Een onderzoek naar de aanwezigheid van enterovirussen in Nederlands drinkwater

1. Inleiding

In Nederland wordt gemiddeld 40 % van de bevolking, in het westen oplopend tot 60 %, voorzien van drinkwater bereid uit oppervlaktewater dat tal van pathogene micro-organismen kan bevatten [10, 19]. Teneinde inzicht te verkrijgen in de risico's voor de volksgezondheid met betrekking tot de mogelijke aanwezigheid van deze micro-organismen in drinkwater, is het noodzakelijk het drinkwater hierop te onderzoeken [1, 2, 9, 22].



H. J. VAN KRANEN
Chemisch Biologische Hoofdafdeling Rijksinstituut voor Drinkwatervoorziening



H. J. KOOL
Chemisch Biologische Hoofdafdeling Rijksinstituut voor Drinkwatervoorziening

Dit onderzoek wordt ten aanzien van pathogene bacteriën uitgevoerd met behulp van zgn. indicatorbacteriën, namelijk de thermotolerante bacteriën van de coligroep. Deze bacteriën vormen een groep van voor de mens in het algemeen niet-pathogene darmbacteriën, met als gemeenschappelijk kenmerk lactosevergisting bij 44 °C. De afwezigheid van deze bacteriën in een volume drinkwater geeft aan dat het zeer onwaarschijnlijk is dat pathogene bacteriën in dit volume voorkomen. Het gebruik van deze groep van bacteriën als indicatororganismen voor virussen is echter ter discussie gesteld geworden toen uit diverse onderzoekingen bleek, dat enterovirussen met name met betrekking tot desinfectieprocessen aanzienlijk resistenter zijn dan deze indicatororganismen [7, 32, 34].
Uit recente overzichten blijkt bovendien dat in een aantal gevallen waarbij geen indicatorbacteriën konden worden aangetoond in het drinkwater wel (entero)-virussen werden geïsoleerd [3, 4, 5, 11, 26, 35].
Deze virussen, die via het water verspreid kunnen worden en infecties bij de mens veroorzaken, zijn voornamelijk typen die zich in het spijsverteringskanaal vermeerderen om vervolgens via de excreta in grote aantallen te worden uitgescheiden. Er zijn van deze voor de mens pathogene enteric virussen circa 100 verschillende typen bekend (Tabel I). Uit het totale scala van ziekteverschijnselen zijn met name poliomyelitis, hepatitis en gastroenteritis (diarree) het bekendst vanwege hun epidemisch karakter.

TABEL I - *Humane enteric virussen die in water kunnen voorkomen* [35].

Virusgroepen[a]	Aantal typen	Enkele ziekteverschijnselen
Enterovirussen		
Poliovirus	3	Paralysis, meningitis, koorts
Echovirus	34	Meningitis, diarree, huidexantheem, koorts, luchtweginfecties
Coxsackievirus A	24	Herpangina, luchtweginfecties, koorts, meningitis
Coxsackievirus B	6	Pleurodynie, meningitis, pericarditis, myocarditis, koorts
Nieuwe enterovirussen	4	Meningitis, exantheem met blaasjes (type 71), conjunctivitis (type 70)
Hepatitis A virus	1	Infectieuze hepatitis
Gastroenteritis virus (Norwalk type)	5	Diarree, braken, koorts
Rotavirus	?	Diarree en braken (vnl. bij kinderen)
Reovirus	3	Niet opgehelderd
Adenovirus	30	Luchtweginfecties, ooginfecties
Parvovirus	?	Onbekend

[a] Andere stabiele virussen die water kunnen contamineren zijn:
(1) SV40-achtige papovavirussen die in urine voorkomen. Het J.C. subtype is geassocieerd met progressieve leukoencephalopathie;
(2) Creutzfeldt-Jakob (C. J.) ziekte virus. Evenals scrapie virus is het C.J. virus resistent t.o.v. hitte en formaldehyde.

Bij het overzicht zoals weergegeven in tabel I dient men zich te realiseren dat slechts virussen van de groep der enterovirussen en enkele Reovirussen en Adenovirussen, met een per virustype variërende totaal efficiency van 5–95 %, met de beschikbare concentratie- en isolatiemethoden kunnen worden aangetoond [8, 12, 24, 33]. Een cruciale stap bij het aantonen van virussen is de isolatieprocedure met behulp van zgn. weefselkweektechnieken. Op basis van literatuur [31, 33] kan worden gesteld dat Poliovirus, Coxsackievirus B, Echovirus en wellicht Reovirus kunnen worden geïsoleerd uit concentraten indien met een continue cellijn, zoals bijv. de BGM cellijn, wordt gewerkt.
Hoewel er in Nederland geen aanwijzingen zijn dat drinkwater een belangrijke rol speelt bij de verspreiding van deze ziekten, is uit enkele onderzoekingen gebleken dat in Nederlands oppervlaktewater en in al dan niet gechloord afvalwater diverse typen enterovirussen in verschillende hoeveelheden kunnen worden aangetoond [15, 19] De concentratie in het oppervlaktewater is echter reeds van dien aard, nl. minder dan 1 virusdeeltje per ml, dat een concentratiestap noodzakelijk is om het aantal virussen per liter met een redelijke betrouwbaarheid te kunnen bepalen. Voor het bepalen van virussen in drinkwater, waarin tijdens de zuivering het aantal virussen nog aanzienlijker wordt gereduceerd [6, 15, 20, 24, 35] dienen om dezelfde redenen grote volumina (tot 500 l) te worden onderzocht.
Een ander belangrijk aspect is het minimum aantal virusdeeltjes dat bij de mens infectie kan veroorzaken, de zgn. minimale infectieuze dosis (MID). Een eenduidige waarde voor de diverse enterovirussen is tot op heden niet vastgesteld. Op basis van experimenten met verzwakt Polio vaccin virus is destijds geconcludeerd dat slechts enkele virusdeeltjes reeds tot infectie bij de mens in staat zouden zijn [13, 16, 30]. Recent onderzoek [27] omtrent dit onderwerp wijst echter in de richting dat de voor de mens infectieuze dosis in het algemeen een grootte-order hoger is, namelijk enkele tientallen virusdeeltjes.
Omdat slechts een beperkt volume, namelijk enkele milliliters water direct met behulp van weefselkweek op de aanwezigheid van virus kan worden onderzocht, en omdat gezien de verwachte virusconcentraties grote volumina water (100–500 l) moeten worden onderzocht is het noodzakelijk de aanwezige virussen te concentreren in een volume van enkele milliliters.
Daarom is in eerste instantie onderzoek verricht aan enkele concentratiemethoden die voor dit type onderzoek zijn beschreven [12, 14, 25, 29]. Vervolgens is de methode gekozen die in het drinkwateronderzoek is toegepast.

