



Pathogenen in de mest van grazers

Maart 2009

KWR

Watercycle Research Institute



Watercycle Research Institute

Pathogenen in de mest van grazers

Maart 2009

© 2009 KWR

Alle rechten voorbehouden.

Niets uit deze uitgave mag worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke

Colofon

Titel

Pathogenen in de mest van grazers

Projectnummer

A307140.100

Projectmanager

Jack van de Vossenberg

Opdrachtgever

Waternet

Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

Auteur(s)

Leo Heijnen

Verzonden aan

Waternet

Dit rapport is niet openbaar en slechts verstrekt aan de opdrachtgevers van het Contractonderzoekproject/adviesproject. Eventuele verspreiding daarbuiten vindt alleen plaats door de opdrachtgever zelf.

Samenvatting

Om inzicht te krijgen in de microbiologische risico's die verbonden zijn aan de toename van grote grazers (vee en wild) in het gebied van de Amsterdamse waterleidingduinen en het uitbreiden van het leefgebied van vee tot gebieden dicht bij de winmiddelen van het productiebedrijf Leiduin is kennis nodig over het voorkomen van pathogene micro-organismen bij de grazers. Daarom zijn in dit onderzoek gedurende een periode van een jaar mestmonsters van vee (runderen en schapen) en wild (reeën en damherten) geanalyseerd op het bevatten van de pathogenen: *E. coli* type O157, *Campylobacter*, en *Cryptosporidium*. Voor de analyses is gebruik gemaakt van PCR methoden waarmee het mogelijk is om zeer gevoelig en specifiek een, voor het te detecteren organisme, kenmerkend DNA fragment te amplificeren en te detecteren.

In totaal zijn 140 mestmonsters van vee (61 van runderen en 79 van schapen) en 118 mestmonsters van wild (34 van reeën en 84 van damherten) onderzocht. In 9% van de mestmonsters van vee werd *E. coli* O157 aangetoond, in 46% van deze monsters was *Campylobacter* aantoonbaar en in 1% van de monsters werd menspathogene *Cryptosporidium parvum* gedetecteerd. Er werd geen *E. coli* O157 aangetoond in de mest van schapen. In de mest van wild werd in 3% van de monsters *E. coli* O157 gedetecteerd, in 9% van de monsters *Campylobacter* en in 3% van de monsters was menspathogene *Cryptosporidium parvum* aantoonbaar. De concentraties pathogenen was in de mest van vee hoger dan in de mest van wild.

Het voorkomen van *E. coli* O157, *Campylobacter*, en *Cryptosporidium* bij beide diergroepen (vee en wild) geeft aan dat uitbreiding van het leefgebied van het vee niet zal zorgen voor introductie van deze pathogenen bij de populatie wild. Een toename van de populatie vee en wild en het toelaten van vee in de nabijheid van de winmiddelen zal wel leiden tot een hogere belasting van het ruwe water met *E. coli* O157, *Campylobacter*, en *Cryptosporidium* en daardoor een hoger infectierisico t.g.v. deze pathogenen. Door een hogere besmettingsgraad van het vee en hogere concentraties pathogenen in de mest van vee is te verwachten dat het effect van vee op de belasting van het ruwe water groter zal zijn dan de belasting ten gevolge van wild. Vooral *Campylobacter* vormt een risico, een groot deel van het vee (vooral de runderen, 80%) is besmet met *Campylobacter* en de concentraties van deze pathogeen zijn in de mest van vee beduidend hoger dan in de mest van wild.

Inhoud

Samenvatting	2
Inhoud	4
1 Aanleiding voor het onderzoek	6
2 Opzet van het onderzoek en de gebruikte methoden	8
2.1 Selectie van diersoorten	8
2.2 Frequentie van de bemonstering	8
2.3 De pathogenen	8
2.4 Verzamelen en transport van de mestmonsters	8
2.5 De keuze van detectiemethoden	8
2.5.1 PCR	9
2.5.2 Kwantitatieve Real-time PCR (Q-PCR)	9
2.6 Extractie van DNA uit mest	9
2.7 De toegepaste PCR methoden	10
2.7.1 Detectie van <i>Cryptosporidium</i>	10
2.7.2 Detectie van <i>Giardia</i>	10
2.7.3 Detectie van <i>Campylobacter</i>	10
2.7.4 Detectie van <i>E. coli</i> O157	10
2.7.5 Kwaliteitscontroles	11
2.7.6 Detectiegrens	11
3 Resultaten	12
3.1 Monstername	12
3.1.1 Vee	12
3.1.2 Wild	12
3.2 Pathogenen in mest	13
3.2.1 Controles	13
3.2.2 Detectie van <i>Giardia</i>	13
3.2.3 Aanwezigheid en concentraties pathogenen in de mest van vee	14
3.2.4 Aanwezigheid en concentraties pathogenen in de mest van wild	15
4 Discussie	17
4.1 Pathogenen in de mest van vee	17
4.1.1 <i>Campylobacter</i>	17
4.1.2 <i>E. coli</i> O157	17
4.1.3 <i>Cryptosporidium</i>	18
4.2 Pathogenen in de mest van wild (damherten en reeën)	19
4.2.1 <i>Campylobacter</i>	19
4.2.2 <i>E. coli</i> O157	19
4.2.3 <i>Cryptosporidium</i>	19
4.3 Vergelijking tussen de diergroepen	20
4.3.1 <i>Campylobacter</i>	20
4.3.2 <i>E. coli</i> O157	20

4.3.3	<i>Cryptosporidium</i>	20
5	Conclusies	21
6	Literatuur	23
I	Bijlage: Pathogenen in de mest van schapen en moeflons	25
II	Bijlage: Pathogenen in de mest van runderen	28
III	Bijlage: Pathogenen in de mest van herten en reeën	30

1 Aanleiding voor het onderzoek

De waterbedrijven in Nederland die oppervlaktewater als grondstof gebruiken voor de bereiding van drinkwater zijn, in het kader van het Waterleidingbesluit, verplicht om een kwantitatieve risicoanalyse voor het bereide drinkwater op te stellen. Hierbij moet voor een aantal indexpathogenen het theoretisch infectierisico van drinkwater worden berekend aan de hand van meetgegevens van deze pathogenen in het ruwe water en gegevens over de verwijderingscapaciteit bij de verschillende zuiveringsprocessen.

Bij Waternet is, aan de hand van resultaten van een eerste evaluatie van de infectierisico's (met behulp van de QMRA-tool) van het drinkwater van productiebedrijf Leiduin, gebleken dat het jaarlijks infectierisico voor de parameters *Campylobacter*, *Giardia* en *Cryptosporidium* de gestelde grens van 10^{-4} niet overschrijdt. Piekwaarden voor deze parameters in bijzondere omstandigheden kunnen echter niet op voorhand worden uitgesloten. In een interne workshop bij Waternet zijn diverse maatregelen benoemd die kunnen bijdragen aan verlaging van het infectierisico en voorkómen van piekwaarden. Deze maatregelen hebben onder meer betrekking op het al dan niet toelaten van grote grazers (schapen en runderen naast de al aanwezige herten en reeën) in het duingebied nabij de winmiddelen. De vragen die hierbij binnen Waternet onder meer gesteld worden, zijn:

- Is de populatie herten en reeën reeds besmet met humaanpathogene *Giardia*, *Cryptosporidium*, *Campylobacter* en eventueel andere relevante pathogenen? Zo nee, zou introductie van grazers als schapen en runderen kunnen leiden tot versnelde besmetting van de populatie herten en reeën met deze pathogenen?
- Indien de populatie herten en reeën al drager van deze pathogenen is, of na introductie van grazers alsnog wordt, dan rijst de vraag: veroorzaken populaties schapen en runderen, inclusief de periodiek aanwezige lammeren en kalveren, een groter/lager/zelfde infectierisico als de populatie herten en reeën met periodiek aanwezige kalveren?

Voor het maken van een juiste afweging van voor- en nadelen van toelaten van schapen en runderen is er bij Waternet behoefte aan kwantitatieve gegevens over de aanwezigheid van genoemde pathogenen *Campylobacter*, *Giardia* en *Cryptosporidium* en eventueel andere relevante pathogenen zoals enteropathogene *E. coli* O157 in de mest van het vee (runderen en schapen) en het wild (herten en reeën).

Daarom is voor dit onderzoek gedurende een jaar de mest van deze dieren verzameld en onderzocht op het bevatten van de pathogenen: *Campylobacter*, *Giardia* en *Cryptosporidium* en de enteropathogene *E. coli* O157.

2 Opzet van het onderzoek en de gebruikte methoden

2.1 Selectie van diersoorten

De grootste kwantitatieve bijdrage aan het risico van pathogenen uit mest mag worden verwacht van de grote grazers. Daarom is het mestonderzoek beperkt tot de volgende diersoorten:

- runderen
- schapen en moeflons
- damherten
- reeën

2.2 Frequentie van de bemonstering

Omdat de uitscheiding van pathogenen door de genoemde dieren in de tijd sterk kan variëren (Hoogenboezem et al, 2001), is er voor gekozen om gedurende het jaar op verschillende momenten mest te bemonsteren.

2.3 De pathogenen

Op basis van de Inspectierichtlijn, moet een risicoanalyse worden uitgevoerd voor *Cryptosporidium*, *Giardia*, enterovirussen en *Campylobacter*. Omdat humaanpathogene enterovirussen vooral door de mens worden uitgescheiden en volgens de huidige inzichten niet door dieren, is onderzoek van mest op enterovirussen in dit project niet zinvol.

Daarentegen bestaat er wel een reële kans op aanwezigheid van enteropathogene *E. coli* O157 in de mest van deze dieren. Dit type *E. coli* is ook pathogeen voor de mens en besmetting van drinkwater met mest van grazers heeft in het buitenland tot outbreaks geleid van ernstige infecties met *E. coli* O157 met zelfs sterfte tot gevolg (Hrudey et al., 2003, Skala, 1994).

Daarom is er gekozen om de mest op de aanwezigheid van de volgende micro-organismen te onderzoeken:

- *Cryptosporidium*
- *Giardia*
- *Campylobacter*
- *E. coli* O157

2.4 Verzamelen en transport van de mestmonsters

De mestmonsters zijn genomen door de terreinbeheerders van het gebied. Voor het nemen van de monsters is gebruik gemaakt van een steriel wegwerpsysteem. Dit systeem bestaat uit een afsluitbaar steriel potje (kunststof) waarbij in het deksel een steriele plastic lepel is geïntegreerd. Deze lepel is gebruikt om de mest op te scheppen en de mest is vervolgens direct in het afsluitbare potje gebracht en getransporteerd naar een vriezer bij (-20°C) en daarin bewaard. De monsters zijn gedurende periodes van 2-3 maanden opgespaard. Gedurende het jaar zijn vijf monsterseries voor analyse naar KWR getransporteerd.

2.5 De keuze van detectiemethoden

Kweektechnieken zijn "traditioneel" de aangewezen methoden voor detectie van de bacteriesoorten *Campylobacter* en *E. coli* O157. Echter, de gevoeligheid van de kweekmethoden wordt beperkt door de kleine hoeveelheid mest die kan worden uitgestreken over een voedingsbodem en de uitvoering van kweekmethoden is bovendien arbeidsintensief. Bij het

toepassen van kweektechnieken is verder nog van groot belang dat uitgegaan wordt van vers materiaal waaruit de bacteriën nog kweekbaar zijn. Dit brengt logistieke beperkingen met zich mee (verse mestmonsters moeten worden gevonden en vervolgens snel worden geanalyseerd). Microscopie in combinatie met specifieke kleuring met fluorescente antilichamen (immuno-fluorescentie) is de “traditionele” methode voor detectie van de protozoa *Giardia* en *Cryptosporidium*. Deze methode is lastig uitvoerbaar op mestmonsters en de gevoeligheid is laag (Weber et al., 1991).

