

RIVM rapport 330000011/2007

**De microbiologische kwaliteit van het
grachtenwater in Amsterdam**

F.M. Schets, J.H. van Wijnen¹⁾, H. Schoon²⁾,
R. Italiaander, H.H.J.L. van den Berg,
A.M. de Roda Husman

1) GGD Amsterdam, Medische Milieukunde, Postbus 2200, 1000 CE
Amsterdam

2) Omegam-Water, H.J.E. Wenckebachweg 120, 1096 AR Amsterdam

Contact:

F.M. Schets

Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie (LZO)

e-mail: ciska.schets@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van GGD Amsterdam.

Rapport in het kort

De microbiologische kwaliteit van het grachtenwater in Amsterdam

Het water in de Amsterdamse Prinsengracht en Herengracht en het water in de Amstel bij de Berlagebrug en het IJmeer bij de inlaat van het gemaal Zeeburg is verontreinigd met feces van mens of dier. Acht van twaalf onderzochte mogelijke ziekteverwekkers werden in het water aangetroffen. Het ging om *Campylobacter*, *Salmonella*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, rotavirus, enterovirus, reovirus en norovirus.

Microbiologische verontreiniging van het water in de Amsterdamse grachten kan optreden doordat afvalwater van woonboten in de grachten geloosd wordt, maar ook doordat al dan niet gezuiverd rioolwater rechtstreeks of via de Amstel in de grachten terecht komt. Wanneer mensen in aanraking komen met microbiologisch verontreinigd oppervlaktewater kunnen ze milde aandoeningen zoals maagdarmklachten, huidklachten en oor- en oogklachten oplopen, maar ook ernstigere aandoeningen zoals hepatitis.

Elk jaar komen vooral in de zomermaanden veel mensen, al dan niet vrijwillig, in het water van de Amsterdamse grachten terecht. Anderen, zoals professionele duikers, komen bij het uitoefenen van hun beroep in aanraking met het grachtenwater. De Amsterdamse grachten zijn niet als zwemlocatie aangewezen en daarom wordt de waterkwaliteit niet gecontroleerd.

Toetsing van de waterkwaliteit in de grachten aan de strenge normen voor indicatoren voor fecale verontreiniging uit de herziene Europese Zwemwaterrichtlijn die in 2006 in werking is getreden, liet zien dat het water niet voldeed aan de normen en daarom niet als zwemwater geschikt is. Het is niet uit te sluiten dat personen die aan dit water worden blootgesteld een gezondheidsrisico lopen.

Trefwoorden: waterkwaliteit, oppervlaktewater, zwemwaterrichtlijn, grachten

Abstract

The microbiological quality of the water in the Amsterdam canals

The water in the Amsterdam canals Prinsengracht and Herengracht as well as the river Amstel near the Berlagebrug and the IJmeer at the inlet of pumping engine Zeeburg is contaminated with faeces from human or animal origin. Eight of twelve possible pathogens studied were detected in the water; these are *Campylobacter*, *Salmonella*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, rotavirus, enterovirus, reovirus and norovirus

Microbiological contamination of the water in the Amsterdam canals can occur through discharge of wastewater from houseboats into the canals, but also through purified or non-purified sewage that enters the canal directly or via the Amstel. People exposed to microbiologically contaminated surface water may develop mild health complaints such as gastroenteritis, skin complaints, and ear and eye complaints, but also more severe conditions like hepatitis.

Every year, particularly during the summer, many people enter the Amsterdam canals, voluntarily or not. Others, like occupational divers, are exposed to the canal water while exercising their jobs. Since the Amsterdam canals are not official bathing sites, water quality is not tested.

Testing of the canal water quality for compliance with the stringent standard values for faecal indicators in the revised European Bathing Water Directive, which came into force in 2006, has demonstrated that water quality did not comply with the standards. The canal water was therefore considered unsuitable for swimming and health risks for persons exposed to these waters cannot be ruled out.

Key words: water quality, surface water, bathing water directive, canals

Inhoud

Samenvatting	7
1. Inleiding	9
2. Materiaal en methoden	11
2.1 Monsterlocaties en monsterneming	11
2.2 Bepaling van indicatoren voor fecale verontreiniging	12
2.3 Detectie van Cryptosporidium en Giardia met behulp van immunofluorescentie	12
2.4 Bepaling van somatische en F-specifieke bacteriofagen	14
2.5 Moleculaire detectie van virussen	14
2.6 Detectie van kweekbare entero- en reovirussen	17
2.7 Kwalitatieve bepaling van Campylobacter en Salmonella	18
2.8 Detectie van Escherichia coli O157 met behulp van real-time PCR	18
2.9 Europese zwemwaternormen	19
3. Resultaten	21
3.1 Grachtenwaterkwaliteit volgens de Europese wetgeving	21
3.2 Pathogene micro-organismen in grachtenwater	27
3.3 Slib	31
3.4 Neerslag	32
4. Discussie	33
4.1 Fecale verontreiniging	33
4.2 Zwemwaternormen	34
4.3 Pathogenen	34
4.4 Bronnen	36
4.5 Slib	37
5. Conclusies	39
Literatuur	43

Samenvatting

Microbiologische verontreiniging van het water in de Amsterdamse grachten kan optreden doordat afvalwater van woonboten, die veelal niet op de riolering zijn aangesloten, in de grachten geloosd wordt, maar ook doordat al dan niet gezuiverd rioolwater rechtstreeks of via de Amstel in de grachten terecht komt. Wanneer mensen worden blootgesteld aan microbiologisch verontreinigd oppervlaktewater kunnen ze aandoeningen zoals maagdarmklachten, huidklachten en oor- en oogklachten oplopen. Bovendien is het mogelijk dat ernstigere aandoeningen zoals hepatitis worden opgelopen wanneer het water besmet is met hepatitisvirussen.

Elk jaar, met name in de zomermaanden, komen veel mensen, al dan niet vrijwillig, in het water van de Amsterdamse grachten terecht. Anderen, zoals professionele duikers, worden bij het uitoefenen van hun beroep aan het grachtenwater blootgesteld. De Amsterdamse grachten zijn niet als zwemlocatie aangewezen en daarom wordt de waterkwaliteit niet gecontroleerd. Om meer inzicht te krijgen in de microbiologische kwaliteit van het grachtenwater en de invloed van de aanwezigheid van woonboten op deze kwaliteit, werden van juni 2003 tot juni 2004 monsters water genomen uit een gracht met woonboten (Prinsengracht), een gracht zonder woonboten (Herengracht), de Amstel en het IJmeer.

Bacteriële indicatoren voor fecale verontreiniging werden op alle locaties aangetoond. Op bemonsteringsdagen met veel neerslag werden zij op alle locaties in relatief hoge concentraties aangetroffen. Op deze dagen waren ook de concentraties van de onderzochte potentiële ziekteverwekkers hoog. Afspoeling van straatvuil, riooloverstorten en uitslag van polderwater tijdens en na regenval zijn mogelijke bronnen van verontreiniging.

In het water van de Herengracht, de Prinsengracht, de Amstel bij de Berlagebrug en het IJmeer bij de inlaat van het gemaal Zeeburg waren ziekteverwekkende micro-organismen aanwezig. Acht van twaalf onderzochte potentiële ziekteverwekkers zijn in het water aangetoond, met verschillende frequentie. Het ging om *Campylobacter*, *Salmonella*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, rotavirus, enterovirus, reovirus en norovirus. Voor de meeste ziekteverwekkers moet in vervolgonderzoek door typering worden vastgesteld of er in het water op deze locaties soorten aanwezig zijn die specifiek pathogeen zijn voor de mens en of de aangetroffen micro-organismen infectieus zijn. De geïsoleerde *Salmonella* stammen zijn getypeerd en bleken de voor de mens pathogene *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Newport en *Salmonella* Typhimurium faagtype 690 te zijn.

Hoewel pathogenen werden aangetroffen, bleek het water bij toetsing aan de eisen uit de Europese Zwemwaterrichtlijn uit 1976 op twee van de vier onderzochte locaties te voldoen aan de normen voor goede zwemwaterkwaliteit; in de Amstel en de Herengracht werden deze normen overschreden. Echter, toetsing aan de strengere normen uit de herziene Zwemwaterrichtlijn die in 2006 in werking is getreden, liet zien dat het water zelfs niet voldeed aan de normen voor aanvaardbare zwemwaterkwaliteit en daarom volgens deze

nieuwe normen niet als zwemwater geschikt is. Het is niet uit te sluiten dat personen die aan dit water worden blootgesteld een gezondheidsrisico lopen.

Astro-, hepatitis E-, rota-, entero- en norovirussen kunnen zowel van dierlijke als humane oorsprong zijn en de onderzochte wateren via rioolwateroverstorten, uitslag van polderwater of afspoeling van landoppervlakken bereikt hebben (De Roda Husman, 2001). Hepatitis A heeft alleen een humaan reservoir. Om vast te stellen in welke mate woonboten, riooloverstorten en afspoeling van oppervlakken de waterkwaliteit in de Amsterdamse grachten beïnvloeden is verder onderzoek nodig, waarbij frequenter wordt bemonsterd en ziekteverwekkers worden gekwantificeerd en getypeerd. *Campylobacter* en *Salmonella* kunnen zowel van humane oorsprong zijn als door vogels in het grachtenwater zijn gebracht. De toegepaste detectiemethoden voor rotavirussen en kweekbare enterovirussen detecteren de humane varianten van deze virussen, terwijl de gevonden reo- en norovirussen zowel van dierlijke als humane oorsprong kunnen zijn. Ook *Cryptosporidium* en *Giardia* kunnen van mens en van dier afkomstig zijn.

1. Inleiding

Microbiologische verontreiniging van water in de Amsterdamse grachten kan optreden door lozing van afvalwater door de vele niet op de riolering aangesloten woonboten die in de grachten aanwezig zijn, maar ook door riooloverstorten na zware regenval op verschillende plaatsen in de stad. Bovendien kan bij regenval hondenfeces van het straatoppervlak in de grachten spoelen. Ook kan vogelfeces rechtstreeks in het grachtenwater terecht komen. Daarnaast kan het effluent van rioolwaterzuiveringsinstallaties in de nabijheid van Amsterdam via de Amstel de grachten bereiken.

Als gevolg van blootstelling aan microbiologisch verontreinigd oppervlaktewater kunnen gezondheidsklachten zoals maagdarmklachten, huidklachten en oor- en oogklachten ontstaan (Gezondheidsraad, 2001; Schets en de Roda Husman, 2005). Bovendien is het mogelijk dat ernstigere aandoeningen zoals hepatitis worden opgelopen wanneer het water besmet is met hepatitisvirussen (Gezondheidsraad, 2001).

Elk jaar, met name in de zomermaanden, komen veel passanten, al dan niet vrijwillig, in het water van de Amsterdamse grachten terecht. Anderen, zoals professionele duikers, worden aan het grachtenwater blootgesteld wanneer zij hun beroep uitoefenen.

Op officieel bij de Europese Unie aangemelde zwemlocaties wordt de zwemwaterkwaliteit regelmatig gecontroleerd en dient deze te voldoen aan de eisen die in de Europese Zwemwaterrichtlijn worden gesteld (Anonymous, 1976; Anonymous, 2006). Hiertoe wordt de aanwezigheid van indicatorparameters voor fecale verontreiniging gemeten. In de Zwemwaterrichtlijn uit 1976 waren dat (thermotolerante) bacteriën van de coligroep en fecale streptococci, in de herziene Zwemwaterrichtlijn uit 2006 zijn dat *Escherichia coli* en intestinale enterococci. De Amsterdamse grachten zijn geen officiële zwemlocaties en daarom wordt de waterkwaliteit niet op regelmatige basis onderzocht. Wel worden, als een hygiënemaatregel, de Amsterdamse grachten regelmatig doorgespoeld met water uit het IJmeer dat via de grachten en de Amstel naar het IJ stroomt. In de zomer gebeurt dit vier keer per week in de nachten van maandag, dinsdag, donderdag en vrijdag; in de winter worden de grachten twee keer per week doorgespoeld, in de nachten van maandag en dinsdag.

De GGD Amsterdam vaccineerde tot voor enkele jaren personen die in de grachten terecht waren gekomen tegen hepatitis A. Omdat onder bewoners van woonboten in de Amsterdamse grachten nooit hepatitis A werd vastgesteld, werd het risico op hepatitis A via blootstelling aan grachtenwater klein geacht en werd afgezien van de hepatitis A-vaccinaties. Echter, de regelmatige niet-beroepsmatige blootstelling van veel mensen aan het grachtenwater en de onbekende microbiologische kwaliteit van het grachtenwater leidde bij de lokale autoriteiten tot vragen over de gezondheidsrisico's die deze mensen liepen. Bovendien konden vragen over de risico's voor de gezondheid van personen die beroepsmatig aan het grachtenwater werden blootgesteld, zoals reddingswerkers en duikers, niet goed worden beantwoord.

