

RIVM rapport 250931001/2003

***Cryptosporidium* en *Giardia* in Nederlandse
zwembaden**

F.M. Schets, G.B. Engels en E.J.T.M. Leenen

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van Directie RIVM, in het kader van project S/250931, Gezondheidsrisico's pathogenen in water, en VROM Inspectie in het kader van project M/252202, Watermicrobiologie

Abstract

Swimming-pool associated outbreaks of cryptosporidiosis have been frequently reported in the UK and USA. *Cryptosporidium* oocysts could sometimes be detected in the pool water or the filter backwash water in cases where the source of the outbreak was confirmed. The occurrence of *Cryptosporidium* and *Giardia* in swimming pools in the Netherlands was studied at five locations. The backwash water from seven pool filters (from toddler pools, hot whirlpools and recreational and learner pools with an elevated water temperature) was analysed for the presence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts for a period of one year. Of the total 153 samples of filter backwash water analysed, 18 (11.8 %) were found positive for either *Cryptosporidium* (4.6 %), *Giardia* (5.9 %) or both (1.3 %). The presence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in filter backwash water indicates previous presence of these parasites in the pool water. Oocysts and cysts were detected in the water of one toddler pool and one learner pool. Pool water quality complied with legal bacteriological standards on most sampling days. Although most of the (oo)cysts in the filter backwash water were dead, viable and potentially infectious oocysts were detected in the learner pool. On the basis of numbers of potentially infectious (oo)cysts detected in the learner pool, and assuming one visit to an infected pool per year, risk assessment indicated an estimated risk of infection with *Cryptosporidium* that exceeded the generally accepted risk of one infection per 10,000 people per year. Guidelines for pool operators on how to manage faecal accidents and public information on the importance of hygiene in swimming pool complexes are recommended tools in controlling the risk of infection.

Inhoud

| | |
|--|-----------|
| Samenvatting | 5 |
| 1. Inleiding | 7 |
| 1.1 Aanleiding tot het onderzoek | 7 |
| 1.2 <i>Cryptosporidium</i> | 8 |
| 1.3 <i>Giardia</i> | 8 |
| 1.4 Zwemwaterbehandeling | 9 |
| 1.5 Opzet van het onderzoek | 10 |
| 1.5.1 Selectie van deelnemers | 10 |
| 1.5.2 Terugspoelwater en filters | 10 |
| 1.5.3 Metingen | 11 |
| 1.5.4 ‘Fecale ongelukjes’ | 11 |
| 1.5.5 Whvz parameters | 11 |
| 2. Materiaal en methode | 13 |
| 2.1 Monstername | 13 |
| 2.1.1 Terugspoelwater filters | 13 |
| 2.1.2 Peuterbaden | 13 |
| 2.1.3 Instructiebad | 13 |
| 2.2 Bacteriologische en fysisch-chemische parameters | 14 |
| 2.2.1 Terugspoelwater | 14 |
| 2.2.2 Peuterbaden en instructiebad | 14 |
| 2.3 Optimalisatie van de methode | 14 |
| 2.3.1 Spiken van monsters | 15 |
| 2.3.2 Concentratie van kleine volumes | 15 |
| 2.3.3 Aanzuren van monsters | 15 |
| 2.3.4 Zuivering m.b.v. FACS | 16 |
| 2.4 Concentratie | 16 |
| 2.5 Zuivering | 16 |
| 2.6 Kleuring en detectie | 17 |
| 3. Resultaten | 19 |
| 3.1 Optimalisatie van de methode | 19 |
| 3.1.1 Concentratie van kleine volumes | 19 |
| 3.1.2 Aanzuren van monsters | 19 |
| 3.1.3 Zuivering m.b.v. FACS | 21 |
| 3.2 Analyses van het terugspoelwater van de zwembadfilters | 21 |
| 3.2.1 Ruwe data | 21 |
| 3.2.2 Positieve monsters | 22 |
| 3.2.3 Levensvatbaarheid | 24 |
| 3.2.4 Recovery | 25 |
| 3.3 Analyses van het zwembadwater van peuter- en instructiebaden | 25 |
| 3.3.1 Recovery bij hoge filtratiesnelheid | 25 |
| 3.3.2 Peuterbaden | 26 |
| 3.3.3 Instructiebad | 26 |
| 3.4 ‘Fecale ongelukjes’ | 28 |
| 3.5 Whvz parameters | 28 |

| | | |
|-------------------|---|-----------|
| 3.6 | Risicoschattingen | 29 |
| 4. | Discussie | 33 |
| 4.1 | Detectiemethode | 33 |
| 4.2 | Selectie van deelnemers | 34 |
| 4.3 | Positieve monsters terugspoelwater | 34 |
| 4.3.1 | Seizoensverdeling | 34 |
| 4.3.2 | pH en troebelheid | 35 |
| 4.3.3 | Concentratie en levensvatbaarheid | 35 |
| 4.4 | Positieve monsters zwembadwater | 36 |
| 4.4.1 | Relatie met Whvbz parameters | 36 |
| 4.4.2 | Incident instructiebad | 37 |
| 4.5 | Fecale besmetting zwembadwater | 38 |
| 4.6 | Indicatief jaar-infectierisico | 39 |
| 5. | Conclusies | 41 |
| 6. | Aanbevelingen | 43 |
| | Dankwoord | 45 |
| | Literatuur | 47 |
| Bijlage 1 | Verzendlijst | 53 |
| Bijlage 2 | De belangrijkste kenmerken van de baden | 54 |
| Bijlage 3 | Invulformulier fecale ongelukjes | 55 |
| Bijlage 4 | Normen voor zwem- en badwater | 56 |
| Bijlage 5 | Protocol voor Envirochek concentratie | 57 |
| Bijlage 6 | Monstergelideformulier | 60 |
| Bijlage 7 | Protocol voor IMS | 61 |
| Bijlage 8 | Analyse data terugspoelwater zwembadcomplex I | 64 |
| Bijlage 9 | Analyse data terugspoelwater zwembadcomplex II | 65 |
| Bijlage 10 | Analyse data terugspoelwater zwembadcomplex III | 66 |
| Bijlage 11 | Analyse data terugspoelwater zwembadcomplex IV | 67 |
| Bijlage 12 | Analyse data terugspoelwater zwembadcomplex V | 69 |
| Bijlage 13 | Recovery data terugspoelwater | 70 |
| Bijlage 14 | Analyse data zwembadwater peuterbaden | 72 |
| Bijlage 15 | Analyse data zwembadwater instructiebad | 73 |
| Bijlage 16 | Richtlijnen fecale ongelukjes | 74 |
| Bijlage 17 | Beheersmaatregelen ter voorkoming van verspreiding infecties | 75 |

Samenvatting

Watergerelateerde gezondheidsklachten kunnen optreden door blootstelling aan bacteriën, virussen en parasieten. De parasitaire protozoa *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn belangrijke via water overdraagbare veroorzakers van gastro-enteritis bij mensen. De laatste jaren zijn in het buitenland regelmatig explosies van cryptosporidiose of giardiase gerapporteerd die geassocieerd werden met zwembadgebruik. In Nederland zijn dergelijke explosies vooralsnog niet gesignaleerd, hoewel bekend is dat *Cryptosporidium* en *Giardia* voorkomen in de Nederlandse populatie. Uit patiënt-controle onderzoeken kwam naar voren dat zwemmen in een zwembad één van de risicofactoren is voor het oplopen van een *Cryptosporidium* of *Giardia* infectie. Aangezien weinig tot geen gegevens bekend zijn over het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in Nederlandse zwembaden, is in 2000-2001 een studie uitgevoerd waarbij in vijf zwembadcomplexen zwemwater en zwembadfilters werden onderzocht.

Om een goede microbiologische zwemwaterkwaliteit te handhaven dient het zwemwater continu behandeld te worden. In de Wet hygiëne en veiligheid badinrichtingen en zwemgelegenheden (Whvbz) zijn voor een aantal procesindicatoren wettelijke normen aangegeven. Deze procesindicatoren geven aan of het proces van waterbehandeling naar behoren functioneert. Indien de zwemwaterbehandeling volgens de wettelijke normen wordt uitgevoerd, zijn de risico's om een infectie met bacteriën of virussen op te lopen gering. De wettelijk voorgeschreven concentratie vrij beschikbaar chloor biedt vrijwel altijd voldoende bescherming, of de micro-organismen komen zo zelden voor dat de kans op infectie hierdoor zeer klein is. Protozoa zoals *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn echter veel resistenter tegen chloor dan bacteriën en virussen. Verwijdering van (oö)cysten van deze protozoa uit zwemwater zal dan ook hoofdzakelijk door coagulatie en filtratie moeten plaatsvinden. In het hier beschreven onderzoek is het terugspoelwater van zeven filters van zogenaamde 'risicobaden', dat wil zeggen peuterbaden en instructiebaden met verhoogde watertemperatuur, gedurende een jaar onderzocht op de aanwezigheid van *Cryptosporidium* en *Giardia*. Aansluitend werd in twee peuterbaden het badwater na piekbelasting en het badwater van een instructiebad tijdens piekbelasting onderzocht. Tevens werd de zwembadbeheerders gevraagd bij te houden wanneer er fecaal materiaal in één van de bassins werd aangetroffen en welke actie daarop werd ondernomen. Gedurende het onderzoek is bovendien aandacht besteed aan het optimaliseren van de methode waarmee *Cryptosporidium* en *Giardia* in terugspoelwater van zwembadfilters kunnen worden gedetecteerd. Van de 153 onderzochte monsters terugspoelwater zijn er 18 (11,8 %) positief gevonden voor *Cryptosporidium* en/of *Giardia*. De concentratie *Cryptosporidium* oöcysten varieerde van 0,11 tot 34 oöcysten per liter terugspoelwater, voor *Giardia* was dit 0,06 tot 24 cysten per liter terugspoelwater. Van de 13 onderzochte monsters zwembadwater van peuterbaden werd er één positief gevonden. Dit monster overschreed de norm voor het koloniegetal bij 37 °C en er werden *Giardia* cysten in aangetroffen. In het bemonsterde instructiebad vond vermoedelijk een besmettingsincident plaats, waarbij grote aantallen (oö)cysten in het zwemwater terechtkwamen. Gedurende vier weken konden *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten in steeds lagere concentraties worden gedetecteerd. Het zwemwater voldeed

in deze periode overigens steeds aan de wettelijke bacteriologische normen. Een slecht functionerend zwembadfilter was waarschijnlijk de oorzaak van de trage verwijdering van de (oö)cysten.

Uit bepaling van de levensvatbaarheid van (oö)cysten met behulp van propidium jodide (PI) kleuring is gebleken dat de meeste (oö)cysten die uit terugspoelwater geïsoleerd werden dood waren. Het is echter aannemelijk dat er op het moment dat (oö)cysten door besmette baders in het zwembad worden gebracht levensvatbare en infectieuze (oö)cysten aanwezig zijn en gedurende enige tijd aanwezig en infectieus blijven. Een deel van de *Cryptosporidium* oöcysten aangetroffen in het water van het onderzochte instructiebad bleek levensvatbaar en potentieel infectieus, het merendeel van de *Giardia* cysten was dood.

Om een indruk te krijgen van de orde van grootte van de concentratie die relevant is voor het oplopen van een *Cryptosporidium* of *Giardia* infectie bij zwemmen in een zwembad, is een puntschatting gemaakt van de maximaal toelaatbare concentraties in zwembadwater.

Hiervoor is uitgegaan van een infectierisico van 10^{-4} op jaarbasis, dat wil zeggen dat per jaar één op de 10.000 zwemmers geïnfecteerd raakt. Dit is een vaak gehanteerde en algemeen geaccepteerde risicogrens als het gaat om drinkwater. Het risico om via zwemmen in een zwembad een *Giardia* infectie op te lopen lijkt, gebaseerd op de resultaten van deze studie, gering. Het infectierisico blijft bij inslikken van volumes zwembadwater tot 100 ml onder het algemeen geaccepteerde maximale jaarrisico van één infectie per 10.000 personen. Bij inslikken van volumes zwembadwater van 10 ml of meer, wordt voor *Cryptosporidium* het infectierisico van 10^{-4} overschreden. Bij berekening van het infectierisico is uitgegaan van de concentratie levensvatbare (oö)cysten zoals die met PI kleuring en Differentieel Interferentie Contrast (DIC) microscopie is bepaald. Niet alle op deze manier als levensvatbaar gekenmerkte *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten zullen echter daadwerkelijk infectieus zijn. De geschatte infectierisico's moeten beschouwd worden als een indicatie voor de grootteorde waarin het gezondheidsrisico met betrekking tot *Cryptosporidium* en *Giardia* bij gebruik van zwembaden ligt.

Een risico op infectie met *Cryptosporidium* en/of *Giardia* bij zwemmen in een zwembad is op basis van de resultaten uit deze studie niet uit te sluiten, daarom wordt dit rapport afgesloten met een aantal aanbevelingen voor toekomstig beleid en voor aanvullend onderzoek. Daar de deelnemende zwembadbeheerders regelmatig fecaal materiaal aantreffen in de bassins, lijkt het opstellen van richtlijnen die aangeven hoe er in zo'n geval gehandeld dient te worden zinvol. Ook publieksvoorlichting met betrekking tot het belang van goede hygiëne in en om het zwembad en de noodzaak voor diarree patiënten om af te zien van zwemmen kan een belangrijke bijdrage leveren aan het verkleinen van de kans op infectie. Aanvullend onderzoek zou zich kunnen richten op het verkrijgen van informatie betreffende de aanwezigheid van infectieuze *Cryptosporidium* oöcysten en het uitvoeren van een risicoschatting. Bovendien is het van belang de kwaliteit van het filtratieproces te bewaken en moet onderzocht worden of continue monitoring van de troebelheid van het filtraat van zwembadfilters geschikt is als indicator voor adequate filtratie.

1. Inleiding

1.1 Aanleiding tot het onderzoek

Contact met microbiologisch verontreinigd water kan leiden tot gezondheidsklachten. Deze klachten kunnen optreden als gevolg van consumptie van verontreinigd (drink)water, door recreatie op of in verontreinigd oppervlaktewater of door zwemmen in zwembaden waarvan de waterkwaliteit onvoldoende is. Watergerelateerde gezondheidsklachten kunnen o.a. door bacteriën, virussen en parasieten veroorzaakt worden. *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn via water overdraagbare parasitaire veroorzakers van gastro-enteritis bij mensen. De laatste jaren zijn in het buitenland regelmatig explosies van cryptosporidiose of giardiasis geassocieerd met zwembadgebruik gerapporteerd (Nichols, 1999; Minshew *et al.*, 2000; Veverka *et al.*, 2001). In Nederland zijn dergelijke explosies vooralsnog niet gesignaleerd. Het is echter wel bekend dat *Cryptosporidium* en *Giardia* voorkomen in de Nederlandse populatie (De Wit *et al.*, 2001a). Besmetting van zwembadwater zou kunnen optreden indien feces van besmette personen (al dan niet met symptomen) hierin terecht komen.

Uit Nederlandse studies blijkt dat er een verhoogd risico bestaat op het oplopen van gastro-enteritis veroorzaakt door *Cryptosporidium* of *Giardia* bij zwemmen in zwembaden.

In de nazomer van 1995 werd vaker dan normaal *Cryptosporidium* gevonden in de feces van diarree-patiënten in de regio Spijkenisse. In een periode van drie maanden werd in 14 % van de feces van patiënten met diarree *Cryptosporidium* aangetroffen. In eerdere onderzoeken was een prevalentie van 1-2 % gevonden. Ook in de regio Haarlem werd een verhoogde prevalentie waargenomen (11 %). De hoogste prevalentie werd waargenomen in de laagste leeftijdsklassen (0-9 jaar). Uit het patiënt-controle onderzoek kwamen de volgende risicofactoren voor het oplopen van een *Cryptosporidium* infectie naar voren: contact met een diarreepatiënt in het huishouden, zwemmen in een zwembad, een historie van chronische buikklachten en bezoeken aan kinderdagverblijven (Van Asperen *et al.*, 1996).

Uit een onderzoek naar de risicofactoren voor het oplopen van gastro-enteritis ten gevolge van *Giardia*, waarvoor patiënt-controle paren uit een onderzoek naar gastro-enteritis bij een huisartsen-peilstation (De Wit *et al.*, 2001b) en de populatiestudie Sensor (De Wit *et al.*, 2001a) zijn opgenomen, bleek dat mensen die hadden gezwommen in de week voor het begin van de klachten een zestien keer zo hoog risico op *Giardia* gastro-enteritis hadden als mensen die niet hadden gezwommen. Dit gold zowel voor mensen die hadden gezwommen in zwembaden als in oppervlaktewater. Contact met iemand met klachten van diarree of braken en een gezinslid dat naar de basisschool gaat gaven eveneens een verhoogd risico (De Wit, 2001c).

Aangezien geen gegevens bekend zijn over het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in Nederlandse zwembaden is het in dit rapport gepresenteerde inventariserend onderzoek naar het voorkomen uitgevoerd. Tevens wordt een schatting gemaakt van het mogelijke volksgezondheidsrisico bij blootstelling aan deze parasieten in zwembaden.

1.2 Cryptosporidium

Cryptosporidium is een parasitaire protozoön. *Cryptosporidium* infecties bij mensen worden vrijwel uitsluitend veroorzaakt door *Cryptosporidium parvum*. Deze soort wordt echter ook aangetroffen bij een groot aantal andere zoogdieren.

Het belangrijkste overlevingsstadium uit de levenscyclus van *Cryptosporidium* is de oöcyste. Oöcysten worden met de feces van geïnfecteerde gastheren uitgescheiden, kunnen gedurende langere tijd in het milieu overleven en infectieus blijven en kunnen overgebracht worden op een andere gastheer. Transmissie vindt plaats via de fecaal-orale route. Een belangrijke transmissie route is overdracht van persoon-op-persoon. Transmissie van dier op mens komt ook regelmatig voor, met name bij contact met geïnfecteerde kalveren en lammeren. Tevens vindt overdracht plaats via besmet drinkwater en recreatiewater (Fayer *et al.*, 2000).

Drinkwater gerelateerde explosies zijn vaak toe te schrijven aan met rioolwater of oppervlaktewater besmette drinkwatervoorzieningen met een beperkte of falende waterzuivering (Furtado *et al.*, 1998).

Het meest kenmerkende symptoom van een *Cryptosporidium* infectie is een waterige diarree. Klachten beginnen meestal zeven dagen na infectie (range 2-10 dagen) en houden één tot twee weken aan. Uitscheiding van oöcysten kan echter veel langer doorgaan: tot één tot vier weken na het verdwijnen van de klachten. Bij immuungecompromiteerde personen, zoals AIDS patiënten, patiënten die chemotherapie ondergaan of transplantatie hebben ondergaan, kan de infectie persistent en ernstig zijn, en zelfs leiden tot levensbedreigende uitdroging. Er is geen effectieve therapie tegen *Cryptosporidium* infecties en daardoor is het sterftecijfer onder deze groep patiënten als gevolg van een dergelijke infectie hoog (Arrowood, 1997). Bij explosies van cryptosporidiose die gerelateerd zijn aan zwembadgebruik kan in veel gevallen de bron van infectie microbiologisch niet direct worden aangegeven. Gebruik van zwembaden, komt vaak als significante risicofactor voor het oplopen van *Cryptosporidium* diarree uit patiënt-controle onderzoeken naar voren (Bongard *et al.*, 1994; Lemmon *et al.*, 1996; Hellard *et al.*, 2000; Puech *et al.*, 2001). Een al of niet opgemerkte fecale besmetting van het zwemwater (Bell *et al.*, 1993; Hunt *et al.*, 1994; McAnulty *et al.*, 1994; MacKenzie *et al.*, 1995), defecten aan het waterbehandelingssysteem (Sorvillo *et al.*, 1992; Bell *et al.*, 1993;) of onvolkomenheden in de bouwkundige constructie van het zwembad (Joce *et al.*, 1991) worden gerapporteerd als de mogelijke oorzaken van besmetting van het zwemwater.

1.3 Giardia

Giardia is een flagellaire parasitaire protozoön, die in meer dan 40 diersoorten is aangetroffen. *Giardia intestinalis* is de soort die bij zoogdieren, inclusief de mens, wordt aangetroffen. Het is mondiaal gezien de meest frequent geïsoleerde intestinale parasiet. *Giardia* komt vooral voor bij kinderen in ontwikkelingslanden. De parasiet wordt met de feces uitgescheiden als een cyste die goed bestand is tegen milieu-invloeden. Cysten worden overgebracht op een nieuwe gastheer. Na een incubatieperiode van één tot twee weken veroorzaakt *Giardia* acute diarree die meestal binnen twee tot vier weken zelf-limiterend is, maar chronische infecties komen ook voor. Giardiase kan goed behandeld worden met medicijnen (Marshall *et al.*, 1997).

Transmissie van *Giardia* vindt plaats van persoon-op-persoon via de fecaal-orale route. Voedsel gerelateerde explosies zijn vaak het gevolg van consumptie van voedsel dat door besmet personeel of besmette huisgenoten is bereid. Water gerelateerde explosies worden al decennia lang over de hele wereld gerapporteerd. Deze explosies zijn vaak geassocieerd met de consumptie van onbehandeld oppervlaktewater, besmet grondwater of oppervlaktewater met beperkte of slecht functionerende zuivering (Lin, 1985; Marshall *et al.*, 1997). Bij explosies van giardiase die gerelateerd zijn aan het gebruik van zwembaden wordt als mogelijke bron van infectie het regelmatig in het zwemwater aangetroffen fecale materiaal genoemd (Harter *et al.*, 1984; Greensmith *et al.*, 1988; Porter *et al.*, 1988). In deze gevallen voldeed het zwemwater aan de bacteriologische normen, maar problemen met de troebelheid van het zwemwater (Harter *et al.*, 1984) en een onvoldoende chloor concentratie (Porter *et al.*, 1988) werden wel gerapporteerd.