Vanwege de beperkingen van deze methoden is er voor gekozen om de PCR (Polymerase Chain Reaction) techniek te gebruiken voor detectie van deze organismen. Bij PCR wordt een kenmerkend stukje van het erfelijk materiaal (DNA) van het te detecteren organisme vermenigvuldigd en zichtbaar gemaakt. PCR-technieken zijn zeer specifiek, gevoelig en relatief eenvoudig uitvoerbaar. Daarnaast zijn PCR methoden efficiënt inzetbaar voor detectie van meerdere verschillende organismen op individuele monsters, er kan dan éénmalig DNA uit het monster worden geëxtraheerd waarna PCR reacties met verschillende specificiteit worden uitgevoerd voor detectie van de verschillende pathogenen.

2.5.1 PCR

Met de PCR-techniek is het mogelijk om een kenmerkend fragment van het erfelijk materiaal (DNA) van de te detecteren organismen in korte tijd tot grote hoeveelheden te vermenigvuldigen. Voor deze vermenigvuldiging worden korte synthetische DNA moleculen (primers) gebruikt, de samenstelling (DNA-sequentie) van deze primers is zodanig gekozen dat deze primers slechts binden aan het DNA van het te detecteren organisme. Na binding van de primers aan het DNA van het organisme, wordt een enzymatische kettingreactie in gang gezet die verloopt onder invloed van wisseling van temperatuur. Het gevormde fragment wordt, op basis van lengte, gescheiden door toepassing van agarose-gel-electroforese en aansluitend gekleurd. Met PCR technieken is het mogelijk om zeer specifiek, gevoelig en snel geselecteerde organismen te detecteren.

2.5.2 Kwantitatieve Real-time PCR (Q-PCR)

Voor detectie van *Campylobacter* en *E. coli* O157 zijn kwantitatieve Real-Time PCR (Q-PCR) methoden gebruikt. Bij Q-PCR wordt, net als bij de “standaard” PCR techniek, een kenmerkend DNA fragment vermenigvuldigd. Echter, bij de Q-PCR techniek wordt de vorming van het vermenigvuldigde DNA fragment al tijdens de PCR reactie gemeten (Real-Time) door gebruik te maken van lichtgevende synthetische DNA-moleculen (probes) die pas licht gaan geven indien het PCR fragment gevormd wordt. Doordat er een relatie is tussen het reactietijdstip waarop detectie van het gevormde fragment mogelijk is (CT-waarde) en de concentratie van het DNA fragment aan het begin van de reactie is met deze techniek ook kwantificatie mogelijk.

2.6 Extractie van DNA uit mest

Bij toepassing van PCR technieken is de keuze van een geschikte extractiemethode van groot belang. Met een geschikte extractiemethode wordt DNA uit de mest geëxtraheerd met hoge opbrengst en worden monstercomponenten die de PCR reactie kunnen remmen efficiënt verwijderd. In de eerste fase van dit onderzoek is een kort onderzoek uitgevoerd waarbij twee verschillende DNA extractiemethoden (“FastDNA” methode van de firma Bio101 en de “QIAamp DNA StoolKit” van de firma Qiagen) met elkaar zijn vergeleken voor toepassing voor extractie van DNA uit mestmonsters. Uit dit onderzoek bleek dat vooral met de FastDNA methode DNA werd verkregen met hoge opbrengst en weinig PCR-remmende stoffen. Daarom is voor dit onderzoek gekozen voor gebruik van de FastDNA methode.

Bij deze methode wordt ca. 250 mg mest in een buisje gebracht met hierin lysis buffer en glasparels, dit mengsel wordt zeer krachtig geschud (beat-beating) waardoor de mest wordt gehomogeniseerd en de bacterie- en protozoacellen door een combinatie van fysische kracht en chemische inwerking van de lysis buffer worden kapot gemaakt. Door dit proces wordt o.a. het DNA uit de cellen vrijgemaakt. Vervolgens wordt het DNA uit het lysaat gezuiverd door het DNA in de suspensie te laten binden aan zeer fijne silica-deeltjes (op basis van lading). Het aan de silica deeltjes gebonden DNA wordt een aantal malen “gewassen” waarna een gezuiverd DNA-preparaat aan de silica deeltjes gebonden blijft. Ten slotte wordt het DNA van de silica losgemaakt door de deeltjes in een buffer met een andere zoutsterkte en pH te brengen. Silica en vloeistof worden van elkaar gescheiden waarna er een gezuiverde DNA suspensie (met een volume van 200 µl) wordt verkregen die bruikbaar is voor PCR-analyses.

2.7 De toegepaste PCR methoden

2.7.1 Detectie van *Cryptosporidium*

Voor detectie van *Cryptosporidium* is gebruik gemaakt van een “nested-PCR” methode waarmee een specifiek fragment van het 18S ribosomaal RNA gen wordt vermenigvuldigd. Bij een “nested-PCR” worden twee opeenvolgende PCR reacties gebruikt voor het genereren van een specifiek fragment. Het gevormde fragment wordt op basis van lengte gescheiden door toepassing van agarose-gel-electroforese en aansluitend gekleurd. Als er tijdens de PCR reactie een fragment gevormd is met de juiste lengte (ca. 800 base paren) dan is het van belang om te bevestigen dat het gevormde fragment werkelijk afkomstig is van *Cryptosporidium*. Hiervoor is het fragment uit de agarose-gel geïsoleerd, opnieuw vermenigvuldigd (met PCR), en aansluitend wordt de DNA-samenstelling (DNA-sequentie) van het fragment bepaald (door de firma Macrogen in de VS). De samenstelling van het DNA-fragment wordt gebruikt voor de bevestiging en is tevens bruikbaar om te bepalen welke *Cryptosporidium* soort is aangetroffen (typering). Met het resultaat van de typing wordt inzicht verkregen over de pathogeniteit voor de mens van de aangetoonde *Cryptosporidium* soort(en).

2.7.2 Detectie van *Giardia*

Voor detectie van *Giardia* is gebruik gemaakt van een methode waarmee een specifiek fragment van het Giardine gen wordt vermenigvuldigd. Het gevormde fragment wordt op basis van lengte gescheiden door toepassing van agarose-gel-electroforese en aansluitend gekleurd. Het monster is als positief beoordeeld indien er tijdens de PCR reactie een fragment gevormd is met de juiste lengte (ca. 200 base paren).

2.7.3 Detectie van *Campylobacter*

Voor detectie van *Campylobacter* is gebruik gemaakt van een Q-PCR methode waarmee een fragment van het 16S ribosomaal RNA gen dat aanwezig is bij alle *Campylobacter* soorten wordt vermenigvuldigd. Een specifieke fluorescente DNA-probe is gebruikt om de vorming van het PCR fragment tijdens de reactie te volgen. Verdunningen van een DNA suspensie met bekende hoeveelheden van een plasmide waarin het PCR-fragment gekloneerd is zijn gebruikt voor het genereren van een ijklijn, deze ijklijn maakt kwantificatie van de in het monster aanwezige aantal *Campylobacter* bacteriën mogelijk.

2.7.4 Detectie van *E. coli* O157

Voor detectie van *E. coli* O157 is gebruik gemaakt van een Q-PCR methode waarmee een fragment van het *rfbE* gen wordt vermenigvuldigd. Deze Q-PCR maakt kwantificatie van de in het monster aanwezige aantal *E. coli* O157 bacteriën mogelijk.

2.7.5 Kwaliteitscontroles

Bij de toegepaste methoden is een aantal controles uitgevoerd om de kwaliteit van de PCR analyses te waarborgen.

- *Positieve en negatieve controles*

Bij elke monsterserie van 12 mestmonsters is een positieve en een negatieve controle in de analyse meegenomen. Bij de negatieve controle is een DNA extractie, en zijn aansluitend PCR analyses, uitgevoerd op gedestilleerd water. Bij de positieve controle is een DNA extractie en PCR analyse uitgevoerd op gedestilleerd water waaraan ca. 1000 cellen *Cryptosporidium* en *Giardia* en ca. 1000 kolonie vormende eenheden (KVE) *Campylobacter* en *E. coli* O157 zijn toegevoegd (gespiked).

- *Procedure*

Voor het controleren van de gehele procedure (DNA extractie uit mest en PCR analyse) is bij elke monsterserie van 12 mestmonsters één van de monsters gespiked met ca. 1000 cellen *Cryptosporidium* en *Giardia* en ca. 1000 kolonie vormende eenheden (KVE) *Campylobacter* en *E. coli* O157. Analyse van dit monster geeft aan of de verschillende organismen kunnen worden gedetecteerd in de mest.

- *Remming en recovery*

Na de homogenisatie van het mestmonster, en de lysis van de in het mestmonster aanwezige cellen, is er aan elk monster een “gestandaardiseerd” DNA fragment toegevoegd (interne-controle). Dit toegevoegde fragment kan middels Q-PCR gelijktijdig met de *Campylobacter* en *E. coli* O157 Q-PCR analyses worden gedetecteerd en gekwantificeerd. Analyse van deze interne controle geeft inzicht in de opbrengst van de DNA-extractie procedure en de mogelijke aanwezigheid van stoffen die de PCR-reactie remmen.

- *Verdunning van monster-DNA*

Bij co-extractie van monstercomponenten die de PCR reacties remmen zijn problemen met remming vaak op te lossen door het geëxtraheerde DNA te verdunnen. Vandaar dat er voor de analyse van de mestmonsters voor gekozen is om alle monsters zowel onverdund als 1:10 verdund te analyseren.

2.7.6 Detectiegrens

Per monster is DNA geëxtraheerd uit 250 mg mest. De extractieprocedure levert een volume van 200 µl DNA op, van dit DNA is 10 µl gebruikt voor elke PCR-analyse. Bij de gebruikte PCR methoden is slechts 1 molecule DNA van het te detecteren organisme voldoende voor van een positief PCR signaal. Daarom is een detectiegrens aangehouden van $1000/250 \times 200/10 = 80$ DNA kopieën per gram mest. Een detectiegrens van 800 DNA kopieën/g is gebruikt in situaties waarbij de interne controle niet detecteerbaar is in het onverdunde monster-DNA, maar wel in het 1:10 verdunde monster-DNA