Om meer inzicht te krijgen in de microbiologische kwaliteit van het grachtenwater en de invloed van de aanwezigheid van woonboten op deze kwaliteit, werden van juni 2003 tot juni

2004 monsters water genomen uit een gracht met woonboten (Prinsengracht), een gracht zonder woonboten (Herengracht), de Amstel en het IJmeer. De monsters werden genomen op maandag, voor het spoelen van de grachten. Het water werd door Omegam-Water onderzocht op de aanwezigheid van de parameters voor fecale verontreiniging, zoals opgenomen in de Europese Zwemwaterrichtlijn uit 1976 (Anonymous, 1976) en de op dat moment nog in concept beschikbare herziene Europese Zwemwaterrichtlijn uit 2006 (Anonymous, 2006). Het water werd tevens door het Microbiologisch Laboratorium voor Gezondheidsbescherming (MGB; thans Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie (LZO)) van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) onderzocht op de aanwezigheid van pathogenen waarvan bekend is dat zij via water overgedragen kunnen worden, zoals *Campylobacter*, *Salmonella*, *Escherichia coli* O157, *Cryptosporidium*, *Giardia*, rotavirus, enterovirus, reovirus, norovirus, astrovirus, hepatitis A-virus en hepatitis E-virus.



Prinsengracht, Amsterdam

2. Materiaal en methoden

2.1 Monsterlocaties en monsterneming

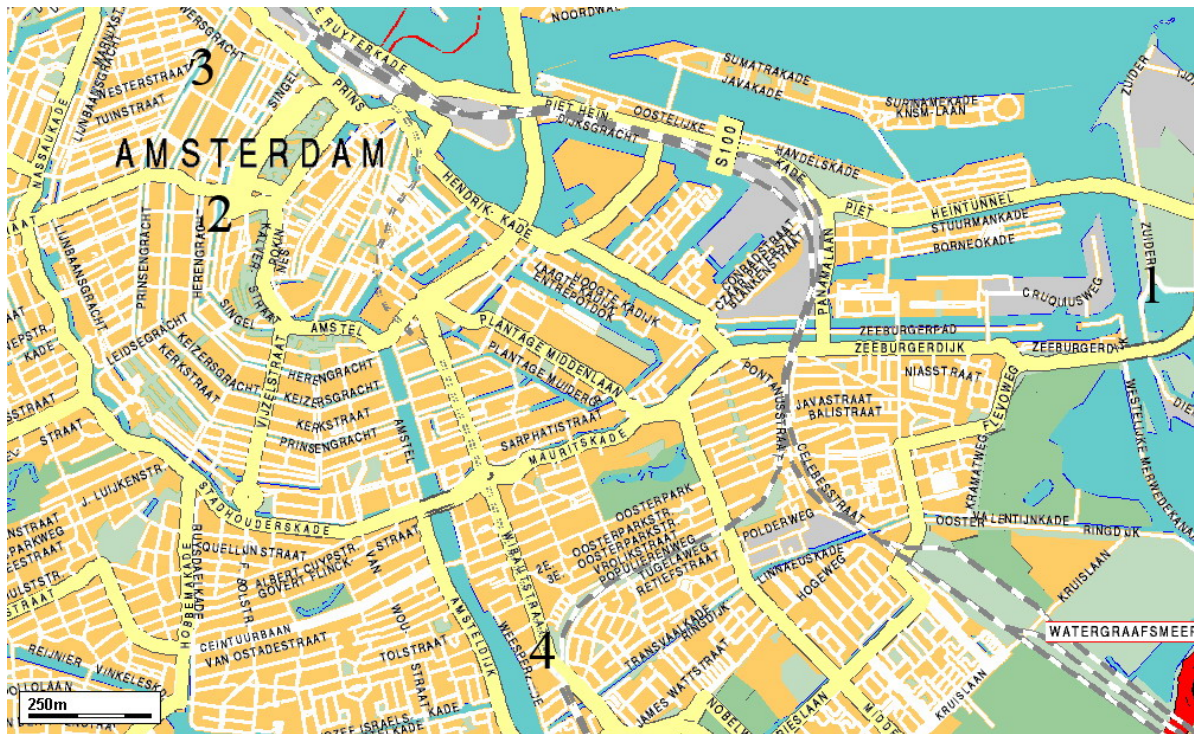
Van juni 2003 tot juni 2004 zijn op vier verschillende locaties in Amsterdam monsters water genomen (Tabel 1; Figuur 1). Op elke locatie zijn door Omegam-Water achtmaal monsters water genomen volgens NEN 6559 (Anonymous, 1992). Monsters voor analyses van fecale indicatorparameters werden gekoeld naar het laboratorium van Omegam-Water vervoerd, de monsters voor analyses van pathogenen werden bij omgevingstemperatuur naar het RIVM vervoerd. Op elke locatie werd gedurende de onderzoeksperiode vijfmaal een monster van het slib genomen. Het betrof op elke locatie per keer tien steekmonsters, die werden samengevoegd en gemengd, waarvan een deel in een glazen pot bij omgevingstemperatuur werd vervoerd naar het laboratorium van MGB. Alle analyses werden binnen 24 uur na monsterneming gestart.

Tabel 1 Monsterlocaties in Amsterdam

locatie	omschrijving
IJmeer	bij inlaat gemaal Zeeburg
Amstel	bij Berlagebrug, Weesperzijde tegenover nr. 123
Prinsengracht	met woonboten, bij Prinsenstraat
Herengracht	zonder woonboten, tegenover nr. 275 bij Romeinsarmsteeg



Herengracht, Amsterdam



Figuur 1 Monsterlocaties in Amsterdam: 1) IJmeer, 2) Herengracht, 3) Prinsengracht, 4) Amstel

2.2 Bepaling van indicatoren voor fecale verontreiniging

De bepaling van de fecale indicatoren volgens de Europese Zwemwaterrichtlijn uit 1976, thermotolerante bacteriën van de coligroep en fecale streptococci, werd uitgevoerd volgens, respectievelijk NEN 6570 (Anonymous, 1982) en NEN 6274 (Anonymous, 1995a). Bepaling van de fecale indicatoren volgens de herziene Europese Zwemwaterrichtlijn, *Escherichia coli* en intestinale enterococci, werd respectievelijk verricht volgens NEN-EN-ISO 9308 (Rapid Test) (Anonymous, 2000a) en NEN-EN-ISO 7899-2 (Anonymous, 2000b).

2.3 Detectie van *Cryptosporidium* en *Giardia* met behulp van immunofluorescentie

2.3.1 Concentratie van monsters water

Monster volumes van circa 20 liter zijn gefiltreerd door Envirochek HV filters (Pall Gelman, Ann Arbor, USA); de filtratiesnelheid bedroeg 2 l/min (Anonymous, 2004a). Het gefiltreerde materiaal is van de filters geëluëerd met 120 ml elutiebuffer (1 g Laureth-12, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0, 150 µl Antifoam A) door 5 min bij 600 rpm te schudden. Deze stap is herhaald met opnieuw 120 ml elutiebuffer. Het totale eluaat is geconcentreerd door

gedurende 10 min bij 1080x g te centrifugeren. Het supernatant is afgezogen en het volume van het pellet is bepaald. De helft van het pellet is verder opgewerkt zoals hieronder beschreven.

2.3.2 Zuivering van waterconcentraten

De waterconcentraten zijn gezuiverd met behulp van immunomagnetische separatie (IMS) (Anonymous, 2004a). Hierbij worden *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten omgeven door magnetische bolletjes die gelabeld zijn met antilichamen die tegen de celwand van de (oö)cysten gericht zijn. Er ontstaan complexen van magnetische bolletjes en (oö)cysten die met behulp van een magneet gescheiden kunnen worden van de rest van de in de suspensie aanwezige deeltjes. De (oö)cysten en de magnetische bolletjes worden weer van elkaar gescheiden door toevoeging van zuur, de (oö)cysten worden zo in gezuiverde vorm verkregen. Er is gebruik gemaakt van Dynabeads GC-Combo (DynaL, Oslo, Noorwegen). Aan 0,5 ml concentraat is 1 ml 10x SL buffer A en 1 ml 10x SL buffer B toegevoegd. Het volume is tot 10 ml aangevuld met gedestilleerd water. Er zijn 100 µl geresuspendeerde Dynabeads anti-*Cryptosporidium* en 100 µl Dynabeads anti-*Giardia* toegevoegd. Gedurende 1 uur bij kamertemperatuur is geïncubeerd op een roterende mixer (25 rpm). Het gevormde complex van Dynabeads en (oö)cysten is afgevangen met behulp van een magneet (DynaL MPC-1). Het supernatant is afgezogen en het beads-(oö)cystencomplex is geresuspendeerd in 1 ml 1x SL buffer A. De beads zijn van de (oö)cysten los gemaakt door toevoeging van 50 µl 0,1 N HCl, waarna de beads met behulp van een magneet (DynaL MPC-M) zijn afgevangen. De gezuiverde (oö)cysten zijn op een DynaL Spot-On slide gebracht, gedroogd en gefixeerd door toevoeging van een druppel methanol.

2.3.3 Kleuring van (oö)cysten

Gezuiverde *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten zijn gekleurd met fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC) gelabelde monoklonale antilichamen gericht tegen de celwand van de (oö)cysten (Cellabs, *Cryptosporidium*/*Giardia* staining reagent, Brookvale, Australië). (Oö)cysten en monoklonale antilichamen werden gedurende 30-45 min bij 37 °C geïncubeerd. Na afloop van de incubatieperiode is één maal gewassen met PBS en werd 5 µl van een propidium jodide (PI) oplossing (1 mg/ml) toegevoegd. Dit werd 2 min bij kamertemperatuur geïncubeerd, waarna nogmaals met PBS werd gewassen. Vervolgens zijn de slides gedroogd, is DABCO-glycerol mounting medium aangebracht en zijn de slides afgelakt met blanke nagellak om uitdroging te voorkomen. De slides werden in het donker bij 2-8 °C bewaard en beoordeeld met behulp van een Zeiss Axioskop epifluorescentiemicroscoop. Preparaten zijn gescreend bij een vergroting van 250x, verdachte *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten werden ter bevestiging bij een vergroting van 1000x nader bekeken en indien mogelijk is gebruik gemaakt van Differentieel Interferentie Contrast (DIC) microscopie om de interne structuur te beoordelen.

2.4 Bepaling van somatische en F-specifieke bacteriofagen

Voor de detectie van bacteriofagen is een geschikte gastheerbacterie gemengd met een gesmolten voedingsbodem en een bepaalde hoeveelheid monster. Dit geheel is over een vaste voedingsbodem in een petrischaal gegoten en overnacht geïncubeerd bij 37 °C. Geïnfekteerde bacteriën worden gelyseerd, waardoor bacteriofagen vrijkomen die nabijgelegen bacteriën infecteren. Op deze manier ontstaan groepjes dode bacteriën, die zichtbaar zijn als gaten in het bacteriedek, de zogeheten plaques. Aan de hand van het getelde aantal plaques en het onderzochte volume is de hoeveelheid bacteriofagen in het oorspronkelijke watermonster berekend.

Voor detectie van somatische bacteriofagen is de gastheer *Escherichia coli* CN (WG5) gebruikt volgens ISO 10705-2 (Anonymous, 2000c) en werd 10 x 1 ml van het onverdunde en 5 x 1 ml van het 1/5 verdunde monster onderzocht. Voor F-specifieke bacteriofagen was de gebruikte gastheer een *Salmonella typhimurium*-mutant met lage pathogeniciteit (WG49). Van het onverdunde monster is 10 x 1 ml onderzocht volgens ISO 10705-1 (Anonymous, 1995b).

