

BTO 2017.001 | Maart 2017

BTO rapport

Relatie tussen het aantal DNA genkopieën (qPCR) en cellen van *E. coli* en *L. pneumophila* en *Aeromonas*

BTO

Bepalen van de relatie tussen het aantal DNA-kopieën (qPCR) en het aantal bacteriecellen

BTO 2017.001 | Maart 2017

Opdrachtnummer

400554.107.001

Projectmanager

Stefan Kools

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Nieuwe meetmethoden en sensing

Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

Auteurs

Bart Wullings en Leo Heijnen

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is openbaar.

Jaar van publicatie
2017

Meer informatie

Ir. B.A. Wullings
T 06 11 36 52 19
E bart.wullings@kwrwater.nl

Keywords: qPCR, DNA-kopieën, bacteriecellen, detectie

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



BTO | Juni 2017 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

BTO Managementsamenvatting

Kwantificering DNA-kopieën (qPCR) voor bepaling bacterieconcentraties in drinkwater vormt goed alternatief voor traditionele technieken

Auteurs ir. Bart Wullings en ing. Leo Heijnen

qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction) – een methode waarin DNA genkopieën een maat vormen voor het aantal bacteriecellen – is een snel, gevoelig en robuust alternatief voor onderzoek door drinkwaterlaboratoria naar de aanwezigheid of groei van specifieke bacteriën. Traditioneel gebeurt dit aan de hand van tijdrovende niet altijd specifieke kweekmethoden. Tot op heden was de relatie tussen resultaten afkomstig van qPCR en celaantallen (verkregen met kweekmethoden of celtellingen) niet bekend vanwege de uiteenlopende manieren waarmee ze bacteriecellen kwantificeren. Ondanks de genoemde voordelen van qPCR is, door het ontbreken van kennis over de relatie tussen celaantallen en de concentratie DNA genkopieën, de duiding van qPCR resultaten lastig. Dit onderzoek toont aan dat veel resultaten vergelijkbaar zijn en dat in sommige situaties bij qPCR hogere aantallen worden gevonden dan bij celtellingen en kweekmethoden. Dat maakt qPCR een potentieel een gevoeliger methode om specifieke micro-organismen in drinkwater te detecteren. Deze positieve uitkomst vormt een stap in het traject om wettelijke verankering van qPCR als routinematige analysemethode in drinkwaterlaboratoria mogelijk te maken.



Workflow van het ddPCR proces: het genereren van druppeltjes (1); PCR waarbij een deel van de druppeltjes zal gaan fluoresceren (2) en het uitlezen van de druppeltjes waarbij het aantal positieve en negatieve druppeltjes wordt bepaald

Belang: versnellen toepasbaarheid en wettelijke acceptatie qPCR-detectie voor drinkwaterlaboratoria

Om te weten of drinkwater vrij is van potentieel ziekteverwekkende micro-organismen en indicatorbacteriën voor fecale besmetting of nagroei, vindt dagelijks in drinkwaterlaboratoria controle plaats op grond van verschillende microbiologische parameters. Dit onderzoek wordt nu uitgevoerd door middel van relatief tijdrovende en weinig specifieke kweekmethoden die nu wettelijk zijn voorgeschreven in het drinkwaterbesluit. Daarentegen bieden kwantitatieve PCR-methoden (qPCR) veel voordelen: ze kunnen snel, zeer gevoelig, specifiek en tegen lage kosten de aanwezigheid en aantallen van diverse micro-organismen in water meten. Voor drinkwaterlaboratoria vormt routinematige toepassing van deze

mogelijk robuuste qPCR-methoden daarom een aantrekkelijk alternatief. Moeilijkheid hierbij is de onbekende relatie tussen qPCR-resultaten en traditionele methoden zoals kweek of celtellingen, wat interpretatie lastig maakt. Elke detectiemethode kwantificeert namelijk op een andere wijze de bacterie-aantallen. Bij de qPCR-methode gebeurt dit op grond van het aantal DNA genkopieën; de kweekmethode gebruikt het aantal kweekbare cellen (kolonievormende eenheden ofwel kve) en met behulp van celtelling met een flowcytometer wordt het aantal fluorescente deeltjes gemeten. Opheldering van de relatie tussen genoemde resultaten kan wettelijke toelating van de qPCR-methode versnellen.

Aanpak: groei-experiment met vaststelling relatie tussen resultaten celtelling, kweekmethode en qPCR

In het laboratorium zijn gekweekte bacterieculturen van *L. pneumophila*, *E. coli* en *Aeromonas* in afzonderlijke groeistadia (exponentieel, stationair en afstervend) bemonsterd en geanalyseerd op grond van celaantal (flowcytometrie ofwel FCM), aantal kweekbare cellen (agarkweekmethode) en aantal DNA-genkopieën (qPCR). De digitale droplet PCR technologie is toegepast om DNA-kalibratiesuspensies nauwkeurig te kwantificeren. Op grond van deze resultaten is de relatie tussen de gebruikte meetmethoden vastgesteld.

Resultaten: groeifase bacteriecel van sterke invloed op resultaten celtelling, kweekmethode en qPCR

Uit de experimenten blijkt dat de resultaten van FCM, de kweekmethode en qPCR vergelijkbare groeicurven opleveren voor *E. coli* en *Aeromonas*. Wegens een hardnekkige besmetting van de *L. pneumophila*-cultuur konden de resultaten hiervan maar heel beperkt worden meegenomen. In alle gevallen blijkt bij *E. coli* en *Aeromonas* de groeifase sterk van invloed te zijn op de meetresultaten van de verschillende analysemethoden. Ook in natuurlijke monsters zal dit waarschijnlijk een rol spelen. Tijdens de exponentiële en stationaire groei geven de qPCR-resultaten beduidend hogere gehalten (*E. coli* 1-2-logeenheden; *Aeromonas* 2-3-logeenheden) dan bij de FCM telling (totaal en levend) en de kweekmethode. In de afstervende fase neemt het aantal gekweekte cellen sterk af, maar komen de kwantitatieve resultaten van qPCR en FCM (totaal) sterk overeen. De hogere uitkomst van qPCR ten opzichte van de FCM telling en de kweekmethode maakt het vanwege de lagere detectiegrens voor celtellingen een gevoeliger manier om specifieke micro-organismen in drinkwater op te sporen. Het onderscheid van qPCR kan onder andere worden verklaard door (1) het ontstaan van cellen tijdens de afstervende fase van een bacteriecultuur die zich in een zogenaemde 'viable but non culturable' staat bevinden en (2) de aanwezigheid van meerdere genoom (DNA)kopieën in een cel tijdens de snelle (exponentiële) groeifase.

Implementatie: wettelijke verankering qPCR methode in routinematige kwantitatieve risicobeoordeling

Met dit onderzoek is aangetoond dat qPCR gevoeliger en mogelijk ook robuuster is in het aantonen van specifieke bacteriën dan kweekmethoden die drinkwaterlaboratoria traditioneel gebruiken. Het is daarmee een aantrekkelijk alternatief voor een 'worst case' benadering in kwantitatieve risicobeoordeling.

Aanbevolen wordt om de qPCR-methoden wettelijk te verankeren, wat routinematige toepassing mogelijk maakt.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport *Bepalen van de relatie tussen het aantal DNA-kopieën (qPCR) en het aantal bacteriecellen* (BTO-2017.001).

Samenvatting

Dagelijks wordt drinkwater op verschillende microbiologische parameters gecontroleerd die inzicht geven in de aanwezigheid van potentieel ziekteverwekkende – micro-organismen en indicatorbacteriën voor een fecale besmetting of nagroei. Deze detectiemethoden zijn veelal gebaseerd op kweekmethoden. Kwantitatieve PCR-methoden (qPCR) zijn echter uitermate geschikt om snel, zeer gevoelig, specifiek en tegen lage kosten de aanwezigheid en aantallen van diverse micro-organismen in water te meten. Voor de drinkwaterlaboratoria vormt routinematige toepassing van deze qPCR-methoden daarom een aantrekkelijk alternatief voor de huidige kweekmethoden voor bijvoorbeeld *Legionella pneumophila*. De interpretatie van qPCR-resultaten wordt momenteel nog bemoeilijkt door de onbekende relatie tussen qPCR-resultaten en de traditionele methoden, zoals kweek of celtellingen. De achterliggende oorzaak is dat deze detectiemethoden elk op een andere wijze de bacterie-aantallen kwantificeren. De qPCR-methode kwantificeert het aantal DNA genkopieën, de kweekmethode het aantal kweekbare cellen, uitgedrukt als kolonievormende eenheden (kve) en de celtelling het aantal fluorescente deeltjes. De ontbrekende informatie over de relatie tussen de resultaten van de traditionele methoden en de qPCR-methode staat onder andere wettelijke toelating (nog) in de weg.

