

BTO 2013.054 | December 2013

BTO rapport

Non-tuberculeuze
mycobacteriën in
drinkwater

BTO Rapport

Non-tuberculeuze mycobacteriën in drinkwater

BTO 2013.054 | December 2013

Opdrachtnummer

B111750/B222004

Projectmanager

Niels Dammers/Luc Hornstra

Opdrachtgever

BTO

Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

Auteurs

Paul van der Wielen en Marijan Uytewaal-Aarts

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid aan BTO-participanten en is verder niet openbaar.

Jaar van publicatie
2013

Meer informatie

T 030 6069642
E paul.van.der.wielen@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl



KWR BTO 2013.054 | December 2013 © KWR

Alle rechten voorbehouden.
Niets uit deze uitgave mag worden veelevoudigd, 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.

Leeswijzer

Dit rapport beschrijft de resultaten van **het BTO project ‘Ziekteverwekkende *Mycobacterium* in drinkwater’** dat een looptijd had van 1 januari 2011 t/m 31 december 2013. In 2011 en 2012 is het project begeleid door de PBC Microbiologie en in 2013 is de begeleiding **overgenomen door de themagroep ‘Biologische Activiteit’**.

Het project bestond uit drie onderdelen:

- De samenstelling en diversiteit van de non-tuberculeuze mycobacteriën (NTM) populatie in het Nederlandse drinkwater karakteriseren;
- Ontwikkelen van qPCR methoden voor de detectie van *M. kansasii* en *M. xenopi* in drinkwater en met deze ontwikkelde methoden onderzoeken in welke mate beide organismen in het Nederlandse drinkwater voorkomen;
- Kweken van NTM uit het Nederlandse drinkwater en analyseren of drinkwaterstammen overeenkomen met patiëntstammen.

In samenspraak met de PBC Microbiologie is het budget voor het laatste onderdeel besteed aan de ontwikkeling van een specifieke qPCR methode voor de kwantitatieve detectie van NTM in drinkwater. De resultaten van dat onderzoek zijn eerder gerapporteerd. Doordat de resultaten van het eerste onderdeel ook een uitstraling hebben naar de internationale wetenschappelijke drinkwatersector is er voor gekozen om de resultaten van dat onderzoek te beschrijven in een Engelstalige wetenschappelijke publicatie, die ondertussen is gepubliceerd door Applied and Environmental Microbiology (Appl. Environ. Microbiol. 79: 6160-6166). Het tweede onderdeel leende zich als stageonderwerp en is uitgevoerd door Marijan Uytendwaal-Aarts voor verkrijging van haar BSc-titel. In hoofdstuk 1 van dit rapport is de tekst van het wetenschappelijke artikel integraal overgenomen. In het wetenschappelijke artikel zijn de onderzochte locaties echter geanonimiseerd. De gebruikte codes staan voor de verschillende pompstations en zijn als volgt: SW1, ps Berenplaat; SW2, ps Scheveningen; SW3, ps Weesperkarspel; SW4, ps Andijk; GW1, ps Spannenburg. In hoofdstuk 2 is het stageverslag integraal overgenomen. Omdat het format van een wetenschappelijk artikel en een stageverslag zich mogelijk minder goed lenen voor directe rapportage naar de drinkwaterbedrijven is er voor gekozen om de resultaten van beide projectonderdelen ook te beschrijven in een uitgebreide samenvatting. Tot slot hebben Leo Heijnen en Dick van der Kooij een belangrijke rol gespeeld bij het tot stand komen van hoofdstuk 1 en heeft Bart Wullings een belangrijke bijdrage geleverd aan de begeleiding van de stage, waarvoor dank.

Uitgebreide samenvatting

Introductie

In Nederland wordt het drinkwater gedistribueerd zonder chloor. Om drinkwater zonder chloor te distribueren moet het drinkwater van onberispelijke kwaliteit zijn. Groei van opportunistische ziekteverwekkers vormt mogelijk een dreiging van de onberispelijke kwaliteit, met name omdat in de toekomst onder invloed van klimaatverandering de drinkwatertemperatuur toe zal nemen. Daarnaast zal door de vergrijzing en de verbeterde gezondheidszorg ook het aantal mensen met een verzwakt immuunsysteem toenemen. Verschillende soorten die behoren tot de non-tuberculeuze mycobacteriën (NTM) kunnen ziekte veroorzaken bij mensen met een verzwakt immuunsysteem en zijn in drinkwatergerelateerde milieus waargenomen. Onderzoek in het buitenland heeft laten zien dat sommige klinische NTM-stammen genetisch identiek zijn aan NTM-stammen uit drinkwater. Dit impliceert dat in die landen drinkwater waarschijnlijk een rol speelt in de verspreiding van ziekteverwekkende NTM. Veel van het buitenlandse onderzoek is uitgevoerd met de opportunistische pathogene soort *Mycobacterium avium*, die regelmatig in het Amerikaanse drinkwater wordt aangetroffen. *M. avium* is tot nu toe echter niet aangetroffen in het Nederlandse drinkwater en ook lijkt het aantal ziektegevallen met *M. avium* in Nederland mee te vallen. In sommige delen van Nederland is in het verleden de opportunistische ziekteverwekkende *M. kansasii* in het water aftap en in het leidingnet aangetroffen. Aanvullend onderzoek heeft met faagtypering laten zien dat klinische *M. kansasii* isolaten van patiënten, identiek waren aan isolaten uit het drinkwater. In de ons omringende landen (Duitsland, Frankrijk, België en Engeland) wordt regelmatig de opportunistische NTM-pathogeen *M. xenopi* in drinkwater aangetroffen, een opportunistische pathogeen, waar ook in Nederland ziektegevallen van bekend zijn. In het BTO is in 2010, 2011 en 2012 onderzocht of NTM voorkomen in het Nederlandse drinkwater. Metingen in de zomer en winter hebben laten zien dat *Mycobacterium* spp. in alle onderzocht drinkwatermonsters aanwezig zijn. De betekenis voor de volksgezondheid van het voorkomen van *Mycobacterium* spp. in het drinkwater is echter niet onderzocht.

Doel

Het onderzoek naar NTM heeft tot doel om de volgende vragen te beantwoorden:

- Wat is de diversiteit van NTM in het Nederlandse drinkwater en in welke mate verschillen NTM-populaties tussen locaties binnen een distributiesysteem en/of reinwater, tussen verschillende distributiesystemen en tussen de winter en zomer op een locatie in het distributiesysteem?
- Welke NTM-soorten komen dominant voor in het Nederlandse drinkwater en wat is de gezondheidskundige betekenis van deze dominante NTM-soorten?
- In welke mate komen de opportunistische ziekteverwekkende NTM-soorten *M. kansasii* en *M. xenopi* voor in het Nederlandse drinkwater?

Diversiteit en samenstelling van non-tuberculeuze mycobacteriën in drinkwater

De diversiteit en samenstelling van NTM in drinkwater is bepaald met behulp van moleculaire methoden. In een eerste stap werd DNA geïsoleerd van reinwater en gedistribueerd drinkwater van de pompstations Berenplaat, Scheveningen, Weesperkarspel, Andijk en Spannenburg en vervolgens werd het hsp65 gen van NTM vermenigvuldigd met behulp van een specifieke PCR-methode. Daarna is met behulp van 454 pyrosequencing (een 'next

generation sequencing'methode) de DNA-volgorde (sequentie) van het hsp65 gen van 2943 verschillende NTM bepaald. Met behulp van deze sequenties is de diversiteit en samenstelling van de NTM-populatie per drinkwatermonster bepaald en onderling vergeleken.

De diversiteit van NTM-populaties in de onderzochte drinkwatermonsters is relatief hoog en over het algemeen worden 8 tot 25 NTM-soorten, weergegeven als operationele taxonomische units (OTUs), aangetroffen. De diversiteit van de NTM-populatie is lager in het reinwater dan in het gedistribueerde drinkwater en lager in de winter dan in de zomer. 142 van de in totaal 175 waargenomen NTM-soorten is slechts in één drinkwatermonster aangetroffen. Eén NTM-soort werd echter in 14 van de 16 geanalyseerde drinkwatermonsters aangetroffen en lijkt algemeen voor te komen in het Nederlandse drinkwater. De hsp65 gensequentie van deze NTM-soort is gerelateerd aan een onbekende, niet eerder gekweekte NTM-soort. Ondanks dat deze NTM-soort in de meeste drinkwatermonsters aanwezig is, verschilt de NTM-populatie tussen reinwater en gedistribueerd drinkwater van een pompstation, tussen locaties binnen één distributiesysteem, tussen distributiesystemen en tussen zomer en winter. Elk drinkwatermonster blijkt een unieke NTM-samenstelling te hebben. Deze resultaten laten dus zien dat NTM zich in drinkwatermilieus kunnen vermenigvuldigen en dat lokale en seizoensinvloeden bepalend zijn voor de ontwikkeling en vestiging van een NTM-populatie. Uit het onderzoek is tevens gebleken dat de bron voor drinkwaterbereiding (oppervlaktewater of grondwater) en de biologische stabiliteit van het drinkwater (AOC en BVS) geen of beperkte invloed hebben op de NTM-populatiesamenstelling.

De DNA-sequenties van NTM zijn ook vergeleken met DNA-sequenties die zijn gedeponeerd in een grote internationale sequentiedatabase (GenBank). Uit deze vergelijking volgt dat 95,8% van de NTM-sequenties behoorde tot NTM-soorten die nog onbekend en niet-gekweekt zijn. Het is onwaarschijnlijk dat deze onbekende NTM-soorten een gezondheidskundige betekenis hebben, omdat ze tot nu toe niet zijn gelinkt aan ziektegevallen. Verdere opheldering van de virulentie-eigenschappen van deze NTM-soorten is echter nodig om definitief te kunnen concluderen dat ze geen rol bij ziekte spelen. Van de wel bekende NTM-soorten die zijn gevonden behoorde 2,9% van de sequenties tot *M. gordonae*, 0,48% tot *M. avium*, 0,44% tot *M. genavense*, 0,27% tot *M. llatzerense* en 0,14% tot *M. salmoniphilum*. De meeste van deze NTM-soorten zijn wereldwijd ooit waargenomen bij patiënten met een verzwakt immuunsysteem. Een studie naar NTM-isolaten in patiënten uit de regio Nijmegen/Arnhem heeft echter laten zien dat van deze vijf NTM-soorten alleen *M. avium* enige klinische relevantie heeft in die regio. De 14 aangetroffen DNA-sequenties in drinkwater die zijn gerelateerd aan *M. avium*, hebben een overeenkomst van 97,5% met de DNA-sequentie van *M. avium*. *Mycobacterium*-stammen die een DNA-overeenkomst tussen de 97 en 98% op het hsp65 gen hebben, worden beschouwd als nieuwe *Mycobacterium* soorten. Dezelfde drinkwatermonsters zijn ook geanalyseerd met een kwantitatieve PCR-methode voor *M. avium*, maar met die methode werd *M. avium* niet aangetroffen. Het is daarom waarschijnlijk dat deze 14 sequenties niet toebehoren aan een stam van *M. avium*, maar een *Mycobacterium*-soort die verwant is aan *M. avium* en waarvan onduidelijk is of die soort ook infecties kan veroorzaken bij mensen. De algehele resultaten van deze studie tonen aan dat de NTM-soorten in het drinkwater van de vijf onderzochte pompstations geen of slechts een geringe volksgezondheidskundige betekenis hebben.

Mycobacterium kansasii en *Mycobacterium xenopi* in drinkwater

Om *M. kansasii* en *M. xenopi* in drinkwater te kunnen kwantificeren zijn specifieke detectiemethoden nodig. Omdat specifieke kweekmethoden voor deze organismen ontbreken en ontwikkeling van dergelijke kweekmethoden moeilijk zal zijn, is er voor

gekozen om specifieke en kwantitatieve PCR (qPCR) methoden te ontwikkelen voor *M. kansasii* en *M. xenopi*. De specifieke qPCR methode voor *M. kansasii* richt zich op het 16S-23S ITS gen, terwijl de specifieke qPCR methode voor *M. xenopi* zich richt op het 16S rRNA gen. Een ijklijn werd gemaakt van beide genen en er is getest of de ontwikkelde qPCR methoden voor *M. kansasii* en *M. xenopi* voldoen aan de gestelde eisen. Zowel de efficiëntie van de twee qPCR-methoden als de correlatiecoëfficiënt van de ijklijnen zijn voldoende betrouwbaar voor kwantitatieve detectie van *M. kansasii* of *M. xenopi* in drinkwater.

Vervolgens is onderzocht of *M. kansasii* en/of *M. xenopi* voorkomen in het Nederlandse drinkwater. In de zomer van 2012 en winter van 2013 is het reinwater en drinkwater op negen locaties in het distributiesysteem van pompstations Spannenburg, Zuidwolde, Amersfoortseweg, Nuland, Hanik, Braakman, Berenplaat, Scheveningen, Weesperkarspel, Andijk en Kluizen (B) bemonsterd. Hierbij is drinkwater van de binneninstallatie (directe bemonstering) en van het distributiesysteem (bemonstering na vier minuten doorstroming van de kraan) bemonsterd. Van deze monsters is DNA geïsoleerd dat is gebruikt als template voor de specifieke qPCR van *M. kansasii* en *M. xenopi*. In geen van de onderzochte drinkwatermonsters is *M. kansasii* of *M. xenopi* aangetroffen. Dit betekent dat het aantal genkopieën van *M. kansasii* in het onderzochte drinkwater lager is dan $1,3 \times 10^3$ per liter en die van *M. xenopi* $1,9 \times 10^3$ per liter. In de jaren '70 en '80 van de vorige eeuw werd *M. kansasii* wel in het Rotterdamse drinkwater aangetroffen, voornamelijk in de drinkwaterinstallatie in gebouwen. Destijds was het Rotterdamse drinkwater echter van een andere kwaliteit; het werd in die tijd bijvoorbeeld nog met chloor gedistribueerd. Deze kwaliteitsverschillen verklaren waarschijnlijk dat in het voorzieningsgebied van ps Berenplaat (Rotterdam en omstreken) deze keer geen *M. kansasii* werd waargenomen in de drinkwaterinstallaties. Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat het Nederlandse drinkwater waarschijnlijk geen rol speelt bij de infectie van patiënten met *M. kansasii* en *M. xenopi*. De analyse van grotere volumehoeveelheden in de qPCR dan is toegepast (50 ml) in de huidige studie en drinkwatermonsters van andere voorzieningsgebieden zijn echter nodig om dit definitief te kunnen concluderen.

Conclusies

- De diversiteit van NTM-populaties in de onderzochte drinkwatermonsters is hoog en ieder drinkwatermonster heeft een unieke NTM-samenstelling, dus lokale condities in het drinkwaterdistributiesysteem beïnvloeden de NTM-populatie in drinkwater;
- De bron (grondwater vs oppervlaktewater) en de biologische stabiliteit lijken geen of een minder belangrijke invloed te hebben op de ontwikkeling en samenstelling van de NTM-populatie in het drinkwatermilieu in Nederland;
- De meeste NTM-soorten (95,8%) in de onderzochte drinkwatermonsters zijn gerelateerd aan onbekende en niet-gekweekte NTM-soorten;
- De NTM-soorten die zijn aangetroffen in de drinkwatermonsters van de vijf onderzochte pompstations hebben geen of slechts een geringe betekenis voor de volksgezondheid;
- Specifieke kwantitatieve detectiemethoden gebaseerd op qPCR zijn ontwikkeld voor *M. kansasii* en *M. xenopi*. Het aantal genkopieën van deze twee micro-organismen kan dus betrouwbaar worden bepaald in drinkwater;
- *M. kansasii* en *M. xenopi* zijn in geen van het reinwater en gedistribueerde drinkwatermonsters van elf onderzochte pompstations aangetroffen. Vooralsnog lijkt drinkwater dus geen rol te spelen in de verspreiding van deze twee micro-organismen naar mensen met een verzwakt immuunsysteem.

Inhoud

Leeswijzer	3
Uitgebreide samenvatting	5
Inhoud	9
1 Pyrosequence analysis of the <i>hsp65</i> gene of nontuberculous <i>Mycobacterium</i> communities in unchlorinated drinking water in the Netherlands	11
1.1 Abstract	11
1.2 Introduction	11
1.3 Materials and Methods	12
1.4 Results	14
1.5 Discussion	18
1.6 Acknowledgement	21
1.7 References	21
1.8 Supporting online material	25
2 Kwantitatieve Real-time PCR methode voor detectie van <i>Mycobacterium kansasii</i> en <i>Mycobacterium xenopi</i> in drinkwater	33
2.1 Samenvatting	33
2.2 Inleiding	34
2.3 Moleculaire detectiemethoden	37
2.4 Herkomst en behandeling van drinkwatermonsters	44
2.5 Onderzoekresultaten	46
2.6 Discussie	55
2.7 Conclusies en aanbevelingen	56
2.8 Bibliografie	57

2.9 Bijlage 1

58

1 Pyrosequence analysis of the *hsp65* gene of nontuberculous *Mycobacterium* communities in unchlorinated drinking water in the Netherlands

Paul W. J. J. van der Wielen*, Leo Heijnen and Dick van der Kooij

KWR Watercycle Research Institute, Nieuwegein, The Netherlands

1.1 Abstract

Studies have shown that certain opportunistic pathogenic nontuberculous *Mycobacterium* (NTM) species can be present in distributed drinking water. However, detailed information about NTM population composition in drinking water is lacking. Therefore, NTM communities in unchlorinated drinking water from the distribution system of five treatment plants in the Netherlands were characterized using 454 pyrosequencing of the *hsp65* gene. Results showed high diversities in unchlorinated drinking water with up to 28 different NTM operational taxonomic units (OTUs) in a single sample. Each drinking water sample had a unique NTM community and most OTUs (81.1%) were only observed once. One OTU was observed in 14 of 16 drinking water samples, indicating that this NTM species is well-adapted to unchlorinated drinking water conditions. A clear influence of season, source type (groundwater, surface water), and easily assimilable organic carbon (AOC) concentration, biofilm formation rate, and active biomass in treated water on the establishment of an NTM community in drinking water was not observed. Apparently, local conditions are more important for the development of a specific NTM community in the drinking water distribution system. A low number (4.2%) of *hsp65* gene sequences showed more than 97% similarity to sequences of the opportunistic pathogens *M. avium*, *M. genavense* and *M. goodnae*. However, most NTM *hsp65* gene sequences (95.8%) were related to not-yet described NTM species that have not been linked to disease, indicating that most NTM species in unchlorinated drinking water from distribution systems in the Netherlands have a low public health significance.

1.2 Introduction

Several species of the genus *Mycobacterium* are described as nontuberculous mycobacteria (NTM) and these NTM species can be opportunistic pathogens, causing disease in immunocompromised humans (1). The drinking water environment provides niches for certain NTM species, since some species are capable of multiplying in biofilms, protozoa that graze on biofilms and sediments (2-7). As a result, studies have identified different NTM species isolated from drinking water using cultivation methods (8-11). Moreover, several studies have suggested that NTM isolates from drinking water and patients have the same genotype (12-17). Thus, drinking water can be a route of transmission for opportunistic pathogenic NTM species to immunocompromised humans.

A large proportion of the NTM species in drinking water cannot be cultivated with the currently used culture methods (18). Consequently, cultivation based studies provide a limited view of NTM communities in drinking water. A more complete characterization of the NTM populations in drinking water can be achieved by employing molecular methods like PCR and sequencing, but such studies are still scarce (19, 20). As a result, the NTM diversity

in drinking water is still largely unexplored. A possible reason for this is that the generally used 16S rRNA gene sequence analysis is not suitable to investigate NTM populations, because the 16S rRNA gene sequence between different *Mycobacterium* species can be 100% identical (21). However, NTM communities can be characterized by analysing the *hsp65* gene, since it has been reported that (i) the resolving power for differentiation among NTM species is higher for *hsp65* gene sequences than 16S rRNA gene sequences and (ii) NTM species with (approximate) 100% 16S rRNA gene sequence identity can be clearly differentiated by *hsp65* gene sequence analysis (21).

Regrowth of microorganisms in drinking water in the Netherlands is not limited by a disinfectant residual, but by reducing biodegradable organic carbon concentrations to the $\mu\text{g C l}^{-1}$ level in treated water (22). However, since NTM species can grow under oligotrophic conditions (5, 23), distribution of drinking water without a disinfection residual might increase the risk of NTM growth during distribution of the drinking water. On the other hand, studies have demonstrated that certain NTM species are especially resistant to monochloramine and shifts from chlorine to monochloramine disinfection in drinking water treatment, resulted in enhanced numbers of NTM in the drinking water distribution system (24–26). Research in the 1980s has demonstrated the occurrence of *M. kansasii* in drinking water from the Rotterdam area in the Netherlands (27). Phage typing showed that *M. kansasii* strains from drinking water were identical to patient strains (27). However, drinking water in the Rotterdam area was still distributed with a disinfectant residual (chlorine) at that time. More recently, van Ingen et al. (10) isolated several NTM species from unchlorinated drinking water sampled in two different regions in the Netherlands. Most of these strains were related to NTM-strains that are generally not observed among patient strains in the Netherlands (10).

Although several studies have described NTM communities in drinking water using cultivation methods, a thorough and complete description of the NTM communities, using molecular methods, in drinking water is lacking. The aim of our study was to characterize the NTM communities in unchlorinated drinking water, using 454 pyrosequence analyses of the *hsp65* gene. In addition, the influence of sources used for drinking water production (groundwater versus surface water), season, and easily assimilable organic carbon (AOC), the biofilm formation rate (BFR) and the amount of active biomass in the water, on the NTM-populations in drinking water was elucidated.

1.3 Materials and Methods

Sample locations. The selection of drinking water treatment plants was based on type of source water used for drinking water production, total organic carbon (TOC) content, easily assimilable organic carbon (AOC) concentration and the biofilm formation rate (BFR) of the treated water (Table 1). The unchlorinated distributed drinking water of four plants that used surface water (plant SW1, SW2, SW3, and SW4) and one plant that used groundwater (plant GW1) were analyzed. The TOC content of the treated water at the surface water plants is normal in the Netherlands, whereas the TOC concentration of the treated water at plant GW1 is relatively high. In addition, AOC levels above 10 ng l^{-1} and BFR levels above $10 \text{ pg ATP cm}^{-2} \text{ day}^{-1}$, respectively, are considered relatively high in the Netherlands.

Table 1. The water source used for drinking water production, the total organic carbon (TOC), easily assimilable organic carbon (AOC), adenosinetriphosphate (ATP) concentration, and the biofilm formation rate (BFR) in the treated drinking water of five treatment plants.

Plant ^a	Water source	TOC (mg C L ⁻¹)	AOC (µg C L ⁻¹)	BFR (pg ATP cm ⁻² day ⁻¹)	ATP (ng l ⁻¹)
SW1	Surface water	1.6 ± 0.1	14.7 ± 4.0	26.0	4.2 ± 2.4
SW2	Surface water	2.3 ± 0.3	4.5 ± 0.9	0.64	1.2 ± 0.6
SW3	Surface water	3.1 ± 0.5	20.4 ± 7.7	4.5	4.4 ± 1.3
SW4	Surface water	2.5 ± 0.7	18.4 ± 6.9	15.2	4.2 ± 1.0
GW1	Anoxic groundwater	7.9 ± 0.6	14.8 ± 5.9	33.1	6.2 ± 1.2

^a SW: surface water treatment plant; GW: groundwater treatment plant

Sampling. Drinking water samples (1000 ml) were taken from treated water at the plant and at approximately ten different locations in the distribution system of the five treatment plants in the winter and summer of 2010. Before samples were taken, taps were flushed until the water temperature remained stable for 30 seconds. The exception to this sampling strategy was drinking water sampled from the tap in the distribution system of plant SW1 in the summer, which were taken directly from the tap. Water samples were transported and stored at 4°C. Filtration of the water sample for DNA analyses was performed within 24 h after samples were collected.

DNA isolation. Each water sample (1000 ml) was filtrated over a 25-mm polycarbonate filter (0.22 µm pore size, type GTTP; Millipore, The Netherlands). Subsequently, the filter was added to phosphate and MT buffer of the FastDNA[®] SPIN Kit for Soil (Qbiogene, US) and a DNA fragment of an internal control was included before the buffer with filter was stored at -20°C. The internal control was used to determine the recovery efficiency of DNA isolation and PCR analysis (28, 29). DNA was isolated using the FastDNA[®] SPIN Kit for Soil according to **the supplier's protocol and eluted in 200 µl elution buffer.**

qPCR analyses. To determine the *hsp65* gene copy numbers of *Mycobacterium* spp., a qPCR protocol using the TB11 and TB12 primers published by Telenti et al. (30) was used. In short, reaction mixtures of 50 µl for PCR analyses contained 25 µl of 2 × IQTM SYBR[®] Green Supermix (Bio-Rad Laboratories BV, The Netherlands), 10 pmol of forward and reverse primer and 20 µg bovine serum albumin and 10 µl of DNA template. The amplification program consisted of 2 min 95°C; 43 cycles: 30 sec 95°C, 1 min 60°C, 1 min 72°C; 7 min 72°C. Amplification, detection, and data analysis were performed in an iCycler IQ Real-Time detection system (Bio-Rad laboratories BV, The Netherlands). The PCR cycle after which the fluorescence signal of the amplified DNA is detected (threshold cycle C_t), was used to quantify the gene copy concentration. Quantification was based on comparison of the sample C_t value with the C_t values of a calibration curve based on known copy numbers of the *hsp65* gene of *M. avium* subsp. *avium*.