1.4 Zwemwaterbehandeling

Om een goede microbiologische zwemwaterkwaliteit te handhaven, wordt een snelwerkend desinfectiemiddel aan het water toegevoegd. In Nederland zijn alleen producten op basis van chloor wettelijk toegestaan. Voor een optimale effectieve werking van het desinfectiemiddel dient het water zodanig behandeld te worden dat het vrij is van gesuspendeerd en colloïdaal materiaal, van reducerende stoffen en van de juiste pH. De verschillende onderdelen van de zwemwaterbehandeling, inclusief desinfectie, moeten op elkaar afgestemd worden voor het verkrijgen en behouden van een goede waterkwaliteit. Zwemwaterbehandeling bestaat o.a. uit: zeven, coagulatie/flocculatie, filtratie, oxidatie, desinfectie, pH en temperatuur regeling, spuien en suppleren, afvoeren van bezonken en drijvend vuil en circulatie (Van Leengoed *et al.*, 1988).

In de Wet hygiëne en veiligheid badinrichtingen en zwemgelegenheden (Whvbz) zijn voor een aantal procesindicatoren wettelijke normen aangegeven. Deze procesindicatoren geven aan of het proces van waterbehandeling naar behoren functioneert en kunnen als toetsingsgrootheden gebruikt worden om de waterkwaliteit te beheersen (Anonymous, 2000). Indien de zwemwaterbehandeling volgens de wettelijke normen wordt uitgevoerd, zijn de risico's om een infectie met bacteriën, virussen of vrijlevende amoeben op te lopen gering, omdat de wettelijk voorgeschreven concentratie vrij beschikbaar chloor vrijwel altijd voldoende bescherming biedt of de micro-organismen zo zelden voorkomen dat de kans op infectie hierdoor zeer klein is (Galbraith, 1980).

Protozoa zoals *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn echter veel resistenter tegen chloor dan bacteriën en virussen. De concentraties chloor die voor zwemwaterbehandeling gebruikt worden (0,5 – 1,5 mg/L vrij beschikbaar chloor) hebben geen snel afdodend effect op met name *Cryptosporidium* oöcysten (Korich *et al.*, 1990). Verwijdering van (oö)cysten uit zwemwater moet daarom hoofdzakelijk door coagulatie en filtratie plaatsvinden. Hierdoor zullen (oö)cysten langer in het zwembadwater aanwezig zijn en is de kans op overdracht tussen personen groter.

1.5 Opzet van het onderzoek

1.5.1 Selectie van deelnemers

Er zijn tien zwembadcomplexen verspreid over Nederland aangeschreven met het verzoek om mee te doen aan het onderzoek naar het voorkomen van *Cryptosporidium* en *Giardia* in zwembaden. De tien complexen waren geselecteerd op basis van informatie die door één van de externe laboratoria die de maandelijkse controles van de Whvbx parameters doet aan het RIVM is verstrekt. Deze informatie betrof de openstelling van de baden, de aanwezigheid van binnenbaden, de gebruikte waterzuivering en de vermoedelijke bereidheid tot deelname. Uiteindelijk werden vijf zwembadcomplexen bereid gevonden tot deelname. Deze baden zijn bezocht om de plannen nader uiteen te zetten. Alle verdere stappen en de planning van het onderzoek zijn in overleg met de zwembadbeheerders tot stand gekomen.

1.5.2 Terugspoelwater en filters

Het grote volume water in zwembaden, de hoge turn-over snelheid van het zwemwater en de niet-continue belasting van het zwemwater met *Cryptosporidium* en *Giardia* leiden vermoedelijk tot lage concentraties *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten in het zwemwater. De kans op het vaststellen van vervuiling van het zwemwater met deze protozoa door rechtstreekse detectie in het zwembadwater wordt hierdoor gering geacht.

Het zwembadwater wordt onder andere gezuiverd door filtratie. Vuil verzamelt zich op en in de bovenste laag van de zwembadfilters, waardoor deze dichtslibben en kans op doorslag ontstaat. Regelmatige reiniging van de filters is dan ook noodzakelijk en vindt plaats door middel van het terugspoelen van de filters. Hierbij wordt een krachtige waterstroom door de filters geleid, tegengesteld aan de normale stroomrichting tijdens filtratie. Het filterbed komt hierbij los (fluïdisatie) en door afschuifkrachten en schurende werking van langs elkaar bewegende deeltjes wordt vuil van en uit de bovenste laag van het filter verwijderd (Van Leengoed *et al.*, 1988). Het terugspoelwater wordt op het riool geloosd. Indien verontreiniging van het zwembadwater met *Cryptosporidium* oöcysten en/of *Giardia* cysten heeft plaatsgevonden, zullen de (oö)cysten zich verzameld hebben op het filter en zullen ze bij terugspoelen geheel of gedeeltelijk vrij komen uit het filter en in het terugspoelwater terechtkomen.

In de deelnemende zwembadcomplexen zijn verschillende bassins aanwezig (Bijlage 2), sommige bassins worden door een eigen filter gezuiverd, andere maken gecombineerd gebruik van één filter. In dit onderzoek zijn bij de deelnemers alle filters bemonsterd die werden gebruikt voor de zuivering van een 'risicobad', dat wil zeggen peuterbaden, instructiebaden met verhoogde watertemperatuur, veelal alleen gebruikt door kinderen, ouderen en gehandicapten. Dit heeft geresulteerd in de bemonstering van het terugspoelwater van zeven filters, verdeeld over vijf zwembadcomplexen.

1.5.3 Metingen

Het terugspoelwater van de geselecteerde zwembadfilters is gedurende een jaar (mei 2000 t/m mei 2001) met een tweewekelijks interval bemonsterd. Aansluitend werd in twee peuterbaden het badwater na piekbelasting bemonsterd. Er werden in juni t/m augustus 2001 wekelijks monsters genomen. In september-oktober 2001 werd het badwater van een instructiebad tijdens piekbelasting wekelijks bemonsterd.

1.5.4 ‘Fecale ongelukjes’

De zwembadbeheerders is gevraagd gedurende het laatste deel van het onderzoek (maart t/m augustus 2001) bij te houden wanneer er fecaal materiaal in één van de bassins werd aangetroffen en welke actie daarop werd ondernomen. Hiertoe werd aan de zwembadbeheerders een invulformulier toegestuurd (Bijlage 3).

1.5.5 Whvbz parameters

Volgens de Wet hygiëne en veiligheid badinrichtingen en zwemgelegenheden (Whvbz) zijn de zwembaden verplicht om de in het Besluit hygiëne en veiligheid badinrichtingen en zwemgelegenheden (Bhvbz) aangegeven parameters met een eveneens aangegeven frequentie te controleren of door een extern laboratorium te laten controleren. De betreffende parameters, de onderzoeksfrequentie en de bijbehorende normen zijn in bijlage 4 weergegeven. Alle eigen metingen en de resultaten van de metingen door externe laboratoria zijn na afloop van de bemonsteringsperiode door de zwembadbeheerders ten behoeve van deze studie beschikbaar gesteld.

2. Materiaal en methode

2.1 Monstername

2.1.1 Terugspoelwater filters

Het terugspoelwater van de zwembadfilters in zwembadcomplex I en II werd bemonsterd door een RIVM medewerker, in complex III, IV en V werden de monsters genomen door een vooraf geïnstrueerde technisch medewerker van de zwembaden. In alle baden komt het meeste vuil direct aan het begin van het terugspoelproces van het filter. Er werden daarom monsters van 20-25 L van het eerste terugspoelwater genomen door een deel van de terugspoelstroom in een polypropyleen vat met een volume van 25 L te leiden. Er werd per liter monster 1 ml van een natriumthiosulfaat-oplossing (30 g/L, pH 9,5 ± 0,2, volgens NEN 6559 (Anonymous, 1992)) aan het vat toegevoegd. De vaten werden ongekouwd naar het laboratorium vervoerd; de monsters werden direct na aankomst of de volgende dag, maar altijd binnen 24 uur, geconcentreerd (zie 2.4). Indien de monsters de dag na monstername werden geconcentreerd, werden ze na aankomst gekouwd (2-8 °C) bewaard. Er zijn 153 monsters terugspoelwater genomen en onderzocht op de aanwezigheid van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten.

2.1.2 Peuterbaden

Er zijn 13 monsters van het badwater van twee verschillende peuterbaden genomen. Monstername vond plaats na een periode van hoge belasting van de peuterbaden: aan het einde van een drukke zondagmiddag (bad II), of na het ouder-en-kind zwemmen op woensdagochtend (bad IIIb). Nadat de laatste zwemmer het bad verlaten had werd de circulatie gestopt, zodat het 'vuile' water het bad niet kon verlaten en er geen vers water in stroomde. Tevens werden kleppen gesloten zodat het bad niet leeg geheveld werd. De monstername werd direct gestart en vond plaats door middel van filtratie door een Envirochek HV filter (Pall Gelman, Ann Arbor, USA). In Bijlage 5 is de gebruikte opstelling schematisch weergegeven en is de gevolgde procedure beschreven. Er werden monsters van 200-400 L genomen; de filtratiesnelheid bedroeg 10 L/min. Voor elk monster werd een monstername formulier ingevuld (Bijlage 6). De Envirochek filters werden na bemonstering gekouwd (op smeltend ijs) naar het laboratorium vervoerd en binnen 24 uur bewerkt. Er werd tevens een monster van 1 L voor bacteriologisch onderzoek volgens NEN 6559 (Anonymous, 1992) genomen. Dit monster werd gekouwd (op smeltend ijs) naar het laboratorium vervoerd en binnen 24 uur geanalyseerd.

2.1.3 Instructiebad

Gedurende zes opeenvolgende weken werd wekelijks het badwater van een instructiebad (bad IVb) bemonsterd tijdens het ouder-en-kind-zwemmen. De monsters werden genomen aan de uitlaatzijde van het bad, de plaats waar het vuile water het bad verlaat. De monstername werd direct gestart bij aanvang van de zwemles en werd tot gedurende een half

uur na beëindiging van de zwemles gecontinueerd. Monstername vond plaats door middel van filtratie door een Envirochek HV filter, met een filtratiesnelheid van 10 L/min. Er werden monsters van *ca.* 1000 L genomen.

Er werd tevens een monster van 1 L voor bacteriologisch onderzoek volgens NEN 6559 (Anonymous, 1992) genomen. Dit monster werd gekoeld (op smeltend ijs) naar het laboratorium vervoerd en binnen 24 uur geanalyseerd.

2.2 Bacteriologische en fysisch-chemische parameters

2.2.1 Terugspoelwater

In het laboratorium werden de pH (Sentron 2001-008 pH meter) en de troebelheid (HANNA HI 93703 troebelheidsmeter) van het terugspoelwater gemeten.

2.2.2 Peuterbaden en instructiebad

Ter plaatse werd bij aanvang van de monstername de pH, de troebelheid en de temperatuur van het zwembadwater gemeten. In het instructiebad werden pH en troebelheid halverwege de monstername gemeten en nogmaals na afloop van de monstername.

De monsters genomen voor bacteriologisch onderzoek, werden onderzocht op de aanwezigheid van bacteriën van de coligroep volgens NEN 6553 (Anonymous, 1981a), thermotolerante bacteriën van de coligroep volgens NEN 6552 (Anonymous, 1981b), *Escherichia coli* volgens NEN 6261 (Anonymous, 1990), *Pseudomonas aeruginosa* volgens NEN 6573 (Anonymous, 1987) en sporen van *Clostridium perfringens* volgens Bisson en Cabelli (1979). Er werd per parameter 100 ml in enkelvoud onderzocht. Tevens werd het totaal aantal kweekbare bacteriën per ml bij 37 °C bepaald volgens NEN 6550 (Anonymous, 1979).

2.3 Optimalisatie van de methode

Tijdens het opwerken van de eerste monsters terugspoelwater bleek dat concentratie van de monsters resulteerde in grote slijmerige pellets waar moeilijk mee te werken was. Er werden eveneens resultaten verkregen die deden vermoeden dat de opbrengst van de methode slechter was wanneer kleine volumes (5 L of minder) werden geconcentreerd met behulp van Envirochek HV filters dan wanneer werd geconcentreerd door middel van centrifugeren. Door gebruik te maken van monsters waaraan *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten in bekende concentraties werden toegevoegd is geprobeerd de methode te optimaliseren.

2.3.1 Spiken van monsters

Uit stock-suspensies (*Cryptosporidium*: crypt 700/00, 02-05-2000, Nationaal Instituut voor Diergeneeskundig Onderzoek, Brussel, België; *Giardia*: crypt 822/01, 07-02-2001, Parasitology Research Labs, Neosho, USA) werden spike-suspensies in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS) gemaakt met concentraties van *circa* 1000 *Cryptosporidium* oöcysten en *circa* 1000 *Giardia* cysten per ml. Monsters werden gespiket door aan een vat of fles met een bekend volume monster 1 ml spike-suspensie per liter monster toe te voegen. Aantallen (oö)cysten in de spike-suspensies werden op het moment dat deze gebruikt werden om te spiken in duplo bepaald door middel van een immunofluorescentie assay (IFA), zoals beschreven onder 2.6.

2.3.2 Concentratie van kleine volumes

Van acht monsters terugspoelwater werd in tweevoud 5 L gespiket zoals hierboven beschreven. Eén gespiket monster van 5 L werd geconcentreerd d.m.v. centrifugeren. Hierbij werd het monster verdeeld in porties van 1 L die gedurende 15 min bij 1050x g gekoeld (4 °C) gecentrifugeerd werden (Beckman J6B centrifuge). Het supernatant werd afgezogen tot een restvolume van *ca.* 50-150 ml, vervolgens werd het pellet hierin geresuspendeerd en overgebracht in een conische 175 ml centrifugebuis, waarna nogmaals werd gecentrifugeerd, gedurende 10 min bij 1080x g (Heraeus Megafuge 1.0). Het supernatant werd afgezogen en het volume van het pellet werd bepaald. Het andere gespikete monster van 5 L werd geconcentreerd door middel van Envirochek HV filtratie volgens het protocol in bijlage 5.

2.3.3 Aanzuren van monsters

Een deel van de pellet na concentratie bestaat uit complexen gevormd door vlokmiddelen. Deze vlokmiddelen worden tijdens het zuiveren van het zwembadwater toegevoegd en vormen door chemische reacties vlokken waarin (een deel van) het in zwembadwater aanwezige zwevende vuil wordt gevangen. Het vuil kan zo beter door de zwembadfilters uit het water verwijderd worden. Bij terugspoelen van de filters komen de vlokken in het terugspoelwater terecht. De vlokcomplexen kunnen opgelost worden door toevoeging van zuur aan het water. Deze methode zou toegepast kunnen worden op concentraten van terugspoelwater van zwembadfilters zonder dat dit negatieve gevolgen heeft voor de resultaten (C. Höller, Universiteit Kiel, Duitsland, persoonlijke mededeling).

Aan 20 monsters terugspoelwater (alle 1 L) werd voor concentratie door centrifugeren 1 N HCl toegevoegd in een zodanige hoeveelheid dat de pH werd teruggebracht tot 2,5. De monsters werden na aanzuren gespiket en verder bewerkt zoals hierboven aangegeven. Van alle monsters werd eveneens 1 L gespiket, maar niet aangezuurd, en gelijktijdig op dezelfde wijze opgewerkt. Het pelletvolume werd zowel met als zonder aanzuren gemeten en de recovery van het aantal *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten uit aangezuurde en niet-aangezuurde monsters werd bepaald.

2.3.4 Zuivering m.b.v. FACS

Er is onderzocht of de concentraten van het terugspoelwater gezuiverd konden worden met behulp van een flow cytometer, gebruik makend van Fluorescence Activated Cell Sorting. Hiertoe werden concentraten van 24 monsters terugspoelwater zowel met behulp van immunomagnetische separatie (IMS) als met een Becton Dickinson FACSort flowcytometer gezuiverd. IMS werd uitgevoerd zoals beschreven onder 2.4. Zuivering door FACSort werd uitgevoerd volgens een door Schets en Medema (1995) beschreven procedure. Er werden eveneens drie gespikete monsters met beide methoden gezuiverd en de recovery van het aantal *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten werd bepaald.

2.4 Concentratie

Monsters groter dan 5 L werden gefiltreerd door Envirochek HV filters; de filtratiesnelheid bedroeg 2 L/min. Het gefiltreerde materiaal werd van de filters geëluëerd met 120 ml elutiebuffer (1 g Laureth-12, 10 mM Tris pH 7,4, 1 mM EDTA pH 8,0, 150 µl Antifoam A) door 5 min bij 600 rpm te schudden. Deze stap werd herhaald met opnieuw 120 ml elutiebuffer. Het totale eluaat werd geconcentreerd door gedurende 10 min bij 1080x g te centrifugeren. Het supernatant werd afgezogen en het volume van het pellet werd bepaald. De procedure staat in detail beschreven in bijlage 5. Monsters van 1 tot 5 L werden geconcentreerd door middel van centrifugeren, zoals beschreven onder 2.3.2.

2.5 Zuivering

De waterconcentraten, verkregen via Envirochek HV filtratie of centrifugeren werden gezuiverd met behulp van IMS. Hierbij worden *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten omgeven door magnetische bolletjes die gelabeld zijn met antilichamen die tegen de celwand van de (oö)cysten gericht zijn. Er ontstaan complexen van magnetische bolletjes en (oö)cysten die met behulp van een magneet gescheiden kunnen worden van de rest van de in de suspensie aanwezige deeltjes. De (oö)cysten en de magnetische bolletjes worden weer van elkaar gescheiden door toevoeging van zuur, de (oö)cysten worden zo in gezuiverde vorm verkregen. Er is gebruik gemaakt van Dynabeads GC-Combo (DynaL, Oslo, Noorwegen). Aan 0,5 ml concentraat werd 1 ml 10x SL buffer A en 1 ml 10x SL buffer B toegevoegd. Het volume werd tot 10 ml aangevuld met gedestilleerd water. Er werden 100 µl geresuspendeerde Dynabeads anti-*Cryptosporidium* en 100 µl Dynabeads anti-*Giardia* toegevoegd. Er werd gedurende 1 uur bij kamertemperatuur geïncubeerd op een roterende mixer (25 rpm). Het gevormde complex van Dynabeads en (oö)cysten werd afgevangen met behulp van een magneet (DynaL MPC-1). Het supernatant werd afgezogen en het beads-(oö)cysten complex werd geresuspendeerd in 1 ml 1x SL buffer A. De beads werden van de (oö)cysten los gemaakt door toevoeging van 50 µl 0,1 N HCl, waarna de beads met behulp van een magneet (DynaL MPC-M) werden afgevangen. De gezuiverde (oö)cysten werden op een Dynal Spot-On slide gebracht, gedroogd en gefixeerd door toevoeging van een druppel methanol. De gevolgde procedure staat in detail beschreven in bijlage 7.

2.6 Kleuring en detectie

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

3. Resultaten

3.1 Optimalisatie van de methode

3.1.1 Concentratie van kleine volumes

Gespikete monsters van 5 L zijn geconcentreerd door Envirochek filtratie of door centrifugeren. De recovery van het aantal *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten is bepaald: (aantal teruggevonden oöcysten/aantal gespikete oöcysten) x 100%. Uit tabel 1 blijkt dat voor zowel *Cryptosporidium* als *Giardia* de recovery variabel is. De (geometrisch) gemiddelde recovery is voor beide hoger wanneer een volume van 5 L wordt gecentrifugeerd (10,7 respectievelijk 16,2 %) dan wanneer het wordt gefiltreerd door een Envirochek HV filter (6,8 respectievelijk 9,5 %).

Tabel 1: Vergelijking van de recovery van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten uit gespikete monsters terugspoelwater van zwembadfilter IIIb, geconcentreerd d.m.v. centrifugeren of Envirochek HV filtratie.

| datum | monster-code | pH | troebelheid (NTU) | recovery (%) | | | |
|--------|--------------|-----|-------------------|------------------------|------------|----------------|------------|
| | | | | <i>Cryptosporidium</i> | | <i>Giardia</i> | |
| | | | | centrifuge | Envirochek | centrifuge | Envirochek |
| 290101 | 810/01 | 6,4 | 28 | 6,6 | 14,2 | nd | nd |
| 120201 | 817/01 | 6,5 | 20 | 13,7 | 11,5 | nd | nd |
| 270201 | 825/01 | 6,5 | 30 | 10,1 | 3,8 | 23,1 | 10,5 |
| 130301 | 832/01 | 7,3 | 46 | 18,2 | 6,8 | 23,9 | 14,1 |
| 260301 | 838/01 | 7,4 | 31 | 2,1 | 8,6 | 6,1 | 19,8 |
| 230401 | 849/01 | 7,4 | 36 | 16,8 | 3,9 | 12,7 | 5,1 |
| 210501 | 857/01 | 7,6 | 30 | 12,5 | 6,0 | 19,4 | 7,4 |
| 050601 | 865/01 | 8,1 | 33 | 5,6 | <0,02 | 11,9 | 0,04 |

nd = niet gedaan

3.1.2 Aanzuren van monsters

De recovery van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten uit al of niet aangezuurde gespikete monsters terugspoelwater is, evenals het pellet volume, opgenomen in tabel 2. Hieruit blijkt dat toevoeging van 1 N HCl een reductie van het pelletvolume van gemiddeld 33 % (range 0-62 %) tot gevolg heeft. De recoveries zijn variabel. Indien alle 'kleiner dan' recoveries worden weggelaten bij berekening van het gemiddelde, bedraagt de gemiddelde

recovery voor *Cryptosporidium* bij aanzuren 4,6 %, zonder aanzuren is deze 6,8 %. Voor *Giardia* bedraagt de gemiddelde recovery bij aanzuren 13,6 %, terwijl deze zonder aanzuren 17,4 % is.