2.5 Moleculaire detectie van virussen

2.5.1 Concentratie van monsters water

Monstervolumes van circa 20 liter zijn geconcentreerd door middel van filtratie door een negatief geladen membraan. Vóór filtratie is $MgCl_2$ aan het watermonster toegevoegd zodat een eindconcentratie van 0,05M ontstond. De pH werd met zoutzuur verlaagd tot 3,8. De negatief geladen virusdeeltjes in het water vormen hierdoor positief geladen complexen. Door het watermonster vervolgens door een negatief geladen membraanfilter te pompen, worden de viruscomplexen geadsorbeerd aan het filter. Met een beefextractoplossing met een hoge pH (pH 9,0) werd het geadsorbeerde virus geëluëerd in een totaal volume van 600 ml. De pH werd geneutraliseerd met behulp van azijnzuur-acetaat buffer (pH 5,0). Hierdoor werden de gevormde magnesiumverbindingen in oplossing gebracht en disaggregeerden de virusdeeltjes. Vervolgens is een gemodificeerde twee-fasenscheiding toegepast (Pöyry *et al.*, 1988; Lodder *et al.*, 1999) die gebaseerd is op de selectieve verdeling van virussen tussen twee niet-mengbare fasen. Hiertoe werden aan het eluaat Dextraan T40, polyethyleenglycol (PEG) 6000, NaCl en fosfaatbuffer (pH 7,2) toegevoegd tot eindconcentraties van respectievelijk 1% (w/v), 10% (w/v), 0,2 M en 10 mM, waarna dit mengsel een uur bij 4 °C werd geschud. Vervolgens is het monster in een scheitrechter overnacht bewaard bij 4 °C, zodat de scheiding in twee fasen op kon treden. Het monster is geconcentreerd met behulp van spin-kolom-gel-chromatografie en centricon-ultrafiltratie (Rutjes en de Roda Husman, 2004).

2.5.2 RNA isolatie

Uit het verkregen ultrafiltraat is uiteindelijk het virale RNA geïsoleerd door middel van silica-extractie. Per 1 ml monster werd 0,56 g guanidiniumisothiocyanaat (GuSCN), 92,8 µl 1M Tris (pH 6,4) en 81,6 µl 1 M EDTA toegevoegd. Hierin werden de virusdeeltjes gelyseerd en kon het vrijgekomen virale RNA binden aan de silica. Na verschillende wasstappen met lysis buffer, ethanol en aceton is het RNA geëluëerd en gebruikt voor verdere analyses in diverse RT-PCR's (reverse transcriptase polymerase ketting reacties) (Boom *et al.*, 1990).

2.5.3 Semi-kwantitatieve RT-PCR

Bij een semi-kwantitatieve RT-PCR wordt een specifiek stuk DNA geamplificeerd tot een detecteerbare hoeveelheid. Het virale RNA-genoom moet na isolatie eerst worden omgezet in een DNA-kopie (cDNA). Hiervoor is het enzym reverse transcriptase (RT) nodig, dat vanaf een antisense primer een complementaire DNA-kopie van het RNA maakt. Het geïsoleerde RNA werd in tienvoudige stappen verdund tot 10^{-2} en in elke verdunning werd bepaald of virus RNA aangetoond kon worden.

2.5.4 Detectie van RT-PCR-producten

De verkregen PCR-producten zijn geanalyseerd door middel van agarosegel-electroforese. Hierbij worden nucleïnezuren gescheiden op grootte, waarbij de kleinste DNA-fragmenten het snelst door de gel bewegen en daarom gescheiden worden van de grotere producten die langzamer door de gel bewegen. De producten zijn zichtbaar gemaakt door kleuring met SYBR-gold. Door het DNA uit de gel over te brengen op een membraan, en het daarna te detecteren door te hybridiseren met specifieke probes die gelabeld zijn met een biotinegroep is voor elk virus een specifiekere detectie uitgevoerd. De gehybridiseerde probe is zichtbaar gemaakt door het filter te incuberen met peroxidase-geconjugeerde streptavidine, dat aan de gebiotinileerde probe bindt. Vervolgens is de peroxidase gelabelde probe geïncubeerd met een geschikt substraat, waardoor een detecteerbaar chemoluminescerend signaal ontstond.

2.5.5 Detectie van entero-, rota-, noro-, astro-, hepatitis A- en hepatitis E-virussen

De aanwezigheid van zowel enterovirussen, rotavirussen, norovirussen, astrovirussen als hepatitis A- en E-virussen is onderzocht met behulp van semi-kwantitatieve RT-PCR's zoals hierboven beschreven. Voor enterovirussen is gebruikgemaakt van de primers Entero1 en Entero2 (Tabel 2). Voor rotavirussen is de primer set VP6-3 en VP6-4 (Tabel 2) gebruikt. Voor de detectie van norovirus is gebruikgemaakt van het gemodificeerde primer paar JV12Y en JV13i (Tabel 2). Voor detectie van hepatitis A-virus is het primer paar HAV 240 en HAV 68 gebruikt, terwijl voor hepatitis E-virus het primer paar Orf2-S1 en Orf2-A1 werd gebruikt (Tabel 2). Voor astrovirussen zijn de primers A2 en A1 gebruikt (Tabel 2).

In Tabel 2 zijn tevens de probes vermeld die gebruikt zijn voor de specifieke detectie van de RT-PCR-producten van de verschillende virussen. Om zoveel mogelijk verschillende subtypes te detecteren werd voor de hybridisatie van norovirussen gebruikgemaakt van een hybridisatiemix met vier verschillende detectieprobes. In Tabel 2 zijn voor alle virussen de referenties opgenomen van het artikel waarin de PCR-condities die toegepast zijn voor analyse van de grachtenwatermonsters zijn beschreven.

Tabel 2 *Primers en probes gebruikt voor de moleculaire detectie van entero-, rota-, noro-, hepatitis A, -hepatitis E, en astrovirussen*

primers en probes	sequentie	referentie
<i>enterovirus</i>		
Entero 1	CCTCCGGCCCCTGAATG	Schwab <i>et al.</i> ,1995
Entero 2	ACCGGATGGCCAATCCAA	
Probe	TACTTTGGGTGTCCGTGTTTC	
<i>rotavirus</i>		
VP6-3	GCTTTAAAACGAAGTCTTCAAC	Villena <i>et al.</i> , 2003,
VP6-4	GGTAAATTACCAATTCCTCCAG	
Probe	CAAATGATAGTTACTATGAATGG	
<i>norovirus</i>		
JV12Y*,	ATACCACTATGATGCAGAYTA	Vennema <i>et al.</i> , 2002
JV13i§,	TCATCATCACCATAGAAIGAG	
Probe UK-3	GTCCCCTGACATCATAACAGGCT	
Probe JV-5	CTCACCAGAGGTTGTCCAAGC	
Probe GG-I*	ATGGAYGTTGGYGAYTATGT	
Probe GG-II*#	GAAYTCCATCRCCCAYTG	
<i>hepatitis A virus</i>		
HAV 240	GGAGAGCCCTGGAAGAAAGA	Bosch <i>et al.</i> , 2001
HAV 68	TCACCGCCGTTTGCCTAG	
Hep-A probe	TTAATTCCTGCAGGTTCAGG	
<i>hepatitis E virus</i>		
Orf2-S1	GACAGAATTRATTTTCGTCGGCTGG	Van der Poel <i>et al.</i> , 2001
Orf2-A1	CTTGTTTCRTGYTGGTTRTCATAATC	
Probe	GAGAATGCDGAGCAGGAYAAGGG	
<i>astrovirus</i>		
A2	GTAAGATTCCCAGATTGGTGC	Guix <i>et al.</i> , 2002
A1	CCTGCCCCGAGAACAACCAAGC	
AV-Probe	GAAGAAAGAGAAACAACC	

* Y = C of T, [§] I = Inosine, [#] R = A of G

2.6 Detectie van kweekbare entero- en reovirussen

Een deel van de concentraten van de monsters grachtenwater is onderzocht op de aanwezigheid van entero- en reovirussen die kweekbaar zijn op de nierepitheelcellijn 'Buffalo Green Monkey' (BGM) (Dahling en Wright, 1986). Voordat het concentraat van het monster op de cellen geënt werd, werd geïncubeerd met een mix van antibiotica om eventueel aanwezige bacteriën, gisten en schimmels te inactiveren. Deze mix bestond uit neomycine (10 mg/ml), penicilline (1675 units/mg), streptomycine (750 units/mg), kanamycine (748 µg/mg) en amphotericine B (250 µg/ml) en werd een uur bij kamertemperatuur met het concentraat geïncubeerd. Per monster zijn drie kweekflessen van 75 cm² geënt met een totaalvolume van 4,5 ml, wat bestond uit 3,3 g concentraat en 1,2 ml antibioticamix. De 4,5 ml is verdeeld over drie kweekflessen met BGM-cellen, die vier dagen voor de enting waren ingezaaid met 2×10^4 cellen per cm². Nadat het concentraat en de mix van antibiotica twee uur bij kamertemperatuur op de cellen hebben gestaan, is 25 ml overlaymedium van 0,9% agar in Earle Medium 199 medium met 10% foetaal bovineserum op de cellen gegoten. Hierna werden de flessen bij 37 °C geïncubeerd. Enterovirussen die zich na infectie van BGM-cellen hebben vermeerderd, hebben de BGM-cellen kapot gemaakt. De dode cellen zijn zichtbaar gemaakt door negen dagen na infectie de cellen te kleuren met 0,33 g/l neutraal rood in 15 ml gebufferde agar. Het neutraal rood wordt niet opgenomen door de dode cellen, zodat de plaatsen waar cellen gelyseerd zijn zichtbaar worden als lichte vlekken (plaques) in een rode achtergrond. Na een incubatie van tien dagen variëren de plaques in diameter van 1 tot circa 70 mm, plaques groter dan of gelijk aan 10 mm werden aangeduid als enterovirussen en plaques kleiner dan 10 mm als reovirussen. Aan de hand van het aantal virusplaques en het geanalyseerde volume is de hoeveelheid infectieuze virusdeeltjes in het monster berekend (Lodder en de Roda Husman, 2005).



IJmeer bij inlaat gemaal Zeeburg

2.7 Kwalitatieve bepaling van *Campylobacter* en *Salmonella*

2.7.1 *Campylobacter*

De aan- of afwezigheid van *Campylobacter* is onderzocht in monster volumes van 1 liter. Dit onderzoek is uitgevoerd volgens de in NEN 6269 (Anonymous, 1996) beschreven methode. Na membraanfiltratie van het monster werd het filter geïncubeerd in een selectief ophopingmedium (Preston medium), vervolgens werd een deel van deze ophopingcultuur uitgestreken op een selectief isolatiemedium (Karmali agar). Bij de aanwezigheid van karakteristieke kolonies is het koloniemateriaal microscopisch beoordeeld op de karakteristieke spiraalvormige morfologie en beweeglijkheid van *Campylobacter*.

2.7.2 *Salmonella*

De aan- of afwezigheid van *Salmonella* is onderzocht in monster volumes van 1 liter. Na membraanfiltratie van het monster is het filter gedurende 18 ± 2 uur bij 37 ± 1 °C geïncubeerd in gebufferd peptonwater. Hierna is 0,1 ml van de ophopingcultuur overgebracht in Rappaport Vassiliadis medium dat vervolgens is geïncubeerd bij 42 ± 1 °C. Na 24 uur en na 48 uur is een entoog van deze cultuur uitgestreken op Briljant Groen Agar. Deze platen werden gedurende 24 ± 2 uur geïncubeerd bij 37 ± 1 °C, waarna ze zijn beoordeeld op de aanwezigheid van ondoorzichtige roze kolonies. Indien deze kolonies aanwezig waren zijn per plaat 5 kolonies bevestigd door middel van enting in Ureum Agar met Triple-Sugar-Iron Agar en Lysine-decarboxylase medium. Indien deze testen na incubatie gedurende 24 ± 2 uur bij 37 ± 1 °C de voor *Salmonella* karakteristieke uitslagen gaven zijn de isolaten ter typering aangeboden aan het Laboratorium voor Infectieziekten Diagnostiek en Screening van het RIVM. Voor de samenstelling van alle gebruikte media wordt verwezen naar ISO 6579 (Anonymous, 2002).

2.8 Detectie van *Escherichia coli* O157 met behulp van real-time PCR

Per monster is een volume van ongeveer 500 ml gefiltreerd door een polycarbonaat membraanfilter met een poriegrootte van 0,4 µm. Vervolgens is met behulp van een DNeasy Tissue Kit (Qiagen Benelux BV, Venlo) DNA geëxtraheerd volgens de bijgeleverde gebruiksaanwijzing. Er is een real-time PCR uitgevoerd om het *rfbE* gen dat in *E. coli* O157 aanwezig is te detecteren gebruik makend van primer paar:

O157BF2: 5'-AAATATAAAGGTAAATATGTGGGAACATTTGG-3' en
O157BR2: 5'-GGCCTTTAAAATGTAAACAACGG-3'.