In samenwerking met het KIWA en in samenspraak met de Commissie Virologie van het KIWA werden een zestal waterleidingbedrijven geselecteerd die oppervlaktewater als ruwwater bron gebruiken. De selectie was behalve op bovengenoemd criterium gebaseerd op diverse typen van voorraadvorming en zuivering. Per bedrijf werden behalve het ruwe water een tweetal monsters drinkwater (af pompstation, in de distributie) van ieder maximaal 500 l onderzocht. In de periode oktober 1978 tot en met maart 1980 werd elk bedrijf door beide instituten ten minste achtmaal bemonsterd. Naast het virologisch onderzoek werd eveneens bacteriologisch onderzoek en een beperkt chemisch onderzoek uitgevoerd.

De resultaten van zowel de methodiek-ontwikkeling m.b.t. het concentreren van virussen als het virologisch en bacteriologisch zes-steden onderzoek worden in dit artikel weergegeven en besproken.

2. **Materiaal en methoden**

2.1. *Bacteriologisch onderzoek*

In alle monsters drinkwater en ruw water werden een zestal bacteriologische parameters bepaald te weten:

1. Thermotolerante bacteriën van de coligroep
2. Bacteriën van de coligroep
3. Faecale streptococcen
4. Sulfietreducerende Clostridia sporen
5. Koloniegetal 37 °C
6. Koloniegetal 22 °C.

De monsterneming is voor alle monsters uitgevoerd conform de Nederlandse Norm NEN 6559.
Voor de bepaling van bacteriën in drinkwater vermeld onder punt 1 t/m 4 werden in afwijking van standaardprocedures monstervolumina van 500 ml onderzocht. De gebruikte methoden zijn in detail weergegeven in RID mededeling 82-6 [20a].

2.2. *Fysisch-Chemisch onderzoek*

Ter plaatse werd bij het zes-stedenonderzoek van elk monster de pH en de temperatuur gemeten.
Indien desinfectie werd toegepast dan werd m.b.v. de DPD-methode zowel het vrij chloor als het totaal chloor bepaald.

2.3. *Virologisch onderzoek*

Voor het onderzoeken van de bereide concentraten op de aanwezigheid van virussen, alsmede voor het kwantificeren van diverse werkvirussen bij concentratie-experimenten is gebruik gemaakt van een continue cellijn afkomstig van de apenier van de zogeheten *B*uffalo *G*reen *M*onkey (BGM, Cercopithecus aethiops). Het kweken van deze cellijn alsmede het kwantificeren van virussen is uitgevoerd als eerder beschreven [20a]. Als werkvirussen bij alle experimenten werden Polio 1 vaccintype (Sabin) virus, Echo 7 virus en Coxsackie B3 virus gebruikt. Deze virussen werden verkregen van het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid (RIV), Afdeling Enterovirussen (dr. J. C. Kapsenberg) te Bilthoven. Op gebruikelijke wijze [21, 28] werden hiervan via de BGM cellijn regelmatige nieuwe stockoplossingen bereid. Deze stockoplossingen alsmede verdunningen en virusconcentraten werden bij – 80 °C bewaard.

2.3.2. Concentratietechniek voor enterovirussen in water

Voor het concentreren van virussen uit volumina van 10–500 l water werd een uit twee fasen opgebouwde adsorptie-elutietechniek toegepast zoals o.a. beschreven door Katzenelson [14].

2.3.2.1. Laboratoriumexperimenten

Bij het optimaliseren van de totale methodiek m.b.v. werkvirussen werd gebruik gemaakt van 20 l r.v.s. druktanks. Hierin werd leidingwater (DWL Den Haag) gebracht waaraan het werkvirus werd toegevoegd. Vervolgens werd het principe van de procedure als beschreven onder 2.3.2.2. gevolgd.
Bij een aantal experimenten is echter ook gebruik gemaakt van het 50 l mengvat van de virusconcentrator (zie 2.3.2.3.) om zowel de recovery-percentages alsmede de technische aspecten van de apparatuur te testen.