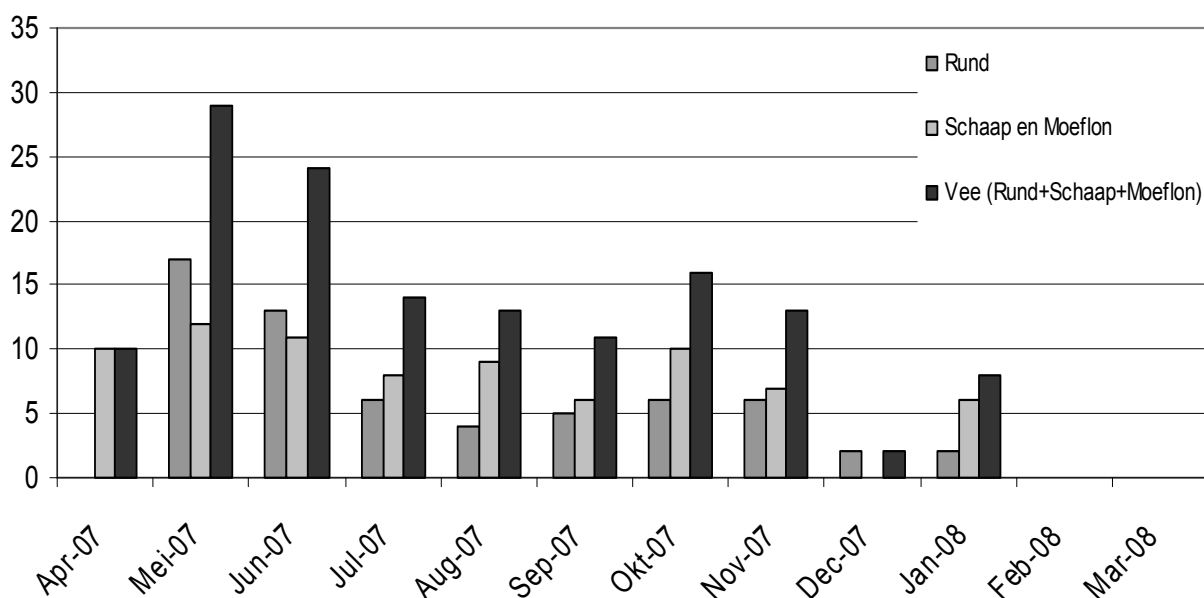
3 Resultaten

3.1 Monsternamen

Gedurende een periode van ca. 1 jaar (april 2007-april 2008) zijn mestmonsters, afkomstig van vee (Schapen, Moeflons en runderen) en wild (reeën en damherten), verzameld en geanalyseerd. Een aantal mestmonster, afkomstig van wild, was in de periode voorafgaand aan dit onderzoek (april 2006-maart 2007) verzameld en ingevroren. Deze monsters zijn eveneens geanalyseerd en de resultaten van deze analyses maken onderdeel uit van dit rapport.

3.1.1 Vee

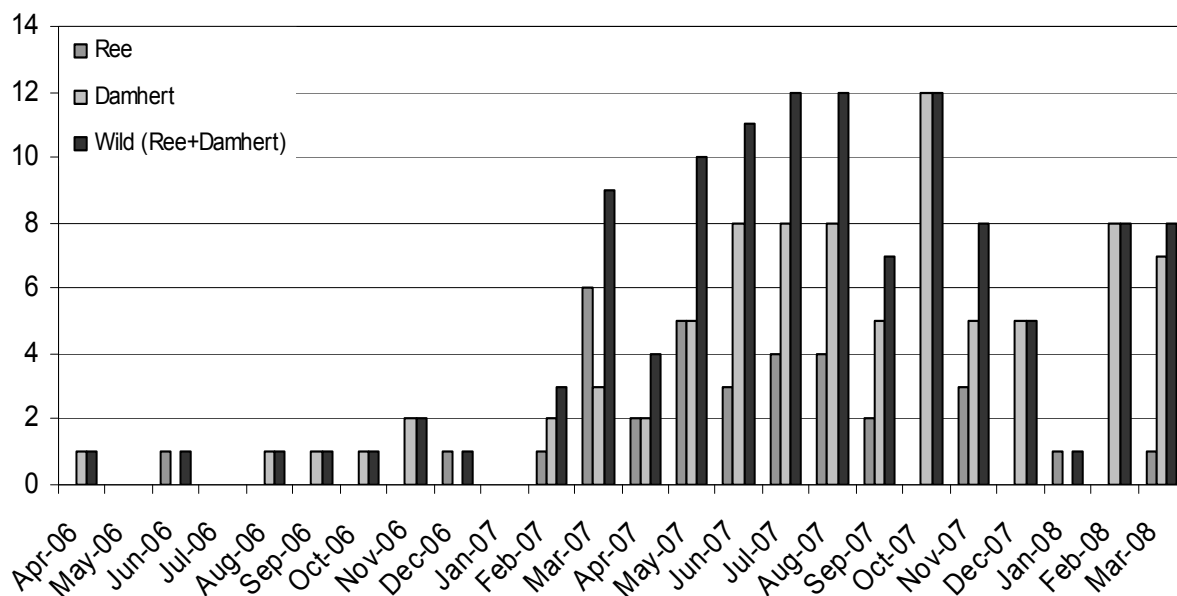
In totaal zijn 140 mestmonsters van vee geanalyseerd. Van deze monsters waren er 61 afkomstig van runderen en 79 van schapen. De verdeling van de verschillende monsters over het jaar is weergegeven in figuur 1.



Figuur 1. Het aantal maandelijks geanalyseerde mestmonsters, afkomstig van vee.

3.1.2 Wild

In totaal zijn 118 mestmonsters van wild geanalyseerd. Van deze monsters waren er 34 afkomstig van reeën en 84 van damherten. De verdeling van het aantal monsters over het jaar is weergegeven in figuur 2.



Figuur 2. Het aantal maandelijks geanalyseerde mestmonsters, afkomstig van wild.

3.2 Pathogenen in mest

3.2.1 Controles

- Spike monsters

Van de in totaal 258 monsters zijn er 32 zowel gespiked (met toevoeging van *Cryptosporidium*, *E. coli* O157 en *Campylobacter*) als niet-gespiked geanalyseerd. In alle spikemonsters bleken *Cryptosporidium*, *E. coli* O157 en *Campylobacter* detecteerbaar. In een aantal spikemonsters was *Cryptosporidium* alleen detecteerbaar na verdunning van het monster-DNA hetgeen aangeeft dat deze PCR methode gevoeliger is voor remming dan de PCR-methoden voor detectie van *E. coli* O157 en *Campylobacter*.

- Interne controle

Het DNA van de interne controle was detecteerbaar in alle monsters afkomstig van schapen (en moeflons). Van twee mestmonsters van runderen was het interne controle DNA alleen detecteerbaar na 10-voudige verdunning van het DNA. Bij één mestmonster van een rund was de interne controle ook niet detecteerbaar na verdunning van het DNA.

Bij 42 monsters van wild was de interne controle slechts detecteerbaar na (10X) verdunning van het DNA terwijl bij één mestmonster de interne controle ook in het verdunde monster niet detecteerbaar was.

3.2.2 Detectie van *Giardia*

Bij de start van dit onderzoek zijn 10 mestmonsters afkomstig van verschillende diersoorten zowel gespiked (met toevoeging van *Giardia*, *Cryptosporidium*, *E. coli* O157 en *Campylobacter*) als niet-gespiked geanalyseerd. Uit deze analyses bleek dat *Cryptosporidium*, *E. coli* O157 en *Campylobacter* goed detecteerbaar waren in de monsters waaraan deze organismen waren toegevoegd. Echter, *Giardia* bleek in deze spike monsters niet detecteerbaar terwijl *Giardia* wel detecteerbaar was in positieve controle monsters (*Giardia* in gedestilleerd water). Dit geeft aan dat de *Giardia*-specifieke PCR methode zeer gevoelig is voor remmende stoffen die aanwezig zijn in het DNA dat geëxtraheerd is uit de mestmonsters. Aangezien er geen alternatieve PCR methode beschikbaar was voor detectie van *Giardia* is, in overleg met Waternet, besloten om de mestmonsters verder niet te analyseren op de aanwezigheid van *Giardia*.

3.2.3 Aanwezigheid en concentraties pathogenen in de mest van vee

Een globaal overzicht van de analyse van 140 mestmonsters, afkomstig van "Vee" (runderen, schapen en moeflons), op het bevatten van de pathogene micro-organismen *E. coli* O157, *Campylobacter* en *Cryptosporidium* is weergegeven in tabel 1. Een uitgebreider overzicht van de analyseresultaten van individuele mestmonsters van vee is weergegeven in bijlage I (schapen en moeflons) en II (runderen).

Diersoort	Aantal n	<i>E. coli</i> O157 n (%)	<i>Campylobacter</i> n (%)	<i>Cryptosporidium</i> n (%)	<i>Crypto. parvum</i> n (%)
Rund	61	9 (15)	49 (80)	1 (2)	1 (2)
Schaap + Moeflon	79	0 (0)	15 (19)	3 (4)	0 (0)
Vee (Rund + Schaap + Moeflon)	140	9 (6)	64 (46)	4 (3)	1 (1)
Gemiddelde concentratie in positieve monsters van runderen (n/g)		1.4E+06	9.0E+07		
Range in positieve monsters Van runderen (n/g)		3.7E+03 – 1.2E+07	9.2E+01 – 4.1E+08		
Gemiddelde concentratie in positieve monsters van schapen		Niet aangetoond	2.6E+08		
Range in positieve monsters Van schapen (n/g)		Niet aangetoond	1.2E+03 – 8.2E+09		
Gem. concentratie in positief Vee (n/g)		1.4E+06	9.6E+07		
Range in positief vee (n/g)		3.7E+03 – 1.2E+07	9.2E+01 – 1.6E+09		

Tabel 1. Samenvatting van de analyseresultaten van detectie van de pathogenen in de mest van vee. In het bovenste deel van de tabel wordt het aantal en het percentage positieve mestmonsters weergegeven, in het onderste deel de concentraties *Campylobacter* en *E. coli* O157 die worden aangetroffen in positieve mestmonsters.

Aanwezigheid van pathogenen in de mest van runderen

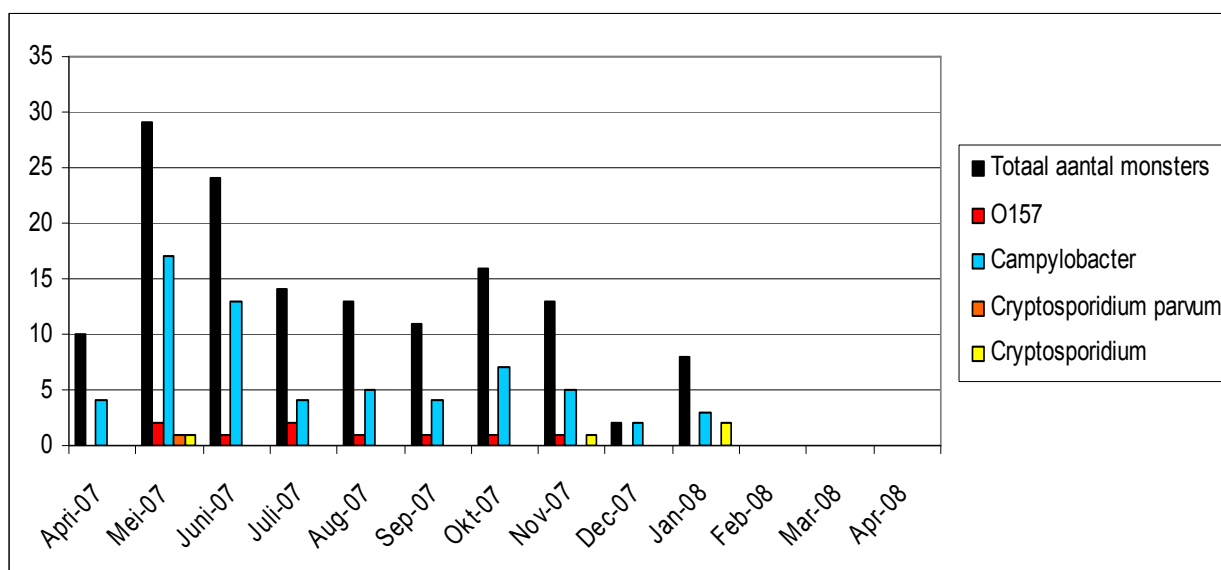
Alle onderzochte pathogenen worden aangetoond in de mest van runderen. *Campylobacter* wordt zelfs gedetecteerd in het merendeel van de mestmonsters van runderen (80%) en ook *E. coli* O157 wordt in een relatief groot deel van de rundermest monsters aangetroffen (15%). In slechts één rundermest monster is *Cryptosporidium* aangetoond, het gaat daarbij wel om een pathogene soort (*Cryptosporidium parvum*).

