathogenic *Leptospira* differed between a filtration method as employed in this study and a method based on centrifugation and found no significant differences.

The effect of filtered volume on detection rates and isolation efficiency was investigated (see results). There were no significant differences in isolation efficiency (as shown by the percentage of internal control in the final sample) between the filtered volumes ≤ 100 to ≥ 250 ml, however there was a decreasing trend. The isolation efficiency of the 150 ml group was significantly lower than the >300 ml group. It should be noted that all samples with filtered volumes ≥ 300 ml are from location 14, which has a lot clearer water than the other 13 locations (personal observation). This suggests that larger volumes can cause decreased isolation efficiency, however, this can be resolved with either filtration or DNA isolation protocols that allow larger volumes to be processed.

Most detections of pathogenic *Leptospira* and brown rat eDNA were close to the detection limit of the assay, Cq 40 and 41, for *Leptospira* and brown rat, respectively. For both assays

this means that, on the detection limit, not more than one to two copies of the gene were present per reaction. The detection limit was determined using a dilution series of a known quantity of each gene and was stringently applied. Therefore, while copy numbers were generally low they still represent valid observations. There was a substantial number of samples that exceeded the detection limit only slightly (i.e. <1 Cq value), that thus may have been below the detection limit if tested again. Therefore, it is likely that the amount of samples positive for pathogenic *Leptospira* and brown rat eDNA is an underestimation.

Pathogenic Leptospira and brown rat eDNA are heterogeneously distributed in both space and time

Pathogenic *Leptospira* have been shown to form aggregates that may greatly aid their survival in the environment (Barragan *et al.*, 2017; Trueba, Zapata, Madrid, Cullen, & Haake, 2004). While not directly comparable to the sites studied here, Thibeaux *et al.* (2017) found that all water samples from small streams they studied did not contain pathogenic *Leptospira*, whereas about 60 % of soil samples from adjacent embankments as well as all samples from the benthic algal layer did. This indicates that the detection rates of pathogenic *Leptospira* are influenced by the amounts of aggregates in the water column. Moreover, a highly heterogeneous distribution may be the reason that sites that tested positive most of the time (e.g. location 1 and 13) were not positive for all sampling dates.

Brown rat cyt b gene copy numbers showed high variation through time (fig. 3), which also indicates a heterogeneous distribution. Moreover, no clear pattern in brown rat cyt b copy numbers could be discerned in the studied period. The number of pathogenic *Leptospira* was less variable compared to brown rat eDNA and showed a peak during the period July to early August, this is in accordance with the results obtained by Kardinaal (2016).

The failure to detect either species in samples taken less than 50m from a sample that tested positive, as was the case at location 1 during the intensive sampling, shows that it is highly unlikely that false positives (i.e. detection of organism while not present) occur that are, for instance, caused by the influx of genetic material from nearby locations.

A sampling strategy where multiple samples were taken on a single location was employed for the more intensive sampling done at locations 1 and 14. In location 1 this resulted in the simultaneous detection of pathogenic *Leptospira* and brown rat eDNA when combining the results of all samples. More samples of a smaller volume have been shown to most accurately represent the actual presence of an organism (Kelly, Port, Yamahara, & Crowder, 2014). Moreover, when multiple samples are taken at one site it becomes possible to more precisely determine the location of brown rat populations and adjust management strategies accordingly.

Conventional (non-eDNA) monitoring allows for an estimation of the size of the population. (Takahara *et al.*, 2012) have shown that this can also be done using eDNA monitoring. Pathogenic *Leptospira* contain a single copy of the lipL32 gene that is targeted in this study. Therefore, each gene copy represents one individual leptospire, which allows for easy and accurate quantification of the organism. The number of mitochondria per cell-type and organism is highly variable and each cell may contain a number of mitochondria and thus copies of the cytochrome b gene (Rees *et al.*, 2014). This means that calculating brown rat densities in a certain area using copy numbers is challenging and would require careful study before generalisations can be made.