2.3.2.2. Veldonderzoek

De eerste fase bestond uit adsorptie van de aanwezige virussen aan een epoxyglasfiber-filter met een poriëngrootte van 8 μm (Balston, Grade C) bij pH = 3,5. Indien desinfectie met chloor en/of chloordioxide op het te onderzoeken water was toegepast, werd voorafgaand aan de filtratie, behalve zoutzuur, eveneens natriumthiosulfaat tot een concentratie van 0,01 M gedoseerd voor neutralisatie. Nadat het te onderzoeken volume water op deze wijze met een filtratiesnelheid van 8 l per minuut was gefiltreerd, werd het filter in de filterhouder gedurende 30 minuten geëlueerd met 500 ml steriele 3 % vleesextractoplossing (Lab. Lemco, Oxoid) met een pH = 9. Een intensief contact tussen filter en elutievloeistof werd verkregen door het rondpompen van de elutievloeistof.
Vervolgens werd het eluaat geneutraliseerd tot pH = 7,5 en gekoeld tot 4 °C. Al deze werkzaamheden werden ter plaatse van het monsterpunt verricht met de speciaal voor dit doel ontwikkelde virusconcentrator (zie 2.3.2.3.). Na vervoer van de verzamelde eluaten naar het laboratorium te Leidschendam werd elk eluaat als volgt verder opgewerkt.
De tweede fase, de zgn. organische flocculatiestap, werd uitgevoerd bij pH = 3,5 à 4,0 door toevoeging van 2 N HCl. De virussen adsorberen aan de gevormde vlokken.
Het ontstane neerslag werd vervolgens gedurende 10 min. afgecentrifugeerd bij 5000 r.p.m. (4 °C). Het sediment werd opgelost in 6 ml 0,15 M Na_2HPO_4-oplossing met een pH = 9. Deze oplossing werd bacterievrij gemaakt door filtratie over een 0,45 μm filter waarna 0,2 ml antibiotica-oplossing werd toegevoegd. Indien het concentraat niet direct werd onderzocht, werd het bewaard bij – 80 °C.

2.3.2.3. Virusconcentrator

Om monstervolumina van 100 – 500 l in behandeling te nemen is het om praktische redenen gewenst de eerste stap van het concentratieproces ter plaatse uit te voeren. I.v.m. een nauwkeurige pH-regeling en om plaatselijk extreem lage pH waarden te voorkomen is gekozen voor een systeem met mengvat met variabel volume van max. 50 l. Hiermede is het mogelijk om met flowsnelheden van circa 10 l/minuut te filtreren bij een pH = 3,5 ± 0,1. Het volume is variabel gemaakt om bij lagere flowsnelheden de verblijftijd gelijk te kunnen houden. De pH werd door middel van een PID regelaar (Metrohm) geregeld en geregistreerd. De flowsnelheid en het totale gefiltreerd volume werden geregistreerd door middel van een flowsensor c.q. batchcontroller van het fabrikaat Signet. De ontwikkeling en bouw van dit apparaat is in nauwe samenwerking met de firma Applikon te Schiedam en de heer E. Staakman van de Technische Hoofdafdeling van het RID tot stand gekomen.

2.3.3. Monstername en monsterlokaties

De zes geselecteerde hiernavolgende waterleidingbedrijven werden op drie verschillende lokaties bemonsterd voor virologisch, bacteriologisch en chemisch onderzoek:

1. Gemeentewaterleidingen Amsterdam (GWA)
2. Goudse Waterleiding Maatschappij (GWM)
3. Provinciaal Waterleidingbedrijf Noord-Holland (PWN)
4. Gemeentelijk Waterbedrijf Groningen (GWG)
5. Westlandse Drinkwater Maatschappij (WDM)
6. Drinkwaterleiding Rotterdam (DWL-R).

De bemonsteringspunten kunnen per bedrijf als volgt worden omschreven:

1: Ruwwater, niet of gedeeltelijk gezuiverd oppervlaktewater

2: Drinkwater na zuivering (indien mogelijk voor veiligheidsdesinfectie)

3: Drinkwater uit het distributiegebied.

In de periode oktober 1978 tot en met november 1979 werden alle hierboven aangegeven monsterpunten elk zevenmaal, gelijkmatig over de periode verdeeld, bemonsterd.
In het vijf maanden lopend onderzoek van november 1979 tot en met maart 1980

werden de drinkwaterlokaties nogmaals maximaal tweemaal per bedrijf bemonsterd. In totaal werden 100 monsters drinkwater (monstervolume maximaal 500 l) en 42 monsters ruwwater (monstervolume maximaal 100 l) onderzocht op de aanwezigheid van enterovirussen.
Als controle op de concentratieprocedure werd direct voorafgaand aan het eerste monster ter plaatse 50 liter gesteriliseerd Haags leidingwater op analoge wijze als de monsters (2.3.5.2.) behandeld. Het op deze wijze verkregen concentraat fungeerde als blanco bij de isolatiemethode.
Vervolgens werd altijd als eerste het distributiemonster behandeld, daarna het monster na zuivering en als laatste het monster ruw water. Na ieder monsterpunt werd de apparatuur m.b.v. chloor (Amochlor, 15 mg Cl_2/l) gedesinfecteerd.

3. **Resultaten**

3.1. *Evaluatie virusconcentratiemethode volgens Katzenelson [14]*

Om het rendement van deze concentratietechniek met betrekking tot het concentreren van enterovirussen in drinkwater na te gaan werden in een aantal experimenten verschillende typen enterovirussen (zie 2.3.) aan drinkwater toegevoegd en vervolgens teruggeconcentreerd (zie 2.3.2.3.). De resultaten van dit onderzoek zijn in tabel II weergegeven.

TABEL II - *Recovery van toegevoegde virussen in drinkwater m.b.v. concentratiemethode Katzenelson.*

Drinkwater volume (liter)	Toegevoegde hoeveelheid virus (pfu)	Virus type	% Recovery ± SD *	Aantal experimenten
10	25 – 60	Polio 1	71 ± 30	19
10	90	Echo 7	39 , 52	2
10	90	Coxsackie B3	43 ± 11	6
10	100	Echo 7 Coxsackie B3	69 , 73	2
55 **	100	Polio 1	84 ± 22	10

* standaard deviatie
** virusconcentrator experimenten

De resultaten in tabel II geven aan dat gemiddeld een goede recovery van het poliovirus 1 (76 %) met deze concentratietechniek wordt verkregen. Wat betreft het concentreren van het Echo 7 en het Coxsackie B3 virus lijkt het erop dat deze virustypen ieder voor zich minder efficiënt met deze techniek worden geconcentreerd.
In een viertal experimenten waarbij Poliovirus aan 55 l drinkwater werd toegevoegd werd, alvorens dit water te concentreren, 500 l Haags leidingwater over het filter geleid, om de invloed op de adsorptie van Poliovirus hiervan na te gaan. Bij deze experimenten werden t.o.v. de andere experimenten geen significante verschillen in recovery percentages waargenomen.

