



De inactivatie van MS2 door lage druk en midden druk UV

BTO 2013.027(s)
Mei 2013

De inactivatie van MS2 door lage druk en midden druk UV

BTO 2013.027(s)
Mei 2013

© 2013 KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

Colofon

Titel

De inactivatie van MS2 door lage druk en midden druk UV

Opdrachtnummer

B111633

Rapportnummer

BTO 2013.027(s)

Onderzoeksprogramma

BTO

Projectmanager

Niels Dammers

Opdrachtgever

CvO

Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

Auteur

Luc Hornstra

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar

Samenvatting

In Nederland wordt zowel lage druk (LP-UV) als midden druk (MP-UV) ingezet om drinkwater te desinfecteren. Door het toepassen van UV worden de aanwezige (ziekteverwekkende) micro-organismen in het drinkwater effectief geïnactiveerd. Daarnaast wordt UV ingezet om de aantallen niet pathogene bacteriën in de zuivering te reduceren. Het is al geruime tijd bekend dat UV schade toebrengt aan het genetisch materiaal van bacteriën. Het is echter ook beschreven dat LP-UV en MP-UV verschillen in hun inactiverend effect. Zo is MP-UV bij gelijke dosis effectiever dan LP-UV, en is adenovirus in vergelijking met andere virussen zeer resistent tegen LP-UV, maar niet bijzonder resistent tegen MP-UV. Dit impliceert dat het inactivatiemechanisme van LP-UV wellicht anders is dan dat van MP-UV. In deze studie wordt bacteriofaag MS2 blootgesteld aan verschillende doses LP-UV en MP-UV. Vervolgens wordt de afname in plaque vormende eenheden bepaald, en de schade aan het RNA genoom van MS2 gemeten door middel van Q-PCR. Daarnaast wordt met behulp van ET-PCR vastgesteld of de stabiliteit van het capsid als gevolg van de verschillende UV behandelingen is verminderd. De resultaten laten zien dat MP-UV effectiever MS2 inactieveert dan LP-UV. De schade aan het RNA genoom laat echter zien dat die niet verschilt tussen LP-UV en MP-UV. MP-UV induceert dus niet meer RNA schade dan LP-UV. Verder blijkt dat zowel LP-UV als MP-UV schade toebrengen aan het capsid. Echter in geval van MP-UV ontstaat er meer schade aan het capsid dan bij LP-UV. Hieruit kan worden geconcludeerd dat de grotere inactivatie van MP-UV bij een gelijke dosis, vermoedelijk het gevolg is van een grotere schade aan het capsid. Blootstelling aan LP-UV en MP-UV resulteert dus niet alleen in beschadiging van het erfelijk materiaal, maar ook in beschadiging van eiwitten van het virus, waarbij MP-UV meer letale schade toebrengt aan het capsid dan LP-UV.

Inhoud

Samenvatting	1
Inhoud	3
1 Inleiding	5
2 Materiaal en Methoden	7
2.1 UV desinfectie	7
2.2 Het bepalen van de inactivatie van MS2.	7
2.3 Het bepalen van de RNA schade met behulp van reverse transcriptase (RT-PCR)	7
2.4 ET-PCR om destabilisatie van het capsid te bepalen	9
3 Resultaten	11
3.1 Inactivatie van MS2 door LP-UV en MP-UV	11
3.2 Beschadiging van het RNA genoom van MS2 door LP-UV en MP-UV	14
3.3 Beschadiging van het MS2 capsid door LP-UV en MP-UV	15
4 Discussie	17
4.1 Het meten van RNA schade door middel van Q-PCR	17
4.2 Het type schade aan het RNA van MS2	17
4.3 Het verschil in inactivatie tussen LP-UV en MP-UV	18
4.4 Vertaling van de resultaten naar water uit de praktijk	19
5 Conclusies en aanbevelingen	21
5.1 Conclusies	21
5.2 Aanbevelingen	21
6 Referenties	23

1 Inleiding

In Nederland wordt naast grondwater ook oppervlaktewater gebruikt als grondstof voor drinkwater. Oppervlaktewater bevat echter een aanzienlijk aantal ziekteverwekkende micro-organismen waaronder ziekteverwekkende virussen (Lodder et al 2010), en er is daarom een uitgebreidere zuivering nodig dan de zuivering van grondwater om veilig drinkwater te maken. Om er zeker van te zijn dat tijdens het zuiveringsproces ziekteverwekkende micro-organismen onschadelijk worden gemaakt, is een combinatie van zuiveringsprocessen essentieel. Desinfectieprocessen maken daar een belangrijk onderdeel van uit.

Desinfectie kan plaatsvinden door het toevoegen van oxidatieve chemicaliën als chloor, chloordioxide, ozon etc. Deze technieken hebben echter nadelen, zoals de vorming van schadelijke desinfectiebijproducten, die vanuit gezondheidskundig oogpunt (verdacht) schadelijk kunnen zijn of nagroei van bacteriën kunnen bevorderen. Ook resulteert additie van chloor of chloordioxide in een minder aangename smaak. Bovendien zijn bepaalde micro-organismen, zoals *Cryptosporidium*, *Giardia* en *Mycobacterium avium* goed bestand tegen bijvoorbeeld chlorering.

Ook van UV is bekend dat het micro-organismen kan inactiveren. UV desinfectie heeft daarnaast een aantal voordelen boven de hierbovengenoemde chemicaliën. Zo is bekend dat UV een breed scala aan micro-organismen kan inactiveren, zoals protozoa, bacteriën en virussen (Clancy et al., 2000). Daarnaast is de vorming van bijproducten in het water als gevolg van UV desinfectie afwezig tot gering (Malley et al, 1995).

In Nederland wordt UV desinfectie veel toegepast in de drinkwaterzuivering. Er worden in UV installaties gebruik gemaakt van lagedruk (LP, low pressure) UV lampen en midden druk (MP medium pressure) UV lampen. Lage druk lampen hebben een emissiepiek bij 253,7 nm, terwijl middendruk lampen een breed emissiespectrum hebben met golflengtes tussen de 200 en 370 nm.

Hoewel UV wereldwijd veel wordt toegepast voor de desinfectie van drinkwater, is het exacte mechanisme van inactivatie niet goed bekend. Wat bekend is, is dat UV het genoom (DNA of RNA) beschadigt van het micro-organisme. Bij voldoende genoom schade is het organisme vervolgens niet meer in staat om zich te repliceren, en is het dus onschadelijk. Omdat DNA een absorptiemaximum heeft van 260 nm, en dit vlakbij het de golflengte ligt waarop een LP-UV lamp zijn emissie heeft, is een efficiënte energieoverdracht van de UV straling naar het DNA/RNA te verwachten.

MP-UV heeft geen emissiepiek, maar een emissiespectrum van 200 tot 370 nm. In een MP-UV kunnen meerdere geëmitteerde golflengtes bijdragen aan de inactivatie van de micro-organismen.

Veel gepubliceerde studies maken gebruik van een "collimated beam" experimentele opzet, waarbij gebruik wordt gemaakt van gestandaardiseerde berekeningen om de dosis van LP-UV en MP-UV lampen te berekenen (Bolton and Linden, 2003). Hierdoor zijn de resultaten van collimated beam experimenten redelijk goed met elkaar te vergelijken.

In gevalideerde collimated beam experimenten is de inactivatie van verschillende virussen door LP en MP-UV vergeleken. Uit deze gegevens blijkt dat MP-UV bij een gelijke dosis resulteert in een hogere inactivatie van bacteriofaag MS2 (Malley, 2004) (Linden et al, 2007). Zo geeft blootstelling van MS2 aan 60 mJ/cm² LP-UV een inactivatie van ongeveer 3 logeenheden, maar een gelijke dosis MP-UV resulteert in ongeveer 6 logeenheden inactivatie. MP-UV is dus bij een gelijke dosis veel effectiever. Ook voor rotavirus SA11, echovirus 1, bovine calicivirus en adenovirus is MP-UV effectiever (Malley, 2004). Met name voor adenovirus is dat van belang omdat adenovirussen zeer goed bestand zijn tegen LP-UV, en daarmee maatgevend zijn voor de benodigde UV dosis voor desinfectie (Eischeid, 2009).

MP-UV is dus bij een gelijke dosis beter in staat om virussen te inactiveren. Het mechanisme hierachter is echter niet bekend. Wel is bekend dat niet alleen de emissie dicht bij het absorptiemaximum van RNA/DNA bijdraagt, maar dat ook de golflengtes beneden de 240 nm een belangrijke bijdrage leveren aan de inactivatie (Linden, 2007). Waarschijnlijk tasten de andere golflengtes ook andere virusonderdelen (capside eiwitten) aan.

Gelijktijdig met het uitvoeren van deze studie is een artikel verschenen waarin ook werd gekeken naar het effect van UV op het inactivatiemechanisme van MS2. Dit artikel liet zien dat naast UV schade ook

schade aan het capsid ontstaat bij MS2. Deze studie werd echter uitgevoerd met LP-UV (Pecson et al, 2009).

De in deze rapportage beschreven studie heeft als doel om de inactivatie van virussen (met MS2 als surrogaatvirus) door LP-UV en MP-UV te onderzoeken, en hierbij meer inzicht te verkrijgen in het inactivatiemechanisme van LP-UV en MP-UV voor virussen.

2 Materiaal en Methoden

2.1 UV desinfectie

Voor UV desinfectie is gebruik gemaakt van een collimated beam opstelling. De UV dosis werd bepaald door middel van de berekeningstabel zoals opgesteld door Bolton en Linden (2003). In deze tabel worden alle factoren die van belang zijn bij collimated beam experimenten, zoals water absorptie, divergentie, gevoeligheid van de sensor, en verschillen in "germicidal" effect tussen LP-UV en MP-UV, meegenomen in de dosisberekening. De bacteriofagen werden opgenomen in een 5 mM fosfaatbuffer met een pH van 7.8. Bacteriofagen werden blootgesteld aan de straling van LP-UV, respectievelijk MP-UV in oplopende doses van 0 tot 500 mJ/cm². Tijdens de UV bestraling werden de monsters constant met een roervlo in beweging gehouden.

Na de bestraling werden monsters genomen om:

1. De afsterving van MS2 te bepalen door middel van het bepalen van het aantal plaque vormende eenheden/ml.
2. De beschadiging te bepalen van het RNA door middel van reverse transcriptase Q-PCR
3. De beschadiging te bepalen van het capsid door middel van ET (enzymatic treatment) PCR.

2.2 Het bepalen van de inactivatie van MS2.

Bacteriofaag MS2 was afkomstig van Gap Enviromicrobial Services (London, Ontario, Canada) en de stock oplossing had een concentratie van ongeveer 1×10^{11} pve/ml.

Bacteriofaag MS2 werd aangetoond door middel van plaquevormende eenheden te tellen op een agar plaat met gastheer-bacteriën volgens KWR labvoorschriften LMB-037. In het kort is de gevolgde werkwijze: het watermonster of een verdunning daarvan werd in een petrischaal gemengd met semi-solid agarmedium en een cultuur van de gastheerstam. De petrischalen werden vervolgens 24 uur geïncubeerd bij 37 °C. Na incubatie werd het aantal heldere zones geteld (plaques) en de aantallen werden omgerekend naar het aantal plaquevormende eenheden per ml (pve/ml).

Van elk monster werden meerdere verdunningen ingezet en werd de best telbare plaat geselecteerd voor de telling. De gastheer voor MS2 was *S. typhimurium* WG49.

2.3 Het bepalen van de RNA schade met behulp van reverse transcriptase (RT-PCR)

Het genoom van MS2 bestaat uit een RNA molecuul met een lengte van 3569 nucleotiden. Om hierop een PCR uit te kunnen voeren wordt van het RNA eerst cDNA gemaakt met behulp van het enzym reverse transcriptase. De reverse primer dient als startpunt voor het enzym reverse transcriptase. Het cDNA is vervolgens de template voor de PCR. PCR werd uitgevoerd met primers zoals hieronder aangegeven in de tabel. De positie van de PCR primers en het door de PCR gegenereerde amplicon zijn te zien in figuur 1.

Door gebruik te maken van reverse primer 3569 r, die is gepositioneerd op het 3' uiteinde van het RNA molecuul, wordt het gehele RNA afgeschreven en een full length cDNA gemaakt. Indien het RNA beschadigt raakt, in de vorm van een breuk of een verandering van de RNA structuur, dan zal dit van invloed zijn op de lengte van het te synthetiseren cDNA. In het geval van een breuk in het RNA molecuul, zal cDNA worden gesynthetiseerd tot de breuk, waarna de synthese niet verder kan en stopt. Indien UV straling resulteert in breuken in het RNA, dan zal met het toenemen van de UV dosis ook het aantal RNA moleculen met beschadiging door breuken toenemen. Dit heeft als gevolg dat er minder full

length RNA moleculen aanwezig zijn. Hierdoor wordt er ook minder van de 5' kant van het RNA molecuul omgezet in cDNA.

Met behulp van Q(uantitative)-PCR kan het verschil in hoeveelheid cDNA aan de 5' kant worden vergeleken met de hoeveelheid cDNA in het midden of aan de 3' kant van het RNA. Op deze wijze is de mate van schade door middel van Q-PCR te detecteren.

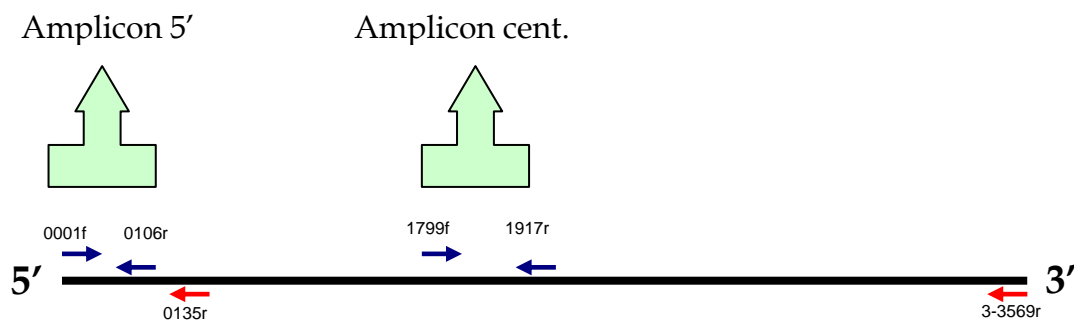


Fig 1. Het RNA genoom van MS2 met de positie van de reverse transcriptase primers voor de cDNA synthese en de PCR primers voor de RT-PCR

Tabel 1: De in deze studie gebruikte primers

RT primers	
5-0135r	5'-TCGCACAGGTCAAACCTCCTAG-3'
3-3569r	5'-TGGGTGGTAACTAGCCAAGC-3'
PCR primers:	
Amplicon 5'	0001f 5'-GGGTGGGACCCCTTTCGG-3'
	0106r 5'-ATTCCGGCTACCTACAGCG-3'
Amplicon cent.	1799f 5'- TGATCTTCCICGCGATCTTTC -3'
	1917r 5'- GCAATTCGTCCCTTAAGTAAGC-3'

Isoleer RNA met de Qiagen miniRNA isolatie kit volgens het protocol van de kit.

Vervolgens wordt cDNA gemaakt op basis van het geïsoleerde RNA en wordt qPCR uitgevoerd volgens hiervolgend protocol:

Synthese cDNA

	Per reactie μ l
Reverse primer 1 pmol/ μ l 5'3569r	2
5 x First strand buffer	2
RNA	5
Totaal	9

Incubeer 5 min bij 75°C

Breng daarna naar 48°C

Synthese cDNA (vervolg)

	Per reactie μ l
5x First strand buffer	2
DTT (0.1M)	2
dNTPs (5 mM)	2
Superscript II	1
RNAseOut (40 U/ μ l)	1
DNA vrij water	3
Product stap 1	9
Totaal	20

Maak de mix voor alle monsters, bewaar op ijs! Voeg 11 μ l toe aan de 9 μ l van stap 1. Incubeer 1 uur bij 48°C. Product 10x verdunnen voor PCR

Touchdown Q-PCR

	Per reactie μ l
Sybr-green mix	25
Forward primer (10pmol/ μ l)	1
Revers primer (10pmol/ μ l)	1
DNA vrij water	18
cDNA (10x verdund)	5
totaal	50

Primers: 5'-0027f 5'-0106r (mix 5')

Primers: centr 1799f centr 1917r (mix cent.)

Maak de mix voor alle monsters, vul uit in een 96 wells plaat. Voeg daaraan 5 μ l cDNA toe. Programma:

3 min 94°C	} 10 Cycli, per cycli 0,7 °C omlaag
30 sec 94°C	
30 sec 69°C	
1 min 72°C	
30 sec 94°C	} 30 Cycli
30 sec 62°C	
min 72°C	

De vorming van PCR-product wordt in de tijd gevolgd door de intensiteit van SYBRgreen kleuring te meten. Het aantal PCR cycli dat nodig was om boven de threshold waarde uit te komen werd geregistreerd als maat voor de hoeveelheid cDNA en daarmee RNA in het monster.

2.4 ET-PCR om destabilisatie van het capsid te bepalen

Met behulp van ET-PCR is het mogelijk om te bepalen of het capsid van het virus is gedestabiliseerd als gevolg van een bepaalde behandeling. In deze studie was dat blootstelling aan UV. ET-PCR is er op gebaseerd dat een gedestabiliseerd capsid vatbaar is voor degradatie door proteïnase K, terwijl een niet gedestabiliseerd capsid niet door proteïnase K kan worden afgebroken. Na (partiële) degradatie van het capsid door proteïnase K is het RNA genoom niet mee beschermt door het capsid. Door vervolgens een RNAse behandeling uit te voeren, wordt het RNA van de virussen met een gedestabiliseerd capsid afgebroken. Virussen die niet zijn gedestabiliseerd, zijn bestendig tegen proteïnase K, en met een intact capsid, ook tegen RNAse. Bij niet gedestabiliseerde virussen blijft het RNA dus tijdens de beide enzymbehandelingen geheel intact.

Na de enzymatische behandelingen wordt met behulp van Q-PCR bepaald hoeveel MS2 RNA aanwezig is in het monster. Bij een grote destabilisatie van het capsid zal bijna alle RNA zijn afgebroken, terwijl

bij een intact capside geen RNA afbraak zal worden waargenomen. Met behulp van Q-PCR is dit verschil in RNA hoeveelheid in de monsters te kwantificeren.

Enzymatic digestion

100 μ l monster
+ 37 μ l proteinase-K oplossing (600 U/ml)
Roche, PCR grade
+ 15 μ l 0.1 PBS
1 uur incuberen bij 37°C in waterbad.

5 μ l 0.1 M PMSF (Phenyl methane Sulfonyl fluoride) toevoegen in zuurkast.
(koelkast mol.lab 0797g/ml)
30 min incuberen bij kamer temperatuur

Toevoegen RNase 2.5 μ l (100x verdund, 100 ng)
(stock 4ug/ul en 100X verdund 0.04ug/ul)
30 min incuberen bij 37°C

1 μ l RNase-out toevoegen (40 units/ μ l)

Isoleer RNA met de Qiagen miniRNA isolatie kit volgens het protocol van de kit.

Maak cDNA en voer Q-PCR uit zoals beschreven in paragraaf 2.3.

3 Resultaten

3.1 Inactivatie van MS2 door LP-UV en MP-UV

Om het effect van LP-UV en MP-UV te bepalen op de inactivatie van MS2 zijn verschillende bestralingsexperimenten uitgevoerd waarin een MS2 suspensie met concentraties van 1×10^8 pve/ml en 1×10^{10} pve/ml werd blootgesteld aan LP-UV en MP-UV. Deze hoge concentraties zijn niet vergelijkbaar met de concentraties MS2 in oppervlaktewater maar werden gekozen omdat hiermee een groot inactivatiebereik van MS2 door UV zichtbaar was te maken. Het verschil in inactivatie van MS2 door LP-UV en MP-UV is weergegeven in figuur 2. Uit deze figuur is duidelijk op te maken dat MS2 inactivatie bij een gelijke UV dosis bij MP-UV sneller verloopt. Het verschil bedraagt bij 60 mJ/cm^2 bijna 3 logeenheden in het voordeel van MP-UV inactivatie. Een gelijk experiment is ook beschreven in de literatuur, en daar wordt een bijna gelijke inactivatie waargenomen voor MS2 met LP-UV en MP-UV (Fig. 3).

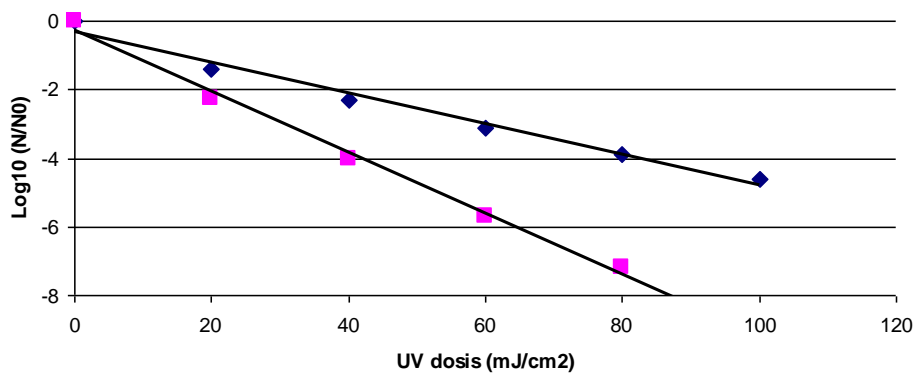


Fig 2. Inactivatie van 1×10^8 pve/ml MS2 met LP-UV (blauwe meetpunten) en MP-UV (roze meetpunten).

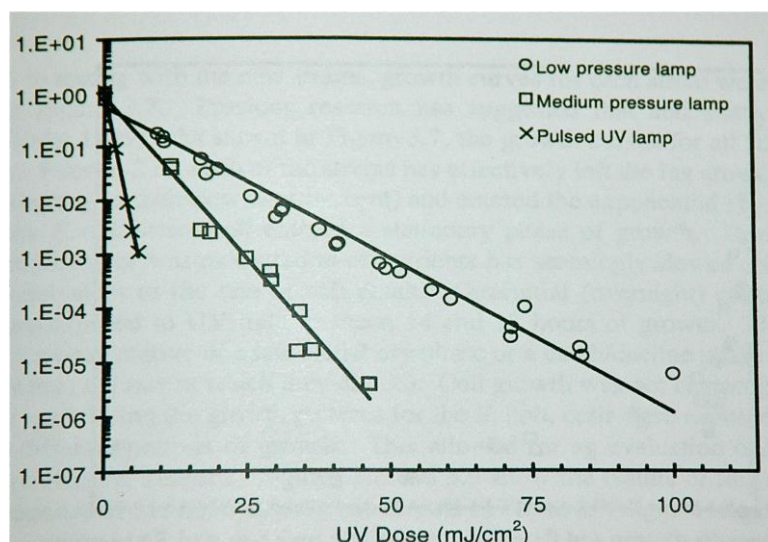
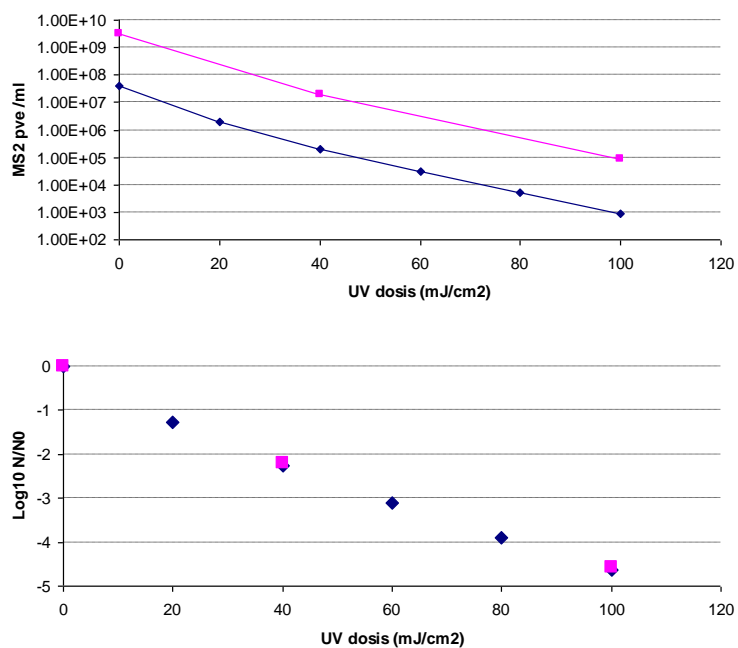


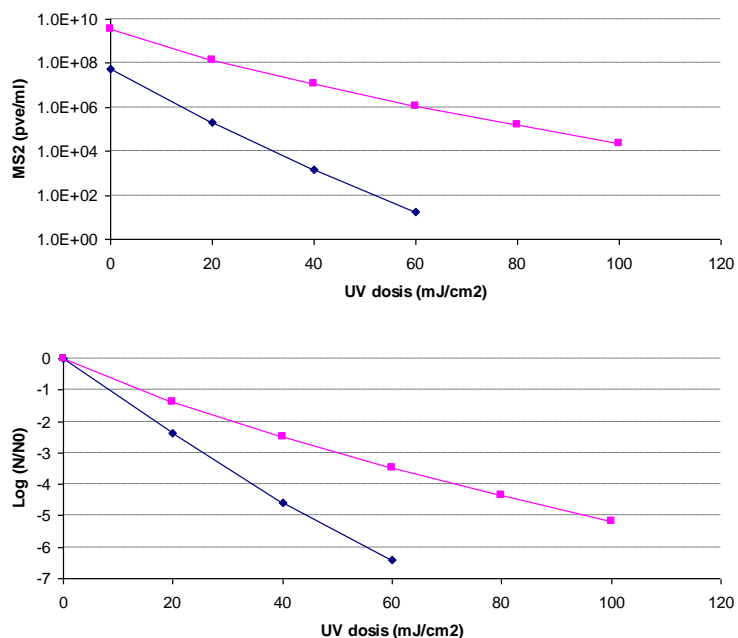
Fig 3. Inactivatie van MS2 met LP-UV en MP-UV (uit Malley, 2004).

Naast MS2 suspensies met een bacteriofagenaantal van 1×10^8 pve/ml MS2 werden ook bacteriofagensuspensies gebruikt met 1×10^{10} pve/ml MS2. Voor LP-UV is de inactivatie van 1×10^8 pve/ml MS2 gelijk aan de inactivatie van 1×10^{10} pve/ml MS2. De hogere dichtheid van de bacteriofagensuspensie heeft dus geen effect op de LP-UV effectiviteit (Fig 4).



Figuur 4. Inactivatie van 1×10^8 pve/ml MS2 (blauwe meetpunten) en 1×10^{10} pve/ml MS2 (roze meetpunten) met LP-UV. In de bovenste grafiek staan de absolute aantallen MS2 in pve/ml, en de onderste grafiek de genormaliseerde meetpunten van de bovenste grafiek.

Ook voor MP-UV werd bepaald of de inactivatie van een bacteriofagensuspensie met 1×10^8 pve/ml MS2 verschilde van een bacteriofagensuspensie met 1×10^{10} pve/ml MS2. Bij MP-UV bleek de inactivatie niet gelijk te zijn. De suspensie met 1×10^{10} pve/ml MS2 inactiverde minder snel dan de suspensie met 1×10^8 pve/ml MS2 (Fig 5).



Figuur 5. Inactivatie van 1×10^8 pve/ml MS2 (blauwe meetpunten) en 1×10^{10} pve/ml MS2 (roze meetpunten) met MP-UV. De bovenste grafiek laat de absolute aantallen MS2 zien in pve/ml, en de onderste grafiek de genormaliseerde meetpunten van de bovenste grafiek.

Bij MP-UV heeft de dichtheid van de bacteriofagensuspensie wel een effect. Bij een 100 keer hogere MS2 concentratie neemt de inactivatiesnelheid van MS2 door MP-UV veel af. Bacteriofaag MS2 werd aangeleverd door GAP (Canada) en wordt bewaard in het kweekmedium waarin productie van de bacteriofagen door lysis van de gastheercellen heeft plaatsgevonden. Het toevoegen van een 100 keer hogere concentratie MS2 heeft daardoor tot gevolg dat ook een 100 keer grotere hoeveelheid van dit medium zal worden toegevoegd. Om te bepalen of het medium van invloed was op de inactivatie van MS2, werden MS2 bacteriofagen gezuiverd met behulp van de Centricon procedure, en opgenomen in een fosfaatbuffer. Van deze bacteriofagensuspensie, met een MS2 concentratie van 1×10^{10} pve/ml MS2 werd de inactivatie bepaald (Fig 6).

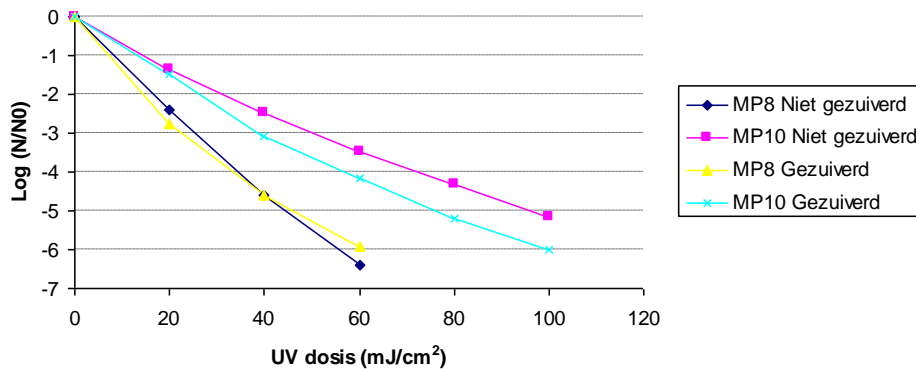


Fig 6. Inactivatie van ongezuiverde 1×10^8 pve/ml MS2 (blauwe meetpunten) en 1×10^{10} pve/ml MS2 (roze meetpunten), en van gezuiverde 1×10^8 pve/ml MS2 (gele meetpunten) en 1×10^{10} pve/ml MS2 (lichtblauwe meetpunten) met MP-UV.

Bij een concentratie van 1×10^8 pve/ml MS2 is de inactivatie van de bacteriofagen in het gezuiverde monster nagenoeg gelijk aan de inactivatie in het ongezuiverde monster. Bij de hogere concentratie van 1×10^{10} pve/ml MS2 is de inactivatie in het gezuiverde monster sneller. Het verwijderen van medium heeft dus een positief effect op de inactivatie, en dat betekent dat het medium componenten bevat die de UV straling absorberen. De inactivatie is niet zo snel als in een suspensie met 1×10^8 pve/ml MS2. Om beter inzicht te krijgen in het effect van een meer geconcentreerde bacteriofagensuspensie op de inactivatie van MS2, is het absorptiespectrum bepaald van een ongezuiverde en een gezuiverde bacteriofagensuspensie met een concentratie van 1×10^8 pve/ml MS2 en 1×10^{10} pve/ml MS2 (Fig 7).

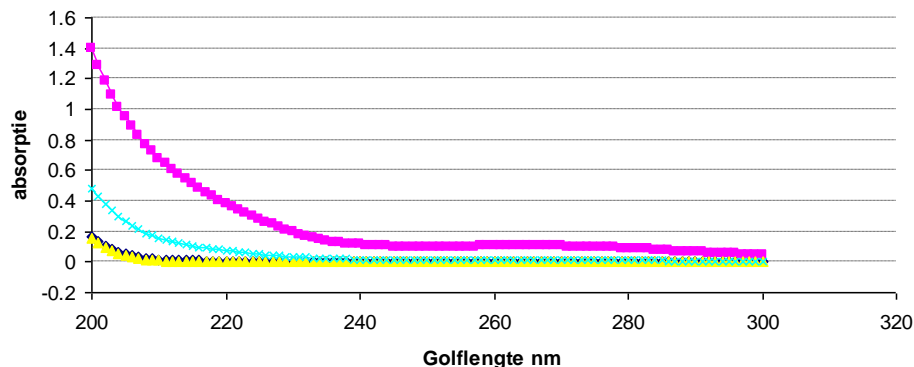


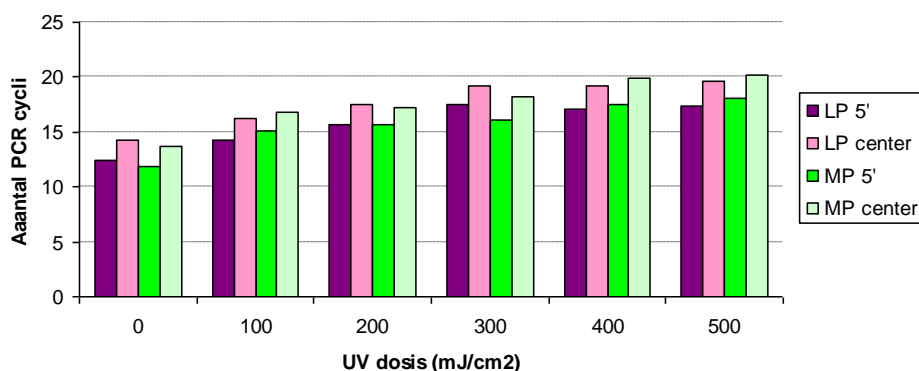
Fig 7. Het absorptiespectrum van ongezuiverde 1×10^8 pve/ml MS2 (donkerblauwe meetpunten) en 1×10^{10} pve/ml MS2 (roze meetpunten), en van gezuiverde 1×10^8 pve/ml MS2 (gele meetpunten) en 1×10^{10} pve/ml MS2 (lichtblauwe meetpunten).

Uit de absorptiespectra blijkt dat het spectrum van een ongezuiverde 1×10^{10} pve/ml MS2 suspensie duidelijk afwijkt van de andere spectra. De absorptie van dit monster is over het gehele golflengtebereik hoger, maar vooral in het gebied onder de 240 nm is de absorptie hoger. Dit is vermoedelijk van invloed op de verminderde inactivatie van MS2 die in dit monster wordt waargenomen. Het gezuiverde monster laat zien dat door zuivering de absorptie van de bacteriofagensuspensie afneemt en dichter ligt tegen de absorptie van de 1×10^8 pve/ml MS2 suspensie, maar ook in een gezuiverde 1×10^{10} pve/ml MS2 suspensie is de inactivatie minder dan in 1×10^8 pve/ml MS2 suspensie. De verhoogde absorptie in de 1×10^{10} pve/ml MS2 suspensie wordt mogelijk veroorzaakt door de bacteriofagen zelf. Het feit dat een hogere absorptie in het gebied tussen 200 en 240nm resulteert in een verminderde inactivatie, geeft aan dat de golflengtes tussen de 200 en 240 ook een bijdrage leveren aan de inactivatie van MS2. Dat deze golflengtes een bijdrage leveren aan inactivatie is eerder waargenomen door Linden et al voor adenovirussen (Linden et al, 2007).

3.2 Beschadiging van het RNA genoom van MS2 door LP-UV en MP-UV

MS2 werd blootgesteld aan een toenemende dosis van respectievelijk LP-UV en MP-UV om het effect hiervan op het RNA van MS2 te bepalen. Na deze blootstelling werd het RNA geïsoleerd, en de integriteit van het RNA werd bepaald door middel van Q-PCR, waarbij gebruik werd gemaakt van 2 amplicons. Het center amplicon is gelocaliseerd ongeveer in het midden van het 3569bp lange RNA molecuul, en het 5' amplicon is gelocaliseerd aan het 5' einde van het RNA molecuul. Primer 3569r, gelocaliseerd aan het 3' eind van het RNA, dient als startpunt voor de cDNA synthese (Fig. 1). Alleen als het RNA molecuul volledig wordt afgeschreven, kan amplicon 5' een PCR product vormen. Indien de cDNA synthese eerder stopt, bijvoorbeeld door UV geïnduceerde beschadigingen of breuken, dan wordt van dat RNA molecuul geen cDNA gevormd aan de 5' kant van het RNA molecuul. Hetzelfde geldt voor het center amplicon, indien de door UV geïnduceerde beschadiging of breuk plaatsvindt tussen het 3' startpunt van de cDNA synthese en het begin van het center amplicon. De hoeveelheid gevormd cDNA is dus een maat voor de door UV ontstane schade aan het RNA. Met behulp van Q-PCR wordt deze schade (door te bepalen hoeveel cDNA aanwezig is voor het 5' amplicon en voor het center amplicon) vervolgens gekwantificeerd.

In Figuur 2 is de inactivatie van MS2 door LP-UV en MP-UV weergegeven. LP-UV inactieveert MS2 met 3 logeenheden, en MP-UV bijna 6 logeenheden na een dosis van 60 mJ/cm^2 . Indien blootstelling aan UV letale schade veroorzaakt aan het RNA genoom van MS2, dan is te verwachten dat een inactivatie van 3 respectievelijk 6 logeenheden een meetbaar effect zou moeten hebben op de hierboven beschreven Q-PCR.



Figuur 8. De schade aan het RNA genoom van MS2 na blootstelling aan LP-UV (paars en roze) en MP-UV (groen en blauw), gemeten door middel van vermeerdering van het 5' amplicon en het center amplicon.

In figuur 8 is het aantal PCR cycli weergegeven dat nodig is voor detectie van het 5' amplicon en het center amplicon na blootstelling aan een toenemende dosis LP-UV en MP-UV. Het RNA van 0 mJ/cm^2 is geïsoleerd uit niet UV behandelde MS2 bacteriofagen. Hier zal (bij een onbeschadigd RNA genoom) het

enzym reverse transcriptase een full length cDNA molecuul synthetiseren. Het geproduceerde cDNA is dan net zo lang (3569 bp) als het originele RNA molecuul. Er is een klein verschil in PCR cycli waarneembaar tussen het 5' amplicon (14 cycli) en het center amplicon (12 cycli). Dit wordt veroorzaakt doordat de PCR van het center amplicon iets minder efficiënt verloopt. Er is uiteraard geen verschil zichtbaar tussen LP-UV en MP-UV. Bij een bestraling van 100 mJ/cm² LP-UV of MP-UV neemt het aantal PCR cycli toe met ongeveer 2 tot 3 cycli. 3 PCR cycli komt ongeveer overeen met één log-eenheid (2³). Figuur 2 in de vorige paragraaf liet de inactivatie zien van MS2 na blootstelling aan 100 mJ/cm², en daarin kon worden waargenomen dat dit voor LP-UV al resulteerde in een inactivatie van bijna 5 logeenheden. MP-UV liet bij blootstelling aan 60 mJ/cm² al bijna 6 log inactivatie zien. De waargenomen inactivatie met een ordegrrootte van 3 tot 6 logeenheden binnen de range van 0-100 mJ/cm² laat dus maar een geringe toename in PCR cycli zien.

Dit is in lijn met eerdere waarnemingen van Pecson et al, 2009, waar ook wordt beschreven dat een grote inactivatie van MS2 door LP-UV maar een klein meetbaar verschil laat zien in een PCR assay (Pecson et al, 2009).

Om te bepalen of blootstelling aan nog hogere UV doses een groter effect zou laten zien op het RNA, is MS2 voor zowel LP-UV als MP-UV blootgesteld aan een oplopende dosis tot 500 mJ/cm². Het blootstellen van MS2 aan deze zeer hoge dosis laat inderdaad zien dat de Ct waarde toeneemt met het toenemen van de UV dosis. Gezien de zeer hoge dosis blijft de totale toename, van ongeveer 5 tot 6 PCR cycli relatief gering. Blootstelling van MS2 aan LP-UV en MP-UV resulteert dus in door middel van PCR, meetbare RNA schade, maar het waargenomen effect op de RNA schade is in vergelijking tot de inactivatie van MS2 gering.

Verder wordt in figuur 8 waargenomen dat de met PCR detecteerbare schade veroorzaakt door LP-UV gelijk is aan de schade veroorzaakt door MP-UV. Het grote verschil in inactivatie na blootstelling aan LP-UV of MP-UV, wordt niet waargenomen bij het bepalen van de beschadiging van het genomisch RNA. De hoeveelheid genoomschade is dus niet verschillend tussen LP-UV en MP-UV.

Ook is het opvallend dat er geen verschil is in de toename van het aantal PCR cycli van het 5' amplicon versus het center amplicon. Beide amplicons nemen in ongeveer gelijke mate toe. Dat er een toename voor beide amplicons wordt waargenomen, betekent dat er schade ontstaat aan het RNA die met de PCR methode wordt gemeten, maar de UV schade leidt vermoedelijk niet tot breuken of fragmentatie van het RNA maar tot een andere schade. Bij breuken in het RNA zou er, omdat er minder full length cDNA kopieën worden gemaakt, minder cDNA zijn gevormd aan de 5' kant van het RNA. Daardoor zou het aantal PCR cycli dat nodig is om het 5' amplicon aan te tonen meer zijn toegenomen dan het aantal cycli dat nodig is om het center amplicon aan te tonen. Dit wordt niet waargenomen, en daardoor kan worden geconcludeerd dat blootstelling aan LP-UV en MP-UV niet resulteert in breuken in het genomisch RNA of andere schade die het reverse transcriptase volledig blokkeert en daarmee vorming van (volledig) PCR-product onmogelijk maakt.

3.3 Beschadiging van het MS2 capsid door LP-UV en MP-UV

Blootstelling van MS2 aan LP-UV of MP-UV kan naast schade aan het genomisch RNA, mogelijk ook leiden tot schade aan het capsid van het virus. Schade aan het capsid kan worden aangetoond met behulp van ET-PCR. Deze methode detecteert destabilisatie van het capsid als gevolg van blootstelling aan LP-UV en MP-UV.

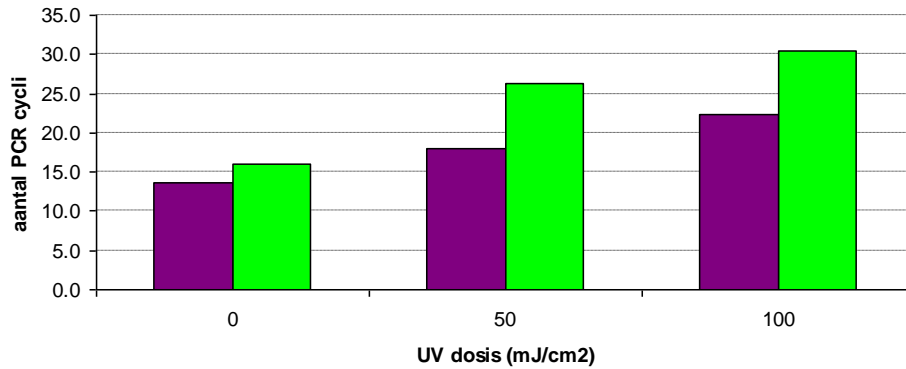


Fig 9. Het aantal PCR cycli na ET-PCR van MS2 behandeld met LP-UV (paars) en MP-UV (groen).

Uit de resultaten van de ET-PCR blijkt duidelijk dat na blootstelling aan zowel LP-UV als MP-UV het capside destabiliseert (Fig. 9). Blootstelling aan 50 mJ/cm² laat al een duidelijke toename zien in het aantal PCR cycli, en na blootstelling aan 100 mJ/cm² wordt deze toename nog duidelijker. LP-UV laat een totale toename zien van 9 cycli. Blootstelling aan MP-UV laat een nog grotere toename zien van 15 cycli. Bij het meten van alleen RNA schade werd een toename waargenomen van 2 en 3 cycli voor respectievelijk LP-UV en MP-UV. ET-PCR laat dus een veel groter inactivatiebereik zien dan de PCR waarmee genoomschade wordt gedetecteerd.

Uit de informatie van figuur 9 kan dus worden geconcludeerd dat destabilisatie van het MS2 capside optreedt na blootstelling aan UV, en dat dit met behulp van ET-PCR waarneembaar kan worden gemaakt. Bovendien kan worden geconcludeerd dat MP-UV het capside meer destabiliseert dan LP-UV. Omdat is gebleken dat MP-UV ook een sterker inactiverend effect laat zien, en in de voorgaande paragraaf is aangetoond dat het sterker inactiverende effect van MP-UV niet het gevolg is van meer RNA schade, is het waarschijnlijk dat de extra inactivatie door MP-UV het gevolg is van de schade aan het capside.

Verder is uit figuur 9 waar te nemen dat zowel LP-UV als MP-UV resulteert in schade aan het capside. Deze resultaten geven aan dat UV niet alleen het RNA genoom beschadigt, maar ook eiwitschade tot gevolg heeft en dat deze schade van invloed is op de inactivatie van MS2. Een recente publicatie, waar MS2 na LP-UV werd onderzocht op genoomschade en capsideschade laat gelijke resultaten zien, en bevestigen hiermee de resultaten van deze studie (Pecson et al, 2009).

4 Discussie

4.1 Het meten van RNA schade door middel van Q-PCR

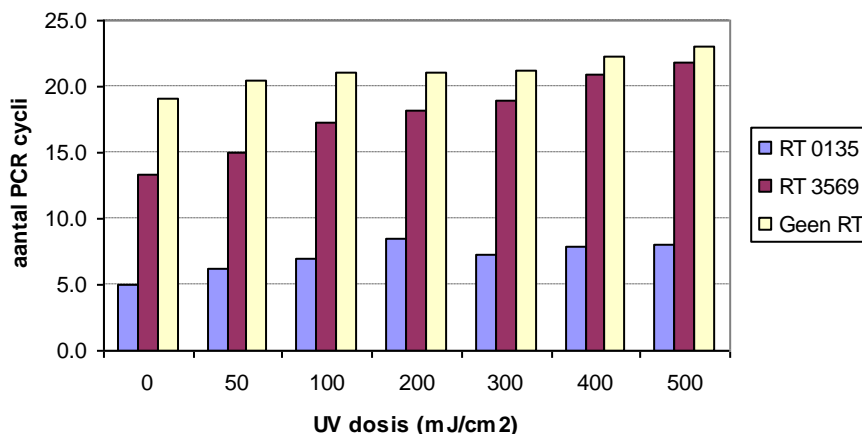
Blootstelling aan UV resulteert in schade aan het RNA. Er zijn verschillende studies geweest waar deze schade aan het genoom van MS2 is gedetecteerd door middel van PCR (Simonet and Gantzer, 2006; Pecson et al, 2009). Om deze schade te kunnen detecteren is het noodzakelijk om van het RNA molecuul eerst cDNA te maken. Dit gebeurt door het enzym reverse transcriptase. Het is niet exact bekend hoe het enzym reverse transcriptase wordt geremd door de door UV geïnduceerde beschadigingen. Wel is in meerdere studies gevonden dat PCR wel RNA schade kan kwantificeren, maar dat de waargenomen schade relatief klein is in het voor desinfectie belangrijke bereik van 0 tot 100 mJ/cm², terwijl de inactivatie in dit bereik wel groot is. Hiermee lijkt Q-PCR, in tegenstelling tot wat Simonet and Gantzer beweren, geen goede techniek om direct schade te meten aan MS2 (of virussen) als gevolg van blootstelling aan UV (Simonet and Gantzer, 2006).

4.2 Het type schade aan het RNA van MS2

Om meer inzicht te krijgen in het type RNA schade als gevolg van blootstelling aan UV is nog een extra experiment uitgevoerd. Hierin is als eerste cDNA gemaakt met de oorspronkelijke primer 3569r aan het 3' eind van het RNA molecuul. Daarnaast is ook cDNA gemaakt met primer 0135r vlak voor de reverse primer van het 5' amplicon. Als laatste is een cDNA synthese ingezet zonder het toevoegen van een primer.

Deze drie verschillende RT reacties zullen resulteren in een verschillende cDNA template voor de Q-PCR reactie, die is voor alle drie reacties is uitgevoerd met het 5' amplicon.

De eerste primer zal het hele RNA genoom moeten aflezen, en in cDNA omzetten om een template te kunnen maken voor de PCR met het 5' amplicon. Primer 0135r hoeft slechts 135 baseparen af te schrijven en om te zetten in cDNA om template te kunnen maken voor het 5' amplicon. Indien er geen RT-primer is, kan er in theorie geen cDNA worden gemaakt. In de praktijk gebeurt dit wel, omdat ook secundaire structuren van het RNA en RNA fragmenten die ontstaan zijn door afbraak kunnen dienen als startprimer voor de cDNA synthese.



Figuur 10. Q-PCR met amplicon 5 op cDNA gemaakt met primer 0135r, 3569r en zonder RT primer, na blootstelling aan verschillende doses MP-UV.

Figuur 10 laat zien dat er een duidelijk effect is van waar de reverse transcriptase wordt gestart op het RNA molecuul. Start van reverse transcriptase dicht bij het 5' amplicon (met primer 0135r) geeft een veel hogere opbrengst van cDNA en dus een veel lager aantal PCR cycli om het PCR fragment zichtbaar te maken. Start van reverse transcriptase bij het 3' einde van het RNA molecuul vereist dat eerst het

volledige RNA molecuul wordt afgeschreven, voordat cDNA template wordt gemaakt voor de Q-PCR. Het is duidelijk zichtbaar dat, ook zonder blootstelling aan UV, het afschrijven van het volledige RNA molecuul minder efficiënt verloopt dan het afschrijven van een klein stukje (primer 0135r). Daardoor is er minder cDNA template voor het 5' amplicon, en zijn meer PCR cycli nodig om het PCR fragment zichtbaar te maken. Indien er geen reverse primer is toegevoegd voor de cDNA synthese, dan wordt er toch nog cDNA gemaakt, maar dit is zonder rt-primer een minder efficiënt proces, en geeft het achtergrondniveau aan. Er zijn in dit geval nog meer PCR cycli nodig om het PCR fragment zichtbaar te maken.

De reacties waar geen reverse transcriptase primer aan is toegevoegd, laten een aantal PCR cycli zien van rond de 20 voor detectie. Het aantal cycli neemt bij blootstelling aan 400 en 500 mJ/cm² iets toe. Hieruit kan worden afgeleid dat UV schade niet resulteert in breukjes/fragmentatie van RNA genoom. Indien het RNA door breuken in fragmenten was verdeeld, dan hadden deze fragmenten kunnen dienen als startpunt voor de cDNA synthese. In dat geval was bij het toenemen van de UV dosis, door het random hechten van deze ontstane fragmenten, meer cDNA ontstaan, en was het achtergrondniveau juist hoger geworden. Het aantal PCR cycli in de monsters waar geen reverse transcriptase primer was toegevoegd zou dan lager worden met het toenemen van de UV dosis. Dit wordt niet waargenomen, dus UV schade resulteert niet in fragmentatie van het RNA in het dosisgebied onder de 500 mJ/cm².

Het ontstaan van schade aan het RNA kan met PCR het duidelijkst zichtbaar worden gemaakt als primer 3569r wordt gebruikt voor de cDNA synthese. Dit is ook wel in de lijn der verwachting, omdat met deze primer als startpunt het gehele RNA molecuul moet worden afgelezen voordat cDNA wordt gemaakt van het 5' deel van het molecuul waar de Q-PCR op is ontworpen. De cDNA synthese "verzamelt" dus de geaccumuleerde schade van het gehele RNA molecuul. Bij een start van de reverse transcriptase met primer 0135 vlak bij het 5' amplicon, wordt alleen de geaccumuleerde schade in het gebied van 135 baseparen tot 0 waargenomen. In figuur 10 is te zien dat de schade op cDNA dat is gesynthetiseerd met deze primer ook waar is te nemen, maar effect is minder duidelijk.

Resumerend kan worden gesteld dat UV schade geen fragmentatie geeft van het RNA, maar dat de cDNA synthese wel wordt beïnvloed als het RNA bloot heeft gestaan aan UV. Er ontstaat minder cDNA template voor het 5' amplicon nadat MS2 is blootgesteld aan UV, maar niet in zodanige mate dat dit de afname van kweekbare MS2 verklaard. De schade aan het kapsel, zoals gemeten met ET-PCR, laat beduidend meer schade zien, in de vorm van vergroting van het aantal PCR cycli dat nodig is voor een positief signaal.

4.3 Het verschil in inactivatie tussen LP-UV en MP-UV

MP-UV heeft een inactivatiespectrum van 200 tot 370 nm. In eerdere experimenten, waarin gebruik is gemaakt van filters om virussen bloot te stellen aan een specifiek gebied van het MP-UV spectrum is gebleken dat juist de lage golflengtes van 220 tot 230 nm een relatief sterk inactiverend effect hebben op virussen (Malley et al, 2004; Eischeid 2009). Deze golflengtes dringen echter maar beperkt door in water, dus het positieve effect van deze golflengtes op de inactivatie zal in de praktijk minder groot zijn. De waarneming wordt overigens wel bevestigd door het absorptiespectrum in deze studie van niet gezuiverde bacteriofagen, waar in het absorptiespectrum van 200 tot 240 nm veel absorptie plaatsvond van de bacteriofagensuspensie. Dit had een duidelijk negatief effect op de inactivatie.