Tabel 2: Vergelijking van de recovery van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten uit gespikete monsters terugspoelwater van diverse zwembadfilters, waarbij de monsters al (+ zuur) of niet (- zuur) zijn aangezuurd met 1 N HCl.

| datum | monster- code | filter | pH | troebelheid (NTU) | pellet volume (ml) | | recovery (%) | | | |
|--------|------------------|--------|-----|----------------------|-----------------------|--------|------------------------|--------|----------------|--------|
| | | | | | - zuur | + zuur | <i>Cryptosporidium</i> | | <i>Giardia</i> | |
| | | | | | | | - zuur | + zuur | - zuur | + zuur |
| 201100 | 780/00 | II | 6,2 | 184 | 10 | 5 | <1,0 | 2,0 | <1,0 | 14,8 |
| 290101 | 808/01 | II | 6,4 | 293 | 4 | 3 | 6,3 | 3,6 | nd | nd |
| 120201 | 815/01 | II | 6,4 | 332 | 24 | 14 | <0,3 | <0,1 | nd | nd |
| 270201 | 823/01 | II | 6,3 | 297 | 4,5 | 3 | <0,1 | <0,1 | 6,3 | 1,5 |
| 120301 | 830/01 | II | 6,7 | 171 | 5 | 2 | <0,2 | 0,9 | 10,8 | 13,8 |
| 260301 | 837/01 | II | 6,9 | 237 | 4,5 | 2 | <0,1 | <0,1 | 13,7 | 29,2 |
| 230401 | 847/01 | II | 7,0 | 412 | 10 | 5 | <0,7 | <0,3 | 18,7 | 7,4 |
| 210501 | 855/01 | II | 6,7 | 317 | 6 | 3,5 | 9,4 | 15,2 | 13,4 | 22,8 |
| 050601 | 862/01 | II | 6,8 | 142 | 6 | 4 | 1,5 | 0,8 | 13,5 | 15,0 |
| 050201 | 812/01 | IVa | 6,3 | 142 | 21 | 8 | <0,3 | 0,1 | nd | nd |
| 200201 | 819/01 | IVa | 6,6 | 45 | 5 | 2,5 | <0,2 | <0,1 | nd | nd |
| 060301 | 827/01 | IVa | 5,6 | 14 | 0,5 | 0,5 | 11,8 | 1,0 | 32,2 | 0,1 |
| 200301 | 834/01 | IVa | 6,8 | 50 | 4 | 1,5 | 0,6 | 0,2 | 14,8 | 19,3 |
| 030401 | 841/01 | IVa | 6,8 | 4 | 0,3 | 0,2 | 7,2 | 9,9 | 37,9 | 8,7 |
| 170401 | 844/01 | IVa | 6,9 | 59 | 0,8 | 0,8 | 16,6 | 27,6 | 27,2 | 27,8 |
| 050201 | 814/01 | V | 6,5 | 103 | 2 | 2 | <0,1 | 0,2 | nd | nd |
| 220201 | 821/01 | V | 7,5 | 5 | 0,2 | 0,2 | 4,2 | 4,5 | nd | nd |
| 060301 | 829/01 | V | 6,2 | 105 | 1,5 | 1 | <0,1 | 0,3 | 3,9 | 2,8 |
| 200301 | 836/01 | V | 7,1 | 101 | 1,5 | 1 | <0,2 | 0,3 | 8,0 | 1,0 |
| 030401 | 843/01 | V | 7,0 | 129 | 2 | 2 | 3,2 | 1,9 | 26,2 | 25,8 |

nd = niet gedaan

3.1.3 Zuivering m.b.v. FACS

Bij zuivering van de concentraten van het terugspoelwater met behulp van flow cytometrie bleek dat de slijmerige consistentie van de monsters voor grote problemen zorgde. De concentraten konden zeer moeilijk door de flow cytometer geanalyseerd worden doordat het flowkanaal verstopt raakte; de analyses werden hierdoor tijdrovend en door verlies van materiaal onnauwkeurig. Er zijn drie gespikete concentraten zowel met FACS als met IMS gezuiverd en uit de behaalde recoveries (Tabel 3) blijkt eveneens dat zuivering van deze concentraten met behulp van FACS geen voordelen oplevert ten opzichte van zuivering met behulp van IMS. Dit geldt zowel voor monsters met een lage en een hogere troebelheid.

Tabel 3: Vergelijking van de recovery van Cryptosporidium oöcysten en Giardia cysten uit gespikete monsters terugspoelwater van diverse zwembadfilters gezuiverd m.b.v. IMS of FACS.

| datum | monster- code | filter | pH | troebelheid (NTU) | recovery (%) | | | |
|--------|------------------|--------|-----|----------------------|------------------------|------|----------------|------|
| | | | | | <i>Cryptosporidium</i> | | <i>Giardia</i> | |
| | | | | | IMS | FACS | IMS | FACS |
| 301000 | 771/00 | IVb | 6,5 | 0,4 | 40,8 | 15,2 | 40,1 | 10,6 |
| 211100 | 783/00 | I | 6,5 | 31 | 35,7 | 9,7 | 17,1 | 1,2 |
| 051200 | 790/00 | I | 6,4 | 44 | 1,9 | <0,2 | nd | nd |

nd = niet gedaan

3.2 Analyses van het terugspoelwater van de zwembadfilters

3.2.1 Ruwe data

In bijlage 8 t/m 12 zijn alle ruwe data met betrekking tot de analyse van het terugspoelwater van de zwembadfilters opgenomen. Het betreft hier onder andere de resultaten van de parasitologische analyses en bepaling van de fysisch-chemische parameters. De data zijn per bad, onder code, gerangschikt. In tabel 4 zijn voor de monsters van de verschillende filters een aantal gegevens samengevat.

Tabel 4: Samenvatting van een aantal gegevens betrekking hebbend op onderzochte monsters terugspoelwater van diverse zwembadfilters.

| filter | onderzocht volume (L) | pH | | troebelheid (NTU) | | aantal monsters onderzocht | aantal monsters positief |
|--------|-----------------------------|-----------|-----------|-------------------|-----------|----------------------------------|--------------------------------|
| | | range | gemiddeld | range | gemiddeld | | |
| I | 1 – 2 | 5,6 - 7,4 | 6,6 | 15 - 92 | 51 | 21 | 1 |
| II | 1 – 2 | 5,7 - 7,0 | 6,5 | 105 - 428 | 257 | 22 | 2 |
| IIIa | 2 – 5 | 5,9 - 7,9 | 6,7 | 7,7 - 110 | 36 | 19 | 5 |
| IIIb | 2 – 5 | 6,2 - 8,1 | 6,9 | 6,9 - 82 | 34 | 19 | 1 |
| IVa | 1 – 2 | 5,6 - 7,1 | 6,4 | 3,9 - 390 | 73 | 25 | 4 |
| IVb | 2 – 25 | 5,8 - 7,2 | 6,5 | 0,0 - 30 | 3,8 | 24 | 2 |
| V | 1 – 2 | 6,1 - 7,5 | 6,8 | 0,1 - 168 | 86 | 23 | 3 |

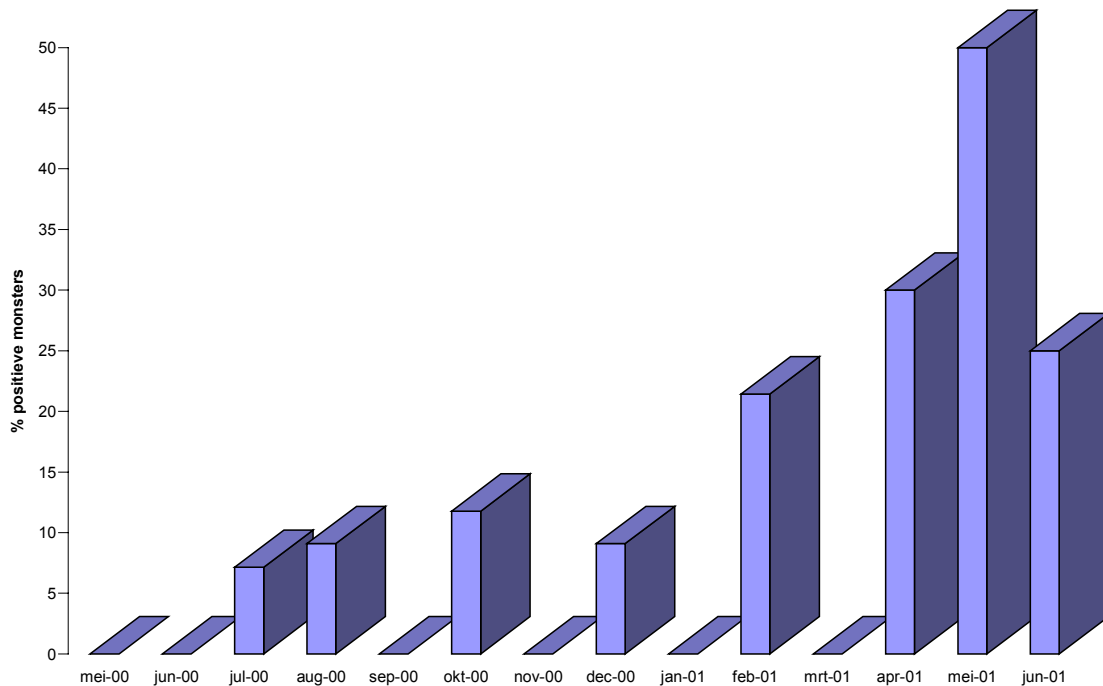
3.2.2 Positieve monsters

Van de 153 onderzochte monsters terugspoelwater zijn er 18 (11,8 %) positief gevonden voor *Cryptosporidium* en/of *Giardia*. Het terugspoelwater van alle filters werd minimaal één keer positief gevonden. In zes monsters (3,9 %) werd alleen *Cryptosporidium* aangetroffen, in negen monsters (5,9 %) alleen *Giardia* en in drie monsters (2,0 %) werd zowel *Cryptosporidium* als *Giardia* aangetoond (Tabel 5). De concentratie gedetecteerde *Cryptosporidium* oöcysten varieerde van 0,11 tot 34 oöcysten per liter terugspoelwater, voor *Giardia* was dit 0,06 tot 24 cysten per liter terugspoelwater.

Tabel 5: Monsters terugspoelwater van diverse zwembadfilters waarin *Cryptosporidium* oöcysten en/of *Giardia* cysten zijn aangetroffen; gedetecteerde aantallen en concentraties per liter terugspoelwater.

| datum | monster-code | filter | pH | troebelheid (NTU) | onderzocht volume (L) | aantal <i>Cryptosporidium</i> | aantal <i>Giardia</i> | concentratie (n/L) | |
|--------|--------------|--------|-----|-------------------|-----------------------|-------------------------------|-----------------------|------------------------|----------------|
| | | | | | | | | <i>Cryptosporidium</i> | <i>Giardia</i> |
| 220501 | 858/01 | I | 6,6 | 89 | 1,0 | 12 | 24 | 12 | 24 |
| 170700 | 722/00 | II | 6,7 | nd | 0,48 | 10 | 0 | 20,8 | <2,1 |
| 240401 | 847/01 | II | 7,0 | 412 | 0,25 | 0 | 1 | <4,0 | 4,0 |
| 091000 | 760/00 | IIIa | 6,4 | 36 | 4,0 | 0 | 1 | <0,25 | 0,25 |
| 231000 | 767/00 | IIIa | 6,6 | 22 | 4,0 | 0 | 1 | <0,25 | 0,25 |
| 051200 | 788/00 | IIIa | 6,0 | 32 | 4,0 | 0 | 2 | <0,25 | 0,5 |
| 210501 | 856/01 | IIIa | 7,3 | 34 | 2,0 | 0 | 1 | <0,5 | 0,5 |
| 050601 | 864/01 | IIIa | 7,9 | 110 | 2,0 | 0 | 1 | <0,5 | 0,5 |
| 270201 | 825/01 | IIIb | 6,5 | 30 | 5,0 | 3 | 1 | 0,6 | 0,2 |
| 070800 | 733/00 | IVa | 6,4 | nd | 0,5 | 17 | 0 | 34 | <2,0 |
| 050201 | 812/01 | IVa | 6,3 | 142 | 0,19 | 1 | 0 | 5,2 | <1,0 |
| 030401 | 841/01 | IVa | 6,8 | 4 | 1,0 | 0 | 2 | <1,0 | 2,0 |
| 010501 | 852/01 | IVa | 6,9 | 59 | 0,50 | 0 | 1 | <2,0 | 2,0 |
| 290500 | 702/00 | IVb | nd | nd | 2,0 | 1 | 0 | 0,5 | <0,5 |
| 290501 | 860/01 | IVb | 6,8 | 2 | 17,2 | 2 | 1 | 0,11 | 0,06 |
| 050201 | 814/01 | V | 6,5 | 103 | 1,0 | 1 | 0 | 1,0 | <1,0 |
| 030401 | 843/01 | V | 7,0 | 129 | 1,0 | 1 | 0 | 1,0 | <1,0 |
| 010501 | 854/01 | V | 7,0 | 168 | 0,5 | 0 | 1 | <2,0 | 2,0 |

In figuur 1 is de frequentieverdeling van de positieve monsters per maand weergegeven, terwijl in tabel 6 de positieve monsters, voor *Cryptosporidium* en *Giardia* afzonderlijk, per seizoen zijn gegroepeerd. In het voorjaar van 2001 werd, zowel voor *Cryptosporidium* als *Giardia*, het grootste aantal positieve monsters gevonden.



Figuur 1: Het percentage monsters terugspoelwater van zwembadfilters waarin *Cryptosporidium* oöcysten en/of *Giardia* cysten is aangetroffen per maand.

Tabel 6: Verdeling van de positieve monsters over de seizoenen.

| seizoen | aantal onderzochte monsters | aantal positief <i>Cryptosporidium</i> | aantal (%) positief <i>Cryptosporidium</i> | aantal positief <i>Giardia</i> | aantal (%) positief <i>Giardia</i> |
|----------|-----------------------------|--|--|--------------------------------|------------------------------------|
| winter | 42 | 3 | (7,1) | 1 | (2,4) |
| voorjaar | 34 | 4 | (11,8) | 8 | (23,5) |
| zomer | 35 | 2 | (5,7) | 0 | (<2,9) |
| herfst | 42 | 0 | (<2,4) | 3 | (7,1) |

3.2.3 Levensvatbaarheid

Van de aangetroffen (oö)cysten in het terugspoelwater is met behulp van de vital dye propidium jodide (PI) bepaald of zij dood waren of niet. Verdeeld over alle positieve monsters zijn 48 *Cryptosporidium* oöcysten aangetroffen. Hiervan waren er 35 (72,9 %) PI positief, dat wil zeggen dood. Zes oöcysten (12,5 %) waren PI negatief en bleken, vastgesteld met behulp van DIC microscopie, slechts uit een lege celwand te bestaan. Vijf oöcysten (10,4 %) die PI negatief waren bleken wel sporozoïten te bevatten en van twee (4,2 %) PI negatieven was dit niet bekend. Er zijn in totaal 37 *Giardia* cysten gedetecteerd, hiervan waren er 30 (81,1 %) PI positief. Eén cyste (2,7 %) was PI negatief, maar had wel inhoud,

van twee andere PI negatieven (5,4 %) was niet bekend of ze een trofozoït bevatten en van vier cysten (10,8 %) is de levensvatbaarheid niet vastgesteld.

3.2.4 Recovery

Naast 60 monsters terugspoelwater is parallel een extra monster genomen voor recovery bepaling; 38 monsters zijn gespiket met *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten, 22 monsters zijn alleen met *Cryptosporidium* oöcysten gespiket. De gemeten recoveries staan vermeld in de overzichtstabel in bijlage 13. In tabel 7 is een samenvatting van de gegevens per filter weergegeven. Er zijn gemiddelde recoveries per filter berekend, waarbij recoveries met een ‘kleiner dan’ teken niet zijn meegerekend. De geometrisch gemiddelde overall recoveries in monsters terugspoelwater van zwembadfilters zijn dan: 9,7 % voor *Cryptosporidium*, 17,4 % voor *Giardia*.

Tabel 7: Recovery van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten uit gespikete monsters terugspoelwater van diverse zwembadfilters.

| filter | <i>Cryptosporidium</i> | | | <i>Giardia</i> | | |
|--------|------------------------|-------------|-----------|------------------|-------------|-----------|
| | aantal spikes | recovery | | aantal spikes | recovery | |
| | | range | gemiddeld | | range | gemiddeld |
| I | 9 | <0,1 – 35,7 | 12,2 | 5 | 3,6 – 24,6 | 14,5 |
| II | 9 | <0,1 – 9,4 | 5,3 | 7 | <1,0 – 18,7 | 12,0 |
| IIIa | 9 | <0,2 – 26,1 | 11,1 | 5 | 4,9 – 30,1 | 18,1 |
| IIIb | 8 | 2,1 – 18,2 | 10,7 | 6 | 6,1 – 23,9 | 16,2 |
| IVa | 8 | <0,2 – 27,6 | 12,5 | 5 | 14,8 – 37,9 | 28,0 |
| IVb | 9 | 1,5 – 40,8 | 8,5 | 6 | 10,8 – 40,1 | 20,8 |
| V | 8 | <0,1 – 4,7 | 3,7 | 4 | 8,0 – 26,2 | 17,2 |

3.3 Analyses van het zwembadwater van peuter- en instructiebaden

3.3.1 Recovery bij hoge filtratiesnelheid

Bij bemonstering van het zwembadwater van peuter- en instructiebaden werd gebruik gemaakt van Envirochek HV filtratie zoals beschreven in bijlage 5. Er werd echter bij een snelheid van 10 L/min gefiltreerd in plaats van bij de door de fabrikant voorgeschreven snelheid van 2 L/min. Hier werd voor gekozen omdat het op deze manier mogelijk was om in de relatief korte beschikbare tijd voor monsternamen, een monster met een groot volume te

nemen. Spike experimenten die in het laboratorium werden uitgevoerd toonden aan dat deze hogere filtratiesnelheid niet tot een lagere recovery leidde. Er werd 100 L leidingwater gespiket op de manier die onder 2.3.1 staat beschreven. De resultaten van deze recovery metingen zijn opgenomen in tabel 8.

Tabel 8: Vergelijking van de recovery van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten uit gespikete monsters leidingwater gefiltreerd met een snelheid van 2 L/min en 10 L/min.

| datum | recovery (%) bij filtratiesnelheid | | | |
|-----------|------------------------------------|----------|----------------|----------|
| | <i>Cryptosporidium</i> | | <i>Giardia</i> | |
| | 2 L/min | 10 L/min | 2 L/min | 10 L/min |
| 300701 | 15,3 | 16,1 | nd | 40,9 |
| 070801 | 11,6 | 12,6 | 35,4 | 37,5 |
| 140801 | 11,3 | 10,9 | 41,8 | 39,2 |
| 180901 | 12,1 | 11,0 | 34,3 | 31,4 |
| 061101 | 3,6 | 4,3 | 24,4 | 36,4 |
| gemiddeld | 10,8 | 11,0 | 34,0 | 37,1 |

nd = niet gedaan

3.3.2 Peuterbaden

In bijlage 14 zijn de ruwe data met betrekking tot de microbiologische analyses en de fysisch-chemische parameters van de monsters zwembadwater van de twee onderzochte peuterbaden opgenomen. Er zijn 13 monsters zwembadwater onderzocht. In geen van de monsters werden bacteriën van de coligroep, thermotolerante bacteriën van de coligroep, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* of (sporen van) *C. perfringens* aangetroffen. In één monster werd een normoverschrijding voor het koloniegetal bij 37 °C aangetoond (1010 kve/ml, norm: ≤ 100 kve/ml). In datzelfde monster werden *Giardia* cysten aangetroffen, de concentratie bedroeg 0,04 /L. Alle *Giardia* cysten (n=13) waren dood, aangetoond met PI kleuring.

3.3.3 Instructiebad

In bijlage 15 zijn de ruwe data met betrekking tot de microbiologische analyses en de fysisch-chemische parameters van de monsters zwembadwater van het onderzochte instructiebad opgenomen. In geen van de monsters werden bacteriën van de coligroep, thermotolerante bacteriën van de coligroep, *E. coli*, *Ps. aeruginosa* of (sporen van) *C. perfringens*

aangetroffen, terwijl ook geen normoverschrijdingen van het koloniegetal bij 37 °C werden waargenomen. De norm voor de troebelheid van het zwemwater werd echter wel overschreden in het monster dat genomen werd aan het begin van de zwemles. Zoals blijkt uit tabel 9, werden in het op 24 september 2001 genomen monster zwemwater hoge concentraties *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten gedetecteerd. Van een 100 van de (oö)cysten in dit monster is de levensvatbaarheid bepaald met behulp van PI: 34 % van de *Cryptosporidium* oöcysten bleek PI positief te zijn, 5 % van de PI negatieve oöcysten had geen inhoud. De overige 61 % was PI negatief en had een inhoud. Van de 100 beoordeelde *Giardia* cysten waren 88,7 % PI positief en had 1,4 % geen inhoud. In het monster van 8 oktober 2001 was 96 % van de beoordeelde *Cryptosporidium* oöcysten PI positief en had 2 % van de PI negatieve oöcysten geen inhoud. De levensvatbaarheid van de gevonden *Giardia* cysten is niet beoordeeld.