3.4.3 Knowledge gaps and future research

This research mostly focused on the source of pathogenic *Leptospira* in bathing sites. However, there are a number of open questions regarding human infection with *Leptospira* from the environment. For instance, the dose at which *Leptospira* is infectious to humans has never been determined (Barragan *et al.*, 2017). When an infectious dose has been determined it becomes possible to determine a safe limit, above which use of the site could be prohibited. The effect of leptospiral aggregates on environmental detection, survival and spread are unknown. Moreover, because only the more severe, clinical, cases of leptospirosis are registered it is likely that a far larger number of less severe cases are not registered. This leads to an underestimation of total leptospirosis cases (Terpstra, World Health Organization, & International Leptospirosis Society, 2003).

3.4.4 Conclusions

This study showed that the brown rat is a likely source of pathogenic *Leptospira* in a number of bathing sites in the Netherlands. The use of a novel method for detecting brown rat eDNA from environmental surface water samples is now available and ready for monitoring. An intensive sampling strategy employed at two locations showed that the method is not likely to be susceptible for genetic material that did not originate close to the sampling site. Moreover, taking multiple samples on one site allows for the inference of the exact location of a source which can be used to inform management policies. Optimizing sampling strategy as well as sample filtration and DNA isolation will likely result in less false negatives. However, a lack of fundamental knowledge regarding the human infection with environmental pathogenic *Leptospira* hinders advancement of guidelines that demark an acceptable limit of pathogenic *Leptospira* numbers at bathing water locations.

Literature

Aviat, F., Blanchard, B., Michel, V., Blanchet, B., Branger, C., Hars, J., ... Andre-Fontaine, G. (2009). *Leptospira* exposure in the human environment in France: A survey in feral rodents and in fresh water. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 32(6), 463–476. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2008.05.004>

Barbosa, S., Pauperio, J., Searle, J. B., & Alves, P. C. (2013). Genetic identification of Iberian rodent species using both mitochondrial and nuclear loci: application to noninvasive sampling. *Molecular Ecology Resources*, 13(1), 43–56. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12024>

Barnes, M. A., Turner, C. R., Jerde, C. L., Renshaw, M. A., Chadderton, W. L., & Lodge, D. M. (2014). Environmental Conditions Influence eDNA Persistence in Aquatic Systems. *Environmental Science & Technology*, 48(3), 1819–1827. <https://doi.org/10.1021/es404734p>

Barragan, V., Olivas, S., Keim, P., & Pearson, T. (2017). Critical Knowledge Gaps in Our Understanding of Environmental Cycling and Transmission of *Leptospira* spp. *Applied and Environmental Microbiology*, 83(19), e01190-17. <https://doi.org/10.1128/AEM.01190-17>

Costa, F., Hagan, J. E., Calcagno, J., Kane, M., Torgerson, P., Martinez-Silveira, M. S., ... Ko, A. I. (2015). Global Morbidity and Mortality of Leptospirosis: A Systematic Review. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 9(9), e0003898. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003898>

Galan, M., Pagès, M., & Cosson, J.-F. (2012). Next-Generation Sequencing for Rodent Barcoding: Species Identification from Fresh, Degraded and Environmental Samples. *PLoS ONE*, 7(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048374>

Goris, M., A. Ahmed en E. Kardinaal, (2016). Pathogene *Leptospira* in oppervlaktewater. Rapport nummer NRL 2016.11, in opdracht van RWS-WVL.