Niet alle golflengten van een MP-UV lamp dragen in gelijke mate bij aan het inactiverend effect van de MP-UV lamp. Voor het berekenen van de dosis is het echter wel van belang om voor elke golflengte te weten in welke mate deze bijdraagt aan de inactivatie. De omrekening van de dosis tussen LP-UV en MP-UV is gestandaardiseerd door Bolton en Linden (2003), en deze berekening is in deze studie ook toegepast. Bij de door Bolton en Linden toegepaste berekeningen wordt echter uitgegaan van het absorptiespectrum van DNA voor het berekenen van de dosis. Nu er steeds meer aanwijzingen zijn dat UV ook het capsid beschadigt, is het duidelijk dat het bepalen van de inactivatie van een micro-organisme alleen op basis van het absorptiespectrum van DNA niet volledig is. Het is daarom waarschijnlijk dat de gestandaardiseerde berekening van Bolton en Linden niet correct is en aanpassingen behoeft om ook de beschadigingen aan het capsid in de berekening mee te nemen.

4.4 Vertaling van de resultaten naar water uit de praktijk

Deze studie had tot doel om het inactivatie-mechanisme van LP-UV en MP-UV op MS2 te onderzoeken. Hierbij staat MS2 model voor pathogene virussen in de zuivering. Om variatie als gevolg van verschillende reactieomstandigheden anders dan LP-UV en MP-UV zo veel mogelijk uit te sluiten, is ervoor gekozen de experimenten uit te voeren in gebufferd water.

In de praktijk zal water een scala aan stoffen en verbindingen bevatten die van invloed kunnen zijn op de UV desinfectie. Van bijvoorbeeld verbindingen zoals humuszuren en nitraat is bekend dat ze UV kunnen absorberen. Voor de vermindering van de UV dosis door absorptie zal in dat geval moeten worden gecorrigeerd. Vooral voor MP-UV kan dit complex zijn, omdat het effect van de absorptie van de opgeloste verbindingen in het water voor elke golflengte anders kan zijn. Daarnaast is het effect van de verschillende golflengten uit het spectrum van MP-UV op viruscapsiden nog niet goed in kaart gebracht. De afname van de effectiviteit van MP-UV als gevolg van absorberende stoffen in het water in de praktijk is met de huidige informatie dus niet goed te voorspellen. Voor LP-UV zal dit gemakkelijker zijn, omdat het effect van een absorberende verbinding op de LP-UV emissiepiek goed te bepalen is.

5 Conclusies en aanbevelingen

5.1 Conclusies

Naast de inactivatie van MS2 door genoomschade, speelt capsideschade een belangrijke rol bij de inactivatie van MS2 door UV. De verwachting is dat bij andere virussen capsideschade door UV ook zal optreden.

De extra inactivatie die wordt waargenomen na blootstelling van MS2 aan MP-UV tov LP-UV, wordt voor een belangrijk deel veroorzaakt door schade aan het capside.

RNA schade als gevolg van LP-UV of MP-UV is in het relevante gebied van 0 tot 100 mJ/cm² maar beperkt te bepalen met behulp van Q-PCR, omdat het gemeten verschil van de Q-PCR in dit gebied maar tot 2-3 cycli (ofwel minder dan een log-eenheid) bedraagt, terwijl de log-inactivatie (gemeten met plaque assay) 5 of meer log-eenheden bedraagt.

ET-PCR geeft in het voor LP-UV en MP-UV relevante gebied van 0 tot 100 mJ/cm² wel een groot verschil van 9 cycli voor LP-UV en 15 cycli voor MP-UV. Met ET-PCR kan daarom wel de schade als gevolg van LP-UV of MP-UV worden gekwantificeerd tussen 0 en 100 mJ/cm². De hoeveelheid gemeten kapselschade lijkt nog niet de volledige inactivatie te kunnen verklaren.

5.2 Aanbevelingen

ET-PCR heeft een gevoeligheid die in de buurt komt van de inactivatie van MS2 in het veel gebruikte UV dosis gebied van 0 tot 100 mJ/cm². ET-PCR zou daarom kunnen dienen als een snelle test ter evaluatie van de werking van een UV installatie. Wel is het hiervoor nodig om meer inzicht te krijgen in de robuustheid van de techniek.

Het bepalen van de UV beschadiging van van nature veel voorkomende bacteriofagen in het water door middel van ET-PCR kan een gemakkelijke manier zijn om de UV dosis van een installatie in een praktijksituatie te bepalen. Dit zou misschien mogelijk zijn met de natuurlijke populatie somatische colifagen, maar ook nieuwe veel voorkomende bacteriofagen kunnen hiervoor wellicht worden ingezet.

Virussen verschillen in de samenstelling en structuur van het capside. Het is niet bekend of het capside van ziekteverwekkende virussen in dezelfde mate gevoelig is voor LP en MP-UV als het capside van MS2. Indien bekend is hoe gevoelig een virus is voor capsideschade door UV, dan zou deze informatie mee kunnen worden genomen bij de beslissing of voor de desinfectie moet worden gekozen voor een LP-UV of een MP-UV installatie.

Omdat niet alle inactivatie verklaard lijkt te kunnen worden door kapselschade verdient het aanbeveling om ook te onderzoeken of schade kan optreden aan de hechting van de fagen aan de gastheer en/of de injectie van het faag-RNA in de gastheercel (of eventueel daarop volgende cDNA synthese en replicatie).

Adenovirus is niet bijzonder resistent tegen MP-UV (Eischeid, 2009), en daarom is MP-UV te verkiezen boven LP-UV indien adenovirus het "target organisme" is in de desinfectie. De MP-UV geïnitieerde inactivatie is waarschijnlijk het gevolg van niet repareerbare schade aan de capside eiwitten van het adenovirus.

6 Referenties

Bolton, J.R., Linden, K.G. (2003). Standardization of Methods for Fluence (UV Dose) Determination in bench-Scale UV experiments. *Journ. Environment. Engineer.* 129; p209-215.

Clancy, J.L., Bukhari, z., Hargy, T.M., Bolton, J.R., Dussert, B.W. and Marshall, M.M. (2000) Using UV to inactivate *Cryptosporidium*. *J. AWWA* 92 (9), 97-104.

Eischeid, A.C., Meyer, J.N. et al., (2009). UV disinfection of adenoviruses: Molecular indications of DNA Damage efficiency. *AEM* 75(1) p23-28.

Linden, K.G., Thurston, J. et al. (2007). Enhanced inactivation of adenovirus under polychromatic UV lamps. *AEM* 73(23), p7571-7574)

Lodder, W.J., H.H.J.L. van den Berg, S.A. Rutjes, and A.M. de Roda Husman. 2010. Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in the Netherlands. *AEM* 76(17), p5965-5971

Malley, J.R., Shaw, J.P., and Ropp, J.D. (1995). Evaluation of byproducts produced by treatment of groundwaters with ultraviolet irradiation. Denver CO, Americ. WWA Research Found. and American Water works association.

Malley et al, 2004. Inactivation of pathogens with innovative UV Technologies. Awwa Research foundation and Amerc. WW Association.

Nuanualsuwan et al, *J Virol Methods* 2002, Pretreatment to avoid positive RT-PCR results with inactivated viruses.

Pecson et al, *AEM* 2009, Quantitative PCR for determining the infectivity of bacteriophage MS2 upon inactivation by heat, UV-B radiation and singlet oxygen: Advantages and limitations of an enzymatic treatment to reduce false-positive results.

Simonet, J., Gantzer, C. (2006) Inactivation of Poliovirus 1 and F-Specific RNA pahges and degradation of their genomes by UV irradiation at 254 nanometers. *AEM.* 72.12; p7671-7677.