Om de betekenis van met qPCR verkregen meetwaarden beter te kunnen beoordelen, en daarmee één van de belemmeringen voor wettelijke acceptatie weg te nemen is onderzoek uitgevoerd naar de relatie tussen het aantal cellen, DNA genkopieën en kweekbare cellen tijdens de verschillende fasen van de groei van *L. pneumophila*, *E. coli* en *Aeromonas*. Om deze relatie vast te stellen zijn cellen van *L. pneumophila*, *E. coli* en *Aeromonas* in het laboratorium gekweekt en zijn tijdens de verschillende fasen van de groei (exponentieel, stationair en afsterving) de culturen bemonsterd. In elk monster is het aantal cellen geteld met flowcytometrie (FCM), is het aantal kweekbare cellen bepaald met een specifieke agarkweekmethode en zijn het aantal DNA-genkopieën bepaald met een specifieke qPCR. Bij aanvang van het onderzoek is de innovatieve digitale droplet PCR (ddPCR) technologie geïmplementeerd in het laboratorium. Deze ontwikkeling op het gebied van de qPCR maakt het mogelijk om de concentratie van een specifiek DNA-molecuul zeer gevoelig en nauwkeurig te bepalen zonder daarbij afhankelijk te zijn van een kalibratiesuspensie. Voor *E. coli*, *L. pneumophila* en *Aeromonas* spp. is deze ddPCR methodiek geoptimaliseerd en is voor elk doelorganisme een DNA-kalibratiesuspensie nauwkeurig gekwantificeerd.

Het verloop van de groeicurven van *E. coli* en *Aeromonas* gemeten met de qPCR, FCM en kweekmethode vertonen grote overeenkomsten. Uit de groei-experimenten is gebleken dat zowel bij *E. coli* als *Aeromonas*, de qPCR-resultaten gemeten tijdens de logaritmische en stationaire groei beduidend hoger zijn in vergelijking met de FCM telling (totaal en levend) en kweekmethode. Voor *E. coli* zijn de qPCR resultaten ongeveer 1-2-logeenheden hoger en voor *Aeromonas* 2-3-logeenheden. In de afstervende fase neemt het aantal gekweekte cellen sterk af, maar zijn de kwantitatieve resultaten van de qPCR en FCM (totaal) zeer overeenkomend.

De groei-experimenten met *L. pneumophila* zijn door een hardnekkige besmetting mislukt. Alleen in een experiment waarin *L. pneumophila* is voorgekweekt in rijk medium is het gelukt de stationaire – en afstervende groeifase te analyseren met de verschillende detectiemethoden waarbij echter door onverklaarbare redenen de FCM tellingen en

kweekmethode ruim een log-waarde hoger zijn dan het aantal DNA genkopieën bepaald met qPCR.

De resultaten van de groeicurven geanalyseerd met de qPCR, FCM en kweekmethode laten zien dat de meetresultaten sterk beïnvloed worden door de groeifase waarin de bacteriecel zich bevind. Ook in natuurlijke monsters zal dit waarschijnlijk een rol spelen. De hogere aantallen DNA genkopieën die worden gemeten met qPCR zijn (deels) te verklaren door het voorkomen van meerdere genoomkopieën tijdens de relatief snelle groei van *E. coli* en *Aeromonas*.

De kwantitatieve detectie met de qPCR van *E. coli* en *Aeromonas* in water resulteert in betrouwbare maar in sommige situaties hogere gedetecteerde DNA-genkopieën ten opzichte van de kweekmethode en FCM telling. De sterke afname van het aantal kweekbare cellen in de afstervende fase van een bacteriecultuur kan ook worden veroorzaakt doordat de cellen in een zogenaamde "viable but non culturable" staat verkeren. Deze cellen zijn onder bepaalde condities weer in staat te activeren en te vermeerderen. De FCM telling is niet geschikt voor detectie van specifieke micro-organismen in een natuurlijk monster door de geringe specificiteit en relatief hoge detectiegrens. Ondanks de genoemde kanttekeningen is een kwantitatieve risicobeoordeling met qPCR een "worse case" benadering die echter gevoeliger en mogelijk ook robuuster is dan ten opzichte van de kweekmethode én de FCM telling.

Voorwoord

Moleculairbiologische methoden worden al meer dan een decennium toegepast in microbiologisch onderzoek en ook in routineanalyses door de drinkwaterlaboratoria. De belangrijkste drijfveren om deze methodieken in de laboratoria toe te passen, is de snelheid en grote specificiteit ten opzichte van de klassieke methoden die veelal op kweek zijn gebaseerd. Wettelijke implementatie van de nieuwe moleculaire methoden wordt echter bemoeilijkt door het verschil in uitkomst van de verschillende detectiemethoden (DNA genkopieën versus kolonievormende eenheden). De belangrijkste doelstelling van het onderzoek dat in dit rapport is beschreven was om inzicht te krijgen in hoe de meetwaarden van de verschillende detectiemethoden onderling overeenkomen of juist verschillen. Gedurende het onderzoek is ook een werkgroep gestart waarin drinkwaterlaboratoria, RIVM en KWR samenwerken en die tot doel heeft (i) om te onderzoeken voor welke parameters vervanging van de huidige (kweek)methoden door nieuwe meetmethoden (qPCR) mogelijk is en (ii) hoe tot wettelijke acceptatie van nieuwe meetmethode kan worden gekomen. De bijdrage van KWR medewerkers aan deze werkgroep was onderdeel van dit project. In 2016 heeft dit geresulteerd in de aanvraag voor wettelijke toelating van de RT-PCR voor *E. coli* in drinkwater. In deze aanvraag is samengewerkt met verschillende collega's van de waterleidingbedrijven en KWR. De resultaten van dit overleg zijn niet opgenomen in dit onderzoeksrapport.

Bij aanvang van het onderzoek was ook voorzien om in het onderzoek tevens de invloed van de DNA-bindende kleurstoffen EMA en PMA te analyseren, waarmee met behulp van qPCR onderscheid zou kunnen worden gemaakt tussen membraanintacte en membraanbeschadigde cellen. Gedeeltelijk parallel aan dit onderzoek is echter gevonden dat PMA/EMA niet geschikt is voor routinematige toepassing (Wullings et al., 2016). Daarom is deze methodiek niet verder onderzocht binnen de hier beschreven studie.

Inhoud

Samenvatting	2
Voorwoord	6
Inhoud	7
1 Inleiding	8
1.1 Aanleiding voor het onderzoek	8
1.2 Doelen	9
2 Opzet van het onderzoek en gebruikte analysemethoden	11
2.1 Opzet van het onderzoek	11
2.2 Groeiproeven	11
2.3 Analyses	13
2.4 Digitale droplet PCR (ddPCR)	13
3 Resultaten en discussie	15
3.1 Kwantificeren van de qPCR kalibratiesuspensies met ddPCR	15
3.2 Groeiproeven	17
4 Conclusies en aanbevelingen	24
4.1 Conclusies	24
4.2 Aanbevelingen	24
5 Literatuur	25
Experiment 1	26
Experiment 2	27
Experiment 3	28
Experiment 4	29
Experiment 5	30

1 Inleiding

1.1 Aanleiding voor het onderzoek

Kwantitatieve PCR-methoden (qPCR) zijn uitermate geschikt om snel, zeer gevoelig, specifiek en tegen lage kosten de aanwezigheid en aantallen van diverse micro-organismen in water te meten. Voor de drinkwaterlaboratoria vormt routinematige toepassing van qPCR-methoden daarom een aantrekkelijk alternatief voor de huidige kweekmethoden. Het aantal DNA genkopieën bepaald in een qPCR-reactie wordt berekend aan de hand van een DNA kalibratiesuspensie met bekende hoeveelheden genkopieën. Het exacte aantal DNA genkopieën in deze kalibratiesuspensie wordt op dit moment bepaald door de concentratie in een zeer sterk geconcentreerde DNA-suspensie (1.000.000-voudige concentratie) te bepalen en deze vervolgens zeer sterk te verdunnen tot werkconcentraties. Er zijn momenteel geen betrouwbare, extern gekalibreerde, DNA-suspensies beschikbaar. Echter, met behulp van nieuwe innovatieve digitale PCR-methoden, zoals de “droplet PCR”, is het tegenwoordig mogelijk om de concentratie van lage DNA kopieaantallen (1-10.000) zeer nauwkeurig vast te stellen. Het principe van de droplet PCR wordt uitgelegd in box 1. Deze innovatieve methode wordt toegepast om voor alle gebruikte kalibratiesuspensies de concentraties DNA genkopieën exact vast te stellen, zodat uiteindelijk kalibratiesuspensies kunnen worden gemaakt waarmee de DNA genkopieën in een monster nauwkeuriger kunnen worden bepaald. Deze nauwkeurig gekwantificeerde kalibratiesuspensies worden in het vervolgonderzoek gebruikt en kunnen ook door de drinkwaterlaboratoria worden gebruikt voor het standaardiseren van de kalibratiesuspensies bij qPCR-analyses.

De interpretatie van qPCR-resultaten wordt momenteel nog bemoeilijkt door de onbekende relatie tussen qPCR-resultaten en resultaten van de traditionele methoden, zoals kweek of celtellingen. De achterliggende oorzaak is dat deze detectiemethoden elk op een andere wijze de bacterie-aantallen kwantificeren. De qPCR-methode kwantificeert het aantal DNA genkopieën, de kweekmethode het aantal kweekbare cellen, uitgedrukt als kolonievormende eenheden (kve) en de celtelling het aantal karakteristieke fluorescente deeltjes. De aanwezigheid van dode of niet-kweekbare cellen, klontjes cellen of fluorescente deeltjes zullen de resultaten van de respectievelijke detectiemethoden beïnvloeden. Op basis van informatie uit de literatuur (o.a. Ditommaso et al., 2015) maar ook uit ervaringen bij KWR is de verwachting dat het aantal DNA-genkopieën hoger is dan het aantal kweekbare cellen en ook het aantal aanwezige cellen. Een verklaring voor dit fenomeen is waarschijnlijk dat elke individuele cel meerdere DNA-kopieën (genomen) bevat. Het is echter onbekend hoeveel genoomkopieën een cel bevat en of dit aantal constant is of mogelijk varieert tijdens de verschillende groeifasen van de organismen.

De ontbrekende informatie over de relatie tussen de traditionele methoden en de qPCR-methode staat onder andere wettelijke toelating van de qPCR methoden (nog) in de weg, waardoor het nog niet mogelijk is om qPCR-methoden routinematig toe te passen om de drinkwaterkwaliteit te beoordelen. Om de betekenis van met qPCR verkregen meetwaarden beter te kunnen beoordelen, en daarmee één van de belemmeringen voor wettelijke acceptatie weg te nemen, is onderzoek naar de relatie tussen celaantallen en aantallen DNA genkopieën van micro-organismen noodzakelijk.

1.2 Doelen

- Het bepalen van het aantal DNA genkopieën in kalibratiesuspensies voor qPCR met ddPCR;
- Inzicht in de relatie tussen celaantallen en het aantal DNA genkopieën tijdens de verschillende fasen van de groei van *L. pneumophila*, *E. coli* en *Aeromonas*

Tekst box 1 Digitale droplet PCR (ddPCR)

Al geruime tijd wordt gebruik gemaakt van PCR (Polymerase Chain Reaction) technieken voor detectie van specifieke organismen. Bij PCR wordt een, voor een specifiek organisme, kenmerkend DNA-fragment vermeerderd door gebruik te maken van synthetische DNA-moleculen (primers) in een enzymatische reactie. De PCR reactie verloopt cyclisch onder invloed van temperatuurswisselingen waarbij de hoeveelheid DNA tijdens elke temperatuurcyclus een verdubbeling ondergaat. Bij het gebruik van real-time kwantitatieve PCR (qPCR) wordt fluorescente detectie (d.m.v. een primer waaraan een fluorescent label is gebonden) gebruikt voor het meten van de vermeerdering van het DNA-fragment tijdens de PCR reactie. Een verband is vervolgens aanwezig tussen het aantal temperatuurcycli dat nodig is voor het genereren van een detecteerbaar fluorescentiesignaal (Cq waarde) en de concentratie van het specifieke DNA-fragment aan het begin van de PCR-reactie. Voor kwantificatie van het DNA worden de Cq waarden, verkregen bij het uitvoeren van qPCR reacties op monsters met bekende concentraties DNA genkopieën (kalibratiesuspensies), gebruikt voor het genereren van een kalibratiecurve en deze curve wordt gebruikt voor het kwantificeren van monsters met onbekende concentratie. De nauwkeurigheid waarmee qPCR kan worden gebruikt voor kwantificatie is daarmee voor een groot deel afhankelijk van de nauwkeurigheid waarmee de kalibratiesuspensies zijn samengesteld.

Digitale droplet PCR (ddPCR) is een nieuwe technologie waarmee de concentratie van een specifiek DNA-molecuul zeer gevoelig en nauwkeurig kan worden bepaald zonder daarbij afhankelijk te zijn van een kalibratiesuspensie. Bij ddPCR wordt het PCR monster verdeeld over ca. 20.000 individuele druppeltjes en vindt er in elk individueel druppeltje een PCR reactie plaats waarbij de vorming van een PCR-fragment resulteert in de vorming van een fluorescentiesignaal (door toepassing van een niet-specifieke fluorescente kleurstof (Eva-green) of een specifieke fluorescente probe. Na het uitvoeren van de PCR reactie zullen er fluorescente druppels zijn waarin de doelsequentie (DNA van het te detecteren organisme) aanwezig is en druppels die niet fluoresceren doordat de doelsequentie niet aanwezig is. Het monster wordt vervolgens door een scanner (een eenvoudig soort flow cytometer) gevoerd waarbij het aantal positieve en het aantal negatieve druppels wordt geteld. Een poisson statistische analyse wordt gebruikt voor het bepalen van de (nauwkeurige) absolute concentratie van de doelsequentie in het monster.



FIGUUR 1. WORKFLOW VAN HET DDPCR PROCESS: HET GENEREREN VAN DRUPPELTJES (1); PCR WAARBIJ EEN DEEL VAN DE DRUPPELTJES ZAL GAAN FLUORESCEREN (2) EN HET UITLEZEN VAN DE DRUPPELTJES WAARBIJ HET AANTAL POSITIEVE EN NEGATIEVE DRUPPELTJES WORDT BEPAALD (3)

2 Opzet van het onderzoek en gebruikte analysemethoden

2.1 Opzet van het onderzoek

Om het aantal DNA-genkopieën te vergelijken met celtaantallen zijn cellen van *L. pneumophila*, *E. coli* en *Aeromonas* in het laboratorium gekweekt en zijn tijdens de verschillende fasen van de groei (exponentieel, stationair en afsterving) de culturen bemonsterd. In elk monster is het aantal cellen geteld met flowcytometrie, zijn het aantal kweekbare cellen bepaald met voor ieder organisme een specifieke agarkweekmethode, en zijn het aantal DNA-genkopieën bepaald met organisme-specifieke qPCR. Voor het exact bepalen van het aantal DNA-genkopieën met qPCR is voor elk doelgen een DNA-kalibratiesuspensie gekwantificeerd met de ddPCR methode.

Door de BTO themagroep "nieuwe meetmethoden en sensing" zijn *Legionella pneumophila*, *Escherichia coli*, en *Aeromonas* voor het onderzoek geselecteerd.

2.2 Groeiproeven

Gedurende de groeiproeven met *E. coli* stam WR1, *Aeromonas* stam M800 en *L. pneumophila* stam ATCC35289 zijn tijdens de verschillende fasen van de groei (exponentieel, stationair en afsterving) monsters genomen. De tijdstippen van bemonstering zijn geschat op basis van de generatietijd van de verschillende micro-organismen (tabel 1). In totaal zijn vijf groeiproeven gedaan die worden beschreven in de bijlagen 1-4.

TABEL 1: BEMONSTERINGSMOMENTEN VAN DE EXPONENTIËLE, STATIONAIRE EN AFSTERVINGSFASE VAN DE LABORATORIUMCULTUREN. DE BEMONSTERINGSMOMENTEN ZIJN GESCHAT OP BASIS VAN GENERATIETIJD.

	Generatie tijd	Kolonie op plaat	Exponentieel	Stationair	Afsterving
<i>E. coli</i> stam WR1	17 min	8 uur	4 uur	10 uur	30 uur
<i>Aeromonas</i> stam M800	2 uur	24 uur	14 uur	22 uur	60 uur
<i>L. pneumophila</i> ATCC35289	6 uur	5 dgn	2 dgn	6 dgn	12,5 dgn

2.2.1 Experiment 1

Van ieder van de organismen is een ophopingscultuur gestart die is geënt met een celsuspensie vanuit een invriescupje.

- *E.coli* - WR1 referentie stam, 50 µl uit cupje toegevoegd aan 50 ml LB, 37°C op schutplateau
- *Aeromonas* - M800 referentie stam, 1,5ml cupje toegevoegd aan 50 ml LB medium 30°C op schutplateau
- *L. pneumophila* - ATCC 35289, stammenbank, 50 µl uit cupje toegevoegd aan 50 ml BCYE (zonder kool), 37°C op schutplateau

L. pneumophila ATCC 35289 is voor dit onderzoek gekozen, omdat in eerder onderzoek is vastgesteld dat deze stam in vloeibaar rijk medium als losse cellen of per twee cellen aan elkaar groeit. Andere *L. pneumophila* stammen groeien filamenteus in rijk medium en zijn daardoor moeilijk te kwantificeren met kweek of celtellingen.

Bij elke bemonsteringsronde is 3 ml medium steriel bemonsterd en bewaard op ijs. Met behulp van flowcytometrie (FCM) analyse is het aantal bacteriecellen in de monsters bepaald. Op basis van de FCM resultaten is de kweekverduunning ingezet en is 100-300 µl monster aan een DNA-extractiebuisje toegevoegd.

2.2.2 Experiment 2

Om meer controle te krijgen over de celaantallen van de ent, waarmee de drie ophopingsculturen worden gestart, is eerst een voorkweek gemaakt. Verschillende verduunningen van deze voorkweek zijn met de kweekmethode bepaald en ingevroren (tabel 2). Doordat er na de eerste ent met lage celaantallen weinig groei plaatsvond, zijn de culturen opnieuw geënt met hogere celaantallen (tweede ent). Om zo nauwkeurig mogelijk de verschillende groeifasen in de monsters vast te leggen zijn de culturen op zes momenten bemonsterd.

TABEL 2: CONCENTRATIEBEPALING VAN VOORKWEEK EN CONCENTRATIE ENT EXPERIMENT 2

	Eerste ent		Tweede ent	
	Verduunning	kve/ml	Verduunning	kve/ml
<i>L. pneumophila</i>	-4	87		
<i>Aeromonas</i>	-7	1	-5	55,2
<i>E. coli</i>	-6	15	-4	1500

2.2.3 Experiment 3

Dit experiment is identiek aan experiment 2 maar alleen uitgevoerd met *E. coli* en *L. pneumophila*. Opnieuw is een voorkweek uitgevoerd, zijn de culturen met ongeveer 100 cellen geënt en zijn op zes momenten de culturen bemonsterd.

2.2.4 Experiment 4 en 5

Het doel van deze experimenten was om een *L. pneumophila* ophopingscultuur te starten met een ent van een voorkweek met lage celaantallen waarin geen besmetting heeft plaatsgevonden. Hiervoor zijn in experimenten 4 en 5 vanuit een enkele kolonie tien kleine ophopingsculturen gestart in BCYE en BCYE_{AB} (Figuur 2). De experimentele variaties die zijn getest zijn weergegeven in de bijlagen.

FIGUUR 2: VOORKWEEKCULTUREN VAN *L. PNEUMOPHILA*

2.3 Analyses

2.3.1 Flowcytometer

Met de flowcytometer (FCM, BD FacsCalibur) kunnen deeltjes, waaronder bacteriecellen, in oplossing worden geteld. De methode is uitgevoerd conform LMB-071 voorschrift. Voor telling van de bacteriën met behulp van de FCM worden de bacteriecellen eerst met een fluorescent label gekleurd. Hierdoor kan de FCM onderscheid maken tussen bacteriën en (niet fluorescerende) deeltjes. Deeltjes die autofluoresceren of deeltjes die ook het fluorescentielabel binden worden wel gedetecteerd (achtergrondruis). Veelal zijn deze vervuilingendeeltjes van andere grootte, zodat het apparaat redelijk betrouwbaar het aantal bacteriecellen kan bepalen. Geklonterde cellen worden in deze telling wel gemist doordat ze een andere grootte hebben. Bij de kweekmethode worden geklonterde cellen als één kolonievormende eenheid geteld. In de methodiek worden twee kleuringen toegepast. Een algemene kleuring waarmee alle cellen worden gekleurd (SYBR) en een kleuring met propidiumiodide (PI), waarmee cellen met een beschadigde membraan worden geteld. Een gekleurde cel met PI wordt daarom verondersteld “dood” te zijn.

2.3.2 Kweekmethode

Voor elk van de drie bacteriesoorten zijn de specifieke kweekmethoden toegepast zoals die routinematig in het laboratorium worden toegepast.

- *L. pneumophila*: NEN6265
- *E. coli*: NEN-EN-ISO 9308-1
- *Aeromonas*: NEN6263

2.3.3 qPCR

De detectie van het aantal DNA-genkopieën (GK) is uitgevoerd met een specifieke qPCR methode voor *E. coli*, *Aeromonas* spp. en *L. pneumophila* (LMB voorschrift en bijlagen LMB-065). De kalibratie van de qPCR methoden is uitgevoerd met behulp van de DNA-kalibratiesuspensies die met de digital droplet-PCR zijn gekwantificeerd (zie paragraaf 2.4).

2.4 Digitale droplet PCR (ddPCR)

Digitale droplet PCR (ddPCR) is een techniek waarmee zeer nauwkeurige (“absolute”) kwantificatie van DNA moleculen mogelijk is (zie tekstbox 1 voor uitleg). Bij deze techniek wordt een PCR reactiemengsel eerst verdeeld over een groot aantal (ca. 20.000) individuele reactiedruppels (“droplets”). Vervolgens wordt er een PCR reactie uitgevoerd op de droplets en uiteindelijk worden positieve en negatieve droplets geteld m.b.v. een scanner.

2.4.1 Kwantificeren van het kalibratiesuspensies met ddPCR

Het KWR plasmide is een plasmide waarin een groot aantal specifieke DNA-genfragmenten (van o.a. *E. coli*, *Aeromonas* en *L. pneumophila*) zijn ingebracht en wordt gebruikt voor kwantificatie van verschillende organismen. Kalibratiesuspensies van verdunningen van dit plasmide worden gebruikt bij verschillende qPCR methoden. In dit onderzoek zijn kalibratiesuspensies van het KWR plasmide en is een kallibratiesuspensie met hierin het doelgen voor de *E. coli* PCR gekwantificeerd d.m.v. ddPCR. De kwantificaties zijn uitgevoerd door het uitvoeren van ddPCR waarmee de volgende doelgenen worden gekwantificeerd: IC (een fragment van het dengue virus, dit controlefragment wordt gebruikt voor het bepalen van de opbrengst van DNA-isolaties en het optreden van remming tijdens qPCR reacties) en het *mip*-gen van *L. pneumophila*. De gebruikte primers en probes voor het detecteren van deze doelgenen zijn beschreven in ISO12869:2012 (Anonymous, 2012). Voor het kwantificeren van de DNA-genkopieën van *E. coli* is in dit onderzoek gebruik gemaakt van een qPCR waarmee een fragment van een heat-shock gen van *E. coli* wordt geamplificeerd, de primers hiervoor zijn eerder beschreven (Heijnen et al., 2009).

Samenstellen van reactiemengsels:

Eerst worden reactiemengsel samengesteld, deze reactiemengsel bevatten een suspensie van het te kwantificeren DNA en alle reagentia die noodzakelijk zijn voor de ddPCR.

Mix (per monster):

10 µl ddPCR Probe Supermix (afkomstig van Biorad)

0,4 µl Forward primer (10 µM)

0,4 µl reverse primer (10 µM)

0,4 µl Probe (10 µM)

3,8 µl H₂O

5 µl DNA

In vervollexperimenten is ook een digestie van het plasmide uitgevoerd door toevoeging van ca. 2U van het restrictie-enzym *HinFI* en 10 min. incubatie bij 37°C. Dit restrictie-enzym fragmenteert het DNA van de KWR-plasmide in fragmenten van gemiddeld ca. 300 baseparen lang, waardoor de primers eenvoudiger het doelgen kunnen bereiken en de PCR-reactie efficiënter verloopt, het enzym laat het DNA-genfragment van *L. pneumophila*, *E. coli* en IC verder intact.

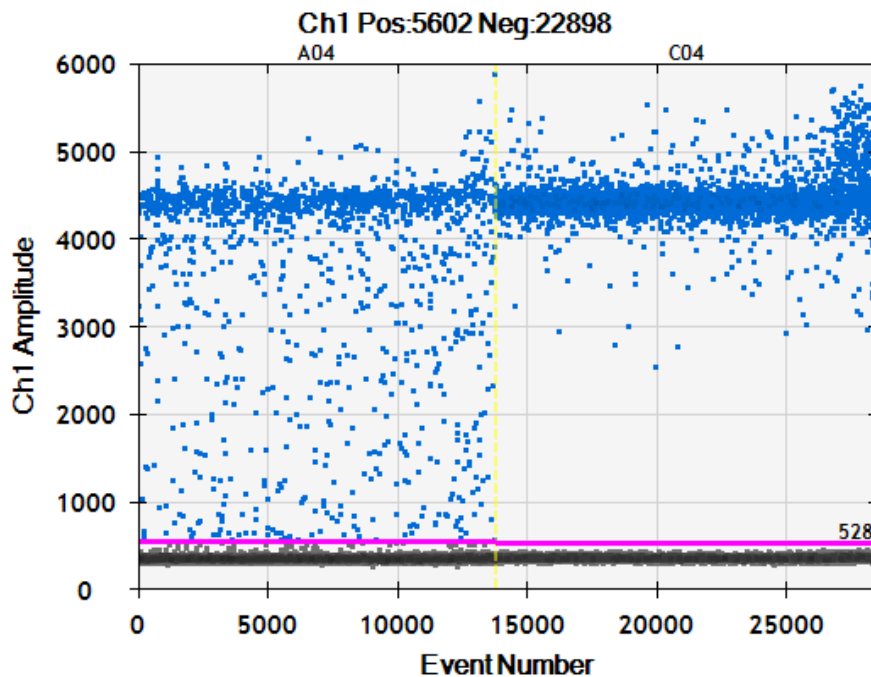
Het genereren van druppels

Voor het genereren van druppels wordt het reactiemengsel onder nauwkeurig gecontroleerde omstandigheden gemengd met olie. Voor het genereren van de druppels is een "droplet generator" gebruikt en is het protocol van de leverancier (Biorad) gebruikt.

3 Resultaten en discussie

3.1 Kwantificeren van de qPCR kalibratiesuspensies met ddPCR

Voor het kwantificeren met qPCR wordt gebruik gemaakt van kalibratiesuspensies met bekende concentraties DNA-genkopieën van het doelgen van de verschillende organismen. De kalibratiesuspensies die bij KWR worden toegepast bestaan uit verdunningsreeksen van plasmide DNA. De nauwkeurigheid waarmee met qPCR het aantal DNA-genkopieën kan worden gekwantificeerd, is sterk afhankelijk van de nauwkeurigheid waarmee kalibratiesuspensies kunnen worden samengesteld. De kwantificatie van deze kalibratiesuspensies is gebaseerd op het meten van de concentratie DNA in een zeer geconcentreerde suspensie m.b.v. een fluorometer (QuBit) en vervolgens het maken van verdunningen via een groot aantal verdunningsstappen. Het is te verwachten dat deze aanpak, vanwege de beperkte nauwkeurigheid van de fluorometer en de mogelijke introductie van verdunningsfouten, minder nauwkeurig is. Om een nauwkeuriger bepaling van de concentratie DNA-genkopieën in de kalibratiesuspensies te krijgen, is in dit onderzoek de concentratie in de kalibratiesuspensies nauwkeurig bepaald met behulp van ddPCR. Vervolgens zijn deze nauwkeurig bepaalde concentraties van de kalibratiesuspensies in de vervolgstappen van dit onderzoek gebruikt voor het kwantificeren met qPCR analyses. Als eerste stappen binnen het project zijn ddPCR trainingen gevolgd en zijn op het laboratorium optimalisatie-experimenten uitgevoerd. Eén van de optimalisaties bestond uit de toevoeging van een digestie met een restrictie-enzym (HinfI) waarmee het plasmide-DNA wordt gefragmenteerd voor het efficiënt laten verlopen van de PCR reacties in de individuele druppels. Bij het toevoegen van ongeknipt plasmide ontstaat er een patroon waarbij de hoeveelheid fluorescentielicht per druppel zeer veel varieert (monster A04, figuur 3). Waarschijnlijk is dit het gevolg van de secundaire structuur van het plasmide DNA, waarbij het circulaire plasmide als het ware oprolt tot een in elkaar gevouwen bolletje ("supercoiled" structuur). Door deze structuur kunnen de primers de sequentie van het doelgen moeilijk bereiken en verlopen de PCR reacties in de verschillende druppels met een variërende efficiëntie, dat resulteert in een wisselend fluorescentiesignaal per druppel. Door deze variatie is de telling van het aantal positieve druppels minder betrouwbaar uit te voeren. De toepassing van een digestie met HinfI heeft tot effect dat er minder variatie optreedt in de hoeveelheid fluorescentielicht per druppel (monster C04, figuur 3), wat resulteert in een betrouwbaardere kwantificatie.



FIGUUR 3. HET RESULTAAT VAN *L. PNEUMOPHILA* DDPCR WAARBIJ HET RESULTAAT VAN TWEE MONSTER ZICHTBAAR IS. EÉN MONSTER ZONDER DIGESTIE MET RESTRICTIE-ENZYM (LINKS: A04) EN EÉN MONSTER NA DIGESTIE MET HINFI (RECHTS: C04). DE INTENSITEIT VAN DE FLUORESCENTIE IS WEERGEGEVEN OP DE Y-AS, NEGATIEVE DRUPPELS ZIJN WEERGEGEVEN ALS GRIJZE BOLLETJES EN POSITIEVE DRUPPELS ZIJN WEERGEGEVEN ALS BLAUWE BOLLETJES.

Kwantificatie van de kalibratiesuspensies van *L. pneumophila*, IC en *E. coli* is uitgevoerd met en zonder digestie en de resultaten zijn met elkaar vergeleken. De resultaten van deze vergelijking zijn samengevat in tabel 3.

TABEL 3. RESULTATEN VAN KWANTIFICATIES MET DDPCR OP TWEE SUSPENSIES VAN PLASMIDE-DNA.

Suspensie	Target	Kalibratiesuspensie Op basis van QuBit (kopieen/ul)	Resultaat ddPCR (DNA kopieen/ul)							
			L.pneu				IC			
			Meting		%	Meting		%		
A	B	Gem	ddPCR	A	B	Gem	ddPCR			
A	L. pneu	2,5E+04	1,8E+04	1,8E+04	1,8E+04	-27,1	1,8E+04	1,8E+04	1,8E+04	-28,8
	L. pneu+HinF	2,5E+04	2,3E+04	2,3E+04	2,3E+04	-6,5	2,2E+04	2,3E+04	2,2E+04	-10,2
B	E.coli	2,5E+04	6,6E+03	6,8E+03	6,7E+03	-73,2	6,6E+03	6,9E+03	6,7E+03	-73,0
	E.coli+HinF	2,5E+04	2,0E+04	2,0E+04	2,0E+04	-20,3	1,9E+04	1,9E+04	1,9E+04	-24,6

Op de plasmiden van de kalibratiesuspensies voor kwantificatie van *L. pneumophila* en *E. coli* is ook de sequentie voor de IC PCR aanwezig. In de beide kalibratiesuspensies zijn daarom twee doelgenen (van *L. pneumophila* of *E. coli* en IC) gemeten met ddPCR. De vergelijking tussen de QuBit metingen ten opzichte van de ddPCR resultaat is uitgedrukt in een percentage ten opzichte van de meetwaarde met de ddPCR. De metingen laten zien dat er voor beide plasmiden geen verschil is in het aantal DNA-genkopieën van IC en *L. pneumophila*/*E. coli* bepaald met de ddPCR. Dit is te verwachten aangezien op beide onderzochte plasmiden één DNA-copy aanwezig is van IC en één copy van het *L.*

pneumophila of het *E. coli* specifieke fragment. De resultaten laten daarnaast zien dat het aantal DNA-genkopieën met ddPCR gemeten op een intact plasmide lager zijn dan op een plasmide waar een digestie met *HinFI* op is uitgevoerd. Het is dus noodzakelijk om een digestie op het plasmide uit te voeren om het aantal DNA-genkopieën met ddPCR betrouwbaar te bepalen. De resultaten laten ook zien dat het aantal DNA-genkopieën bepaald met ddPCR na digestie lager zijn dan wanneer ze worden gekwantificeerd met QuBit: de *L. pneumophila* suspensie 6,5-10,2% lager en de *E. coli* suspensie 20,3-24,6% lager. Bij de vervolgstappen van dit onderzoek zijn, bij het kwantificeren met qPCR, de concentraties die zijn gemeten met ddPCR gebruikt als waarden voor de kalibratiesuspensies.

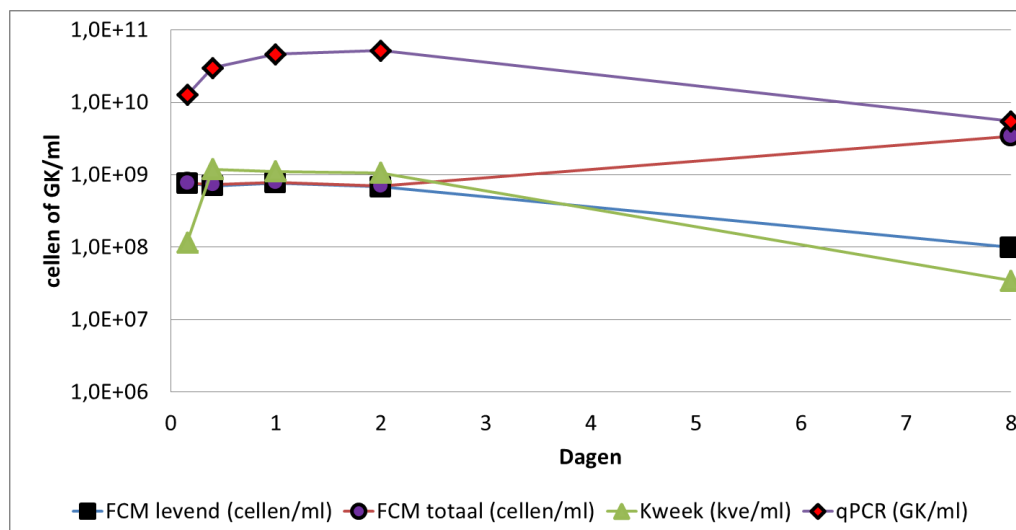
3.2 Groeiproeven

Voor de validatie van de qPCR-methode zijn in verschillende ophopingsexperimenten met *L. pneumophila*, *E. coli* en *Aeromonas* tijdens de verschillende fasen van de groei (exponentieel, stationair en afsterving) de culturen bemonsterd. Elk monster is geanalyseerd op het aantal cellen welke zijn geteld met flowcytometrie, het aantal kweekbare cellen bepaald met voor ieder organisme een specifieke agarkweekmethode, en het aantal DNA-genkopieën bepaald met organisme specifieke qPCR geanalyseerd met de qPCR-methode (details zijn weergegeven in de bijlagen).

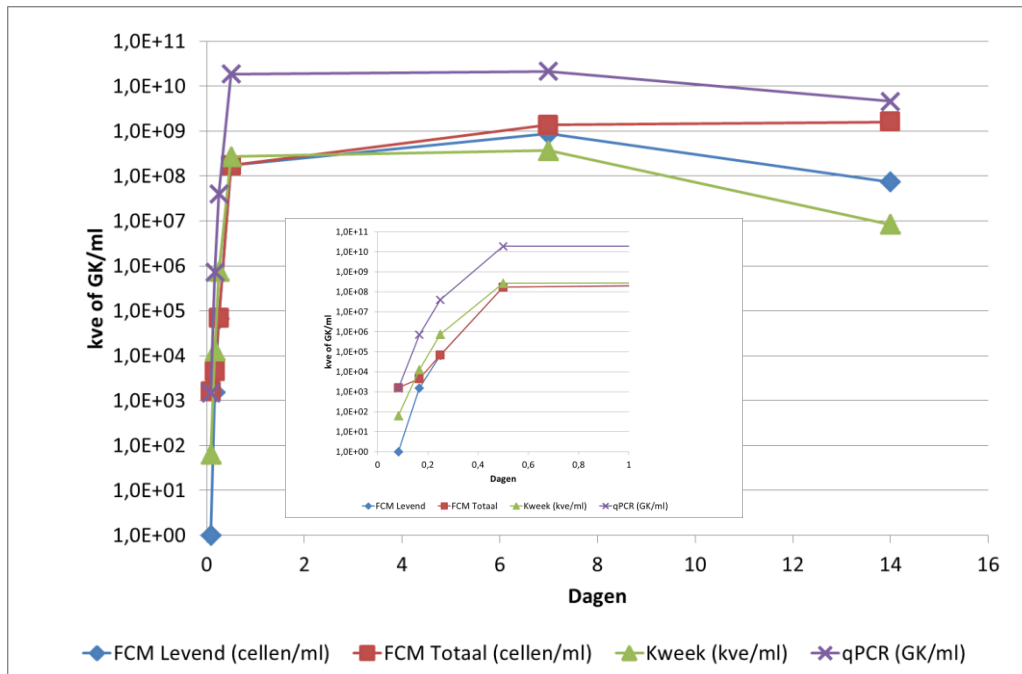
3.2.1 *E. coli*

In experimenten 1 tot 3 is *E. coli* WR1 geënt en gegroeid in LB medium. Doordat in experiment 2 een besmetting van de *E. coli* cultuur is opgetreden, zijn de resultaten van experiment 2 niet verder uitgewerkt. In experiment 1 is een vriescupje met *E. coli* WR1 rechtstreeks toegevoegd aan het medium. Dit resulteerde in (te) hoge startaantallen, waardoor de exponentiële groeifase maar in één monster is waargenomen (Figuur 4). In de vervolggroeiexperimenten is het aantal cellen waarmee de ophopingscultuur is geënt vooraf gekwantificeerd. Hierdoor is het mogelijk geweest om de beginaantallen van de ent nauwkeurig te bepalen. In experiment 3 is het hierdoor mogelijk geweest monsters te analyseren tijdens de drie groeifasen van de cultuur (Figuur 5).

Het verloop van de groeicurven, gemeten met de verschillende detectiemethoden, zijn in experiment 1 en 3 ondanks een verschillende startconcentratie, zeer overeenkomend.



FIGUUR 4: VERLOOP VAN DE *E. COLI* CULTUUR GEMETEN MET FCM, KWEEKMETHODE EN QPCR IN EXPERIMENT 1



FIGUUR 5: VERLOOP VAN DE *E. COLI* CULTUUR GEMETEN MET FCM, KWEEKMETHODE EN QPCR IN EXPERIMENT 3

In de exponentiële groeifase zijn de meetwaarden verkregen met FCM en kweek vergelijkbaar, terwijl de aantallen met qPCR beduidend hoger zijn. In de qPCR is het aantal genkopieën van het *clpB* heat shock gen gekwantificeerd. Dit gen is in één kopie aanwezig op het *E. coli* genoom (*E. coli* genoom “Blast” analyse). Een mogelijke verklaring voor de hogere *E. coli* aantallen gemeten met qPCR is dat door samenklontering van *E. coli* cellen, de resultaten van de FCM en kweekanalyses een onderschatting geven van de daadwerkelijke aantallen, omdat samengeklonterde cellen mogelijk niet afzonderlijk worden geteld met de FCM en maar één kolonie vormen op een agarplaat. De verschillen tussen de resultaten van de drie detectiemethoden kan tevens worden verklaard door de mogelijke aanwezigheid van meerdere genoomkopieën in één *E. coli* cel. *E. coli* is in staat om zich zeer snel te vermenigvuldigen met een delingstijd van 20 min (Helmstetter et al., 1967). De tijd die een *E. coli* cel nodig heeft om het genoom (al het DNA) te vermenigvuldigen is echter ongeveer een uur. Een delingstijd van 20 min. is dan ook alleen mogelijk als in de *E. coli* cel het genoom vanaf verschillende locaties op het DNA tegelijk wordt vermenigvuldigd (Tabel 4).

TABEL 4: HET AANTAL DNA-REPLICATIEVORKEN ALS FUNCTIE VAN DE DELINGSTIJD VAN EEN BACTERIECEL. SNEL GROEIENDE *E. COLI* CELLEN HEBBEN TIJDENS DE GROEI MEERDERE “ORIGINS OF REPLICATION” (BREMER AND DENNIS, 1996)

Doubling time (min)	Number of origins of replication per cell	Number of replication forks per cell
24	6.5	9.2
30	4.7	5.9
40	3.4	3.6
60	2.4	2.1
100	2.0	1.5

In tabel 5 is de verhouding tussen *E. coli* aantallen verkregen met qPCR en FCM-totaal, FCM-levend of kweek en tussen kweek en FCM-levend weergegeven. De vergelijking van de resultaten van de qPCR ten opzichte van de celtelling (FCM totaal) laat zien dat in de logaritmische groeifase het aantal genkopieën per cel toeneemt en dat in de afstervende fase deze vervolgens afneemt tot 1,6-2,9 genkopieën/cel. Dit maakt het aannemelijk dat de kwantitatieve verschillen tussen deze twee detectiemethoden voornamelijk wordt veroorzaakt door een toename of afname van het aantal gen (genoom) kopieën per cel. In een stationaire of afstervende populatie zijn in beide experimenten de resultaten van de qPCR en celtelling zeer overeenkomend (± 1 Cq-waarde).

De resultaten van de qPCR zijn ten opzichte van de celtelling van levende cellen en/of de kweekmethode beduidend hoger. Dit komt het sterkst tot uiting in de log-fase groeiende populatie (24,9-609,8 keer hoger). Tijdens de afstervingsfase neemt het aantal membraanintacte cellen en het aantal kweekbare cellen af, maar blijkt het DNA aantoonbaar waardoor er een relatief groot verschil blijft ten opzichte van de qPCR resultaten (24,4-554,6). Echter, ook het aantal genkopieën neemt af tijdens de afstervingsfase, terwijl het totaal aantal cellen hetzelfde blijft. Hierdoor blijft de verhouding qPCR/intacte cellen vergelijkbaar, terwijl verhouding qPCR/totaal aantal cellen duidelijk verandert tijdens de afstervingsfase (verhouding wordt kleiner).

Opvallend is dat ook het aantal kweekbare *E. coli* bacteriën ten opzichte van de celtelling van levende cellen (celmembraan intact) zeer variabel is (0,15 – 63,3 maal). Deze resultaten laten zien dat het aantal kweekbare cellen in veel gevallen ook niet overeenkomt met het aantal getelde levende cellen. De afname van het aantal kweekbare cellen zou (deels) kunnen worden verklaard doordat de cellen overgaan in een “viable but non culturable” status. Deze cellen kunnen onder bepaalde condities weer activeren en delen.

De qPCR resultaten lijken dus beïnvloed te worden door de activiteit/groeifase van *E. coli*. Het zal dan ook lastig zijn om één vaste correctiefactor toe te passen om de *E. coli* aantallen verkregen met qPCR te corrigeren zodat ze (meer) overeenkomen met de FCM- of kweekaantallen. In een natuurlijke populatie is het waarschijnlijk dat de populatie bestaat uit cellen die in verschillende fasen van de groei verkeren, waardoor het detectieresultaat van de qPCR mogelijk meer of minder overeenkomt met de celtelling van het aantal intacte cellen (FCM totaal).

Voor een risicobeoordeling van water op de aanwezigheid van *E. coli* is het resultaat van de qPCR methode in veel gevallen een “worse case” analyse. De methode detecteert waarschijnlijk cellen met meerdere genkopieën waardoor de methode mogelijk een hogere gevoeligheid heeft dan de kweekmethode en celtelling met FCM. De qPCR is hierdoor waarschijnlijk een gevoeliger methode om te beoordelen of het water fecaal is verontreinigd.

TABEL 5: KWANTITATIEF DETECTIERESULTAAT VAN GROEIPROEFMONSTERS MET *E. COLI* VAN QPCR RESULTATEN TEN OPZICHTE VAN DE KWEK- EN FCM RESULTATEN EN KWEK RESULTATEN TEN OPZICHTE VAN DE FCM LEVEND RESULTATEN

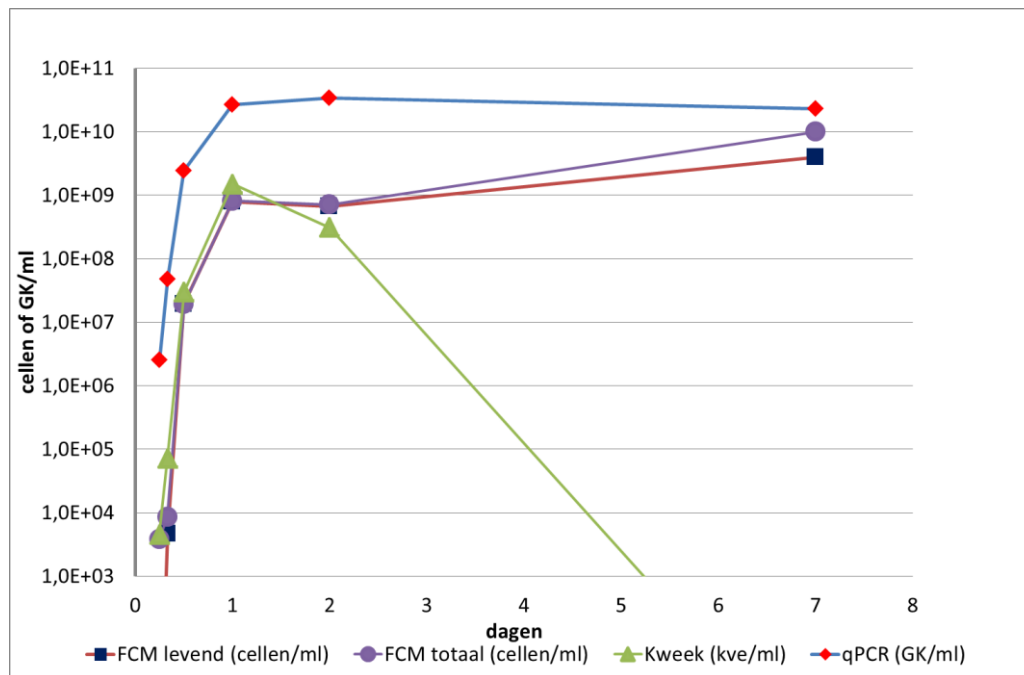
	Dagen	Groeifase*	qPCR/#			Kweek/#
			FCM totaal	FCM levend	kweek	FCM levend
Exp. 1	0,16	logaritmisch	16,3	16,5	108,6	0,2
	0,4	logaritmisch/stationair	40,3	42,5	24,9	1,7
	1	stationair	58,8	60,0	41,7	1,4
	2	stationair	74,0	76,2	49,0	1,6
	8	afstervend	1,6	55,4	159,8	0,3
Exp. 3	0,083	logaritmisch	0,9	1467,3	23,2	63,3
	0,17	logaritmisch	159,6	462,2	56,6	8,2
	0,25	logaritmisch	587,5	609,8	53,8	11,3
	0,5	logaritmisch/stationair	108,7	109,4	69,3	1,6
	7	stationair	15,6	24,4	57,7	0,4
	14	afstervend	2,9	62,3	554,6	0,1

*groeifase is gebaseerd op groeicurve kweekmethode; # waarden <1 zijn in rood weergegeven

3.2.2 Aeromonas

In experiment 2 zijn tijdens de verschillende groeifasen van *Aeromonas* M800, monsters genomen en geanalyseerd met de kweekmethode, FCM waarbij onderscheid is gemaakt tussen membraanintacte cellen en totaal aantal cellen en de qPCR-methode. Uit de ervaring die is opgedaan in experiment 1 is voor experiment 2 voor een lagere beginent gekozen waardoor ook de exponentiële groeifase kon worden bemonsterd en geanalyseerd (Figuur 6).

Het verloop van de groeicurven bepaald met de verschillende detectiemethoden vertoont in de exponentiële- en stationaire groeifase grote overeenkomsten. De groeicurve van de kweekmethode neemt echter sterk af na de stationaire fase en wijkt hiermee af van de overige groeicurven gemeten met de qPCR en celtelling. Na 7 dagen blijken celmembraanintacte cellen die met FCM worden geteld, niet meer kweekbaar op het agarmedium. Ook in een vergelijkbare studie waarin de DNA-bindende kleurstof EMA en/of PMA is toegepast om onderscheid te maken tussen levende of dode cellen op basis van membraanintacte en membraanpermeabele bacteriecellen bleek er een duidelijke discrepantie tussen celmembraanpermeabiliteit en kweekbaarheid van *Aeromonas*. (Wullings et al., 2016). Onbekend is of deze niet kweekbare maar celmembraanintacte *Aeromonas* cellen onder natuurlijke condities nog in staat zijn tot deling (groei).



FIGUUR 6: VERLOOP VAN DE AEROMONAS CULTUUR GEMETEN MET FCM, KWEKMETHODEN EN QPCR IN EXPERIMENT 2

De qPCR-methode detecteert het 16S rRNA gen van *Aeromonas*. In de wetenschappelijke databases (Genbank/NCBI) zijn vier genomesequenties van *Aeromonas* aanwezig (2x *A. hydrophila* en 2x *A. veronii*). In elk van deze genomesequenties zijn 10 kopieën van het 16S rRNA gen aanwezig. Om de gekwantificeerde DNA-kopieën (qPCR) te vergelijken met de cellaantallen (FCM) of kweekbare cellen (agarmethode) zijn de DNA-kopieën met deze factor 10 gecorrigeerd. Ondanks de correctie zijn de qPCR-aantallen in alle geanalyseerde monsters hoger dan de cellaantallen en kweekbare cellen. In tabel 6 zijn de verhoudingen tussen de verschillende detectiemethoden weergegeven. In de stationaire en afstervende groeifase nemen de verschillen tussen de FCM en qPCR sterk af. In het monster na 7 dagen incubatie is het verschil tussen de meetwaarde van de qPCR en FCM minimaal.

TABEL 6: KWANTITATIEF DETECTIERESULTAAT VAN GROEI- EN AFSTERVENDE MONSTERS MET *E. COLI* VAN QPCR RESULTATEN TEN OPZICHTE VAN DE KWEK- EN FCM RESULTATEN EN KWEK RESULTATEN TEN OPZICHTE VAN DE FCM LEVEND RESULTATEN

	Dagen	Groeifase*	qPCR/#		Kweek/#	
			FCM totaal	FCM levend	kweek	FCM levend
Exp. 2	0,25	logaritisch	667,4	>2500 ²	558,3	>45 ²
	0,33	logaritisch	5496,5	10185,8	661,4	15,4
	0,5	logaritisch	125,7	125,7	81,3	1,5
	1	logaritisch/stationair	32,8	33,7	17,9	1,9
	2	stationair	47,2	50,2	108,6	0,5
	7	afstervend	2,3	5,8	>69696 ³	<0,00083 ³

1, groeifase is gebaseerd op groeicurve kweekmethode; 2, Detectiegrens FCM levend; 3, kweekmethode negatief; # waarden <1 zijn in rood weergegeven

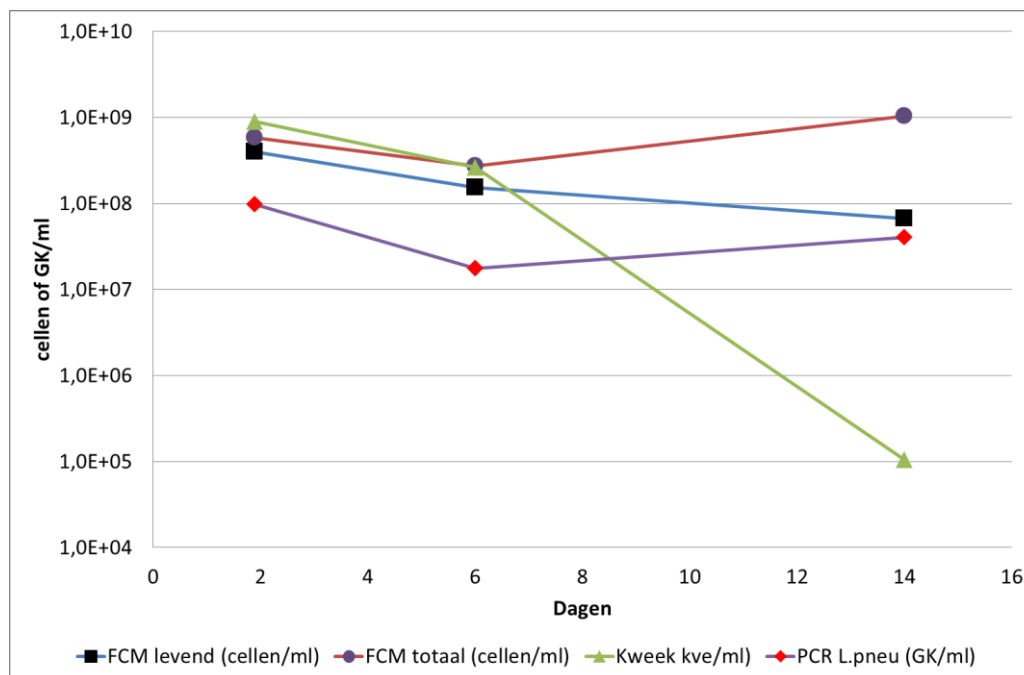
De resultaten van de verschillende detectiemethoden (qPCR versus FCM (levend en totaal), qPCR versus kweek en kweek versus FCM levend) verschillen aanzienlijk gedurende de verschillende groeifasen.

Op basis van de waargenomen verschillen is het vrijwel niet mogelijk de uitkomsten van de verschillende detectiemethode met een (vaste) factor te corrigeren. Elke detectiemethode geeft een ander kwantitatief inzicht van de *Aeromonas*-populatie in het monster.