De reactiemix voor de real-time PCR bestond uit 2,5 µl geëxtraheerd DNA, 10 µl Platinum SYBR-green qPCR Supermix-UDG (Invitrogen, Breda), 0.5 µM reverse en forward primers en 50 µg/ml BSA. Het totale volume is op 20 µl gebracht met gedestilleerd water van PCR-kwaliteit. Met een LightCycler Real-time PCR-apparaat (Roche, Almere) is het volgende programma gedraaid: 2 min bij 50 °C, 2 min bij 95 °C en 45 cycli van 5 s bij 95 °C, 10 s bij 48 °C en 10 s bij 72 °C. De accumulatie van fluorescentie als gevolg van intercalatie van SYBR-green is gedurende de 72 °C stap gemeten. Om de specificiteit van de gevormde PCR-fragmenten te bevestigen is na de laatste amplificatiecyclus een smeltcurve-analyse uitgevoerd door te verhitten tot 95 °C, af te koelen tot 55 °C en vervolgens weer te verhitten tot 95 °C in stappen van 0,1 °C/1 s. De fluorescentie is continu gemeten (Schets *et al.*, 2005).

2.9 Europese zwemwaternormen

Hoewel het water wat in deze studie in Amsterdam werd onderzocht niet officieel is aangewezen als zwemwater, werd de waterkwaliteit getoetst aan de zwemwaternormen omdat veel mensen al dan niet vrijwillig in met name het grachtenwater terecht komen.

Zwemwater van goede microbiologische kwaliteit bevat volgens Zwemwaterrichtlijn 76/160/EEG (Anonymous, 1976) ten hoogste 10.000 bacteriën van de coligroep en 2000 thermotolerante bacteriën van de coligroep per 100 ml (Tabel 3). Voor goede zwemwaterkwaliteit moet 80 % van de waarnemingen op officiële zwemlocaties in een badseizoen aan de gestelde eisen voldoen. Er dient bovendien naar gestreefd te worden om te voldoen aan de eisen die gelden voor uitstekende zwemwaterkwaliteit. *Salmonella* mag niet aanwezig zijn in 1 liter water en enterovirussen mogen niet voorkomen in 10 liter.

In de herziene Zwemwaterrichtlijn 2006/7/EC (Anonymous, 2006) zijn nieuwe microbiologische parameters opgenomen, *E. coli* en intestinale enterococcen, die een betere indicatie voor fecale verontreiniging van humane en dierlijke oorsprong zijn en bovendien een betere koppeling met het optreden van gezondheidsklachten geven. In de herziene Zwemwaterrichtlijn wordt onderscheid gemaakt tussen binnenwateren en kust- en overgangswateren, waarvoor verschillende normen gelden (Tabel 4). Per beoordelingsperiode moeten 16 monsters per locatie in beschouwing genomen worden. Deze bestaan uit een waarneming voorafgaand aan het badseizoen en minimaal vier waarnemingen tijdens het badseizoen aangevuld met waarnemingen uit voorgaande badseizoenen. Wanneer de 95-percentielscore van de waarnemingen op een zwemlocatie voldoet aan de voorgestelde grenswaarden voor *E. coli* en intestinale enterococcen uit Tabel 3, is de kwaliteit van het zwemwater volgens de richtlijn 'goed'. Wordt voldaan aan de richtwaarden voor deze parameters (Tabel 3), dan is de kwaliteit van het zwemwater 'uitstekend'. Bovendien wordt een klasse 'aanvaardbaar' ingesteld waarin de 90-percentielscore van de onderzochte monsters op een locatie aan de eisen moet voldoen.

Tabel 3 Normen voor indicatoren voor fecale verontreiniging opgenomen in Europese Zwemwaternrichtlijn 76/160/EEG

parameter	streefwaarde kve*/ 100 ml	richtwaarde kve*/ 100 ml
totale coliformen	500	10.000
fecale coliformen	100	2000
fecale streptococcen	100	

* kolonievormende eenheid

Tabel 4 Normen voor indicatoren voor fecale verontreiniging opgenomen in de herziene Europese zwemwaternrichtlijn 2006/7/EC

watertype	parameter	uitstekende kwaliteit kve ^a /100 ml	goede kwaliteit kve ^a /100 ml	aanvaarbare kwaliteit kve ^a /100 ml
binnenwateren	<i>Escherichia coli</i>	500 ^b	1000 ^b	900 ^c
	intestinale enterococcen	200 ^b	400 ^b	330 ^c
kustwateren en overgangswateren	<i>Escherichia coli</i>	250 ^b	500 ^b	500 ^c
	intestinale enterococcen	100 ^b	200 ^b	185 ^c

a: kolonievormende eenheid

b: beoordeling op 95-percentiel

c: beoordeling op 90-percentiel

3. Resultaten

3.1 Grachtenwaterkwaliteit volgens de Europese wetgeving

3.1.1 Fecale indicatorparameters

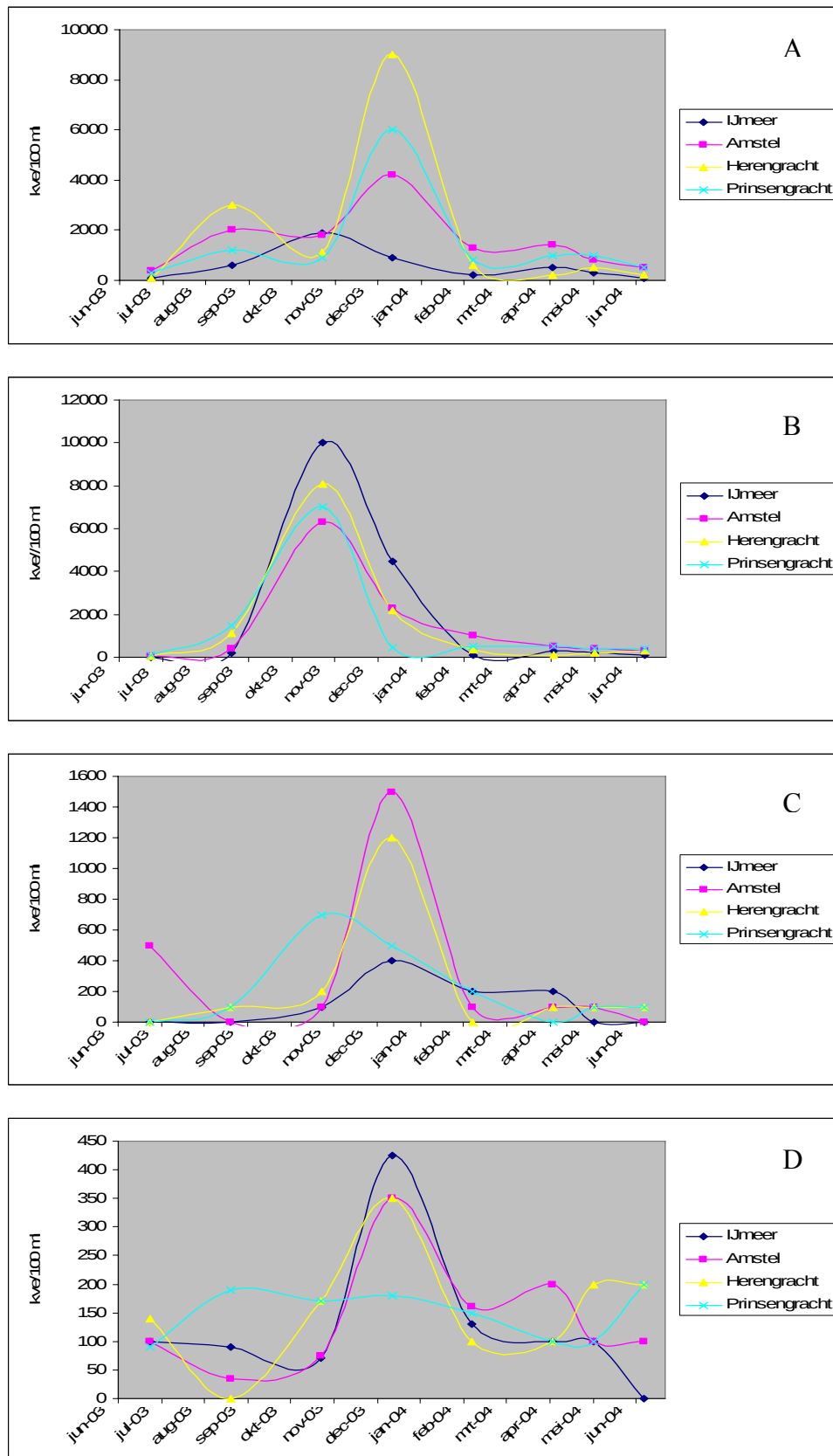
Om vast te stellen of het water in de Amsterdamse grachten voldeed aan de eisen die door de Europese Unie aan zwemwater worden gesteld, werd de aanwezigheid van de indicatoren voor fecale verontreiniging, thermotolerante bacteriën van de coligroep, *E. coli*, fecale streptococci en intestinale enterococci, onderzocht.

De fecale indicatorparameters thermotolerante bacteriën van de coligroep en *E. coli* werden in alle monsters op alle locaties aangetroffen (Tabel 5). De gemeten concentraties varieerden per locatie en gedurende het jaar. De concentraties thermotolerante bacteriën van de coligroep vertoonden een piek in de nazomer (eind augustus) en een hoge piek half december (Figuur 2A). De waarnemingen in het IJmeer volgden dit verloop niet en vertoonden eind oktober een piek. De concentraties *E. coli* vertoonden op alle locaties een duidelijke piek in het najaar (eind oktober), terwijl de concentraties op alle locaties, met uitzondering van de Prinsengracht, ook in december nog vrij hoog waren (Figuur 2B).

De indicatorparameters fecale streptococci en intestinale enterococci werden in een groot deel van de monsters op alle locaties gevonden (Tabel 5). De gemeten concentraties varieerden per locatie en gedurende het jaar en vertoonden een grilliger verloop dan de concentraties thermotolerante bacteriën van de coligroep en *E. coli*. Voor zowel fecale streptococci (Figuur 2C) als intestinale enterococci (Figuur 2D) was een piek in de concentratie waar te nemen in de winterperiode (december), op alle locaties met uitzondering van de Prinsengracht.



Bemonstering van de Amstel bij de Berlagebrug, Amsterdam



Figuur 2 *Thermotolerante bacteriën van de coligroep (A), Escherichia coli (B), fecale streptococci (C) en intestinale enterococci (D) in oppervlaktewater op verschillende locaties in Amsterdam, van juni 2003 tot juni 2004*

Tabel 5 *Fecale indicatorparameters thermotolerante bacteriën van de coligroep (thcol), fecale streptococci (fstrep), Escherichia coli en intestinale enterococci (int.ent.) in oppervlaktewater op verschillende locaties in Amsterdam*

locatie	datum	thcol (kve ^a /100 ml)	fstrep (kve/100 ml)	<i>E. coli</i> (kve/100 ml)	int. ent. (kve/100 ml)
IJmeer	30/06/03	100*	0*	8	100
	25/08/03	600*	0*	200	90
	27/10/03	1900*	100*	10000	70
	15/12/03	900*	400*	4500	425
	09/02/04	200*	200*	120	130
	05/04/04	500*	200*	300*	100*
	03/05/04	300*	0*	200*	100*
	07/06/04	100*	0*	100*	0*
Amstel	30/06/03	400*	500*	28	100
	25/08/03	2000*	0*	400	35
	27/10/03	1800*	100*	6300	75
	15/12/03	4200*	1500*	2300	350
	09/02/04	1300*	100*	1000	160
	05/04/04	1400*	100*	500*	200*
	03/05/04	800*	100*	400*	100*
	07/06/04	500*	0*	300*	100*
Herengracht	30/06/03	100*	0*	40	140
	25/08/03	3000*	100*	1100	0
	27/10/03	1100*	200*	8100	170
	15/12/03	9000*	1200*	2200	350
	09/02/04	600*	0*	375	100
	05/04/04	200*	100*	100*	100*
	03/05/04	500*	100*	200*	200*
	07/06/04	200*	100*	300*	200*
Prinsengracht	30/06/03	300*	0*	80	90
	25/08/03	1200*	100*	1500	190
	27/10/03	900*	700*	7000	170
	15/12/03	6000*	500*	450	180
	09/02/04	800*	200*	500	150
	05/04/04	1000*	0*	500*	100*
	03/05/04	1000*	100*	400*	100*
	07/06/04	500*	100*	400*	200*