Sequence analysis. A part of the *hsp65* gene (441 bp) was amplified from two to three drinking water samples from the distribution system and/or treated water taken in the summer (Plant SW3, SW4 and GW1) or in the winter and summer (Plant SW1 and SW2) using the TB11 and TB12 primers with sample identifiable bar codes using the PCR conditions as described above. 454 pyrosequencing of the amplified *hsp65* genes was performed using a 454 Life Sciences GS FLX series genome sequencer (Roche, The Netherlands). Returned *hsp65* gene sequences were trimmed, aligned, assigned to operational taxonomic units (OTUs) using the Mothur pipeline software tool (31). In short, sequences were trimmed (only sequences with lengths between 400 and 440 base pairs and that had both primer

sequences were selected), and aligned using a reference file with *hsp65* gene sequences of 34 different *Mycobacterium* species, six different *Nocardia* species, one *Streptomyces* species and one *Bifidobacterium* species (outgroup). Sequences were assigned to the genus *Mycobacterium* when they showed more than 83.1% similarity to a *hsp65* gene from a cultivated *Mycobacterium* species (21). Subsequently, *hsp65* gene sequences from NTM were assigned to operational taxonomic units (OTUs) using a 97% cut-off value (32). The NTM diversity was estimated by calculating the Shannon and Simpson diversity index (33, 34). Similarity between samples was determined by comparing OTU presence and abundance using the Morisita index for similarity and an unweighted pair group method with arithmetic mean cluster analysis based on the Morisita similarity index was done using the PAST software tool (35, 36). OTU identification was done by comparing the *hsp65* gene sequence of each NTM OTU with the *hsp65* gene sequences in the GenBank database. Genbank accession numbers of the *hsp65* gene sequences obtained in our study are KC832034 to KC832289.

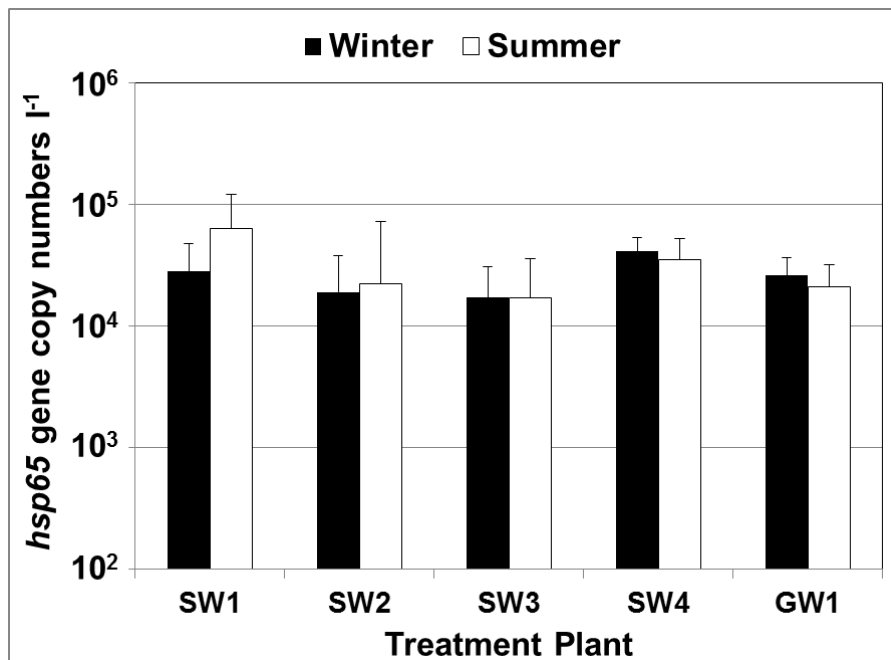


Fig. 1. Geometric mean (\times / geometric standard deviation) of the *hsp65* gene copy numbers in unchlorinated drinking water samples from the distribution systems of five different treatment plants in the Netherlands.

1.4 Results

hsp65 gene copies numbers in unchlorinated drinking water. The *hsp65* gene was amplified from all drinking water samples. The geometric gene copy numbers did not vary considerably between the different distribution systems in the winter and summer (1.7×10^4 to 6.3×10^4 gene copies l⁻¹; Fig. 1). Only the *hsp65* gene copy numbers in the drinking water samples from the distribution system of plant SW1 in the summer were significantly higher than the *hsp65* gene copy numbers observed in the distribution system of the other plants (ANOVA with Bonferroni post hoc test; $p < 0.01$).

hsp65 gene sequences. The 454 pyrosequencing of the *hsp65* gene amplified from drinking water resulted in approximately 10,000 *hsp65* gene sequences from the 16 samples that were analysed. Comparing these gene sequences with gene sequences from the Genbank database demonstrated that the similarity between 6,678 (69%) *hsp65* gene

sequences obtained in our study and the *hsp65* gene sequences of defined *Mycobacterium* species was below the cut-off value (83.1%) for the genus *Mycobacterium* (21). Thus, bacteria carrying these *hsp65* gene sequences belonged to other genera than *Mycobacterium*. On average, 32% of the *hsp65* gene sequences obtained in our study belonged to NTM, but this percentage differed between drinking water samples (Fig. 2).

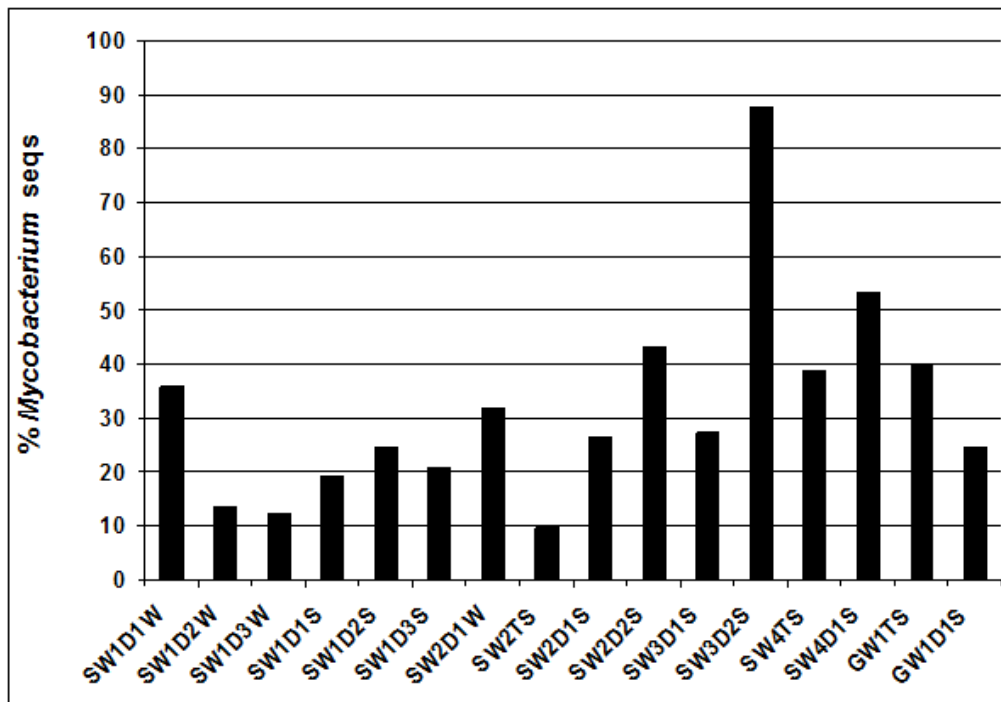


Fig. 2. Percentage of *hsp65* gene sequences that belongs to the genus *Mycobacterium*. SW1, SW2, SW3, SW4, GW1: treatment plants; D1, D2, D3: location in the distribution system; T: treated water at plant; S: summer; W: winter.

NTM communities in drinking water. The 2,943 *hsp65* gene sequences from NTM were used for further analyses. The number of different NTM OTUs in each drinking water sample varied between 4 and 28, but was in general higher than 10 (Table 2). Concomitantly, the diversity indices of the NTM community in most drinking water samples was relatively high (Table 2). The number of NTM OTUs and NTM diversity indices in drinking water from plants SW1 and SW2 were in general lower in winter ($9.2 \pm 4.4^\circ\text{C}$) than in summer ($20.3 \pm 1.5^\circ\text{C}$) (Table 2). In addition, the NTM OTU numbers and NTM diversity indices were higher in distributed water than in treated water of plants SW2, SW4 and GW1 (Table 2). A pronounced difference in NTM OTU numbers or NTM diversity indices between water samples from the different plants was not observed.

Table 2. The number of sequences analysed, operational taxonomic units (OTUs), and Shannon and Simpson diversity indices for the *hsp65* gene sequences of NTM in the different drinking water samples.

Treatment plant ^a	Location	Season	# sequences	# OTUs	Diversity index	
					Shannon	Simpson
SW1	DS 1	W	227	28	2.2	0.81
SW1	DS 2	W	114	16	1.6	0.64
SW1	DS 3	W	78	8	1.2	0.54
SW1	DS 1	S	96	26	2.4	0.85
SW1	DS 2	S	112	21	2.2	0.82
SW1	DS 3	S	91	11	1.5	0.70
SW2	DS 1	W	114	7	1.1	0.58
SW2	T	S	86	4	0.9	0.51
SW2	DS 1	S	167	14	1.8	0.78
SW2	DS 2	S	121	18	2.0	0.78
SW3	DS 1	S	139	21	2.3	0.84
SW3	DS 2	S	665	20	1.2	0.51
SW4	T	S	171	7	1.1	0.56
SW4	DS 1	S	161	23	1.9	0.72
GW1	T	S	329	8	0.2	0.072
GW1	DS 1	S	272	25	1.6	0.62

^a SW: surface water treatment plant; GW: groundwater treatment plant

^b DS: distribution system; T: treated water

^c W: winter; S: summer

Most NTM OTUs were observed in only one drinking water sample (142 of 175 OTUs) or in the distribution system and/or drinking water of one plant (153 of 175 OTUs) (Table 3). Still, one NTM OTU was observed in 14 of the 16 analysed drinking water samples, which came from the distribution system and/or treated water from all five treatment plants (Table 3). In general, this OTU constituted more than 10% of the *hsp65* gene sequences observed in the drinking water samples and that belonged to the genus *Mycobacterium* (Table S1). The other NTM OTUs were present in eight or less drinking water samples, although four NTM OTUs were observed in the distribution system and/or treated water of four different plants.

Table 3. The occurrence of operational taxonomic units (OTUs) in one or more drinking water samples or in one or more treatment plants.

# ^a OTUs	# Drinking water samples	# OTUs	# Treatment plants
142	1	153	1
16	2	11	2
9	3	5	3
4	6	4	4
1	5	1	5
1	7		
1	8		
1	14		

^a # = number of

The Morisita similarity index demonstrated that each drinking water sample had a unique NTM community (Fig. 3). Consequently, the similarity of the NTM OTU community between the sampled locations in each distribution system of plants SW1, SW2, or SW3 was low (Fig. 3), indicating that the NTM community differed considerably between different locations in the distribution system of these plants. None of the NTM OTUs in the treated water of plant SW2 were observed in the distributed drinking water (Table S1), indicating that the NTM community in treated water differs completely from the NTM community in distributed water. In contrast, the NTM community in the treated water and in the distribution system of plants SW4 and GW1 were relatively similar (86 to 94% similarity; Fig. 3), although the number of OTUs and NTM diversity were higher in the distributed water of these two plants than in the

treated water (Table 2). The dominant NTM OTUs in the treated water of plants SW4 and GW1 were also observed in the distributed water, but the distributed water contained additional NTM OTUs (Table S1). The NTM community at a specific location in the distribution system of plant SW1 differed considerably between summer and winter (31 to 67% similarity; Fig. 3). In contrast, the NTM community at location 1 in the distribution system of plant SW2 was not that different between summer and winter (81% similarity). The NTM communities in treated water and distribution system of a treatment plant were in general different from NTM communities at other plants (Fig. 3). However, similarities between NTM communities at a certain location in the distribution system of plant SW1 and SW3, SW2 and SW3, SW1 and GW1, and SW4 and GW1 were observed.

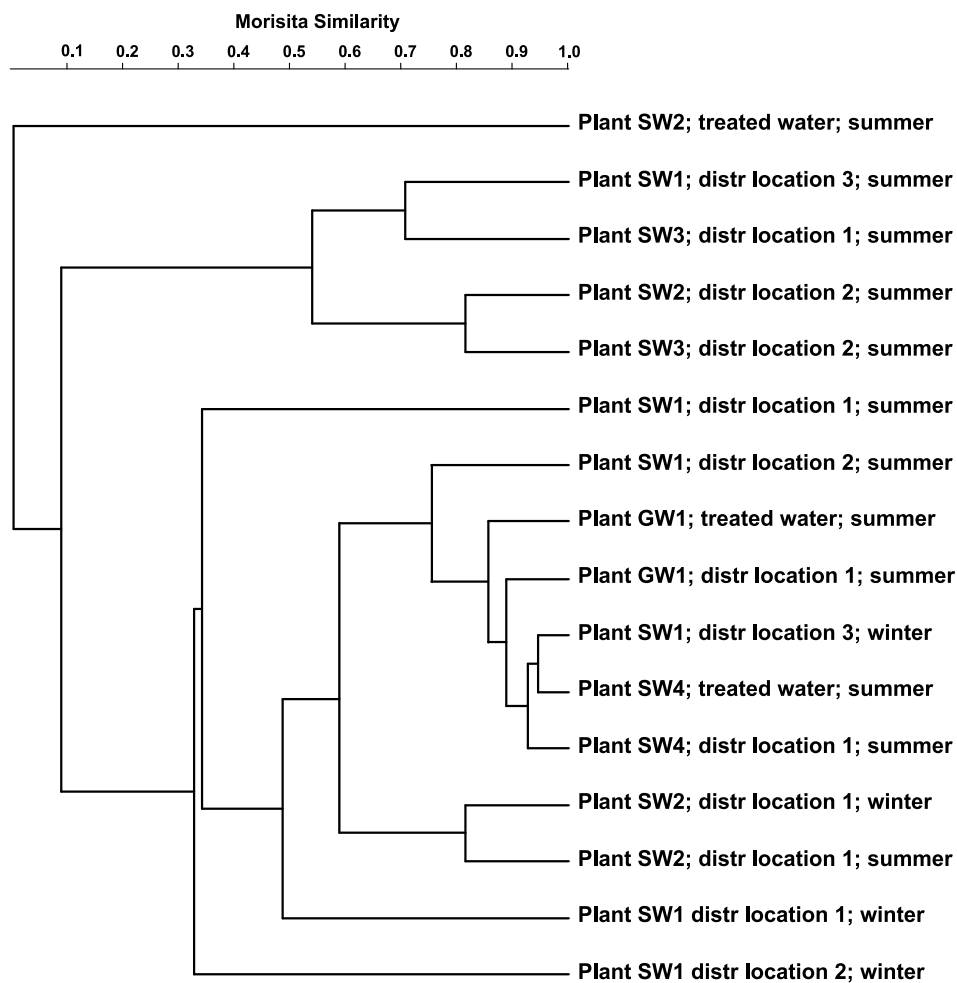


Fig. 3. UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) cluster analysis based on the Morisita similarity index between the operational taxonomic units of the *hsp65* gene sequences of nontuberculous mycobacteria in the different drinking water samples.

NTM identification in drinking water. All NTM *hsp65* gene sequences observed in water samples from the distribution system and/or treated water of plant SW1, SW4 and GW1 had less than 97% similarity to *hsp65* gene sequences of defined NTM species (Table S1). This indicates that the dominant NTM species in the distribution system of these plants are not-yet described NTM species. *hsp65* gene sequences with more than 97% similarity to defined

NTM species were observed in a few drinking water samples of the other plants. Four of 86 *hsp65* gene sequences from the treated water of plant SW2 were related to *M. salmoniphilum* (98.9% sequence similarity). *hsp65* gene sequences in drinking water (2 of 114 sequences in winter and 16 of 167 sequences in summer) at location 1 in the distribution system of plant SW2 were related to *M. gordonae* (98.5 to 99.8% sequence similarity). *hsp65* gene sequences (6 of 121 sequences) related to *M. gordonae* (99.8% sequence similarity) were also observed in the drinking water sample from the other location in the distribution system of plant SW2. In addition, 8 *hsp65* gene sequences were related to *M. Illatzerense* (97.5% sequence similarity) and 14 sequences to *M. avium* (97.5% sequence similarity) in this sample. *hsp65* gene sequences (61 of 665 sequences) were also related to *M. gordonae* (99.8% sequence similarity) in drinking water sampled from one location in the distribution system of plant SW3. Thirteen of the 129 *hsp65* gene sequences were related to *M. genavense* (97.3% sequence similarity) in drinking water from the other location in the distribution system of plant SW3.

1.5 Discussion

Lack of *hsp65* PCR primer specificity. The objective of our study was to investigate the NTM community in unchlorinated drinking water in the Netherlands by sequencing the *hsp65* gene after PCR amplification using primers TB11 and TB12 (30). The results showed that the majority of the *hsp65* gene sequences obtained from drinking water samples was not related to bacteria from the genus *Mycobacterium*. Thus, primer pair TB11 and TB12 cannot be used for the quantitative detection of *Mycobacterium* in drinking water. It is, therefore, better to use other developed qPCR assays for the quantitative detection of NTM in the drinking water environment (18, 37). One of these qPCR assays has also been used for the quantitative detection of NTM in unchlorinated drinking water in the Netherlands (38).

NTM communities in drinking water. We obtained 2,943 *hsp65* gene sequences of NTM in our study, which is adequate to describe and compare the NTM community from the different drinking water samples. Overall, the results demonstrate that each drinking water sample had a unique NTM composition, which was also observed with cultivation methods for drinking water samples in the US (39). Most NTM OTUs were only present in one drinking water sample, indicating that local conditions are important drivers for the establishment of NTM species in the drinking water distribution systems. Still, one NTM OTU was observed in the distributed and/or treated water of all five plants. Consequently, this NTM species seems well adapted to the unchlorinated drinking water environment in the Netherlands. Unfortunately, this NTM species is a not-yet described NTM species and the *hsp65* gene sequence of this species has not been deposited in the GenBank database before.

The number of NTM OTUs and the Shannon and Simpson diversity indices were noticeably higher in drinking water samples from the distribution system than in treated water. These results demonstrate that NTM species that are not present or at low numbers in the treated water are capable to establish themselves and multiply in the drinking water distribution system. However, the dominant NTM OTUs in treated water of plant SW4 and GW1 were also observed in the distributed drinking water. Only the NTM OTUs in treated water of plant SW2 were not observed in the distributed drinking water of that plant. Plant SW2 is the only one of these three plants that uses slow sand filtration as last step in the treatment train. Perhaps, conditions in the slow sand filters select for NTM species that are not well adapted to growth in the distribution system.

Angenent et al. (19) observed a substantial NTM diversity in the air and water from a hospital therapy pool, although OTU numbers or diversity indices were not given. Still, the NTM diversity observed in that study is difficult to compare with the NTM diversity observed in

our study, because they analysed 16S rRNA gene sequences instead of *hsp65* gene sequences (21). A much lower number of NTM species (normally up to 8 in a drinking water sample) was observed in drinking water samples when cultivation based methods were used (9-11, 18, 39-45). These cultivation based methods normally analyse about 100 to 1000 ml of drinking water. The amount of drinking water volume analysed in our PCR reaction corresponds to 50 ml of drinking water, since only a small portion (5%) of the isolated DNA was used in the PCR reaction. Consequently, the NTM diversity and number of OTUs could even been higher when 100 to 1000 ml of drinking water had been used for analysis. Our results indicate that numerous NTM species in drinking water have not-yet been cultivated, which was confirmed by our observation that most *hsp65* gene sequences of NTM were related to not-yet described species. Consequently, cultivation based methods provide a limited view of NTM diversity in drinking water. The observation that most NTM in unchlorinated drinking water have not-yet been cultivated, and may not be cultivable, is consistent with observations made for other microorganisms in unchlorinated drinking water like *Legionella* (29), protozoa (46), or fungi (37).

The source used for drinking water production (groundwater versus surface water) had no or minor influence on the establishment of a specific NTM community, since more than 90% similarity was observed between the NTM community in drinking water from plant GW1 and plant SW1 or SW4. This similarity value was higher than the similarity between some NTM communities in drinking water produced at different surface water plants (e.g. SW3 and SW4). In the US and France, a clear difference between the NTM community in drinking water from groundwater and surface water was observed when cultivation based methods were used (41, 43). In addition, NTM could not be cultivated from drinking water in 64 to 69% of the investigated plants in the US and in 28% of the investigated plants in France. The discrepancy between their and our results reconfirms the need for DNA based methods to identify factors that affect NTM communities in drinking water.

A distinct seasonal influence on the NTM community was observed for the samples of plant SW1, but a less noticeable seasonal effect was observed for samples from plant SW2. However, this apparent disagreement can also be explained by the different sampling methods used for the winter and summer samples of plant SW1. Winter samples were obtained after flushing the tap till the water temperature was stable for 30 seconds (assuming that the drinking water sample came from the distribution system), whereas summer samples were obtained directly from the tap (assuming that the drinking water sample came from the premise plumbing system). Consequently, the different NTM populations in winter and summer samples in the distributed drinking water of plant SW1 might indicate that NTM communities differ between premise plumbing and distribution system. A seasonal effect on the NTM numbers in distributed drinking water has been observed before (38, 39) as well as an effect of the premise plumbing system (25, 38). Therefore, additional experiments are required to determine whether the NTM community in distributed drinking water is affected by season and/or premise plumbing system.

The drinking water from plant SW2 has a lower AOC concentration, and a lower BFR value than the drinking water from the other four plants (Table 1). As a result, the active biomass concentration (i.e. ATP) in the drinking water from plant SW2 is low compared to drinking water from the other plants (Table 1). The NTM community composition of drinking water from SW2 did not cluster separately from the NTM community composition of drinking water from the other plants. Moreover, the drinking water NTM community at one location in the distribution system of plant SW2 was relatively similar to the drinking water NTM community at a location in the distribution system of plant SW3 (82% similarity). These results show that a low BFR, AOC and ATP concentration in drinking water has limited impact on the NTM

community composition in the drinking water distribution system. A previous study has shown that AOC and/or BFR of the drinking water did not affect the 16S rRNA gene copy numbers of NTM in unchlorinated drinking water in the Netherlands (38). It can be concluded from our studies that both NTM numbers and NTM community composition cannot be controlled by further reduction of the microbial activity, AOC concentration and/or BFR in unchlorinated drinking water in the Netherlands. Obviously, certain NTM species are well-adapted to the intense oligotrophic conditions in the drinking water environment.

NTM identification in drinking water. Although 95.8% of the *hsp65* gene sequences were related to not-yet described NTM species, 4.2% of the *hsp65* gene sequences demonstrated more than 97% similarity to *hsp65* gene sequences from defined NTM species. Most of these *hsp65* gene sequences were related to *M. gordonae*, which has also been regularly detected in cultivation-based analysis of NTM communities in drinking water in the Netherlands (27, 47) or other countries (9, 11, 18, 39-41, 43-45). In a more recent study the rapid growing mycobacteria *M. llatzerense*, *M. chelonae*, *M. vaccae*, *M. salmoniphilum*, *M. peregrinum*, and *M. septicum* were cultivated from drinking water sampled at two locations in the Netherlands (10). Only two of these species (*M. llatzerense* and *M. salmoniphilum*) were observed in our study as well. Drinking water samples from other plants than used in our study were analysed in this recent study (10). This might explain the different NTM species observed between their and our study, since our results indicate that each drinking water sample has a unique NTM population. *M. genavense* has been observed in hospital drinking water in the Netherlands in 1999 using molecular methods (48). This hospital is located in the same geographic area as the single location where *hsp65* gene sequences related to *M. genavense* were found in our study and might indicate a specific geographic distribution or adaptation to a specific water type of this NTM species. Other publications that describe the detection of *M. genavense* in drinking water could not be found, probably because *M. genavense* is difficult to cultivate (48).

The observation that 14 *hsp65* gene sequences showed more than 97% similarity with the *hsp65* gene of *M. avium* was unexpected, because *M. avium* could not be detected in the same water type with a previously described qPCR protocol (37). The *hsp65* gene sequences related to *M. avium* were only observed at one location in the distribution system of SW2 in the summer, where it constituted 5.0% of the total *hsp65* gene sequences. Given the relatively high *hsp65* gene copy number ($9.2 \times 10^4 \text{ l}^{-1}$) and the number of *hsp65* gene sequences related to *M. avium* in this drinking water sample, *M. avium* numbers should have been ten times above the detection limit of the specific qPCR assay. Therefore, the bacterium carrying this *hsp65* gene may represent a separate NTM species closely related to *M. avium* or the selective PCR method used for *M. avium* does not detect all *M. avium* strains.

Our study showed that the majority of NTM species in drinking water are related to not-yet described species. It is unlikely that these NTM species are of public health significance, because these unidentified NTM species have not been linked to disease. Still, elucidation of the virulence properties of these species is necessary to definitely exclude their role in public health. A small number of *hsp65* gene sequences related to *M. gordonae*, *M. avium*, *M. salmoniphilum*, *M. genavense* and *M. llatzerense* were observed in drinking water in our study. Some of these species have been reported to be involved in disease of immunocompromised persons (1, 48). Disease caused by NTM is not obligatory to report to the health authorities in the Netherlands and, therefore, detailed information about NTM species involved in disease in the Netherlands is not available. A recent examination of several clinical NTM cases in the Netherlands indicated that of the five species observed in drinking water only *M. gordonae* and *M. avium* have been confirmed in clinical cases (49, 50). However, the clinical relevance of *M. gordonae* in the Netherlands is very low, whereas the

clinical relevance of *M. avium* is moderate (49, 50). Consequently, the results from our study do not indicate that NTM in unchlorinated drinking water from distribution systems in the Netherlands are of important public health significance.

The NTM with the highest clinical relevance in the Netherlands seems to be *M. xenopi*, *M. kansasii* and *M. malmoense* (49, 50), species that were not observed in our NTM community analysis. Since we have analysed NTM communities in 50 ml of drinking water, it remains possible that these three NTM species are present at numbers that were below the detection limit of our sequencing approach. In addition, *M. kansasii* has been observed in drinking water from the premise plumbing system in the Netherlands, but not in drinking water from the treatment plant or distribution system (27). This indicates that premise plumbing systems rather than distribution system enhance growth of *M. kansasii*. Therefore, specific qPCR methods are currently being developed for the quantitative detection of *M. kansasii*, *M. xenopi* and *M. malmoense* in drinking water. Such qPCR assays can subsequently be used to determine whether these three NTM species are present in unchlorinated drinking water in the distribution and/or premise plumbing systems in the Netherlands.

1.6 Acknowledgement

This work was financed by the joint research program (BTO) of the Dutch drinking water companies.

1.7 References

1. Falkinham, J. O., 3rd. 1996. Epidemiology of infection by nontuberculous mycobacteria. Clin. Microbiol. Rev. 9:177-215.
2. Dailloux, M., M. Albert, C. Laurain, S. Andolfatto, A. Lozniewski, P. Hartemann, and L. Mathieu. 2003. *Mycobacterium xenopi* and drinking water biofilms. Appl. Environ. Microbiol. 69:6946-6948.
3. Goy, G., V. Thomas, K. Rimann, K. Jaton, G. Prod'homme, and G. Greub. 2007. The Neff strain of *Acanthamoeba castellanii*, a tool for testing the virulence of *Mycobacterium kansasii*. Res. Microbiol. 158:393-397.
4. Kazda, J. 1973. The importance of water for the spread of potentially pathogenic Mycobacteria. I. Possibilities for the multiplication of Mycobacteria. Zentralbl. Bakteriol. Orig. B 158:161-169.
5. Norton, C. D., M. W. LeChevallier, and J. O. Falkinham, 3rd. 2004. Survival of *Mycobacterium avium* in a model distribution system. Water Res. 38:1457-1466.
6. Schulze-Robbecke, R., and R. Fischeder. 1989. Mycobacteria in biofilms. Zentralbl. Hyg. Umweltmed. 188:385-390.
7. Strahl, E. D., G. E. Gillaspay, and J. O. Falkinham, 3rd. 2001. Fluorescent acid-fast microscopy for measuring phagocytosis of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and *Mycobacterium scrofulaceum* by *Tetrahymena pyriformis* and their intracellular growth. Appl. Environ. Microbiol. 67:4432-4439.
8. Neumann, M., R. Schulze-Robbecke, C. Hagenau, and K. Behringer. 1997. Comparison of methods for isolation of mycobacteria from water. Appl. Environ. Microbiol. 63:547-552.
9. Peters, M., C. Muller, S. Rusch-Gerdes, C. Seidel, U. Gobel, H. D. Pohle, and B. Ruf. 1995. Isolation of atypical mycobacteria from tap water in hospitals and homes: is this a possible source of disseminated MAC infection in AIDS patients? J. Infect. 31:39-44.
10. van Ingen, J., H. Blaak, J. de Beer, A. M. de Roda Husman, and D. van Soolingen. 2010. Rapidly growing nontuberculous mycobacteria cultured from home tap and shower water. Appl. Environ. Microbiol. 76:6017-6019.

11. September, S. M., V. S. Brozel, and S. N. Venter. 2004. Diversity of nontuberculoïd *Mycobacterium* species in biofilms of urban and semiurban drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7571-7573.
12. Burns, D. N., R. J. Wallace, Jr., M. E. Schultz, Y. S. Zhang, S. Q. Zubairi, Y. J. Pang, C. L. Gibert, B. A. Brown, E. S. Noel, and F. M. Gordin. 1991. Nosocomial outbreak of respiratory tract colonization with *Mycobacterium fortuitum*: demonstration of the usefulness of pulsed-field gel electrophoresis in an epidemiologic investigation. *Am. Rev. Respir. Dis.* 144:1153-1159.
13. Conger, N. G., R. J. O'Connell, V. L. Laurel, K. N. Olivier, E. A. Graviss, N. Williams-Bouyer, Y. Zhang, B. A. Brown-Elliott, and R. J. Wallace, Jr. 2004. *Mycobacterium simae* outbreak associated with a hospital water supply. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 25:1050-1055.
14. Hilborn, E. D., M. A. Yakrus, T. C. Covert, S. I. Harris, S. F. Donnelly, M. T. Schmitt, S. Toney, S. A. Bailey, and G. N. Stelma, Jr. 2008. Molecular comparison of *Mycobacterium avium* isolates from clinical and environmental sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 74:4966-4968.
15. Kline, S., S. Cameron, A. Streifel, M. A. Yakrus, F. Kairis, K. Peacock, J. Besser, and R. C. Cooksey. 2004. An outbreak of bacteremias associated with *Mycobacterium mucogenicum* in a hospital water supply. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 25:1042-1049.
16. Marshall, H. M., R. Carter, M. J. Torbey, S. Minion, C. Tolson, H. E. Sidjabat, F. Huygens, M. Hargreaves, and R. M. Thomson. 2011. *Mycobacterium lentiflavum* in drinking water supplies, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 17:395-402.
17. von Reyn, C. F., J. N. Maslow, T. W. Barber, J. O. Falkinham, 3rd, and R. D. Arbeit. 1994. Persistent colonisation of potable water as a source of *Mycobacterium avium* infection in AIDS. *Lancet* 343:1137-1141.
18. Hussein, Z., O. Landt, B. Wirths, and N. Wellinghausen. 2009. Detection of non-tuberculous mycobacteria in hospital water by culture and molecular methods. *Int. J. Med. Microbiol.* 299:281-290.
19. Angenent, L. T., S. T. Kelley, A. St Amand, N. R. Pace, and M. T. Hernandez. 2005. Molecular identification of potential pathogens in water and air of a hospital therapy pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:4860-4865.
20. Perkins, S. D., J. Mayfield, V. Fraser, and L. T. Angenent. 2009. Potentially pathogenic bacteria in shower water and air of a stem cell transplant unit. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:5363-5572.
21. Kim, H., S. H. Kim, T. S. Shim, M. N. Kim, G. H. Bai, Y. G. Park, S. H. Lee, G. T. Chae, C. Y. Cha, Y. H. Kook, and B. J. Kim. 2005. Differentiation of *Mycobacterium* species by analysis of the heat-shock protein 65 gene (*hsp65*). *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 55:1649-1656.
22. van der Kooij, D., and H. R. Veenendaal. 2013. Regrowth problems and biological stability assessment in the Netherlands, in press. *In* D. van der Kooij and P. W. J. J. van der Wielen (ed.), *Microbial Growth in Drinking Water Supplies: Problems, Causes, Controls and Research Needs*. IWA Publishing, London, UK.
23. Torvinen, E., M. J. Lehtola, P. J. Martikainen, and I. T. Miettinen. 2007. Survival of *Mycobacterium avium* in drinking water biofilms as affected by water flow velocity, availability of phosphorus, and temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:6201-6207.
24. Moore, M. R., M. Pryor, B. Fields, C. Lucas, M. Phelan, and R. E. Besser. 2006. Introduction of monochloramine into a municipal water system: impact on colonization of buildings by *Legionella* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:378-383.
25. Wang, H., M. Edwards, J. O. Falkinham, 3rd, and A. Pruden. 2012. Molecular survey of the occurrence of *Legionella* spp., *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas*

- aeruginosa*, and amoeba hosts in two chloraminated drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 78:6285-6294.
26. Wang, H., S. Masters, Y. Hong, J. Stallings, J. O. Falkinham, 3rd, M. A. Edwards, and A. Pruden. 2012. Effect of disinfectant, water age, and pipe material on occurrence and persistence of *Legionella*, mycobacteria, *Pseudomonas aeruginosa*, and two amoebas. *Environ. Sci. Technol.* 46:11566-11574.
 27. Engel, H. W., L. G. Berwald, and A. H. Havelaar. 1980. The occurrence of *Mycobacterium kansasii* in tapwater. *Tubercle* 61:21-26.
 28. van der Wielen, P. W. J. J., and G. Medema. 2010. Unsuitability of quantitative *Bacteroidales* 16S rRNA gene assays for discerning fecal contamination of drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 76:4876-4881.
 29. Wullings, B. A., G. Bakker, and D. van der Kooij. 2011. Concentration and diversity of uncultured *Legionella* spp. in two unchlorinated drinking water supplies with different concentrations of natural organic matter. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:634-641.
 30. Telenti, A., F. Marchesi, M. Balz, F. Bally, E. C. Bottger, and T. Bodmer. 1993. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J. Clin. Microbiol.* 31:175-178.
 31. Schloss, P. D., S. L. Westcott, T. Ryabin, J. R. Hall, M. Hartmann, E. B. Hollister, R. A. Lesniewski, B. B. Oakley, D. H. Parks, C. J. Robinson, J. W. Sahl, B. Stres, G. G. Thallinger, D. J. Van Horn, and C. F. Weber. 2009. Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:7537-7541.
 32. McNabb, A., D. Eisler, K. Adie, M. Amos, M. Rodrigues, G. Stephens, W. A. Black, and J. Isaac-Renton. 2004. Assessment of partial sequencing of the 65-kilodalton heat shock protein gene (*hsp65*) for routine identification of *Mycobacterium* species isolated from clinical sources. *J. Clin. Microbiol.* 42:3000-3011.
 33. Hill, M. O. 1973. Diversity and evenness: A unifying notation and its consequences. *Ecology* 54:427-432.
 34. Haegeman, B., J. Hamelin, J. Moriarty, P. Neal, J. Dushoff, and J. S. Weitz. 2013. Robust estimation of microbial diversity in theory and in practice. *ISME J.* doi:10.1038/ismej.2013.10
 35. van der Wielen, P. W. J. J., H. Bolhuis, S. Borin, D. Daffonchio, C. Corselli, L. Giuliano, G. D'Auria, G. J. de Lange, A. Huebner, S. P. Varnavas, J. Thomson, C. Tamburini, D. Marty, T. J. McGenity, and K. N. Timmis. 2005. The enigma of prokaryotic life in deep hypersaline anoxic basins. *Science* 307:121-123.
 36. Wolda, H. 1981. Similarity indices, sample size and diversity. *Oecologia (Berl)* 50:296-302.
 37. van der Wielen, P. W. J. J., R. Italiaander, B. A. Wullings, L. Heijnen, and D. van der Kooij. 2013. Opportunistic pathogens in drinking water in the Netherlands, in press. In D. van der Kooij and P. W. J. J. van der Wielen (ed.), *Microbial Growth in Drinking Water Supplies: Problems, Causes, Controls and Research Needs*. IWA Publishing, London, UK.
 38. van der Wielen, P. W. J. J., and D. van der Kooij. 2013. Nontuberculous mycobacteria, fungi, and opportunistic pathogens in unchlorinated drinking water in the Netherlands. *Appl. Environ. Microbiol.* 79:825-834.
 39. Falkinham, J. O., 3rd, C. D. Norton, and M. W. LeChevallier. 2001. Factors influencing numbers of *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium intracellulare*, and other mycobacteria in drinking water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:1225-1231.
 40. Castillo-Rodal, A. I., M. Mazari-Hiriart, L. T. Lloret-Sanchez, B. Sachman-Ruiz, P. Vinuesa, and Y. Lopez-Vidal. 2012. Potentially pathogenic nontuberculous

- mycobacteria found in aquatic systems. Analysis from a reclaimed water and water distribution system in Mexico City. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 31:683-694.
41. Covert, T. C., M. R. Rodgers, A. L. Reyes, and G. N. Stelma, Jr. 1999. Occurrence of nontuberculous mycobacteria in environmental samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 65:2492-2496.
 42. Hilborn, E. D., T. C. Covert, M. A. Yakrus, S. I. Harris, S. F. Donnelly, E. W. Rice, S. Toney, S. A. Bailey, and G. N. Stelma, Jr. 2006. Persistence of nontuberculous mycobacteria in a drinking water system after addition of filtration treatment. *Appl. Environ. Microbiol.* 72:5864-5869.
 43. Le Dantec, C., J. P. Duguet, A. Montiel, N. Dumoutier, S. Dubrou, and V. Vincent. 2002. Occurrence of mycobacteria in water treatment lines and in water distribution systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:5318-5325.
 44. Schulze-Robbecke, R., B. Janning, and R. Fischeder. 1992. Occurrence of mycobacteria in biofilm samples. *Tuber. Lung Dis.* 73:141-144.
 45. Torvinen, E., S. Suomalainen, M. J. Lehtola, I. T. Miettinen, O. Zacheus, L. Paulin, M. L. Katila, and P. J. Martikainen. 2004. Mycobacteria in water and loose deposits of drinking water distribution systems in Finland. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:1973-1981.
 46. Valster, R. M., B. A. Wullings, G. Bakker, H. Smidt, and D. van der Kooij. 2009. Free-living protozoa in two unchlorinated drinking water supplies, identified by phylogenetic analysis of 18S rRNA gene sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 75:4736-4746.
 47. Groothuis, D. G., and L. G. Berwald. 1982. Voorkomen van *M. kansasii* in leidingwater te Amsterdam en te 's-Gravenhage. Rapport nr 128102001. RIVM.
 48. Hillebrand-Haverkort, M. E., A. H. Kolk, L. F. Kox, J. J. Ten Velden, and J. H. Ten Veen. 1999. Generalized *Mycobacterium genavense* infection in HIV-infected patients: detection of the mycobacterium in hospital tap water. *Scand. J. Infect. Dis.* 31:63-68.
 49. van Ingen, J. 2009. Nontuberculous mycobacteria. From gene sequences to clinical relevance. PhD thesis, Radboud University Nijmegen, Nijmegen, the Netherlands.
 50. van Ingen, J., S. A. Bendien, W. C. de Lange, W. Hoefsloot, P. N. Dekhuijzen, M.J. Boeree, and D. van Soolingen. 2009. Clinical relevance of non-tuberculous mycobacteria isolated in the Nijmegen-Arnhem region, The Netherlands. *Thorax* 64:502-506.

1.8 Supporting online material

Table S1. Number of sequences related to each operational taxonomic unit (OTU) per drinking water sample and the nearest defined NTM species relative in the GenBank database of each OTU with the percentage sequence similarity.

OTU	Seqs # (%)	Nearest species relative	Genbank	Similarity (%)
Plant SW1; Distribution location 1; Winter				
27	45 (19.8)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.5
53	2 (0.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.8
54	57 (25.1)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	93.7
55	1 (0.4)	<i>M. kansasii</i>	AB232365	93.2
56	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	91.6
17	3 (1.3)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.3
57	1 (0.4)	<i>M. kansasii</i>	AB232365	92.5
58	1 (0.4)	<i>M. intracellulare</i>	HM454232	94.1
59	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	88.6
61	1 (0.4)	<i>M. avium</i>	AF126033	91.2
62	2 (0.9)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	92.7
63	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	87.2
64	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	91.6
65	1 (0.4)	<i>M. holsaticum</i>	AJ310469	90.0
66	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.6
67	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.5
70	1 (0.4)	<i>M. avium</i>	FJ643452	92.1
71	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.7
72	1 (0.4)	<i>M. gordonae</i>	FJ643462	92.5
69	1 (0.4)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	89.8
12	18 (7.9)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	94.8
19	5 (2.2)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.4
60	2 (0.9)	<i>M. avium</i>	DQ284771	90.5
22	3 (1.3)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.7
24	2 (0.9)	<i>M. moriokaense</i>	AY859680	95.7
68	10 (4.4)	<i>M. avium</i>	CP000479	94.3
11	47 (20.7)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
5	16 (7.0)	<i>M. marinum</i>	FJ868212	93.9
Plant SW1; Distribution location 2; Winter				
60	3 (2.7)	<i>M. avium</i>	DQ284771	90.5
73	1 (0.9)	<i>M. gordonae</i>	FJ643461	90.9
74	1 (0.9)	<i>M. holsaticum</i>	AJ310469	92.0
75	1 (0.9)	<i>M. fortuitum</i>	AJ310232	86.4
76	1 (0.9)	<i>M. smegmatis</i>	HM454230	89.1
77	11 (9.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.5
78	1 (0.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	90.4
22	57 (51.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.7
79	7 (6.3)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	95.7

OTU	Seqs # (%)	Nearest species relative	Genbank	Similarity (%)
80	1 (0.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	91.6
81	1 (0.9)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	95.1
82	1 (0.9)	<i>M. gordonae</i>	EF546780	85.5
83	1 (0.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	90.4
84	1 (0.9)	<i>M. avium</i>	HM454220	87.3
12	8 (7.2)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	94.8
11	15 (13.5)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
Plant SW1; Distribution location 3; Winter				
85	2 (2.6)	<i>M. genavense</i>	EU495310	92.5
86	1 (1.3)	<i>M. avium</i>	AJ307641	88.2
88	1 (1.3)	<i>M. avium</i>	FJ643452	92.1
12	2 (2.6)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	94.8
19	2 (2.6)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.4
22	8 (10.3)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.7
87	11 (14.1)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	96.8
11	51 (65.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
Plant SW1; Distribution location 1; Summer				
27	2 (1.8)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.5
11	16 (14.3)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
87	1 (0.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	96.8
1	2 (1.8)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	95.0
110	1 (0.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.8
22	3 (2.7)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.7
102	1 (0.9)	<i>M. avium</i>	U55826	93.9
103	2 (1.8)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	90.9
104	1 (0.9)	<i>M. avium</i>	DQ284771	94.6
105	1 (0.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.5
106	1 (0.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.3
92	24 (21.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.3
107	1 (0.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.1
99	1 (0.9)	<i>M. wolinskyi</i>	FJ351484	92.5
108	1 (0.9)	<i>M. avium</i>	CP000479	91.4
109	1 (0.9)	<i>M. fortuitum</i>	AJ310232	92.5
69	1 (0.9)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	89.8
2	2 (1.8)	<i>M. saskatchewanense</i>	AY208858	94.1
12	18 (16.1)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	94.8
19	25 (22.3)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.4
111	1 (0.9)	<i>M. gordonae</i>	EF546780	86.9
96	1 (0.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.9
112	1 (0.9)	<i>M. holsaticum</i>	AJ310469	90.9
113	1 (0.9)	<i>M. avium</i>	CP000479	88.9
114	1 (0.9)	<i>M. lentiflavum</i>	AF547851	92.1

OTU	Seqs # (%)	Nearest species relative	Genbank	Similarity (%)
115	2 (1.8)	<i>M. marinum</i>	FJ868212	94.1
Plant SW1; Distribution location 2; Summer				
96	1 (1.0)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.9
11	32 (33.3)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
68	1 (1.0)	<i>M. avium</i>	CP000479	94.3
100	6 (6.3)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	95.2
24	1 (1.0)	<i>M. moriokaense</i>	AY859680	95.7
93	3 (3.1)	<i>M. avium</i>	U55827	92.7
22	22 (22.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.7
60	5 (5.2)	<i>M. avium</i>	DQ284771	90.5
19	9 (9.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.4
69	1 (1.0)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	89.8
99	2 (2.1)	<i>M. wolinskyi</i>	FJ351484	92.5
92	3 (3.1)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.3
89	1 (1.0)	<i>M. avium</i>	AF126033	94.8
90	1 (1.0)	<i>M. avium</i>	DQ284771	92.3
91	1 (1.0)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	90.7
94	1 (1.0)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.9
95	1 (1.0)	<i>M. marinum</i>	FJ868212	89.3
97	1 (1.0)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	90.7
33	2 (2.1)	<i>M. avium</i>	HM454220	92.7
98	1 (1.0)	<i>M. avium</i>	CP000479	88.7
101	1 (1.0)	<i>M. avium</i>	DQ284771	91.8
Plant SW1; Distribution location 3; Summer				
11	16 (17.6)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
1	43 (47.3)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	95.0
23	19 (20.9)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	96.6
19	6 (6.6)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.4
116	1 (1.1)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	93.0
117	1 (1.1)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	91.2
118	1 (1.1)	<i>M. avium</i>	DQ284771	90.0
93	1 (1.1)	<i>M. avium</i>	U55827	92.7
25	1 (1.1)	<i>M. genavense</i>	EU495310	95.0
119	1 (1.1)	<i>M. gordonae</i>	EF546780	86.6
24	1 (1.1)	<i>M. moriokaense</i>	AY859680	95.7
Plant SW2; Distribution location 1; Winter				
148	1 (0.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.5
110	3 (2.6)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.8
27	62 (54.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.5
150	1 (0.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.7
147	5 (4.4)	<i>M. hassiacum</i>	AF547842	94.1
149	2 (1.8)	<i>M. gordonae</i>	FJ643464	99.8

OTU	Seqs # (%)	Nearest species relative	Genbank	Similarity (%)
11	40 (35.1)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
Plant SW2; Distribution location 1; Summer				
11	63 (37.7)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
149	15 (9.0)	<i>M. gordonae</i>	FJ643464	99.8
1	17 (10.2)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	95.0
158	1 (0.6)	<i>M. gordonae</i>	FJ643463	95.2
152	5 (3.0)	<i>M. tusciae</i>	AF547887	96.7
147	9 (5.4)	<i>M. hassiacum</i>	AF547842	94.1
27	39 (23.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.5
153	1 (0.6)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	92.1
150	1 (0.6)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.7
49	12 (7.2)	<i>M. genavense</i>	EU495310	94.1
154	1 (0.6)	<i>M. gordonae</i>	FJ643457	98.5
155	1 (0.6)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	86.6
156	1 (0.6)	<i>M. avium</i>	DQ284771	92.3
157	1 (0.6)	<i>M. fortuitum</i>	AJ310232	94.6
Plant SW2; Distribution location 2; Summer				
23	51 (42.1)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	96.6
159	8 (6.6)	<i>M. moriokaense</i>	AY859680	95.5
147	17 (14.0)	<i>M. hassiacum</i>	AF547842	94.1
152	2 (1.7)	<i>M. tusciae</i>	AF547887	96.7
160	1 (0.8)	<i>M. avium</i>	CP000479	94.1
9	2 (1.7)	<i>M. austroafricanum</i>	AM403501	92.7
161	1 (0.8)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	94.8
158	2 (1.7)	<i>M. gordonae</i>	FJ643463	95.2
162	8 (6.6)	<i>M. llatzerense</i>	AM421344	97.5
163	6 (5.0)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	99.8
164	1 (0.8)	<i>M. avium</i>	DQ284771	91.8
165	1 (0.8)	<i>M. moriokaense</i>	AY859680	93.4
166	1 (0.8)	<i>M. lacticola</i>	HM030495	95.0
167	14 (11.6)	<i>M. avium</i>	CP000479	97.5
168	1 (0.8)	<i>M. holsaticum</i>	AJ310469	92.3
169	1 (0.8)	<i>Mycobacterium sp</i>	EU619912	90.5
170	1 (0.8)	<i>M. llatzerense</i>	AM421344	94.7
1	3 (2.5)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	95.0
Plant SW2; Treated water; Summer				
44	4 (4.7)	<i>M. salmoniphilum</i>	DQ866777	98.9
171	1 (1.2)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	95.7
127	53 (61.6)	<i>M. gordonae</i>	EU486081	94.1
172	28 (32.6)	<i>M. wolinskyi</i>	FJ531484	93.2
Plant SW3; Distribution location 1; Summer				
173	1 (0.7)	<i>M. genavense</i>	EU495310	94.5

OTU	Seqs # (%)	Nearest species relative	Genbank	Similarity (%)
100	3 (2.2)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	95.2
174	1 (0.7)	<i>M. avium</i>	CP000479	95.0
175	8 (5.8)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.5
176	13 (9.4)	<i>M. genavense</i>	EU495310	97.3
177	1 (0.7)	<i>M. genavense</i>	EU495310	93.2
178	1 (0.7)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.4
179	1 (0.7)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	90.7
1	30 (21.6)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	95.0
68	5 (3.6)	<i>M. avium</i>	CP000479	94.3
180	3 (2.2)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	92.1
181	1 (0.7)	<i>M. intracellulare</i>	HM454232	96.1
182	1 (0.7)	<i>M. avium</i>	FJ643451	94.1
183	1 (0.7)	<i>M. smegmatis</i>	HM454230	94.1
185	1 (0.7)	<i>M. saskatchewanense</i>	AY208858	93.0
87	3 (2.2)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	96.8
27	16 (11.5)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.5
25	3 (2.2)	<i>M. genavense</i>	EU495310	95.0
23	39 (28.1)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	96.6
11	1 (0.7)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
184	6 (4.3)	<i>M. saskatchewanense</i>	AY208858	95.0
Plant SW3; Distribution location 2; Summer				
1	62 (9.3)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	95.0
23	456 (68.6)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	96.6
24	33 (5.0)	<i>M. moriokaense</i>	AY859680	95.7
12	2 (0.3)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	94.8
149	61 (9.2)	<i>M. gordonae</i>	FJ643464	99.8
11	1 (0.2)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
186	1 (0.2)	<i>M. haemophilum</i>	GQ245967	92.2
187	1 (0.2)	<i>M. gordonae</i>	FJ643464	95.2
188	6 (0.9)	<i>M. intracellulare</i>	HM454232	91.8
189	1 (0.2)	<i>M. avium</i>	FJ643451	95.0
190	2 (0.3)	<i>M. simulans</i>	FJ786253	93.2
184	1 (0.2)	<i>M. saskatchewanense</i>	AY208858	95.0
191	1 (0.2)	<i>M. gordonae</i>	FJ643462	97.1
192	1 (0.2)	<i>M. scrofulaceum</i>	GQ478700	89.3
193	3 (0.5)	<i>M. gordonae</i>	FJ643462	95.2
5	2 (0.3)	<i>M. marinum</i>	FJ868212	93.9
194	19 (2.9)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	96.4
10	6 (0.9)	<i>M. mageritense</i>	EU732652	94.3
195	1 (0.2)	<i>M. gordonae</i>	FJ63464	96.8
196	5 (0.8)	<i>M. gordonae</i>	FJ643464	96.6