Tabel 9: Concentratie Cryptosporidium oöcysten en Giardia cysten in monsters van het zwemwater van een instructiebad; A: voor opening van het bad, B: tijdens therapie zwemmen, C: tijdens ouder-en-kind zwemmen, E: drie uur na beëindiging van de zwemlessen.

| datum | monster-code | concentratie (n/L) | | pH | troebelheid (NTU) |
|--------|--------------|------------------------|----------------|-----|-------------------|
| | | <i>Cryptosporidium</i> | <i>Giardia</i> | | |
| 240901 | 895/01 | 2,31 | 0,12 | 6,9 | 1,64 |
| 011001 | 896/01 | 0,23 | 0,10 | 7,4 | 0,74 |
| 081001 | 897/01A | 0,01 | <0,002 | 7,1 | 0,00 |
| 081001 | 897/01B | 0,04 | 0,005 | 7,2 | 0,00 |
| 081001 | 897/01C | 0,06 | <0,001 | 7,3 | 0,00 |
| 081001 | 897/01E | 0,04 | <0,002 | 7,4 | 0,50 |
| 151001 | 899/01 | 0,004 | 0,001 | 7,0 | 0,00 |
| 221001 | 900/01 | <0,001 | <0,001 | 7,2 | 0,00 |
| 291001 | 903/01 | <0,001 | <0,001 | 7,2 | 0,00 |

In het herhalingsmonster van 1 oktober en de monsters van 8 oktober 2001, die werden genomen om een mogelijke infectiebron te achterhalen, werden eveneens *Cryptosporidium* oöcysten aangetroffen, echter in lagere concentraties. In het monster van 1 oktober 2001 werd ook een overschrijding van de norm voor de troebelheid waargenomen op het moment dat de zwemles begon. De concentratie *Giardia* cysten daalde na 1 oktober 2001 tot rond de detectiegrens, zodat soms wel en soms geen positieve monsters werden gevonden. Vier weken na de eerste detectie van (oö)cysten in het zwemwater, werden de monsters voor beide protozoa negatief gevonden.

3.4 ‘Fecale ongelukjes’

Gedurende een aantal maanden hebben zwembadbeheerders bijgehouden wanneer zij feces in het zwemwater van een van de bassins aantreffen. Vooraf hadden zij aangegeven welke actie zij gebruikelijk in zo'n situatie nemen. Indien de actie die ze in de gerapporteerde gevallen ondernamen daar van afweek, is deze ook vermeld. Uit tabel 10 blijkt dat in de meeste zwembaden in een periode van drie tot vijf maanden enkele keren fecaal materiaal in het zwemwater aangetroffen wordt. De actie die daarop wordt ondernomen bestaat in vrijwel alle gevallen slechts uit het uit het water scheppen van de grove delen. Door het personeel van bad II werd het toegestuurd formulier niet ingevuld, maar zij meldden dat er ongeveer één maal per twee maanden feces in het recreatiebad werd aangetroffen.

Tabel 10: Frequentie waarin beheerders van verschillende zwembaden fecaal materiaal in een van de bassins aantreffen.

| bad | periode | aantal maal | bassin |
|-----|----------------|-------------|--|
| I | maart-juli | 7 | wedstrijdbad (3x), peuterbad (2x), recreatiebad (2x) |
| II | april-mei | 1 | recreatiebad |
| III | maart-juli | 3 | peuterbad |
| IV | maart-mei | 2 | instructiebad |
| V | maart-augustus | 3 | instructiebad |

3.5 Whvbz parameters

Uit de resultaten van de maandelijkse metingen van de verplichte Whvbz parameters door externe laboratoria gedurende het onderzoek naar *Cryptosporidium* en *Giardia*, blijkt dat er in deze monsters (n=128) regelmatig overschrijdingen van de wettelijke normen plaatsvinden (n=35). Hoewel 73 % van de monsters volledig aan de normen voldoet, geldt dit niet voor de overige 27 % van de monsters. In vrijwel alle baden wordt af en toe een overschrijding van de norm voor de concentratie vrij beschikbaar chloor (VBC) gemeten, in alle gevallen (n= 27) betreft het een overschrijding van de bovengrens, dat wil zeggen de concentratie VBC is groter dan 1,5 mg/L. Incidenteel wordt een te hoog kaliumpermanganaat verbruik (n=3) of een te hoge pH (n= 2) gemeten. Een geringe overschrijding van de norm voor het koloniegetal bij 37 °C wordt zeven maal gerapporteerd.

Door de deelnemende zwembaden wordt twee maal per dag de pH, de concentratie VBC en de concentratie gebonden beschikbaar chloor (GBC) gemeten. De metingen die gedurende het onderzoek naar *Cryptosporidium* en *Giardia* aan het einde van de dag zijn gedaan, zijn gebruikt om per bassin en per parameter het aantal normoverschrijdingen vast te stellen.

Verdeeld over tien bassins in vijf zwembadcomplexen zijn 3178 pH metingen opgenomen: er zijn 18 (0,6 %) normoverschrijdingen waargenomen. Van de 2842 metingen van de concentratie GBC overschreden er 12 (0,4 %) de norm. Het grootste percentage overschrijdingen werd gevonden in de concentratie VBC: 15,4 %. In 3195 geteste monsters werd 282 maal (8,8 %) een te lage concentratie VBC gemeten (kleiner dan 0,5 mg/L), 211 maal (6,6 %) was de concentratie VBC te hoog.

3.6 Risicoschattingen

Om een indruk te krijgen van de concentratie range die relevant is voor het oplopen van een *Cryptosporidium* of *Giardia* infectie bij zwemmen in een zwembad, is een puntschatting gemaakt van de maximaal toelaatbare concentraties in zwembadwater. Hiervoor is uitgegaan van een infectierisico van 10^{-4} op jaarbasis, dat wil zeggen dat per jaar één op de 10.000 zwemmers geïnfecteerd raakt. Dit is een vaak gehanteerde en algemeen geaccepteerde risicogrens. Met behulp van de dosis-responsparameters r zoals deze door Teunis *et al.* (1996) zijn vastgesteld en het exponentiële model voor berekening van het infectierisico P_{inf} (Versteegh *et al.*, 1997) :

$$P_{inf} = 1 - e^{-r\mu}$$

zijn voor *Cryptosporidium* en *Giardia* de doses μ berekend die een infectierisico van 10^{-4} per jaar geven, waarbij wordt aangenomen dat een persoon één keer per jaar in een zwembad zwemt (Tabel 11).

Tabel 11: Dosis-responsparameters r en doses μ die een infectierisico van 10^{-4} per jaar geven bij eenmalig zwembadgebruik per jaar.

| | r | μ |
|------------------------|---------|---------|
| <i>Cryptosporidium</i> | 0,00401 | 0,0249 |
| <i>Giardia</i> | 0,0199 | 0,00503 |

Uit deze doses en verschillende ingestievolumes zijn maximaal toelaatbare concentraties *Cryptosporidium* en *Giardia* in zwembadwater berekend die een kans van één op 10.000 per jaar geven om als zwemmer geïnfecteerd te raken (Tabel 12).

Tabel 12: Maximaal toelaatbare concentraties Cryptosporidium en Giardia in zwembadwater bij verschillende ingestievolumes.

| ingestievolume (ml) | concentratie (n/L) <i>Cryptosporidium</i> | concentratie (n/L) <i>Giardia</i> |
|------------------------|--|--------------------------------------|
| 1 | 24,9 | 5,03 |
| 10 | 2,49 | 0,503 |
| 25 | 0,998 | 0,201 |
| 100 | 0,249 | 0,050 |

Het bovenstaande geeft een indruk van de concentraties die relevant zijn in relatie tot het infectierisico. Verder is voor een concreet geval, een instructiebad waarin op 24 september 2001 hoge concentraties *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn gevonden, een schatting gemaakt van het risico op infectie wat de zwemmers ten tijde van die besmetting hebben gelopen. Deze berekening is omgekeerd aan degene die hierboven is uitgevoerd. De concentraties gemeten op 24 september 2001 (Tabel 9) zijn gecorrigeerd voor de gemiddelde recoveries die in het laboratorium zijn gemeten bij een filtratiesnelheid van 10 L/min (Tabel 8). Tevens is rekening gehouden met het percentage levensvatbare (PI negatieve (oö)cysten met inhoud), potentieel infectieuze (oö)cysten zoals dat in deze monsters is vastgesteld. Uit de resulterende concentraties levensvatbare (oö)cysten in het instructiebad (Tabel 13) zijn bij verschillende ingestievolumes de doses berekend (Tabel 14). Met behulp van bovengenoemde dosis-responsrelatie en dosis-responsparameters zijn infectierisico's per blootstelling afhankelijk van het ingestievolume berekend (Tabel 14). Het infectierisico van 10^{-4} wordt voor *Cryptosporidium* bij ingestievolumes van 10 ml of meer overschreden.

Tabel 13: Berekening van de concentratie levensvatbare (oö)cysten op basis van maximaal gemeten concentraties Cryptosporidium en Giardia in een instructiebad.

| | gemeten concentratie (n/L) | recovery (%) | levensvat- baarheid (%) | concentratie levensvatbare (oö)cysten (n/L) |
|------------------------|----------------------------------|-----------------|-------------------------------|---|
| <i>Cryptosporidium</i> | 2,31 | 11,0 | 61,0 | 12,84 |
| <i>Giardia</i> | 0,12 | 37,1 | 9,86 | 0,032 |

Tabel 14: Berekening van het infectierisico bij éénmalige blootstelling aan verschillende doses Cryptosporidium en Giardia in een instructiebad.

| ingestievolume (ml) | dosis | | infectierisico | |
|------------------------|------------------------|----------------|--|----------------------|
| | <i>Cryptosporidium</i> | <i>Giardia</i> | <i>Cryptosporidium</i> | <i>Giardia</i> |
| 1 | 0,0128 | 0,00003 | $5,1 \times 10^{-5}$ | $6,3 \times 10^{-7}$ |
| 10 | 0,1284 | 0,00032 | $5,1 \times 10^{-4}$ | $6,3 \times 10^{-6}$ |
| 25 | 0,3211 | 0,00080 | $1,3 \times 10^{-3}$ | $1,6 \times 10^{-5}$ |
| 100 | 1,284 | 0,00319 | $5,1 \times 10^{-3}$ | $6,3 \times 10^{-5}$ |

4. Discussie

4.1 Detectiemethode

Cryptosporidium en *Giardia* zijn aangetoond in zowel het terugspoelwater van filters van risicobaden zoals peuter- en instructiebaden, als in het zwembadwater van deze baden. Ongeveer 12 % van de terugspoelwater monsters was positief en in ongeveer 8 % van de monsters zwembadwater uit peuterbaden werd *Cryptosporidium* en/of *Giardia* aangetoond. Deze percentages zijn waarschijnlijk een onderschatting van het werkelijke percentage positieve monsters. Terugspoelen van zwembadfilters vindt plaats met grote hoeveelheden water (15-40 m³), hiervan kon slechts een monster van 20-25 liter genomen worden. De monsters waren erg vuil, waardoor er problemen ontstonden met het opwerken en er vaak slechts een klein gedeelte van geanalyseerd kon worden. Er is geprobeerd de problemen met het opwerken van de monsters te ondervangen door de methode zo veel mogelijk te optimaliseren.

Het volume van de pellets die na concentratie van de monsters ontstonden kon aanzienlijk gereduceerd worden door het aanzuren van de monsters alvorens te concentreren. Ondanks het feit dat zo meer concentraat opgewerkt kon worden, was zowel voor *Cryptosporidium* als voor *Giardia* de gemiddelde recovery na aanzuren lager dan wanneer niet werd aangezuurd. De verschillen waren echter niet groot. De lage pH zou de (oö)cysten tot excystatie aanzet kunnen hebben, een aantal van de lege omhulsels zou mogelijk tijdens de opwerkprocedure gedesintegreerd of verloren gegaan kunnen zijn en hierdoor niet meer gedetecteerd zijn. Uit recovery experimenten bleek eveneens dat concentreren van volumes kleiner dan vijf liter met behulp van centrifugeren een hogere opbrengst gaf dan filtratie door een Envirochek HV filter. De opwerkprocedure omvat op deze manier een stap minder en verliezen die in Envirochek HV filters optreden hebben zo geen invloed op het relatief kleine monstervolume. Zuiveren van de verkregen concentraten zou voor laboratoria die in het bezit zijn van een flow cytometer goedkoper en minder bewerkelijk kunnen zijn bij gebruik van Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS). De slijmerige consistentie van de terugspoelwater concentraten maakte echter het gebruik van FACS tijdrovend en inefficiënt, doordat het flowkanaal van de flowcytometer verstopt raakte en er materiaal verloren ging. Dit laatste was terug te zien in de lagere recoveries bij gebruik van FACS.

Het nemen van grote volume monsters van het zwembadwater van de peuterbaden zou te veel tijd in beslag nemen indien met een snelheid van 2 L/min gefiltreerd zou worden. Het Envirochek HV filter kan gebruikt worden zolang de druk tijdens filtratie niet verder oploopt dan 2,1 bar (persoonlijke mededeling Pall Gellman). Dit is bij filtratie van zwembadwater geen probleem en zodoende kon de maximale filtratiesnelheid van de beschikbare pomp van 10 L/min gehanteerd worden. Recovery experimenten toonden slechts een gering verschil in opbrengst aan tussen filtratie met een snelheid van 2 L/min of met 10 L/min.

Uiteindelijk is een methode gekozen waarbij monstervolumes kleiner dan vijf liter werden geconcentreerd door centrifugeren en monstervolumes groter dan vijf liter door Envirochek HV filtratie werden geconcentreerd. Monsters zwembadwater werden gefiltreerd met een snelheid van 10 L/min terwijl voor alle overige monsters een filtratiesnelheid van 2 L/min

werd gehandhaafd. Concentraten werden gezuiverd met behulp van IMS, er werd geen keuze gemaakt tussen al of niet aanzuren van de monsters, de gehele monsterserie werd gebruikt om het verschil tussen wel of niet aanzuren vast te stellen. Gezien het geringe verschil in recovery, de grote reductie van het pelletvolume en de verbeterde mogelijkheden om met IMS te zuiveren zou in het vervolg gekozen kunnen worden voor aanzuren van de monsters terugspoelwater.

Uit analyse van 60 gespikete monsters terugspoelwater die parallel aan 60 'gewone' monsters terugspoelwater werden onderzocht, kon een gemiddelde recovery van 9,7% voor *Cryptosporidium* en 17,4% voor *Giardia* berekend worden. Daarbij dient opgemerkt te worden dat voor deze berekening de 'kleiner dan' recoveries niet zijn gebruikt en de gemiddelde recoveries in werkelijkheid waarschijnlijk lager zullen liggen. De recovery metingen vertoonden de voor deze methode gebruikelijke (Stanfield *et al.*, 2000) spreiding (*Cryptosporidium*: 1,5 - 40,8 %; *Giardia*: 3,6 - 40,1 %).

4.2 Selectie van deelnemers

Naast de tekortkomingen in de methode kan ook de groep zwembaden die uiteindelijk deelnam aan het onderzoek een onderschatting van het aantal positieve monsters hebben veroorzaakt. De baden die uitgenodigd zijn deel te nemen aan dit onderzoek zijn in eerste instantie geselecteerd op basis van hun bereidheid tot deelname aan onderzoek, gebaseerd op ervaringen van een van de externe laboratoria die de maandelijkse controle van de Whvz parameters doet. Uit deze groep van tien hebben vijf baden zich vrijwillig bereid verklaard deel te willen nemen, de overige vijf deden om verschillende redenen liever niet mee. Uit eigen ervaring en ervaring van de controlerende laboratoria is gebleken dat baden die deelnemen aan onderzoek in het algemeen baden zijn die weinig tot geen grote problemen ondervinden met het handhaven van de waterkwaliteit volgens de wettelijke normen en het management van het zwembadcomplex goed geregeld hebben. Zij streven er veelal naar met resultaten van onderzoek en nieuwe inzichten hun voordeel te doen. Mogelijk is dit onderzoek uitgevoerd bij een aantal 'boven gemiddelde' baden en zal het percentage positieve monsters hoger zijn indien een random steekproef uit alle Nederlandse zwembaden wordt onderzocht.

4.3 Positieve monsters terugspoelwater

4.3.1 Seizoensverdeling

Er zijn in dit onderzoek 7 zwembadfilters onderzocht. Alle filters werden minimaal één keer positief gevonden. De filters die vaker dan één keer positief werden gevonden, waren dit verspreid over het monstername jaar en vrijwel nooit op achtereenvolgende monstername data. Er werden gedurende het gehele monstername jaar positieve monsters gevonden, echter een beduidend hoger aantal in de laatste drie maanden van het onderzoek, het tweede kwartaal van 2001. In diezelfde periode in 2000 werd geen vergelijkbare verhoging van het aantal positieve monsters waargenomen. In deze periode bevond het onderzoek zich echter in

de beginfase en hierin traden veel methodische problemen op. Een aantal monsters zou in deze fase ten onrechte als negatief bestempeld kunnen zijn.

In een studie naar het voorkomen van pathogene micro-organismen in feces van patienten met persistente diarree werden *Cryptosporidium* en *Giardia* het meest frekwent geïsoleerd in de na-zomer en herfst (Mank, 1997). Er werd echter ook een lichte verhoging van de incidentie in het voorjaar gezien (T. Mank, Streeklaboratorium Haarlem, persoonlijke mededeling). Verhoogde incidentie in de na-zomer en herfst wordt gezien als najlen van het ontwikkelen van symptomen en laboratoriumonderzoek van feces op infectie na blootstelling aan zwemwater gedurende het badseizoen (Mank, 1997). Het ontbreken van een zomerpiek in de onderzochte zwembaden kan wellicht als volgt verklaard worden. Gedurende de zomermaanden wordt verminderd gebruik gemaakt van de onderzochte binnenbaden: zwemlessen, schoolzwemmen, ouder-en-kind zwemmen en therapeutisch zwemmen worden in deze periode gestopt. De baden worden hierdoor minder belast door de risico-groepen en bovendien vindt recreatief zwemmen in deze periode veel meer plaats in de (niet onderzochte) buitenbassins.

4.3.2 pH en troebelheid

De monsters terugspoelwater waarin *Cryptosporidium* en/of *Giardia* werd gevonden weken in pH of troebelheid niet duidelijk af van de monsters waarin geen (oö)cysten werden gevonden. De troebelheid van de monsters terugspoelwater wordt bepaald door de hoeveelheid vuil (al dan niet gebonden aan vlokmiddel) die werd afgevangen en zou indicatief kunnen zijn voor het aantal aanwezige (oö)cysten. De bemonsteringsprocedure is echter zodanig dat niet telkens exact op het moment van het vrijkomen van de grootste vuilpiek eenzelfde monster genomen kan worden. Een sterke wisseling van de troebelheid van het terugspoelwater monster per filter per keer is het gevolg. Monsters terugspoelwater met een zeer hoge troebelheid zijn bovendien ook degenen die voor problemen bij de analyse zorgen, waardoor mogelijk juist in deze monsters minder gedetecteerd wordt dan in werkelijkheid aanwezig is.

4.3.3 Concentratie en levensvatbaarheid

De concentraties (oö)cysten aangetroffen in het terugspoelwater zijn variabel. In de loop van deze studie is gebleken dat een groot aantal factoren deze gedetecteerde aantallen beïnvloed kunnen hebben. De aantallen (oö)cysten kunnen daarom mogelijk beter beschouwd worden als een semi-kwantitatieve indicatie van aan- of afwezigheid van *Cryptosporidium* en/of *Giardia*. Aanwezigheid van (oö)cysten in het terugspoelwater van zwembadfilters duidt in ieder geval op besmetting van het zwemwater met *Cryptosporidium* en/of *Giardia* op enig moment in de periode voorafgaand aan het terugspoelen. Extrapolatie van de concentraties (oö)cysten in het terugspoelwater naar concentraties in het zwemwater levert getallen op die een geringe realiteitswaarde hebben omdat een groot aantal aannames gedaan zal moeten worden. Het is bijvoorbeeld onbekend hoeveel water er exact door het filter gefiltreerd wordt tussen twee terugspoelbeurten en bovendien zal een besmetting van zwemwater gekenmerkt worden door een initiële hoge piekconcentratie die geleidelijk afneemt in de tijd.

Uit de metingen van de levensvatbaarheid m.b.v. PI blijkt dat de meeste oöcysten (min. ca. 79 %) en cysten (min. ca. 81 %) die uit terugspoelwater geïsoleerd worden dood zijn. Naar alle waarschijnlijkheid is dit het gevolg van de ondervonden stress tijdens verblijf in het zwembadfilter en gedurende het terugspoelproces. Mogelijk heeft de opwerkprocedure ook een negatief effect gehad op de levensvatbaarheid van deze beschadigde (oö)cysten. Het is echter aannemelijk dat op het moment dat (oö)cysten door besmette baders in het zwemwater worden gebracht er levensvatbare en infectieuze (oö)cysten aanwezig zijn en gedurende enige tijd aanwezig blijven. De concentraties chloor die voor zwemwaterbehandeling gebruikt worden (0,5 – 1,5 mg/L VBC) hebben geen snel afdodend effect op met name *Cryptosporidium* oöcysten. De CT₉₉-waarden (concentratie VBC vermenigvuldigd met de contacttijd (in minuten), met als gevolg 99 % inactivatie) die voor *Cryptosporidium* oöcysten worden gerapporteerd zijn hoog: 3700 (Driedger *et al.*, 2000), 7200 (Korich *et al.*, 1990), 8640 (Carpenter *et al.*, 1999) en 9600 (Korich *et al.*, 1990). *Giardia* cysten zijn bij lage watertemperaturen (< 10 °C) enigszins resistent tegen chloor, maar bij gangbare zwembadwater temperaturen van 20 °C of meer worden zij bij een VBC concentratie van 1,5 mg/L binnen 10 min geïnactiveerd, een CT₉₉ waarde van 15 (Jarrol *et al.*, 1981; Porter *et al.*, 1988). Verwijdering van infectieuze (oö)cysten zal hoofdzakelijk door coagulatie en filtratie plaatsvinden. In de periode tussen uitscheiden en verwijdering zullen met name infectieuze *Cryptosporidium* oöcysten een risico voor de zwemmers vormen.