Aanwezigheid van pathogenen in de mest van schapen en moeflons

In de mest van schapen en moeflons wordt geen *E. coli* O157 gedetecteerd en *Campylobacter* wordt aangetoond in 19% van de monsters. *Cryptosporidium* wordt aangetoond in drie monsters (4%), het gaat daarbij om een *Cryptosporidium* type (cervine genotype) dat niet bekend staat als mens-pathogeen.

Variatie in de aanwezigheid van pathogenen in de mest van vee gedurende het jaar

De mestmonsters van vee zijn verspreid over het jaar genomen en geanalyseerd om inzicht te krijgen over variatie in de aanwezigheid van de pathogenen gedurende het jaar. De analyseresultaten hiervan zijn samengevat in figuur 4. Deze resultaten laten geen duidelijk verband zien tussen seizoensinvloeden en de aan- of afwezigheid van pathogene micro-organismen.



Figuur 4. Overzicht van het maandelijks aantal geanalyseerde mestmonsters van vee en de aanwezigheid van de verschillende pathogenen in deze monsters.

Concentraties pathogenen in de mest van vee

De *Campylobacter* concentraties in positieve monsters, afkomstig van vee variëren van $9.2E+03/g$ tot

$1.6E+09/g$ (gem.: $9.6E+07/g$), deze concentraties zijn hoger dan de *Campylobacter* concentraties in de positieve mestmonsters van wild (gem.: $3.4E+06/g$). De *E. coli* O157 concentraties in de positieve rundermest monsters varieert van $3.7E+03/g$ tot $1.2E+07/g$ (gem.: $1.4E+06/g$), ook deze concentraties zijn hoger dan in de mestmonsters van wild (gem.: $4.5E+04/g$).

3.2.4 Aanwezigheid en concentraties pathogenen in de mest van wild

Een globaal overzicht van de analyse van 118 mestmonsters, afkomstig van "wild" (reeën en damherten), op het bevatten van de pathogene micro-organismen *E. coli* O157, *Campylobacter* en *Cryptosporidium* is weergegeven in tabel 2. Een uitgebreider overzicht van de analyseresultaten van individuele mestmonsters van wild is weergegeven in bijlage III.

Diersoort	Aantal n	<i>E. coli</i> O157 n (%)	<i>Campylobacter</i> n (%)	<i>Cryptosporidium</i> n (%)	<i>Crypto. parvum</i> n (%)
Ree	34	2 (6)	2 (6)	1 (3)	1 (3)
Damhert	84	2 (2)	8 (10)	7 (8)	3 (4)
Wild (Damhert + Ree)	118	4 (3)	10 (9)	8 (7)	4 (3)
Gemiddelde concentratie in positieve monsters (n/g)		$4.4E+04$	$3.4E+06$		
Range in positieve monsters (n/g)		$8.2E+02 - 1.1E+05$	$2.7E+03 - 1.6E+07$		

Tabel 2. Samenvatting van de analyseresultaten van detectie van de pathogenen in de mest van wild. In het bovenste deel van de tabel wordt het aantal en het percentage positieve mestmonsters weergegeven, in het onderste deel de concentraties *Campylobacter* en *E. coli* O157 die worden aangetroffen in positieve mestmonsters.

Aanwezigheid van pathogenen in de mest van reeën en damherten

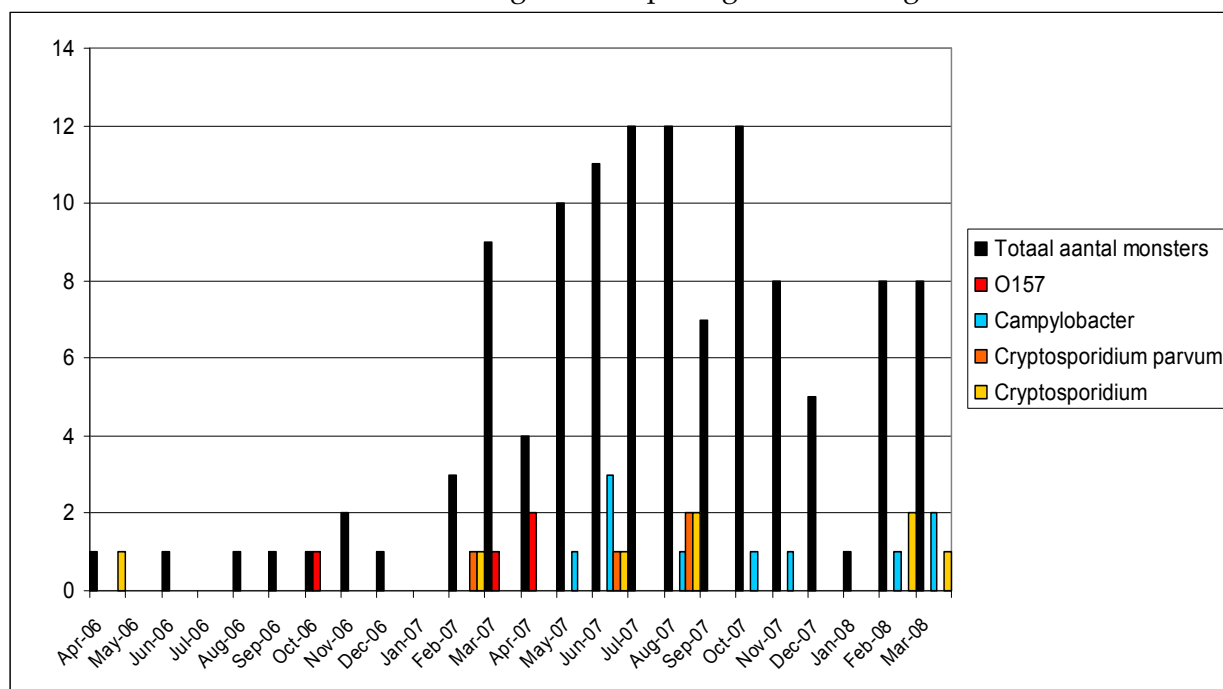
Alle onderzochte pathogene micro-organismen worden aangetoond in de mest van Reeën en Damherten. *Campylobacter* wordt het meest aangetoond, 9% van het wild is besmet met deze pathogene bacterie. *E. coli* O157 wordt minder aangetoond (3%).

Cryptosporidium wordt aangetoond in 7 damherten en slechts 1 ree (7% van de monsters). Uit nadere typering van de gevonden *Cryptosporidium* soorten blijkt dat in 3% van de mestmonsters (4 monsters) een *Cryptosporidium* soort wordt gevonden waarvan bekend is dat

deze pathogeen is voor de mens (*Cryptosporidium parvum*). Van de andere *Cryptosporidium* soorten die worden aangetoond zijn geen ziektegevallen bekend bij gezonde mensen zodat kan worden aangenomen dat deze soorten niet pathogeen zijn voor de mens.

Variatie in de aanwezigheid van pathogenen in de mest van wild gedurende het jaar

Om inzicht te krijgen over variatie in de aanwezigheid van de pathogenen gedurende het jaar zijn er verspreid over het jaar monsters geanalyseerd. De analyseresultaten hiervan zijn samengevat in figuur 3. Deze resultaten laten geen duidelijk verband zien tussen seizoensinvloeden en de aan- of afwezigheid van pathogene micro-organismen.



Figuur 3. Overzicht van het maandelijks aantal geanalyseerde mestmonsters van wild en de aanwezigheid van de verschillende pathogenen in deze monsters.

Concentraties pathogenen in de mest van reeën en damherten

De concentraties van *E. coli* O157 in positieve monsters van wild varieert van $8.2E+02/g$ tot $1.1E+05/g$ (gem.: $4.5E+04$ DNA kopieën per gram mest). De concentraties *Campylobacter* in de positieve mestmonsters van vee varieert van $2.7E+03$ tot $1.6E+07$ (gem.: $3.4E+06/g$). de concentraties van deze pathogenen zijn in de positieve mestmonsters van vee hoger.

4 Discussie

Om een indruk te krijgen over de mogelijke bedreigingen die er zijn voor de productie van (microbiologisch) veilig drinkwater bij productiebedrijf Leiduin, ten gevolge van de aanwezigheid van wild (reeën en damherten) en de aanvullende risico's die er mogelijk ontstaan door het toelaten van vee (schapen en runderen), is het van belang om een goed beeld te hebben over het voorkomen van pathogene micro-organismen bij deze dieren.

De resultaten van deze studie geven een beeld over het voorkomen van de pathogene micro-organismen *Campylobacter*, *E. coli* O157 en *Cryptosporidium* in de mest van wild (reeën en damherten) en vee (runderen, schapen en moeflons).

4.1 Pathogenen in de mest van vee

4.1.1 *Campylobacter*

In dit onderzoek is *Campylobacter* aangetoond in de mestmonsters van het merendeel (80%) van de onderzochte runderen (n=61) en in een groot deel (19%) van de schapen en moeflons (n=79). Deze hoge besmettingspercentages zijn in overeenstemming met de resultaten van een studie in Engeland (Milnes et al., 2008). Bij deze studie is, in de mest van runderen en schapen in slachthuizen, *Campylobacter* aangetoond in 54.6% van de runderen en 43.8% van de schapen. Hoge percentages worden ook gevonden in een Nederlandse studie (Bouwknegt et al., 2003) waarbij het voorkomen van *Campylobacter* in Nederlandse runderen in 1998 en 1999 is onderzocht (in 1998 en 1999 resp. 32% en 7% van de melkkoeien en 97% en 46% van de vleeskalveren).

Momenteel is de kennis over de aanwezigheid van pathogenen bij vee vooral gebaseerd op studies waarbij melkvee en slachtvee zijn onderzocht (Bouwknegt et al., 2003, Milnes et al., 2008, Stanley and Jones, 2003), er is nog weinig bekend over de aanwezigheid van pathogenen in vee dat in de relatieve vrijheid van een natuurgebied leeft. Er was wellicht te verwachten dat de besmettingsgraad van de in deze studie onderzocht vee lager zou zijn dan die van in een grotere dichtheden levende boerderijdieren (en daardoor efficiëntere verspreiding van micro-organismen). Toch blijkt dit niet het geval te zijn, waarschijnlijk is het contact tussen de onderzochte schapen en runderen (en het contact van de dieren met de mest) groot genoeg om de micro-organismen efficiënt over de populatie te laten verspreiden. Het is echter ook mogelijk dat het gebruik van PCR als analysetechniek (in vergelijking tot kweektechnieken) heeft gezorgd voor een lagere detectiegrens en daardoor een hoger aantal dieren waarin *Campylobacter* is aangetroffen. Ook is mogelijk dat met de gebruikte *Campylobacter*-specifieke PCR ook soorten kunnen worden aangetoond die gemist worden met de kweektechnieken.