a: kolonievormende eenheid

*: getallen berekend op basis van tellingen in volumes kleiner dan 100 ml

3.1.2 Toetsing waterkwaliteit aan Europese zwemwaternormen

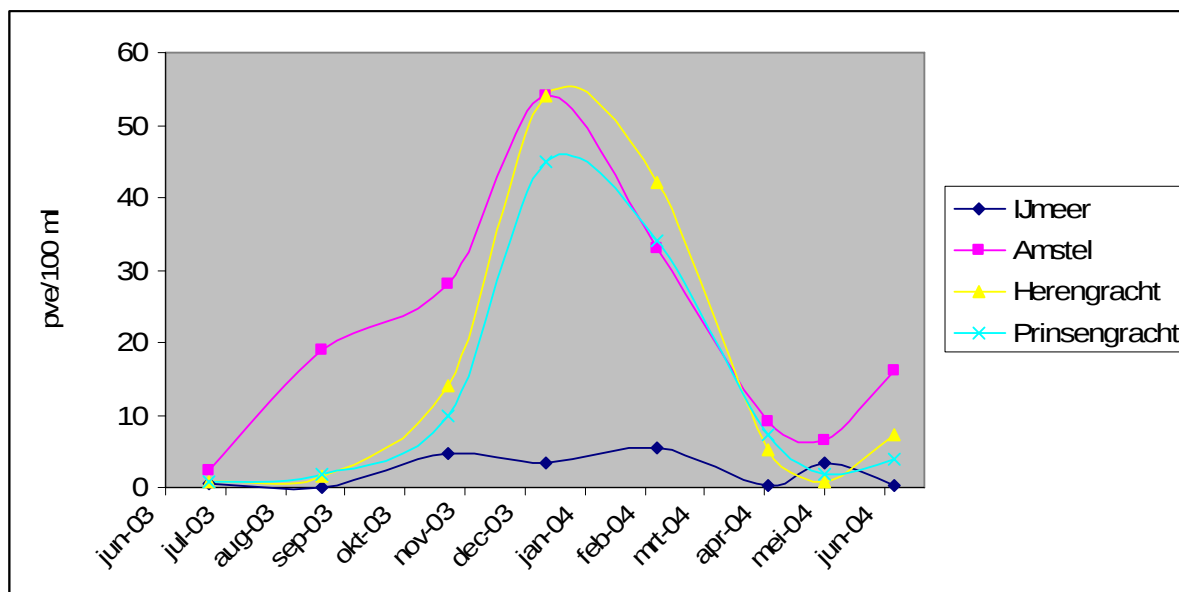
Voor toetsing van de waterkwaliteit aan de normen uit de Zwemwaterrichtlijn uit 1976 dienen 11 of 12 waarnemingen in beschouwing genomen te worden, terwijl dit er voor toetsing aan de normen uit de Zwemwaterrichtlijn uit 2006 16 dienen zijn. Hoewel in deze studie slechts acht waarnemingen per locatie zijn verkregen, is toch getoetst aan de Europese zwemwaternormen om een indicatie van de grachtenwaterkwaliteit te krijgen.

Toetsing van de waterkwaliteit op de onderzochte locaties in Amsterdam toonde aan dat op geen van de locaties aan de normen voor uitstekende zwemwaterkwaliteit volgens de Zwemwaterrichtlijn uit 1976 werd voldaan (Tabel 3; Tabel 5). Volgens deze richtlijn was het water op de onderzochte locaties in het IJmeer en de Prinsengracht van goede kwaliteit. In de Herengracht werd niet voldaan aan de eisen voor goede zwemwaterkwaliteit omdat de normen voor de fecale parameters in teveel monsters werden overschreden. Bovendien werden kweekbare enterovirussen en *Salmonella* aangetroffen. Ook het water uit de Amstel bevatte *Salmonella* en voldeed hiermee niet aan de normen.

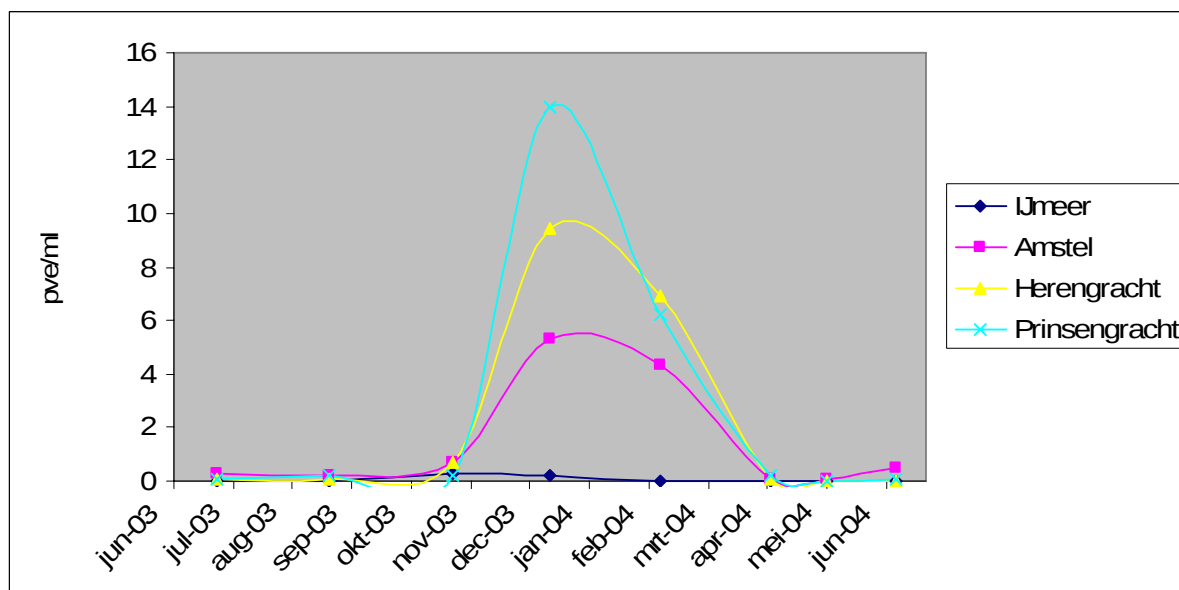
Toetsing van de in Amsterdam gevonden waarden voor *E. coli* en intestinale enterococci volgens de toetsingssysteematiek en aan de normen zoals aangegeven in de herziene Zwemwaterrichtlijn uit 2006 (Tabel 4) toonde aan dat de waterkwaliteit op geen van de locaties voldeed aan de norm voor aanvaardbare kwaliteit en daarmee dus als slecht geclassificeerd werd (Tabel 5).

3.1.3 Bacteriofagen

Met uitzondering van een monster uit het IJmeer, werden somatische colifagen in alle monsters op alle locaties aangetroffen (Tabel 6). De concentraties varieerden gedurende het jaar en per locatie, maar waren het laagst in het IJmeer. De hoogste concentraties somatische colifagen werden aangetroffen in de Amstel. Zowel in de Amstel, als in de Herengracht en de Prinsengracht werd een piek in de concentratie somatische fagen waargenomen op 15 december 2003 (Figuur 3). De gemeten concentraties F-specifieke fagen waren veel lager dan de concentraties somatische colifagen (Tabel 6; Figuur 4). Ook werden deze fagen in minder monsters aangetroffen, met name de monsters uit het IJmeer waren vaak (6 van 8 monsters) negatief. Met uitzondering van het IJmeer, werd op alle locaties een piek in de concentratie F-specifieke fagen waargenomen op 15 december 2003 (Figuur 4).



Figuur 3 Somatische colifagen in oppervlaktewater op verschillende locaties in Amsterdam, van juni 2003 tot juni 2004



Figuur 4 F-specifieke bacteriofagen in oppervlaktewater op verschillende locaties in Amsterdam, van juni 2003 tot juni 2004

Tabel 6 *F-specifieke bacteriofagen en somatische colifagen in oppervlaktewater op verschillende locaties in Amsterdam*

locatie	datum	F-specifieke fagen (pve^a/ ml)	somatische colifagen (pve/ ml)
IJmeer	30/06/03	< 0,1	0,4
	25/08/03	< 0,1	< 0,1
	27/10/03	0,3	4,7
	15/12/03	0,2	3,5
	09/02/04	< 0,1	5,4
	05/04/04	< 0,1	0,3
	03/05/04	< 0,1	3,3
	07/06/04	< 0,1	0,3
Amstel	30/06/03	0,3	2,3
	25/08/03	0,2	19
	27/10/03	0,7	28
	15/12/03	5,3	54
	09/02/04	4,3	33
	05/04/04	0,1	9,2
	03/05/04	0,1	6,4
	07/06/04	0,5	16
Herengracht	30/06/03	0,1	0,7
	25/08/03	0,1	1,5
	27/10/03	0,7	14
	15/12/03	9,4	54
	09/02/04	6,9	42
	05/04/04	0,1	5,2
	03/05/04	< 0,1	0,7
	07/06/04	< 0,1	7,4
Prinsengracht	30/06/03	0,1	0,9
	25/08/03	0,2	1,7
	27/10/03	0,2	10
	15/12/03	14	45
	09/02/04	6,2	34
	05/04/04	0,2	7,4
	03/05/04	<0,1	1,7
	07/06/04	0,1	3,8

a: plaquevormende eenheid

3.2 Pathogene micro-organismen in grachtenwater

3.2.1 Humaan pathogene virussen

Astrovirussen en hepatitis A- en E-virussen werden met moleculaire methoden in geen van de onderzochte monsters aangetroffen. RNA van rotavirussen, norovirussen en enterovirussen werd in een aantal monsters afkomstig van alle vier de monsterlocaties aangetroffen (Tabel 7). In de Amstel werd het vaakst RNA van verschillende virussen in één monster aangetoond.

Kweekbare enterovirussen werden slechts eenmaal in het water van de Herengracht aangetroffen in een concentratie van 3,2 plaquevormende deeltjes per liter. In alle overige monsters werden geen kweekbare enterovirussen gedetecteerd (Tabel 7). Kweekbare reovirussen werden niet in het water uit het IJmeer gevonden, maar wel in een aantal monsters afkomstig van de andere monsterlocaties. De monsters genomen op 15 december 2003 en 9 februari 2004 uit de Amstel, de Herengracht en de Prinsengracht bevatten kweekbare reovirussen, bovendien bevatte ook een monster genomen uit de Herengracht in juni 2004 kweekbare reovirussen.

3.2.2 Pathogene bacteriën en protozoa

Zowel in het water van de onderzochte grachten als in het water uit de Amstel en het IJmeer werden pathogene micro-organismen aangetroffen (Tabel 8). *Salmonella* werd tweemaal aangetoond in water uit de Amstel en eenmaal in water uit de Herengracht. Typering wees uit dat het hier om verschillende soorten ging: *Salmonella* Newport, *Salmonella* Virchow en *Salmonella* Typhimurium faagtype 690 (Tabel 8). In water uit het IJmeer en de Prinsengracht werd *Salmonella* niet aangetroffen. *Campylobacter* werd op alle monsterlocaties in het water aangetroffen, echter het vaakst in monsters uit de beide onderzochte grachten: op deze locaties waren zes van de zeven onderzochte monsters positief (Tabel 8). De pathogene bacterie *E. coli* O157 werd in geen van de monsters gedetecteerd. De parasiet *Cryptosporidium* werd op alle vier de onderzochte locaties aangetroffen, maar met verschillende frequentie. *Cryptosporidium* werd het minst frequent geïsoleerd uit water uit het IJmeer en het vaakst uit water uit de Prinsengracht (Tabel 8). De gemeten concentraties waren laag, meestal werden slechts enkele oöcysten per tien liter gedetecteerd. Met uitzondering van de Prinsengracht werd op alle locaties de hoogste concentratie gemeten op 15 december 2003 (Figuur 5). Op één monster uit het IJmeer na, werden in alle monsters van alle locaties *Giardia*-cysten aangetroffen (Tabel 8). De aantallen *Giardia*-cysten lagen hoger dan de aantallen *Cryptosporidium*-oöcysten en varieerden van enkele tot ruim 150 cysten per 10 liter (Figuur 6).

Tabel 7 *Aan- of afwezigheid (+ of -) van RNA van rota-, noro- en enterovirussen alsmede het aantal kweekbare reo- en enterovirussen in oppervlaktewater op verschillende locaties in Amsterdam*

locatie	datum	virussen gedetecteerd met PCR			virussen gedetecteerd met celkweek	
		rota-virus	noro-virus	entero-virus	reo-virus (pve ^a /l)	entero-virus (pve/l)
IJmeer	30/06/03	-	-	-	0	0
	25/08/03	-	-	+	0	0
	27/10/03	+	-	-	0	0
	15/12/03	+	-	+	0	0
	09/02/04	+	+	+	0	0
	05/04/04	-	-	+	0	0
	03/05/04	-	-	-	0	0
	07/06/04	-	-	-	0	0
Amstel	30/06/03	+	-	+	0	0
	25/08/03	-	-	+	0	0
	27/10/03	+	+	+	0	0
	15/12/03	+	+	+	36,7	0
	09/02/04	+	+	+	24,9	0
	05/04/04	+	-	+	0	0
	03/05/04	+	-	-	0	0
	07/06/04	+	+	+	0	0
Herengracht	30/06/03	+	-	-	0	0
	25/08/03	+	-	-	0	0
	27/10/03	+	-	-	0	3,2
	15/12/03	+	+	-	36,1	0
	09/02/04	+	+	+	42,3	0
	05/04/04	+	-	+	0	0
	03/05/04	+	-	-	0	0
	07/06/04	+	-	-	3,3	0
Prinsengracht	30/06/03	-	-	-	0	0
	25/08/03	+	-	-	0	0
	27/10/03	+	+	-	0	0
	15/12/03	+	+	-	18,8	0
	09/02/04	+	-	-	17,5	0
	05/04/04	-	-	+	0	0
	03/05/04	+	-	-	0	0
	07/06/04	-	-	+	0	0

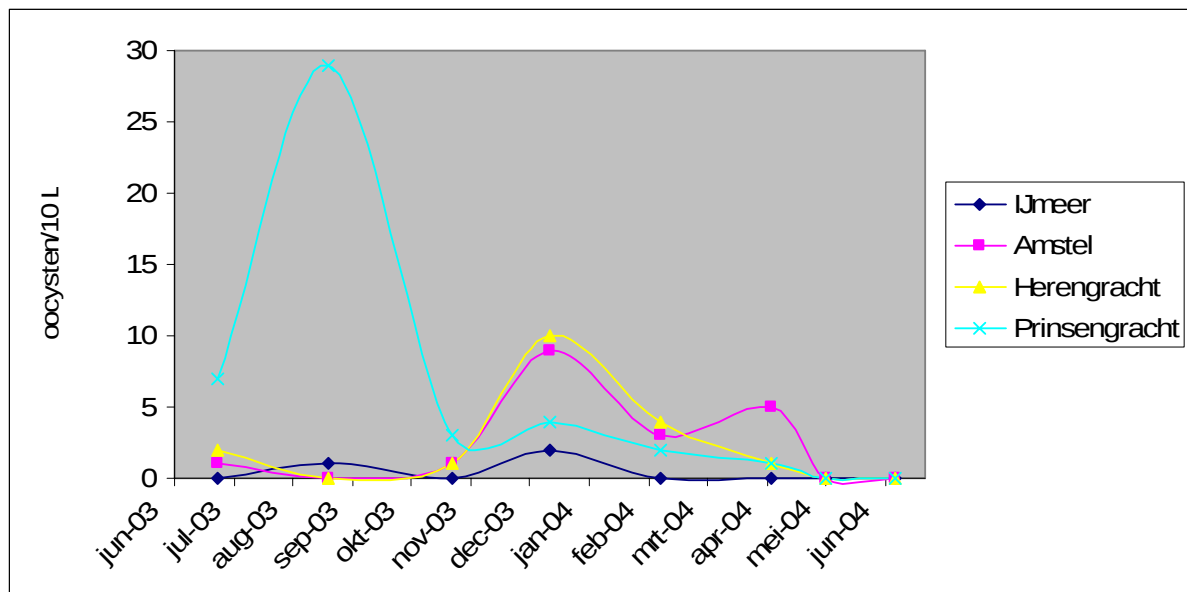
a: plaquevormende eenheid

Tabel 8 *Pathogene micro-organismen in oppervlaktewater op verschillende locaties in Amsterdam*

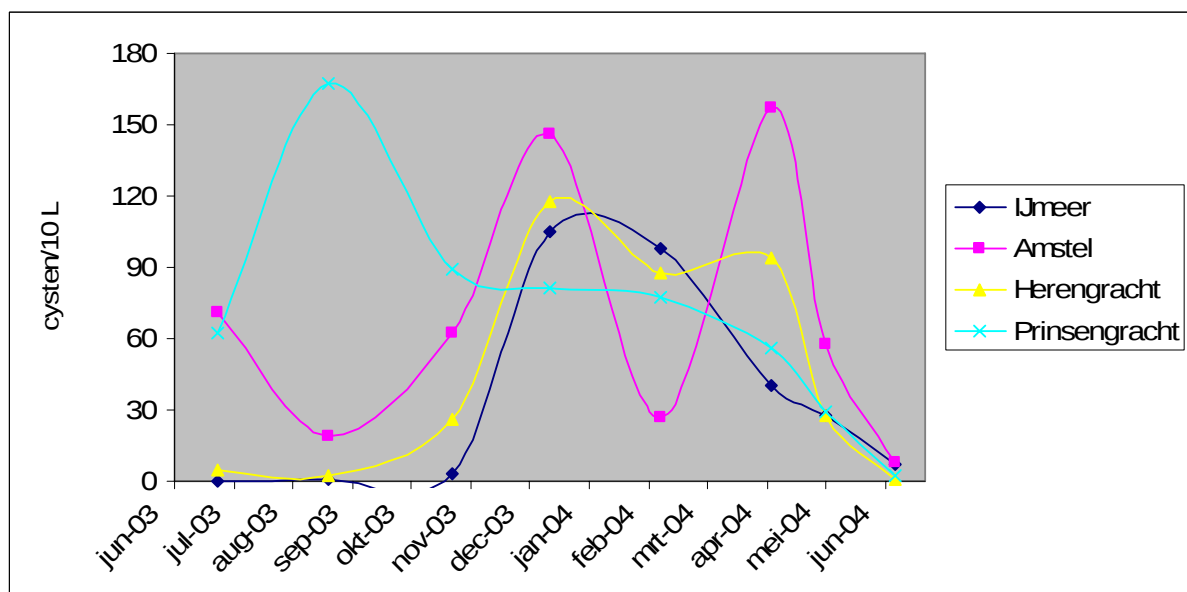
locatie	datum	<i>Salmonella</i>	<i>Campylobacter</i>	<i>Cryptosporidium</i> (oöcysten/10 l)	<i>Giardia</i> (cysten/10 l)
IJmeer	30/06/03	-	nt ^a	0	0
	25/08/03	-	- ^b	1	1
	27/10/03	-	-	0	3
	15/12/03	-	+ ^c	2	105
	09/02/04	-	-	0	98
	05/04/04	-	-	0	40
	03/05/04	-	+	0	28
	07/06/04	-	+	0	7
Amstel	30/06/03	-	nt	1	71
	25/08/03	-	-	0	19
	27/10/03	-	+	1	62
	15/12/03	+ ¹⁾	-	9	146
	09/02/04	+ ²⁾	-	3	27
	05/04/04	-	-	5	157
	03/05/04	-	+	0	58
	07/06/04	-	+	0	8
Herengracht	30/06/03	-	nt	2	5
	25/08/03	-	-	0	2
	27/10/03	-	+	1	26
	15/12/03	-	+	10	118
	09/02/04	+ ³⁾	+	4	88
	05/04/04	-	+	1	94
	03/05/04	-	+	0	28
	07/06/04	-	+	0	1
Prinsengracht	30/06/03	-	nt	6.8	62
	25/08/03	-	-	29	167
	27/10/03	-	+	3.1	89
	15/12/03	-	+	4	81
	09/02/04	-	+	2	77
	05/04/04	-	+	1	56
	03/05/04	-	+	0	29
	07/06/04	-	+	0	2

a: niet getest, b: afwezig, c: aanwezig

1): *Salmonella* Newport, 2): *Salmonella* Virchow, 3): *Salmonella* Typhimurium faagtype 690



Figuur 5 *Cryptosporidium* oöcysten in oppervlaktewater op verschillende locaties in Amsterdam, van juni 2003 tot juni 2004



Figuur 6 *Giardia* cysten in oppervlaktewater op verschillende locaties in Amsterdam, van juni 2003 tot juni 2004

3.3 Slib

Gedurende het project werd op de vier monsterlocaties vijf maal een monster slib genomen. In deze monsters werden de pathogene bacteriën *E. coli* O157, *Salmonella* en *Campylobacter* niet aangetroffen in de onderzochte hoeveelheid van één gram. In alle monsters werden F-specifieke fagen en somatische colifagen aangetoond (Tabel 9). De concentraties bacteriofagen waren per gram slib veel hoger dan per milliliter water. De fecale parameter thermotolerante bacteriën van de coligroep werd in de meeste onderzochte monsters aangetroffen, fecale streptococci daarentegen werden maar in enkele monsters gevonden (Tabel 9). Alleen de monsters slib die in augustus 2003 en februari 2004 werden genomen, werden onderzocht op de aanwezigheid van *Cryptosporidium*-oöcysten en *Giardia*-cysten. De meeste (oö)cysten werden aangetroffen in de monsters slib uit de Herengracht en de Prinsengracht (Tabel 9).

Tabel 9 F-specifieke fagen (Fspec.), somatische colifagen (som.), thermotolerante bacteriën van de coligroep (thcol), fecale streptococci (fstrep), Cryptosporidium en Giardia in slib op verschillende locaties in Amsterdam

locatie	datum	Fspec. (pve ^a /g)	som. (pve/g)	thcol (kve ^b /g)	fstrep (kve/g)	<i>Cryptosporidium</i> (oöcysten/g)	<i>Giardia</i> cysten/g
IJmeer	25/08/03	3,1	0,8	4	0	0	0
	23/02/04	45	29	1	0	0	0
	05/04/04	123	31	- ^c	-	-	-
	03/05/04	12	6,1	3	0	-	-
	07/06/04	17	9,3	30	4	-	-
Amstel	25/08/03	49	5,6	14	0	0	0
	23/02/04	79	23	56	6	0	1
	05/04/04	258	56	-	-	-	-
	03/05/04	596	42	12	1	-	-
	07/06/04	205	37	1	1	-	-
Herengracht	25/08/03	8,8	0,6	4	0	0	9,8
	23/02/04	109	26	27	2	2	1
	05/04/04	2401	31	-	-	-	-
	03/05/04	234	15	3	0	-	-
	07/06/04	114	16	3	5	-	-
Prinsengracht	25/08/03	3,8	3,1	4	0	4,2	49
	23/02/04	121	46	0	0	0	0
	05/04/04	267	252	-	-	-	-
	03/05/04	449	48	4	0	-	-
	07/06/04	84	6,9	13	6	-	-

a: plaquevormende eenheid, b: kolonievormende eenheid, c: niet getest

3.4 Neerslag

De hoeveelheid neerslag en de neerslagduur kan van invloed zijn op de microbiologische kwaliteit van oppervlaktewater. Daarom is de hoeveelheid neerslag die drie dagen voorafgaand aan en op de bemonsteringsdag viel via www.knmi.nl opgezocht en weergegeven in Tabel 10.

Tabel 10 *Neerslag gedurende het onderzoek bij meetstation Amsterdam Schiphol*

datum	neerslag (mm)		duur (h)	intensiteit (mm/h)
	bemonsteringsdag	totaal*	totaal*	totaal*
30/06/03	5,8	5,8	7,6	0,76
25/08/03	<0,05	1,4	1,7	0,82
27/10/03	0,0	10,7	7,9	1,35
15/12/03	2,3	25,5	18	1,42
09/02/04	1,6	21,4	18,1	1,18
05/04/04	4,3	10,1	11,3	0,89
03/05/04	0,4	0,4	0,6	0,67
07/06/04	0,0	3,7	5,8	0,63

*bemonsteringsdag en 3 voorafgaande dagen



Bemonstering van de Prinsengracht

4. Discussie

Inventarisatie van de microbiologische kwaliteit van het water op vier locaties in Amsterdam heeft aangetoond dat zowel het water in de Herengracht zonder woonboten als het water in de Prinsengracht met woonboten, alsmede het water van de Amstel bij de Berlagebrug en het IJmeer bij de inlaat van het gemaal Zeeburg fecaal verontreinigd zijn. De indicatoren voor fecale verontreiniging, thermotolerante bacteriën van de coligroep, *E. coli*, fecale streptococci en intestinale enterococci, werden in de meeste monsters op alle locaties aangetroffen. Daarnaast werden micro-organismen die ziekte bij de mens zouden kunnen veroorzaken, zoals *Salmonella*, *Campylobacter*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, rotavirus, norovirus, enterovirus en reovirus, in verschillende monsters afkomstig van deze locaties aangetroffen.