4.4 Positieve monsters zwembadwater

4.4.1 Relatie met Whvbz parameters

In één van 13 onderzochte monsters zwembadwater van peuterbadjes werden *Giardia* cysten aangetroffen, in datzelfde monster vond een normoverschrijding van het koloniegetal bij 37 °C plaats. De norm voor de troebelheid werd enkele malen overschreden, maar niet in het positieve monster. In zeven van negen onderzochte monsters uit een instructiebad werd *Cryptosporidium* en/of *Giardia* aangetroffen, al deze monsters voldeden aan de bacteriologische normen, de norm voor de troebelheid werd twee maal overschreden op het moment dat de zwemlessen aanvingen. Een normoverschrijding voor het koloniegetal bij 37°C geeft aan dat de algehele hygiënische waterkwaliteit onvoldoende is, maar is geen directe indicatie voor fecale verontreiniging van het water. Uit de resultaten van de externe maandelijkse metingen van de Whvbz parameters blijkt dat normoverschrijdingen regelmatig plaatsvinden. In 5 % van de monsters wordt een geringe overschrijding van de norm voor het koloniegetal bij 37 °C gerapporteerd. Verreweg de meeste overschrijdingen betreffen overschrijdingen van de bovengrens van de norm voor de concentratie VBC, dit blijkt zowel uit de externe metingen als uit de dagelijkse metingen door de zwembadbeheerders zelf. De concentratie VBC is vaker (iets) te hoog dan te laag, waardoor desinfectie van het zwemwater met betrekking tot bacteriën en virussen waarschijnlijk geen probleem zal zijn. *Giardia* cysten zullen ook vrij snel worden geïnactiveerd. Het voldoen aan alle Whvbz normen garandeert echter geenszins de afwezigheid van (levensvatbare, potentieel infectieuze) *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten.

4.4.2 Incident instructiebad

Het verloop van de concentraties *Cryptosporidium* en *Giardia* in het bemonsterde instructiebad suggereert dat hier naar alle waarschijnlijkheid sprake is geweest van een besmettingsincident op of kort voor 24 september 2001. Mogelijk heeft op of rond 1 oktober 2001 nogmaals een geringe besmetting plaatsgevonden. Met name de aanwezigheid van een vrijwel gelijke concentratie *Giardia* cysten doet een herbesmetting vermoeden. Na 1 oktober is de concentratie van beide parasieten geleidelijk gedaald. Uit onderzoek naar een mogelijke infectiebron, wat op 8 oktober is uitgevoerd, bleek dat er ook oöcysten aanwezig waren in het monster wat genomen werd voor openstelling van het bad. Noch tijdens het therapeutisch zwemmen noch tijdens het ouder-en-kind zwemmen vond een meetbare herbesmetting van het water plaats. Drie uur na beëindiging van de zwemlessen konden nog steeds oöcysten in vrijwel dezelfde concentratie gedetecteerd worden. Schrobben van de dode hoeken in het bassin en van de bassinwanden alsmede het dagelijks terugspoelen van het filter hadden niet tot gevolg dat er geen (oö)cysten meer in het bassin werden aangetoond. Vermoedens dat het filter van dit bassin niet goed functioneerde werden bevestigd toen de zwembadbeheerder rond 12 oktober 2001 grote scheuren in het filterbed rapporteerde. Door deze 'kanaalvorming' in het filter kan een deel van de waterstroom het filter ongehinderd passeren en met de recirculatie weer in het bassin terechtkomen. Vanaf dit moment werd een meer stringente terugspoelprocedure voor dit filter gehanteerd, waarbij het filterbed krachtiger werd opgewerveld en de scheuren zich in de loop van de tijd konden sluiten. Kort hierna werden geen positieve monsters meer gevonden.

Hieruit blijkt dat filtratie het belangrijkste proces in de zwembadwaterbehandeling is voor verwijdering van oöcysten van pathogene protozoa zoals *Cryptosporidium*. Filtratie verwijdert (oö)cysten echter niet volledig. Zelfs bij een zeer goed functionerend filtratieproces en optimale circulatie van het zwembadwater zijn meerdere turn-over perioden nodig om deeltjes zoals (oö)cysten volledig te verwijderen (Chapman and Rush, 1990).

Verhoging van de troebelheid van het zwembadwater tot boven de norm-waarde gedurende de gehele bemonsteringsperiode werd alleen waargenomen op 24 september 2001. Hier zou het een indicatie voor het niet optimaal functioneren van de zuivering geweest kunnen zijn. In alle overige gevallen dat een verhoging van de troebelheid werd waargenomen, viel dit samen met het gezamenlijk te water gaan van alle deelnemers aan een zwemles. Kort hierna daalde de troebelheid altijd weer naar 0 NTU. Hieruit blijkt dat het zwembadwater aan alle normen uit de Whvzbz kan voldoen en toch (oö)cysten kan bevatten. Het niet optimaal functioneren van de zuivering kon bij de monsters genomen na 24 september 2001 niet afgeleid worden uit één van de procesindicatoren. Bewaking van de efficiëntie van het coagulatie/filtratie proces op een andere manier dan via de huidige wettelijke parameters is dan ook van essentieel belang. Dit zou gedaan kunnen worden door continue monitoring van de troebelheid van het filtraat van de zwembadfilters. Een stijging van de troebelheid kan een indicatie voor verminderde zuiveringsefficiëntie zijn. Regelmatige visuele inspectie van het filterbed kan eveneens een extra veiligheid bieden.

4.5 Fecale besmetting zwembadwater

Door de deelnemende zwembadbeheerders werd regelmatig fecaal materiaal aangetroffen in bijna alle typen bassins, niet alleen in de risicobaden. De frequentie varieerde van ongeveer één keer per twee maanden tot ongeveer twee keer per maand. Het gaat hier om zichtbare, stevige, fecale verontreiniging die, indien mogelijk, met een schepnet uit de bassins verwijderd wordt. In enkele gevallen wordt bij fecale verontreiniging van het water van peuterbadjes de gehele inhoud van het badje vervangen. Bij grotere baden wordt nooit verdere actie ondernomen, wat waarschijnlijk uit het oogpunt van een microbiologisch verantwoorde waterkwaliteit ook niet nodig is. In de Verenigde Staten werd de aanwezigheid van parasieten in vast fecaal materiaal wat in zwembaden werd aangetroffen onderzocht (CDC Recreational Waterborne Disease Working Group, 2001). In geen van de 293 onderzochte feces monsters werd *Cryptosporidium* aangetroffen, 4,4 % van de monsters bevatte *Giardia* cysten. Naast deze zichtbare fecale verontreiniging speelt de in grote bassins nauwelijks op te merken fecale verontreiniging ingebracht door personen met (waterdunne) diarree in relatie tot *Cryptosporidium* en/of *Giardia* besmetting een veel belangrijkere rol. Deze incidenten zijn voor zwembadbeheerders nauwelijks tot niet te detecteren en de mogelijkheid tot het nemen van maatregelen is dan ook volledig afhankelijk van de bereidheid van het zwembadpubliek om zo'n incident te melden. Dit vraagt bekendheid van het publiek met de mogelijkheid van het overdragen en oplopen van onder andere parasitaire infecties via zwembadwater. Een informatie campagne zou kunnen bestaan uit het verspreiden van informatiefolders en –posters die het publiek erop attent maken dat het van belang is om af te zien van zwemmen bij het hebben van gastro-enteritis klachten. Tevens kan benadrukt worden dat het inslikken van zwembadwater zoveel mogelijk moet worden voorkomen. Goede hygiëne voor en tijdens het zwemmen (bv. douchen, handen wassen na toiletbezoek, regelmatig toiletbezoek, hygiënische verwisseling van luiers) dienen onder de aandacht gebracht te worden en het gebruik van zwemluiers voor kinderen die nog niet zindelijk zijn kan worden aanbevolen. Bovendien is goede training van het zwembadpersoneel onontbeerlijk.

Nederlandse zwembadbeheerders zijn niet gewend uitgebreide maatregelen te nemen in het geval van een 'fecaal ongelukje', er zijn daarvoor ook geen richtlijnen. Gezien de frequentie waarin dit echter (zichtbaar) voorkomt, gecombineerd met het aantreffen van *Cryptosporidium* en/of *Giardia* in het terugspoelwater van zwembadfilters en in het zwemwater van peuter- en instructiebaden zou een lijst met richtlijnen opgesteld kunnen worden, gebaseerd op de suggesties en richtlijnen zoals deze in de Verenigde Staten worden gegeven (Anonymous, 2001; Kebabjian, 1995). Er zou hierbij onderscheid gemaakt kunnen worden tussen het nemen van maatregelen bij het aantreffen van vast fecaal materiaal in het zwemwater en het nemen van maatregelen bij melding van diarree in het zwemwater, zoals dit ook door het CDC (Anonymous, 2001) wordt aanbevolen. Een overzicht van de voorgestelde maatregelen is opgenomen in bijlage 16. Tevens wordt een aantal beheersmaatregelen ter voorkoming van het verspreiden van infecties via zwemwater genoemd (Bijlage 17). Een deel van deze aanbevelingen wordt al afgedekt door de Whvbz, terwijl maatregelen, zoals bijv. het ontzeggen van de toegang tot zwembaden aan kinderen

die niet zindelijk zijn of het een aantal keer per maand sluiten van een bassin voor hyperchlorering en 24 uur filterspoelen, praktisch en financieel niet aantrekkelijk zijn. Gezocht zal moeten worden naar een balans tussen wat wenselijk is en wat haalbaar is. Alle gesuggereerde maatregelen dienen bezien te worden in het licht van het infectierisico.

4.6 Indicatief jaar-infectierisico

Het risico om via zwemmen in een zwembad een *Giardia* infectie op te lopen lijkt, gebaseerd op de resultaten van deze studie, gering. Slechts een kleine 10 % van de aangetroffen cysten in het water van een instructiebad op het moment dat de concentratie het hoogst was, bleek potentieel infectieus. Alle cysten die in het water van een peuterbad werden aangetroffen waren dood. Het infectierisico blijft bij inslikken van volumes zwembadwater tot 100 ml onder het algemeen geaccepteerde maximale jaarrisico van één infectie per 10.000 personen. Bij de berekening van het infectierisico is uitgegaan van de concentratie levensvatbare cysten zoals die met PI kleuring en DIC microscopie is bepaald. Niet alle op deze manier als levensvatbaar gekenmerkte *Giardia* cysten zullen echter infectieus zijn. Deze resultaten stroken met de mate van inactivatie door het in zwembaden aanwezige chloor. Bij gangbare zwembadwater temperaturen van meer dan 20 °C en een chloorconcentratie van 1,5 mg/L worden *Giardia* cysten binnen 10 minuten geïnactiveerd (Jarroll *et al.*, 1981). Er zullen dus weinig infectieuze cysten aanwezig zijn en als gevolg daarvan zal het infectierisico laag zijn. In Nederland zijn tot op heden geen explosies van giardiase gerelateerd aan zwembadbezoek bekend. Uit patiënt-controle onderzoek (De Wit *et al.*, 2001a; De Wit *et al.*, 2001b) kwam echter wel een verhoogd risico op het oplopen van een *Giardia* infectie bij zwemmen in een zwembad naar voren. De hoogte van de concentratie *Giardia* cysten in een zwembad en de locatie in het bassin waar de verhoogde concentratie aanwezig is bepalen of een zwemmer blootgesteld wordt, terwijl individuele verschillen met betrekking tot de hoeveelheid zwemwater die iemand binnen krijgt en gevoeligheid voor infectie ook een rol spelen. Van de *Cryptosporidium* oöcysten die werden gevonden in het water van het instructiebad was een veel groter percentage levensvatbaar en daardoor potentieel infectieus. Doordat de geschatte concentratie levensvatbare *Cryptosporidium* oöcysten hoger is, ligt het geschatte infectierisico voor *Cryptosporidium* twee ordes hoger dan voor *Giardia*. Bij inslikken van volumes zwembadwater van 10 ml of meer, wordt het infectierisico van 10^{-4} overschreden. Ook hier moet rekening gehouden worden met het feit dat waarschijnlijk niet alle oöcysten die met PI kleuring en DIC microscopie als levensvatbaar worden beschouwd daadwerkelijk infectieus zijn.

De gekozen range ingestie volumes is arbitrair, het is niet bekend hoeveel water een zwemmer per zwembadbezoek binnen krijgt. Er zullen hierbij zeker individuele verschillen optreden. De resultaten van de risicoschattingen bevestigen de bevindingen in een patiënt-controle onderzoek waaruit een verhoogd risico op het oplopen van een *Cryptosporidium* infectie bij zwemmen in een zwembad blijkt (Van Asperen *et al.*, 1996).

Er dient echter wel rekening gehouden te worden met het feit dat de hier beschreven infectierisico's zijn berekend aan de hand van (oö)cysten concentraties die zijn waargenomen bij één incident in één bassin. Gegevens over de mate waarin de (oö)cysten infectieus zijn,

zijn niet bekend en zowel de gebruikte recovery van de detectiemethode als de aanname van de grootte van het ingestievolumé alsmede de aanname van gemiddeld één zwembadbezoek per jaar aan een besmet bassin, zijn bronnen van onzekerheid in deze berekening. De berekende infectierisico's zijn dan ook meer een indicatie voor de grootteorde waarin het gezondheidsrisico met betrekking tot *Cryptosporidium* en *Giardia* bij gebruik van zwembaden ligt.

5. Conclusies

- *Cryptosporidium* en *Giardia* zijn aangetroffen in zowel terugspoelwater van zwembadfilters van risicobaden als in het zwemwater van peuter- en instructiebaden.
- De meeste *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten uit het terugspoelwater van zwembadfilters waren dood (PI positief), in een instructiebad zijn wel levensvatbare (oö)cysten aangetroffen.
- Het is niet bekend in hoeverre de geïsoleerde *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten infectieus zijn voor de mens.
- Op basis van de resultaten uit deze studie en rekening houdend met de aannames en beperkingen bij de berekening, ligt het geschatte infectierisico voor *Giardia* voor ingestie volumes tot 100 ml onder het algemeen geaccepteerde maximale jaarrisico van 10^{-4} uitgaande van één zwembadbezoek per jaar aan een besmet bassin.
- Op basis van de resultaten uit deze studie en rekening houdend met de aannames en beperkingen bij de berekening, ligt het geschatte infectierisico voor *Cryptosporidium* voor ingestie volumes vanaf 10 ml boven het algemeen geaccepteerde maximale jaarrisico van 10^{-4} uitgaande van één zwembadbezoek per jaar aan een besmet bassin.
- Fecaal materiaal, waarin potentieel infectieuze (oö)cysten aanwezig kunnen zijn, wordt regelmatig in alle typen bassins aangetroffen.

6. Aanbevelingen

Uit dit onderzoek blijkt dat bij zwemmen in een zwembad het oplopen van een infectie met *Cryptosporidium* of *Giardia* niet volledig uit te sluiten is. Daarom wordt dit rapport afgesloten met een aantal aanbevelingen voor beleidsmaatregelen en vervolgonderzoek, die een verlaging van het gezondheidsrisico zouden kunnen bewerkstelligen.

- Het opstellen van richtlijnen voor zwembadbeheerders waarin aangegeven wordt hoe gehandeld dient te worden bij het aantreffen van feces in het zwembadwater. Er kan daarbij onderscheid gemaakt worden tussen het aantreffen van vast fecaal materiaal en het aantreffen of melden van diarree:
 - vast fecaal materiaal: relatief beperkte maatregelen, *Cryptosporidium* wordt in feces met deze consistentie niet of nauwelijks aangetroffen.
 - diarree: uitgebreide maatregelen, de aanwezigheid van *Cryptosporidium* is waarschijnlijker en de kans op infectie groter.
- Het verzorgen van publieksvoorlichting met betrekking tot het belang van goede hygiëne in en om het zwembad en de noodzaak voor patiënten met gastro-enteritis klachten om van gebruik van het zwembad af te zien.
- Onderzoeken of continue monitoring van de troebelheid van het filtraat van zwembadfilters een adequate maatregel is om de kwaliteit van het filtratieproces te bewaken.
- Onderzoeken in welke mate (oö)cysten die in zwembadwater worden aangetroffen infectieus zijn voor de mens.
- Op basis van nieuwe inzichten (bijvoorbeeld bekende fractie infectieuze (oö)cysten) en gebruik makend van andere aannames verder uitwerken van de risicoschatting.

Dankwoord

De auteurs zijn dank verschuldigd aan de beheerders van de deelnemende zwembaden voor de bereidheid tot deelname en de plezierige samenwerking. Een bijzonder woord van dank is gericht aan het technisch personeel van de zwembaden dat altijd behulpzaam klaar stond en zonder wie al de extra onderzoeksvragen die in de loop van het onderzoek naar voren kwamen nooit beantwoord hadden kunnen worden. De auteurs bedanken Dr. E. G. Evers (RIVM-MGB) voor zijn hulp bij de risicoberekeningen, Dr. G. J. Medema (Kiwa Water Research) voor nuttige adviezen zowel tijdens het onderzoek als bij de totstandkoming van dit rapport en Dr. A. M. de Roda Husman (RIVM-MGB) voor het kritisch doornemen van het concept van dit rapport.

Literatuur

Anonymous

Bacteriologisch onderzoek van water – Bepaling van het koloniegetal op glucose-gistextractagar bij 37 °C (NEN 6550)
Nederlands Normalisatie Instituut, Delft, 1979

Anonymous

Bacteriologisch onderzoek van drinkwater – Onderzoek met behulp van membraanfiltratie naar de aanwezigheid van bacteriën van de coligroep (NEN 6553)
Nederlands Normalisatie Instituut, Delft, 1981a

Anonymous

Bacteriologisch onderzoek van drinkwater – Onderzoek met behulp van membraanfiltratie naar de aanwezigheid van thermotolerante bacteriën van de coligroep (NEN 6552)
Nederlands Normalisatie Instituut, Delft, 1981b

Anonymous

Bacteriologisch onderzoek van water – Onderzoek met behulp van membraanfiltratie naar de aanwezigheid van het aantal kolonievormende eenheden van *Pseudomonas aeruginosa* (NEN 6573)
Nederlands Normalisatie Instituut, Delft, 1987

Anonymous

Bacteriologisch onderzoek van water – Onderzoek met behulp van membraanfiltratie naar de aanwezigheid van het aantal kolonievormende eenheden van *Escherichia coli* (NEN 6261)
Nederlands Normalisatie Instituut, Delft, 1990

Anonymous

Bacteriologisch onderzoek van water – Monsterneming en conservering (NEN 6559)
Nederlands Normalisatie Instituut, Delft, 1992

Anonymous

Beschikking van de Minister van Justitie van 27 november 2000, houdende plaatsing in het Staatsblad van de tekst van het Besluit hygiëne en veiligheid badinrichtingen en zwemgelegenheden, zoals dit laatstelijk is gewijzigd bij besluit van 1 november 2000, Stb. 482.
Staatsblad van het Koninkrijk der Nederlanden 508, 2000

Anonymous

Notice to readers: responding to fecal accidents in disinfected swimming venues
MMWR Weekly 2001; 50 (20): 416-417

Arrowood MJ

Diagnosis, in: *Cryptosporidium* and cryptosporidiosis, ed. Fayer R
CRC press, Inc. 1997: 43-64

- Asperen IA van, Stijnen C, Mank T, Boer A de, Groot JF, Medema GJ, Ham P ten, Sluifers JF, Borgdorff MW
An outbreak investigation of cryptosporidiosis in the Netherlands
RIVM report no. 215700 001, Bilthoven, 1996
- Bell A, Guasparini R, Meeds D, Mathias RG, Farley JD
A swimming pool-associated outbreak of cryptosporidiosis in British Columbia
Can J Publ Health 1993; 84 (5): 334-337
- Bisson JW, Cabelli VJ
Membrane filtration enumeration method for *Clostridium perfringens*
Appl Environm Microbiol 1979; 37 (1): 55-66
- Bongard J, Savage R, Dern R, Bostrum H, Kazmierczak J, Keifer S, Anderson H, Davis JP
Cryptosporidium infections associated with swimming pools – Dane County, Wisconsin, 1993
MMWR Weekly 1994; 43 (31): 561-563
- Carpenter C, Fayer R, Trout J, Beach MJ
Chlorine disinfection of recreational water for *Cryptosporidium parvum*
Em Infect Dis 1999; 5 (4): 579-583
- CDC Recreational Waterborne Disease Working Group
Prevalence of parasites in fecal material from chlorinated swimming pools – United States, 1999
MMWR Weekly 2001; 50 (20): 410-412
- Chapman PA, Rush BA
Efficiency of sand filtration for removing *Cryptosporidium* oocysts from water
J Med Microbiol 1990; 32: 243-245
- Driedger AM, Rennecker JL, Marinas BJ
Sequential inactivation of *Cryptosporidium parvum* oocysts with ozone and free chlorine
Wat Res 2000; 34 (14): 3591-3597
- Fayer R, Morgan U, Upton SJ
Epidemiology of *Cryptosporidium*: transmission, detection and identification
Int J Parasitol 2000; 30: 1305-1322
- Furtado C, Adak GK, Stuart JM, Wall PG, Evans HS, Casemore DP
Outbreaks of waterborne infectious intestinal disease in England and Wales, 1992-5
Epidemiol Infect 1998; 121: 109-119
- Galbraith NS
Infections associated with swimming pools
Environm Health 1980; 88: 31-33
- Greensmith CT, Stanwick RS, Elliot BE, Fast MV
Giardiasis associated with the use of a water slide
Pediatr Infect Dis J 1988; 7 (2): 91-94