- Goris, M. G. A., Boer, K. R., Duarte, T. A. T. E., Kliffen, S. J., & Hartskeerl, R. A. (2013). Human Leptospirosis Trends, the Netherlands, 1925–2008. *Emerging Infectious Diseases*, 19(3), 371–378. <https://doi.org/10.3201/eid1903.111260>
- Goris, M. G. A., Kikken, V., Straetemans, M., Alba, S., Goeijenbier, M., van Gorp, E. C. M., ... Hartskeerl, R. A. (2013). Towards the Burden of Human Leptospirosis: Duration of Acute Illness and Occurrence of Post-Leptospirosis Symptoms of Patients in The Netherlands. *PLoS ONE*, 8(10), e76549. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0076549>
- Hammer, Ø., Harper, D. A. T., & Ryan, P. D. (2001). Paleontological Statistics Software: Package for Education and Data Analysis. *Palaeontologia Electronica*, (4).
- Kardinaal, E., (2016). Screening van pathogene *Leptospira* in zwemwater. KWR rapport: KWR2016.128, in opdracht van RWS-WVL.
- Kelly, R. P., Port, J. A., Yamahara, K. M., & Crowder, L. B. (2014). Using Environmental DNA to Census Marine Fishes in a Large Mesocosm. *PLOS ONE*, 9(1), e86175. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086175>
- Levett, P. N. (2001). Leptospirosis. *Clinical Microbiology Reviews*, 14(2), 296–326. <https://doi.org/10.1128/CMR.14.2.296-326.2001>
- Mayer-Scholl, A., Hammerl, J. A., Schmidt, S., Ulrich, R. G., Pfeffer, M., Woll, D., ... Nöckler, K. (2014). *Leptospira* spp. in Rodents and Shrews in Germany. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(8), 7562–7574. <https://doi.org/10.3390/ijerph110807562>
- OligoCalc: Oligonucleotide Properties Calculator. (n.d.). Retrieved November 21, 2017, from <http://biotoools.nubic.northwestern.edu/OligoCalc.html>
- Picardeau, M. (2017). Virulence of the zoonotic agent of leptospirosis: still terra incognita? *Nature Reviews Microbiology*, 15(5), nrmicro.2017.5. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2017.5>
- Pijnacker, R., Goris, M. G. A., Wierik, M. J. M. te, Broens, E. M., Giessen, J. W. B. van der, Rosa, M. de, ... Schimmer, B. (2016). Marked increase in leptospirosis infections in humans and dogs in the Netherlands, 2014. *Eurosurveillance*, 21(17). <https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2016.21.17.30211>

- Rees, H. C., Maddison, B. C., Middleditch, D. J., Patmore, J. R. M., & Gough, K. C. (2014). REVIEW: The detection of aquatic animal species using environmental DNA – a review of eDNA as a survey tool in ecology. *Journal of Applied Ecology*, 51(5), 1450–1459. <https://doi.org/10.1111/1365-2664.12306>
- Runge, M., von Keyserlingk, M., Braune, S., Becker, D., Plenge-Bönig, A., Freise, J. F., ... Esther, A. (2013). Distribution of rodenticide resistance and zoonotic pathogens in Norway rats in Lower Saxony and Hamburg, Germany. *Pest Management Science*, 69(3), 403–408. <https://doi.org/10.1002/ps.3369>
- Schlegel, M., Ali, H. S., Stieger, N., Groschup, M. H., Wolf, R., & Ulrich, R. G. (2012). Molecular Identification of Small Mammal Species Using Novel Cytochrome b Gene-Derived Degenerated Primers. *Biochemical Genetics*, 50(5–6), 440–447. <https://doi.org/10.1007/s10528-011-9487-8>
- Takahara, T., Minamoto, T., Yamanaka, H., Doi, H., & Kawabata, Z. (2012). Estimation of Fish Biomass Using Environmental DNA. *PLOS ONE*, 7(4), e35868. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035868>
- Terpstra, W. J., World Health Organization, & International Leptospirosis Society (Eds.). (2003). *Human leptospirosis: guidance for diagnosis, surveillance and control*. Geneva: World Health Organization.
- Thibeaux, R., Geroult, S., Benezech, C., Chabaud, S., Soupé-Gilbert, M.-E., Girault, D., ... Goarant, C. (2017). Seeking the environmental source of Leptospirosis reveals durable bacterial viability in river soils. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, 11(2). <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005414>
- Trueba, G., Zapata, S., Madrid, K., Cullen, P., & Haake, D. (2004). Cell aggregation: a mechanism of pathogenic *Leptospira* to survive in fresh water. *International Microbiology*, 7(1), 35–40.

Bijlage I: H2O online bericht

NIEUWE DNA-TECHNIEK VERBETERT OPSPORING WEIL-BACTERIE

21 augustus 2017

De *Leptospira*-bacterie, die in het ergste geval de Ziekte van Weil kan veroorzaken, kan met een nieuwe DNA-techniek sneller worden opgespoord. Dat is goed nieuws, want het aantal besmette zwemmers is de afgelopen drie jaar toegenomen.

Mensen die in open water zwemmen, kunnen getroffen worden door leptospirose, een infectieziekte die wordt veroorzaakt door bepaalde *Leptospira*-bacteriën. De ziekte kan zich uiten in griepachtige verschijnselen, en in het ergste geval als de ziekte van Weil met onder andere geelzucht, en ernstige nier- en longproblemen. De belangrijkste besmettingsbron is de urine van ratten.