3.2. *Zes steden onderzoek*

3.2.1. Een overzicht van alle gemeten parameters in het ruwe water is per waterleidingbedrijf weergegeven in de tabellen 3 t/m 8.

Als schatting voor virusconcentraties is gewerkt met tabellen voor het Meest Waarschijnlijk Aantal (M.W.A.) zoals gebruikelijk in de microbiologie. Hierbij zijn de tabellen volgens De Man [23] gebruikt, met als illustratie voor het semi-kwantitatieve karakter van de methode enkele grenswaarden behorend bij het 95 % betrouwbaarheidsinterval

TABEL III - *Overzicht bacteriologie, virologie en chemie van het ruwe water (IJsselmeer) te Andijk.*

	VIROLOGIE		BACTERIOLOGIE					CHEMIE	
			Aantal micro-organismen per liter (1)						
Datum monster-name	Aantal M.W.A./ 100l(2)	Virustype	Bacteriën van de coligroep	Thermo-tolerante bacteriën van de coligroep	Faecale strepto-coccen	Sulfiet-reduce-rende Clostridia sporen	Vrij chloor mg/l	Temp. °C	pH
31-10-1978	19	Coxsackie B3	500	20	N.D.	N.D.		12	8,0
12-12-1978	<2		130	70	50	50		–	8,4
22- 2-1979	<1		110	20	N.D.	120		2	6,8
22- 5-1979	<1		1 x 10^3	40	N.D.	N.D.	n.v.t.	11,5	7,9
3- 7-1979	28	Echo 17	2,5 x 10^3	600	N.D.	N.D.		16,5	–
28- 8-1979	<3 (3)		1,4 x 10^3	200	30	N.D.		14	7,4
16-10-1979	<5		3 x 10^3	1 x 10^3	300	10		12	7,4

TABEL IV - *Overzicht bacteriologie, virologie en chemie van het ruwe water (Drentse Aa) te Groningen.*

	VIROLOGIE		BACTERIOLOGIE					CHEMIE	
			Aantal micro-organismen per liter (1)						
Datum monster-name	Aantal M.W.A./ 100l(2)	Virustype	Bacteriën van de coligroep	Thermo-tolerante bacteriën van de coligroep	Faecale strepto-coccen	Sulfiet-reduce-rende Clostridia sporen	Vrij chloor mg/l	Temp. °C	pH
10-10-1978	<4		3,2 x 10^3	130	3,4	3		15	7,4
21-11-1978	<6		3,6 x 10^5	2,2 x 10^4	510	20		–	7,6
30- 1-1979	7	Polio 3	3,0 x 10^4	1,4 x 10^4	400	N.D.		1	6,8
27- 3-1979	62	N.T. (4)	1,9 x 10^4	9,9 x 10^3	900	1,1 x 10^3	n.v.t.	7,0	7,3
29- 5-1979	<5		3,8 x 10^4	6,6 x 10^4	3,6 x 10^3	5,4 x 10^3		17,5	7,1
24- 7-1979	6	Coxsackie B3	1,4 x 10^5	8 x 10^3	500	20		–	7,9
26- 9-1979	–		1,4 x 10^5	2,5 x 10^4	350	340		–	–

TABEL V - *Overzicht bacteriologie, virologie en chemie van het ruwe water (Heemraadswater) te Monster.*

	VIROLOGIE		BACTERIOLOGIE					CHEMIE	
			Aantal micro-organismen per liter (1)						
Datum monster-name	Aantal M.W.A./ 100l(2)	Virustype	Bacteriën van de coligroep	Thermo-tolerante bacteriën van de coligroep	Faecale strepto-coccen	Sulfiet-reduce-rende Clostridia sporen	Vrij chloor mg/l	Temp. °C	pH
3-10-1978	7	Coxsackie B3	80	80	27	–		12	7,8
14-11-1978	<1		1,2 x 10^5	1,5 x 10^4	670	410		8,5	8
20- 2-1979	<1		6,0 x 10^4	1,3 x 10^4	4 x 10^3	1,5 x 10^3		3	7,9
20- 3-1978	16	N.T. (4)	1,7 x 10^3	800	4,8	600		7,2	7,2
8- 5-1979	<8		6,5 x 10^3	1 x 10^4	450	2,5 x 10^3	n.v.t.	12	7
17- 7-1979	<2		1,8 x 10^4	5 x 10^2	2,8 x 10^3	200		17	–
18- 9-1978	7	Coxsackie B4	1,2 x 10^4	2 x 10^4	2,2 x 10^3	140		16	8,1

N.D. = niet detecteerbaar in onderzocht volume (2) = 20 – 100 l water onderzocht
(1) = 25 – 100 ml water onderzocht (4) = niet getypeerd
– = niet bepaald

TABEL VI - *Overzicht bacteriologie, virologie en chemie van het ruwe water (Brabantse Biesbosch) te Rotterdam-Kralingen na het ontvangbekken.*

	VIROLOGIE		BACTERIOLOGIE					CHEMIE	
			Aantal micro-organismen per liter (1)						
Datum monster-name	Aantal M.W.A./ 100 l (2)	Virustype	Bacteriën van de coligroep	Thermo-tolerante bacteriën van de coligroep	Faecale strepto-coccen	Sulfiet-reduce-rende Clostridia sporen	Vrij chloor mg/l	Temp. °C	pH
19-10-1978	< 2		1 x 10^3	130	10	20		12,0	8,4
28-11-1978	< 2		330	188	92	12		3,5	8.4
7- 2-1979	< 3		410	180	180	350		3,5	8,4
3- 4-1979	< 3		350	240	100	300		7,0	7.8
7- 6-1979	< 1		80	200	20	40	< 0,1	–	9
7- 8-1979	< 2		500	50	60	N.D.		–	7,5
2-10-1979	< 1		1,6 x 10^3	1,1 x 10^3	170	105		16,5	9