- Harter L, Frost F, Grunenfelder G, Perkins-Jones K, Libby J
Giardiasis in an infant toddler swim class
Am J Publ Health 1984; 74 (2): 155-156
- Hellard ME, Sinclair MI, Fairley CK, Andrews RM, Bailey M, Dharmage SC, Kirk MD
An outbreak of cryptosporidiosis in an urban swimming pool: why are such outbreaks difficult to detect?
Austr New Zeal J Publ Health 2000; 24 (3): 272-275
- Hunt DA, Sebugwawo S, Edmondson SG, Casemore DP
Cryptosporidiosis associated with a swimming pool complex
Comm Dis Rep 1994; 4 (2): R20-R22
- Jarroll EL, Bingham AK, Meyer EA
Effect of chlorine on *Giardia lamblia* cyst viability
Appl Environm Microbiol 1981; 41 (2): 483-487
- Joce RE, Bruce J, Kiely D, Noah ND, Dempster WB, Stalker R, Gumsley P, Chapman PA, Norman P, Watkins J, Smith HV, Price TJ, Watts D
An outbreak of cryptosporidiosis associated with a swimming pool
Epidemiol Infect 1991; 107: 497-508
- Kebabjian RS
Disinfection of public pools and management of fecal accidents
J Environm Health 1995; 58 (1): 8-12
- Korich DG, Mead JR, Madore MS, Sinclair NA, Sterling CR
Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability
Appl Environm Microbiol 1990; 56 (5): 1423-1428
- Leengoed L van, Hagens T, Boere JA, Straaten DGJ van
Cursus zwemwaterbehandeling niveau B
Centrilab bv, Soest, 1988
- Lemmon JM, McAnulty JM, Bawden-Smith J
Outbreak of cryptosporidiosis linked to an indoor swimming pool
MJA 1996; 165: 613-616
- Lin SD
Giardia lamblia and water supply
J AWWA 1985; 77: 40-47
- MacKenzie WR, Kazmierczak JJ, Davis JP
An outbreak of cryptosporidiosis associated with a resort swimming pool
Epidemiol Infect 1995; 115: 545-553
- Mank TG
Intestinal protozoa and diarrhoea in general practice
Proefschrift Vrije Universiteit Amsterdam, 1997

- Marshall MM, Naumovitz D, Ortega Y, Sterling CR
Waterborne protozoan pathogens
Clin Microbiol Rev 1997; 10 (1): 67-85
- McAnulty JM, Fleming DW, Gonzalez AH
A community-wide outbreak of cryptosporidiosis associated with swimming at a wave pool
JAMA 1994; 272 (20): 1597-1600
- Minshew P, Ward K, Mulla Z, Hammond R, Johnson D, Heber S, Hopkins R
Outbreak of gastroenteritis associated with an interactive water fountain at a beachside park – Florida, 1999
MMWR Weekly 2000; 49 (25):565-568
- Nichols G
Cryptosporidiosis associated with swimming pools in England
Week's News 25 November 1999
- Porter JD, Ragazzoni HP, Buchanon JD, Waskin HA, Juranek DD, Parkin WE
Giardia transmission in a swimming pool
Am J Publ Health 1988; 78 (6): 659-662
- Puech MC, McAnulty JM, Lesjak M, Shaw N, Heron L, Watson JM
A statewide outbreak of cryptosporidiosis in New South Wales associated with swimming at public pools
Epidemiol Infect 2001; 126: 389-396
- Schets FM, Medema GJ
Detection of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in water samples with a Becton Dickinson FACSort flow cytometer
RIVM report nr. 289202004, Bilthoven, 1995
- Sorvillo FJ, Fujioka K, Nahlen B, Tormey MP, Kebabjian R, Mascola L
Swimming-associated cryptosporidiosis
Am J Publ Health 1992; 82 (5): 742-744
- Stanfield G, Carrington E, Albinet F, Compagnon B, Dumoutier N, Hamsch B, Lorthioy A, Medema G, Pezoldt H, de Roubin MR, Lohman A, Whitmore T
An optimised and standardised test to determine the presence of the protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* in water
Wat Sci Tech 2000; 41 (7): 103-110
- Teunis PFM, Heijden OG van der, Giessen JWB van der, Havelaar AH
The dose-response relation in human volunteers for gastro-intestinal pathogens
RIVM report nr. 284550002, Bilthoven, 1996
- Versteegh JFM, Evers EG, Havelaar AH
Gezondheidsrisico's en normstelling voor huishoudwater
RIVM rapport nr. 289202019, Bilthoven, 1997

Veverka F, Shapiro N, Parish MK, York S, Becker W, Smith F, Allensworth C, Baker T, Iwen P, Safraneck T
Protracted outbreaks of cryptosporidiosis associated with swimming pool use – Ohio and Nebraska, 2000
MMWR Weekly 2001; 50 (20): 406-410

Wit MAS de, Koopmans MPG, Kortbeek LM, Wannet WJB, Vinjé J, Leusden F van, Bartelds AIM, Duynhoven YTHP van
Sensor, a population-based cohort study on gastroenteritis in the Netherlands: incidence and etiology
Am J Epidemiol 2001a; 154 (7), 666-674

Wit MAS de, Koopmans MPG, Kortbeek LM, Leeuwen NJ van, Bartelds AIM, Duynhoven YTHP van
Gastroenteritis in sentinel general practices, the Netherlands
Em Infect Dis 2001b; 7 (1): 82-91

Wit MAS de
Risicofactoren voor gastro-enteritis veroorzaakt door *Giardia Lamblia*.
RIVM Notitie, 2001c

Bijlage 1 Verzendlijst

1. DGM, Directeur Drinkwater, Water, Landbouw, Drs. J.A. Suurland
2. Inspecteur Generaal VROM-Inspectie, Mr. G.J.R. Wolters
3. Plaatsvervangend Directeur-Generaal Milieubeheer, Dr. ir. B.C.J. Zoeteman
4. Ir. W. Cramer, VROM/DGM, Directie BWL
5. Dr. B.J.A.M. Haring, VROM/DGM, Directie BWL
6. Dhr. C.J.M. van den Bogaard, VROM-Inspectie Directie Beleidszaken
7. Drs. L. Groen, VROM-Inspectie Regio Noord
8. Dhr. M. Kouwe, VROM-Inspectie Regio Oost
9. Ir. F. Wetsteyn, VROM-Inspectie Regio Noord-West
10. Ir. M. Oversluizen, VROM-Inspectie Regio Noord-West
11. Drs. R.A.G. te Welscher, VROM-Inspectie Regio Zuid-West
12. Ir. F.A.M. Swinkels, VROM-Inspectie Regio Zuid
13. Voorzitter van de Gezondheidsraad, Prof. Dr. J.A. Knottnerus
14. Dhr. H. Ruiter, RIZA, Lelystad
15. Dhr. C. Collé, IPO, Arnhem
16. Dr. G.J. Medema, Kiwa Onderzoek en Advies, Nieuwegein
17. Dhr. H. Veenendaal, secretaris KKBO, Nieuwegein
18. Dr. C. Höller, Universiteit Kiel, Duitsland
19. Dr. A. Wiedenman, Universiteit Tübingen, Duitsland
- 20-29. Beheerders deelnemende zwembaden
- 30-69. Nederlandse GGD'en
- 70-81. Nederlandse Provincies
82. Sportfondsen Nederland NV, Amsterdam
83. Nederlandse vereniging voor zwembadmedewerkers, NieuwVennep
84. Depot Nederlandse Publicaties en Nederlandse Bibliografie, Den Haag
85. Directie RIVM
86. Prof. Dr. ir. D. Kromhout, Directeur Sector VCV
87. Dr. ir. A.M. Henken, Hoofd MGB
88. Dr. ir. A.H. Havelaar, Plaatsvervangend Hoofd MGB
89. Dr. A.M. de Roda Husman, Projectleider Watermicrobiologie
90. Dr. E.G. Evers, MGB
91. Dr. J.W.B. van der Giessen, MGB
92. Drs. L.M. Kortbeek, LIS
- 93-95. Auteur(s)
96. SBC / Communicatie
97. Bureau Rapportenregistratie
98. Bibliotheek RIVM
- 99-108 Bureau Rapportenbeheer
- 109-120 Reserve exemplaren

Bijlage 2 De belangrijkste kenmerken van de baden waarvan het terugspoelwater van de zwembadfilters en/of het zwembadwater is onderzocht.

| zwembad complex | bemonsterde baden | inhoud (m3) | filter* | filtertype | terugspoelen filters | | | water bron | bezoekers in 2000 |
|-----------------|-------------------|-------------|---------|-----------------|----------------------|--------------------|------------|-----------------|-------------------|
| | | | | | frekwentie per week | volume (m3) | tijd (min) | | |
| I | instructiebad | 300 | I | gelaagd | 2 | 25 | 5-10 | leidingwater | 341000 |
| | peuterbad | 4 | I | zandfilter | | | | | |
| | whirlpool | 2 | I | | | | | | |
| II | recreatiebad | 230 | II | neutraal | 2 | 15-20 | 5-10 | bronwater | 304000 |
| | glijbaanbad | 26 | II | koolfilter | | | | | |
| | peuterbad | 3,5 | II | | | | | | |
| III | whirlpool | 5 | II | | 3 | 14 | 5 | bronwater, zout | 133000 |
| | recreatiebad | 160 | IIIa | biflowfilter, | | | | | |
| | glijbaanbad | # | IIIa | zand | | | | | |
| IV | peuterbad | 0,8 | IIIb | | 3 | afh. bad-belasting | 10 | bronwater | 245000 |
| | whirlpool | 65 | IIIb | | | | | | |
| | instructiebad | 104 | IVb | zand-hydro- | | | | | |
| V | glijbaanbad | 26 | IVa | antracietfilter | 1 | 40 | 4-5 | grondwater | 152000 |
| | peuterbad | 2 | IVa | | | | | | |
| | instructiebad | 100 | V | zandfilter | | | | | |

: onbekend

* : indien water van meerdere bassins door hetzelfde filter wordt gezuiverd, staat hetzelfde filternummer vermeld; indien in een complex meerdere filters bemonsterd zijn, zijn deze behalve met een Romeins cijfer aangeduid met een kleine letter

Bijlage 3 Invulformulier toegezonden aan de zwembadbeheerders om het optreden van fecale ongelukjes bij te houden.

invulformulier fecale ongelukjes in zwembaden

| datum | tijdstip | bad | actie anders dan uitscheppen | opmerkingen |
|-------|----------|-----|------------------------------|-------------|
| | | | | |

Bijlage 4 Normen voor zwem- en badwater, in badinrichtingen, ingericht voor het zwemmen of baden anders dan in oppervlaktewater, zoals opgenomen in het Besluit hygiëne en veiligheid bad- en zwemgelegenheden (Anonymous, 2000)

| Parameters en plaatsen van onderzoek | Eenheid | Norm | Frequentie van onderzoek uit te voeren door | |
|---|----------------------------|---|---|----|
| Te meten in het bassin op de plaats waar de waarde naar redelijkerwijs kan worden aangenomen, het ongunstigst is | | | <u>houder</u> <u>laboratorium</u> | |
| Bij 37 °C kweekbare kiemen | aantal per ml | ≤ 100 | | m |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> | aantal per 100 ml | niet aantoonbaar | | 3 |
| Doorzicht | meter | tot bodem | d | m |
| Troebelingsgraad bij uitlaat | FTE | $\leq 0,5$ | | 3 |
| Kaliumpermanganaatverbruik | mg/L | $\leq 70\%$ van het verbruik van het suppletiewater | | m |
| | | +6 | | |
| Zuurgraad | pH | $6,8 \leq \text{pH} \leq 7,8$ | d | m |
| Buffercapaciteit | mmol/L | ≥ 1 | | 3 |
| Ureum | mg/L | $\leq 2,0$ | | m |
| Vrij beschikbaar chloor (VBC) | mg/L | $0,5 \leq \text{VBC} \leq 1,5$ | d | m |
| Vrij beschikbaar chloor indien cyanuurzuur wordt gebruikt | mg/L | $2,0 \leq \text{VBC} \leq 5,0$ | d | m |
| Gebonden beschikbaar chloor | mg/L | $\leq 1,0$ | d | m |
| Cyanuurzuur (indien dit in enigerlei vorm wordt gebruikt) | mg/L | ≤ 50 bij gebruik cyanuurzuur ≤ 100 bij gebruik isocyanuurzuur verbindingen | | m |
| Te meten in het toevoerwater | | | | |
| Ozon (indien als oxydatiemiddel gebruikt) | mg/L | niet aantoonbaar | d | m |
| Te meten op de in het beheersplan Legionella aangegeven risicopunten | | | | |
| Legionella | kolonievormende eenheden/L | niet aantoonbaar | | hj |

m = maandelijks, d = dagelijks, hj = half jaarlijks, 3: indien er aanwijzingen zijn dat de waterkwaliteit ten aanzien van deze parameter niet aan de norm voldoet, dient onderzoek ten aanzien van deze parameter plaats te vinden

Bijlage 5 Protocol voor de concentratie van monsters water met behulp van Envirochek filters zoals dit gebruikt is voor de detectie van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten in (een deel van de) monsters terugspoelwater van zwembadfilters en zwembadwater.

PROTOCOL VOOR CONCENTRATIE VAN MONSTERS WATER T.B.V DETECTIE VAN *CRYPTOSPORIDIUM* OOCYSTEN EN *GIARDIA* CYSTEN M.B.V. ENVIROCHEK FILTERS

concept 28-2-2000

UPDATE 24-1-2002

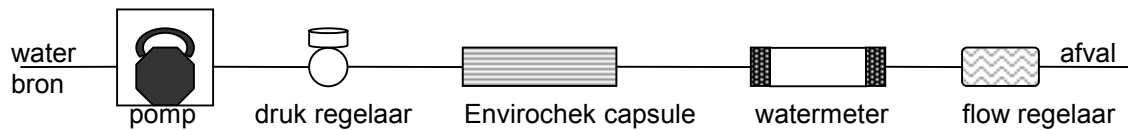
• **Materialen voor monstername**

1. Envirochek filter, 1 filter per monster
2. Slang 12.7 mm diameter
3. Klemmen
4. Watermeter
5. Flow regelaar 2 L/min
6. Pomp
7. Schudmachine voor Envirochek capsules
8. Koelelementen of ijs
9. 250 ml conische centrifuge buizen
10. 50 ml polypropyleen buizen
11. Elutie buffer
 - 1 g Laureth-12
 - 10 ml 1 M Tris, pH 7,4
(121,1 g tris oplossen in 700 ml aqua dest, pH stellen op 7,4 met 1 N HCl of NaOH; filtersteriliseren door 0,2 µm filter)
 - 2 ml 0,5 M EDTA-2 Na
(186,1 g EDTA disodiamsalt dihydraat oplossen in 800 ml aqua dest, pH stellen op 8,0 met 1 N HCl of NaOH)
 - 150 µl antifoam A
 - 1 L aqua dest
 1. 1 g Laureth-12 afwegen in bekersglas
 2. 100 ml aqua dest toevoegen
 3. Verwarmen om Laureth-12 te smelten
 4. Overbrengen naar 1000 ml maatcilinder
 5. Bekersglas aantal keren naspoelen
 6. 10 ml Tris oplossing toevoegen
 7. 2 ml EDTA oplossing toevoegen
 8. 150 µl antifoam toevoegen
 9. Volume tot 1000 ml brengen met aqua dest **LET OP: EINDVOLUME IS 1000 ML !!**

• **Monstername**

1. Groene dopjes van Envirochek capsule verwijderen en bewaren

2. Installatie volgens figuur



3. Voor aansluiten bemonsteringssysteem water 2-3 min laten doorstromen
4. Bemonsteringssysteem aansluiten zonder Envirochek capsule
5. Pomp aanzetten en flow rate instellen op 2 L/min
6. Systeem spoelen met ca. 76 L water
7. Envirochek capsule tussen koppelen, slang op in- en uitstroomopening vastmaken met klemmen
8. Filterhuis beschrijven met monsterlocatie, naam uitvoerder, datum, troebelheid van het monster, beginstand van de watermeter
9. Start de monstername
10. Laat de lucht uit de capsule ontsnappen door het 'ventilatieknopje' (wit) tegen de klok in te draaien, draai weer dicht als het filterhuis gevuld is met water
11. Stop de waterstroom als het monster genomen is, laat de druk langzaam afnemen
12. Noteer de tijd en de eindstand van de watermeter
13. Maak de instroomopening van de Envirochek capsule los, let er hierbij op geen water te morsen, dit water hoort ook bij het monster
14. Sluit de instroomopening af met de groene dop
15. Maak de uitstroomopening van de Envirochek capsule los en laat zoveel mogelijk water weglopen
16. Sluit de uitstroomopening af met de groene dop
17. Bewaar de Envirochek capsule bij 0-8 °C (het monster moet binnen 36 h na monstername opgewerkt zijn)

• Elutie

1. Zet de schudmachine zo neer dat de Envirochek capsules horizontaal in de klemmen geplaatst kunnen worden
2. Bereid voldoende elutie buffer (ca. 250 ml per monster) en voor elk monster een genummerde 250 ml konische centrifugebuis
3. Indien de 'bovenkamer' van de Envirochek capsule water bevat, decanteer dit dan voorzichtig in een genummerde centrifugebuis
4. Houd de capsule rechtop met de instroomopening boven, verwijder het groene dopje
5. Giet elutie buffer (**CA. 130 ML**) in de instroomopening en laat het niveau stabiliseren; er dient zoveel buffer gebruikt te worden, dat het niveau ca. 1 cm boven de bovenkant van het witte gevouwen filter komt; sluit de instroomopening met het groene dopje
6. Zet de capsule in een van de klemmen van de schudmachine, met het ventilatiedopje naar voren op '12 uur'; schud gedurende 5 min, snelheid 600 rpm
7. Haal de capsule uit de schudmachine, verwijder voorzichtig het groene dopje van de instroomopening en decanteer de inhoud van de capsule in een genummerde 250 ml centrifugebuis
8. Giet opnieuw elutie buffer in de instroomopening en laat het niveau stabiliseren; er dient zoveel buffer gebruikt te worden, dat het niveau ca. 1 cm boven de bovenkant van het witte gevouwen filter komt; sluit de instroomopening met het groene dopje

9. Zet de capsule in een van de klemmen van de schudmachine, met het ventilatiedopje naar voren op '3 of 9 uur', schud gedurende 5 min, snelheid 600 rpm
10. Haal de capsule uit de schudmachine, verwijder voorzichtig het groene dopje van de instroomopening en decanteer de inhoud van de capsule in de onder 7 gebruikte 250 ml centrifugebuis

- **Concentratie**

1. Centrifugeer het monster bij 1000-1100 x g gedurende 10-15 min, gebruik geen rem **LET OP: GEBRUIK GEEN REM !!**
2. Noteer het pelletvolume, gebruik een pasteur pipet om het supernatant tot net boven het pellet te verwijderen
3. Indien het pelletvolume 0,5 ml of minder is, voeg dan water toe tot een volume van 10 ml, resuspendeer de pellet
4. Indien het pelletvolume 0,5 ml of meer is, bereken dan de benodigde hoeveelheid water als volgt:

$$\text{totaal benodigd volume} = \frac{\text{pellet volume} \times 10 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}}$$

Note

Stappen 3 en 4 zijn nodig indien met IMS verder gewerkt wordt.

Bijlage 6 Monstergeleideformulier zoals dit gebruikt is bij de bemonstering van het zwembadwater van peuter- en instructiebaden.

MONSTERFORMULIER CRYPTOSPORIDIUM/GIARDIA IN PEUTERBADEN

Datum: _____**Bad:** _____**Voorspoelen:** ja / nee

beginstand watermeter: _____

eindstand watermeter: _____

Monstername

Beginstand watermeter: _____ begintijd: _____

Eindstand watermeter: _____ eindtijd: _____

Volume: _____ liter

Maximale druk over Envirochek filter: _____ bar

Gegevens badwater

pH: _____

troebelheid: _____ NTU

temperatuur: _____ °C

Gegevens badbelasting

Aantal peuters vaste periode: _____

Aantal peuters laatste uur: _____

Aantal volwassenen (zelfde periode als aantal peuters): _____

Bijzonderheden (bv. poep in water): _____

Bijlage 7 Protocol voor immunomagnetische separatie (IMS) van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten uit waterconcentraten gebruikt voor zuivering van concentraten van monsters terugspoelwater van zwembadfilters en monsters zwembadwater.

PROTOCOL VOOR IMMUNOMAGNETISCHE SEPARATIE (IMS) VAN *CRYPTOSPORIDIUM* OOCYSTEN EN *GIARDIA* CYSTEN UIT WATERCONCENTRATEN

concept 22-2-2000

UPDATE 24-1-2002

• **Bereiding van reagentia**

1. Voor elk monster, sub-monster of controle zijn de volgende hoeveelheden buffers nodig: 1 ml van 1x SL-buffer A; 1 ml van 10x SL-buffer A; 1 ml van 10x SL-buffer B.
2. Maak een 1x verdunning van SL-buffer A uit de 10x SL-buffer A. Gebruik (oo)cysten vrij gedemineraliseerd water als verdunningsvloeistof. Neem 100 µl 10xSL-buffer A voor elke 1 ml 1x SL-buffer A die nodig is en verdun tot 1 ml.
3. Bewaar de 1x verdunning van SL-buffer A in een gelabeld buisje, om later in de procedure te gebruiken.
4. Breng 1 ml 10x SL-buffer A in een Dynal L10 tube (60 x 10 mm vlak stuk).
5. Breng in dezelfde buis 1 ml 10x SL-buffer B.