Tot 2014 liepen ongeveer twintig mensen jaarlijks in Nederland de zogeheten 'modderkoorts' of de ziekte van Weil op, blijkt uit cijfers van het RIVM. Nog eens tien komen na een buitenlandse vakantie besmet thuis. Het toenemend aantal besmettingen sinds 2014 is voor onderzoeksinstituut KWR, in samenwerking met Rijkswaterstaat en het Nationaal Referentielaboratorium voor Leptospirosen.

Wanneer mensen geïnfecteerd zijn en de bron blijkt terug te voeren naar activiteiten in één en hetzelfde recreatiewater, dan bestaat de kans dat de besmette zwemwaterlocatie uit voorzorg door de betreffende provincie een paar maanden wordt afgesloten. Aanvullend wordt vaak gekeken of er dragers van leptospiren in de omgeving aanwezig zijn (met name ratten, muizen en muskusratten). Deze dragers scheiden de leptospiren uit in de omgeving en zo komen de bacteriën in het oppervlaktewater terecht. Deze dragers moeten dan bestreden worden.

De nieuwe DNA-methode, die specifiek is voor ziekteverwekkende *Leptospira*-bacteriën, helpt niet alleen om een eventuele besmetting snel en doeltreffend vast te stellen, maar maakt het ook mogelijk om in de weken daarna de eventuele aanwezigheid van *Leptospira* te monitoren, veelal in combinatie met de bestrijding van de rat als besmettingsbron. "Dat maakt het mogelijk om sneller weer het sein 'brand meester' te geven. Dat is een belangrijk voordeel, want het gaat soms om locaties waar in de weekenden honderden mensen komen zwemmen. Die wil je niet onnodig maanden dicht houden."

De DNA-opsporingsmethode wordt nu als pilot toegepast in reguliere zwemwatermonitoring op tien zwemwaterlocaties. Een complexe vraag is nog wel wat het beleid moet zijn als de

bacterie wordt gesignaleerd, zegt Kardinaal. “Als het DNA van de *Leptospira*-bacterie wordt aangetroffen, weet je nog niet hoe groot de kans is dat zwemmers ziek worden. Ten eerste moet je maar net tegen die bacterie aanzwemmen en ten tweede is de ene persoon er veel gevoeliger voor dan de andere. Met dat vraagstuk moeten we nog aan de slag.”

Op de website van het RIVM staat meer informatie over leptospirose
(<http://www.rivm.nl/Onderwerpen/L/Leptospirose>)

De Atlas Infectieziekten van het RIVM geeft een beeld van het aantal gevallen van leptospirose per regio in de afgelopen jaren
(<https://www.atlasinfectieziekten.nl/leptospirose>)

Bijlage II Locations

Location	Location number	Number of samples
Strand Edam	1	9
Vooroever Het Nesbos	2	3
De Holle Poarte, Makkum	3	5
Lemsterstrand, Lemmer	4	5
Dijkstrand Urk	5	10
Recreatieoord Veluwe Strandbad Elburg	6	3
Nijkerk aan Zee	7	9
Oud Valkeveen	8	10
Strand IJburg 2015	9	10
Strand IJburg 2019	10	10
Diemerpark, Amsterdam	11	5
De oude Pol	12	10
De oude Pol Extra meetpunt B, Bijselsebeek	13	10
Slijk-Ewijk	14	x

Bijlage III Primers & probes

SEQUENCES OF PRIMERS AND PROBES USED: *RATTUS NORVEGICUS* CYTOCHROME-B (RNCYTB), *LEPTOSPIRA INTEROGANS* L32 (LIPL32). AN ASTERISK (*) INDICATES THAT THE PRIMERS OR PROBE ARE DESCRIBED IN (AHMED, ANTHONY, & HARTSKEERL, 2010)

Primer name	Sequence ('5 → '3)
RnCytB-F	CATCAACCACTCCTTTATCG
RnCytB-R	CACGTCTGATACCATAACAG
RnCytB-P	AGGATTTGTACTATGAGGCATACTC
LipL32F*	ZZZZZZZZZZZZZZZZZZZZ
LipL32R*	YYYYYYYYYYYYYYYYYYYY
LipL32P*	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX