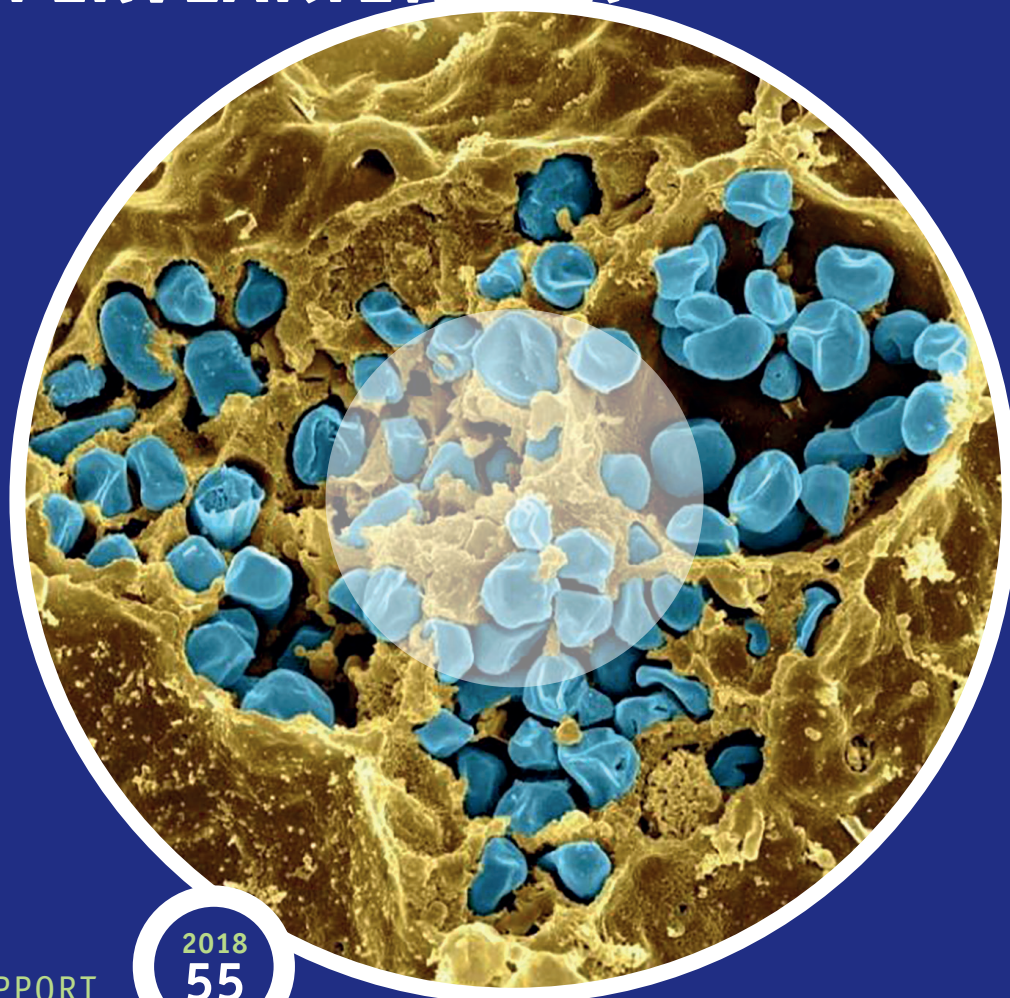


VERSPREIDING VAN DE TULAREMIE BACTERIE *FRANCISELLA TULARENSIS* IN NEDERLANDS OPPERVLAKTEWATER



RAPPORT

2018
55

VERSPREIDING VAN DE TULAREMIE BACTERIE FRANCISELLA
TULARENSIS IN NEDERLANDS OPPERVLAKTEWATER

RAPPORT

2018

55

ISBN 978.90.5773.839.5



stowa@stowa.nl www.stowa.nl

TEL 033 460 32 00

Stationsplein 89 3818 LE Amersfoort

POSTBUS 2180 3800 CD AMERSFOORT

Publicaties van de STOWA kunt u bestellen op www.stowa.nl

COLOFON

UITGAVE Stichting Toegepast Onderzoek Waterbeheer
Postbus 2180
3800 CD Amersfoort

AUTEURS Ingmar Janse
Rozemarijn Q. J. van der Plaats
Mark J. van Passel

DRUK Kruyt Grafisch Adviesbureau
STOWA STOWA 2018-55
ISBN 978.90.5773.839.5

COPYRIGHT Teksten en figuren uit dit rapport mogen alleen worden overgenomen met bronvermelding.

DISCLAIMER Deze uitgave is met de grootst mogelijke zorg samengesteld. Niettemin aanvaarden de auteurs en de uitgever geen enkele aansprakelijkheid voor mogelijke onjuistheden of eventuele gevolgen door toepassing van de inhoud van dit rapport.

TEN GELEIDE

De waterbeheerders hebben de laatste jaren meer en meer oog voor de gezondheidsaspecten bij het gebruik van oppervlaktewater. Recreëren op -, of in het oppervlaktewater brengt soms gezondheidsrisico's met zich mee als gevolg van blootstelling aan ziekteverwekkers. Ook het gebruik van oppervlaktewater voor het besproeien van gewassen kan mogelijk leiden tot verspreiding van ziekteverwekkers.

Een van de ziekten die de laatste jaren vaker wordt waargenomen is tularemie, veroorzaakt door een bacterie. De ziekte komt vooral voor bij knaagdieren en hazen, vandaar ook de naam 'hazenpest'. Ook mensen kunnen besmet raken, hetgeen in incidentele gevallen kan leiden tot ernstige ziekteverschijnselen.

De klimaatverandering leidt tot situaties waar vaker gewassen besproeid worden met oppervlaktewater. Op verzoek van STOWA heeft het RIVM daarom onderzoek gedaan naar het voorkomen van de bacterie in oppervlaktewater in Nederland.

In het onderzoek wordt de bacterie op 13 van de 76 onderzochte locaties aangetoond. Om definitief conclusies te kunnen trekken over infectierisico's is dit onderzoek te beperkt van opzet geweest. Vooralsnog acht de STOWA het risico echter niet hoog genoeg om uitgebreider vervolgonderzoek te rechtvaardigen.

De waterschappen wordt geadviseerd alert te zijn op de ziekte en op de verspreidingsroute via het beregenen van gewassen. Het kan zijn dat vanuit de GGD's contact opgenomen wordt met de waterbeheerders.

Joost Buntsma
Directeur STOWA

DE STOWA IN HET KORT

STOWA is het kenniscentrum van de regionale waterbeheerders (veelal de waterschappen) in Nederland. STOWA ontwikkelt, vergaart, verspreidt en implementeert toegepaste kennis die de waterbeheerders nodig hebben om de opgaven waar zij in hun werk voor staan, goed uit te voeren. Deze kennis kan liggen op toegepast technisch, natuurwetenschappelijk, bestuurlijk-juridisch of sociaalwetenschappelijk gebied.

STOWA werkt in hoge mate vraaggestuurd. We inventariseren nauwgezet welke kennisvragen waterschappen hebben en zetten die vragen uit bij de juiste kennisleveranciers. Het initiatief daarvoor ligt veelal bij de kennisvragende waterbeheerders, maar soms ook bij kennisinstellingen en het bedrijfsleven. Dit tweerichtingsverkeer stimuleert vernieuwing en innovatie.

Vraaggestuurd werken betekent ook dat we zelf voortdurend op zoek zijn naar de 'kennisvragen van morgen' – de vragen die we graag op de agenda zetten nog voordat iemand ze gesteld heeft – om optimaal voorbereid te zijn op de toekomst.

STOWA ontzorgt de waterbeheerders. Wij nemen de aanbesteding en begeleiding van de gezamenlijke kennisprojecten op ons. Wij zorgen ervoor dat waterbeheerders verbonden blijven met deze projecten en er ook 'eigenaar' van zijn. Dit om te waarborgen dat de juiste kennisvragen worden beantwoord. De projecten worden begeleid door commissies waar regionale waterbeheerders zelf deel van uitmaken. De grote onderzoekslijnen worden per werkveld uitgezet en verantwoord door speciale programmacommissies. Ook hierin hebben de regionale waterbeheerders zitting.

STOWA verbindt niet alleen kennisvragers en kennisleveranciers, maar ook de regionale waterbeheerders onderling. Door de samenwerking van de waterbeheerders binnen STOWA zijn zij samen verantwoordelijk voor de programmering, zetten zij gezamenlijk de koers uit, worden meerdere waterschappen bij één en het zelfde onderzoek betrokken en komen de resultaten sneller ten goede aan alle waterschappen.

De grondbeginselen van STOWA zijn verwoord in onze missie:

Het samen met regionale waterbeheerders definiëren van hun kennisbehoeften op het gebied van het waterbeheer en het voor én met deze beheerders (laten) ontwikkelen, bijeenbrengen, beschikbaar maken, delen, verankeren en implementeren van de benodigde kennis.

VERSPREIDING VAN DE TULAREMIE BACTERIE FRANCISELLA TULARENSIS IN NEDERLANDS OPPERVLAKTEWATER

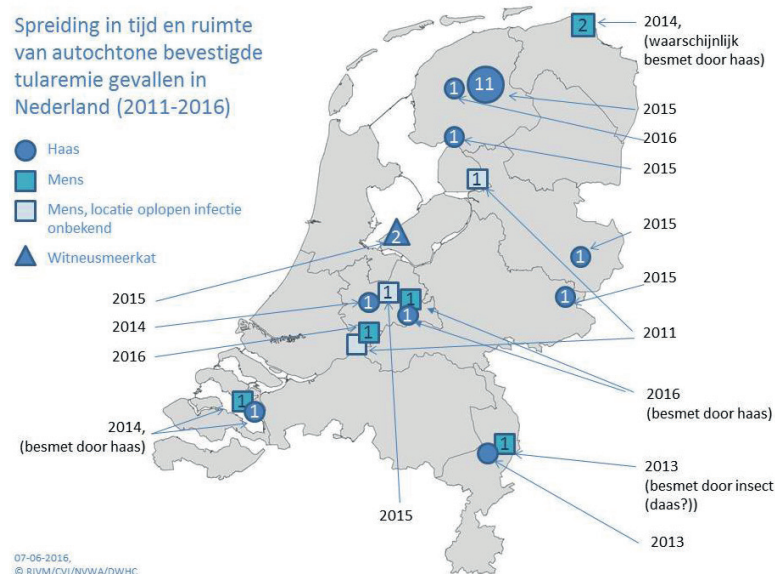
INHOUD

TEN GELEIDE		
DE STOWA IN HET KORT		
ACHTERGROND		1
ONDERZOEK		3
RESULTATEN		5
DISCUSSIE		7
CONCLUSIES		8
MATERIAAL EN METHODES		9
DANKWOORD		11
REFERENTIES		12
BIJLAGE 1	E-mail aan waterschappen met verzoek om deelname aan onderzoeksproject	13
BIJLAGE 2	Tijdstippen van monsternames op de verschillende locaties	15
BIJLAGE 3	Aanwezigheid van <i>F. tularensis</i> DNA gemeten met qPCR	17
BIJLAGE 4	Samenvatting van Engelstalige publicatie	24

ACHTERGROND

Tularemie is een infectieziekte veroorzaakt door de bacterie *Francisella tularensis*. Naast veel diersoorten kunnen mensen geïnfecteerd worden en dit kan op verschillende manieren gebeuren; via direct contact (bijvoorbeeld tijdens het villen van een haas), via ingestie, en via inademing van aerosolen. Besmetting kan leiden tot een zeer ernstig, mogelijk dodelijk, ziekteverloop, met name wanneer de blootstelling via de lucht plaatsvindt. De ziekte is moeilijk te herkennen aan specifieke symptomen.

FIGUUR 1



In Nederland werd sinds 1953 decennia lang geen endemisch geval van tularemie gemeld, maar in 2011 veranderde deze situatie en worden sporadisch tularemie patiënten herkend die de ziekte in Nederland hebben opgelopen [1-4]. Sinds 2011 loopt ook een monitoringsproject waarbij gevonden dode hazen (een van de meest gevoelige diersoorten voor deze ziekte) getest worden op tularemie. Verspreid over Nederland worden geïnfecteerde hazen gevonden [5]. De humane en hazen met tularemie betrof altijd incidentele gevallen, maar in het merengebied van Friesland werd in februari-maart 2015 een cluster van tularemie bij hazen vastgesteld. De bacterie *F. tularensis* werd aangetoond bij 13 dood gevonden hazen die vanaf februari 2015 werden ingezonden uit de wijde omgeving van Akkrum. Dit zijn dus alleen ingezonden hazen want het aantal hazen dat door de ziekte geveld werd lag vele malen hoger. Omdat dit een voor Nederland uitzonderlijke situatie is, werd besloten monsters te nemen om potentiële bronnen en transmissiewegen te onderzoeken. Hiertoe werden monsters genomen van muizen, muggenlarven en oppervlaktewater in de omgeving waar de hazen gevonden werden. De bacterie werd aangetroffen in oppervlaktewater en sediment binnen het gebied rondom Akkrum waar de besmette hazen gevonden waren. In monsters die genomen waren buiten dit gebied, of in het gebied maar nadat de uitbraak onder hazen voorbij was (geen nieuwe sterfte gemeld), werd de bacterie niet aangetroffen. Het onderzoek aan dit cluster werd beschreven in een wetenschappelijke publicatie [6], waarbij naast het CIB (Centrum voor Infectieziektebestrijding) van het RIVM ook onder meer het WBVR (Wageningen Bioveterinary

Research) en het DWHC (Dutch Wildlife Health Centre) van de Universiteit Utrecht betrokken waren.

De aanwezigheid van *F. tularensis* in oppervlaktewater tijdens de tularemie uitbraak bij hazen riep verschillende vragen op. Een van deze vragen was of de bacterie op meerdere plekken en in meerdere seizoenen in Nederlands oppervlaktewater aanwezig is. Dit werd waarschijnlijk geacht, omdat de besmettingen van hazen en mensen sinds 2011 verspreid over Nederland voorkomen (Figuur 1).

ONDERZOEK

ONDERZOEKSVRAGEN

In dit rapport worden de resultaten beschreven van onderzoek naar de bacterie *F. tularensis* in Nederlands oppervlaktewater. Het doel van het onderzoek was om gegevens te verzamelen die helpen bij het beoordelen van infectierisico's van oppervlaktewater. Hiervoor zijn gegevens belangrijk over het vóórkomen van *F. tularensis* in Nederlands oppervlaktewater om mogelijke bronnen en transmissieroutes te achterhalen die kunnen leiden tot blootstelling van de mens in de nabije toekomst. Daarnaast maakt gedetailleerde informatie over de types bacteriën in water en in geïnfecteerde dieren of mensen het mogelijk om te beoordelen of oppervlaktewater daadwerkelijk een infectiebron is geweest.

Voor het onderzoeken van mogelijke blootstelling is het van belang om meer inzicht te krijgen in de verspreiding van *F. tularensis* in oppervlaktewater, niet alleen in Friesland maar ook in andere delen van Nederland. Daarnaast is ook het verloop in de tijd van belang. Zoals hierboven vermeld worden sporadisch tularemie gevallen gemeld vanuit heel Nederland en in verschillende seizoenen. Er waren al aanwijzingen dat de bacterie in andere delen van het land aanwezig is, maar het was onbekend in welke mate en of er een samenhang is met eigenschappen van het water. Voor het onderzoeken van de rol van oppervlaktewater bij beschreven gevallen van tularemie is het noodzakelijk om de bacterie te kunnen typeren om te achterhalen of de stammen die in het water aangetroffen worden dezelfde zijn als die infecties in hazen en mensen veroorzaken.

AANPAK

Verspreiding en verloop van F. tularensis in Friesland

Over de verspreiding in de omgeving van Akkrum hadden we op basis van eerdere metingen een beeld gekregen. De bacterie was aantoonbaar in water en in sediment, maar zeker niet overal. Positieve monsters waren allemaal afkomstig van oppervlaktewateren ten noordoosten en noordwesten van Akkrum, binnen een straal van ongeveer 5 kilometer. Monsters afkomstig van buiten dit gebied waren negatief. De monsternamen in deze omgeving werd voortgezet in samenwerking met het waterschap Friesland, waardoor ook informatie verzameld is over het verloop door het seizoen.

Verspreiding en verloop F. tularensis in de rest van Nederland

De verspreiding over de rest van Nederland werd onderzocht door aansluiting bij de routinebemonstering door een aantal waterschappen verspreid over het land. Hiertoe werd contact gezocht met waterschappen waarbij extra inspanning geleverd werd om samen te werken met waterschappen in gebieden waar tularemie casussen gevonden zijn (bij mensen of hazen).

Typeren F. tularensis

Om gedetailleerde typering van de bacterie mogelijk te maken is het wenselijk om deze te kunnen kweken, omdat op die manier voldoende geschikt materiaal voor de analyses geproduceerd kan worden. Het kweken van *F. tularensis* is echter zeer bewerkelijk doordat deze bacteriën alleen gekweekt kunnen worden in laboratoria met een strikt veiligheidsregime vanwege de hoge besmettelijkheid en het ernstige ziekteverloop van tularemie. Daarnaast is de kans van slagen in omgevingsmonsters klein, mede door de verwachte lage aantallen in het bronmateriaal. We hebben een alternatieve methode ontwikkeld en gebruikt waarbij

de typering gedaan kon worden op basis van het DNA van de bacterie. Dit DNA werd ook gebruikt voor het aantonen van de aanwezigheid van de bacterie, maar door de gevolgde aanpak werd het ook mogelijk om meer gedetailleerde informatie voor typering te verkrijgen uit de omgevingsmonsters.

RESULTATEN

Van 9 waterschappen werden van 76 locaties verspreid over Nederland 174 monsters verkregen (zie bijlage I en II). De weken waarin monsternames uitgevoerd werden en de frequentie van de monsternames verschilden per locatie (bijlage II). Van de 76 locaties werden er 21 op 1 tijdstip bemonsterd, 27 op twee tijdstippen, 23 op 3 tijdstippen, en 5 werden op 6 tijdstippen bemonsterd.

De aanwezigheid van *F. tularensis* DNA werd onderzocht met behulp van qPCR. Op basis van deze qPCR uitslagen werden positieve monsters verdeeld in 5 niveaus met oplopende concentratie *F. tularensis* DNA. De resultaten worden weergegeven in Tabel 1 en Figuur 2, meer details zijn te vinden in bijlage III.

TABEL 1 DETAILS VAN MONSTERLOCATIES WAAR *F. TULARENSIS* DNA GEDETECTEERD WERD IN OPPERVLAKTEWATER. DE LETTERS IN DE EERSTE KOLOM REFEREREN NAAR DE LOCATIES IN FIGUUR 2 WAAR DNA AANGETROFFEN WERD BIJ MINIMAAL 1 MONSTERNAME. DE CONCENTRATIE VAN DNA IS WEERGEGEVEN MET CIJFERS OPLOPEND VAN 0 (AFWEZIG) TOT 5 (HOOGSTE RELATIEVE CONCENTRATIE).