OTU	Seqs # (%)	Nearest species relative	Genbank	Similarity (%)
Plant SW4; Treated water; Summer				
11	105 (61.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
25	8 (4.7)	<i>M. genavense</i>	EU495310	95.0
22	38 (22.2)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.7
34	1 (0.6)	<i>Mycobacterium sp</i>	EU619883	92.1
35	1 (0.6)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.8
36	17 (9.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	96.8
37	1 (0.6)	<i>M. marinum</i>	FJ868212	94.3
Plant SW4; Distribution location 1; Summer				
3	1 (0.6)	<i>M. simulans</i>	FJ786253	94.6
4	1 (0.6)	<i>M. agri</i>	AY438080	90.9
6	1 (0.6)	<i>M. avium</i>	FJ643452	92.5
7	1 (0.6)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	95.4
13	1 (0.6)	<i>M. holsaticum</i>	AJ310469	90.9
15	1 (0.6)	<i>M. austroafricanum</i>	AM403501	91.6
16	1 (0.6)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	95.2
18	1 (0.6)	<i>M. rutilum</i>	EU727188	93.7
20	1 (0.6)	<i>M. genavense</i>	EU495310	93.4
21	1 (0.6)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	96.1
8	6 (3.7)	<i>M. avium</i>	FJ643452	93.0
17	7 (4.3)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.3
2	1 (0.6)	<i>M. saskatchewanense</i>	AY208858	94.1
12	2 (1.2)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	94.8
19	14 (8.7)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.4
22	25 (15.5)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.7
24	4 (2.5)	<i>M. moriokaense</i>	AY859680	95.7
14	1 (0.6)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	94.3
23	7 (4.3)	<i>M. gordonae</i>	FJ384767	96.6
9	1 (0.6)	<i>M. austroafricanum</i>	AM403501	92.7
1	3 (1.9)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	95.0
11	77 (47.8)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
5	2 (1.2)	<i>M. marinum</i>	FJ868212	93.9
10	1 (0.6)	<i>M. mageritense</i>	EU732652	94.3
Plant GW1; Treated water; Summer				
11	315 (96.3)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
140	1 (0.3)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.2
141	1 (0.3)	<i>M. genavense</i>	EU495310	89.1
142	1 (0.3)	<i>M. saskatchewanense</i>	AY208859	89.8
143	1 (0.3)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	91.1
144	4 (1.2)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.1
145	2 (0.6)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.0
146	2 (0.6)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.6

OTU	Seqs # (%)	Nearest species relative	Genbank	Similarity (%)
Plant GW1; Distribution location 1; Summer				
52	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.4
120	3 (1.1)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.6
14	1 (0.4)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	94.3
121	1 (0.4)	<i>M. mageritense</i>	EU732652	93.2
122	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.5
123	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.2
125	1 (0.4)	<i>M. fortuitum</i>	AJ310232	91.8
124	36 (13.2)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.3
126	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6
128	1 (0.4)	<i>M. intracellulare</i>	HM454232	89.8
130	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	93.8
26	5 (1.8)	<i>M. avium</i>	DQ284771	94.6
131	1 (0.4)	<i>M. avium</i>	FJ643452	92.7
132	1 (0.4)	<i>M. gordonae</i>	EF601222	93.2
133	2 (0.7)	<i>M. avium</i>	DQ284771	93.0
134	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	91.1
135	1 (0.4)	<i>M. saskatchewanense</i>	AY208859	94.3
136	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	90.4
129	2 (0.7)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	96.1
8	3 (1.1)	<i>M. avium</i>	FJ643452	93.0
27	1 (0.4)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.5
22	64 (23.5)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	92.7
24	1 (0.4)	<i>M. moriokaense</i>	AY859680	95.7
127	9 (3.3)	<i>M. gordonae</i>	EU486081	94.1
100	10 (3.7)	<i>M. gordonae</i>	FJ643460	95.2
11	122 (44.9)	<i>M. parascrofulaceum</i>	AY337276	94.6

2 Kwantitatieve Real-time PCR methode voor detectie van *Mycobacterium kansasii* en *Mycobacterium xenopi* in drinkwater

Afstudeerverslag van Marijan Uytewaal-Aarts voor verkrijging van de Bsc titel.

2.1 Samenvatting

Achtergrond en doel

Door opwarming van de aarde zal Nederland in de toekomst, waarschijnlijk te maken krijgen met een stijging van de temperatuur in het oppervlaktewater en drinkwater. Door de toename van de drinkwatertemperatuur kan de populatie van micro-organismen in het distributiesysteem veranderen. Het aantal opportunistische pathogenen in drinkwater kan toenemen omdat opportunistische pathogenen die in drinkwater kunnen groeien over het algemeen beter groeien bij hogere drinkwatertemperatuur. Daarnaast wordt verwacht dat ook het aantal mensen met een verzwakt immuunsysteem zal toenemen in de toekomst. Door toename van het aantal van mensen met een verminderde afweer is de kans groter dat een aantal van deze mensen besmet raakt door een opportunistisch pathogeen. In een eerdere literatuurstudie (van der Wielen & van der Kooij, 2009) is onderzocht welke opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen, die zich in drinkwater kunnen vermeerderen een mogelijk gezondheidsrisico vormen in Nederland. Er zijn kwantitatieve PCR-methoden ontwikkeld voor specifieke detectie van opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater. Beschikbaar zijn qPCR methoden voor schimmels, *Legionella pneumophila*, *Aspergillus fumigatus*, *Mycobacterium* spp., *Mycobacterium avium* complex, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acanthamoeba* spp. en *Stenotrophomonas maltophilia*. In eerdere studie is geconcludeerd dat ziekteverwekkende schimmels en *Mycobacterium* spp. algemeen voorkomen in het Nederlands drinkwater en in staat zijn zich te vermeerderen in distributiesystemen en in binnen-installaties. Resultaten over de mogelijke aanwezigheid van *Mycobacterium kansasii* en *Mycobacterium xenopi* zijn niet beschikbaar omdat specifieke detectiemethoden voor deze soorten ontbreken.

Het doel van de studie beschreven in deze rapportage is om kwantitatieve PCR-methoden te ontwikkelen voor de specifieke en kwantitatieve detectie van *M. kansasii* en *M. xenopi* in (drink)water. Deze methode zal vervolgens worden toegepast om het voorkomen van *M. kansasii* en *M. xenopi* in een groot aantal Nederlands drinkwatermonsters te analyseren.

Resultaten

qPCR-methoden voor de specifieke en kwantitatieve detectie van *M. kansasii* of *M. xenopi* in (drink)water zijn ontwikkeld en beschikbaar. Voor *M. kansasii* zijn specifieke primers en probe tegen het 16S-23S ITS gen beschikbaar en voor *M. xenopi* zijn specifieke primers en probe tegen het 16S rRNA gen beschikbaar. Voor de kwantificatie van de qPCR is een kalibratiesysteem (MYC1cAvKaSpXe) ontwikkeld, waarmee een ijklijn kan worden gegenereerd voor het kwantificeren van *M. kansasii* respectievelijk *M. xenopi* in water. De detectielimiet voor *M. kansasii* is 8,8 DNA kopieën / PCR en de detectielimiet voor *M. xenopi* is 5,9 DNA kopieën / PCR. In Nederlands drinkwatermonsters afkomstig van 11 verschillende pompstations en hun bijbehorend voorzieningsgebied zijn met de in deze studie ontwikkelde qPCR methoden geen *M. kansasii* respectievelijk *M. xenopi* aangetoond.

Conclusies en aanbevelingen.

- Er is een kwantitatieve Real-time PCR methode beschikbaar voor de detectie van *Mycobacterium kansasii* en *Mycobacterium xenopi* in (drink)water.
- *Mycobacterium kansasii* en *Mycobacterium xenopi* zijn met de ontwikkelde qPCR voor *Mycobacterium kansasii* respectievelijk *Mycobacterium xenopi* niet aangetoond in Nederlands drinkwatermonsters afkomstig van 11 verschillende pompstations en hun bijbehorend voorzieningsgebied. Vooralnog lijkt er geen risico te zijn in drinkwater voor *M. kansasii* en *M. xenopi*.

Aanbevolen wordt om in een vervolgstudie watermonsters te analyseren met qPCR die positief zijn voor *Mycobacterium kansasii* respectievelijk *Mycobacterium xenopi* welke vervolgens met behulp van sequentieanalyse kunnen worden bevestigd.

Voorgesteld wordt om naast drinkwatermonsters ook drinkwatermonsters uit landen met een (sub)tropisch klimaat te analyseren met deze qPCR 's, tevens kunnen bv oppervlaktewatermonsters en monsters uit koeltorens in Nederland worden onderzocht. Ook kunnen drinkwatermonsters worden gespiked met een bekende hoeveelheid *M. kansasii* of *M. xenopi*. Watermonsters die positief zijn voor *Mycobacterium kansasii* respectievelijk *Mycobacterium xenopi* kunnen vervolgens met behulp van sequentieanalyse worden bevestigd.

Aanbevolen wordt om vervolgonderzoek te doen naar de mogelijkheid om een multiplex PCR te ontwikkelen voor *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium* en *Mycobacterium* spp.

2.2 Inleiding

Klimaat

Sinds de industriële revolutie is de wereldtemperatuur met 0,8 graden Celsius gestegen (18). De gemiddelde opwarming van de wereld zal volgens het platform Communication on Climate Change (PCCC) in het jaar 2100 tussen de 1,1 en 6,4 graden Celsius zijn, waarbij het grootste deel van de opwarming van de laatste vijftig jaar waarschijnlijk te wijten is aan de door de mens uitgestoten broeikassen (18). Door klimaatverandering kan in de toekomst het oppervlakte water en drinkwater in het distributiesysteem opwarmen (17). In bepaalde delen van het distributiesysteem kan door het zogenoemde hitte-eiland effect (Urban Heat Island) nog hogere temperatuur behaald worden doordat in een stad de temperatuur gemiddeld hoger is dan in een omliggend gebied (18). Ook onder donkere oppervlakten (bijvoorbeeld asfalt) is de verwachting dat de water/bodem temperaturen hoger zijn dan in de omgeving (16).

Opportunistische pathogenen

Door de toename van de watertemperatuur kan de populatie van micro-organismen in het distributiesysteem veranderen. De microbiële populatie zal als gevolg hiervan verschuiven naar een populatie van micro-organismen met een hogere optimale groeitemperatuur (15). Het merendeel van de micro-organismen in het drinkwater zijn niet pathogeen, maar een beperkt aantal soorten micro-organismen die in het drinkwater voorkomen kunnen opportunistische pathogeen zijn. Een opportunistisch pathogeen is een micro-organisme dat ziekteverwekkend kan zijn als het immuunsysteem van de gastheer verlaagd (verminderde afweer) is terwijl bij een normale afweer dit micro-organisme geen kans heeft pathogeen te zijn. Onder andere *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* en Non-tuberculeuze mycobacteriën (NTM) behoren tot de groep opportunistische pathogenen (15). Naast de trend

van toename van de drinkwatertemperatuur door klimaatverandering wordt ook verwacht dat de komende jaren het aantal mensen met een verzwakt immuunsysteem zal toenemen. Deze toename komt doordat mensen met een levensbedreigende ziekte (bv kanker, cystic fibrosis) langer in leven blijven, er steeds meer mensen geneesmiddelen krijgen die de activiteit van het immuunsysteem verlagen (bv bij orgaantransplantatie en reuma- of kankertherapie) en het aantal ouderen toeneemt (16). Door toename van het aantal mensen met een verminderde afweer is de kans groter dat een aantal van deze mensen besmet raakt door een opportunistisch pathogeen (14). Beide trends geven aan dat het van belang is dat er onderzoek gedaan wordt naar de aanwezigheid van opportunistische pathogenen in drinkwater. In 2009 is een start gemaakt door een literatuurstudie uit te voeren naar opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen die zich in drinkwater kunnen vermeerderen (14). Hierbij is onderzocht welke opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen in Nederland een mogelijk gezondheidsrisico vormen. Aan de hand van deze studie is er een lijst opgesteld van prioritering van micro-organismen waar aanvullend onderzoek gewenst is naar het voorkomen in Nederlands drinkwater in relatie tot opwarming van het leidingnet (tabel 1) (15).

Tabel 1, Prioritering micro-organismen voor onderzoek in Nederlands drinkwater in relatie tot opwarming van het leidingnet

Micro-organismen	Prioriteit
<i>Legionella pneumophila</i>	Zeer hoog
Non-tuberculeuze <i>Mycobacterium</i> spp.	Hoog
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Hoog
Ziekteverwekkende fungi	Hoog
<i>Burkholderia cepacia</i> complex	Midden
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	Midden
<i>Acanthamoeba</i> spp.	Midden
<i>Acinetobacter baumannii</i> - <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> complex	Laag
<i>Aeromonas</i>	Laag
<i>Afipia</i>	Laag
<i>Bosea</i>	Laag
<i>Chlamydia</i> -achtige bacteriën zoals <i>Simkania negevensis</i>	Laag
<i>Elizabethkingia meningoseptica</i>	Laag
<i>Helicobacter pylori</i>	Laag
<i>Methylobacterium</i>	Laag
<i>Yersinia enterocolitica</i>	Laag

Geconcludeerd is dat *L. pneumophila* de hoogste prioriteit voor onderzoek heeft. Deze prioriteit werd ingegeven doordat het aantal ziektegevallen van *L. pneumophila* in Nederland relatief hoog is, het organisme in drinkwater gerelateerde biofilms kan groeien en bij een hogere temperatuur een verschuiving in de legionellapopulatie kan veroorzaken. Hierdoor kan *L. pneumophila* vaker worden aangetroffen in het distributiesysteem (15). Veel onderzoek naar *L. pneumophila* heeft de afgelopen 10 jaar reeds plaatsgevonden door de Nederlandse drinkwaterbedrijven, VROM en KWR. De drinkwaterbedrijven laten in het bedrijfstak onderzoek (BTO) onderzoek uitvoeren door KWR. Non-tuberculeuze mycobacteriën (NTM), *P. aeruginosa* en ziekteverwekkende schimmels hebben na *L. pneumophila* een hoge prioriteit gekregen voor aanvullend onderzoek (tabel 1). Deze hoge prioriteit wordt veroorzaakt doordat *P. aeruginosa*, enkele NTM- en ziekteverwekkende schimmelsoorten in Nederland infecties veroorzaken en kunnen groeien in (drink)water gerelateerde milieus (15). Daarnaast is aangetoond dat ziekteverwekkende bacteriën van *Mycobacterium avium* complex, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium xenopi* en *Aspergillus* spp. via drinkwater kunnen worden verspreid. Het staat niet vast dat de ziekteverwekkende stammen van *P. aeruginosa* via drinkwater worden verspreid, maar dit kan op basis van de literatuur ook niet worden uitgesloten (15). *Stenotrophomonas maltophilia*, *Acanthamoeba* spp. en bacteriën die behoren tot het *Burkholderia cepacia* complex (BCC) kunnen via drinkwater worden verspreid en kunnen zich in drinkwater

vermeerderen. Omdat het aantal ziektegevallen met deze organismen in Nederland echter laag is, is de prioriteit voor aanvullend onderzoek lager dan voor de organismen die hierboven zijn genoemd (15). De overige micro-organismen met ziekteverwekkende eigenschappen die zijn genoemd in tabel 1 hebben een lage prioriteit voor aanvullend onderzoek en worden daarom voorlopig niet verder onderzocht (15).

Mycobacteriën

Mycobacteriën behoren tot het geslacht *Mycobacterium*. Na de ontdekking van *Mycobacterium tuberculosis* in 1882 door Robert Koch zijn in de jaren daarna gelijkende mycobacteriën geïsoleerd. Een kenmerk van mycobacteriën is dat deze zuurvast zijn. Door een kleurprocedure uit te voeren van Ziehl -Neelsen worden zuurvaste bacteriën rood gekleurd en niet zuurvaste bacteriën blauw. Het geslacht *Mycobacterium* wordt onderverdeeld in drie groepen:

- *M. tuberculosis*, veroorzaker van tuberculosis
- *Mycobacterium leprae*, veroorzaker van lepra
- Non-tuberculose *Mycobacterium* (NTM) (13)

De NTM bestaan inmiddels uit 130 verschillende soorten waarvan de meesten vrij in ons milieu en in drinkwater voorkomen(13). Een aantal NTM soorten kan bij de mensen een longontsteking veroorzaken, maar ze kunnen ook ontstekingen van huid en lymfeknopen veroorzaken (15). De precieze incidentie van infectie door één van de NTM soorten bij de mens in Nederland is onbekend. Dit kan komen doordat er voor deze soorten geen meldingsplicht is door artsen en medisch microbiologische laboratorium aan de gemeenschappelijke gezondheidsdienst (GGD). Er zijn meerdere ziektegevallen door *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. haemophilum*, *M. scrofulaceum*, *M. malmoense* en *M. avium* beschreven in Nederland, maar infecties door *M. kansasii* en *M. malmoense* lijken het meest voor te komen. De incidentie van infecties met deze twee NTM-soorten lijkt sinds de **jaren '80 te zijn toegenomen. Deze toename wordt waarschijnlijk veroorzaakt door de** toename van immuungecompromitteerde personen in Nederland (12, 15, 16). Aidspatiënten zijn met name gevoelig voor infectie met NTM, maar ook mensen die om een andere reden een verzwakt immuunsysteem hebben, kunnen door deze bacteriën geïnfecteerd raken (15, 16). NTM zijn in staat om in drinkwater en drinkwater gerelateerde biofilms te groeien (15). Ook is bekend dat NTM-soorten een hoge resistentie tegen chloor hebben waardoor het gebruik van chloor en / of monochlooramine voor desinfectie van het drinkwater alleen niet voldoende is om groei van NTM in drinkwater te voorkomen (15, 16). Een hogere watertemperatuur heeft een positief effect op de groei van opportunistische NTM soorten (15). Veel NTM zijn moeilijk kweekbaar en groeien pas na 10 dagen van incubatie en stellen bovendien hoge eisen aan het groeimedium.

Aanleiding van het onderzoek

Door klimaatverandering zal in de toekomst het oppervlaktewater en drinkwater in het distributiesysteem opwarmen en is het belangrijk om te weten of opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen zich gaan vermeerderen door deze veranderingen en bij welke temperatuur dit gebeurt. Daarnaast is het onduidelijk wat de invloed is van de watersamenstelling, leidingmateriaal, sediment en biofilms op de aanwezigheid en groei van deze organismen in het distributiesysteem en in drinkwater installaties in gebouwen (binneninstallaties). In het huidige BTO wordt een project uitgevoerd door KWR met als doel het effect te bepalen van deze factoren op het voorkomen en groei van *Mycobacterium* spp. (met name *M. avium*, *M. kansasii* en *M. xenopi*), *P. aeruginosa*, ziekteverwekkende schimmels en *S. maltophilia* in drinkwater. Deze informatie in combinatie met de aantallen mogelijk ziekteverwekkende organismen in drinkwater wordt vervolgens gebruikt om te bepalen onder welke condities in het gedistribueerde drinkwater en/of binneninstallaties

deze opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen een mogelijke risico voor de volksgezondheid vormen.

Dit project is onderverdeeld in drie deelprojecten:

1. Effect van drinkwater temperatuur op groei opportunistische pathogenen.
2. Opportunistische pathogenen in drinkwater van verschillende herkomst en watersamenstelling.
3. Effect van leidingmateriaal op groei van opportunistische pathogenen.

Er zijn moleculaire methoden ontwikkeld voor de specifieke detectie van opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater. Beschikbaar zijn qPCR (kwantitatieve polymerase ketting reactie) methode voor schimmels, *A. fumigatus*, *Mycobacterium* spp., *M. avium* complex, *P. aeruginosa* en *S. maltophilia* (11). Deze qPCR methoden zijn samen met de reeds bestaande qPCR methoden voor *L. pneumophila* en *Acanthamoeba* spp. toegepast in onderzoek naar opportunistische pathogenen in drinkwater.

Geconcludeerd kan worden dat ziekteverwekkende schimmels en *Mycobacterium* spp. algemeen voorkomen in het Nederlands drinkwater en in staat zijn zich te vermeerderen in distributiesystemen en binneninstallaties (10, 16). Resultaten over de mogelijke aanwezigheid van *M. kansasii* en *M. xenopi* zijn niet beschikbaar omdat specifieke detectiemethoden voor deze soorten ontbreken. Aanvullend onderzoek naar *M. kansasii* en *M. xenopi* moet worden uitgevoerd, zodat er meer inzicht wordt verkregen naar het voorkomen van *M. kansasii* en *M. xenopi* in het Nederlands drinkwater. Om de aanwezigheid van *M. kansasii* en *M. xenopi* in drinkwater te bepalen is het noodzakelijk om relatief snelle, specifieke en kwantitatieve methoden beschikbaar te hebben, waarmee deze organismen in drinkwater kunnen worden gedetecteerd.

Doel van het onderzoek

Ontwikkel een moleculaire methoden (qPCR) waarmee *M. kansasii* en *M. xenopi* betrouwbaar, specifiek en kwantitatief in (drink)water kan worden bepaald. Deze methoden zullen vervolgens worden toegepast om het voorkomen van *M. kansasii* en *M. xenopi* in een groot aantal Nederlandse drinkwatermonsters te analyseren zodat kan achterhaald of drinkwater een mogelijke rol speelt bij infectie van patiënten.

2.3 Moleculaire detectiemethoden

PCR

De afgelopen 50 jaar is er veel ontwikkeling geweest in de moleculaire biologie. Eén van de **belangrijkste ontwikkelingen is de moleculaire detectiemethode “polymerase ketting(chain) reactie (PCR)” waarmee een kenmerkend DNA-fragment**, van het te detecteren organisme, zeer specifiek en snel aan te tonen. In de PCR, beschreven door Kary Mullis (1983, Nobelprijs 1994), worden vele kopieën gemaakt van een specifiek (kenmerkend) DNA-fragment (8, 9).

Dit DNA-fragment wordt vermeerderd met behulp van:

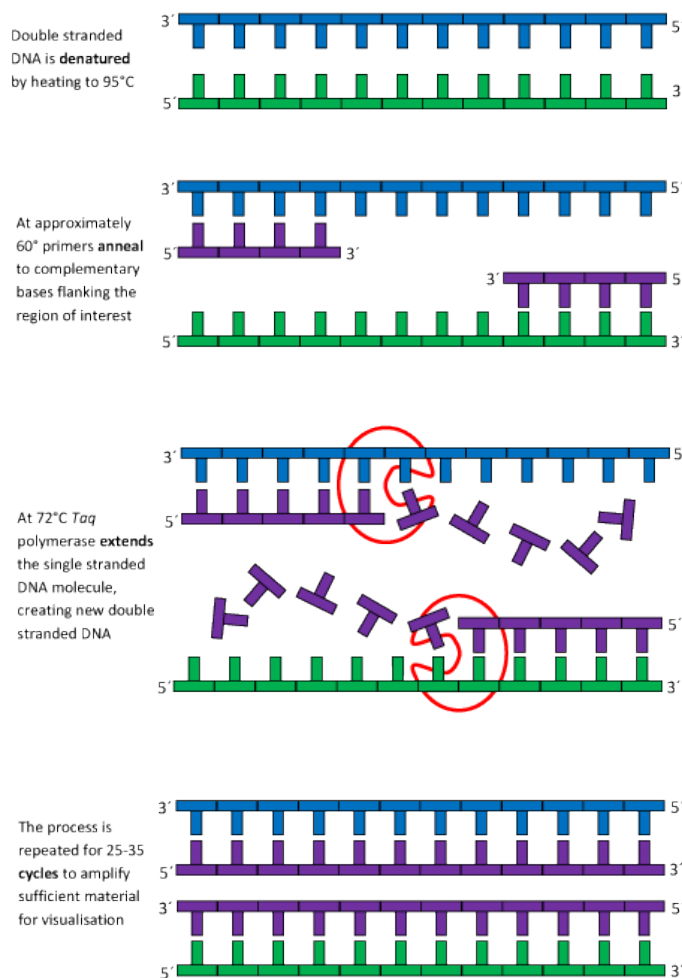
- Twee synthetische oligodeoxynucleotide primers (forward primer en reverse primer)
- Een thermosstabiel DNA-polymerase
- Vier deoxyribonucleoside trifosfaten (dATP, dGTP, dTTP en dCTP).

Iedere cyclus van een PCR reactie bestaat uit drie afzonderlijke stappen (3-staps) weergegeven in figuur 1:

- Denaturatie (smelten) van dubbelstrengs DNA-moleculen tot twee enkelstrengs DNA-moleculen bij 93°-96°C
- Annealing (binden) van de primers aan het enkelstrengs DNA-moleculen bij 50°-60°C, waarbij de annealing temperatuur essentieel is om de primers specifiek te laten binden aan het DNA.

- Elongatie (verlengen) van de primer door het enzym Taq-polymerase bij 72°C.

Analyse van het PCR product gaat met behulp van agarose gels (niet real-time). Bij korte fragmenten is ook mogelijk de annealing en elongatie te combineren tot een 2-staps PCR. Daarbij wordt het reactiemengsel eerst verhit tot 95°C voor denaturatie van de DNA strengen om vervolgens het reactiemengsel te laten afkoelen naar 55 tot 65°C (vaak 60°C) om de primers en probe te laten binden en het Taq-polymerase de fragment(en) te laten synthetiseren. De specificiteit van de PCR-reactie is gebaseerd op de verschillen in DNA-molecuul volgorde van de organismen. Met behulp van twee korte synthetische DNA-moleculen (forward primer en reverse primer), met een DNA-volgorde (DNA-sequentie) die specifiek is voor het te detecteren DNA-fragment van bepaalde organismen, wordt het kenmerkende DNA-fragment selectief vermenigvuldigd (7).