4.1.2 *E. coli* O157

Uit studies waarin het voorkomen van *E. coli* O157 in landbouwhuisdieren is bestudeerd is gebleken dat deze dieren een belangrijk reservoir vormen voor deze pathogeen. Zo is aangetoond dat *E. coli* O157 (in 2002) aanwezig is in 14.2% van het Nederlandse melkvee en 23.9% van de melkkoeien (Bouwknegt et al., 2003). Uit onderzoek bij schapen en lammeren bij slachthuizen, dat in 2001 is uitgevoerd door de Voedsel en Waren Autoriteit (VWA, voorheen: Keuringsdienst van Waren), is aangetoond dat *E. coli* O157 aanwezig is in 4% van de mestmonsters (Heuvelink et al., 2001). Er is slechts weinig bekend over het voorkomen van *E. coli* O157 bij "in de natuur levend vee", in één studie is het voorkomen van *E. coli* O157 onderzocht bij wild en vee dat "naast elkaar" leeft in een natuurgebied. In deze studie (Branham et al., 2005) is aangetoond dat *E. coli* O157 voorkomt bij ca. 1.25% van de runderen.

In deze studie is *E. coli* type O157 aangetoond in de mest van 15% van de monsters van runderen, dit percentage komt overeen met de percentages die worden aangetoond in melk- en slachtkoeien afkomstig van boerderijen.

Het is opvallend dat er in deze studie in de mest van schapen en moeflons geen *E. coli* O157 is gedetecteerd. Naast de VWA studie (Heuvelink et al., 2001) is uit de resultaten van diverse onderzoeken gebleken dat schapen een reservoir kunnen vormen voor *E. coli* O157. Uit onderzoek van schapen in Engelse slachthuizen (Milnes et al., 2008) bleek dat 0.7% van de schapen besmet was met *E. coli* O157 en uit een Amerikaans onderzoek naar de aanwezigheid van pathogenen bij wild en vee in een natuurgebied bleek dat 1.22% van de schapen besmet was met *E. coli* O157 (Branham et al., 2005). Duidelijk is wel dat de besmettingsgraad van schapen met *E. coli* O157 in deze studies relatief laag is (lager dan de besmettingsgraad van runderen). Mogelijk, dat de schapen in het duingebied niet besmet zijn met *E. coli* O157, het is echter ook mogelijk dat het aantal monsters van schapen en moeflons, dat in deze studie geanalyseerd is, te klein (n=79) is geweest om de lage besmettingsgraad van deze dieren te kunnen waarnemen.

4.1.3 Cryptosporidium

Er zijn weinig gegevens beschikbaar over de besmettingsgraad van runderen met *Cryptosporidium* in Nederland. In een studie, uitgevoerd in opdracht van RIWA (Hoogenboezem et al., 2001) is het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in gepoolde mestmonsters van kuddes kalveren in de intensieve mestveehouderij onderzocht. Hierbij is toen aangetoond dat vooral kuddes met zeer jonge kalveren (enkele weken oud) besmet zijn met *Cryptosporidium* terwijl veel minder besmetting werd geconstateerd van kuddes met oudere dieren. Er zijn ook verschillende buitenlandse studies bekend waarin wordt aangetoond dat de besmettingsgraad bij runderen hoog maar ook zeer variabel (variërend 1-75%) is (Fayer, 1997, Feltus et al., 2008).

In de mest van runderen is slechts in één monster (2%) *Cryptosporidium* aangetoond, dit *Cryptosporidium* type blijkt tot het mens-pathogene genotype "*Cryptosporidium parvum*" te behoren. Dit *Cryptosporidium* genotype komt algemeen voor bij runderen (Fayer, 1997) en is, naast *Cryptosporidium hominis*, bekend als belangrijkste verwekker van *Cryptosporidium* gerelateerde ziekte bij mensen. Het is onduidelijk of dit monster afkomstig was van een besmet jong kalf of dat het hier gaat om een ouder dier.

In de mest van schapen is in drie monsters (4%) *Cryptosporidium* aangetoond, deze behoren tot een recent beschreven genotype dat bekend is als "cervine genotype". Dit genotype wordt bij een groot aantal verschillende diersoorten aangetroffen en lijkt dus een brede gastheerspecificiteit te hebben (Santin and Fayer, 2007). Dit *Cryptosporidium* type wordt nog niet algemeen aangemerkt als pathogeen voor de mens maar wordt wel sporadisch gevonden als veroorzaker van infecties bij mensen (Ong et al., 2002) en wordt daardoor aangemerkt als potentiële "emerging pathogen" (Santin and Fayer, 2007). Het percentage met *Cryptosporidium*, besmette schapen is, vergeleken bij andere studies, laag. Zo is bij een onderzoek naar het voorkomen van *Cryptosporidium* bij schapenkuddes in Engeland gevonden dat in 44% van de onderzochte mestmonsters *Cryptosporidium* detecteerbaar was (Ryan et al., 2005). Bij een studie in België waar lammeren zijn onderzocht, wordt gevonden dat ca. 13% van de lammeren besmet is met *Cryptosporidium*, ook daar behoort het merendeel van de *Cryptosporidium* typen tot het "cervine genotype".

Met de gebruikte PCR-methode wordt in slechts een relatief klein deel van de mestmonsters *Cryptosporidium* gedetecteerd. In veel gevallen wordt de PCR-analyse gehinderd door remming van de PCR-reactie. Hierdoor was verdunning van het geëxtraheerde DNA noodzakelijk om

de PCR reacties goed te laten verlopen (ook in spike-monsters) . Ten gevolge hiervan is de detectiegrens van deze methode hoger dan die van de andere PCR-methoden. Mogelijk dat na verdere optimalisatie van de PCR en/of DNA-extractie methode in een groter deel van de mestmonsters *Cryptosporidium* kan worden aangetoond.

4.2 Pathogenen in de mest van wild (damherten en reeën)

4.2.1 *Campylobacter*

In verschillende studies wordt melding gemaakt van de aanwezigheid van *Campylobacter* in de mest van “hertachtigen” (Kemper et al., 2006, Lillehaug et al., 2005), maar er is niet voldoende data beschikbaar om goed inzicht te krijgen in de besmettingsgraad van deze diersoorten. In een onderzoek van de VWA (Heuvelink et al., 2003), waarin de aanwezigheid van pathogenen is onderzocht bij de dieren op kinderboerderijen in Nederland, werd *Campylobacter* aangetoond in 2.6% van de herten (n=117).

In de in deze studie onderzochte mestmonsters van wild in het duingebied werd *Campylobacter* aangetoond in 5.9% van de onderzochte monsters van reeën (n=34) en 9.5% van de monsters van damherten (n=84). Voor zover te achterhalen is via de literatuurdatabases is dit de eerste studie waarbij deze diersoorten “in het wild” op grotere schaal zijn onderzocht op het bevatten van *Campylobacter*.

4.2.2 *E. coli* O157

Van *E. coli* O157 is eerder aangetoond dat deze pathogeen voor kan komen bij “hertachtigen”. Bij herten in Nebraska (USA) werd *E. coli* O157 gedetecteerd in 0.25% van de mestmonsters en bij herten in Louisiana (USA) bij 0.4% van de mestmonsters (Branham et al., 2005). In het onderzoek naar het voorkomen van pathogenen bij dieren op kinderboerderijen in Nederland is geen *E. coli* O157 aangetoond bij herten (Heuvelink et al., 2003).

In de mest van herten en reeën in het duingebied, die zijn onderzocht in deze studie, wordt een beduidend hoger percentage *E. coli* O157 positieve monsters gevonden dan in de hierboven beschreven studies (5.9% van de reeën en 2.4% van de damherten). Mogelijk dat een hoger percentage van de onderzochte dieren in het duingebied besmet is vanwege andere leefomstandigheden (hoge dichtheden) of is dit verschil het gevolg van het verschil tussen de hertensoorten die in het duingebied voorkomen en de hertensoorten die in Amerika en bij de kinderboerderijen zijn onderzocht. Het verschil kan ook het gevolg zijn de kenmerken van de methoden die zijn gebruikt (PCR in deze studie en kweektechnieken in de andere studies).

4.2.3 *Cryptosporidium*

Hoewel er slechts beperkte kennis beschikbaar is over het voorkomen van *Cryptosporidium* bij hertachtigen, is het duidelijk dat deze diersoorten een reservoir kunnen vormen voor *Cryptosporidium*.

Een studie van mestmonsters van wild in Noorwegen (Hamnes et al., 2006) laat zien dat 0.3% van de monsters van edelherten en 6.2% van de monsters van reeën *Cryptosporidium* bevat . Bij een onderzoek in de staat New York (USA) is gevonden dat 11% van de herten, die leven in de nabijheid van waterreservoirs die gebruikt worden voor de productie van drinkwater, besmet was met *Cryptosporidium* (Perz and Le Blancq, 2001). In een vergelijkbare studie in de omgeving van Melbourne (Australië) is aangetoond dat 22% van de mestmonsters van herten besmet is met *Cryptosporidium* (Cinque et al., 2008).

Dit onderzoek heeft de eerste data opgeleverd over het voorkomen van deze pathogeen bij reeën en damherten in Nederland. Uit de resultaten van de onderzochte mest van damherten

en reeën in het duingebied bleek dat in de mest van één ree (2.9%) en zeven damherten (8.3%) *Cryptosporidium* wordt aangetoond. De besmettingsgraad van het onderzochte wild in het duingebied lijkt dus lager dan het wild dat is onderzocht in de studies in New York en Melbourne en vergelijkbaar met het wild in Noorwegen. Het *Cryptosporidium* type dat in de mest van het ree is aangetoond behoort tot het mens-pathogene *Cryptosporidium parvum* type. In de mest van de damherten worden 3 verschillende genotypen aangetoond: *Cryptosporidium parvum* (in 3 damherten), een genotype dat "Deer like" genotype wordt genoemd en *Cryptosporidium andersoni*.

Het aantonen van de ziekteverwekkende *Cryptosporidium parvum* soort in de mest van reeën en damherten bevestigt de resultaten van het onderzoek in New York waar eveneens *Cryptosporidium parvum* werd gedetecteerd in de mest van herten (Perz and Le Blancq, 2001). Deze bevinding bevestigt dat hertachtigen gastheer kunnen zijn voor *Cryptosporidium parvum* en dat deze dieren een potentiële haard vormen voor de verspreiding van deze stabiele, en in de zuivering moeilijk te verwijderen, parasitaire organismen. Het "Deer-like genotype" dat is aangetoond in de mest van 3 damherten is een type dat in eerste instantie is geïsoleerd uit herten, en daarom "Deer-like genotype" is genoemd (Xiao et al., 2002), dit genotype komt niet alleen voor bij herten maar wordt ook aangetoond in runderen (Feltus et al., 2008). Er zijn momenteel geen ziektegevallen bij de mens bekend waarvan is aangetoond dat die zijn veroorzaakt door het "Deer-like *Cryptosporidium* genotype" zodat aangenomen wordt dat dit type niet pathogeen is. In één mestmonster van een damhert werd *Cryptosporidium bovis* gedetecteerd, een *Cryptosporidium* soort die vooral voorkomt bij runderen (Feltus et al., 2008) maar waarschijnlijk geen ziekte kan veroorzaken bij de mens.

4.3 Vergelijking tussen de diergroepen

4.3.1 Campylobacter

In de mest van wild blijkt een kleiner deel van de mestmonsters *Campylobacter* te bevatten dan in de mest van vee (9% van de mestmonsters van wild tegen 46% van vee). Bovendien zijn de gemiddelde *Campylobacter* concentraties in de positieve monsters van vee hoger dan *Campylobacter* concentraties in de positieve mestmonsters van wild (gemiddeld $9.6E+07/g$ bij vee en $3.4E+06/g$ bij wild).

Dit geeft aan dat toename van de populatie vee en uitbreiding van het gebied waarin het vee kan grazen, tot gebieden die dichtbij de winmiddelen gelegen zijn, zal leiden tot hogere concentraties *Campylobacter* in het duingebied en daarmee een grotere belasting van de zuivering met deze pathogeen.