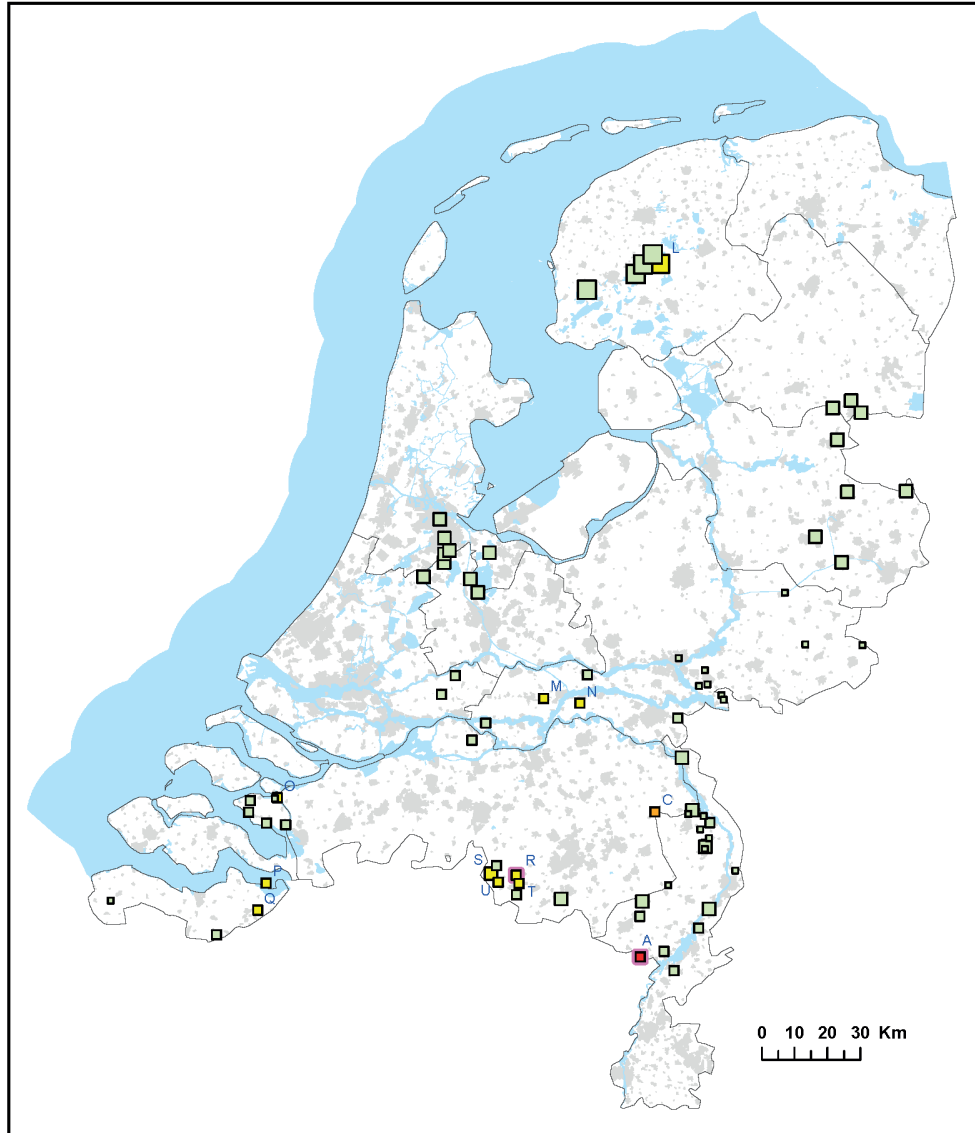
Monster			April				Mei				Juni				Juli				Augustus				September				Oktober				
Fig. 2	Max. Score	Watertype	week	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43
A	5	kanaal																	5					4							
C	2	vaart																	2				0								
L	1	sloot				1				0			0				0			0				0							
M	1	plas																							1		0				
N	1	sloot																								0					1
O	1	kanaal			0					1																					
P	1	getijdengebied			0							1																			
Q	1	vaart		0					1																						
R	1	kanaal																		1				1							
S	1	plas																		1		0		0							
T	1	kanaal																		0				1							
U	1	kanaal																	0					1							
V	1	kanaal										1																			

De aanwezigheid van *F. tularensis* DNA werd aangetoond in 15 van de 174 monsters (9%), afkomstig van 13 van de 76 locaties (17%) (Tabel 1, bijlage III). In de meeste gevallen ging het om locaties die meerdere keren bemonsterd waren, en waarbij niet alle monsters positief waren. In het geval de concentratie relatief hoog was (monster A in Tabel 1) waren wel beide monsters positief.

Van één van de monsters waarin *F. tularensis* was aangetoond in een relatief hoge concentratie (A in Figuur 2 en Tabel 1) werd het geïsoleerde DNA nader onderzocht. Door middel van een nieuw ontwikkelde methode werd in 2 stappen een set van 10 unieke fragmenten DNA vanuit het watermonster vermeerderd en gesequencet. Deze 10 fragmenten waren zo geselecteerd dat deze informatie kunnen bevatten waarmee *F. tularensis* getypeerd kan worden. De resultaten lieten zien dat de ondersoort *Francisella tularensis holarctica* aanwezig is, en deze ondersoort kon verder getypeerd worden tot 'subclade' B4 volgens de classificatie zoals beschreven in de literatuur [7].

FIGUUR 2

VERSPREIDING VAN *F. TULARENSIS* IN OPPERVLAKEWATER IN NEDERLAND. DE VIERKANTE SYMBOLEN GEVEN DE PLEKKEN WEER WAAR MONSTERS VERZAMELD ZIJN IN 2016. DE GROOTTES VAN DE SYMBOLEN KOMEN OVEREEN MET HET AANTAL MONSTERNAMES OP EEN BEPAALDE LOCATIE (OPLOPEND VAN 1 TOT 8). KLEUREN VERWIJZEN NAAR DE HOEVEELHEDEN *F. TULARENSIS* DNA IN DE MONSTERS DIE INGEDEELD ZIJN OPLOPEND VAN 0 (DNA NIET GEDETECTEERD) TOT 5 (HOOGSTE NIVEAU). BETEKENIS VAN DE KLEUREN: GROEN = NIVEAU 0, GEEL = NIVEAU 1, ORANJE = NIVEAU 2, ROOD = NIVEAU 5. WAAR MONSTERNAMES HERHAALD WERDEN, IS DE KLEUR VAN HET SYMBOOL GEBASEERD OP HET TIJDSTIP MET DE HOOGSTE WAARDE. DE ROZE HALO GEEFT AAN DAT OP DIE PLEK ELKE MONSTERNAME POSITIEF WAS. DE BLAUWE LETTERS KOMEN TERUG IN TABEL 2 WELKE MEER DETAILS GEEFT OVER DE MONSTERPLEK EN OVER DE GEVONDEN WAARDES OP VERSCHILLENDE TIJDSTIPPEN



DISCUSSIE

De metingen laten zien dat de bacterie *Francisella tularensis* aanwezig is in oppervlaktewater verspreid over Nederland. De bacterie werd aangetroffen op 17% van de geselecteerde locaties. Ook als er geen aanwijzingen waren voor de aanwezigheid van de bacterie in de omgeving kon deze worden aangetroffen. De selectie van locaties voor monsternames voor dit onderzoek was niet gestuurd door het voorkomen van tularemie-gevallen (bij mensen of hazen) in de omgeving. De enige uitzondering hierop waren 2 van de 5 geselecteerde plekken uit Friesland, die in het gebied lagen van de hazen-uitbraak in het voorjaar van 2015 [6]. Eén van de 6 monsters van locatie L (Tabel 1 en Figuur 2) werd positief bevonden. Deze monstername vond wel een jaar na de uitbraak plaats, bovendien waren er in de tussentijd op die plek ook negatieve monsters gemeten.

In een eerdere studie leek het of *F. tularensis* DNA alleen aangetroffen wordt in kleine wateren zoals sloten [6], maar dit werd met de metingen in deze studie niet gevonden. De bacterie werd aangetroffen in verschillende types water: in (zwem) plassen, kanalen, sloten, en behalve in zoetwater ook in brak water.

De meeste van de locaties waar *F. tularensis* werd aangetroffen waren meerdere keren bemonsterd, waarbij niet alle monsters positief waren. Dit laat zien dat er dynamiek is in de aanwezigheid van *F. tularensis*, en dat het van belang is om de monstername te herhalen voor een goed beeld van het voorkomen van de bacterie op een bepaalde plek. Aanwezigheid aantonen kan goed met deze specifieke detectiemethode, maar afwezigheid aantonen is veel lastiger. Alleen herhaalde metingen kunnen afwezigheid aannemelijk maken.

Er was 1 locatie waar *F. tularensis* duidelijk meer aanwezig was (A in Figuur 2), op deze locatie waren ook beide monsters genomen op deze plek positief. Hoewel dit dus een locatie met meer *F. tularensis* is, is er geen aanwijzing dat dit infectierisico's met zich meebrengt. Het tularemie geval dat er het dichtst bij in de buurt komt stamt uit 2013 (Figuur 1).

De in dit onderzoek verkregen monsters waren afkomstig van locaties verspreid over Nederland en vormden een belangrijke aanvulling op monsters verkregen uit andere bronnen (zie bijlage IV). Bij de interpretatie van deze metingen is het belangrijk te beseffen dat het aantonen van DNA geen bewijs is voor een aanwezigheid van levende, infectieuze bacteriën op het moment van monstername. Het geëxtraheerde DNA kan afkomstig zijn van intacte levende bacteriën, maar ook van dode bacteriën of van bacteriën waarvan alleen nog fragmenten waaronder DNA over zijn. DNA blijft voor een variabele periode intact en aantoonbaar in de omgeving, te denken valt aan een periode van dagen of weken voor oppervlaktewater. Het verdwijnt doordat bacteriën of bacterie-restanten opgegeten worden, het DNA bindt aan partikels, of doordat het uiteen valt door chemische processen. Daarom wordt met de aanwezigheid van DNA wel aangetoond dat niet lang geleden levende bacteriën aanwezig waren.