N.D. = niet detecteerbaar in onderzocht volume – = niet bepaald
(1) = 100 – 200 ml water onderzocht (2) = 50 – 200 l water onderzocht

TABEL VII - *Overzicht bacteriologie, virologie en chemie van het ruwe water (WRK) te Amsterdam (Leiduin).*

	VIROLOGIE		BACTERIOLOGIE					CHEMIE	
			Aantal micro-organismen per liter (1)						
Datum monster-name	Aantal M.W.A./ 100 l (2)	Virustype	Bacteriën van de coligroep	Thermo-tolerante bacteriën van de coligroep	Faecale strepto-coccen	Sulfiet-reduce-rende Clostridia sporen	Vrij chloor mg/l	Temp. °C	pH
24-10-1978	< 1		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		13	
6-12-1978	< 1		760	134	2	N.D.		–	
13- 2-1979	< 1		430	124	30	30		2	
17- 4-1979	< 1		72	36	5	10	< 0,1	11	7,2-8,0
26- 6-1979	< 1		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		19	
21- 8-1979	4	Polio I (vaccin)	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		19	
9-10-1979	< 1		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.		–	

N.D. = niet detecteerbaar in onderzocht volume – = niet bepaald
(1) = 100 – 250 ml water onderzocht (2) = 100 – 200 l water onderzocht

TABEL VIII - *Overzicht bacteriologie, virologie en chemie van het ruwe water (Oeverinfiltraat) te Gouda.*

	VIROLOGIE		BACTERIOLOGIE					CHEMIE	
			Aantal micro-organismen per liter (1)						
Datum monster-name	Aantal M.W.A./ 100 l (2)	Virustype	Bacteriën van de coligroep	Thermo-tolerante bacteriën van de coligroep	Faecale strepto-coccen	Sulfiet-reduce-rende Clostridia sporen	Vrij chloor mg/l	Temp. °C	pH
7-11-1978	< 1							11	
8- 1-1979	< 1							10	
27- 2-1979	< 2							10	
2- 5-1979	< 1		N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	n.v.t.	–	7,0-7,8
10- 7-1979	< 1							16	
4- 9-1979	< 1							18	
23-10-1979	< 1							11	

N.D. = niet detecteerbaar in onderzocht volume – = niet bepaald
(1) = 25 – 100 ml water onderzocht (2) = 20 – 100 l water onderzocht

M.W.A. = 7/100 l: Ondergrens 3/100 l, bovengrens 41/100 l;

M.W.A. = 62/100 l: Ondergrens 5/100 l, bovengrens 195/100 l.

In het algemeen blijkt uit deze resultaten dat overeenkomstig de verwachting, in onbehandeld oppervlaktewater diverse typen enterovirussen werden aangetroffen, dit in tegenstelling tot voorbehandeld ruw water met één uitzondering van het WRK water bij de Gemeentewaterleiding Amsterdam.

3.3. *Virologische en bacteriologische resultaten van het onderzochte drinkwater*

In een aantal bemonsteringen van drinkwater na zuivering en van drinkwater in het distributiegebied werden in eerste instantie enterovirussen aangetroffen. Intensieve controle van de concentratie en isolatieprocedure, herhalingen van titraties alsmede uitvoerige identificatie van alle ruwwater monsters door het RIV, Afdeling Enterovirussen, bevestigden de hypothese dat de virus positieve drinkwaterresultaten het gevolg zijn geweest van cross-contaminatie met opgehoopt virus materiaal afkomstig van ruwwaterconcentraten.
Deze hypothese werd versterkt door de resultaten van de tweede serie bemonsteringen van na oktober 1979 toen alleen drinkwater is bemonsterd en in geen enkel concentraat virus werd aangetroffen. In totaal is met uitzondering van Gouda van alle bedrijven één bemonsteringsdatum dientengevolge niet verder betrokken bij de evaluatie van deze resultaten. Concluderend kan worden gesteld dat in de 90 onderzochte monsters drinkwater van maximaal 500 l geen virus is aangetoond.
In geen der onderzochte monsters drinkwater van 500 ml werden bacteriën van de coligroep, thermotolerante colibacteriën, faecale streptococcen of sulfietreducerende Clostridia sporen aangetoond. Ook het koloniegetal bij 22 °C en het koloniegetal bij 37 °C lagen in alle gevallen beneden de door de VEWIN opgestelde aanbevelingen [36].

4. **Discussie**

In Nederland is gedurende de periode december 1978 tot februari 1980 een inventarisatie-onderzoek uitgevoerd, waarbij het drinkwater en het ruwe water van een zestal waterleidingbedrijven is onderzocht op de aanwezigheid van enterovirussen en de gebruikelijke indicatorbacteriën.
De geselecteerde waterleidingbedrijven bereiden hun drinkwater voornamelijk uit oppervlaktewater.
De concentratie procedure die veelvuldig bij wateronderzoek wordt gebruikt is de concentratietechniek zoals o.a. beschreven door Katzenelson [14] en Hill et al. [12]. Bij deze procedure kunnen grote volumina water worden behandeld in een relatief kort tijdsbestek. Uit de literatuur is bekend dat de recovery van poliovirussen relatief hoog is [12, 14, 25, 29]. Dit laatste werd ook door onze experimenten met poliovirus bevestigd (tabel II). Op grond van o.a. deze resultaten werd dan ook besloten deze procedure voor een oriënterend onderzoek toe te passen. Bij het onderzoek naar enterovirussen in de verschillende ruwwaterbronnen werden bij een viertal waterleidingbedrijven virussen aangetoond, waarvan driemaal in het ongezuiverde oppervlaktewater (tabel III t/m VI).
Voorbehandeling door middel van spaarbekkens + transportchloring en oeverinfiltratie blijkt een zodanige virusreductie te veroorzaken dat hierna geen virus meer in het onderzochte volume aantoonbaar was. In het algemeen geven de in deze monsters gemeten bacteriologische indicatororganismen een redelijke kwalitatieve indicatie t.a.v. de virologische gesteldheid van het water.