4.3.2 E. coli O157

E. coli O157 komt in de mest van wild in een kleiner deel (3%) van de monsters voor dan in de mest van vee (6%). Daarnaast zijn de gemiddelde concentraties van deze pathogeen in de mest van positieve monsters van vee ($1.4E+06/g$) hoger dan in de mest van wild ($4.4E+04/g$). Ook dit geeft aan dat uitbreiding van het aantal runderen (bij schapen en moeflons is geen *E. coli* O157 aangetoond) en uitbreiding van hun leefgebied zal resulteren in een grotere belasting van de zuivering met deze pathogeen.

4.3.3 Cryptosporidium

Cryptosporidium is in een groter deel van de mestmonsters van wild (7%) dan in de mestmonsters van vee (3%) aangetoond met verdere typering is aangetoond dat de menspathogene typen ook meer voorkomen in de mest van wild (3%) dan in de mest van vee (1%).

5 Conclusies

Onderzoek van 140 mestmonsters van vee (61 van runderen en 79 van schapen en moeflons) en 118 mestmonsters van wild (reeën en damherten) toont aan dat de pathogene micro-organismen *Campylobacter*, *E. coli* O157 en *Cryptosporidium* in de mest van zowel vee als wild voorkomen. *E. coli* O157 blijkt niet te detecteren in de mestmonsters van schapen (en moeflons). Uit nader onderzoek van de *Cryptosporidium* soorten die zijn aangetoond in de mest van de beide diergroepen bleek bovendien dat het in een deel van de gevallen gaat om een soort die pathogeen is voor de mens: *Cryptosporidium parvum*.

Aangezien *Campylobacter*, *E. coli* O157 en mens-pathogene *Cryptosporidium* bij zowel de vee- als de wildpopulatie voorkomen zal een toename van het vee en een uitbreiding van het gebied waar deze dieren kunnen grazen niet leiden tot de introductie van deze pathogenen in het gebied en, via de mest, bij de wildpopulatie.

Groei van de wildpopulatie zal leiden tot een stijging van het aantal besmette dieren in het gebied. De belasting van het ruwe water met pathogenen zal hierdoor ook toenemen en daarmee ook het infectierisico. De verwachting is echter dat deze toename van het infectierisico afhankelijk zal zijn van de mate van toename van de wildpopulatie en daardoor beperkt zal blijven (pas 1 log toename bij 10X zoveel wild).

Uitbreiding van de populatie vee en uitbreiding van het gebied waarin dit vee zich kan bewegen, tot gebieden dichtbij de winmiddelen, zal leiden tot hogere concentraties van de pathogenen *Campylobacter*, *E. coli* O157 en mens-pathogene *Cryptosporidium* in het gebied. Deze hogere concentraties pathogenen zullen ook een grotere belasting van de zuivering veroorzaken. Doordat een groter deel van de veepopulatie de pathogenen in de mest bevat, en de concentratie pathogenen in de mest van vee hoger is, valt te verwachten dat de invloed van vee op de belasting van de zuivering groter is dan de belasting ten gevolge van de wildpopulatie. Het is momenteel niet mogelijk om te bepalen hoe groot de invloed zal zijn op de belasting van de zuivering en hoe groot het gevolg van deze belasting zal zijn op het infectierisico. Er kan echter niet uitgesloten worden dat het 10^{-4} infectierisico overschreden kan worden, zeker onder risicovolle omstandigheden waarbij piekconcentraties kunnen optreden zoals sterke regenval of mest die direct in het ruwe water terecht komt. In dit verband vormt vooral *Campylobacter* een risico, deze pathogeen is aangetoond in een groot deel van de mestmonsters van vee (46%, en zelfs in 80% van de monsters van runderen) en daarnaast zijn ook nog de concentraties van deze pathogeen in de mest van vee beduidend hoger dan in de mest van wild. Als vee in de nabijheid van het ruwe water kan komen mag verwacht worden dat de concentratie pathogenen (m.n. *Campylobacter*) tijdens piekmomenten beduidend hoger kan zijn. Aanvullend onderzoek zal noodzakelijk zijn om de kwantitatieve betekenis voor het infectierisico mogelijk te maken.

Deze studie vormt het eerste grootschalige onderzoek in Nederland naar het voorkomen van pathogenen bij vee en wild in de natuur. Ook in de internationale literatuur zijn maar weinig voorbeelden van soortgelijk onderzoeken beschikbaar.

6 Literatuur

- Bouwknegt, M., Dam-Deisz, W.D.C., Wannet, W.J.B., Pelt van, W., Visser, G. and Giessen van de, A.W., 2003. Surveillance of zoonotic bacteria in farm animals in The Netherlands. RIVM Report 285859013/2003.
- Branham, L.A., Carr, M.A., Scott, C.B. and Callaway, T.R., 2005. *E. coli* O157 and *Salmonella* spp. in white-tailed deer and livestock. *Curr Issues Intest Microbiol* 6 (2), 25-29.
- Cinque, K., Stevens, M.A., Haydon, S.R., Jex, A.R., Gasser, R.B. and Campbell, B.E., 2008. Investigating public health impacts of deer in a protected drinking water supply watershed. *Water Sci Technol* 58 (1), 127-132.
- Fayer, R., 1997. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis.
- Feltus, D.C., Giddings, C.W., Khaita, M.L. and McEvoy, J.M., 2008. High prevalence of *Cryptosporidium bovis* and the deer-like genotype in calves compared to mature cows in beef cow-calf operations. *Vet Parasitol* 151 (2-4), 191-195.
- Hannes, I.S., Gjerde, B., Robertson, L., Vikoren, T. and Handeland, K., 2006. Prevalence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in free-ranging wild cervids in Norway. *Vet Parasitol* 141 (1-2), 30-41.
- Heuvelink, A.E., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M., Kettelarij, M. and Boer, E.d., 2001. Onderzoek naar schapen en lammeren op Shiga toxine-producerende *Escherichia coli* O157. De ware(n)-chemicus : Nederlands tijdschrift voor algemeen levensmiddelenonderzoek 31 (4), 207-213.
- Heuvelink, A.E., Heerwaarden, C.v., Tilburg, J.J.H.C., Zwartkruis-Nahuis, J.T.M. and Boer, E.d., 2003. Kinderboerderijen: Hygiëne en zoönose verwekkers. VWA/Keurigdienst van waren Rapport.
- Hoogenboezem, W., Ketelaars, H.A.M., Medema, G.J., Rijs, G.B.J. and Schijven, J.F., 2001. *Cryptosporidium* and *Giardia*: occurrence in sewage, manure and surface water. Report for the Association of River Waterworks - RIWA.
- Hrudey, S.E., Payment, P., Huck, P.M., Gillham, R.W. and Hrudey, E.J., 2003. A fatal waterborne disease epidemic in Walkerton, Ontario: comparison with other waterborne outbreaks in the developed world. *Water Sci Technol* 47 (3), 7-14.
- Kemper, N., Aschfalk, A. and Holler, C., 2006. *Campylobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., and *Cryptosporidium* oocysts in semi-domesticated reindeer (*Rangifer tarandus tarandus*) in Northern Finland and Norway. *Acta Vet Scand* 48, 7.
- Lillehaug, A., Bergsjø, B., Schau, J., Bruheim, T., Vikoren, T. and Handeland, K., 2005. *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., verocytotoxic *Escherichia coli*, and antibiotic resistance in indicator organisms in wild cervids. *Acta Vet Scand* 46 (1-2), 23-32.
- Milnes, A.S., Stewart, I., Clifton-Hadley, F.A., Davies, R.H., Newell, D.G., Sayers, A.R., Cheasty, T., Cassar, C., Ridley, A., Cook, A.J., Evans, S.J., Teale, C.J., Smith, R.P., McNally, A., Toszeghy, M., Futter, R., Kay, A. and Paiba, G.A., 2008. Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. *Epidemiol Infect* 136 (6), 739-751.
- Ong, C.S., Eisler, D.L., Alikhani, A., Fung, V.W., Tomblin, J., Bowie, W.R. and Isaac-Renton, J.L., 2002. Novel *Cryptosporidium* genotypes in sporadic cryptosporidiosis cases: first report of human infections with a cervine genotype. *Emerg Infect Dis* 8 (3), 263-268.
- Perz, J.F. and Le Blancq, S.M., 2001. *Cryptosporidium parvum* infection involving novel genotypes in wildlife from lower New York State. *Appl Environ Microbiol* 67 (3), 1154-1162.
- Ryan, U.M., Bath, C., Robertson, I., Read, C., Elliot, A., McInnes, L., Traub, R. and Besier, B., 2005. Sheep may not be an important zoonotic reservoir for *Cryptosporidium* and *Giardia* parasites. *Appl Environ Microbiol* 71 (9), 4992-4997.
- Santin, M. and Fayer, R., 2007. Intra-genotypic variations in the *Cryptosporidium* sp. cervine genotype from sheep with implications for public health. *J Parasitol* 93 (3), 668-672.
- Skala, M.F., 1994. *E. coli* O157:H7 is an emerging pathogen in Missouri. *Mo Med* 91 (12), 730-733.
- Stanley, K. and Jones, K., 2003. Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *J Appl Microbiol* 94 Suppl, 104S-113S.
- Weber, R., Bryan, R.T., Bishop, H.S., Wahlquist, S.P., Sullivan, J.J. and Juranek, D.D., 1991. Threshold

of detection of *Cryptosporidium* oocysts in human stool specimens: evidence for low sensitivity of current diagnostic methods. J Clin Microbiol 29 (7), 1323-1327.

Xiao, L., Sulaiman, I.M., Ryan, U.M., Zhou, L., Atwill, E.R., Tischler, M.L., Zhang, X., Fayer, R. and Lal, A.A., 2002. Host adaptation and host-parasite co-evolution in *Cryptosporidium*: implications for taxonomy and public health. Int J Parasitol 32 (14), 1773-1785.