CONCLUSIES

De onderzoeksgegevens beschreven in dit rapport vormen een eerste aanzet voor het mogelijk maken van een schatting van blootstelling aan de bacterie *F. tularensis*. Voor een betere bepaling van de blootstelling zijn veel gegevens nodig van aantallen deze bacteriën op verschillende tijdstippen door het jaar. Bij voldoende gegevens van dergelijke blootstelling in combinatie met informatie van geïnfecteerde mensen of hazen kunnen ook infectierisico's geschat worden. Echter, met de huidige metingen is niets te concluderen over wat infectierisico's van recreatie in een bepaald water of in een bepaald gebied zijn.

Meer informatie over infectierisico kan wel verkregen worden door de gebruikte methode voor het typeren van DNA uit watermonsters, want hiermee kan een verband tussen tularemie gevallen en een verdachte waterbron onderzocht worden.

BEHEERSMAATREGELEN

Waterkwaliteit hangt samen met het gebruik van het water. Er is nog veel onbekend over de rol van mogelijke reservoirs van de ziekteverwekker *F. tularensis*, zoals kleine zoogdieren en oppervlaktewater, en transmissie via vectoren zoals muggen of via directe blootstelling aan oppervlaktewater of aerosolen. Een aantal van deze factoren zijn relevant voor mogelijke beheersmaatregelen. Het is bijvoorbeeld mogelijk dat er door de aanwezigheid van *F. tularensis* in bepaalde regio's, misschien ook gekoppeld aan een bepaald type water, risico's verbonden zijn aan recreatie of aan het sproeien met oppervlaktewater door boeren.

Het beschreven onderzoeksproject geeft inzicht in het vóórkomen en dynamiek van een potentiële bedreiging voor de volksgezondheid in oppervlaktewater. Dit inzicht kan aangewend worden om het gebruik van oppervlaktewater te sturen middels beheersmaatregelen. Op basis van wat nu bekend is over de infectierisico's zou een beheersmaatregel voor bepaalde gebieden kunnen zijn het verhogen van alertheid bij recreanten of medisch personeel wanneer er symptomen zijn die bij tularemie kunnen horen. In overleg met de GGD kan besloten worden onderzoek naar het voorkomen van de bacterie te doen als er duidelijke aanwijzingen zijn voor blootstelling vanuit een bepaalde bron.

MATERIAAL EN METHODES

SAMENWERKING MET WATERSCHAPPEN

Om de verzameling van verschillende oppervlaktewateren verspreid over Nederland mogelijk te maken werd aansluiting gezocht bij de routine monitoring van de kwaliteit van oppervlaktewater door waterschappen. Omdat dit op basis van vrijwilligheid moest gebeuren werd een zo eenvoudig mogelijk protocol opgesteld voor het verzamelen, bewaren en transporteren van materialen voor onderzoek. Via de Kring Monitoring Water (voorzitter Rob Merkelbach, secretaris Peter Kaim), werd een Email uitgestuurd op 29 februari 2016 met een korte schets van het onderzoek en van wat gevraagd werd van deelnemende waterschappen (zie bijlage I). Met 10 waterschappen die positief reageerden op het verzoek om monsters werd een samenwerking aangegaan. Een van deze waterschappen wilde meewerken en had voorbereidingen getroffen, maar er bleek uiteindelijk iets mis gegaan te zijn in het lab waardoor geen monsters genomen waren.

TABEL 2 GEGEVENS VAN DE DEELNEMENDE WATERSCHAPPEN EN AANTALLEN MONSTERS

waterschap	aantal monsters	Contactpersonen waterschap	Monsternamen en filtratie uitgevoerd door
de Dommel	18	Rene de Louw, Oscar van Zanten	AQUON (Eric van Gool)
Fryslan	30	Jan Regeling, Wiesje Sipkema	Laboratorium waterschap
Noorderzijlvest	0	Jan Laninga	
Peel en Maasvallei	24	Gabriël Zwart	Eurofins / Omegam (Gert Wolbink, Harry Heinen)
Rijn en IJssel	9	John Lenssen, Merel Lammertink	
Rivierenland	16	Bram van 't Hullenaar, Arjan de Bruine, Michel Lucas	AQUON (Eric van Gool)
Roer en Overmaas	13	Bert Pex	Laboratorium waterschap
Scheldestromen	18	Karel van Goethem, Yvonne van Scheppingen	Laboratorium waterschap
Vechtstromen	24	Anke Durand	Aqualysis (Ariën Dudink)
Waternet	27	Sonja Viester	Waterproef (Peter Kunst)

MONSTERNAME

Deelnemende waterschappen werd gevraagd om extra water te verzamelen bij de reguliere monsternames. Na transport naar het laboratorium en filtratie over een 0,45 micrometer membraanfilter kon dit filter gebruikt worden voor dit onderzoek. Het verzoek om deze monsters was als beschreven in bijlage I. Er werd geprobeerd een diverse set monsters te krijgen door geografische spreiding en selectie van meerdere types water: naast zwemplassen ook kanalen en indien mogelijk sloten. Als leidraad werd genomen een set monsters op maximaal 10 verschillende locaties op 3 verschillende tijdstippen. De uiteindelijke selectie van plekken voor monsternames werd gedaan in overleg met de contactpersonen bij de verschillende waterschappen. Monsternames werden gestart in 2016. De start en frequentie van monsternames werd bepaald door de waterschappen en varieerden aanzienlijk zoals weergegeven in bijlage II.

Watermonsters werden gefiltreerd in verschillende laboratoria (Tabel 2). Details van de filtratie-opstelling en de opslag van de filters konden variëren en werden in overleg uitgewerkt, maar er werd voor gezorgd dat de bepalende kenmerken overeenkwamen. Deze waren het gebruik van een schone filtratie-opstelling met een membraanfilter met poriëgrootte 0,45 micrometer, en filtratie van het oppervlaktewater tot de filter verstopt raakte. De meeste laboratoria hadden een filtratie-opstelling. In het geval dit niet zo was werd een filtratieopstel-

ling uitgeleend voor de duur van het project. Filters werden bewaard bij -20 °C en vervolgens bevroren getransporteerd naar het RIVM.

METINGEN VAN DE AANWEZIGHEID VAN FRANCISELLA TULARENSIS DNA

Filters werden verwerkt zoals eerder beschreven [6]. Het DNA van de filters werd geïsoleerd met behulp van de DNeasy Powerwater kit van Qiagen volgens de voorschriften van de fabrikant en werd vervolgens bewaard bij -20°C tot verdere verwerking. Detectie van *F.tularensis* DNA werd uitgevoerd met qPCR zoals beschreven in [8]. Deze gevoelige assay detecteert tegelijkertijd de aanwezigheid van meerdere DNA sequenties *fopA* en *ISFtu2*, die specifiek zijn voor *F. tularensis*. De laatste DNA sequentie is aanwezig in meerdere kopieën per bacterie en is daarmee is detectie ervan gevoeliger. Ook wordt er een zogenaamde interne extractiecontrole gedetecteerd die verifieert dat de procedure vanaf DNA extractie tot qPCR detectie goed is verlopen. De Cq waardes voor de gemeten DNA extracten zijn weergegeven in bijlage III.

Om een vergelijking tussen hoeveelheden DNA mogelijk te maken die ook makkelijk gevisualiseerd kan worden, werden de positieve qPCR resultaten in 5 categorieën ingedeeld. Dit gebeurde op basis van de aanwezigheid van de 2 hierboven genoemde DNA sequenties (*fopA* en *ISFtu2*) in triplo metingen. Niveau 1 = *ISFtu2* gedetecteerd 1 of 2 van de 3 metingen; Niveau 2 = *ISFtu2* gedetecteerd 3 uit 3; Niveau 3 = *ISFtu2* gedetecteerd 3 uit 3 en Cq < 33; Niveau 4 = *ISFtu2* gedetecteerd 3 uit 3 en *fopA* gedetecteerd 1 of 2 uit 3; Niveau 5 = Zowel *ISFtu2* als *fopA* gedetecteerd 3 uit 3. Dit indelen was gebaseerd op het feit dat bij toenemende hoeveelheid DNA van *F. tularensis* bacteriën de kans toeneemt dat een DNA sequentie in elke replica gedetecteerd wordt, de Cq waarde afneemt, en dat de kans op detectie van *fopA* (waarvan 1 kopie per bacterie aanwezig is) naast detectie van *ISFtu2* (meerdere kopieën per bacterie) groter wordt.

TYPING FRANCISELLA TULARENSIS

Voor het typen werd het geëxtraheerde DNA uit de watermonsters gebruikt voor vermeerdering van 10 fragmenten die specifiek zijn voor *F. tularensis*. In een eerste stap werden deze 10 fragmenten gelijktijdig vermeerderd doordat alle 20 voor deze amplificatie ontworpen primers aanwezig waren in de reactie. De primers waren aanwezig in relatief lage concentraties en het temperatuurprogramma voor amplificatie was hierop aangepast. Vervolgens werden de restanten van de primers afgebroken met een exonuclease en verdund. Deze mix werd verdeeld over reacties met alleen de primersets voor de losse fragmenten en de 10 fragmenten werden vervolgens los van elkaar vermeerderd in een tweede stap. De producten van de reacties werden gecontroleerd op grootte en zuiverheid en vervolgens naar Baseclear (Leiden, www.baseclear.com) gestuurd om te sequensen. De gesequenste fragmenten werden geanalyseerd met de software CLCbio van Qiagen (www.qiagenbioinformatics.com). De fragmenten werden vergeleken met gepubliceerde genomen van *F. tularensis* verkregen van de NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov).