De resultaten van het bacteriologisch onderzoek aan drinkwater tonen aan dat het drinkwater zowel vanaf pompstation als in de periferie gedurende de onderzoeksperiode aan de bacteriologische norm van drinkwater voldeed, zelfs indien volumina van 500 ml werden onderzocht op indicatororganismen. In 18 van de 100 onderzochte monsters heeft zich met name in het begin van het onderzoek een cross-contaminatie probleem voorgedaan met opgehoopt virusmateriaal vanuit monsters ruw water. Na gedeeltelijke herhaling van titraties van een aantal concentraten alsmede identificatie van ruw water CPE-positieve concentraten blijken een vijftal bemonsteringen (10 monsters) niet geschikt voor verdere evaluatie. Van de resterende 90 monsters drinkwater kan zeker worden gesteld dat in het onderzochte volume geen virus aantoonbaar was. Aangezien de detectiegrens van de concentratiemethode voor de circa 100 virustypen niet bekend is en bovendien per virustype sterk kan variëren, is het niet mogelijk om op grond van statistische beschouwingen een minimale virusconcentratie in het onderzochte drinkwater te berekenen. Er kan slechts worden geconcludeerd dat bij herhaling geen virussen in volumina van maximaal 500 l drinkwater zijn aangetoond. Gezien de beperkingen van de concentratietechniek alsmede de in het onderzoek toegepaste BGM cellijn, waarin zich slechts een beperkt aantal enterovirussen kunnen vermeerderen [31, 33], zal het duidelijk zijn dat op deze wijze slechts een fractie van de totaal aanwezige virussen kan worden aangetoond [9, 35].

Ondanks deze technische beperkingen, maar gelet op o.a. de gemiddelde dagelijkse drinkwaterconsumptie van circa 2 l per dag [31], het ontbreken van epidemiologische aanwijzingen, de huidige opvattingen over de voor de mens geldende minimale infectieuze dosis alsmede het niet aantoonbaar zijn van enterovirussen in de onderzochte monsters, zijn er geen aanwijzingen dat het drinkwater van de onderzochte drinkwaterbedrijven vanuit virologisch oogpunt onbetrouwbaar genoemd zou moeten worden.

Om een statistische betrouwbare uitspraak over de virologische kwaliteit van drinkwater te kunnen doen is o.a. om bovengenoemde redenen een relatief grote toename van het te onderzoeken aantal monsters drinkwater met betere technieken noodzakelijk. Wegens het kostenaspect en het zeer arbeidsintensieve karakter van dit onderzoek lijkt een andere aanpak m.b.t. virusonderzoek van drinkwater dan ook gewenst.

Een mogelijke aanpak is om oppervlaktewater op meerdere onttrekkingspunten voor de drinkwatervoorziening nader te karakteriseren wat betreft virusconcentraties, soortensamenstelling alsmede fluctuaties van de virusconcentraties in de tijd.

Een volgende stap is een nadere evaluatie van desinfectie c.q. verwijderingscapaciteiten voor virussen en andere resistente microorganismen van de diverse waterbehandelingsprocessen. Met behulp van deze gegevens is het mogelijk om te berekenen welk risico de consument uiteindelijk kan lopen om via het drinkwater met virussen in aanraking te komen.

Een belangrijk aspect bij dit onderzoek is de ontwikkeling en/of optimalisering van geschikte virale indicatororganismen, aangezien ook bij dit onderzoek incidenteel een niet voldoen van de thermotolerante colibacteriën in dit opzicht werd geconstateerd. Hierbij wordt met name gedacht aan bacteriofagen gezien de concentraties in water en gelet op de structurele overeenkomsten met de diverse virustypen [17, 18]. Onderzoek aan drinkwater zou zich dan voorlopig kunnen beperken tot zogenaamde case-control studies waarbij op sterke epidemiologische aanwijzing bij het voorkomen van gastroenteritis gericht onderzoek naar verdachte virustypen zoals Rotavirus of Norwalk-agent achtige typen zou kunnen worden verricht. Hiertoe zou in voorkomende gevallen een samenwerkingsverband met o.a. RIV, plaatselijke GGD's en KIWA wenselijk zijn.

Dankbetuiging

Het beschreven onderzoek was mede mogelijk door de medewerking en inzet van de heren E. van Welie en P. C. J. de Vries en mevrouw A. Krul, alsmede door de medewerking van de betrokken waterleidingbedrijven.

Typeringen van de geïsoleerde virussen werden uitgevoerd door de Afdeling Enterovirussen (dr. J. G. Kapsenberg) van het Rijksinstituut voor de Volksgezondheid te Bilthoven. Het onderzoek werd voorbereid en uitgevoerd in samenwerking met de Afdeling Virologie (ir. M. van Olphen) van het KIWA en de Commissie Virologie van het KIWA.

Literatuur

1. Akin, E. A., Benton, W. H. and Hill Jr., W. F. (1971). *Enteric viruses in ground and surface waters. A review of their occurrence and survival.* In Proceedings: Thirteenth Water Quality Conference. Virus and water quality occurrence and control. Department of Civil Engineering, University of Illinois at Urbana Champaign and the Illinois Environment Protection Agency, 59-74.

2. Berg, G. (ed.) (1965). *Transmission of Viruses by the Water Route.* Interscience Publishers, John Wiley and Sons.

3. Committee Report (1979). *Viruses in drinking water.* JAWWA *71,* 441-444.

4. Craun, G. F. (1979). *Waterborne Disease – A Status Report Emphasizing Outbreaks in Ground Water Systems.* Ground Water 17 : 2 : 183.