Figuur 1. Schematische weergave van het werkingmechanisme van de PCR reactie (21)

qPCR

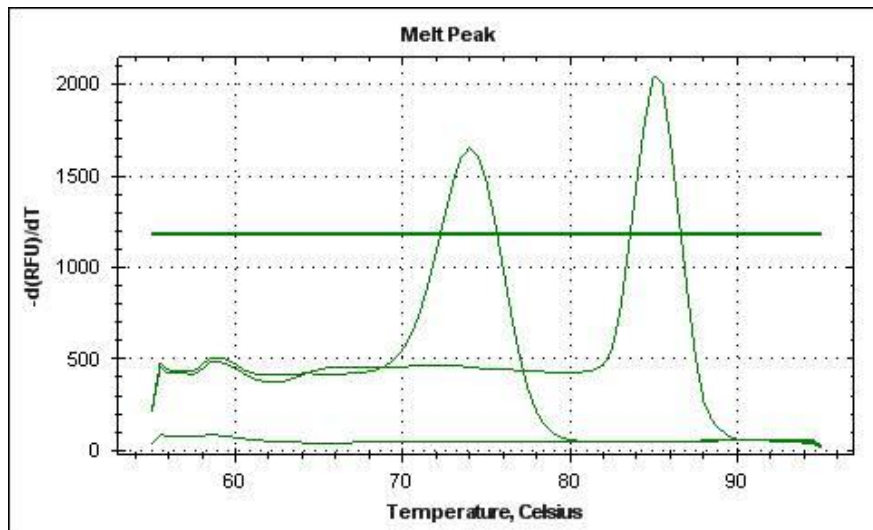
Met qPCR (kwantitatieve polymerase ketting reactie), ook wel Real-time PCR genoemd, wordt tijdens de PCR van iedere cyclus de hoeveelheid fluorescentie gemeten door een Real-time PCR machine. Bij een optimaal verlopende qPCR-reactie vindt, tijdens elke temperatuur-cyclus een verdubbeling plaats van het kenmerkende DNA-fragment. Zo kan minimaal één kopie DNA vermenigvuldigd worden tot vele miljarden kopieën DNA. De hoeveelheid

fluorescentie is een maat voor de hoeveelheid geproduceerd PCR product (8). Voor de detectie van het vermenigvuldigen van DNA wordt in deze studie gebruik gemaakt van twee fluorescente methoden: SYBR Green en de TaqMan probe.

SYBR Green

SYBR Green is een DNA-bindende stof. SYBR Green bindt aan dubbelstrengs DNA en wanneer deze is gebonden geeft deze een fluorescent signaal af. Bij iedere cyclus waarbij dubbelstrengs DNA wordt geamplificeerd (vermeerderd) wordt de toename van de hoeveelheid fluorescentie gemeten. SYBR Green bindt tussen elk dsDNA. De toename van het fluorescent signaal is recht evenredig met de toename van de hoeveelheid DNA (equimolair). Hiermee kan kwantitatief DNA mee worden gedetecteerd (zie § 3.7). De specificiteit van het gevormde product kan geanalyseerd worden met behulp van smeltcurve analyse die aan het eind van de PCR wordt uitgevoerd. Elk PCR product heeft zijn eigen smeltcurve, gebaseerd op de lengte van het PCR product en de nucleotiden volgorde (G, C, A, T). Stapsgewijs wordt de temperatuur verhoogd met stappen van 0,5°C van 60°C tot 90°C. Als de smelttemperatuur van het product is bereikt, zal het dsDNA uitsmelten in enkelstrengs DNA. Hiermee komt SYBR Green weer vrij in de oplossing en zal de hoeveelheid fluorescentie dalen. De afnamesnelheid van de fluorescentie waarbij dit gebeurt wordt uitgezet in een grafiek. Elk gevormd DNA product heeft zijn eigen specifieke smeltcurve.

Als er één product is geamplificeerd, is er één piek zichtbaar, maar er kunnen ook meerdere pieken zichtbaar zijn (figuur 2). Dit betekent dat er meerdere producten gevormd zijn. Dit kunnen primerdimers zijn (waarbij de primers aan elkaar of zichzelf hechten in plaats van aan het target) of de primers zijn niet specifiek gebonden aan het doeltarget maar aan een ander target (8).

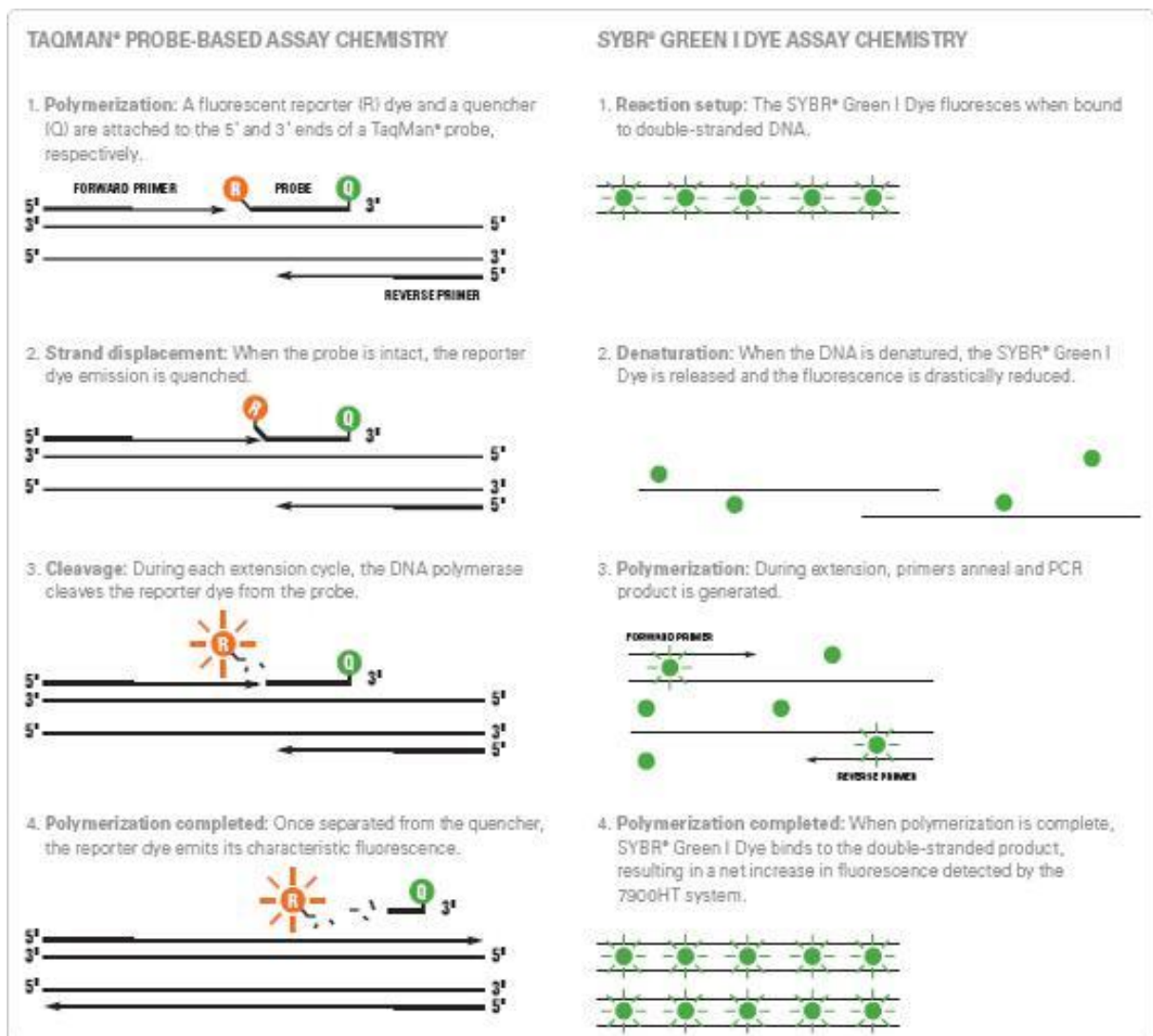


Figuur 2. Weergave van meerder smeltpieken waarbij de smelttemperatuur van de 1^e piek bij 74°C ligt en de smelttemperatuur van de 2^e piek bij 85°C. De onderste vlakke groene lijn is een negatieve controle waar geen pieken zichtbaar zijn en dus geen product gevormd is.

TaqMan probe

Naast de algemene kleuring van al het DNA met SYBR Green is het ook mogelijk om m.b.v. een TaqMan probe DNA te meten. Een TaqMan probe geeft een fluorescerend signaal als deze probe gebonden is geweest aan het template DNA. De TaqMan probe is aan de 5'kant gelabeld met fluorescente groep (reporter) en aan de andere 3'kant zit zowel een quencher, die de fluorescentie uitdooft, en een fosfaatgroep.

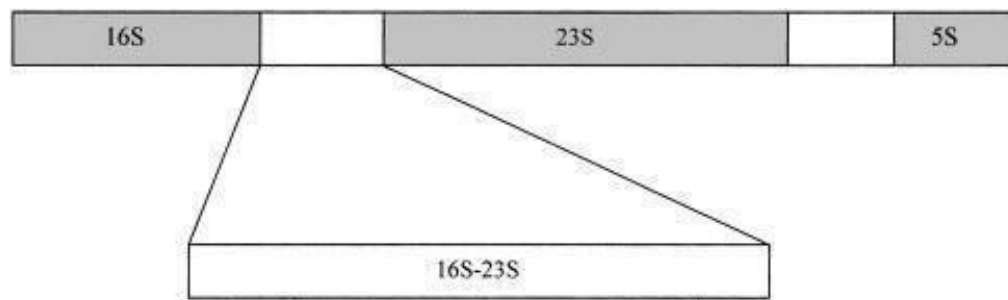
De primers en de probe binden aan het template DNA. De 3'fosfaatgroep voorkomt extensie van de probe. De probe hybridiseert tijdens de PCR aan de complementaire streng van het template DNA. Vervolgens hybridiseren de primers en wordt de probe door de exonuclease activiteit van het enzym Taq DNA polymerase tijdens de elongatiestap afgebroken, waardoor de quencher van de reporter wordt gescheiden. De quencher heeft nu geen effect op de reporter waardoor de intensiteit van het fluorescerend signaal toeneemt. Gedurende de PCR amplificatie neemt het signaal exponentieel toe (8). Dit signaal wordt na elke PCR cyclus gemeten door het Real-Time PCR-machine. Hiermee kan kwantitatief DNA worden gedetecteerd (zie §3.7). In figuur 3 is een schematische weergave te zien van de SYBR Green assay en de TaqMan assay.



Figuur 3. Schematische weergave van TaqMan probe assay en SYBR Green assay(22).

Keuze DNA target

Voor het ontwerp van een PCR-methode moet eerst een keuze gemaakt worden welk DNA target gebruikt kan worden. Dit kan m.b.v. literatuuronderzoek. Gebruik makend van de databank van deze kennis kan onderzocht worden welk gen geschikt kan zijn om specifieke primers en probes te ontwerpen. Dit kunnen genen zijn die slechts voorkomen bij het te detecteren organismen of genen die meer algemeen voorkomen (b.v. 16S rRNA gen). Op basis van de aanwezige DNA-sequentie verschillen worden specifieke primers en probes ontwikkeld. Het DNA-target wat veel gebruikt wordt voor ontwerp van primers mycobacteriën te detecteren is het 16S ribosomaal RNA gen. Dit gen is aanwezig in alle bacteriën en bevat geconserveerde en variabele regionen (6). Naast het 16S rRNA gen zijn er in de literatuur verschillende andere target-genen beschreven die mogelijk genoeg variatie in DNA-sequentie hebben tussen de verschillende mycobacteriën-soorten, zodat specifieke soorten kunnen worden gedetecteerd, zoals het gen coderend voor het 32 kDA eiwit, het 65 kDA heat shock eiwit, het rpoB (RNA polymerase beta-subunit), secA (essentieel eiwit), dnaI (heat shock inducerend eiwit), sodA (superoxide dismutase), recA (recombinant eiwit), gyrA, gyrB (DNA gyrase) en het 16S-23S ribosomaal RNA internal transcribed spacer (ITS). Het 16S-23S ITS is een DNA regio (spacer), dat niet functioneel is voor de functie van de ribosomen. Het ITS zit tussen het 16S en het 23S gen en bevat variabele sequenties (figuur 4).



Figuur 4. Schematische weergave van het 16S-23S ribosomaal RNA internal transcribed spacer (ITS)(19).

Van het ITS en het 16S rRNA zijn voldoende sequences beschikbaar om een goede database op te zetten voor het ontwerp van geschikte primers en probes om onderscheid te maken in de verschillende mycobacteriën. Het 16S rRNA gen wordt in deze studie gebruikt om specifiek *M. xenopi* te onderscheiden van soortgelijke mycobacteriën. Het 16S rRNA gen, hsp65 gen en het rpoB gen is niet geschikt om *M. kansasii* te onderscheiden van *M. gastri* omdat de genen van deze twee organismen grootte gelijkenissen vertonen. Voor *M. kansasii* wordt in deze studie gebruik gemaakt van het ITS omdat deze wel voldoende onderscheid maakt tussen *M. kansasii* en *M. gastri*.

Ontwerp primers en probes

Voor het ontwerpen van primers en probes zijn een aantal richtlijnen (5):

Primers

- Lengte van de primers is tussen de ca. 18 en 27 basen. Kortere primers binden niet goed optimaal bij de hoge toegepaste temperatuur terwijl langere primers verhoogde kans geven op niet-specifieke binding aan het target DNA.

- Geen sequentiehomologie tussen de primers. Sequentiehomologie veroorzaakt binding tussen de primers (dimeer) en resulteert in een verminderde efficiëntie van de PCR reactie.
- Geen sequentiehomologie binnen één primer. Dit veroorzaakt een secundaire structuur in de primer doordat base-paring kan optreden tussen de verschillende delen van de primer. Dit resulteert in een verminderde efficiëntie van de PCR reactie.
- Het fragment dat geamplificeerd wordt ligt tussen de 50 en de 150 bp (max 300pb). Het Taq polymerase is in staat om korte fragmenten efficiënter te amplificeren.
- Het GC gehalte van de primers ligt tussen de 20-80% (bij voorkeur 40-70%). G en C nucleotiden binden sterker dan A en T nucleotiden. Bij deze verhouding bindt de primer optimaal.
- **De primers bevatten bij voorkeur een C of G aan 3' en 5' uiteinde. C en G** nucleotiden binden sterker dan A en T waardoor de uiteinden en hierdoor de gehele primer beter zal binden.
- **Meer dan 3 G's of C's aan het uiteinde wordt afgeraden. Dit type sequentie komt** algemeen voor bij verschillende organismen en is er kans op niet-specifieke binding.
- De smelttemperatuur van de primers ligt tussen de 55 en 65°C. Deze temperatuur is optimaal voor binding van de primers.

Probes

- Lengte van de probes is tussen de ca. 20 en 30 basen.
- De smelttemperatuur van de probes ligt tussen de 65 en 70°C. Deze temperatuur moet ongeveer 10°C hoger zijn dan de smelttemperatuur van de primers waardoor de probes eerder binden dan de primers in de reactie.
- **Het gehalte G's en C's ligt tussen de 30 en 80%.**
- Vermijd meerdere (>4) dezelfde nucleotiden op een rij.
- **Geen G nucleotiden aan de 5' kant. G nucleotiden zijn in staat energie te adsorberen van de fluorescente groep en hierdoor voor het "uitdoven" van de probe.**

Met het programma "Blast" (Basic Local Alignment Search Tool) dat beschikbaar is via de website <http://www.ncbi.nih.gov/> wordt de ingevoerde sequentie van de ontworpen primers en probes vergeleken met alle bekende DNA sequenties. Het resultaat van het Blast programma geeft een globale indruk van de specificiteit van de primers en probes, verder experimenteel onderzoek is noodzakelijk om de werkelijke specificiteit te bepalen.

Selectiviteit en specificiteit

De selectiviteit van een methode is de mogelijkheid van de methode om uitsluitend het doelorganisme en geen ander organismen (vals-positief) te detecteren. De specificiteit geeft de mogelijkheid weer voor het uitblijven van een positieve reactie bij aanwezigheid van het doelorganisme (vals negatief). De specificiteit wordt onderzocht door een collectie gekweekte referentiestammen van het geslacht *Mycobacterium* te isoleren en te testen in de ontworpen qPCR. De *Mycobacterium* soort waarvoor de primers en probes zijn ontworpen moet een positief resultaat geven in de reactie. De selectiviteit wordt onderzocht door een groot aantal referentiestammen te isoleren die verwant zijn aan de te detecteren *Mycobacterium*-soorten te testen in de qPCR, waarbij de stammen die negatief moeten zijn ook daadwerkelijk negatief zijn. Van positieve PCR-reacties op praktijkmonsters kan d.m.v. sequentieanalyse van het PCR fragment onderzocht worden in hoeverre de met PCR ook werkelijk een fragment van het doelorganisme is geamplificeerd.

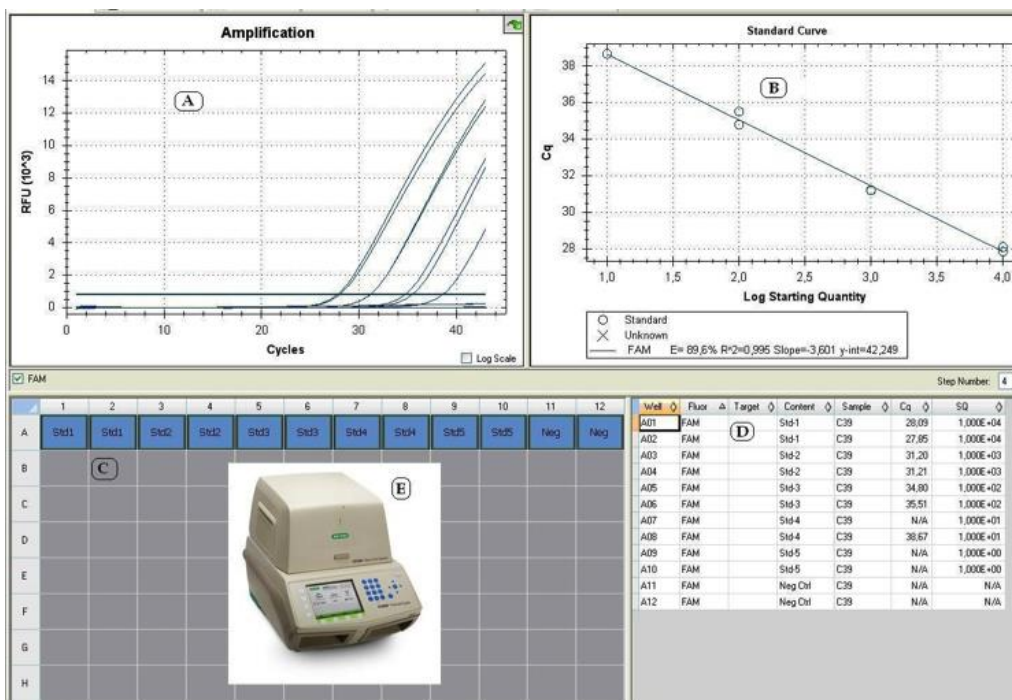
Aantoonbaarheidsgrens

In drinkwater zijn organismen vaak aanwezig in zeer lage aantallen. De qPCR methode moet geschikt zijn om deze lage aantallen te detecteren omdat deze voor onderzoek toch relevant

kunnen zijn. Het is dus van belang om te weten welke minimale hoeveelheid DNA-kopieën er met de qPCR methode kan worden aangetoond. Daarbij wordt gekeken naar de aantoonbaarheidsgrens van de qPCR en de aantoonbaarheidsgrens van de methode. Met de aantoonbaarheidsgrens van de qPCR wordt aangegeven bij welke minimale DNA-concentratie met een betrouwbaarheidsgrens van 90% nog een reproduceerbaar PCR-signaal wordt verkregen. Deze grens wordt bepaald door PCR-reacties uit te voeren op verdunningen van een DNA-suspensie met bekende concentratie. Met de aantoonbaarheidsgrens van de methode wordt de minimale concentratie van het doelorganisme in een watermonster aangegeven waarvan reproduceerbare detectie nog mogelijk is. De aantoonbaarheidsgrens van de methode is afhankelijk van de qPCR maar ook door andere factoren zoals efficiëntie van de concentratiemethode, efficiëntie van de DNA-extractiemethode en matrixeffecten (remming van de qPCR reactie).

Kwantificatie

De oorspronkelijke DNA-concentratie van het te detecteren DNA-fragment is bepalend voor het moment dat de concentratie van het vermenigvuldigde DNA hoog genoeg is om te worden gedetecteerd door de real-time PCR machine. Het aantal cycli waarbij het DNA-signaal boven de basislijn uitkomt is de C_q-waarde (Quantification-Cycle) en is een maat voor de oorspronkelijke DNA-concentratie in het monster en wordt uitgedrukt in het aantal PCR-cycli. Dit wordt weergegeven in figuur 5.



Figuur 5. qPCR procedure. A, TaqMan probe PCR kalibratiecurve. B, bijbehorende standaardcurve met weergegeven Efficiëntie(E) en correlatiecoëfficiënt(R²). C, PCR plaat layout. D, Berekende Ct waarden. E, voorbeeld van real-time PCR-machine

Met behulp van een kalibratielijn kan de DNA-concentratie worden berekend. Door in het zelfde experiment DNA-monsters met een bekende DNA-concentratie te analyseren kan op basis van de C_q-waarde van de kalibratiemonsters en de C_q-waarde van de te analyseren monsters de oorspronkelijke DNA-concentratie in de monsters worden berekend (4). De kalibratielijn geeft ook informatie over de efficiëntie (E) van de PCR en de correlatiecoëfficiënt (R²). De efficiëntie van een optimale qPCR reactie is 100%, wat wil

zeggen dat de hoeveelheid PCR-product tijdens elke temperatuurcyclus wordt verdubbeld. Volgens het rapport kwaliteitsborging bij Real-time PCR methoden(5) moet de PCR-efficiëntie van de calibratielijn minimaal tussen 80 en 105% liggen. De efficiëntie van de qPCR is afhankelijk van vele factoren zoals lengte van het target, target sequence, primer sequence, buffer condities, onzuiverheden van het product, cycling condities, en enzymen die gebruikt zijn(3). Een 10-voudige verdunningsreeks wordt gemaakt van een monster met een bekende concentratie. De efficiëntie wordt berekend met behulp van de helling van de kalibratie curve. Bij een efficiëntie van 100% is de helling -3,3. Dit betekent dat bij een verdunningsfactor van 10, er een verschil is van 3,3 cycli ($E = [10^{(-1/\text{slope})}] - 1$). De correlatiecoëfficiënt (R^2) geeft weer hoe goed de datapunten van de verdunningen in een rechte lijn passen. De correlatiecoëfficiënt (R^2) moet tussen de 0,9 en 1,0 liggen (5).

Kwaliteitscontroles

Voor elke qPCR analyse zijn kwaliteit-controlemonsters van essentieel belang om aan te tonen dat de prestaties van de methode voldoen aan de gestelde criteria.

Positieve controle

Een positieve controle wordt gebruikt om aan te tonen dat de procedure het specifieke DNA-fragment adequaat kan detecteren. De positieve controle bestaat uit reïnculturen van het te detecteren organisme (in dit geval *M. kansasii* of *M. xenopi*).

Negatieve controle

Negatieve controles hebben tot doel aan te tonen dat er geen besmetting heeft plaatsgevonden van DNA tijdens de gehele opwerking van de monsters en de PCR en tevens tijdens het maken van de PCR-amplificatiemix. Per experiment moeten er twee typen negatieve controles worden geanalyseerd.

- PCR negatieve controle; controle dat er geen besmetting heeft plaatsgevonden van (vreemd) DNA in de PCR-mix.
- Methode blanco; controle dat er geen besmetting heeft plaatsgevonden tijdens de opwerking (filtratie en DNA-isolatie) van de monsters.

Interne controle

Componenten in de matrix van het monster kan de efficiëntie van DNA-vermenigvuldiging van de Taq-polymerase verminderen of zelfs geheel teniet doen. Deze inhibitie of remming wordt veroorzaakt door onbekende componenten die samen met het DNA uit het monster zijn geïsoleerd. Ook kan tijdens DNA-isolatie verlies van product optreden. Het rendement en mogelijke remming van de PCR storende componenten in het DNA-isolaat kan worden gemeten door de toevoeging van een Rendements- en Inhibitie-controle (IC) in de monsters. De concentratie van deze IC wordt rechtstreeks gemeten (m.b.v. qPCR) voordat deze aan de monsters wordt toegevoegd en na toevoegen aan het gefiltreerde drinkwater monster en vervolgens extractie van het DNA van het monster. Het verschil tussen deze metingen geeft de recovery van de DNA extractie methode en de qPCR. Een recovery percentage >20% wordt als voldoende resultaat beschouwd (5).

2.4 Herkomst en behandeling van drinkwatermonsters

Locaties

De watermonsters zijn genomen op verschillende plaatsen in Nederland bij pompstations en bijbehorend distributiegebied in de zomerperiode (2012) en de winterperiode (2013). De 11 locaties zijn vermeld in bijlage 1. In figuur 6 zijn de locaties zichtbaar gemaakt in de kaart van Nederland. De plaatsen van de pompstations zijn weergegeven met een blauwe druppel.



Figuur 6. Weergave van de kaart van Nederland met de pompstations die bemonsterd zijn aangegeven met een blauwe druppel.

Bemonstering

De directe drinkwatermonsters zijn uit de tapkraan bemonsterd. De eerste 10 ml wordt niet opgevangen waarbij vervolgens 1 liter drinkwater opvangen wordt in een glazen fles waar trinitrium-NTA (Sigma, $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_6\text{NO}_6$) aan toegevoegd is (voor het complexeren van zware metalen). Tevens zijn ook drinkwatermonsters genomen na spoelen van de tapkraan waarbij de tapkraan 4 minuten doorspoeld wordt en waarbij vervolgens water opvangen wordt. De drinkwatermonsters zijn getransporteerd en bewaard bij 4°C. De drinkwatermonsters zijn binnen 24h na monsternamen in behandeling genomen.