DANKWOORD

We danken medewerkers van de volgende waterschappen en aangesloten laboratoria voor het uitvoeren en opwerken van watermonsters: Den Dommel, Hollandse delta, Hunze en Aa's, Noorderzijlvest, Peel en Maasvallei, Rivierenland, Rijnland, Roer en Overmaas, Scheldestromen, Vechtstromen, Waternet, Wetterskip Fryslan, Wrij, Rijn en IJssel. Ook danken wij Bas van der Wal van de STOWA en Rob Merkelbach en Peter Kaim van de Kring Monitoring Waterschappen voor het verspreiden van het verzoek om medewerking aan dit onderzoek.

REFERENTIES

1. Koene, M.G., et al., *Tularemie in Nederland, terug van weggeweest ?* Nederlands Tijdschrift voor Diergeneeskunde, 2015. **140**(8): p. 4.
2. Pijnacker, R., et al., *Tularemie in Nederland, terug van weggeweest?* Nederlands Tijdschrift voor Medische Microbiologie, 2016. **24**(2): p. 4.
3. van de Wetering, D., et al., *A cluster of tularaemia after contact with a dead hare in the Netherlands.* Neth J Med, 2015. **73**(10): p. 481-2.
4. Zijlstra, M., et al., *[Tularaemia in a boy following participation in a mud race]*. Ned Tijdschr Geneesk, 2017. **160**(0): p. D1180.
5. Rijks, J.M., et al., *Tularaemia in a brown hare (Lepus europaeus) in 2013: first case in the Netherlands in 60 years.* Euro Surveill, 2013. **18**(49).
6. Janse, I., et al., *Environmental surveillance during an outbreak of tularaemia in hares, the Netherlands, 2015.* Euro Surveill, 2017. **22**(35).
7. Svensson, K., et al., *A real-time PCR array for hierarchical identification of Francisella isolates.* PLoS One, 2009. **4**(12): p. e8360.
8. Janse, I., et al., *Reliable detection of Bacillus anthracis, Francisella tularensis and Yersinia pestis by using multiplex qPCR including internal controls for nucleic acid extraction and amplification.* BMC Microbiol, 2010. **10**: p. 314.

BIJLAGE 1

E-MAIL AAN WATERSCHAPPEN MET VERZOEK OM DEELNAME AAN ONDERZOEKSPROJECT

Beste kringleden,

Stowa en RIVM starten een onderzoek om de verspreiding van de tularemie-veroorzakende bacterie *Francisella tularensis* in Nederland in kaart brengen. Uit een vooronderzoek in de Friese meren samen met Wetterskip Fryslan bleek dat deze bacterie aanwezig is het oppervlakte water. Waarschijnlijk is de bacterie ook aanwezig in andere gebieden: Zeeland (Tholen), Noord-Limburg, Utrecht, Overijssel. Zie onder voor meer informatie en uitleg.

Vraag: Wie wil meewerken aan het onderzoek? Het zou fijn zijn als de waterschappen in de gebieden waar de bacterie is aangetroffen hieraan willen meewerken. Het gaat om op een aantal geselecteerde plekken in je gebied (ongeveer 10) extra monsters van een liter oppervlaktewater te nemen; deze monsters vervolgens in het lab te filtreren over 0,45 micrometer filters tot deze dichtgeslibd zijn, en de filters opslaan in een vriezer. Verder analyse loopt via het RIVM.

Aanmelden en vragen bij Ingmar Janse (ingmar.janse@rivm.nl , tel 030 2743666). Graag deze week aangeven of je wilt meewerken, ze willen snel starten.

INFORMATIE/ UITLEG:

Onderzoek Tularemie in oppervlaktewater in Nederland

Achtergrond

Tularemie is een infectieziekte veroorzaakt door de bacterie *Francisella tularensis*. Naast veel diersoorten kunnen mensen geïnfecteerd worden en dit kan op verschillende manieren gebeuren; via direct contact (bijvoorbeeld tijdens het villen van een haas), via ingestie, en via inademing van aerosolen. De *Francisella* bacterie kan gedijen in het milieu en tularemie wordt geassocieerd met oppervlaktewater. Het ziekteverloop na besmetting varieert tussen mild tot zeer ernstig.

Tularemie is endemisch in meerdere landen, in Europa komen relatief veel besmettingen voor in Zweden en Turkije. In Nederland werd sinds 1953 lang geen endemisch geval van tularemie gemeld, maar in 2011 veranderde deze situatie en worden sporadisch patiënten herkend die de ziekte in Nederland hebben opgelopen. In 2015 werd in het merengebied van Friesland een cluster van tularemie bij hazen (zeer gevoelig voor tularemie) vastgesteld. Omdat dit een voor Nederland uitzonderlijke situatie is, werd besloten monsters te

nemen om potentiële bronnen en transmissiewegen te onderzoeken. De metingen wezen uit dat de bacterie aanwezig was in oppervlaktewater in een beperkt gebied in Friesland. Een paar monsters uit andere gebieden in Nederland waar tularemie gevallen (in mensen of in hazen) gemeld waren lieten zien dat de bacterie ook aangetoond kan worden in sommige andere gebieden.

Onderzoek

Naar aanleiding van deze resultaten werd een onderzoeksvoorstel ingediend bij de STOWA met als doel de verspreiding van de tularemie-bacterie in kaart te brengen, in het Friese merengebied maar ook in de rest van Nederland. Met deze kennis kunnen mogelijke bronnen en transmissieroutes die kunnen leiden tot blootstelling van de mens achterhaald worden. De bron van de ziekteverwekker *F. tularensis* kan oppervlaktewater zijn, maar ook kleine zoogdieren, en transmissie kan plaatsvinden via direct contact met dieren of oppervlaktewater, maar ook via aerosolen of via overdracht door insecten. Een aantal van deze factoren zijn relevant voor mogelijke beheersmaatregelen. Om een voorbeeld te noemen: mogelijk zijn er door de aanwezigheid van *F. tularensis* in bepaalde regio's, misschien ook gekoppeld aan een bepaald type water, risico's verbonden aan recreatie of aan het sproeien met oppervlaktewater door boeren.

Daarvoor is het allereerst van belang om meer inzicht te krijgen in de verspreiding van *F. tularensis*, daarnaast is ook het verloop in de tijd van belang. Zoals hierboven vermeld worden sporadische tularemie gevallen gemeld vanuit heel Nederland en in verschillende seizoenen. Er zijn al aanwijzingen dat *F. tularensis* in andere delen van het land aanwezig is, maar we hebben geen idee in welke mate en of er een samenhang is met eigenschappen van het water.

Vraag aan deelnemende waterschappen

Voor het onderzoeken van de verspreiding en dynamiek van *F. tularensis* in Nederland willen we graag aansluiten bij de routinebemonstering door een aantal waterschappen verspreid over het land. In ieder geval zouden waterschappen in de gebieden waar tularemie casussen gevonden zijn (humaan en haas), zoals Zeeland (Tholen), Noord-Limburg, Utrecht, Overijssel, erg interessant zijn om op te nemen in het monsterprogramma. Met Wetterskip Fryslan wordt al samengewerkt.

Wat we vragen is of deelnemende waterschappen bij de routinebemonstering van oppervlaktewater op een aantal geselecteerde plekken extra monsters van een liter oppervlaktewater kunnen nemen, deze monsters vervolgens in het lab filtreren over 0,45 micrometer filters tot deze dichtgeslibd zijn, en de filters opslaan in een vriezer. Aantallen waar we aan denken zijn in de orde van hooguit 10 plekken op 3 verschillende tijdstippen. Dan zorgen wij als filters verzameld zijn voor transport naar het RIVM. Resultaten van de metingen worden gerapporteerd aan de opdrachtgever STOWA, maar deelnemende waterschappen kunnen de resultaten ook al eerder krijgen wanneer ze daar prijs op stellen.

Dr. Ingmar Janse

Zoonoses & Environmental Microbiology (Z & O)

Centre for Infectious Disease Control

National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) – Section I & V

BIJLAGE 2

TIJDSTIPPEN VAN MONSERNAMES OP DE VERSCHILLENDE LOCATIES

Voor details monsterplekken zie bijlage III

locatie code	weeknummer in 2016																												totaal
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	
DO-A																1		1		1									3
DO-B																1					1								2
DO-C																1					1								2
DO-D																	1				1								2
DO-E																	1				1								2
DO-F																	1				1								2
DO-G																	1		1		1								3
FL-A				1				1				1		1				1				1							6
FL-B			1				1				1		1				1				1								6
FL-C			1				1				1		1				1				1								6
FL-D			1				1				1		1				1				1								6
FL-E			1				1				1		1				1				1								6
PM-A											1									1									2
PM-B																1					1								2
PM-C																	1			1									2
PM-D																		1			1								2
PM-E										1							1			1									3
PM-F					1											1					1								3
PM-G																		1				1							2
PM-H							1										1				1								3
PM-I							1						1								1								3
PM-J							1									1													2
RL-A																					1		1						2
RL-B																					1				1				2
RL-C																							1				1		2
RL-D																						1					1		2
RL-E																					1		1						2
RL-F																						1					1		2
RL-G																							1					1	2
RL-H																						1					1		2
RO-A		1																											1
RO-B		1																											1
RO-C		1																											1
RO-D										1																			1
RO-E										1																			1
RO-F										1																			1
RO-G										1																			1

locatie code	weeknummer in 2016																												totaal
	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	
RO-H									1																				1
RO-I									1																				1
RO-J									1																				1
SS-A							1																						1
SS-B	1						1																						2
SS-C			1		1																								2
SS-D		1			1																								2
SS-E	1				1																								2
SS-F		1							1																				2
SS-G			1		1																								2
SS-H							1																						1
SS-I		1					1																						2
SS-J		1			1																								2
VS-A												1							1								1		3
VS-B											1						1			1					1				3
VS-C									1									1								1			3
VS-D												1					1										1		3
VS-E												1					1										1		3
VS-F												1					1								1				3
VS-G												1					1								1				3
VS-H												1						1										1	3
WN-A			1								1							1											3
WN-B	1								1							1													3
WN-C				1								1							1										3
WN-D				1								1							1										3
WN-E	1								1							1													3
WN-F				1							1								1										3
WN-G		1								1							1												3
WN-H				1							1						1												3
WN-I			1									1						1											3
WRI-A																			1										1
WRI-B																			1										1
WRI-C														1															1
WRI-D																	1												1
WRI-E																						1							1
WRI-F																							1						1
WRI-G													1											1					1
WRI-H													1																1
WRI-I																											1		1
Totaal	4	11	8	5	1	5	11	1	11	2	8	11	6	2	1	8	20	7	3	8	17	5	4	5	3	2	4	6	174