Note

In de 10x SL-buffer A kan na langere opslag bij 0-4 °C neerslag ontstaan. Deze lost op als de buffer op kamertemperatuur is.

• **Isolatie**

1. Bepaal het volume van het waterconcentraat. Breng het monster kwantitatief over in de buis met de SL-buffers en label deze. Spoel de centrifugebuis waarin het monster zat na met (10 ml min het volume van het waterconcentraat) gedemineraliseerd water en breng deze spoelvloeistof ook over in de buis met de SL-buffers.
2. Schud (vortex) het buisje met Dynabeads anti-Cryptosporidium gedurende 10 sec. Controleer of de beads volledig geresuspendeerd zijn door het buisje om te keren en te kijken of er geen rest pellet op de bodem zit.
3. Voeg 100 µl Dynabeads anti-Cryptosporidium aan de buis met het monster en de SL-buffers toe.
4. Schud (vortex) het buisje met de Dynabeads anti-Giardia gedurende 10 sec. Controleer of de beads volledig geresuspendeerd zijn door het buisje om te keren en te kijken of er geen rest pellet op de bodem zit.
5. Voeg 100 µl Dynabeads anti-Giardia aan de buis met het monster, de anti-Cryptosporidium beads en de SL-buffers toe.
6. Maak de Dynal L10 tube vast aan de Dynal mixer en laat gedurende 1 uur bij kamertemperatuur met een snelheid van 15-20 rpm roteren. **25 RPM**
7. Verwijder de buis na minstens 1 uur roteren uit de mixer en plaats hem in de magneet (MPC-1) met de platte kant van de buis naar de magneet.
8. Plaats de magnetische kant van de MPC-1 naar beneden zonder de buis te verwijderen (de buis ligt nu horizontaal, boven de magneet).

9. Zwenk de buis rustig heen en weer in een hoek van ca. 90 °, afwisselend de bodem en de dop omhoog brengend. Ga hier gedurende 2 min mee door met een frekwentie van ca. 1 zwenk per **SEC**.
10. Ga door met de zwenkende beweging om hechting van licht magnetisch of magnetiseerbaar materiaal te voorkomen. Als het monster in magneet MPC-1 langer dan 10 sec stilstaat, herhaal dan stap 9 voordat verder gegaan wordt met de procedure.
11. Zet de MPC-1 rechtop, met de buis vertikaal, dop boven. Verwijder onmiddellijk de dop en decanteer het gehele supernatant. Schud de buis niet en verwijder hem niet uit de MPC-1 gedurende deze stap.
12. Verwijder de buis uit de MPC-1 en resuspendeer het monster in 1 ml 1x SL-buffer A. Meng zeer voorzichtig om al het materiaal te resuspenderen. **Vortex niet !**
13. Breng alle vloeistof uit de Dynal L10 buis kwantitatief over in een gelabeld 1.5 ml microcentrifuge vaatje. Controleer of alle vloeistof en Dynabeads zijn overgebracht. **SPOEL DE BUIS NA MET 200 µl 1x SLA BUFFER**
14. Zet het microcentrifuge vaatje in de Dynal MPC-M magneet.
15. Zwenk de MPC-M met microcentrifuge vaatje(s) rustig onder een hoek van **180 °** Ga gedurende 1 min. door met een frekwentie van ca. 1 zwenk per **SEC**. Aan het eind van deze stap moet het Dynabeads-organisme complex een duidelijk zichtbare bruine vlek op de achterkant van het vaatje vormen.
16. Zuig onmiddellijk het supernatant af, laat het vaatje in de MPC-M zitten. Als meer dan een monster tegelijkertijd wordt opgewerkt, zwenk dan 3 keer voor het verwijderen van het supernatant van het volgende vaatje. Let erop dat het materiaal wat aan de wand van het vaatje bij de magneet zit niet verstoord wordt. Vaatje niet schudden.
17. **ALS HET SUPERNATANT TROEBEL IS, KAN NOGMAALS MET 1 ML 1X SLA BUFFER GEWASSEN WORDEN**

- **Dissociatie van het Dynabeads-cysten/oocysten complex**

1. Verwijder de magnetische strip uit de Dynal MPC-M.
2. Voeg 50 µl **0.1N HCl** toe aan het microcentrifuge vaatje en vortex krachtig gedurende 10 sec.
3. Zet het vaatje in de MPC-M zonder magnetische strip en laat gedurende minimaal 10 min in verticale positie bij kamertemperatuur staan.
4. Vortex nog 10 sec krachtig.
5. Controleer of al het materiaal zich in de punt van het vaatje bevindt en zet het in de MPC-M.
6. Schuif de magneetstrip in de MPC-M en laat het vaatje ongestoord gedurende ca. 10 sec. staan.
7. Maak een Dynal Spot-On slide klaar. Label de slide en breng 5 µl **1N NaOH** in een well.
8. Breng alle vloeistof uit het microcentrifuge vaatje over in de well die de 5 µl NaOH bevat. Let erop dat de beads die tegen de achterwand van het vaatje zitten niet verstoord worden en dat alle vloeistof wordt overgebracht. Haal het vaatje niet uit de MPC-M magneet.

- **Kleuring**

1. Laat het monster op de slide aan de lucht drogen. **DROGEN ONDER EEN MATIG WARME FOHN.**
2. Voeg 1 druppel methanol aan elke well toe en laat deze bij kamertemperatuur verdampen tot de well droog is.

3. Breng op iedere well 50 μ l van een werkverdunding van een FITC-geconjugerd anti-*Cryptosporidium* en anti-*Giardia* monoklonaal antilichaam. Zorg ervoor dat de hele well bedekt is.
4. Leg de slide in een vochtige kamer **OF IN EEN PREPARATENMAP** en incubeer gedurende ca. 30 min in een 37 °C stoof.
5. Gebruik een Pasteur pipet en zuig voorzichtig het monoklonale antilichaam af. Let er op dat de pipet geen krassen in het oppervlak maakt.
6. Breng 65-75 μ l PBS in elke well en laat 1-2 min staan. Zuig vervolgens de overmaat PBS af.
7. Breng 1 druppel (50 μ l) DAPI oplossing (stock 2 mg/ml in methanol, 5000x verdunnen door 10 μ l in 50 ml PBS te brengen) op iedere well en laat dit ca. 2 min. bij kamertemperatuur staan.
8. Gebruik een Pasteur pipet en zuig voorzichtig de DAPI oplossing af.
9. Breng 65-75 μ l PBS in elke well en laat 1-5 min staan. Zuig vervolgens de overmaat PBS af.
10. Laat de slides **in het donker ONDER EEN MATIG WARME FOHN** en breng 10 μ l DABCO-glycerol mounting medium op elke well.
11. Breng een dekglasje aan en lak de randen af met nagellak. Bewaar de slides in het donker.

**PUNTEN 5 T/M 9 VERVALLEN TENZIJ ANDERS VERMELD.
NA PUNT 4 WORDT 5 μ l PI PER WEL TOEGEVOEGD EN WORDT 2 MIN BIJ
KAMERTEMPERATUUR GEINCUBEERD. VERVOLGENS WORDT
AFGESPOELD MET PBS EN WORDT VERVOLGD MET PUNTEN 10 EN 11.**

**Bijlage 8 Overzicht van de analyse data van met IMS gezuiverde monsters
terugspoelwater afkomstig van één van de filters van zwembadcomplex I.**

| datum | monster- code | filter | volume (L) | pellet totaal (ml) | pellet onderzocht (ml) | concentratie d.m.v. | telling Giardia | Crypto | pH | troebel- heid (NTU) |
|--------|------------------|--------|---------------|--------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------|--------|-----|---------------------------|
| 200600 | 710/00 | I | 2,0 | 4,0 | 2,0 | Envirochek | 0 | 0 | 7,0 | nd |
| 040700 | 715/00 | I | 2,0 | 3,0 | 1,5 | Envirochek | 0 | 0 | 6,9 | nd |
| 010800 | 729/00 | I | 1,0 | 2,0 | 2,0 | Envirochek | 0 | 0 | 6,5 | nd |
| 290800 | 741/00 | I | 1,0 | 2,5 | 2,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,5 | 44 |
| 120900 | 748/00 | I | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,8 | 42 |
| 260900 | 753/00 | I | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 5,6 | 36 |
| 101000 | 762/00 | I | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,6 | 90 |
| 231000 | 769/00 | I | 1,0 | 2,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,6 | 73 |
| 071100 | 776/00 | I | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 5,8 | 42 |
| 211100 | 783/00 | I | 1,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,5 | 31 |
| 051200 | 790/00 | I | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 44 |
| 181200 | 797/00 | I | 1,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 39 |
| 150101 | 804/01 | I | 1,0 | 2,5 | 2,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 80 |
| 290101 | 811/01 | I | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 92 |
| 130201 | 818/01 | I | 1,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,6 | 49 |
| 270201 | 826/01 | I | 1,0 | 2,5 | 2,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 68 |
| 130301 | 833/01 | I | 1,0 | 3,0 | 3,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,3 | 32 |
| 260301 | 840/01 | I | 1,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,4 | 15 |
| 230401 | 851/01 | I | 1,0 | 2,5 | 2,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,0 | 37 |
| 220501 | 858/01 | I | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 24 | 12 | 6,6 | 89 |
| 050601 | 863/01 | I | 1,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,9 | 18 |

nd = niet gemeten

**Bijlage 9 Overzicht van de analyse data van met IMS gezuiverde monsters
terugspoelwater afkomstig van één van de filters van zwembadcomplex II.**

| datum | monster- code | filter | volume (L) | pellet totaal (ml) | pellet onderzocht (ml) | concentratie d.m.v. | telling Giardia | Crypto | pH | troebel- heid (NTU) |
|--------|------------------|--------|---------------|--------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------|--------|-----|---------------------------|
| 190600 | 707/00 | II | 2,0 | 4,0 | 2,0 | Envirochek | 0 | 0 | 6,9 | nd |
| 030700 | 714/00 | II | 2,0 | 3,0 | 1,5 | Envirochek | 0 | 0 | 7,0 | nd |
| 170700 | 722/00 | II | 1,0 | 10,5 | 5,0 | centrifugeren | 0 | 10 | 6,7 | nd |
| 310700 | 730/00 | II | 1,0 | 3,0 | 1,5 | Envirochek | 0 | 0 | 6,7 | nd |
| 280800 | 740/00 | II | 1,0 | 11,0 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,6 | 338 |
| 110900 | 747/00 | II | 1,0 | 8,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 5,7 | 192 |
| 250900 | 752/00 | II | 1,0 | 10,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,5 | 240 |
| 091000 | 759/00 | II | 1,0 | 15,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,5 | 404 |
| 231000 | 766/00 | II | 1,0 | 15,0 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,6 | 428 |
| 061100 | 773/00 | II | 1,0 | 11,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,0 | 296 |
| 201100 | 780/00 | II | 1,0 | 10,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,2 | 184 |
| 041200 | 787/00 | II | 1,0 | 14,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,2 | 279 |
| 181200 | 794/00 | II | 1,0 | 4,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 105 |
| 150101 | 801/01 | II | 1,0 | 4,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 154 |
| 290101 | 808/01 | II | 1,0 | 4,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 293 |
| 120201 | 815/01 | II | 1,0 | 24,0 | 4,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 332 |
| 270201 | 823/01 | II | 1,0 | 4,5 | 4,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,3 | 297 |
| 120301 | 830/01 | II | 1,0 | 5,0 | 2,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,7 | 171 |
| 260301 | 837/01 | II | 1,0 | 4,5 | 4,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,9 | 237 |
| 230401 | 847/01 | II | 1,0 | 10,0 | 2,5 | centrifugeren | 1 | 0 | 7,0 | 412 |
| 210501 | 855/01 | II | 1,0 | 6,0 | 6,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,7 | 317 |
| 050601 | 862/01 | II | 1,0 | 6,0 | 3,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,8 | 142 |

nd = niet gemeten

**Bijlage 10 Overzicht van de analyse data van met IMS gezuiverde monsters
terugspoelwater afkomstig van filters van zwembadcomplex III.**

| datum | monster- code | filter | volume (L) | pellet totaal (ml) | pellet onderzocht (ml) | concentratie d.m.v. | telling Giardia | Crypto | pH | troebel- heid (NTU) |
|--------|------------------|--------|---------------|--------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------|--------|-----|---------------------------|
| 190600 | 709/00 | IIIa | 2,0 | 1,0 | 1,0 | Envirochek | 0 | 0 | 7,0 | nd |
| 030700 | 717/00 | IIIa | 2,0 | 2,0 | 1,0 | Envirochek | 0 | 0 | 7,0 | nd |
| 310700 | 731/00 | IIIa | 2,0 | 2,0 | 2,0 | Envirochek | 0 | 0 | 7,0 | nd |
| 280800 | 742/00 | IIIa | 2,0 | 0,3 | 0,3 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,6 | 13 |
| 091000 | 760/00 | IIIa | 2,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 1 | 0 | 6,4 | 36 |
| 231000 | 767/00 | IIIa | 2,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 1 | 0 | 6,6 | 22 |
| 061100 | 774/00 | IIIa | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 5,9 | 8,6 |
| 201100 | 781/00 | IIIa | 2,0 | 3,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,2 | 109 |
| 051200 | 788/00 | IIIa | 2,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 2 | 0 | 6,0 | 32 |
| 181200 | 795/00 | IIIa | 2,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,2 | 56 |
| 150101 | 802/01 | IIIa | 2,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,6 | 7,7 |
| 290101 | 809/01 | IIIa | 2,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,2 | 50 |
| 120201 | 816/01 | IIIa | 2,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,2 | 33 |
| 270201 | 824/01 | IIIa | 2,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,2 | 27 |
| 130301 | 831/01 | IIIa | 2,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,1 | 21 |
| 260301 | 839/01 | IIIa | 2,0 | 0,3 | 0,3 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,3 | 7,9 |
| 230401 | 848/01 | IIIa | 2,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,4 | 16 |
| 210501 | 856/01 | IIIa | 2,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 1 | 0 | 7,3 | 34 |
| 050601 | 864/01 | IIIa | 2,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 1 | 0 | 7,9 | 110 |
| 190600 | 708/00 | IIIb | 2,0 | 0,4 | 0,4 | Envirochek | 0 | 0 | 6,9 | nd |
| 030700 | 716/00 | IIIb | 2,0 | 0,2 | 0,2 | Envirochek | 0 | 0 | 7,0 | nd |
| 310700 | 732/00 | IIIb | 5,0 | 2,0 | 1,0 | Envirochek | 0 | 0 | 7,5 | nd |
| 280800 | 743/00 | IIIb | 5,0 | 0,2 | 0,2 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 6,9 |
| 091000 | 761/00 | IIIb | 2,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,9 | 82 |
| 231000 | 768/00 | IIIb | 5,0 | 3,0 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,9 | 42 |
| 061100 | 775/00 | IIIb | 5,0 | 3,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,5 | 46 |
| 201100 | 782/00 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,7 | 27 |
| 051200 | 789/00 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,2 | 38 |
| 181200 | 796/00 | IIIb | 5,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,6 | 35 |
| 150101 | 803/01 | IIIb | 4,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,0 | 13 |
| 290101 | 810/01 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 28 |
| 120201 | 817/01 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,5 | 20 |
| 270201 | 825/01 | IIIb | 5,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 1 | 3 | 6,5 | 30 |
| 130301 | 832/01 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,3 | 46 |
| 260301 | 838/01 | IIIb | 5,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,4 | 31 |
| 230401 | 849/01 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,4 | 36 |
| 210501 | 857/01 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,6 | 30 |
| 050601 | 865/01 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 8,1 | 33 |

nd = niet gemeten

**Bijlage 11 Overzicht van de analyse data van met IMS gezuiverde monsters
terugspoelwater afkomstig van filters van zwembadcomplex IV.**

| datum | monster- code | filter | volume (L) | pellet totaal (ml) | pellet onderzocht (ml) | concentratie d.m.v. | telling Giardia | Crypto | pH | troebel- heid (NTU) |
|--------|------------------|--------|---------------|--------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------|--------|-----|---------------------------|
| 290500 | 701/00 | IVa | 2,0 | 3,0 | 1,5 | Envirochek | 0 | 0 | nd | nd |
| 260600 | 711/00 | IVa | 2,0 | 4,5 | 2,5 | Envirochek | 0 | 0 | nd | nd |
| 100700 | 718/00 | IVa | 1,0 | 15,0 | 2,0 | Envirochek | 0 | 0 | nd | nd |
| 240700 | 726/00 | IVa | 1,0 | 1,0 | 1,0 | Envirochek | 0 | 0 | 6,7 | 122 |
| 070800 | 733/00 | IVa | 1,0 | 5,0 | 2,5 | centrifugeren | 0 | 17 | 6,4 | nd |
| 210800 | 735/00 | IVa | 1,0 | 13,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 141 |
| 250800 | 739/00 | IVa | 2,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 15 |
| 040900 | 744/00 | IVa | 1,0 | 15,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,6 | 92 |
| 180900 | 749/00 | IVa | 2,0 | 9,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,5 | 7,7 |
| 021000 | 756/00 | IVa | 1,0 | 20,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,3 | 114 |
| 161000 | 763/00 | IVa | 1,0 | 14,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,0 | 59 |
| 301000 | 770/00 | IVa | 1,0 | 6,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,2 | 69 |
| 131100 | 777/00 | IVa | 1,0 | 3,0 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 5,8 | 23 |
| 271100 | 784/00 | IVa | 2,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 5,6 | 12 |
| 111200 | 791/00 | IVa | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,1 | 20 |
| 080101 | 798/01 | IVa | 1,0 | 4,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,6 | 92 |
| 220101 | 805/01 | IVa | 1,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 5,7 | 25 |
| 050201 | 812/01 | IVa | 1,0 | 21,0 | 4,0 | centrifugeren | 0 | 1 | 6,3 | 142 |
| 200201 | 819/01 | IVa | 1,0 | 5,0 | 2,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,6 | 45 |
| 060301 | 827/01 | IVa | 1,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 5,6 | 14 |
| 200301 | 834/01 | IVa | 1,0 | 4,0 | 4,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,8 | 50 |
| 030401 | 841/01 | IVa | 1,0 | 0,3 | 0,3 | centrifugeren | 2 | 0 | 6,8 | 3,9 |
| 170401 | 844/01 | IVa | 1,0 | 0,8 | 0,8 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,1 | 41 |
| 010501 | 852/01 | IVa | 1,0 | 7,0 | 3,5 | centrifugeren | 1 | 0 | 6,9 | 59 |
| 290501 | 859/01 | IVa | 1,0 | 35 | 5,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,7 | 390 |
| 290500 | 702/00 | IVb | 2,0 | 0,2 | 0,2 | Envirochek | 0 | 1 | nd | nd |
| 260600 | 712/00 | IVb | 2,0 | 0,2 | 0,2 | Envirochek | 0 | 0 | nd | nd |
| 100700 | 719/00 | IVb | 5,0 | 1,0 | 0,5 | Envirochek | 0 | 0 | nd | nd |
| 240700 | 727/00 | IVb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | Envirochek | 0 | 0 | 6,9 | 1,0 |
| 070800 | 734/00 | IVb | 5,0 | 0,5 | 0,5 | Envirochek | 0 | 0 | 6,5 | nd |
| 210800 | 736/00 | IVb | 5,0 | 0,3 | 0,3 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,5 | 1,2 |
| 040900 | 745/00 | IVb | 5,0 | 0,1 | 0,1 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,8 | 0,08 |
| 180900 | 750/00 | IVb | 10,0 | 0,2 | 0,2 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,5 | 0,32 |
| 021000 | 757/00 | IVb | 10,0 | 0,2 | 0,2 | Envirochek | 0 | 0 | 6,6 | 0,00 |
| 161000 | 764/00 | IVb | 20,0 | 0,1 | 0,1 | Envirochek | 0 | 0 | 6,0 | 0,00 |
| 301000 | 771/00 | IVb | 10,0 | 0,5 | 0,5 | Envirochek | 0 | 0 | 6,5 | 0,39 |
| 131100 | 778/00 | IVb | 12,5 | 0,1 | 0,1 | Envirochek | 0 | 0 | 6,0 | 0,00 |
| 271100 | 785/00 | IVb | 12,5 | 0,1 | 0,1 | Envirochek | 0 | 0 | 6,0 | 0,11 |

vervolgd op volgende pagina

Bijlage 11 **vervolg**

| datum | monster- code | filter | volume (L) | pellet totaal (ml) | pellet onderzocht (ml) | concentratie d.m.v. | telling Giardia | Crypto | pH | troebel- heid (NTU) |
|--------|------------------|--------|---------------|--------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------|--------|-----|---------------------------|
| 111200 | 792/00 | IVb | 12,0 | 0,1 | 0,1 | Envirochek | 0 | 0 | 6,0 | 0,24 |
| 080101 | 799/01 | IVb | 22,4 | 1,0 | 1,0 | Envirochek | 0 | 0 | 6,6 | 0,32 |
| 220101 | 806/01 | IVb | 25,0 | 0,5 | 0,5 | Envirochek | 0 | 0 | 5,9 | 0,00 |
| 050201 | 813/01 | IVb | 20,0 | 1,0 | 1,0 | Envirochek | 0 | 0 | 6,6 | 1,4 |
| 200201 | 820/01 | IVb | 20,0 | 0,4 | 0,4 | Envirochek | 0 | 0 | 6,9 | 0,07 |
| 060301 | 828/01 | IVb | 20,0 | 0,2 | 0,2 | Envirochek | 0 | 0 | 5,8 | 0,00 |
| 200301 | 835/01 | IVb | 20,0 | 1,5 | 1,5 | Envirochek | 0 | 0 | 7,0 | 8,3 |
| 030401 | 842/01 | IVb | 20,0 | 1,0 | 1,0 | Envirochek | 0 | 0 | 7,0 | 2,5 |
| 170401 | 845/01 | IVb | 20,0 | 5,0 | 5,0 | Envirochek | 0 | 0 | 7,2 | 30 |
| 010501 | 853/01 | IVb | 19,0 | 5,0 | 2,5 | Envirochek | 0 | 0 | 6,8 | 28 |
| 290501 | 860/01 | IVb | 17,2 | 1,0 | 1,0 | Envirochek | 1 | 2 | 6,8 | 2,5 |

nd = niet gemeten

**Bijlage 12 Overzicht van de analyse data van met IMS gezuiverde monsters
terugspoelwater afkomstig van één van de filters van zwembadcomplex V.**

| datum | monster- code | filter | volume (L) | pellet totaal (ml) | pellet onderzocht (ml) | concentratie d.m.v. | telling Giardia | Crypto | pH | troebel- heid (NTU) |
|--------|------------------|--------|---------------|--------------------------|------------------------------|------------------------|--------------------|--------|-----|---------------------------|
| 290500 | 703/00 | V | 2,0 | 0,3 | 0,3 | Envirochek | 0 | 0 | nd | nd |
| 260600 | 713/00 | V | 2,0 | 4,0 | 2,0 | Envirochek | 0 | 0 | nd | nd |
| 100700 | 720/00 | V | 2,0 | 2,0 | 1,0 | Envirochek | 0 | 0 | nd | nd |
| 240700 | 728/00 | V | 2,0 | 4,0 | 2,0 | Envirochek | 0 | 0 | 7,3 | 50 |
| 210800 | 737/00 | V | 1,0 | 0,1 | 0,1 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,9 | 0,91 |
| 040900 | 746/00 | V | 2,0 | 0,3 | 0,3 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,8 | 19 |
| 180900 | 751/00 | V | 1,0 | 2,5 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,3 | 71 |
| 021000 | 758/00 | V | 1,0 | 4,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,5 | 94 |
| 161000 | 765/00 | V | 1,0 | 4,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,6 | 124 |
| 301000 | 772/00 | V | 1,0 | 4,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,4 | 129 |
| 131100 | 779/00 | V | 1,0 | 4,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,1 | 132 |
| 271100 | 786/00 | V | 1,0 | 4,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,5 | 99 |
| 111200 | 793/00 | V | 2,0 | 6,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,2 | 77 |
| 080101 | 800/01 | V | 1,0 | 0,1 | 0,1 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,0 | 0,10 |
| 220101 | 807/01 | V | 1,0 | 5,0 | 2,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,6 | 147 |
| 050201 | 814/01 | V | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 1 | 6,5 | 103 |
| 220201 | 821/01 | V | 1,0 | 0,2 | 0,2 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,5 | 4,8 |
| 060301 | 829/01 | V | 1,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 6,2 | 105 |
| 200301 | 836/01 | V | 1,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,1 | 101 |
| 030401 | 843/01 | V | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 1 | 7,0 | 129 |
| 170401 | 846/01 | V | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,3 | 96 |
| 010501 | 854/01 | V | 1,0 | 4,0 | 2,0 | centrifugeren | 1 | 0 | 7,0 | 168 |
| 290501 | 861/01 | V | 1,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 0 | 7,5 | 74 |

nd = niet gemeten

Bijlage 13 **Recovery van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten uit gespikete monsters terugspoelwater afkomstig van verschillende zwembadfilters.**

| datum | monster- code | filter | volume (L) | pellet totaal (ml) | pellet onderzocht (ml) | concentratie d.m.v. | aantal | | recovery (%) | |
|--------|------------------|--------|---------------|--------------------------|------------------------------|------------------------|--------|---------|--------------|---------|
| | | | | | | | Crypto | Giardia | Crypto | Giardia |
| 211100 | 783/00 | I | 1,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 176 | 84 | 35,7 | 17,1 |
| 051200 | 790/00 | I | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 9 | nd | 1,9 | nd |
| 150101 | 804/01 | I | 1,0 | 2,5 | 2,5 | centrifugeren | 4 | nd | 0,2 | nd |
| 290101 | 811/01 | I | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 263 | nd | 14,4 | nd |
| 130201 | 818/01 | I | 1,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 0 | nd | <0,1 | nd |
| 270201 | 826/01 | I | 1,0 | 2,5 | 2,5 | centrifugeren | 0 | 118 | <0,1 | 11,3 |
| 130301 | 833/01 | I | 1,0 | 3,0 | 3,0 | centrifugeren | 0 | 42 | <0,1 | 3,6 |
| 260301 | 840/01 | I | 1,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 2 | 192 | 0,3 | 15,8 |
| 050601 | 863/01 | I | 1,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 223 | 269 | 20,8 | 24,6 |
| 170700 | 722/00 | II | 1,0 | 10,5 | 5,0 | centrifugeren | 10 | 4 | 4,0 | 1,6 |
| 201100 | 780/00 | II | 1,0 | 10,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | 0 | <1,0 | <1,0 |
| 290101 | 808/01 | II | 1,0 | 4,0 | 2,0 | centrifugeren | 58 | nd | 6,3 | nd |
| 120201 | 815/01 | II | 1,0 | 24,0 | 4,0 | centrifugeren | 0 | nd | <0,3 | nd |
| 120301 | 830/01 | II | 1,0 | 5,0 | 2,5 | centrifugeren | 0 | 62 | <0,2 | 10,8 |
| 260301 | 837/01 | II | 1,0 | 4,5 | 4,5 | centrifugeren | 0 | 167 | <0,1 | 13,7 |
| 230401 | 847/01 | II | 1,0 | 10,0 | 2,5 | centrifugeren | 0 | 58 | <0,7 | 18,7 |
| 210501 | 855/01 | II | 1,0 | 6,0 | 6,0 | centrifugeren | 101 | 149 | 9,4 | 13,4 |
| 050601 | 862/01 | II | 1,0 | 6,0 | 3,0 | centrifugeren | 8 | 74 | 1,5 | 13,5 |
| 051200 | 788/00 | IIIa | 2,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 0 | nd | <0,2 | nd |
| 150101 | 802/01 | IIIa | 2,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 272 | nd | 7,8 | nd |
| 290101 | 809/01 | IIIa | 2,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 357 | nd | 9,8 | nd |
| 120201 | 816/01 | IIIa | 2,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 268 | nd | 7,6 | nd |
| 270201 | 824/01 | IIIa | 2,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 15 | 103 | 0,8 | 4,9 |
| 130301 | 831/01 | IIIa | 2,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 387 | 588 | 18,8 | 25,5 |
| 260301 | 839/01 | IIIa | 2,0 | 0,3 | 0,3 | centrifugeren | 51 | 379 | 3,6 | 15,6 |
| 230401 | 848/01 | IIIa | 2,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 315 | 359 | 26,1 | 14,5 |
| 050601 | 864/01 | IIIa | 2,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 315 | 658 | 14,7 | 30,1 |
| 290101 | 810/01 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 606 | nd | 6,6 | nd |
| 120201 | 817/01 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 1210 | nd | 13,7 | nd |
| 270201 | 825/01 | IIIb | 5,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 463 | 1201 | 10,1 | 23,1 |
| 130301 | 832/01 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 936 | 1378 | 18,2 | 23,9 |
| 260301 | 838/01 | IIIb | 5,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 74 | 373 | 2,1 | 6,1 |
| 230401 | 849/01 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 506 | 787 | 16,8 | 12,7 |
| 210501 | 857/01 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 670 | 1083 | 12,5 | 19,4 |
| 050601 | 865/01 | IIIb | 5,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 301 | 649 | 5,6 | 11,9 |

vervolgd op volgende pagina

Bijlage 13 **vervolg**

| datum | monster- code | filter | volume (L) | pellet totaal (ml) | pellet onderzocht (ml) | concentratie d.m.v. | aantal Crypto | recovery (%) | | |
|--------|------------------|--------|---------------|--------------------------|------------------------------|------------------------|------------------|--------------|--------|---------|
| | | | | | | | | Giardia | Crypto | Giardia |
| 220101 | 805/01 | IVa | 1,0 | 1,0 | 1,0 | centrifugeren | 61 | nd | 3,5 | nd |
| 050201 | 812/01 | IVa | 1,0 | 21,0 | 4,0 | centrifugeren | 0 | nd | <0,3 | nd |
| 200201 | 819/01 | IVa | 1,0 | 5,0 | 2,5 | centrifugeren | 0 | nd | <0,2 | nd |
| 060301 | 827/01 | IVa | 1,0 | 0,5 | 0,5 | centrifugeren | 127 | 402 | 11,8 | 32,2 |
| 200301 | 834/01 | IVa | 1,0 | 4,0 | 4,0 | centrifugeren | 4 | 171 | 0,6 | 14,8 |
| 030401 | 841/01 | IVa | 1,0 | 0,3 | 0,3 | centrifugeren | 50 | 479 | 7,2 | 37,9 |
| 170401 | 844/01 | IVa | 1,0 | 0,8 | 0,8 | centrifugeren | 132 | 347 | 24,1 | 27,2 |
| 010501 | 852/01 | IVa | 1,0 | 7,0 | 3,5 | centrifugeren | 151 | 175 | 27,6 | 27,8 |
| 301000 | 771/00 | IVb | 10,0 | 0,5 | 0,5 | Envirochek | 201 | 197 | 40,8 | 40,1 |
| 220101 | 806/01 | IVb | 25,0 | 0,5 | 0,5 | Envirochek | 1700 | nd | 3,9 | nd |
| 050201 | 813/01 | IVb | 20,0 | 1,0 | 1,0 | Envirochek | 558 | nd | 1,5 | nd |
| 200201 | 820/01 | IVb | 20,0 | 0,4 | 0,4 | Envirochek | 1062 | nd | 5,0 | nd |
| 060301 | 828/01 | IVb | 20,0 | 0,2 | 0,2 | Envirochek | 1468 | 3156 | 6,8 | 12,6 |
| 200301 | 835/01 | IVb | 20,0 | 1,5 | 1,5 | Envirochek | 544 | 2639 | 4,0 | 11,4 |
| 030401 | 842/01 | IVb | 20,0 | 1,0 | 1,0 | Envirochek | 703 | 2722 | 5,0 | 10,8 |
| 010501 | 853/01 | IVb | 19,0 | 5,0 | 2,5 | Envirochek | 403 | 1936 | 4,0 | 16,8 |
| 290501 | 860/01 | IVb | 17,2 | 1,0 | 1,0 | Envirochek | 1090 | 2663 | 5,4 | 12,5 |
| 111200 | 793/00 | V | 2,0 | 6,0 | 2,0 | centrifugeren | 12 | nd | 2,6 | nd |
| 220101 | 807/01 | V | 1,0 | 5,0 | 2,5 | centrifugeren | 0 | nd | <0,1 | nd |
| 050201 | 814/01 | V | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 0 | nd | <0,1 | nd |
| 220201 | 821/01 | V | 1,0 | 0,2 | 0,2 | centrifugeren | 45 | nd | 4,2 | nd |
| 200301 | 836/01 | V | 1,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 92 | <0,2 | 8,0 |
| 030401 | 843/01 | V | 1,0 | 2,0 | 2,0 | centrifugeren | 22 | 331 | 3,2 | 26,2 |
| 010501 | 854/01 | V | 1,0 | 4,0 | 2,0 | centrifugeren | 26 | 120 | 4,7 | 19,0 |
| 290501 | 861/01 | V | 1,0 | 1,5 | 1,5 | centrifugeren | 0 | 170 | <0,1 | 15,7 |

nd = niet gemeten

Bijlage 14 Overzicht van de analyse data van monsters zwembadwater van peuterbaden. De monsters zijn geconcentreerd met behulp van Envirochek filters en gezuiverd met IMS. A parasitologische en fysisch-chemische data, B bacteriologische data.

A

| datum | monster-code | bad | volume (L) | pellet totaal (ml) | pellet onderzocht (ml) | aantal Crypto | Giardia | pH | troebelheid (NTU) | badbelasting aantal peuters |
|--------|--------------|-----|------------|--------------------|------------------------|---------------|---------|-----|-------------------|-----------------------------|
| 130601 | 866/01 | III | 203 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | 7,4 | 0,00 | 26 |
| 200601 | 869/01 | III | 300 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | 7,3 | 0,00 | 21 |
| 270601 | 871/01 | III | 300 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | 7,4 | 0,65 | 25 |
| 040701 | 873/01 | III | 300 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | 7,5 | 0,12 | 20 |
| 110701 | 875/01 | III | 302 | 0,5 | 0,5 | 0 | 13 | 7,4 | 0,00 | 31 |
| 180701 | 879/01 | III | 302 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | 7,4 | 0,18 | 29 |
| 010801 | 882/01 | III | 102 | 0,2 | 0,2 | 0 | 0 | 7,1 | 0,96 | 16 |
| 080801 | 889/01 | III | 302 | 0,2 | 0,2 | 0 | 0 | 7,1 | 1,15 | 33 |
| 170601 | 868/01 | II | 301 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | 7,0 | 0,49 | 25 |
| 240601 | 870/01 | II | 300 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | 6,6 | 0,00 | 16 |
| 010701 | 872/01 | II | 300 | 0,5 | 0,5 | 0 | 0 | 6,6 | 0,00 | 20 |
| 080701 | 874/01 | II | 402 | 0,3 | 0,3 | 0 | 0 | 6,8 | 0,00 | 15 |
| 150701 | 878/01 | II | 402 | 0,3 | 0,3 | 0 | 0 | 7,0 | 1,20 | 25 |

B

| datum | monster-code | bad | Cperf n/100 ml | Ecoli n/100 ml | Psaer n/100 ml | totcol n/100 ml | thcol n/100 ml | kgt37 n/ml |
|--------|--------------|-----|----------------|----------------|----------------|-----------------|----------------|------------|
| 130601 | 866/01 | III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 200601 | 869/01 | III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | nd |
| 270601 | 871/01 | III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 040701 | 873/01 | III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 110701 | 875/01 | III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1010 |
| 180701 | 879/01 | III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 6 |
| 010801 | 882/01 | III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 080801 | 889/01 | III | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 49 |
| 170601 | 868/01 | II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 32 |
| 240601 | 870/01 | II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |
| 010701 | 872/01 | II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
| 080701 | 874/01 | II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 40 |
| 150701 | 878/01 | II | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2 |

Cperf = *Clostridium perfringens*, *Ecoli* = *Escherichia coli*, *Psaer* = *Pseudomonas aeruginosa*,
totcol = bacterien van de coligroep, *thocol* = thermotolerante bacterien van de coligroep,
kgt37 = kweekbare bacterien bij 37 °C, *nd* = niet gemeten

Bijlage 15 Overzicht van analyse data van monsters zwembadwater van een instructiebad. De monsters zijn geconcentreerd met behulp van Envirochek filters en gezuiverd met IMS. A parasitologische en fysisch-chemische data, B bacteriologische data.

A

| datum | monster- code | bad | volume (L) | pellet totaal (ml) | pellet onderzocht (ml) | aantal Crypto | Giardia | pH | troebel- heid (NTU) | badbelasting aantal peuters | aantal ouders |
|--------|------------------|-----|---------------|--------------------------|------------------------------|------------------|---------|-----|---------------------------|-----------------------------------|------------------|
| 240901 | 895/01 | IV | 1000 | 1,7 | 1,7 | 2312 | 120 | 6,9 | 1,64 | 26 | 33 |
| 011001 | 896/01 | IV | 1100 | 2,0 | 2,0 | 257 | 113 | 7,4 | 0,74 | 19 | 20 |
| 081001 | 897/01A | IV | 611 | 0,2 | 0,2 | 8 | 0 | 7,1 | 0,00 | 0 | 0 |
| 081001 | 897/01B | IV | 601 | 0,4 | 0,4 | 22 | 3 | 7,2 | 0,00 | nvt | 24 |
| 081001 | 897/01C | IV | 1001 | 0,8 | 0,8 | 65 | 0 | 7,3 | 0,00 | 19 | 23 |
| 081001 | 897/01E | IV | 606 | 0,5 | 0,5 | 25 | 0 | 7,4 | 0,50 | nvt | 16 |
| 151001 | 899/01 | IV | 1102 | 2,0 | 2,0 | 4 | 1 | 7 | 0,00 | 27 | 27 |
| 221001 | 900/01 | IV | 1001 | 2,0 | 2,0 | 0 | 0 | 7,2 | 0,00 | 30 | 43 |
| 291001 | 903/01 | IV | 1102 | 1,0 | 1,0 | 0 | 0 | 7,2 | 0,00 | 21 | 24 |

nvt = niet van toepassing, A = voor opening bad, B = tijdens therapie zwemmen, C = tijdens ouder en kind zwemmen, E = drie uur na beëindiging zwemlessen

B

| datum | monster- code | bad | Cperf n/100 ml | Ecoli n/100 ml | Psaer n/100 ml | totcol n/100 ml | thcol n/100 ml | kgt37 n/ml |
|--------|------------------|-----|-------------------|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|---------------|
| 240901 | 895/01 | IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0,4 |
| 011001 | 896/01 | IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 2,7 |
| 081001 | 897/01A | IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 23 |
| 081001 | 897/01B | IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 7 |
| 081001 | 897/01C | IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 081001 | 897/01D | IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 5 |
| 081001 | 897/01E | IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 3 |
| 151001 | 899/01 | IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 13 |
| 221001 | 900/01 | IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 66 |
| 291001 | 903/01 | IV | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 20 |

Cperf = Clostridium perfringens, Ecoli = Escherichia coli, Psaer = Pseudomonas aeruginosa, totcol = bacterien van de coligroep, thcol = thermotolerante bacterien van de coligroep, kgt37 = kweekbare bacterien bij 37 °C, A = voor opening bad, B = tijdens therapie zwemmen, C = tijdens ouder en kind zwemmen, D = na afloop ouder en kind zwemmen, E = drie uur na beëindiging zwemlessen

Bijlage 16 Richtlijnen voor het nemen van maatregelen bij aanwezigheid van fecaal materiaal in zwembaden, gebaseerd op Amerikaanse literatuur (Anonymous, 2001; Kebabjian, 1995). Er wordt onderscheid gemaakt tussen vaste feces (A) en diarree (B).

A Vast fecaal materiaal

1. Laat iedereen het bad of de baden verlaten waarin het water wat feces bevat circuleert.
2. Verwijder het fecale materiaal met een schepnet, schep of emmer en desinfecteer deze nadat het fecale materiaal op een hygiënische manier is afgevoerd.
3. Verhoog de concentratie vrij beschikbaar chloor (VBC) naar 2 mg/ L, handhaaf de pH tussen 7,2 en 7,5. Controleer of deze waarden overal bereikt worden door monsternamen op verschillende ver uit elkaar liggende plaatsen.
4. Handhaaf een VBC van 2 mg/L gedurende minimaal 25 min. (Een andere combinatie van VBC en contacttijd is ook mogelijk, zolang de CT-waarde maar gelijk blijft. Hiervoor is een tabel beschikbaar.)
5. Zorg dat het filtratiesysteem in werking is.
6. Hou een logboek van fecale ongelukjes bij. Vermeld hierin datum, tijd, vast fecaal materiaal of diarree, VBC, pH, de gevolgde procedure en de contacttijd.

B Diarree

1. Laat iedereen het bad of de baden verlaten waarin het water wat feces bevat circuleert.
2. Verhoog de concentratie vrij beschikbaar chloor (VBC) naar 20 mg/ L, handhaaf de pH tussen 7,2 en 7,5. Controleer of deze waarden overal bereikt worden door monsternamen op verschillende ver uit elkaar liggende plaatsen.
3. Handhaaf een VBC van 20 mg/L gedurende minimaal 8 h. (Een andere combinatie van VBC en contacttijd is ook mogelijk, zolang de CT-waarde maar 9600 blijft. Hiervoor is een tabel beschikbaar.)
4. Zorg dat het filtratiesysteem in werking is en laat de filters drie tot vier turn-over perioden werken alvorens naar punt 5 te gaan.
5. Spoel het filter terug en loos het terugspoelwater op het riool. Leidt het terugspoelwater in geen geval terug over het filter.
6. In dit stadium kan een bad met een klein volume geleegd, gereinigd en opnieuw gevuld worden.
7. Breng het water weer in chemische balans en handhaaf VBC en pH weer volgens de normen. Zodra dit bereikt is kunnen zwemmers weer tot het bassin worden toegelaten.
8. Hou een logboek van fecale ongelukjes bij. Vermeld hierin datum, tijd, vast fecaal materiaal of diarree, VBC, pH, de gevolgde procedure en de contacttijd.

Bijlage 17 Beheersmaatregelen ter voorkoming van het verspreiden van infecties via zwembadwater (Verveka *et al.*, 2001)

1. Gebruik aparte filters voor risicobaden en overige baden om kruisbesmetting te voorkomen.
2. Optimaliseer de filtratiesnelheid in risicobaden zodanig dat in geval van besmetting de blootstelling zo kort mogelijk is.
3. Zorg voor sanitaire voorzieningen die op korte afstand van de bassins gelegen zijn, in ruime mate aanwezig zijn en goed schoon gehouden worden.
4. Controleer de pH en de VBC regelmatig en stel zonodig bij.
5. Zorg ervoor dat het personeel goed op de hoogte is van de problematiek van verspreiding van infecties via zwembadwater.
6. Stel tijdens zwemlessen eventueel een ‘toilet pauze’ in voor kinderen.