I Bijlage: Pathogenen in de mest van schapen en moeflons

Diersoort	Datum (m/d/j)	<i>Campylobacter</i> (n/g)	O157 (n/g)	<i>Cryptosporidium</i> (n/g)	<i>Cryptosporidium</i> type	KWR-monsternummer	Locatie*	Opmerking*
Schaap	04/20/07	<800	<800	<800		M071851	Westhoek	
Schaap	04/20/07	<80	<80	<800		M071852	Westhoek	
Schaap	04/20/07	<80	<80	<800		M071853	Achterhaasveld	
Schaap	04/20/07	4.32E+03	<80	<800		M071854	Achterhaasveld	
Schaap	04/20/07	<80	<80	<800		M071855	Klompenpan	
Schaap	04/20/07	2.99E+04	<80	<800		M071856	Klompenpan	
Schaap	04/20/07	5.89E+08	<80	<800		M071857	Paardenkerkhof	
Schaap	04/20/07	1.61E+09	<800	<800		M071858	Paardenkerkhof	
Schaap	04/20/07	<800	<800	<800		M071859	Strandweg	
Schaap	04/20/07	<80	<80	<800		M071860	Strandweg	
Schaap	05/14/07	<80	<80	<800		M071861	Strandweg	
Schaap	05/14/07	<80	<80	<800		M071862	Achterhaasveld	ram
Schaap	05/14/07	1.52E+04	<80	<800		M071863	Westhoek	
Schaap	05/14/07	<80	<80	<800		M071864	Paardenkerkhof	
Schaap	05/10/07	<80	<80	<800		M071865	Westhoek	
Moeflon	05/03/07	<80	<80	<800		M071868	grootzwarteveld	lam
Moeflon	05/07/07	1.22E+03	<80	<800		M071869	grootzwarteveld	
Schaap	05/15/07	<80	<80	<800		M071870	Klompenpan	ram
Moeflon	05/06/07	2.00E+07	<80	<800		M071871	grootzwarteveld	ram
Moeflon	05/06/07	5.41E+03	<800	<800		M071872	grootzwarteveld	ooi
Moeflon	05/07/07	<800	<800	<800		M072209	grootzwarteveld	
Moeflon	05/31/07	<80	<80	<800		M072210		
Moeflon	06/03/07	<800	<800	<800		M072211		
Schaap	06/18/07	<80	<80	<800		M072238		
Schaap	06/18/07	<80	<80	<800		M072239		
Schaap	06/18/07	<80	<80	<800		M072240		
Schaap	06/18/07	<80	<80	<800		M072241		
Schaap	06/18/07	1.22E+03	<80	<800		M072242		
Schaap	06/18/07	<80	<80	<800		M072243		
Schaap	06/18/07	<800	<800	<800		M072244		

Diersoort	Datum (m/d/j)	Campylobacter (n/g)	O157 (n/g)	Cryptosporidium (n/g)	Cryptosporidium type	KWR-monsternummer	Locatie*	Opmerking*
Schaap	06/18/07	<800	<800	<800		M072245		
Schaap	06/18/07	1.32E+08	<80	<800		M072246		
Schaap	06/18/07	<80	<80	<800		M072247		
Schaap	07/31/07	<80	<80	<800		M073535	Westhoek	
Schaap	07/31/07	<80	<80	<800		M073548	Strandweg	
Schaap	07/31/07	<80	<80	<800		M073491	Westhoek	
Schaap	07/31/07	<80	<80	<800		M073492	Strandweg	
Schaap	07/31/07	<80	<80	<800		M073512	Paardenkerkhof	
Schaap	07/31/07	<80	<80	<800		M073518	Westhoek	
Schaap	07/31/07	<800	<800	<800		M073522	Paardenkerkhof	
Schaap	07/31/07	<800	<800	<800		M073529	Westhoek	
Schaap	08/20/07	<80	<80	<800		M073487	Strandweg	UBN 2188755
Schaap	08/20/07	1.54E+07	<80	<800		M073490	Paardenkerkhof	UBN 2188755
Schaap	08/20/07	<80	<80	<800		M073493	Strandweg	UBN 2188755
Moeflon	08/23/07	<80	<80	<800		M073495	AWD, Zwartevel-d-moeflonraster	
Schaap	08/20/07	<80	<80	<800		M073504	Westhoek	
Moeflon	08/17/07	<80	<80	<800		M073501	AWD, Zwartevel-d-moeflonraster	
Moeflon	08/16/07	<800	<800	<800		M073508	Zwartevel-d-moeflonraster	
Schaap	08/20/07	1.09E+08	<80	<800		M073536	Paardenkerkhof	UBN 2188755
Schaap	08/20/07	<800	<800	<800		M073523	Westhoek	UBN 2188755
Schaap	09/19/07	<800	<800	<800		M073510	Klomp en pan	Ram
Schaap	09/19/07	<800	<800	<800		M073507	Haasveld	ooi?
Schaap	09/19/07	<80	<80	<800		M073530	Haasveld	Ooi
Moeflon	09/10/07	<800	<800	<800		M073531	AWD, Zwartevel-d	lam-ram
schaap	09/19/07	<80	<80	<800		M073488	Achterhaasveld	Ram (oud)
Moeflon	09/20/07	<80	<80	<800		M073520	AWD, Zwartevel-d	ooi?
Schaap	10/16/07	<80	<80	<800		M080688	Paardenkerkhof	UBN 2188755
Schaap	10/16/07	<80	<80	<800		M080689	Zwartevel-d	UBN 2188755
Schaap	10/16/07	<80	<80	<800		M080690	Starrebroek	UBN 2188755
Schaap	10/16/07	3.94E+03	<80	<800		M080695	Zwartevel-d	UBN 2188755
Moeflon	10/02/07	1.12E+08	<80	<800		M080702	Zwartevel-d Moeflonraster	ram "bokito"
Moeflon	10/02/07	<800	<800	<800		M080703	Zwartevel-d Moeflonraster	ram "desirebalzac"
Schaap	10/16/07	<80	<80	<800		M080704	Paardenkerkhof	UBN 2188755

Pathogenen in de mest van grazers

Diersoort	Datum (m/d/j)	Campylobacter (n/g)	O157 (n/g)	Cryptosporidium (n/g)	Cryptosporidium type	KWR-monsternummer	Locatie*	Opmerking*
Schaap	10/16/07	<80	<80	<800		M080705	Starrebroek	UBN 2188755
Schaap	10/16/07	<800	<800	<800		M080725	Klompenspan	
Schaap	10/16/07	<800	<800	<800		M080726	Klompenspan	
Schaap	11/16/07	8.24E+09	<800	>800	Cryptosporidium cervine genotype**	M080727	Zweefvliegveld	
Schaap	11/16/07	<800	<800	<800		M080728	Paardenkerkhof	
Schaap	11/16/07	<800	<800	<800		M080729	Westhoek	
Schaap	11/16/07	<80	<80	<800		M080692	Zwartevelde	
Schaap	11/16/07	<80	<80	<800		M080694	Klompenspan	
Schaap	11/16/07	<80	<80	<800		M080706	Klompenspan	
Schaap	11/16/07	<80	<80	<800		M080707	Westhoek	
Schaap	11/16/07	<80	<80	<800		M080708	Zwartevelde	
Schaap	01/31/08	1.29E+09	<80	<800		M081814	Paardenkerkhof	
Schaap	01/31/08	<80	<80	>800	Cryptosporidium cervine genotype**	M081815	Westhoek	
Schaap	01/31/08	<80	<80	>800	Cryptosporidium cervine genotype**	M081816	Achterhaasveld	
Schaap	01/31/08	<80	<80	<800		M081817	Paardenkerkhof	
Schaap	01/31/08	<80	<80	<800		M081818	Westhoek	
Schaap	01/31/08	<80	<80	<800		M081819	Noekgat	

* Extra informatie zoals die door de monsternemer was vermeld op de monsterpotjes

** Van het *Cryptosporidium cervine* genotype zijn sporadisch ziektegevallen bij gezonde mensen bekend en is daarom mogelijk pathogeen en daarom met oranje aangegeven

II Bijlage: Pathogenen in de mest van runderen

Diersoort	Datum (m/d/j)	<i>Campylobacter</i> (n/g)	O157 (n/g)	<i>Cryptosporidium</i> (n/g)	<i>Cryptosporidium</i> type	KWR-monsternummer	Locatie*	Opmerking*
Rund	05/30/07	1.64E+05	<800	<800		M071866	Zeeveld-zuid	adult
Rund	05/20/07	<80	<80	<800		M071867	Westhoek	kalf
Rund	05/31/07	4.13E+08	<80	<800		M071873	Westhoek	
Rund	05/31/07	1.14E+06	<80	<800		M071874	Westhoek	
Rund	05/31/07	3.81E+07	<80	<800		M071875	Westhoek	
Rund	05/31/07	<80	<80	<800		M071876	Westhoek	
Rund	05/31/07	9.68E+06	<80	<800		M071877	Westhoek	
Rund	05/31/07	1.01E+08	3.96E+05	<800		M071878	Westhoek	
Rund	05/31/07	8.59E+05	<80	<800		M071879	Westhoek	
Rund	05/31/07	4.39E+05	<80	<800		M071880	Westhoek	kalf?
Rund	05/31/07	<80	<80	<800		M071881	Westhoek	kalf?
Rund	05/30/07	2.07E+05	<80	<800		M072175		
Rund	05/30/07	5.92E+06	<80	<800		M072176		
Rund	05/30/07	<80	1.43E+04	>800	<i>Cryptosporidium parvum</i> **	M072177		
Rund	05/30/07	7.46E+04	<80	<800		M072178		
Rund	05/31/07	9.76E+05	<800	<800		M072188		
Rund	05/31/07	3.96E+02	<80	<800		M072189		
Rund	06/05/07	2.47E+06	<80	<800		M072190	Vogelveld	kalf
Rund	06/05/07	<800	1.21E+07	<800		M072191		kalf
Rund	06/05/07	<800	<800	<800		M072192		kalf
Rund	06/08/07	4.27E+08	<80	<800		M072193		
Rund	06/09/07	1.43E+04	<80	<800		M072194		
Rund	06/09/07	6.98E+04	<800	<800		M072195	5-hoek	
Rund	06/09/07	4.66E+04	<80	<800		M072196		
Rund	06/17/07	2.07E+05	<80	<800		M072197		
Rund	06/17/07	2.89E+07	<80	<800		M072198		
Rund	06/22/07	3.46E+07	<80	<800		M072199		
Rund	06/22/07	3.64E+08	<80	<800		M072200		kalf
Rund	06/30/07	1.56E+08	<80	<800		M072201		
Rund	06/30/07	2.16E+08	<80	<800		M072202		

Diersoort	Datum (m/d/j)	<i>Campylobacter</i> (n/g)	O157 (n/g)	<i>Cryptosporidium</i> (n/g)	<i>Cryptosporidium</i> type	KWR-monsternummer	Locatie*	Opmerking*
Rund	07/04/07	5.60E+07	<80	<800		M072203		
Rund	07/04/07	<800	<80	<800		M072204		
Rund	07/04/07	3.19E+06	1.55E+05	<800		M072205		
Rund	07/26/07	<800	8.34E+04	<800		M073538	AWD, Zegveld	M.Jonker
Rund	07/31/07	1.02E+07	<80	<800		M073540	Haasveld	
Rund	07/31/07	1.55E+07	<80	<800		M073533	Haasveld	
Rund	08/22/07	9.57E+02	<80	<800		M073489	AWD, Vogelenveld-oostzijde	
Rund	08/17/07	4.68E+07	<80	<800		M073509	AWD, Mussenveld	
Rund	08/17/07	3.71E+08	2.44E+04	<800		M073526	AWD, Mussenveld	
Rund	08/28/07	<80	<80	<800		M073528	AWD, Klazenwei	
Rund	09/24/07	3.97E+08	<80	<800		M073516	AWD, Zeeduinen-noord	
Rund	09/26/07	<800	<800	<800		M073534	Bos v. verassing	
Rund	09/24/07	1.69E+07	5.50E+04	<800		M073502	AWD, Zeeduinen-noord	
Rund	09/24/07	9.20E+01	<80	<800		M073541	Kinderbergweg	
Rund	09/24/07	5.50E+05	<800	<800		M073546	AWD, Vogelenveld	
Rund	10/23/07	4.71E+08	<80	<800		M080691	Klazewei	
Rund	10/23/07	9.39E+07	<80	<800		M080693	Klazewei	kalf
Rund	10/16/07	1.42E+07	<80	<800		M080712	BB-bergen of de graaflandse bergen	
Rund	10/21/07	<80	<80	<800		M080713	Eiland van Rolvers	
Rund	10/30/07	2.92E+07	<80	<800		M080714	t ouwe huis	
Rund	10/30/07	8.64E+07	3.66E+03	<800		M080716	t ouwe huis	
Rund	11/23/07	2.60E+08	<80	<800		M080686	De Vellen	
Rund	11/27/07	2.19E+07	<80	<800		M080709	Eiland van Rolvers	pink
Rund	11/5/07	1.16E+08	<80	<800		M080710	Graaflandse bergen	
Rund	11/09/07	<80	<80	<800		M080711	Vogelenveld	
Rund	11/09/07	9.47E+07	<80	<800		M080715	Vogelenveld	
Rund	11/27/07	1.68E+08	1.54E+04	<800		M080730	Eiland van Rolvers	pink
Rund	12/13/07	7.43E+07	<80	<800		M080687	Vogelenveld	
Rund	12/26/07	8.58E+07	<80	<800		M081812	AWD Haasveld	
Rund	1/22/08	1.17E+04	<80	<800		M081811	AWD Vossenbergh	
Rund	1/22/08	1.53E+08	<80	<800		M081813	AWD Vossenbergh	