BIJLAGE 3

AANWEZIGHEID VAN F. TULARENSIS DNA GEMETEN MET QPCR

De gemeten C_q (quantification threshold) waardes van de voor *F. tularensis* specifieke genen FopA en ISFtu2 staan in kolommen met ernaast het aantal positieven uit de triplo metingen. De kolom met scoring geeft voor positieve monsters een waarde tussen 1 en 5 naarmate de hoeveelheid DNA hoger is

locatie code	Fig. 2 en Tabel 1	week	Waterschap	Monsternummer	Omschrijving		Monsterdatum		RD-X		RD-Y		Fop A		ISFtu 2				scoring	
															Cq	Cq	Cq	Cq		
D0-A	S	33	Dommel	245650	Spartelvijver, Hooge en Lage Mierde		08-08-16	136339	378806						36.31	36.7		2	1	
D0-A	S	35	Dommel	245650	Spartelvijver, Hooge en Lage Mierde		22-08-16	136339	378806									0		
D0-A	S	37	Dommel	245650	Spartelvijver, Hooge en Lage Mierde		05-09-16	136339	378806									0		
D0-B		32	Dommel	240102	Reusel, Brug in de weg Esbeek-Lage mierd		03-08-16	138008	381192									0		
D0-B		37	Dommel	240102	Reusel, Brug in de weg Esbeek-Lage mierd		07-09-16	138008	381192									0		
D0-C	U	32	Dommel	240109	Reusel, Reusel-Hooge mirdenseweg		03-08-16	138514	376155									0		
D0-C	U	37	Dommel	240109	Reusel, Reusel-Hooge mirdenseweg		07-09-16	138514	376155								34.1	1	1	
D0-D	R	33	Dommel	240089	Groote Breeze, nabij Casteren, brugweg voorbeemd		09-08-16	143994	378342							37.95		1	1	
D0-D	R	37	Dommel	240089	Groote Breeze, nabij Casteren, brugweg voorbeemd		06-09-16	143994	378342								38.59	1	1	
D0-E		33	Dommel	245705	De achterste hoef, Bladel		08-08-16	144127	372390									0		
D0-E		37	Dommel	245705	De achterste hoef, Bladel		05-09-16	144127	372390									0		
D0-F	T	33	Dommel	240082	Groote Beerze, Brug in de weg, Hapert-Bladel		09-08-16	144864	375802									0		
D0-F	T	37	Dommel	240082	Groote Beerze, Brug in de weg, Hapert-Bladel		06-09-16	144864	375802								36.75	1	1	
D0-G		33	Dommel	245525	Kempervennen, Strand Bad Centerparks te Westerhoven		08-08-16	157659	371000									0		
D0-G		35	Dommel	245525	Kempervennen, Strand Bad Centerparks te Westerhoven		22-08-16	157659	371000									0		
D0-G		37	Dommel	245525	Kempervennen, Strand Bad Centerparks te Westerhoven		05-09-16	157659	371000									0		
FL-A		18	Wetterskip Fryslan	I9026zwz	Oudegaaster Brekken, Oudega (Aldegeaster Brekken)		25-04-16	165600	556639									0		
FL-A		22	Wetterskip Fryslan	I9026zwz	Oudegaaster Brekken, Oudega (Aldegeaster Brekken)		23-05-16	165600	556639									0		
FL-A		26	Wetterskip Fryslan	I9026zwz	Oudegaaster Brekken, Oudega (Aldegeaster Brekken)		20-06-16	165600	556639									0		
FL-A		30	Wetterskip Fryslan	I9026zwz	Oudegaaster Brekken, Oudega (Aldegeaster Brekken)		18-07-16	165600	556639									0		
FL-A		34	Wetterskip Fryslan	I9026zwz	Oudegaaster Brekken, Oudega (Aldegeaster Brekken)		15-08-16	165600	556639									0		
FL-A		38	Wetterskip Fryslan	I9026zwz	Oudegaaster Brekken, Oudega (Aldegeaster Brekken)		12-09-16	165600	556639									0		
FL-B		17	Wetterskip Fryslan	I9014zwz	Sneekermeer, Terhorne (Terherne)		18-04-16	180377	561546									0		
FL-B		21	Wetterskip Fryslan	I9014zwz	Sneekermeer, Terhorne (Terherne)		17-05-16	180377	561546									0		
FL-B		25	Wetterskip Fryslan	I9014zwz	Sneekermeer, Terhorne (Terherne)		13-06-16	180377	561546									0		
FL-B		29	Wetterskip Fryslan	I9014zwz	Sneekermeer, Terhorne (Terherne)		11-07-16	180377	561546									0		
FL-B		33	Wetterskip Fryslan	I9014zwz	Sneekermeer, Terhorne (Terherne)		08-08-16	180377	561546									0		
FL-B		37	Wetterskip Fryslan	I9014zwz	Sneekermeer, Terhorne (Terherne)		05-09-16	180377	561546									0		
FL-C		17	Wetterskip Fryslan	I1963owo	Jirnsum, Rijksweg		18-04-16	182734	564406									0		
FL-C		21	Wetterskip Fryslan	I1963owo	Jirnsum, Rijksweg		17-05-16	182734	564406									0		
FL-C		25	Wetterskip Fryslan	I1963owo	Jirnsum, Rijksweg		13-06-16	182734	564406									0		

Locatie code	Fig. 2 en Tabel 1	week	Waterschap	Monsternummer	Omschrijving	Monsterdatum		RD-X		RD-Y		Fop A		ISFtu 2		scoring	
FL-C		29	Wetterskip Fryslan	l1963owo	Jirnsom, Rijksweg	11-07-16	182734	564406								0	0
FL-C		33	Wetterskip Fryslan	l1963owo	Jirnsom, Rijksweg	08-08-16	182734	564406								0	0
FL-C		37	Wetterskip Fryslan	l1963owo	Jirnsom, Rijksweg	05-09-16	182734	564406								0	0
FL-D		17	Wetterskip Fryslan	l9047zwz	Bliskpole, Grou	18-04-16	185581	567512								0	0
FL-D		21	Wetterskip Fryslan	l9047zwz	Bliskpole, Grou	17-05-16	185581	567512								0	0
FL-D		25	Wetterskip Fryslan	l9047zwz	Bliskpole, Grou	13-06-16	185581	567512								0	0
FL-D		29	Wetterskip Fryslan	l9047zwz	Bliskpole, Grou	11-07-16	185581	567512								0	0
FL-D		33	Wetterskip Fryslan	l9047zwz	Bliskpole, Grou	08-08-16	185581	567512								0	0
FL-D		37	Wetterskip Fryslan	l9047zwz	Bliskpole, Grou	05-09-16	185581	567512								0	0
FL-E	L	17	Wetterskip Fryslan	l1962owo	Soarremoarre, Nes	18-04-16	187790	564538							36.98	37.35	2
FL-E	L	21	Wetterskip Fryslan	l1962owo	Soarremoarre, Nes	17-05-16	187790	564538								0	0
FL-E	L	25	Wetterskip Fryslan	l1962owo	Soarremoarre, Nes	13-06-16	187790	564538								0	0
FL-E	L	29	Wetterskip Fryslan	l1962owo	Soarremoarre, Nes	11-07-16	187790	564538								0	0
FL-E	L	33	Wetterskip Fryslan	l1962owo	Soarremoarre, Nes	08-08-16	187790	564538								0	0
FL-E	L	37	Wetterskip Fryslan	l1962owo	Soarremoarre, Nes	05-09-16	187790	564538								0	0
PM-A		25	Peel en Maasvallei	2466345	073218001 Steekmonster Noordervaart Budschop-Eind	14-06-16	181741	365750								0	0
PM-A		36	Peel en Maasvallei	3567612	073221001 Steekmonster Noordervaart Budschop-Eind	01-09-16	181741	365750								0	0
PM-B	A	32	Peel en Maasvallei	3167045	073532001 Steekmonster Uffelschebeek GP 144	04-08-16	181770	353451	30.32	30.17	30.4					3	5
PM-B	A	37	Peel en Maasvallei	3665442	073533001 Steekmonster Uffelschebeek GP 144	05-09-16	181770	353451	33.73					28.27	28.28	28.3	3
PM-C	C	32	Peel en Maasvallei	3166406	073292001 Steekmonster Peelkanaal Vredepaal	03-08-16	186300	397571						33.29	33.22	32.83	3
PM-C	C	36	Peel en Maasvallei	3567614	073293001 Steekmonster Peelkanaal Vredepaal	01-09-16	186300	397571						35.48	36.32	36.4	3
PM-D		34	Peel en Maasvallei	3367544	072908001 Steekmonster Boschmolenplas Heel	18-08-16	189000	355000								0	0
PM-D		37	Peel en Maasvallei	3666753	072909001 Steekmonster Boschmolenplas Heel	07-09-16	189000	355000								0	0
PM-E		24	Peel en Maasvallei	2366276	073206001 Steekmonster Niers Milsbeek	07-06-16	194540	414110								0	0
PM-E		33	Peel en Maasvallei	3266591	073208001 Steekmonster Niers Milsbeek	10-08-16	194540	414110								0	0
PM-E		36	Peel en Maasvallei	3567611	073209001 Steekmonster Niers Milsbeek	01-09-16	194540	414110								0	0
PM-F		20	Peel en Maasvallei	1967773	072797001 Steekmonster Afleidingskanaal Smakt	10-05-16	197730	398110								0	0
PM-F		32	Peel en Maasvallei	3167041	072800001 Steekmonster Afleidingskanaal Smakt	04-08-16	197730	398110								0	0
PM-F		37	Peel en Maasvallei	3666752	072801001 Steekmonster Afleidingskanaal Smakt	07-09-16	197730	398110								0	0
PM-G		34	Peel en Maasvallei	3365562	073436001 Steekmonster Swalm Hoosterhof	15-08-16	199550	362220								0	0