DNA isolatie

Alle DNA-isolaties zijn uitgevoerd met behulp van de Power Biofilm DNA Isolatatie Kit (MO BIO Laboratories) volgens de instructies van de leverancier. De Power Biofilm DNA Isolatatie Kit voldoet aan de criteria die gesteld zijn aan een DNA-extractiemethode (2). Een volume van 500 ml (directe monsters) en 100 ml (indirecte monsters) is gefiltreerd over een Polycarbonate Track-Etch Membraan filter (Millipore) met een poriegrootte van 0,2 µm en een diameter van 47 mm. Het filter en een DNA-fragment van een interne controle (KWR) zijn toegevoegd aan bead-beat-buisje (buisje met glaskorrels) met 350 µl lysis buffer (BF1). Na 10 minuten incubatie bij 65°C wordt het busje 30 seconden bij 5.000 rpm geschud (bead-beaten) in een machine (PowerLyzer), waardoor de cellen door chemische en mechanisch effect kapot gaan en het DNA vrijkomt. Vervolgens worden de eiwitten geprecipiteerd door 1 minuut bij 13.000 rpm te centrifugeren, waarna het supernatant met het DNA in een schoon epje wordt overgebracht. Hieraan wordt 100 µl BF3 toegevoegd en 5

minuten geïncubeerd bij 4°C. De eppen worden gecentrifugeerd, 1 minuut bij 13.000 rpm, en het supernatant wordt overgebracht naar een schoon epje, en 900µl BF4 wordt toegevoegd aan het supernatant. 650µl van deze oplossing wordt overgebracht op een Spin Filter unit en 1 minuut bij 13.000 rpm gecentrifugeerd. De doorgelopen vloeistof wordt verwijderd en de voorgaande stap wordt herhaald tot al het supernatant op het filter is gebracht. Het Spin Filter is op een schone ep geplaatst waar vervolgens 650µl BF5 aan toegevoegd is en 1 minuut bij 13.000 rpm is gecentrifugeerd. De doorgelopen vloeistof wordt verwijderd en er wordt 650µl BF6 aan toegevoegd en 1 minuut bij 13.000 rpm gecentrifugeerd. Door deze stappen wordt het DNA geëxtraheerd en gezuiverd. Na afloop wordt de Spin Filter in een schone ep geplaatst en wordt er 200 µl BF7 (elutiebuffer) aan toegevoegd waarna deze 1 minuut bij 13.000 rpm wordt gecentrifugeerd. Het geëluëerde DNA wordt bewaard bij -80°C.

qPCR

Het aantal gen kopieën van *Mycobacterium xenopi* en *Mycobacterium kansasii* in drinkwatermonsters is bepaald met het in dit onderzoek ontwikkelde qPCR.

De reactiemix voor de qPCR analyse wordt gebruik gemaakt van IQTM Supermix of IQTM SYBR Green Supermix (Biorad Laboratories BV). IQTM Supermix is een 2x geconcentreerd, klaar voor gebruik reactiemix, die samengesteld is uit Taq DNA polymerase, dNTPs, MgCl₂, enhancers en stabilisatoren, IQTM SYBR Green Supermix bevat ook nog SYBR Green dye en fluoresceïne. Aan 25µl reactiemix (van IQTM Supermix of IQTM SYBR Green supermix) wordt 0,2µM van de forward, reverse primer en eventueel probe, 0,4 mg/ml Bovine Serum Albumine (Roche), 10 µl DNA monster toegevoegd. Dit volume wordt aangevuld tot totaal 50 µl met gedestilleerd (DNase/ RNase vrij) water (Gibco). Amplificatie, detectie en data analyse worden uitgevoerd in de CFX96 C1000 Thermal cycler, softwareversie 2.1 (Biorad Laboratories BV).

2.5 Onderzoeksresultaten

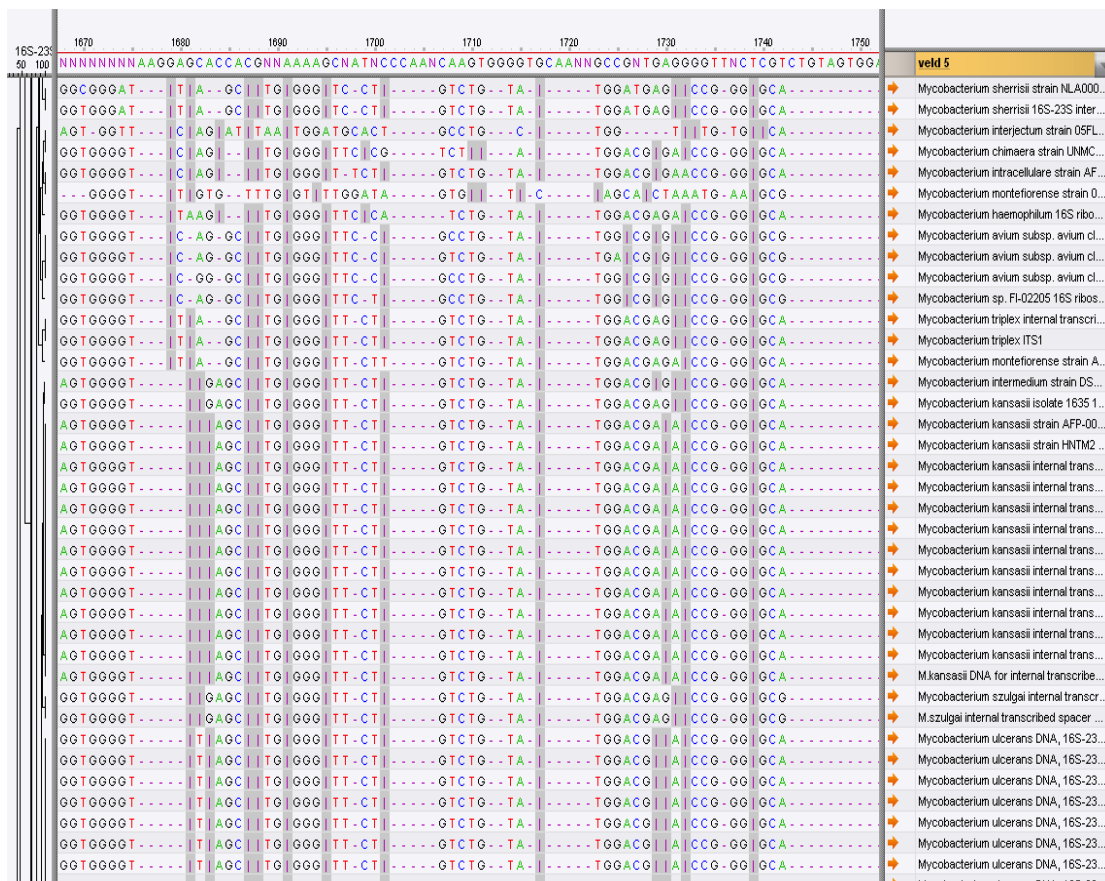
Ontwerp primers en probes

Op basis van de literatuur is gezocht naar een moleculaire methode om *M. kansasii* en *M. xenopi* aan te tonen in drinkwater. Deze methode is nodig om meer inzicht te krijgen in het voorkomen van *M. kansasii* en *M. xenopi* in Nederlands drinkwater. Er is geen bruikbare moleculaire methode in de literatuur gevonden om *M. kansasii* en *M. xenopi* in drinkwater aan te tonen. In de literatuur is informatie beschikbaar over welke genen mogelijk geschikt zijn om onderscheid te maken tussen de verschillende *Mycobacterium* soorten. Binnen deze studie is vervolgens onderzoek uitgevoerd naar welke genen geschikt zijn om primers en probes voor te ontwerpen zodat een specifieke qPCR-methode voor *M. kansasii* en *M. xenopi* wordt verkregen. Een gen is geschikt als het gen lang genoeg is, er voldoende DNA sequenties beschikbaar zijn en het gen beschikt over voldoende verschillen in DNA sequenties om onderscheid te maken tussen het doeltarget (in dit geval *M. kansasii* of *M. xenopi*) en andere *Mycobacterium* soorten. Volgens de richtlijnen die gelden voor ontwikkeling van primers en probes zijn er primers en probes ontworpen voor het geselecteerde gen. Een primer/probe set is geselecteerd voor *M. kansasii* en getest op selectiviteit en specificiteit. Dit zelfde is gedaan voor *M. xenopi*. Doormiddel van een ijklijn **zijn de twee qPCR's gekwantificeerd en vervolgens is een groot aantal drinkwatermonsters**, afkomstig van verschillende pompstations en hun voorzieningsgebied in Nederland, geselecteerd en geanalyseerd met de qPCR-methode voor *M. kansasii* en de qPCR-methode voor *M. xenopi*.

DNA target voor *M.kansasii*

M. kansasii is nauw verwant aan *M. gastri* waardoor het lastig is om een geschikt gen te vinden waarbij op DNA niveau voldoende onderscheid gemaakt kan worden tussen deze

twee soorten. Volgens de literatuur valt het 16S rRNA gen af omdat dit gen onvoldoende verschillen tussen deze twee soorten heeft. Met behulp van het programma Bionumerics is een database gemaakt waar de sequenties van verschillende genen ingevoerd is. Deze sequenties zijn afkomstig van het Nationaal Centrum voor Biotechnologie Informatie (NCBI). Via de nucleotidedatabase is data van verschillende genbanken verkregen waar vervolgens een eigen database van gemaakt is. Voor *M. kansasii* is er een database gemaakt voor het *rpoB* gen, *secA* gen en het 16S-23S ITS gen. Het *rpoB* gen kan geen onderscheid maken tussen de verschillende stammen van *M. kansasii* en andere *Mycobacterium* soorten. Van het *secA* gen waren te weinig sequenties in de databank beschikbaar om een betrouwbare database te maken. Van het 16S-23S ITS gen zijn voldoende sequenties beschikbaar om een betrouwbare database te maken. Het 16S-23S ITS is lang genoeg en heeft voldoende sequentie variaties om primers en probes voor te ontwerpen waarmee *M. kansasii* specifiek aangetoond kan worden en waarmee onderscheid gemaakt kan worden tussen *M. kansasii* en *M. gastri*. De keuze is gemaakt om specifieke primers en probes te ontwikkelen tegen het 16S-23S ITS gen van *M. kansasii*.



Figuur 7. Nucleotidenverschillen weergegeven in de 16S-23S ITS voor het geslacht *Mycobacterium*. Zichtbaar is een stuk gen waar verschillen in nucleotidevolgorde zichtbaar zijn tussen *M. kansasii* en de overige *Mycobacterium*-soorten in de database. De grijs getinte delen zijn voor de *Mycobacterium*-soorten gelijk. De gekleurde nucleotide geven de verschillen weer tussen de *Mycobacterium*-soorten in de database.

DNA target voor *M. xenopi*

Het 16S rRNA gen en het 16S-23S ITS gen is volgens de literatuur geschikt om *M. xenopi* te onderscheiden van de overige *Mycobacterium*-soorten. Er is gebruik gemaakt van het

programma ARB waarin een database beschikbaar is van alle bekende sequenties van het 16S rRNA gen. Op basis van deze database zijn er primers en probes ontworpen tegen het 16S rRNA gen van *M. xenopi*. Ook is een database gemaakt van het 16S-23S ITS gen met behulp van het programma Bionumerics. Met dit gen kan voldoende onderscheid gemaakt worden tussen *M. xenopi* en de overige *Mycobacterium*-soorten. Uiteindelijk is de keuze gemaakt om primers en probes te ontwikkelen tegen het 16S RNA gen van *M. xenopi*.

Ontwikkeling van primers en probes voor *M. kansasii* en *M. xenopi*

Op basis van de verschillen in sequenties van *M. kansasii* en overige *Mycobacterium*-soorten zijn primers en probes ontworpen volgens de richtlijnen genoemd in hoofdstuk 3.4. De primers zijn zo ontworpen dat ze specifiek zijn voor *M. kansasii* of *M. xenopi*. De probes zijn ontworpen om het DNA te detecteren van de doelsoort waarbij in tegenstelling van de primers de selectiviteit minder van belang is. In figuur 7 is een voorbeeld gegeven hoe nucleotide verschillen zichtbaar zijn in de ITS database. De grijs getinte delen zijn voor de *Mycobacterium*-soorten gelijk. De gekleurde nucleotide geven de verschillen weer tussen de stammen in de database. Op basis van deze informatie zijn specifieke primers en minder specifieke probes ontworpen tegen het 16S-23S ITS gen van *M. kansasii*. Voor *M. xenopi* zijn specifieke primers en minder specifieke probes ontworpen tegen het 16S rRNA gen en specifieke primers en specifieke probes ontworpen tegen het 16S-23S ITS. Zonder experimentele gegevens is niet duidelijk welke primers en probes de beste resultaten geven. **Daarom is gekozen om een aantal verschillende “kandidaat” primers en probes te selecteren** en vervolgens experimenteel te bepalen welke combinaties de beste resultaten geven. In tabel 2 is een eerste selectie van primers en probes voor *M. kansasii* en *M. xenopi* weergegeven waarmee experimenten zijn uitgevoerd.

Tabel 2. Schematische weergave van ontworpen primers en probes voor *M. kansasii* en *M. xenopi*, doel, lengte van het fragment (bp), gehalte GC (GC%) en smelttemperatuur (Tm°C).

Naam	Doel	lengte bp	GC%	Tm °C	Target gen	Opmerking
<i>M. kansasii</i>						
MK1713F	Forward primer	22	50	57	ITS	Specifiek
MK1712F	Forward primer	21	47,6	54,8	ITS	Specifiek
MK1724F	Forward primer	19	57,9	57,4	ITS	Specifiek
MK1723F	Forward primer	18	55,6	54,4	ITS	Specifiek
MK1831R	Reverse primer	19	57,9	55,4	ITS	Specifiek
MK1844R	Reverse primer	18	50	51,2	ITS	Specifiek
MK1876R	Reverse primer	21	57,1	57,6	ITS	Specifiek
MK1875R	Reverse primer	20	55	55,4	ITS	Specifiek
MK1801P	Probe	25	52	62,1	ITS	Niet specifiek
MK1800P	Probe	24	54,2	61,1	ITS	Niet specifiek
MK1799P	Probe	23	52,2	60,6	ITS	Niet specifiek
MK1764P	Probe	24	54,2	62,6	ITS	Niet specifiek
MK1742P	Probe	22	59,1	61	ITS	Niet specifiek
<i>M. xenopi</i>						
MX176F	Forward primer	18	55,6	52,5	16S rRNA	Specifiek
MX184F	Forward primer	19	57,9	57	16S rRNA	Redelijk specifiek (a)
MX444R	Reverse primer	22	59,1	60,8	16S rRNA	Redelijk specifiek (a)
MX440R	Reverse primer	18	66,7	59,1	16S rRNA	Redelijk specifiek (a)
MX453R	Reverse primer	18	61,1	57,1	16S rRNA	Redelijk specifiek (a)
MX288P	Probe	21	71,4	66,2	16S rRNA	Niet specifiek
MX287P	Probe	20	65	63	16S rRNA	Niet specifiek
MX309P	Probe	22	68,2	65,1	16S rRNA	Niet specifiek
MX1673F	Forward primer	20	65	61,8	ITS	Specifiek
MX1691F	Forward primer	20	65	61,8	ITS	Specifiek
MX1899R	Reverse primer	19	47,4	50,3	ITS	Redelijk specifiek (a)
MX1930R	Reverse primer	20	55	56,5	ITS	Specifiek
MX1926R	Reverse primer	21	52,4	56,2	ITS	Specifiek
MX1844P	Probe	21	66,7	63,3	ITS	Specifiek
MX1852P	Probe	24	66,7	68,2	ITS	Specifiek
MX1784P	Probe	21	57,1	59,6	ITS	Specifiek

(a). Deze primer is specifiek voor *M. xenopi* maar ook voor één of twee andere *Mycobacterium*-soorten.

Selectie primers en probes

Onderzoek naar de selectiviteit van de primers wordt uitgevoerd met behulp van DNA geïsoleerd van gekarakteriseerde reïnculturen van verschillende *Mycobacterium*-soorten die zijn verkregen van de Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ). Door verschillende primercombinaties met elkaar te testen op verschillende *Mycobacterium*-soorten in een qPCR reactie met SYBR Green is een selectie gemaakt van de primers die op basis van de Cq waarde, specificiteit en smeltcurve het beste resultaat geven. Om de primertest voor *M. kansasii* te testen is een DNA suspensie gebruikt van de geïsoleerde soorten; *M. avium*, *M. gastri*, *M. marinum* en drie verschillende *M. kansasii* soorten. Voor de primertest voor *M. xenopi* is een DNA suspensie gebruikt van de geïsoleerde stammen: *M. avium*, *M. shimoidei*, *M. haemophilum* en drie verschillende *M. xenopi* stammen. Verschillende combinaties van forward primers en reverse primers zijn getest met behulp van SYBR Green. In tabel 3 wordt een voorbeeld weergegeven van twee geteste primer sets. Combinatie A met forward primer MX176F en reverse primer MX453R en combinatie B met forward primer MX184F en reverse primer MX444R tegen het 16S RNA gen van *M. xenopi*. De primer combinatie A detecteert naast *M. xenopi* ook *M. shimoidei* en *M. haemophilum*, de primers blijken dus niet specifiek te zijn voor detectie van 16S RNA gen van *M. xenopi*. Combinatie B geeft alleen een signaal bij *M. xenopi*, de primers lijken specifiek te zijn voor detectie van 16S RNA gen van *M. xenopi*.

Tabel 3. Voorbeeld van twee geteste primersets: combinatie A en combinatie B. De geteste stammen zijn weergegeven met de Cq waarde waarbij het fluorescentiesignaal boven de basislijn uitkomt.

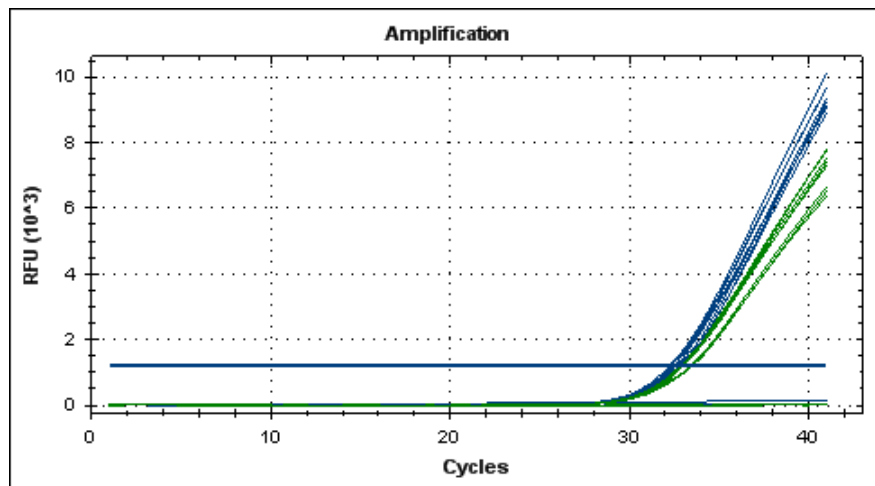
Stam	Combi A MX176F- MX453R (Cq)	Combi B MX184F- MX444R (Cq)
<i>M. avium</i> (DSMZ 44156)	n/a (niet aantoonbaar)	n/a
<i>M. shimoidei</i> (DSMZ 44152)	42,09	n/a
<i>M. haemophilum</i> (DSMZ 44634)	40,6	n/a
<i>M. xenopi</i> (DSMZ 43995)	30,19	29,65
<i>M. xenopi</i> (DSMZ 44168)	29,39	28,97
<i>M. xenopi</i> (DSMZ 44169)	29,09	28,58
PCR negatieve controle	n/a	n/a
PCR negatieve controle	n/a	n/a

Aan de hand van de geteste primers is een keuze gemaakt om voor *M. kansasii* verder te testen met primers MK1713F en MK1875R tegen het 16S-23S ITS gen. Voor *M. xenopi* is de keuze gemaakt om primers MX184F en MX444R tegen het 16S rRNA gen en primer MX1673F en MX1930R tegen het 16S-23S ITS gen verder te testen. De geselecteerde primersets zijn vervolgens getest met verschillende probes. Hierbij is onderzocht bij welke temperatuur de meest efficiënte DNA vermenigvuldiging plaatsvindt waarbij de Cq waarde wordt vergeleken met verschillende temperaturen (aflopend van 65-54°C). Dit wordt uitgevoerd met de qPCR machine met een temperatuur gradiënt functie.

Tabel 4. Voorbeeld van combinatie C en combinatie D waarbij de gradiënt temperaturen vergeleken worden met de Cq waarde geanalyseerd met een DNA suspensie van *M. xenopi* met een concentratie van $1,0 \times 10^3$ /PCR.

Gradiënt Temp.	Combi C MX184F- MX444R-MX309P <i>M. xenopi</i> (DSMZ43995) Cq	Combi D MX184F- MX444R-MX287P <i>M. xenopi</i> (DSMZ43995) Cq	PCR negatieve controle Cq
65,0°C	32,54	32,98	n/a
64,4°C	32,44	32,92	n/a
63,2°C	32,33	33,01	n/a
61,0°C	32,22	32,84	n/a
58,3°C	32,27	32,98	n/a
56,2°C	32,74	33,48	n/a
54,7°C	32,61	33,37	n/a
54,0°C	32,83	33,44	n/a

In tabel 4 is een voorbeeld te zien van het resultaat met combinatie C (forward primer MX184F, reverse primer MX444R en probe MX309P) en met combinatie D (forward primer MX184F, reverse primer MX444R en probe MX287P) geanalyseerd met een DNA suspensie van *M. xenopi* met een concentratie van $1,0 \times 10^3$ /PCR. De Cq waarden bij de verschillende temperaturen laten zien dat de primers en probes in deze temperatuurgradiënten goed hechten aan het template waardoor de PCR robuust is. De PCR negatieve controle is bij elke temperatuur negatief wat aangeeft dat er tijdens de PCR geen besmetting heeft plaatsgevonden. Aan de hand van de Cq waarde is geen duidelijk onderscheid te maken tussen de twee verschillende probes. Als de fluorescentie uitgezet wordt tegen het aantal cycli zie je dat combinatie C een steilere curve (blauw) geeft dan combinatie D (groen) (figuur 8). Een steilere curve wil zeggen dat de PCR efficiënter verloopt. Aan de hand van de resultaten is besloten om verder te gaan met de volgende primer probe combinaties. Voor *M. kansasii*: MK1713F-MK1875R-MK1742P (16S-23S ITS gen). Voor *M. xenopi* MX184F-MX444R-MX309P (16S rRNA gen).



Figuur 8. De grafiek geeft de gradiënt weer van primer probe combinatie C (blauw) en primer probe combinatie D (groen). De curve van combinatie C komt ongeveer op het zelfde moment boven de basislijn maar geeft een steilere curve dan combinatie D.

Vervolgens is onderzocht of een 2 steps PCR (5 minuten 95°C, gevolgd door 40 cycli waarbij snel gewisseld wordt tussen twee temperaturen 20 seconden 95°C en 48 seconden 60°C) vergelijkbare resultaten geeft als een 3 steps PCR (5 minuten 95°C, gevolgd door 40 cycli waarbij snel gewisseld wordt tussen drie temperaturen 20 seconden 95°C, 30 seconden 60°C en 40 seconden 72°C). Daarbij is een 10-voudige verdunningsreeks gemaakt van de te detecteren stam met aflopende concentratie ($1,0 \times 10^4$ /PCR t/m $1,0 \times 10^0$ /PCR). Deze verdunningsreeks is getest met de geselecteerde primers en probes met een 2 steps protocol en een 3 steps protocol. Tabel 5 geeft de efficiëntie (E) en correlatiecoëfficiënt (R^2) weer van de 2 steps en de 3 steps PCR. De verschillen tussen 2 steps protocol en een 3 steps protocol zijn klein.

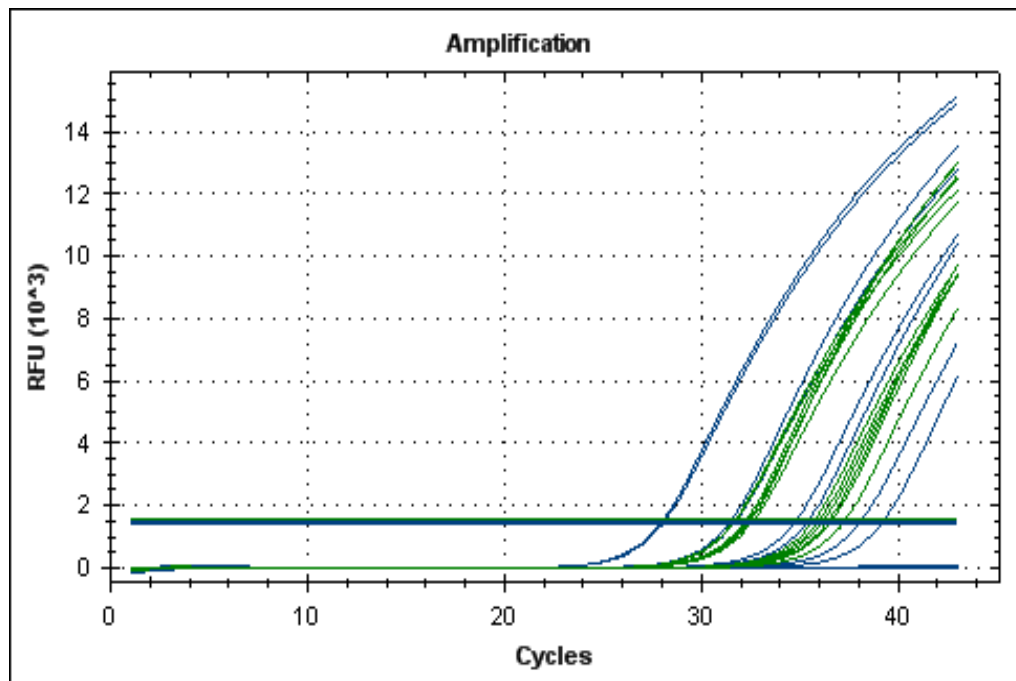
De efficiëntie (E) en de correlatiecoëfficiënt (R^2) van de 2 steps protocol voldoen aan de gestelde eisen voor qPCR.