5. Craun, G. F. and McCabe, L. J. (1979). *Review of the causes of waterborne – disease outbreaks.* J. Am. Wat. Wks. Ass. *65:* p. 74.

6. Dahling, D. R. and Safferman, R. S. (1979). *Survival of enteric viruses under natural conditions in a subarctic river.* Appl. and Env. Microbiol. *38,* 1102-1110.

7. Engelbrecht, R. S. and Greening, E. O. (1978). *Chlorine resistant indicators,* 243-266. In: G. Berg, ed. *Indicators of Viruses in Water.* Ann Arbor Science Publisher Mich.

8. EPA (1979). *Human viruses in the aquatic environment: a status report with emphasis on the EPA research program.* EPA 570/9-78/006, 37 pagina's.

9. Gamble, D. R. (1979). *Viruses in drinking water.* The Lancet 1/8113, 425-428.

10. Havelaar, A. H. and Erne, E. H. W. van (1979). *Escherichia coli en Salmonella in de grote rivieren.* RIV report 43/80 zoön.

11. Hejkal, T. W., Keswick, B., Labelle, R. L., Gerba, C. P., Sanchez, Y., Dreesman, G., Hofkin, B. and Melnick, J. L. (1981). *Viruses in a community water supply associated with an outbreak of gastro-enteritis and infectious hepatitis.* (Submitted for publication).

12. Hill, W. F., Jakubowski, W., Akin, E. W. *et al.* (1976). *Detection of virus in water: Sensitivity of the tentative standard method for drinking water.* Appl. and Env. Microbiol. *31,* 254-261.

13. Katz, M. and Plotkin, S. (1967). *Minimal infective dose of attenuated poliovirus for man.* J. Am. Publ. Hlth. Assn. *57,* 1837-1840.

14. Katzenelson, E., Fattal, B. and Hostovesky, T. (1976). *Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water.* Appl. and Env. Microbiol. 32, 638-639.

15. Kool, H. J. (1978). *Treatment processes applied in public water supply for the removal of micro-organisms.* In: *Biological Indicators of Water Quality.* Eds. A. Jones and L. Evision. John Wiley and Sons USA England.

16. Koprowski, H., Nortor, O. W., Jervis, G. A., Nelsor, T. L., Chadwick, D. L., Nelson, D. J. and Meyer, K. F. (1956). *Clinical investigation on attenuated strains of poliomyelitis virus.* J. Am. Med. ass. *160:* 954-966.

17. Kott, Y., Roze, N., Sperber, S. *et al.* (1974). *Bacteriophages as viral pollution indicators.* Water Res. *8* (3), 165-171.

18. Kott, Y. (1977). *Some thoughts concerning water pollution indicators.* Israel J. Med. Sci. *13,* 646.

19. Kranen, H. J. van, Havelaar, A. H., Mark, H. van der (1981). *The significance of indicator bacteria with regard to chlorine disinfection of wastewater effluents* (abstract). FEMS Symposium: The Significance of indicator organisms September 2, 1981. The Hague, The Netherlands.

20. Kranen, H. J. van and Kool, H. J. (1981). *Inactivation of micro-organisms during the preparation of drinking water.* Antonie van Leeuwenhoek *47,* 280-281.

20a. Kranen, H. J. van en Kool, H. J. (1982). *Een onderzoek naar de aanwezigheid van enterovirussen in Nederlands drinkwater.* RID-mededeling 82-6.

21. Luria, S. E. and Darnell, J. E. (1968). *General Virology,* John Wiley and Sons, London.

22. Mahdy, M. S. (1979). *Viruses in the water environment: An underestimated problem.* JAWWA *71,* 445-449.

23. De Man, J. C. (1975). *The probability of*

Most Probable Numbers. European J. Appl. Microbiol. *2*, 67-68.

24. Melnick, J. L., Gerba, C. P. and Wallis, C. (1978). *Viruses in water*. Bull. World. Hlth. Org. *56*, 499-508.

25. Metcalf, T. G., Wallis, C. and Melnick, J. L. (1974). *Environmental factors influencing isolation of enteroviruses from polluted surface waters*. Appl. Microbiol. *27*, 920-926.

26. Metcalf, T. G., Shaffer, P. T. B. and Mooney, R. (1978). *Incidence of virus in water; case histories*. In: AWWA Proc. 1978 annual conference, paper 35-2.

27. Minor, T. E., Allen, C. I., Tsiatis, A. A., Nelson, D. B. and D'Alessio, D. J. (1981). *Human Infective Dose Determinations for Oral Poliovirus Type 1*. Vaccine in Infants, J. Chemical Microbiol. *13:* 388-389.

28. Paul, J. (1975). *Cell and Tissues Culture*. Fifth Edition, Churchill Livingstone, London.

29. Rao, V. C., Chandorkar, U., Rao, N. U., Kumaren, P. and Lathe, S. B. (1972). *A simple method for concentrating and detecting viruses in wastewaters*. Water Research *6*, pp. 1565-1575.

30. Sabin, A. B. (1975). *Properties of attenuated polioviruses and their behaviour in human beings*. Spec. Publ. NY Acad. of Sc. *5*, 113-127.

31. Safe Drinking Water Committee 1977. *Drinking Water and Health Volume: 2, Chapter 3*. National Academy of Sciences, Washington D.C., USA.

32. Scarpino, P. J., Lucas, D. P., Dahling, D. R., Berg, G. and Chang, S. L. (1974). *Effectiveness on hypochlorous acid and hypochlorite ion in destruction of viruses and bacteria*. In A. J. Rubin, ed. Chemistry of Water Supply, Treatment and Distribution, pp. 359-368. Ann Arbor Science Mich.

33. Schmidtt, N. J., Ho, H. H. and Lennette, E. H. (1976). *Comparative Sensitivity of the BGM Cell line for Isolation of Enteric Viruses*. Health. Lab. Sci. (13) No. 2, p. 115-117.