locatie code	Fig. 2 en Tabel 1	week	waterschap	Monsternummer	Omschrijving	Monsterdatum			Fop A			ISftu 2			scoring	
						RD-X	RD-Y		Cq	Cq	Cq	# pos	Cq	Cq	# pos	
PM-G		38	Peel en Maasvallei	3765610	073437001 Steekmonster Swalm Hoosterhof	12-09-16	199550	362220				0			0	
PM-H		21	Peel en Maasvallei	2065777	075547001 Steekmonster Kasteelse Bossen Dagstrand Horst	17-05-16	201650	386930				0			0	
PM-H		33	Peel en Maasvallei	3265414	075553001 Steekmonster Kasteelse Bossen Dagstrand Horst	08-08-16	201650	386930				0			0	
PM-H		37	Peel en Maasvallei	3665449	075555001 Steekmonster Kasteelse Bossen Dagstrand Horst	05-09-16	201650	386930				0			0	
PM-I		21	Peel en Maasvallei	2066550	073445001 Steekmonster Tasbeek Kessel Schijffweg	18-05-16	202720	367970				0			0	
PM-I		29	Peel en Maasvallei	2867220	073447001 Steekmonster Tasbeek Kessel Schijffweg	13-07-16	202720	367970				0			0	
PM-I		37	Peel en Maasvallei	3667474	073449001 Steekmonster Tasbeek Kessel Schijffweg	08-09-16	202720	367970				0			0	
PM-J		21	Peel en Maasvallei	2068281	072989001 Steekmonster Groote Molenbeek Wanssum	20-05-16	203000	394300				0			0	
PM-J		32	Peel en Maasvallei	3167042	072992001 Steekmonster Groote Molenbeek Wanssum	04-08-16	203000	394300				0			0	
RL-A		38	Rivierenland	16-060571 03	Goudriaan-De Hoogt-surflas Slingeland	12-09-16	121206	433353				0			0	
RL-A		40	Rivierenland	16-062691 03	Goudriaan-De Hoogt-surflas Slingeland	26-09-16	121206	433353				0			0	
RL-B		38	Rivierenland	16-060523 01	Ameide-Reigersdreef-Aaksterveldse steegwetering	16-09-16	125424	439054				0			0	
RL-B		42	Rivierenland	16-066469 01	Amedie-Reigersdreef-Aaksterveldse steegwetering	12-10-16	125424	439054				0			0	
RL-C		40	Rivierenland	16-06262 01	Gemeente Aalberg, Midden gebied Pompveld-Kwelsloot	28-09-16	130575	419407				0			0	
RL-C		44	Rivierenland	16-06871401	Gemeente Aalberg, Midden gebied Pompveld-Kwelsloot	24-10-16	130575	419407				0			0	
RL-D		39	Rivierenland	16-061755 01	Brakel-Kooiweg-A-watergang	20-09-16	134675	424681				0			0	
RL-D		43	Rivierenland	16-067819 01	Brakel-Kooiweg-A-watergang	20-10-16	134675	424681				0			0	
RL-E	L	38	Rivierenland	16-06560 03	Kapel-Avezaath-Lingesteeg-In Den Boombaard	12-09-16	152350	432150				0	36.36		1	1
RL-E	L	40	Rivierenland	16-062680 03	Kapel-Avezaath-Lingesteeg-In Den Boongaard	26-09-16	152350	432150				0			0	
RL-F	N	39	Rivierenland	16-061767 01	Beneden-Leeuwen-Dalenstraat-B-watergang	21-09-16	163415	430688				0			0	
RL-F	N	43	Rivierenland	16-067831 01	Beneden-Leeuwen-Dalenstraat-B-watergang	20-10-16	163415	430688				0	36.8		1	1
RL-G		40	Rivierenland	16-062657 01	Kesteren-Hoge Dijkseweg-B-Watergang	27-09-16	165681	439310				0			0	
RL-G		44	Rivierenland	16-068747 01	Kesteren-Hoge Dijkseweg-B-Watergang	27-10-16	165681	439310				0			0	
RL-H		39	Rivierenland	16-06176001	Beek-Rijksstraatweg-Filosofenbeek	19-09-16	193199	426130				0			0	
RL-H		43	Rivierenland	16-067824 01	Beek-Rijksstraatweg-Filosofenbeek	18-10-16	193199	426130				0			0	
RO-A		16	Roer en Overmaas		Nederweert, Aa Kampersweg	14-04-16	182446	370298				0			0	
RO-B		16	Roer en Overmaas		Helden, Helenavaart	14-04-16	190374	375193				0			0	
RO-C		16	Roer en Overmaas		Montfort, Vlootbeek Reigersbroek	14-04-16	192111	349180				0			0	
RO-D		23	Roer en Overmaas		Venray, Afleidingskanaal	01-06-16	196381	396936				0			0	

locatie code	Fig. 2 en Tabel 1	week	Waterschap	Monsternummer	Omschrijving	Monsterdatum			Fop A			ISftu 2			scoring	
						RD-X	RD-Y		Cq	Cq	Cq	# pos	Cq	Cq	# pos	
RO-E		23	Roer en Overmaas		Venray, Witven	01-06-16	200098	392310				0			0	
RO-F		23	Roer en Overmaas		Geysteren, Oostrumschebeek	01-06-16	201150	396300				0			0	
RO-G		23	Roer en Overmaas		Horst, Kabroekscheek Horst	01-06-16	201500	386300				0			0	
RO-H	V	23	Roer en Overmaas		Kreitenberg, Grote Molenbeek	01-06-16	201500	388150				0	35.2		1	1
RO-I		23	Roer en Overmaas		Tienray, Diepeleng	01-06-16	202790	389558				0			0	
RO-J		23	Roer en Overmaas		Venlo, Zwartwater/Venkeelen	01-06-16	210799	379704				0			0	
SS-A		21	Scheldestromen	OW03	Sophiapolder	19-05-16	20473	370508				0			0	
SS-B		15	Scheldestromen	OW05	Moerspuise watergang, nabij grens	07-04-16	52703	360194				0			0	
SS-B		21	Scheldestromen	OW06	Moerspuise watergang, nabij grens	19-05-16	52703	360194				0			0	
SS-C		17	Scheldestromen	OW04	Tweede Dijk, Sint-Maartensdijk	20-04-16	62520	397410				0			0	
SS-C		20	Scheldestromen	OW05	Tweede Dijk, Sint-Maartensdijk	09-05-16	62520	397410				0			0	
SS-D		16	Scheldestromen	OW04	Westweg, Sint Annaland	13-04-16	63025	401047				0			0	
SS-D		20	Scheldestromen	OW05	Westweg, Sint Annaland	13-05-16	63025	401047				0			0	
SS-E	Q	15	Scheldestromen	OW03	Kruising watergang met Hogestraat	05-04-16	65227	367634				0			0	
SS-E	Q	20	Scheldestromen	OW04	Kruising watergang met Hogestraat	13-05-16	65227	367634				0	35.74		1	1
SS-F	P	16	Scheldestromen	OW01	Kruising watergang met Kruispoldersdijk voor stuw	12-04-16	67823	375899				0			0	
SS-F	P	23	Scheldestromen	OW02	Kruising watergang met Kruispoldersdijk voor stuw	02-06-16	67823	375899				0	37.22		1	1
SS-G		17	Scheldestromen	OW03	Gemaal Loohoek	20-04-16	67870	394150				0			0	
SS-G		20	Scheldestromen	OW04	Gemaal Loohoek	09-05-16	67870	394150				0			0	
SS-H		21	Scheldestromen	OW03	Het stinkgat	18-05-16	70503	401638				0			0	
SS-I	0	16	Scheldestromen	OW04	West van gemaal van haften	13-04-16	71252	401884				0			0	
SS-I	0	21	Scheldestromen	OW05	West van gemaal van haften	18-05-16	71252	401884	39.55			1	41.49		1	1
SS-J		16	Scheldestromen	OW04	Gemaal de Eendracht	13-04-16	73710	393640				0			0	
SS-J		19	Scheldestromen	OW05	Gemaal de Eendracht	04-05-16	73710	393640				0			0	
VS-A		26	Vechtstromen	1619070	Entergraven, Leijerweerdijk, Rectum	22-06-16	235188	481373				0			0	
VS-A		36	Vechtstromen	1627172	Entergraven, Leijerweerdijk, Rectum	30-08-16	235188	481373				0			0	
VS-A		43	Vechtstromen	1632500	Entergraven, Leijerweerdijk, Rectum	17-10-16	235188	481373				0			0	
VS-B		26	Vechtstromen	1619287	Dommerswijk, brug Nieuwe Krim	23-06-16	240458	520629				0			0	
VS-B		33	Vechtstromen	1624794	Dommerswijk, brug Nieuwe Krim	09-08-16	240458	520629				0			0	