4.1 Fecale verontreiniging

Fecale verontreiniging van oppervlaktewater kan op verschillende manieren optreden. Effluent van rioolwaterzuiveringsinstallaties kan het oppervlaktewater bereiken, fecaal materiaal kan direct in het water terechtkomen, bijvoorbeeld door rechtstreekse lozing van afvalwater van woonboten. Ook tijdens (zware) regenval kan fecaal materiaal van landoppervlakken afspoelen en kunnen riooloverstorten en uitslag van polderwater plaatsvinden. Van vrijwel alle gekwantificeerde parameters in deze studie werden de hoogste aantallen gemeten in monsters die werden genomen op dagen waarop veel neerslag viel of waar op de voorafgaande drie dagen veel neerslag viel. Hoewel het beeld niet voor alle locaties precies gelijk was, vertoonden de concentraties fecale parameters met name pieken op 15 december 2003. De neerslagintensiteit op deze en de drie voorafgaande dagen was de hoogste gedurende de hele studie. Voor een bijdrage aan een verhoogde fecale verontreiniging van het oppervlaktewater is niet alleen de hoeveelheid neerslag van belang, maar ook het tijdsbestek waarin de neerslag valt: de neerslagintensiteit. Indien veel neerslag geleidelijk over de dagen verspreid valt, zullen minder snel riooloverstorten plaatsvinden en zal minder vuil van onder andere landbouwgronden en straten afspoelen.

Voor de gedetecteerde pathogenen bestond ook een relatie met de neerslag op en voorafgaand aan de bemonsteringsdagen. Kweekbare reovirussen zijn alleen op de dagen met de meeste neerslag op drie van de vier locaties gevonden, op andere dagen werden ze niet aangetroffen. De concentraties bacteriofagen waren op alle locaties het hoogst op de dagen met de meeste neerslag. Ook werden de hoogste concentraties *Giardia*-cysten gemeten op de dagen met de meeste recente neerslag en werden *Cryptosporidium*-oöcysten alleen op alle onderzochte locaties aangetoond op de bemonsteringsdag met de meeste neerslag. Hoewel geen kwantificering van het aantal *Salmonella* werd uitgevoerd, werd dit micro-organisme ook alleen aangetoond op dagen met veel neerslag. *Campylobacter* kan zowel via afvalwater als door directe inbreng van vogelfeces in het water terecht komen. Voor *Campylobacter* bestond

geen duidelijke relatie met de hoeveelheid neerslag, wat erop zou kunnen duiden dat voor deze ziekteverwekker directe inbreng van vogelfeces mogelijk een belangrijkere rol speelt dan riooloverstorten of afspoeling van land. Op de bemonsteringsdagen zijn op alle locaties weinig watervogels (eenden en meeuwen) waargenomen, dit is echter een momentopname, op andere momenten kunnen meer vogels aanwezig zijn geweest.

In deze context dient voorts opgemerkt te worden dat eerder onderzoek van open zwemwater in Amsterdam heeft aangetoond dat de representativiteit van microbiologisch onderzoek van één monster water voor de microbiologische kwaliteit op de onderzochte locatie slechts gering is. Direct achterelkaar op dezelfde plaats genomen monsters kunnen sterk verschillende concentraties micro-organismen bevatten (Schoon *et al.*, 2005).

4.2 Zwemwaternormen

Bij toetsing van de waterkwaliteit op de onderzochte locaties aan de normen voor thermotolerante bacteriën van de coligroep en fecale streptococci uit Zwemwaterrichtlijn 76/160/EEG bleek de waterkwaliteit in IJmeer en Prinsengracht volgens deze normen goed te zijn. Echter, bij toetsing van de gevonden waarden voor *E. coli* en intestinale enterococci aan de strengere normen uit Zwemwaterrichtlijn 2006/07/EC bleek de kwaliteit van het water slecht. Dit werd hoofdzakelijk veroorzaakt door de hoge aantallen *E. coli* die in alle monsters werden gevonden. De aangetoonde aanwezigheid van pathogene micro-organismen in de onderzochte wateren ondersteunt de beoordeling van de zwemwaterkwaliteit volgens de herziene Zwemwaterrichtlijn als 'slecht'.

Bij blootstelling aan oppervlaktewater dat aan de normen uit de Zwemwaterrichtlijn uit 1976 voldoet, is de kans op het oplopen van gezondheidsklachten zoals gastro-enteritis 12 tot 15 %. Aanscherping van de normen en veranderde fecale indicator parameters in de herziene Europese Zwemwaterrichtlijn leiden er toe dat bij voldoen aan de nieuwe normen een risico op gezondheidsklachten van 8 tot 11 % bestaat. Op de onderzochte locaties, waar de waterkwaliteit niet aan de herziene normen voldoet en als 'slecht' wordt gekenmerkt, is het risico op gezondheidsklachten groter dan 8 tot 11 %.

4.3 Pathogenen

In dit onderzoek zijn de pathogene bacteriën *Campylobacter* en *Salmonella*, alsook de parasitaire protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia* aangetoond op een aantal van de onderzochte locaties in Amsterdam. Tevens werd RNA van rota-, noro- en enterovirussen aangetoond, terwijl hepatitis A-, hepatitis E- en astrovirussen niet werden aangetoond. De detectie van virussen met behulp van moleculaire methoden is kwalitatief, de aan- of afwezigheid van virus-RNA wordt vastgesteld. Deze methode geeft geen informatie over de aanwezigheid van infectieuze virusdeeltjes die in staat zijn ziekte te veroorzaken, maar wordt toegepast omdat er voor de meeste van de genoemde virussen (nog) geen celkweeksystemen zijn. Onderzoek van de monsters met behulp van celkweek heeft aangetoond dat kweekbare

reovirussen, die in staat waren *in vitro* gekweekte cellen te infecteren, op een aantal bemonsteringsdagen in het water van de Amstel, Herengracht en Prinsengracht aanwezig waren. Een Zweedse studie heeft aangetoond dat reovirussen, die vooral werden beschouwd als indicatoren voor virale verontreiniging ook ziekte kunnen veroorzaken. In deze case-studie ging het om het ernstige ziektebeeld meningitis (Johansson *et al.*, 1996). Kweekbare enterovirussen zijn slechts éénmaal, in het water van de Herengracht, aangetoond. Ook voor deze wateroverdraagbare virussen werd vastgesteld dat zij niet alleen een indicator voor virale verontreiniging zijn, maar ook hersenvliesontsteking bij de mens kunnen veroorzaken via recreatie in verontreinigd water (Hauri *et al.*, 2005)

Campylobacter, *Salmonella*, *Cryptosporidium* en *Giardia* veroorzaken gastro-enteritis bij de mens. Daarnaast kunnen *Campylobacter*-infecties ook resulteren in het Guillain-Barré syndroom, een ernstige neurologische aandoening (Havelaar, 2001) en kunnen *Cryptosporidium*-infecties bij mensen met een verzwakt immuunsysteem leiden tot levensbedreigende uitdroging (Arrowood, 1997). *Campylobacter* kan zowel via afvalwater als door directe inbreng van vogelfeces in het water terecht zijn gekomen. Uitspraken over de herkomst van de aangetroffen *Campylobacter* kunnen alleen gedaan worden wanneer de geïsoleerde stammen worden getypeerd. Voor *Campylobacter*, maar ook voor *Giardia* en *Cryptosporidium*, geldt dat het gezien de mogelijke fecale verontreinigingsbronnen aannemelijk is dat er zich ook voor de mens pathogene soorten in het water bevonden. Om hierover uitsluitsel te verkrijgen dienen isolaten getypeerd te worden.

Salmonella is in deze studie driemaal geïsoleerd, de isolaten zijn in dit geval wel getypeerd. In de Amstel zijn *Salmonella* Virchow en *Salmonella* Newport aangetroffen. *Salmonella* Virchow komt voornamelijk bij pluimvee voor en is ook in Nederlands pluimvee aangetoond (Bouwknegt *et al.*, 2003). Van *Salmonella* Newport zijn recentelijk multiresistente isolaten gevonden. Deze isolaten zijn ongevoelig voor de meest gangbare antibiotica. Zij vormen vooral een bedreiging van de gezondheid indien een *Salmonella*-infectie systemisch wordt en behandeling met antibiotica vereist (www.vet.orst.edu/extensn/Snewport.htm). In Nederland is nog geen toename van *Salmonella* Newport waargenomen (Anonymous, 2004b). In de Herengracht is *Salmonella* Typhimurium faagtype 690 aangetoond. *Salmonella* Typhimurium veroorzaakt eveneens ziekte bij de mens. *Salmonella* Typhimurium faagtype 690 wordt in Nederland bij vogels (onder andere duiven), maar ook bij de mens aangetroffen (W. van Pelt, RIVM, persoonlijke mededeling, 2005). Hoewel ook hier alleen kwalitatieve gegevens zijn verkregen, is met behulp van typering wel aangetoond dat humaan pathogene, mogelijk multiresistente, *Salmonella* aanwezig waren.

De pathogene bacterie *E. coli* O157 is op geen van de onderzochte locaties aangetroffen. Runderen zijn het voornaamste reservoir van *E. coli* O157 (Jones, 1999) en deze zijn niet in het stedelijke gebied aanwezig en naar verwachting in geringe mate in het gebied rond Amsterdam. Daardoor is het onwaarschijnlijk dat vanuit deze bron een besmetting van de onderzochte wateren heeft plaatsgevonden. Bij het onderzoek naar *E. coli* O157 en alle andere pathogenen dient echter wel aangetekend te worden dat in deze studie per locatie relatief weinig en relatief kleine monsters zijn onderzocht. Mogelijk zijn bepaalde micro-organismen in bepaalde monsters niet aangetoond omdat zij in een lagere concentratie

aanwezig waren dan die op basis van de onderzochte volumes en toegepaste methoden gedetecteerd kon worden. Dit geldt ook voor de afwezigheid van hepatitis A-virussen in de onderzochte monsters, die het beleid van de GGD om personen die in de Amsterdamse grachten zijn gevallen niet meer te vaccineren lijkt te ondersteunen.

4.4 Bronnen

Op basis van de verkregen resultaten is het niet mogelijk om vast te stellen welke bronnen verantwoordelijk zijn voor de fecale besmetting van het water op de onderzochte locaties in Amsterdam. *Campylobacter* en *Salmonella* kunnen zowel van humane oorsprong zijn als door vogels in het grachtenwater zijn gebracht. De toegepaste detectiemethoden voor rotavirussen en kweekbare enterovirussen detecteren de humane varianten van deze virussen, terwijl de gevonden reo- en norovirussen zowel van dierlijke als humane oorsprong kunnen zijn. Ook *Cryptosporidium* en *Giardia* kunnen van mens en van dier afkomstig zijn. Om inzicht te verkrijgen in de herkomst van pathogene micro-organismen is typering van isolaten noodzakelijk, terwijl inzicht in de mate van verontreiniging op verschillende locaties, mogelijk ten gevolge van verschillende verontreinigingsbronnen, kwantificering van pathogenen vereist.

Hoewel geen typeringen zijn uitgevoerd, zijn de protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia* in deze studie wel gekwantificeerd. Cysten van de parasiet *Giardia* zijn op alle locaties in vrijwel alle monsters aangetroffen, waarbij de concentraties het hoogst waren in de Prinsengracht en de Amstel. De concentraties in het IJmeer en de Herengracht waren meestal weinig tot veel lager. Dit zou er op kunnen duiden dat er in de Prinsengracht en de Amstel naast de genoemde bronnen van fecale verontreiniging, die alle vier de locaties beïnvloeden, nog andere bronnen van *Giardia* zijn. Misschien spelen directe lozingen door woonboten een rol. Op basis van de in deze studie verkregen resultaten kunnen daarover echter nog geen uitspraken worden gedaan. De aard van de fecale verontreinigingsbronnen suggereert dat er *Giardia*-cysten van humane herkomst, die ziekte bij andere mensen kunnen veroorzaken, in het water aanwezig zijn. Echter, typering van de geïsoleerde *Giardia* is nodig om aanvullende informatie over de herkomst van de cysten te verkrijgen en te kunnen vaststellen of het soorten betreft die inderdaad pathogeen zijn voor de mens. *Cryptosporidium* was in het IJmeer minder vaak en in lagere concentraties aantoonbaar dan in de andere drie locaties. Eenmaal is in de Amstel en de grachten een uitschieter gemeten, die samenviel met een hoge *Giardia*-concentratie. Op deze datum (25 augustus 2003) waren ook de aantallen *E. coli* in de grachten hoog. De hoeveelheid neerslag voorafgaand aan deze bemonsteringsdag was echter gering en biedt geen verklaring.

Maatregelen om verontreiniging door potentiële bronnen terug te dringen zouden kunnen bestaan uit het toepassen van extra zuivering op effluent van rioolwaterzuiveringsinstallaties, het aansluiten van woonboten op de riolering, het voorkomen van riooloverstorten door vergroten van de capaciteit van de riolen en rioolwaterzuiveringsinstallaties en het afkoppelen

van regenwaterriolen bij hevige regenval zodat straatvuil niet rechtstreeks op het oppervlaktewater geloosd wordt.