34. Snead, M. C., Olivieri, V. P., Kawata, K. *et al.* (1980). *The effectiveness of chlorine residuals in activation of bacteria and viruses introduced by post-treatment contamination*. Water Research, *14*, 403-408.

35. VEWIN aanbevelingen.

36. World Health Organization (1979). *Human viruses in water, wastewater and soil*. Technical Report Series Nr. 639, Geneva, Switzerland.

● ● ●

Commentaar

op de voordracht tijdens de 34e vakantiecursus TH Delft 7–8 januari 1982 en het daarover in H_2O (15) 1982 nr. 21 verschenen artikel: Voorkomen en betekenis van dierlijke organismen, door ir. J. Zwaagstra

Het is een hoge uitzondering wanneer door een technicus in woord en geschrift een aanvaardbaar betoog over een zuiver biologisch, niet bacteriologisch, onderwerp wordt geleverd.
Wanneer de auteur daarbij echter blijk geeft, onvoldoende op de hoogte te zijn van de onderzoekingen die aan zijn betoog ten grondslag liggen, hangt dit betoog in de lucht en ontstaat twijfel aan eigen studie en waarneming. Het mag dan een ongetwijfeld uitstekende recapitulatie zijn van een deel van de in het tweede kwart der 20e eeuw verschenen literatuur betreffende biologisch drinkwateronderzoek, maar iets nieuws daaromtrent wordt niet medegedeeld.

Dat kan ook niet, omdat na 1955 dit onderzoek nauwelijks meer plaatsvond en indien dit wèl het geval was, de resultaten angstvallig geheim werden gehouden.
Met voorbijgaan aan oudere biologische onderzoekingen in drinkwater, o.a. die van Kraepelin e.a., noemt de auteur alleen de ontdekking van de waterpissebed, Asellus aquaticus in 1923 in het leidingnet van Amsterdam en belandt dan met een grote sprong bij de Biologische Studie-Commissie van 1942. Dat in de ± 20 tussenliggende jaren door ondergetekende reeds verscheidene biologische onderzoekingen in drinkwater werden verricht en ten dele gepubliceerd [lit. 1, 2 en 3] is hem blijkbaar ontgaan, evenals het feit, dat daarbij een speciale methodiek van monsterneming en onderzoek van de verschillende bedrijfsonderdelen en leidingnetten werd ontwikkeld.
De eerste mededelingen van de Biologische Studie-Commissie berusten daardoor grotendeels op gegevens van ondergetekende, die door hem vrijwillig als basis aan de Commissie werden afgestaan, terwijl hij als lid daarvan de enige was, die biologisch onderzoek in de praktijk toepaste !
Tijdens de oorlog 1040–'45 werd dit onderzoek door ondergetekende in dienst van het Rijksinstituut voor Drinkwatervoorziening zo goed mogelijk voortgezet en mededeling daarover verscheen in de verslagen van de Biologische Studie-Commissie.
Daarnaast verschenen van zijn hand de publicaties 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 en 14, deze laatste in 1953.
Na het opheffen van de Biologische Studie-Commissie werd door hem het biologisch onderzoek van drinkwater wederom particulier voortgezet en wel speciaal in het Waterleidingbedrijf Goeree en Overflakkee tot aan de overneming van dit bedrijf door de Waterleidingmaatschappij Zeeland. De desbetreffende rapporten bevinden zich waarschijnlijk in handen van de WMZ te Middelburg en helaas is er niets uit gepubliceerd.
Enkele opmerkingen mogen nog volgen.
1. In tegenstelling met ir. Zwaagstra is ondergetekende van mening, dat Raderdieren zich wel degelijk in het leidingnet voortplanten, alleen zijn het specifieke soorten, waarvan de juiste soortsbepaling en de kennis van de bijbehorende levenswijze heel wat belangrijker zouden zijn dan door foutieve monsterneming en onderzoekmethoden bepaalde fictieve aantallen.
2. Gevaar voor de volksgezondheid kan zonder twijfel ontstaan door ophoping, ook van pathogene kiemen, in het darmkanaal van Nematoden (Draadwormen), Oligochaeten (Borstelwormen), Cladocera (Watervlooien) en andere waterdieren, vastgehecht aan in het leidingnet afgezet organisch materiaal en daarmee als voedsel opgenomen. Met de uitwerpselen van genoemde dieren komen deze kiemen in het water vrij en waarschijnlijk vormen zij een van de hoofdoorzaken van het meestal plaatselijk optreden van ondefinieerbare maag/darm aandoeningen bij de mens, waarvan de oorsprong in het leidingwater moet worden gezocht. Deze aandoeningen zijn meestal niet van ernstige aard; toch zijn en worden zij vooral in de medische literatuur nog steeds beschreven en zij vormen een aanwijzing, dat geregeld competent biologisch (en niet alleen bacteriologisch) onderzoek van drinkwater geenszins verwaarloosd mag worden.
3. Aan de samenstelling van het organisch materiaal, dat in de leidingnetten van vrijwel alle drinkwatervoorzieningen als zogenaamd 'ijzerslib' voorkomt, is tot dusver nauwelijks aandacht besteed; het vormt echter het hoofdbestanddeel van het voedsel voor wormachtige en kreeftachtige dieren. Het is zeer de vraag, of een en ander onder de huidige, vrijwel uitsluitend technische benadering, door de waterleidingbedrijven in voldoende mate wordt ingezien. De wormenexplosie te Rotterdam in 1964 en die van de waterpissebed Asellus te Lekkerkerk in 1981 bevestigen dit vermoeden; door ondergetekende worden zij gezien als voorlopers van toekomstige moeilijkheden.

A. van der Werff
Bioloog-geoloog.

Literatuur A. van der Werff

1. *Enige opmerkingen over biologische vraagstukken in het waterleidingbedrijf*. Verslagen en