locatie code	Fig. 2 en Tabel 1	week	Waterschap	Monsternummer	Omschrijving	Monsterdatum			Fop A			ISFlu 2			scoring	
						RD-X	RD-Y		Cq	Cq	Cq	Cq	Cq	Cq	# pos	# pos
VS-B		41	Vechtstromen	1631123	Dommerswijk, brug Nieuwe Krim	04-10-16	240458	520629							0	0
VS-E		26	Vechtstromen	1618882	Broekbeek, zijzandweg Broekbeekweg, Geesteren	21-06-16	244901	495049							0	0
VS-E		33	Vechtstromen	1624917	Broekbeek, zijzandweg Broekbeekweg, Geesteren	09-08-16	244901	495049							0	0
VS-E		44	Vechtstromen	1633810	Broekbeek, zijzandweg Broekbeekweg, Geesteren	27-10-16	244901	495049							0	0
VS-F		26	Vechtstromen	1619286	Loodiep, Benterdijk	23-06-16	246051	522870							0	0
VS-F		33	Vechtstromen	1624793	Loodiep, Benterdijk	09-08-16	246051	522870							0	0
VS-F		41	Vechtstromen	1631122	Loodiep, Benterdijk	04-10-16	246051	522870							0	0
VS-G		26	Vechtstromen	1619285	Schoonebeekerdiep, uitstroom kanaal	23-06-16	249099	519152							0	0
VS-G		33	Vechtstromen	1624792	Schoonebeekerdiep, uitstroom kanaal	09-08-16	249099	519152							0	0
VS-G		41	Vechtstromen	1631120	Schoonebeekerdiep, uitstroom kanaal	04-10-16	249099	519152							0	0
VS-H		26	Vechtstromen	1618892	Geelebeek, Kipbrug, Hoofdstraat, Lattrop	21-06-16	262746	495328							0	0
VS-H		34	Vechtstromen	1625694	Geelebeek, Kipbrug, Hoofdstraat, Lattrop	16-08-16	262746	495328							0	0
VS-H		44	Vechtstromen	1633568	Geelebeek, Kipbrug, Hoofdstraat, Lattrop	25-10-16	262746	495328							0	0
WN-A		17	Waternet	464289	wnwa000, IB	18-04-16	115799	469183							0	0
WN-A		25	Waternet	470002	wnwa000 Kromme Mijldrecht, Kromme Mijldrecht de Hoef, MB	14-06-16	115799	469183							0	0
WN-A		34	Waternet	476770	wnwa000 ow Kromme Mijldrecht, Kromme Mijldrecht de Hoef, 6,ML	18-08-16	115799	469183							0	0
WN-B		15	Waternet	463441	wosp000 ow Kruising Keizersgracht/Molenpad thv peperbus, MB, 8	05-04-16	120755	486720							0	0
WN-B		23	Waternet	468048	wosp000, MB	02-06-16	120755	486720							0	0
WN-B		32	Waternet	475605	wosp000 ow, Kruising Keizersgracht/molenpad thv peperbus, 8, MB	04-08-16	120755	486720							0	0
WN-C		18	Waternet	465046	wovh110, MB, 7	26-04-16	122030	473494							0	0
WN-C		26	Waternet	471624	wovh110 ow, Polder gr. Mijldrecht Hoge Kant stuw Westveen	23-06-16	122030	473494							0	0
WN-C		36	Waternet	477617	wovh110	30-08-16	122030	473494							0	0
WN-D		18	Waternet	465032	wouro00, MB, 8	26-04-16	122079	476219							0	0
WN-D		26	Waternet	471610	wou... ow, ML 1, Meentslagt rechts van gemaal	23-06-16	122079	476219							0	0
WN-D		36	Waternet	477602	wouro00	30-08-16	122079	476219							0	0
WN-E		15	Waternet	462853	wotw120 ow Amstel 500m n gemaal middel polder, MB 12	04-04-16	122120	480999							0	0
WN-E		23	Waternet	468157	wotw120, vuil, MB	03-06-16	122120	480999							0	0
WN-E		32	Waternet	475628	wotw120 ow, Amstel 500m n, gemaal middel polder, 12, MB	04-08-16	122120	480999							0	0
WN-F		18	Waternet	465248	woun040, MB	29-04-16	123644	477217							0	0
WN-F		25	Waternet	471339	woun040 ow, Gemaal Holendrecht en Bullewijker polder, Krooshek, 14	16-06-16	123644	477217							0	0
WN-F		35	Waternet	477211	woun040	22-08-16	123644	477217							0	0

Locatie code	Fig. 2 en Tabel 1	week	Waterschap	Monsternummer	Omschrijving	Monsterdatum	RD-X	RD-Y	Fop A			ISFtu 2			scoring	
									Cq	Cq	Cq	Cq	Cq	Cq	# pos	# pos
WN-G		16	Waternet	463857	wpwjooo ow Vecht, Vecht te Loenen, IB, 3	13-04-16	129964	468568							0	0
WN-G		24	Waternet	468931	wpwjooo ow, Vecht, Vecht te Loenen, 2, MB	10-06-16	129964	468568							0	0
WN-G		33	Waternet	476264	wpwjooo ow, Vecht, Vecht te Loenen, MB, 2	12-08-16	129964	468568							0	0
WN-H		18	Waternet	465000	wqxc010 ow Muijeveld en Polder Breukelen-Proosdij, zwempunt 5e plas de strook	26-04-16	132329	464537							0	0
WN-H		25	Waternet	470042	wqxc010 ow Muijeveld en Polder Breukelen-Proosdij, zwempunt 5e plas de strook	14-06-16	132329	464537							0	0
WN-H		33	Waternet	476004	wqxc010 ow Muijeveld en Polder Breukelen-Proosdij, zwempunt 5e plas de strook	09-08-16	132329	464537							0	0
WN-I		17	Waternet	464564	wrup010 ow s-Gravelandse vaart, loodijk 27, ML, 4	21-04-16	135811	476535							0	0
WN-I		26	Waternet	471260	wrup10 ow, 4, sGravelandse Vaart, Loodijk 27, MB	20-06-16	135811	476535							0	0
WN-I		34	Waternet	476786	wrup010	19-08-16	135811	476535							0	0
WRI-A		36	Wrij, Rijn, Ijsel	AHM16	Stadswater Arnhem, Vijver park Presikhaaf	30-08-16	193483	444464							0	0
WRI-B		36	Wrij, Rijn, Ijsel	ODR01	Oude Rijn Berghoofdseveerweg Pannerden Aerd	30-08-16	199671	435909							0	0
WRI-C		31	Wrij, Rijn, Ijsel	ZEWO1	Zevenaarse Wetering Boleemweg Zevenaer	26-07-16	201462	440812							0	0
WRI-D		33	Wrij, Rijn, Ijsel	BLY01	Breuly Breulylaan Zevenaer zwenwaterzone	08-08-16	202194	436492							0	0
WRI-E		39	Wrij, Rijn, Ijsel	EKS01	Erkamerlingschap Rijnstrangen Lobith	20-09-16	206555	433111							0	0
WRI-F		40	Wrij, Rijn, Ijsel	ODR00	Oude Rijn Eltenseweg Elten (grens)	01-10-16	207137	431722							0	0
WRI-G		30	Wrij, Rijn, Ijsel	BER03	Berkel Goorseweg Lochem	19-07-16	225843	464363							0	0
WRI-H		29	Wrij, Rijn, Ijsel	BAB01	Baakse Beek, Kunnertij Marienvelde	13-07-16	232143	448668							0	0
WRI-I		44	Wrij, Rijn, Ijsel	BZB00	Beurzerbeek, Masterveldweg/Dwaarsweg Meddo	24-10-16	249460	448345							0	0

BIJLAGE 4

SAMENVATTING VAN ENGELSTALIGE PUBLICATIE

Samenvatting van publicatie met gegevens over *F. tularensis* in Nederlands oppervlaktewater
Deze publicatie is gebaseerd op monsters uit meerdere projecten.

ENVIRONMENTAL SURVEILLANCE OF ZOONOTIC *FRANCISELLA TULARENSIS* IN THE NETHERLANDS

Ingmar Janse, Rozemarijn Q.J. van der Plaats, Ana Maria de Roda Husman, Mark W. J. van Passel.

Tularemia is an emerging zoonosis caused by the Gram-negative bacterium *Francisella tularensis*, which is able to infect a range of animal species and humans. Human infections occur through contact with animals, ingestion of food, insect bites or exposure to aerosols or water, and may lead to serious disease. *F. tularensis* may persist in aquatic reservoirs. In the Netherlands, no human tularemia cases were notified for over 60 years until in 2011 an endemic patient was diagnosed, followed by 17 cases in the 6 years since. The re-emergence of tularemia could be caused by changes in reservoirs or transmission routes.

We performed environmental surveillance of *F. tularensis* in surface waters in the Netherlands by using two approaches. Firstly, 339 samples were obtained from routine monitoring -not related to tularemia- at 127 locations that were visited between 1 and 8 times in 2015 and 2016. Secondly, sampling efforts were performed after reported tularemia cases (n=8) among hares or humans in the period 2013-2017. *F. tularensis* DNA was detected at 17% of randomly selected surface water locations from different parts of the country. At most of these positive locations, DNA was not detected at each time point and levels were very low, but at two locations contamination was clearly higher. From 7 out of the 8 investigated tularemia cases, *F. tularensis* DNA was detected in at least one surface water sample collected after the case. By using a protocol tailored for amplification of low amounts of environmental DNA, 10 gene targets were sequenced. Presence of *F. tularensis* subspecies *holarctica* was confirmed in 4 samples, and in 2 of these, clades B.12 and B.6 were identified.

This study shows that for tularemia, information regarding the spatial and temporal distribution of its causative agent could be derived from environmental surveillance of surface waters. Tracking a particular strain in the environment as source of infection is feasible and could be substantiated by genotyping, which was achieved in water samples with only low levels of *F. tularensis* present. These techniques allow the establishment of a link between tularemia cases and environmental samples without the need for cultivation.

Front. Cell. Infect. Microbiol. 8:140.
doi: 10.3389/fcimb.2018.00140