Tabel 5. Efficiëntie (E) en correlatiecoëfficiënt (R^2) weer van de 2 steps en de 3 steps PCR.

	2 steps protocol Efficiëntie (E%)	Correlatiecoëfficiënt (R^2)	3 steps protocol Efficiëntie (E%)	Correlatiecoëfficiënt (R^2)
MK1713F MK1875R MK1742P	88,7	0,998	89,6	0,995
MX184F MX444R MX309P	109,3	0,967	97,7	0,986

Selectiviteit en specificiteit

Om de selectiviteit te testen van de geselecteerde primers en probe voor *M. kansasii* en *M. xenopi* is gebruik gemaakt van grote collectie referentiestammen (DSMZ) van verschillende *Mycobacterium*-soorten waar DNA van is geïsoleerd. Vervolgens is van deze stammen de DNA concentratie bepaald met behulp van een kalibratiesuspensie en een qPCR voor *Mycobacterium* spp die in het laboratorium beschikbaar is. De verschillende stammen zijn getest in de qPCR met een concentratie van $1,0 \times 10^2$ /PCR en $1,0 \times 10^3$ /PCR. Figuur 9 geeft een indruk van het resultaat van deze analyses terwijl de resultaten van de qPCR analyses op het DNA van de geteste stammen zijn samengevat in tabel 6.



Figuur 9. Resultaat van qPCR analyses uitgevoerd op een DNA collectie van 20 verschillende *Mycobacterium*-soorten. De x-as geeft het aantal temperatuurwisselingen (PCR-cycli) weer die de afzonderlijke monsters hebben ondergaan. De sterkte van het fluorescentielicht (t.g.v. de vorming van een kenmerkend DNA-fragment) wordt op de y-as weergegeven. In het DNA-monster waarin, tijdens de PCR-reactie, de sterkte van het fluorescentiesignaal binnen 40 PCR-cycli toeneemt boven de detectiegrens (2^e vlakke lijn van onder gezien) van de detector worden als positief (*M. kansasii*) aangemerkt. Monsters waarin geen fluorescentiesignaal wordt ontwikkeld (onderste vlakke lijn) wordt als negatief beoordeeld. De ijklijn van *M. kansasii* wordt weergegeven met blauw.

Tabel 6. Samenvatting van de resultaten van 20 gekarakteriseerde bacteriestammen van verschillende *Mycobacterium*-soorten met de qPCR voor *M. kansasii* en de qPCR voor *M. xenopi*.

nr.	Soort	qPCR <i>M. kansasii</i>	qPCR <i>M. xenopi</i>
1	DSMZ 43223 <i>M. intracellulaire</i>	-	-
2	DSMZ 44156 <i>M. avium</i>	-	-
3	DSMZ 43505 <i>M. gastri</i>	-	-
4	DSMZ 44163 <i>M. malmoense</i>	-	-
5	DSMZ 43283 <i>M. chelonae</i>	-	-
6	DSMZ 44160 <i>M. gordonae</i>	-	-
7	DSMZ 44165 <i>M. simiae</i>	-	-
8	DSMZ 44634 <i>M. haemophilum</i>	-	-
9	DSMZ 44164 <i>M. nonchromogenicum</i>	-	-
10	DSMZ 44537 <i>M. botniense</i>	-	-
11	DSMZ 44152 <i>M. shimoidi</i>	-	-
12	DSMZ 44428 <i>M. heckeshornense</i>	-	-
13	DSMZ 44556 <i>M. fluoranthenicorans</i>	-	-
14	DSMZ 44344 <i>M. marinum</i>	-	-
15	DSMZ 43995 <i>M. xenopi</i>	-	+
16	DSMZ 44168 <i>M. xenopi</i>	-	+
17	DSMZ 44169 <i>M. xenopi</i>	-	+
18	DSMZ 44162 <i>M. kansasii</i>	+	-
19	DSMZ 43503 <i>M. kansasii</i>	+	-
20	DSMZ 43498 <i>M. kansasii</i>	+	-

De samengevatte resultaten (tabel 6) laten zien dat *M. kansasii* stammen een positief signaal geven met de selectieve qPCR voor *M. kansasii*. Het DNA van geen van de andere *Mycobacterium*-soorten die in dit onderzoek zijn onderzocht, geven geen qPCR signaal (figuur 9) en worden als negatief gescoord (tabel 6). Dit resultaat, in combinatie met het resultaat van de screening van de primers langs de database sequenties, maakt duidelijk dat de qPCR methode selectief is voor *M. kansasii*. De qPCR voor *M. xenopi* geeft een vergelijkbaar resultaat maar geeft alleen een positief signaal met *M. xenopi* en is voor de overig geteste soorten negatief. Dit resultaat, samen met de screening van de primers langs de databasesequenties, maakt duidelijk dat ook de qPCR voor *M. xenopi* selectief is voor *M. xenopi*.

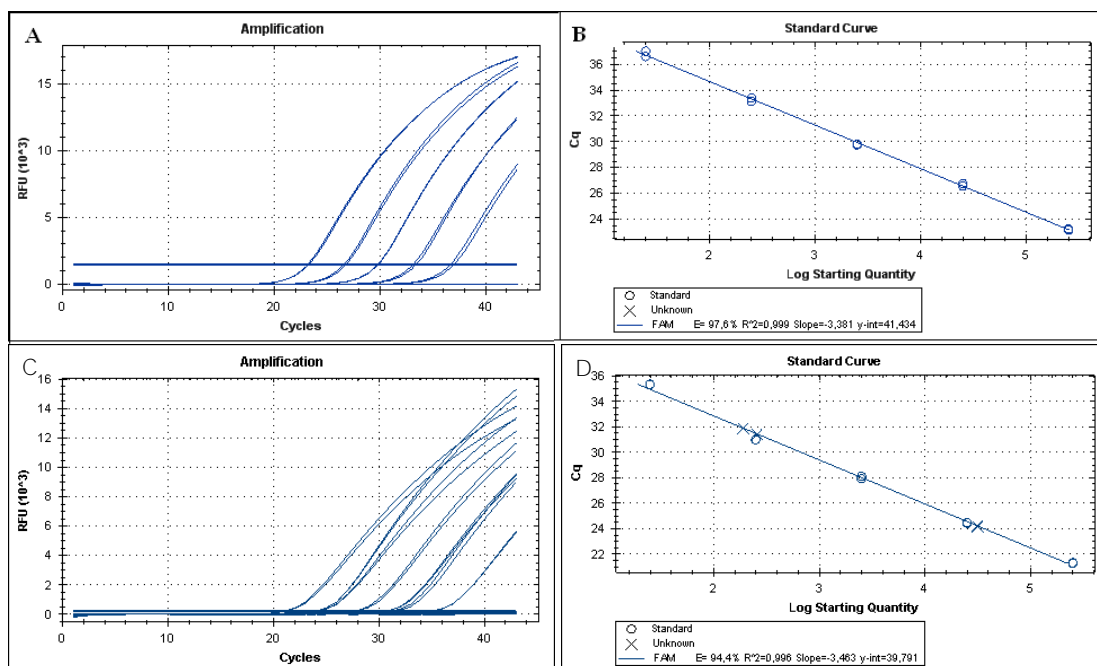
Kwantificatie

Om kwantificatie mogelijk te maken is het noodzakelijk om te beschikken over een kalibratiesuspensie. In de qPCR worden verschillende verdunningen van een kalibratiesuspensie geanalyseerd waar met behulp van een ijklijn de concentratie kan worden berekend van het te detecteren monster.

DNA-ijklijn

Een kalibratiesuspensie is nodig waarmee een ijklijn berekend kan worden voor *M. kansasii* en *M. xenopi* zodat kwantificatie mogelijk wordt. De gesynthetiseerde DNA fragment van *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium*, *Mycobacterium* spp. en een fragment van de KWR interne controle is in een plasmide (pIDTSmart plasmide met ampicilline resistentie) getransformeerd door een gespecialiseerd laboratorium (IDT). Dit plasmide wordt vervolgens aan KWR geleverd. Dit gesynthetiseerde DNA fragment in een plasmide maakt het mogelijk om grote hoeveelheden van dit DNA gezuiverd in handen te krijgen. Het plasmide is vervolgens getransformeerd met behulp van *Escherichia coli* JM109-competent cellen (Promega Madison, USA) welke vervolgens zijn uitgeplaat op LB-agar platen met ampicilline. Het DNA is geëxtraheerd met QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen) volgens de handleiding. De

concentratie van het gezuiverde DNA is na fluorescente kleuring van het DNA gemeten met de Qubit fluorometer volgens de handleiding. Op basis van de DNA concentratie en het molecuulgewicht van de plasmide is de concentratie DNA-moleculen in de suspensie berekend en zijn er verdunningsreeksen gemaakt met een bekende concentratie DNA-moleculen (kopieën). De kalibratie suspensie is vergeleken met de beschikbare KWR kalibratiesuspensie. Aan de hand van de KWR kalibratiesuspensie is de concentratie nauwkeurig bepaald van de kalibratiesuspensie (MYC1cAvKaSpXe) waarmee een ijklijn wordt gegenereerd voor de qPCR van *M. kansasii* en *M. xenopi*. Met behulp van deze ijklijn kan het aantal DNA-kopieën in een monster met een onbekende concentratie van *M. kansasii* respectievelijk *M. xenopi* worden gekwantificeerd. In Figuur 10 wordt een ijklijn weergegeven waarbij monsters van 10-voudige verdunningen (met concentraties variërend van $2,5 \times 10^5$ tot $2,5 \times 10^1$ DNA kopieën per qPCR reactie) van het DNA van de *M. kansasii* ijklijn in 2-voud zijn geamplificeerd met de *M. kansasii* specifieke qPCR.



Figuur 10. Resultaat van qPCR analyses uitgevoerd op DNA van de *M. kansasii* en *M. xenopi* ijklijn. Figuur A (*M. kansasii*) en figuur C (*M. xenopi*) geven de amplificatiecurve weer waarbij de vorming van fluorescentie (y-as) als functie van het aantal PCR-cycli wordt weergegeven. In figuur B (*M. kansasii*) en figuur D (*M. xenopi*) is een ijklijn weergegeven. Bij de ijklijn is de PCR-cyclus waarbij het fluorescentie licht detecteerbaar wordt (Cq) uitgezet tegen de logaritme van de DNA-concentratie aan het begin van de PCR-reactie.

Figuur 10 laat zien dat de *M. kansasii* qPCR en de *M. xenopi* qPCR goed verloopt over een brede concentratie-range ($2,5 \times 10^5$ tot $2,5 \times 10^1$ DNA kopieën per qPCR reactie). De ijklijn maakt het ook mogelijk om de efficiëntie van de qPCR reactie te berekenen. De efficiëntie van de *M. kansasii* qPCR is in dit experiment 97,6% en de efficiëntie van de *M. xenopi* qPCR is in dit experiment 94,4% dat aangeeft dat de qPCR reacties zeer efficiënt verlopen. Uit deze experimenten blijken de reactieomstandigheden van deze PCR optimaal, verdere aanpassing van het protocol is niet nodig.

Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens van de methode varieert afhankelijk van het gefiltreerd volume, elutievolume, detectielimiet en rendement.

Het gefiltreerd volume is het volume water wat in bewerking wordt genomen en waar vervolgens DNA van geïsoleerd wordt.

Elutievolume is het volume waarin het geïsoleerde DNA in wordt geëluëerd.

De detectie limiet wordt berekend door een veelvoud van 0 en 1 DNA kopie/PCR te analyseren met de qPCR voor *M. kansasii* en *M. xenopi*. De detectielimiet wordt berekend volgens ISO EN 16140, paragraaf 6.2.3.3. (1). De detectielimiet voor *M. kansasii* is 8,8 DNA kopieën/PCR en de detectielimiet voor *M. xenopi* is 5,9 kopieën DNA kopieën/PCR.

Het rendement van een monster wordt als volgt berekend:

$$\text{Rendement} = \frac{\text{Concentratie } C_{\text{inmonster}}}{\text{Concentratie } C_{\text{direct}}} \times 100\%$$

De rendementen van de drinkwatermonsters is weergegeven in bijlage 1. De concentratie DNA kopieën per liter monster, gecorrigeerd voor de interne controle wordt als volgt berekend:

$$\text{Kopieën DNA}_{\text{perL}} = N \times F \times \frac{V_E}{V_{\text{PCR}}} \times \frac{1000}{V_F} \times \frac{100}{R}$$

Waarin

N = het gemiddeld aantal DNA kopieën per reactie

V_E = het elutievolume van de DNA isolatie in μl

F = de verdunningsfactor (bij onverdunde monster 1, bij 10x verdund 10)

V_{PCR} = het DNA volume dat is toegevoegd aan de PRC in μl (in dit geval 10 μl)

V_F = het volume gefiltreerde monster in ml

R = het rendement van de interne controle in procenten

De concentratie DNA kopieën per liter monster, gecorrigeerd voor de interne controle is weergegeven in bijlage 1.

M. kansasii en *M. xenopi* in Nederlands drinkwater

PCR Negatieve controle

Elk experiment is een PCR negatieve controle meegenomen. Bij het uitvullen van de PCR(master)-mix in de PCR plaat zijn er twee plaatsen gereserveerd voor de negatieve controle waarbij er een (gelijk aan de monsters) volume DNA-vrij water aan de mix wordt toegevoegd. De PCR-negatieve controle moet een negatief resultaat geven in de qPCR zodat aangetoond is dat de PCR-mix vrij is van DNA-besmetting. In alle gevallen geven de PCR negatieve controle monsters een negatief resultaat waarmee is aangetoond dat de PCR-mix vrij is van DNA-besmetting.

Methodeblanco

De methodeblanco wordt uitgevoerd om aan te tonen dat tijdens de gehele voorbewerking van filtratie, DNA-isolatie en toevoeging van het DNA aan de PCR-mix, geen besmetting van specifieke DNA of bacteriën heeft plaatsgevonden. In elk experiment is een 2-voud van de methodeblanco geanalyseerd waarbij een volume PCR-water is gefiltreerd en vervolgens samen met de overige monsters is geanalyseerd. In alle gevallen **geven de methodeblanco's** een negatief resultaat waarmee aangetoond is dat er geen besmetting van specifieke DNA of bacteriën heeft plaatsgevonden tijdens het filtreren en DNA-isolatie.

Positieve controle

Tijdens het analyseren van de drinkwatermonsters is bij elk experiment een positieve controlemonster meegenomen. Het DNA van de drinkwatermonsters zijn in een periode voorafgaand aan het ontwikkelen van de qPCR voor *M. kansasii* en *M. xenopi* geïsoleerd. Daarbij is tijdens de isolatie geen positief controle monster voor *M. kansasii* of *M. xenopi* meegenomen. Gekozen is om tijdens elke qPCR experiment een hoge en lage DNA concentratie van het te detecteren organismen (*M. kansasii* of *M. xenopi*) mee te nemen. Deze controles zijn afkomstig van geïsoleerd DNA van *M. kansasii* of *M. xenopi* (DSMZ). Deze positieve controlemonsters zijn volgens dezelfde methode opgewerkt als de drinkwatermonsters met uitzondering van de filtratiestap. De concentratie van de positieve controle monsters is bepaald aan de hand van de ijklijn. Een concentratie van $3,0 \times 10^4$ en $3,0 \times 10^2$ per PCR-reactie van *M. kansasii* respectievelijk *M. xenopi* is meegenomen in het experiment. Bij het invullen van de PCR (master)-mix in de PCR plaat zijn er vier plaatsen gereserveerd voor de positieve controle, de controles zijn in 2-voud geanalyseerd. In alle gevallen geven de positieve controle monsters een positief resultaat waarmee is aangetoond dat de qPCR voor *M. kansasii* respectievelijk *M. xenopi* goed verlopen is.

Detectie van *M. kansasii* en *M. xenopi* in Nederlands drinkwater

Om een indruk te krijgen over het voorkomen van *M. kansasii* en *M. xenopi* in het Nederlands drinkwater zijn van verschillende pompstations en hun voorzieningsgebied drinkwatermonsters genomen in de zomerperiode (2012) en de winterperiode (2013). Deze drinkwatermonsters zijn direct en na spoelen van de tapkraan bemonsterd. In bijlage 1 zijn de resultaten opgenomen met daarin de periode, voorzieningsgebied, monster, methode (direct of na spoelen), gefiltreerd volume (ml), elutievolume (μ l), **rendement DNA** extractie/PCR (%), kopieën DNA/Liter voor *M. kansasii* en kopieën DNA/Liter voor *M. xenopi*. De drinkwatermonsters zijn geanalyseerd indien het rendement van het monster groter dan **20% is. Alle PCR's hadden een efficiëntie (E) tussen de 80% en 105%** en een correlatie coëfficiënt (R^2) tussen de 0,9 en 1,0. In de geanalyseerde drinkwatermonsters werd geen *M. kansasii* of *M. xenopi* aangetoond. Dit betekent dat het aantal DNA kopieën van *M. kansasii* lager waren dan $1,3 \times 10^3$ per liter en van *M. xenopi* lager dan $1,9 \times 10^3$ per liter.

2.6 Discussie

Tot op heden is er geen qPCR beschikbaar voor de detectie van *M. kansasii* in drinkwater. Vanuit gegaan werd dat er geen onderscheid gemaakt kan worden tussen *M. kansasii* en *M. gastri*. Dit blijkt te gelden als het 16S rRNA gen gebruikt wordt. Met dit onderzoek is een qPCR methode beschikbaar gekomen die wel onderscheid kan maken tussen *M. kansasii* en *M. gastri* waar gebruik gemaakt wordt van primers en probes tegen het 16S-23S ITS gen. Deze qPCR methode detecteert specifiek *M. kansasii* en geen andere *Mycobacterium*-soorten.

In de literatuur is een qPCR methode beschreven waar *M. xenopi* mee gedetecteerd zou kunnen worden in drinkwater (23). Nadat de sequenties van de primers van deze qPCR vergeleken waren met de database is naar voren gekomen dat de primers niet specifiek waren voor *M. xenopi*. De kans bestaat dat er naast het detecteren van *M. xenopi* ook andere *Mycobacterium*-soorten worden aangetoond met deze methode. Deze methode is niet specifiek bevonden. Met dit onderzoek is een qPCR beschikbaar gekomen die specifiek *M. xenopi* detecteert.

Het 16S rRNA gen en het 16S-23S ITS gen blijken geschikt te zijn om specifieke primers en probes tegen te ontwikkelen voor het aantonen van *M. xenopi* met de qPCR-methode. De primers MX184F, MX444R en probe MX309P zijn ontworpen tegen het 16S rRNA gen en primers MX1673F, MX1930R en probe MX1844P tegen het 16S-23S ITS gen. De keuze is gemaakt om voor *M. xenopi* gebruik te maken van het 16S rRNA gen en de daarvoor

ontworpen primers en probe. Deze keuze is gebaseerd op de mogelijkheid om in de toekomst een multiplex qPCR te ontwikkelen. Bij een multiplex qPCR is het raadzaam om gebruik te maken van twee verschillende doelgenen zodat er minder kans is op overlap van de verschillende primers en probes tegen het gen.

Om de selectiviteit en specificiteit van de qPCR -methoden voor *M. kansasii* en *M. xenopi* te bepalen met praktijkmonsters, moet DNA geïsoleerd uit praktijkmonsters worden geanalyseerd met behulp van de ontwikkelde qPCR methoden. Van positieve qPCR-reacties op de praktijkmonsters kan door middel van sequentieanalyse van het PCR fragment onderzocht worden in hoeverre de met PCR ook werkelijk een fragment van het doelorganisme is geamplificeerd. Voorgesteld wordt om naast drinkwatermonsters ook drinkwatermonsters uit landen met een (sub)tropisch klimaat te analyseren, omdat daar de temperatuur in het leidingnet hoger is. Daarnaast kunnen ook bv oppervlaktewatermonsters en monsters uit koeltorens in Nederland worden onderzocht, omdat de samenstelling van de bacteriële populatie anders kan zijn dan van drinkwater. Tevens kunnen drinkwatermonsters worden gespiked met een bekende hoeveelheid *M. kansasii* of *M. xenopi*. Als in deze monsters *M. kansasii* en *M. xenopi* wordt aangetoond met de qPCR-methoden kan doormiddel van sequentie-analyse het DNA fragment bevestigd worden.

In de drinkwatermonsters die voor dit onderzoek zijn onderzocht op *M. kansasii* en *M. xenopi* is geen *M. kansasii* en *M. xenopi* aangetoond. De aantoonbaarheidsgrens van *M. kansasii* is lager dan $1,3 \times 10^3$ DNA kopieën per Liter en van *M. xenopi* lager dan $1,9 \times 10^3$ DNA kopieën per Liter. Deze aantoonbaarheidsgrens is vrij hoog doordat er een beperkt volume is geanalyseerd (teruggerekend wordt er nu 50 ml geanalyseerd). Door dit volume te verhogen kan de aantoonbaarheidsgrens verlaagd worden. De kans bestaat dat *M. kansasii* en *M. xenopi* in drinkwater aanwezig kunnen zijn in aantallen lager dan de aantoonbaarheidsgrens. Vooralsnog lijkt er geen risico te zijn in drinkwater voor *M. kansasii* en *M. xenopi*.

2.7 Conclusies en aanbevelingen

Conclusies

qPCR-methoden voor de kwantitatieve detectie van *Mycobacterium kansasii* en *Mycobacterium xenopi* zijn ontwikkeld en beschikbaar. Voor *Mycobacterium kansasii* zijn specifieke primers en probe tegen het 16S-23S ITS gen beschikbaar. Voor *Mycobacterium xenopi* zijn specifieke primers en probe tegen het 16S rRNA gen beschikbaar.

De nieuw ontwikkelde qPCR methoden voor de detectie van *Mycobacterium kansasii* respectievelijk *Mycobacterium xenopi* zijn kwantitatief, selectief en gevoelig. Het DNA van de geselecteerde referentiestammen (van het andere geslacht dan *Mycobacterium kansasii* respectievelijk *Mycobacterium xenopi*) geven geen qPCR signaal en worden als negatief beschouwd.

Voor de kwantificatie van de qPCR is een kalibratiesysteem (MYCICAvKaSpXe) ontwikkeld, waarmee een ijklijn kan worden gegenereerd voor het kwantificeren van *Mycobacterium kansasii* respectievelijk *Mycobacterium xenopi*.

De detectielimiet voor *Mycobacterium kansasii* is 8,8 DNA kopieën / PCR. De detectielimiet voor *Mycobacterium xenopi* is 5,9 DNA kopieën / PCR.

Mycobacterium kansasii en *Mycobacterium xenopi* zijn met de ontwikkelde qPCR voor *Mycobacterium kansasii* respectievelijk *Mycobacterium xenopi* niet aangetoond in Nederlands drinkwatermonsters afkomstig van 11 verschillende pompstations en hun

bijbehorend voorzieningsgebied. Vooralsnog lijkt er geen risico te zijn in drinkwater voor *M. kansasii* en *M. xenopi*.

Aanbevelingen

Voorgesteld wordt om naast drinkwatermonsters ook oppervlaktewatermonsters en monsters uit koeltorens in Nederland worden onderzocht. Tevens kunnen drinkwatermonsters worden gespiked met een bekende hoeveelheid *M. kansasii* of *M. xenopi*. Watermonsters die positief zijn voor *Mycobacterium kansasii* respectievelijk *Mycobacterium xenopi* kunnen vervolgens met behulp van sequentieanalyse worden bevestigd.

Aanbevolen wordt om vervolgonderzoek te doen naar de mogelijkheid om een multiplex PCR te ontwikkelen voor *M. kansasii*, *M. xenopi*, *M. avium* en *Mycobacterium* spp.

Een methode evaluerend onderzoek (MEO) kan georganiseerd worden, met als doel de kritische prestatiekenmerken van de methode te bepalen waaronder de herhaalbaarheid bij verschillende laboratoria en de reproduceerbaarheid tussen laboratoria (5).

2.8 Bibliografie

1. Standard, I. (2003). Microbiology of food and animal feeding stuffs-Protocol for the validation of alternative methods. [ISO 16140](#).
2. Italiaander, R. H., L.; Wullings, B. (2011). Validatie van methoden voor DNA-extractie uit water, KWR Watercycle Research Institute.
3. IDT, I. D. t. (2011-2012). qPCR Application Guide, Experimental Overview, Protocol, Troubleshooting, IDT.
4. Wullings, B. A. (2013). Literatuuroverzicht van moleculair biologische methoden voor ijzer- en / of mangaan- oxiderende bacteriën in grondwaterzuivering, KWR Watercycle Research Institute.
5. Heijnen, L. W., B. (2010). Kwaliteitsborging bij Real-time PCR methoden.
6. Tortoli, E. (2012). "Phylogeny of the genus *Mycobacterium*: many doubts, few certainties." [Infection Genetics and Evolution](#) 12(4): 827-831.
7. Heijnen, L. K., E. (2011). Methode voor kwantitatieve detectie van intestinale enterococci met qPCR, KWR watercycle Research Institute.
8. van Berlo, M. F., Rossen, J.W.A (2009). Introductie tot real time PCR. [Hogeschool Utrecht](#). Utrecht.
9. Mullis K, F. F., Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. (1986). "Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction." [Cold Spring Harb Symp Quant Biol.](#) : 263-273.
10. van der Wielen, P. W. v. d. K., D. (2013). "Nontuberculous *Mycobacteria*, Fungi, and Opportunistic Pathogens in Unchlorinated Drinking Water in the Netherlands." [Applied and Environmental Microbiology](#) 79(3): 825-834.