4.5 Slib

In 1 gram van het onderzochte slib afkomstig uit het IJmeer, de Amstel, de Heren- en de Prinsengracht zijn *E. coli* O157, *Salmonella* en *Campylobacter* niet aangetroffen. Hoewel het slib slechts twee maal is onderzocht op het voorkomen van *Giardia* en *Cryptosporidium*, geven de positieve resultaten een indicatie dat het slib in de grachten bij opwerveling, door bijvoorbeeld motoren van schepen, maar ook door het spuien van de grachten, een bron van herbesmetting van het water kan zijn. Oöcysten van *Cryptosporidium* en cysten van *Giardia* zakken uit naar het slib, kunnen daar overleven en bij opwerveling van het slib weer in het water terecht komen (Medema *et al.*, 1998).

Bacteriofagen zijn in alle monsters slib van alle locaties aangetroffen, ook op de dagen dat in de bijbehorende monsters water geen bacteriofagen zijn aangetroffen. Dit is eveneens een aanwijzing dat het slib een reservoir van micro-organismen kan zijn. Per gram slib zijn hogere aantallen bacteriofagen gevonden dan per milliliter water. Bovendien was het opvallend dat in het water van IJmeer, Amstel, Herengracht en Prinsengracht de concentraties somatische colifagen hoger waren dan de concentraties F-specifieke bacteriofagen, terwijl dit in het slib afkomstig van deze locaties precies andersom was: daarin zijn veel meer F-specifieke bacteriofagen dan somatische colifagen aangetoond. Dit zou kunnen duiden op een verschil in overleving tussen beide typen fagen. Om dit opvallende verschil te kunnen verklaren is nader onderzoek nodig.



Bemonstering van het IJmeer

5. Conclusies

Inventarisatie van de microbiologische kwaliteit van oppervlaktewater op verschillende locaties in Amsterdam heeft aangetoond dat zich pathogene micro-organismen in het water van de Herengracht, de Prinsengracht, de Amstel en het IJmeer bevinden. Acht van twaalf onderzochte potentiële ziekteverwekkers zijn met verschillende frequenties in het water aangetoond, het betrof *Campylobacter*, *Salmonella*, *Cryptosporidium*, *Giardia*, rotavirus, enterovirus, reovirus en norovirus, die een range aan klachten van mild tot zeer ernstig kunnen veroorzaken

Toetsing aan de eisen uit de Europese Zwemwaternrichtlijn uit 1976 toonde aan dat het water op twee van de vier de onderzochte locaties voldeed aan de normen voor goede zwemwaterkwaliteit. Echter, toetsing aan de strengere normen uit de herziene Zwemwaternrichtlijn uit 2006, die de volksgezondheid beter beschermen, liet zien dat het water op alle locaties zelfs niet voldeed aan de normen voor aanvaardbare zwemwaterkwaliteit en daarom niet als zwemwater geschikt is.

Om de mate waarin woonboten, riooloverstorten en afspoeling van oppervlakken tijdens en na (hevige) regenval de waterkwaliteit van het oppervlaktewater in Amsterdam beïnvloeden vast te stellen is aanvullend onderzoek nodig, waarbij met grotere frequentie op verschillende locaties wordt bemonsterd, pathogenen worden gekwantificeerd en geïsoleerde pathogenen worden getypeerd.

Personen die beroepsmatig aan het water op de onderzochte locaties worden blootgesteld, zoals duikers en reddingswerkers, dienen voor voldoende beschermende hulpmiddelen te zorgen om mogelijke infecties te voorkomen. Een duikerspak met duikershelm biedt hierbij meer bescherming dan een bandmasker of scuba-uitrusting (Schijven en de Roda Husman, 2005).

Bij gebruik van water uit de Herengracht en de Prinsengracht als spoelwater of schoonmaakwater dient rekening te worden gehouden met de aanwezigheid van ziekteverwekkende micro-organismen. Zo dient gebruik van dit water waarbij inhalatie van aerosol kan optreden te worden vermeden.

Op bemonsteringsdagen met veel neerslag werden op alle locaties relatief hoge concentraties fecale indicatoren aangetroffen. Ook de concentraties van andere onderzochte (potentiële) ziekteverwekkers waren op deze dagen hoog. Maatregelen om verontreiniging bij hevige regenval terug te dringen zouden kunnen bestaan uit het voorkomen van riooloverstorten door vergroten van de capaciteit van de riolen en rioolwaterzuiveringsinstallaties en het afkoppelen

van regenwaterriolen zodat straatvuil niet rechtstreeks op het oppervlaktewater geloosd wordt.

De voor de mens pathogene *Salmonella* Virchow, *Salmonella* Newport en *Salmonella* Typhimurium faagtype 690 werden geïsoleerd. Voor de overige ziekteverwekkers dient vastgesteld te worden of het om soorten gaat die pathogeen zijn voor de mens en of deze micro-organismen in infectieuze toestand in het water aanwezig zijn.

Dankwoord

De auteurs zijn dank verschuldigd aan Ria de Bruin en Sylvain Skraber voor het uitvoeren van bacteriofaaganalyses in water en slib en Willemijn Lodder en Saskia Rutjes voor assistentie bij de moleculaire detectie van virussen.



Amstel, Amsterdam

Literatuur

- Anonymous. 1976. Richtlijn 76/160/EEG van de Raad van 8 december 1975 betreffende de kwaliteit van zwembwater, PB L 31 van 5.2.1976
- Anonymous. 1982. NEN 6750 Bacteriologisch onderzoek van oppervlaktewater - Kwantificeren van thermotolerante bacteriën van de coligroep met behulp van membraanfiltratie. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.
- Anonymous. 1992. NEN 6559 Bacteriologisch onderzoek van water – Monsterneming en conservering Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.
- Anonymous. 1995a. NEN 6274 Bacteriologisch onderzoek van water – Kwantificeren van fecale streptococci door membraanfiltratie. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.
- Anonymous. 1995b. ISO 10705-1 Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages – part 1 Enumeration of F- specific RNA bacteriophages. International Organization for Standardization, Geneva.
- Anonymous. 1996. NEN 6269 Bacteriologisch onderzoek van water – Onderzoek naar de aanwezigheid en/of het meest waarschijnlijke aantal van thermofiele *Campylobacter*-bacteriën. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.
- Anonymous. 2000a. NEN-EN-ISO 9308-1 Water – detectie en enumeratie van *Escherichia coli* en bacteriën van de coligroep – Deel 1: Methode met membraanfiltratie. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.
- Anonymous. 2000b. NEN-EN-ISO 7899-2 Water - Detectie en telling van enterococci - Deel 2: Membraanfiltratiemethode. Nederlands Normalisatie Instituut, Delft.
- Anonymous. 2000c. ISO 10705-2 Water quality – Detection and enumeration of bacteriophages – part 2 Enumeration of somatic coliphages. International Organization for Standardization, Geneva.
- Anonymous. 2002. ISO 6579 Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. International Organization for Standardization, Geneva.
- Anonymous. 2004a. ISO/DIS 15553 Water quality – Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water. International Organization for Standardization, Geneva.
- Anonymous. 2004b. Gesignaleerd. Infect Bull, 15 (09).
- Anonymous. 2006. Directive 2006/7/EC of the European Parliament and of the Council of 15 February 2006 concerning the management of bathing water quality and repealing Directive 76/160/EEC. Official Journal of the European Union L64: 37-51, 4.3.2006.
- Arrowood MJ. 1997. Diagnosis. In: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, ed. Fayer R. CRC press, Inc. Boca Raton, New York, London, Tokyo.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim van Dillen PM, Noordaa JSO van der. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. J Clin Microbiol, 28, 495-503.

- Bosch A, Sánchez G, Le Guyader F, Vanaclocha H, Haugarreau L, Pintó RM. 2001. Human enteric viruses in coquina clams associated with a large hepatitis A outbreak. *Wat Sci Techn*, 12, 61-66.
- Bouwknegt M, Dam-Deisz WDC, Schouten JM, Wannet WJB, van Pelt W, Visser G, van de Giessen AW. 2003. Surveillance of zoonotic bacteria in farm animals in the Netherlands. RIVM report 28589013. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.
- Dahling DR, Wright BA. 1986. Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environment. *Appl Environ Microbiol*, 51, 790-812.
- Gezondheidsraad. 2001. Microbiële risico's van zwemmen in de natuur. Publicatie nr. 2001/25. Gezondheidsraad, Den Haag.
- Guix S, Caballero S, Villena C, Bartolomé R, Latorre C, Rabella N, Simó M, Bosch A, Pintó RM. 2002. Molecular epidemiology of astrovirus infection in Barcelona, Spain. *J Clin Microbiol*, 40, 133-139.
- Hauri AM, Schimmelpfennig M, Walter-Domes M, Letz A, Diedrich S, Lopez-Pila J, Schreier E. 2005. An outbreak of viral meningitis associated with a public swimming pond. *Epidemiology and Infection*, 133 (2), 291-298.
- Havelaar AH. 2001. Campylobacteriose in Nederland. Risico's en interventiemogelijkheden. RIVM rapport 250911001. Rijksintituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.
- Johansson PJ, Sveger T, Ahlfors K, Ekstrand J, Svensson L. 1996. Reovirus type 1 associated with meningitis. *Scand J Infect Dis*, 28 (2), 117-120.
- Jones DL. 1999. Potential health risks associated with the persistence of *Escherichia coli* O157 in agricultural environments. *Soil Use and Management*, 15, 76-83.
- Lodder WJ, Vinje J, Heide R van de, Roda Husman AM de, Leenen EJTM, Koopmans MPG. 1999. Molecular detection of Norwalk-like caliciviruses in sewage. *Appl Environ Microbiol*, 65, 5624-5627.
- Lodder WJ, Roda Husman AM de. 2005. Presence of norovirus and other enteric viruses in sewage and surface waters in the Netherlands. *Appl Environ Microbiol*, 71, 1453-1461.
- Medema GJ, Schets FM, Teunis PFM, Havelaar AH. 1998. Sedimentation of free and attached *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts. *Appl Environ Microbiol*, 64, 4460-4466.
- Poel WHM van der, Verschoor F, Heide R van der, Herrera MI, Vivo A, Kooreman M, Roda Husman AM de. 2001. Hepatitis E virus sequences in swine related to sequences in humans, the Netherlands. *Emerg Infect Dis*, 7, 970-976.
- Pöyry T, Stenvik M., Hovi T. 1988. Viruses in sewage waters during and after a poliomyelitis outbreak and subsequent nationwide oral poliovirus vaccination campaign in Finland. *Appl Environ Microbiol*, 54, 371-374.
- Roda Husman AM de. 2001. Humane virussen in H₂O. *H₂O*, 8, 18-20.
- Rutjes SA, Roda Husman AM de. 2004. Procedure voor virusdetectie in water ten behoeve van het Nederlandse Waterleidingbesluit 2001. RIVM rapport 330000007. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.

- Schets FM, Roda Husman AM de. 2005. Gezondheidsklachten in relatie tot recreatie in oppervlaktewater in de zomer van 2004. *Infect Bull*, 16, 372-377.
- Schets FM, During M, Italiaander R, Heijnen L, Rutjes SA, Zwaluw WK van der, Roda Husman AM de. 2005. *Escherichia coli* O157:H7 in drinking water from private water supplies in the Netherlands. *Water Res*, 39, 4485-4493.
- Schoon JNP, Weijers EP, van Wijnen JH. 2005. Onderzoek kwaliteit oppervlaktewater in Amsterdam waarin wordt gezwommen, november 2002 – oktober 2003. Omegam-Water en GG en GD Amsterdam.
- Schijven JF, de Roda Husman, AM. 2005. Schatting van de blootstelling van beroepsduikers aan micro-organismen in water. RIVM rapport 330000006. Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu, Bilthoven.
- Schwab KJ, de Leon R, Sobsey MD. 1995. Concentration and purification of beef extract mock eluted from water samples for the detection of Enteroviruses, Hepatitis A virus and Norwalk virus by reverse transcriptase-PCR. *Microbiology*, 61, 531-537.
- Vennema H, Bruin E de, Koopmans M. 2002. Rational optimization of generic primers used for Norwalk-like virus detection by reverse transcriptase polymerase chain reaction. *J Clin Virol*, 25, 233-235.
- Villena C, El-Senousy WM, Abad FX, Pinto RM, Bosch A. 2003. Group A rotavirus in sewage samples from Barcelona and Cairo: Emergence of unusual genotypes. *Appl Environ Microbiol*, 69, 3919-3923.