* Extra informatie zoals die door de monsternemer was vermeld op de monsterpotjes

** Van *Cryptosporidium parvum* is bekend dat deze *Cryptosporidium* soort in staat is tot het veroorzaken van ziekte bij mensen en is daarom met rood aangegeven

III Bijlage: Pathogenen in de mest van herten en reeën

Diersoort	Datum (m/d/j)	Campylobacter (n/g)	O157 (n/g)	Cryptosporidium (n/g)	Cryptosporidium type	KWR-monsternummer	Locatie*	Opmerking*
Damhert	04/24/06	<800	<800	>800	Cryptosporidium bovis	M071888		
Damhert	08/21/06	<800	<800	<800		M071889		
Damhert	09/06/06	<80	<80	<800		M071886		
Damhert	10/31/06	<800	1.10E+05	<800		M071885		
Damhert	11/7/06	<800	<800	<800		M071882		
Damhert	11/15/06	<800	<80	<800		M071883		
Damhert	02/02/07	<80	<80	<800		M071884		
Damhert	02/01/07	<800	<800	>800	Cryptosporidium parvum***	M071887		
Damhert	03/21/07	<80	<80	<800		M071905		
Damhert	03/29/07	<80	<80	<800		M071910		
Damhert	03/21/07	<80	<80	<800		M071911		
Damhert	04/02/07	<800	<800	<800		M071909		
Damhert	04/03/07	<80	9.18E+03	<800		M071914		
Damhert	05/20/07	<80	<80	<800		M071898		adult
Damhert	05/19/07	<800	<800	<800		M071900		
Damhert	05/28/07	<80	<80	<800		M071901		
Damhert	05/23/07	<800	<800	<800		M071903		
Damhert	05/29/07	<80	<80	<800		M071904		
Damhert	06/08/07	<800	<800	<800		M072287		
Damhert	06/09/07	<80	<80	>800	Cryptosporidium parvum***	M072288		
Damhert	06/09/07	<80	<80	<800		M072289		
Damhert	06/13/07	9.60E+02	<80	<800		M072290		
Damhert	06/21/07	4.45E+02	<80	<800		M072291		
Damhert	06/22/07	1.27E+02	<800	<800		M072292		
Damhert	06/22/07	<80	<80	<800		M072293		
Damhert	06/27/07	<80	<80	<800		M072294		
Damhert	07/01/07	<80	<80	<800		M072298		
Damhert	07/15/07	<800	<800	<800		M072299		

Diersoort	Datum (m/d/j)	Campylobacter (n/g)	O157 (n/g)	Cryptosporidium (n/g)	Cryptosporidium type	KWR-monsternummer	Locatie*	Opmerking*
Damhert	07/15/07	<80	<80	<800		M072300		
Damhert	07/20/07	<80	<80	<800		M072301		
Damhert	07/24/07	<80	<80	<800		M072302		
Damhert	07/25/07	<80	<80	<800		M073496	AWD, Doktersdrift	M.jonker
Damhert	07/25/07	<80	<80	<800		M073500	AWD, Dennenstrook	M.jonker
Damhert	07/25/07	<80	<80	<800		M073544	Vossenbergr	
Damhert	08/06/07	2.74E+03	<80	<800		M073494	Mussenveld	
Damhert	08/16/07	<80	<80	<800		M073497	AWD, Zwartevel-d-moeflonraster	
Damhert	08/16/07	<80	<80	<800		M073521	AWD, Zwartevel-d-moeflonraster	
Damhert	08/15/07	<800	<800	>800	Cryptosporidium parvum***	M073527	AWD, P. landerweg/ruiterroute	hinde+kalf
Damhert	08/16/07	<800	<800	<800		M073537	AWD	hinde
Damhert	08/25/07	<800	<800	<800		M073542	AWD, Houtpoort	hinde
Damhert	08/28/07	<800	<800	<800		M073543	AWD, zegveld	bok
Damhert	08/25/07	<80	<80	<800		M073549	AWD, Eikenbos bij zwartevel-dkanaal (dam 4)	Hinde
Damhert	09/26/07	<80	<80	<800		M073524	Vliegermonument	
Damhert	09/04/07	<80	<80	<800		M073525	AWD, Marelberge	Bok
Damhert	09/26/07	<80	<80	<800		M073503	Blauwe weg	
Damhert	09/26/07	<800	<800	<800		M073513	Vliegermonument	
Damhert	09/24/07	<800	<800	<800		M073499	AWD, Vogelenveld	
Damhert	10/02/07	<80	<80	<800		M073547	AWD, Eendenvlak	hinde
Damhert	10/02/07	1.64E+07	<80	<800		M080675	Zwartevel-d Moeflonraster	
Damhert	10/10/07	<80	<80	<800		M080677	Hazenleger	
Damhert	10/21/07	<800	<800	<800		M080678	Talud/nieuw kanaal	
Damhert	10/29/07	<80	<80	<800		M080680	Middenveld	
Damhert	10/29/07	<800	<800	<800		M080684	Eendenvlak	
Damhert	10/31/07	<800	<800	<800		M080696	Eikenbos	
Damhert	10/10/07	<800	<800	<800		M080697	Graaflandse bergen	
Damhert	10/10/07	<800	<800	<800		M080721	Graaflandse bergen	bronthert
Damhert	10/10/07	<800	<800	<800		M080722	Hazenlegers	
Damhert	10/18/07	<80	<80	<800		M080723	AWD	
Damhert/Ree	10/01/07	<800	<800	<800		M080699	Duivendrift	spitser
Damhert	11/06/07	<800	<800	<800		M080683	Eikenbos	

Pathogenen in de mest van grazers

Diersoort	Datum (m/d/j)	Campylobacter (n/g)	O157 (n/g)	Cryptosporidium (n/g)	Cryptosporidium type	KWR-monsternummer	Locatie*	Opmerking*
Damhert	11/06/07	<800	<800	<800		M080679	Schuilen R	
Damhert	11/06/07	<800	<800	<800		M080685	Eikenbos	+/- 5j
Damhert	11/06/07	<800	<800	<800		M080717	Eikenbos	4j
Damhert	11/06/07	<800	<800	<800		M080718	Schuilen R	2e kop
Damhert	12/05/07	<800	<800	<800		M080698	Schuilrust	jong (male)
Damhert	12/12/07	<800	<800	<800		M080724	Veenstort	volw hert (8-12j)
Damhert	12/11/07	<800	<800	<800		M080700	Veenstort	jong
Damhert	12/11/07	<80	<80	<800		M080681	Veenstoet	kalf
Damhert	12/25/07	<800	<800	<800		M081834	AWD eikenbos ruiterroute/beukenlaan	
Damhert	02/07/08	<800	<800	<800		M081820	AWD	
Damhert	02/20/08	<800	<800	<800		M081826		Spitser Dom 4
Damhert	02/20/08	<80	<800	>800	Cryptosporidium "Deer like"***	M081827		Spitser Schuil+r -dom 4
Damhert	02/20/08	2.53E+03	<80	>800	Cryptosporidium "Deer like"***	M081828		2kops Schuil+r -dom 4
Damhert	02/20/08	<80	<80	<800		M081829		Spitser Schuil+r -dom 4
Damhert	02/20/08	<800	<800	<800		M081830	Museumduin	Hinde
Damhert	02/20/08	<80	<80	<800		M081831		
Damhert	02/20/08	<800	<800	<800		M081832	Museumduin	Hinde
Damhert	03/17/08	<80	<80	<800		M081821		
Damhert	03/17/08	<800	<800	>800	Cryptosporidium andersoni**	M081822		female
Damhert	03/26/08	1.18E+02	<80	<800		M081823		
Damhert	03/11/08	<800	<800	<800		M081824		
Damhert	03/31/08	4.70E+03	<800	<800		M081825		
Damhert	03/14/08	<800	<800	<800		M081833***	Graaflandse bergen	Spitser
Damhert	03/06/08	<800	<800	<800		M081835		
Ree	06/05/06	<800	<800	<800		M071894		
Ree	12/13/06	<80	<80	<800		M071893		
Ree	02/20/07	<800	<800	<800		M071890		
Ree	03/15/07	<80	<80	<800		M071891		
Ree	03/21/07	<80	<80	<800		M071906		
Ree	03/19/07	<800	<800	<800		M071907		
Ree	03/20/07	<800	<800	<800		M071908		

Pathogenen in de mest van grazers

Diersoort	Datum (m/d/j)	Campylobacter (n/g)	O157 (n/g)	Cryptosporidium (n/g)	Cryptosporidium type	KWR-monsternummer	Locatie	Opmerking
Ree	03/21/07	<800	8.16E+02	<800		M071912		
Ree	03/19/07	<80	<80	<800		M071913		
Ree	04/18/07	<800	<800	<800		M071892		
Ree	04/03/07	<80	5.80E+04	<800		M071915		
Ree	05/20/07	1.71E+07	<80	<800		M071895		
Ree	05/20/07	<800	<800	<800		M071896		jaarling
Ree	05/20/07	<80	<80	<800		M071897		bok
Ree	05/28/07	<80	<80	<800		M071902		
Ree	05/31/07	<800	<800	<800		M072286		
Ree	06/13/07	<800	<800	<800		M072295		
Ree	06/21/07	<80	<80	<800		M072296		
Ree	06/22/07	<80	<80	<800		M072297		
Ree	07/15/07	<80	<80	<800		M072303		jong
Ree	07/30/07	<800	<800	<800		M073514	AWD	Kalf (Berg v. Dorus)
Ree	07/25/07	<80	<80	<800		M073519	AWD Eendenvlak	M.jonker
Ree	07/26/07	<800	<800	<800		M073539	AWD, Westerveld	M.Jonker
Ree	08/16/07	<800	<800	<800		M073498		geit (zogend)
Ree	08/01/07	<800	<800	<800		M073506		bok (Berg v. Dorus)
Ree	08/07/07	<800	<800	<800		M073515	Dennenstrook	
Ree	08/08/07	<80	<80	>800	Cryptosporidium parvum*	M073545	De zijk	Berg v. Dorus
Ree	09/27/07	<800	<800	<800		M073517	Stokmansdel	bok
Ree	09/25/07	<80	<80	<800		M073532		Berg v. Dorus
Ree	11/17/07	<800	<800	<800		M080701	Damstort	
Ree	11/10/07	<800	<800	<800		M080719	Klazenwei	
Ree	11/23/07	5.22E+03	<80	<800		M080720	Achterste haasveld	geit
Ree	01/17/08	<800	<800	<800		M080682		
Ree	03/23/08	<800	<800	<800		M081836	AWD nabij "het Heitje"	Geit

* Extra informatie zoals die door de monsternemer was vermeld op de monsterpotjes

** Van het *Cryptosporidium andersoni* en het Deer-like genotype zijn geen ziektegevallen bij gezonde mensen bekend en is daarom met geel aangegeven

** Van *Cryptosporidium parvum* is bekend dat deze *Cryptosporidium* soort in staat is tot het veroorzaken van ziekte bij mensen en is daarom met rood aangegeven.