11. van der Wielen, P. W. I., R.; Heijnen, L (2011). Kwantitatieve PCR-methoden voor opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater.
12. Glasmacher, A., S. Engelhart, et al. (2003). Infections from HPC organisms in drinking-water amongst the immunocompromised. Heterotrophic Plate Counts and Drinking-Water Safety. J. Bartram, J. Cotruvo, M. Exner, C. Fricker and A. Glasmacher. Cornwall, UK, World Health Organization: 137-145.
13. van Ingen, J. (2009). Nontuberculous mycobacteria. From gene sequences to clinical relevance. Nijmegen, Radboud University Nijmegen. PhD: 348.
14. van der Wielen, P. W. v. d. K., D. (2013). "<Nontuberculous Mycobacteria, Fungi, and Opportunistic Pathogens in.pdf>." Applied and Environmental Microbiology 79(3): 825-834.
15. van der Wielen, P. W. v. d. K., D. (2009). Literatuurstudie naar opportunistische-ziekteverwekkende micro-organismen die zich kunnen vermeerderen in drinkwater.
16. van der Wielen, P. W. v. d. K., D. (2011). Opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater.
17. Solomon, S., D. Qin, et al. (2007). Climate Change 2007. The Physical Science Basis. Cambridge, England, Cambridge University Press.
18. van Dorland, R. D.-V. W., Jansen, B (2011). De staat van het klimaat 2010. U. PCCC. De Bilt/ Wageningen.
19. Berridge, B. R. B., Freliera, B.F. (2001). "Streptococcus agalactiae and Streptococcus difficile 16S-23S intergenic rDNA: genetic homogeneity and species-specific PCR." Veterinary Microbiology 78(2): 165-173.
20. Center for molecular biologie of RNA, U. o. C., Santa Cruz Escherichia coli 16S rRNA Secondary Structure. google, Center for molecular biologie of RNA, University of California, Santa Cruz.
21. Niaid Mycobacterium tuberculosis Bacteria, cause of TB. google.
22. Corporation, L. T. (2013). Taqman SYBR Green assay.
23. Issa, R. S., A.A.; Hassan, N.A.M. (2012). "Development of the Quantitative Real-Time PCR Assay for the Detection of Mycobacterium xenopi." Medical and Biological Sciences 5.

2.9 Bijlage 1

Resultaten van drinkwater monsters afkomstig van 11 pompstations in Nederland en hun voorzieningsgebied bemonsterd in zomer 2012 en winter 2013 die geanalyseerd zijn met de kwantitatieve Real-time PCR voor *Mycobacterium kansasii* en *Mycobacterium xenopi*.

Periode	Voorzienings gebied	Nr	Methode	Gefiltreerd	Elutie	Rende-	Kopieën	Kopieën	
				volume	volume	ment	DNA / liter	DNA / liter	
				(ml)	(µl)	(%)	na correctie IC	na correctie IC	
							<i>M. xenopi</i>	<i>M. kansasii</i>	
Zomer	Spannenburg	1	direct	500	200	22,6	< 1,04E+03	< 1,55E+03	
2012	22-8-2012	2	direct	500	200	25,3	< 9,32E+02	< 1,38E+03	
		3	direct	500	200	24,7	< 9,54E+02	< 1,42E+03	
		4	direct	500	200	26,6	< 8,87E+02	< 1,32E+03	
		5	direct	500	200	22,7	< 1,04E+03	< 1,55E+03	
		6	na doorspoelen	1000	200	22,6	< 5,21E+02	< 7,74E+02	
		7	na doorspoelen	1000	200	27,5	< 4,29E+02	< 6,37E+02	
		8	na doorspoelen	1000	200	31,0	< 3,80E+02	< 5,64E+02	
		9	na doorspoelen	1000	200	27,7	< 4,27E+02	< 6,33E+02	
		10	na doorspoelen	1000	200	24,6	< 4,79E+02	< 7,12E+02	
		11	na doorspoelen	1000	200	25,6	< 4,61E+02	< 6,85E+02	
			Beerenplaat	1	direct	500	200	31,5	< 7,49E+02
	27-8-2012	2	direct	500	200	28,5	< 8,29E+02	< 1,23E+03	
		3	direct	500	200	31,3	< 7,54E+02	< 1,12E+03	
		4	direct	500	200	30,8	< 7,66E+02	< 1,14E+03	
		5	direct	500	200	35,6	< 6,62E+02	< 9,83E+02	
		6	direct	500	200	25,3	< 9,31E+02	< 1,38E+03	
		7	direct	500	200	26,2	< 9,01E+02	< 1,34E+03	
		8	direct	500	200	33,3	< 7,09E+02	< 1,05E+03	
		9	direct	500	200	34,1	< 6,92E+02	< 1,03E+03	
		10	direct	500	200	29,6	< 7,99E+02	< 1,19E+03	
		11	na doorspoelen	1000	200	33,3	< 3,54E+02	< 5,25E+02	
				12	na doorspoelen	1000	200	25,5	< 4,63E+02
13	na doorspoelen	1000		200	29,9	< 3,95E+02	< 5,86E+02		
14	na doorspoelen	1000		200	36,6	< 3,22E+02	< 4,78E+02		
15	na doorspoelen	1000		200	30,4	< 3,88E+02	< 5,77E+02		
16	na doorspoelen	1000		200	27,9	< 4,23E+02	< 6,28E+02		
17	na doorspoelen	1000		200	27,6	< 4,27E+02	< 6,34E+02		
18	na doorspoelen	1000		200	23,9	< 4,93E+02	< 7,32E+02		
19	na doorspoelen	1000		200	30,3	< 3,90E+02	< 5,79E+02		
	Braakman	1		direct	500	200	27,9	< 8,45E+02	< 1,25E+03
2012	29-8-2012	2		direct	500	200	31,2	< 7,57E+02	< 1,12E+03
		3		direct	500	200	27,1	< 8,72E+02	< 1,30E+03
		4	direct	500	200	23,0	< 1,02E+03	< 1,52E+03	
		5	direct	500	200	27,2	< 8,69E+02	< 1,29E+03	
		6	direct	500	200	27,0	< 8,73E+02	< 1,30E+03	
		7	direct	500	200	27,2	< 8,68E+02	< 1,29E+03	
		8	direct	500	200	26,8	< 8,81E+02	< 1,31E+03	
		9	na doorspoelen	1000	200	27,5	< 4,29E+02	< 6,37E+02	
		10	na doorspoelen	1000	200	27,0	< 4,36E+02	< 6,48E+02	
		11	na doorspoelen	1000	200	26,5	< 4,45E+02	< 6,61E+02	
		12	na doorspoelen	1000	200	29,1	< 4,05E+02	< 6,01E+02	

	13	na doorspoelen	1000	200	36,9	< 3,20E+02	< 4,75E+02
	14	na doorspoelen	1000	200	28,7	< 4,10E+02	< 6,09E+02
	15	na doorspoelen	1000	200	31,7	< 3,72E+02	< 5,53E+02
	16	na doorspoelen	1000	200	31,3	< 3,77E+02	< 5,60E+02
	17	na doorspoelen	1000	200	35,0	< 3,37E+02	< 5,01E+02
	18	na doorspoelen	1000	200	27,8	< 4,24E+02	< 6,29E+02
Weesper-							
karspel	1	direct	500	200	25,5	< 9,25E+02	< 1,37E+03
4-9-2012	2	direct	500	200	24,9	< 9,50E+02	< 1,41E+03
	3	direct	500	200	29,7	< 7,94E+02	< 1,18E+03
	4	direct	500	200	42,0	< 5,62E+02	< 8,34E+02
	5	direct	500	200	22,8	< 1,04E+03	< 1,54E+03
	6	direct	500	200	22,9	< 1,03E+03	< 1,53E+03
	7	na doorspoelen	1000	200	23,2	< 5,09E+02	< 7,55E+02
	8	na doorspoelen	1000	200	23,9	< 4,95E+02	< 7,34E+02
	9	na doorspoelen	1000	200	31,1	< 3,79E+02	< 5,63E+02
	10	na doorspoelen	1000	200	21,6	< 5,47E+02	< 8,12E+02
	11	na doorspoelen	1000	200	21,4	< 5,51E+02	< 8,18E+02
	12	na doorspoelen	1000	200	30,4	< 3,88E+02	< 5,76E+02
	13	na doorspoelen	1000	200	25,4	< 4,64E+02	< 6,89E+02
	14	na doorspoelen	1000	200	23,9	< 4,93E+02	< 7,32E+02
Scheveningen	1	direct	500	200	26,0	< 9,09E+02	< 1,35E+03
5-9-2012	2	direct	500	200	30,8	< 7,67E+02	< 1,14E+03
	3	direct	500	200	32,7	< 7,23E+02	< 1,07E+03
	4	direct	500	200	22,9	< 1,03E+03	< 1,53E+03
	5	direct	500	200	20,4	< 1,16E+03	< 1,72E+03
	6	direct	500	200	28,9	< 8,16E+02	< 1,21E+03
	7	direct	500	200	23,8	< 9,93E+02	< 1,47E+03
	8	na doorspoelen	1000	200	28,6	< 4,12E+02	< 6,12E+02
	9	na doorspoelen	1000	200	25,9	< 4,56E+02	< 6,77E+02
	10	na doorspoelen	1000	200	23,8	< 4,96E+02	< 7,36E+02
	11	na doorspoelen	1000	200	24,0	< 4,93E+02	< 7,31E+02
	12	na doorspoelen	1000	200	26,6	< 4,44E+02	< 6,59E+02
	13	na doorspoelen	1000	200	33,0	< 3,58E+02	< 5,31E+02
	14	na doorspoelen	1000	200	25,8	< 4,58E+02	< 6,79E+02
	15	na doorspoelen	1000	200	27,0	< 4,36E+02	< 6,48E+02
	16	na doorspoelen	1000	200	27,1	< 4,35E+02	< 6,46E+02
	17	na doorspoelen	1000	200	29,0	< 4,07E+02	< 6,05E+02
Andijk	1	direct	500	200	50,8	< 4,64E+02	< 6,89E+02
10-9-2012	2	direct	500	200	41,5	< 5,69E+02	< 8,44E+02
	3	direct	500	200	29,0	< 8,15E+02	< 1,21E+03
	4	direct	500	200	55,2	< 4,28E+02	< 6,35E+02
	5	direct	500	200	42,2	< 5,59E+02	< 8,30E+02
	6	direct	500	200	35,4	< 6,67E+02	< 9,90E+02
	7	direct	500	200	39,9	< 5,92E+02	< 8,79E+02
	8	direct	500	200	49,9	< 4,73E+02	< 7,02E+02
	9	direct	500	200	48,3	< 4,89E+02	< 7,26E+02
	10	direct	500	200	43,0	< 5,49E+02	< 8,15E+02
	11	na doorspoelen	1000	200	45,7	< 2,58E+02	< 3,83E+02

	12	na doorspoelen	1000	200	55,2	< 2,14E+02	< 3,17E+02
	13	na doorspoelen	1000	200	48,5	< 2,43E+02	< 3,61E+02
	14	na doorspoelen	1000	200	53,7	< 2,20E+02	< 3,26E+02
	15	na doorspoelen	1000	200	41,1	< 2,87E+02	< 4,26E+02
	16	na doorspoelen	1000	200	52,4	< 2,25E+02	< 3,34E+02
	17	na doorspoelen	1000	200	49,3	< 2,39E+02	< 3,55E+02
	18	na doorspoelen	1000	200	39,3	< 3,00E+02	< 4,46E+02
	19	na doorspoelen	1000	200	42,7	< 2,76E+02	< 4,10E+02
	20	na doorspoelen	1000	200	44,0	< 2,68E+02	< 3,98E+02
Amersfoortsew							
eg	1	direct	350	200	40,2	< 8,39E+02	< 1,25E+03
11-9-2012	2	direct	500	200	44,6	< 5,29E+02	< 7,85E+02
	3	direct	500	200	37,5	< 6,29E+02	< 9,34E+02
	4	direct	500	200	40,5	< 5,83E+02	< 8,65E+02
	5	direct	420	200	36,1	< 7,78E+02	< 1,16E+03
	6	direct	500	200	43,9	< 5,38E+02	< 7,99E+02
	7	direct	500	200	44,5	< 5,30E+02	< 7,87E+02
	8	direct	500	200	50,8	< 4,64E+02	< 6,90E+02
	9	direct	400	200	42,4	< 6,96E+02	< 1,03E+03
	10	na doorspoelen	1000	200	38,1	< 3,10E+02	< 4,60E+02
	11	na doorspoelen	1000	200	44,7	< 2,64E+02	< 3,92E+02
	12	na doorspoelen	1000	200	36,2	< 3,26E+02	< 4,83E+02
	13	na doorspoelen	1000	200	47,5	< 2,48E+02	< 3,69E+02
	14	na doorspoelen	1000	200	37,2	< 3,17E+02	< 4,70E+02
	15	na doorspoelen	1000	200	51,4	< 2,30E+02	< 3,41E+02
	16	na doorspoelen	1000	200	49,1	< 2,40E+02	< 3,57E+02
	17	na doorspoelen	1000	200	47,3	< 2,49E+02	< 3,70E+02
	18	na doorspoelen	1000	200	41,2	< 2,86E+02	< 4,25E+02
	19	na doorspoelen	1000	200	39,7	< 2,98E+02	< 4,42E+02
Nuland							
18-9-2012	1	direct	500	200	25,8	< 9,15E+02	< 1,36E+03
	2	direct	500	200	25,8	< 9,16E+02	< 1,36E+03
	3	direct	500	200	30,2	< 7,80E+02	< 1,16E+03
	4	direct	500	200	25,7	< 9,17E+02	< 1,36E+03
	5	direct	500	200	27,3	< 8,65E+02	< 1,28E+03
	6	direct	500	200	24,4	< 9,68E+02	< 1,44E+03
	7	direct	500	200	22,7	< 1,04E+03	< 1,54E+03
	8	direct	500	200	27,3	< 8,65E+02	< 1,28E+03
	9	direct	500	200	24,7	< 9,54E+02	< 1,42E+03
	10	direct	500	200	28,2	< 8,38E+02	< 1,24E+03
	11	na doorspoelen	1000	200	30,6	< 3,86E+02	< 5,73E+02
	12	na doorspoelen	1000	200	25,0	< 4,72E+02	< 7,01E+02
	13	na doorspoelen	1000	200	28,3	< 4,16E+02	< 6,18E+02
	14	na doorspoelen	1000	200	28,1	< 4,19E+02	< 6,23E+02
	15	na doorspoelen	1000	200	30,8	< 3,83E+02	< 5,69E+02
	16	na doorspoelen	1000	200	30,6	< 3,85E+02	< 5,72E+02
	17	na doorspoelen	1000	200	31,4	< 3,75E+02	< 5,57E+02
	18	na doorspoelen	1000	200	31,5	< 3,75E+02	< 5,57E+02
	19	na doorspoelen	1000	200	30,7	< 3,85E+02	< 5,71E+02
	20	na doorspoelen	1000	200	31,5	< 3,75E+02	< 5,56E+02

Zuidwolde	1	direct	500	200	32,1	< 7,34E+02	< 1,09E+03
20-9-2012	2	direct	500	200	28,8	< 8,20E+02	< 1,22E+03
	3	direct	500	200	35,4	< 6,66E+02	< 9,89E+02
	4	direct	500	200	33,1	< 7,12E+02	< 1,06E+03
	5	direct	470	200	32,1	< 7,82E+02	< 1,16E+03
	6	direct	500	200	33,6	< 7,02E+02	< 1,04E+03
	7	direct	500	200	30,1	< 7,84E+02	< 1,16E+03
	8	direct	500	200	30,4	< 7,76E+02	< 1,15E+03
	9	na doorspoelen	1000	200	31,2	< 3,78E+02	< 5,61E+02
	10	na doorspoelen	1000	200	26,1	< 4,52E+02	< 6,71E+02
	11	na doorspoelen	1000	200	29,6	< 3,99E+02	< 5,93E+02
	12	na doorspoelen	1000	200	29,0	< 4,07E+02	< 6,05E+02
	13	na doorspoelen	1000	200	23,1	< 5,12E+02	< 7,60E+02
	14	na doorspoelen	1000	200	43,3	< 2,73E+02	< 4,05E+02
	15	na doorspoelen	1000	200	35,1	< 3,37E+02	< 5,00E+02
	16	na doorspoelen	1000	200	37,7	< 3,13E+02	< 4,65E+02
	17	na doorspoelen	1000	200	31,5	< 3,74E+02	< 5,55E+02
	18	na doorspoelen	1000	200	23,3	< 5,05E+02	< 7,50E+02
	Hanik	1	direct	500	200	29,6	< 7,96E+02
25-9-2012	2	direct	500	200	26,3	< 8,97E+02	< 1,33E+03
	3	direct	500	200	28,3	< 8,34E+02	< 1,24E+03
	4	direct	500	200	30,0	< 7,87E+02	< 1,17E+03
	5	direct	500	200	33,7	< 7,01E+02	< 1,04E+03
	6	direct	500	200	23,4	< 1,01E+03	< 1,50E+03
	7	direct	500	200	26,2	< 9,00E+02	< 1,34E+03
	8	direct	500	200	25,7	< 9,18E+02	< 1,36E+03
	9	direct	500	200	29,4	< 8,03E+02	< 1,19E+03
	10	direct	500	200	24,7	< 9,56E+02	< 1,42E+03
	11	na doorspoelen	1000	200	30,2	< 3,91E+02	< 5,81E+02
	12	na doorspoelen	1000	200	25,6	< 4,61E+02	< 6,84E+02
	13	na doorspoelen	1000	200	25,5	< 4,63E+02	< 6,88E+02
	14	na doorspoelen	1000	200	28,8	< 4,10E+02	< 6,08E+02
	15	na doorspoelen	1000	200	28,7	< 4,11E+02	< 6,10E+02
	16	na doorspoelen	1000	200	30,7	< 3,85E+02	< 5,71E+02
	17	na doorspoelen	1000	200	27,5	< 4,29E+02	< 6,37E+02
	18	na doorspoelen	1000	200	27,0	< 4,37E+02	< 6,50E+02
	19	na doorspoelen	1000	200	31,2	< 3,78E+02	< 5,62E+02
	20	na doorspoelen	1000	200	28,7	< 4,11E+02	< 6,10E+02
	Kluiizen (B)	1	direct	500	200	20,7	< 1,14E+03
27-9-2012	2	direct	500	200	23,1	< 1,02E+03	< 1,52E+03
	3	direct	500	200	24,4	< 9,67E+02	< 1,44E+03
	4	direct	500	200	18,0	< 1,31E+03	< 1,94E+03
	5	direct	500	200	21,3	< 1,11E+03	< 1,65E+03
	6	direct	500	200	22,5	< 1,05E+03	< 1,56E+03
	7	na doorspoelen	1000	200	23,4	< 5,05E+02	< 7,50E+02
	8	na doorspoelen	1000	200	20,3	< 5,81E+02	< 8,63E+02
	9	na doorspoelen	1000	200	24,1	< 4,90E+02	< 7,28E+02
	10	na doorspoelen	1000	200	24,5	< 4,82E+02	< 7,16E+02
	11	na doorspoelen	1000	200	20,9	< 5,65E+02	< 8,39E+02

		12	na doorspoelen	1000	200	29,4	< 4,01E+02	< 5,95E+02
Winter	Hanik	1	direct	500	200	30,1	< 7,85E+02	< 1,17E+03
2013	07-01-2013	2	direct	500	200	35,0	< 6,74E+02	< 1,00E+03
		3	direct	500	200	38,0	< 6,20E+02	< 9,21E+02
		4	direct	500	200	42,0	< 5,62E+02	< 8,35E+02
		5	direct	500	200	33,7	< 7,00E+02	< 1,04E+03
		6	direct	500	200	32,5	< 7,26E+02	< 1,08E+03
		7	direct	500	200	35,5	< 6,65E+02	< 9,88E+02
		8	direct	500	200	41,0	< 5,76E+02	< 8,55E+02
		9	direct	500	200	33,0	< 7,16E+02	< 1,06E+03
		10	direct	500	200	46,4	< 5,08E+02	< 7,54E+02
		11	na doorspoelen	1000	200	40,6	< 2,91E+02	< 4,31E+02
		12	na doorspoelen	1000	200	37,5	< 3,14E+02	< 4,67E+02
		13	na doorspoelen	1000	200	34,8	< 3,39E+02	< 5,04E+02
		14	na doorspoelen	1000	200	36,0	< 3,28E+02	< 4,87E+02
		15	na doorspoelen	1000	200	42,0	< 2,81E+02	< 4,17E+02
		16	na doorspoelen	1000	200	39,1	< 3,02E+02	< 4,48E+02
		17	na doorspoelen	1000	200	40,8	< 2,89E+02	< 4,30E+02
		18	na doorspoelen	1000	200	37,7	< 3,13E+02	< 4,65E+02
		19	na doorspoelen	1000	200	44,0	< 2,68E+02	< 3,98E+02
	Braakman	1	direct	500	200	20,3	< 1,17E+03	< 1,73E+03
	14-01-2013	2	direct	500	200	25,7	< 9,19E+02	< 1,36E+03
		3	direct	500	200	29,5	< 8,01E+02	< 1,19E+03
		4	direct	500	200	39,6	< 5,96E+02	< 8,85E+02
		5	direct	500	200	42,5	< 5,55E+02	< 8,24E+02
		6	na doorspoelen	1000	200	41,3	< 2,86E+02	< 4,24E+02
		7	na doorspoelen	1000	200	34,2	< 3,45E+02	< 5,12E+02
		8	na doorspoelen	1000	200	36,8	< 3,21E+02	< 4,77E+02
		9	na doorspoelen	1000	200	31,1	< 3,79E+02	< 5,63E+02
		10	na doorspoelen	1000	200	44,9	< 2,63E+02	< 3,90E+02
		11	na doorspoelen	1000	200	42,2	< 2,80E+02	< 4,16E+02
		12	na doorspoelen	1000	200	41,9	< 2,82E+02	< 4,18E+02
		13	na doorspoelen	1000	200	38,2	< 3,09E+02	< 4,59E+02
		14	na doorspoelen	1000	200	42,3	< 2,79E+02	< 4,14E+02
	Amersfoortsew							
	eg	1	direct	500	200	21,4	< 1,10E+03	< 1,63E+03
	04-02-2013	2	direct	500	200	37,0	< 6,38E+02	< 9,47E+02
		3	direct	500	200	33,2	< 7,11E+02	< 1,05E+03
		4	direct	500	200	35,6	< 6,62E+02	< 9,83E+02
		5	direct	500	200	37,8	< 6,25E+02	< 9,28E+02
		6	direct	500	200	33,9	< 6,97E+02	< 1,03E+03
		7	direct	500	200	38,3	< 6,16E+02	< 9,14E+02
		8	direct	500	200	39,7	< 5,94E+02	< 8,82E+02
		9	direct	500	200	38,1	< 6,19E+02	< 9,18E+02
		10	na doorspoelen	1000	200	37,4	< 3,16E+02	< 4,69E+02
		11	na doorspoelen	1000	200	36,9	< 3,20E+02	< 4,75E+02
		12	na doorspoelen	1000	200	36,0	< 3,27E+02	< 4,86E+02
		13	na doorspoelen	1000	200	42,2	< 2,80E+02	< 4,15E+02

	14	na doorspoelen	1000	200	42,5	< 2,78E+02	< 4,12E+02
	15	na doorspoelen	1000	200	45,2	< 2,61E+02	< 3,88E+02
	16	na doorspoelen	1000	200	35,7	< 3,30E+02	< 4,91E+02
	17	na doorspoelen	1000	200	36,5	< 3,24E+02	< 4,80E+02
	18	na doorspoelen	1000	200	33,2	< 3,86E+02	< 5,73E+02
	19	na doorspoelen	1000	200	36,7	< 3,22E+02	< 4,78E+02
Nuland	1	direct	500	200	26,1	< 9,05E+02	< 1,34E+03
06-02-2013	2	direct	500	200	26,0	< 9,06E+02	< 1,35E+03
	3	direct	500	200	37,9	< 6,22E+02	< 9,24E+02
	4	direct	500	200	37,6	< 6,28E+02	< 9,33E+02
	5	direct	500	200	46,7	< 5,06E+02	< 7,51E+02
	6	direct	500	200	50,7	< 4,66E+02	< 6,91E+02
	7	direct	500	200	52,2	< 4,52E+02	< 6,71E+02
	8	na doorspoelen	1000	200	50,9	< 2,32E+02	< 3,44E+02
	9	na doorspoelen	1000	200	53,8	< 2,19E+02	< 3,26E+02
	10	na doorspoelen	1000	200	46,1	< 2,56E+02	< 3,80E+02
	11	na doorspoelen	1000	200	43,2	< 2,73E+02	< 4,05E+02
	12	na doorspoelen	1000	200	49,1	< 2,40E+02	< 3,57E+02
	13	na doorspoelen	1000	200	48,0	< 2,46E+02	< 3,65E+02
	14	na doorspoelen	1000	200	53,2	< 2,22E+02	< 3,29E+02
	15	na doorspoelen	1000	200	45,5	< 2,59E+02	< 3,85E+02
	16	na doorspoelen	1000	200	42,4	< 2,78E+02	< 4,13E+02
	17	na doorspoelen	1000	200	42,9	< 2,75E+02	< 4,08E+02
	18	na doorspoelen	1000	200	46,4	< 2,54E+02	< 3,78E+02