3.2.3 *L. pneumophila*

De groei-experimenten met *L. pneumophila* zijn deels mislukt door een hardnekkige besmetting tijdens de opkweek van *L. pneumophila* stam ATCC35289. Stam ATCC35289 is geselecteerd voor dit onderzoek omdat in eerder onderzoek is gebleken dat deze stam in rijk-medium als losse cellen voorkomt en niet zoals gebruikelijk filamenteus. Voor een betrouwbare FCM analyse kunnen filamenteuze cellen niet worden gebruikt. Waarschijnlijk is de ingevroren cultuur van deze specifieke stam niet vrij van andere bacteriën, waardoor het niet lukt om een reïncultuur van stam ATCC35289 op te kweken. Binnen andere projecten worden altijd andere *L. pneumophila* stammen gebruikt, die dit probleem niet hebben, maar deze stammen groeien filamenteus.

In het eerste experiment is de voorkweek en het groei-experiment gestart met een zeer hoge cel-concentratie. Het gevolg was dat er in de culturen geen groei meer heeft plaatsgevonden en dat alleen de stationaire - en afstervende groeifase konden worden bemonsterd (Figuur 7). Ook bij *L. pneumophila* gaat de afname van kweekbare cellen niet parallel met de afname van 'levende' cellen in de FCM analyse.



FIGUUR 7: VERLOOP VAN DE *L. PNEUMOPHILA* CULTUUR GEMETEN MET FCM, KWEKMETHODE EN QPCR IN EXPERIMENT 1

Opvallend is dat in de geanalyseerde monsters de het aantal gekwantificeerd cellen met FCM tot ruim een log-waarde hoger is dan het aantal DNA genkopieën bepaald met qPCR (Tabel 7). Ook ten opzichte van de kweekmethode is het aantal genkopieën in twee van de

drie geanalyseerde monsters lager. Gezien bovenstaande resultaten van *E. coli* en *Aeromonas* is dit onwaarschijnlijk. Ook de ervaring die bij KWR is opgedaan met het toepassen van de qPCR en kweekmethode heeft geleerd dat de kwantitatieve qPCR resultaten in (vrijwel) alle geanalyseerde monsters hoger is ten opzichte van de kweekmethode. Mogelijk heeft er ook in dit experiment een besmetting plaatsgevonden dat heeft geresulteerd in hogere FCM resultaten. Een andere mogelijkheid is dat er een fout is gemaakt bij het inzetten in de qPCR analyses.

TABEL 7: KWANTITATIEF DETECTIERESULTAAT VAN GROEIPROEFMONSTERS MET *L. PNEUMOPHILA* VAN FCM RESULTATEN TEN OPZICHTE VAN DE KWEEK- EN QPCR-METHODE RESULTATEN (LOG GETRANSFORMEERDE WAARDEN)

	Dagen	Groefase*	qPCR/			Kweek/
			FCM totaal	FCM levend	kweek	FCM levend
Exp. 1	1,9	stationair	0,2	0,3	0,1	2,3
	6	stationair	0,06	0,1	0,07	1,7
	14	afstervend	0,04	0,6	386	0,002

*,groefase is gebaseerd op groeicurve kweekmethode

In de resterende experimenten (2,3,4 en 5) is het ondanks alle inspanning niet gelukt om een voorkweek te groeien zonder besmetting van een ander bacterie. Door de relatief trage groei van *L. pneumophila* zal deze bacterie geen kans hebben te groeien in een doorkweek als er een besmetting van een snel groeiende bacterie aanwezig is. Ook de celtelling is bij een besmetting niet betrouwbaar.

4 Conclusies en aanbevelingen

4.1 Conclusies

- De Digitale droplet PCR methodiek voor detectie van *E. coli*, *L. pneumophila* en *Aeromonas* sp. is geoptimaliseerd en beschikbaar;
- DNA kalibratiesuspensies voor *E. coli*, *L. pneumophila* en *Aeromonas* sp. zijn ontwikkeld en zeer nauwkeurig gekwantificeerd met behulp van de ddPCR.;
- Het verloop van de groeicurven van *E.coli* en *Aeromonas* gemeten met de qPCR, FCM en kweekmethode vertoont grote overeenkomsten gedurende de exponentiële en stationaire fase.;
- In groei-experimenten met *E.coli* WR1 en *Aeromonas* stam M 800 is aangetoond dat tijdens de logaritmische en stationaire groeifase de kwantitatieve qPCR resultaten met 1-2 (*E. coli*) of 2-3 (*Aeromonas*) logeenheden beduidend hoger zijn in vergelijking met de FCM telling (totaal en levend) en kweekmethode. In de afstervende fase zijn de kwantitatieve resultaten van de qPCR vrijwel gelijk met het totaal aantal cellen geteld met de FCM, maar niet met het totaal aantal membraanintacte cellen (FCM) en kweekbare cellen (agarmethode);
- De experimenten met *L. pneumophila* zijn door een hardnekkige besmetting in de groei-experimenten mislukt;
- De meest waarschijnlijke (deel)verklaring voor de hogere meetwaarde van de qPCR-methode tijdens de logaritmische en stationaire groeifase is het voorkomen van meerdere genoomkopieën tijdens de relatief snelle groei van *E. coli* en *Aeromonas*;
- De groeifase waarin een bacteriecultuur of cel zich bevindt beïnvloed in sterke mate het verschil in aantallen die gemeten worden met de qPCR, FCM of kweekmethode.

4.2 Aanbevelingen

De qPCR-detectie is een betrouwbare en gevoelige methode om *E. coli*, *Aeromonas* en *L. pneumophila* kwantitatief in water aan te tonen. De kwantitatieve resultaten uitgedrukt in DNA gen kopieën zijn echter in sommige situaties hoger ten opzichte van de kweekmethode en FCM telling. Dit verschil kan onder andere verklaard worden door (1) het ontstaan van cellen in een zogenaamde cellen in een “viable but non culturable” staat tijdens de afstervende fase van een bacteriecultuur en (2) de aanwezigheid van meerdere genoom (DNA)kopieën in een cel tijdens de snelle groeifase. Doordat het aantal gedetecteerde genkopieën met qPCR hoger is, dan het aantal gedetecteerde cellen met FCM of kweek, is de detectiegrens voor qPCR lager dan voor celtellingen. Toepassing van de qPCR detectiemethode in de praktijk kan dus gevoeliger specifieke micro-organismen detecteren in de drinkwatermonsters. Vanwege de gevoeligheid en snelheid van de methode, wordt daarom aanbevolen om de discussie met de wetgever aan te gaan om deze qPCR-methoden ook wettelijk verankert te krijgen.

Indien het noodzakelijk is om alleen de aanwezigheid van actieve/levende bacteriecellen in een monster te bepalen zou implementatie van een methode die messenger RNA (mRNA) detecteert in plaats van (genomisch) DNA mogelijk een oplossing kunnen zijn. Aanvullend onderzoek is echter nog nodig om de betrouwbaarheid van mRNA detectie in watermonsters te achterhalen.

5 Literatuur

Anonymous (2012) ISO12869:2012: Detection and quantification of Legionella spp. and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR). ISO standard;

Bremer, H., Dennis, P. P. 1996 Modulation of chemical composition and other parameters of the cell by growth rate. Neidhardt, et al. eds. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, 2nd ed. chapter 97 Table 2

Ditommaso, S., E. Ricciadi, M. Giacomuzzi, S. R. Arauco Rivera and C.M. Zotti. 2015. Legionella in water samples: How can you interpret the results obtained by quantitative PCR? Molecular and cellular probes 29 7-15;

Helmstetter, C. E. 1967. Chromosome Replication and the Division Cycle of *Escherichia coli* B/r. *J. Mol. Biol.* (1968) 31, 619-644;

Heijnen, L., and G. Medema. 2009. Method for rapid detection of viable *Escherichia coli* in water using real-time NASBA. *Water Res* 43:3124-3132;

Wullings, B., R. Italiaander en P. van der Wielen. 2016. Onderscheid tussen dode en levende bacteriën door EMA of PMA en detectie met qPCR. BTO 2015.074.

Experiment 1

TABEL 5: ANALYSERESULTATEN VAN DE VERSCHILLENDE DETECTIEMETHODEN NA INCUBATIE VAN OPHOPINGSBROEVEN MET *AEROMONAS*, *E. COLI* EN *L. PNEUMOPHILA*

Bacteriesoort	Incubatietijd (uren)	FCM				Kweek (kve/ml)	qPCR (gk/ml)		
		Totaal	levend (cellen/ml)	Dood	(%) Dood		<i>L. pneumophila</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>E.coli</i>
<i>Aeromonas</i>	14,0	7,4E+08	7,2E+08	2,6E+07	3,5	1,2E+09		7,0992E+10	
<i>Aeromonas</i>	21	1,4E+09	1,4E+09	1,5E+07	1,1	6,9E+08		3,1282E+10	
<i>Aeromonas</i>	38	1,0E+09	2,3E+08	7,9E+08	77,5	<1,0E+05		7,3538E+10	
<i>L. pneumophila</i>	44	5,8E+08	4,0E+08	1,8E+08	31,5	9,0E+08	9,8E+07		
<i>L. pneumophila</i>	141	2,8E+08	1,5E+08	1,2E+08	44,7	2,6E+08	1,8E+07		
<i>L. pneumophila</i>	336	1,0E+09	6,7E+07	9,6E+08	93,4	1,1E+05	4,1E+07		
<i>E.coli</i>	4	7,7E+08	7,6E+08	8,8E+06	1,1	1,2E+08			1,3E+10
<i>E.coli</i>	9,5	7,4E+08	7,0E+08	3,9E+07	5,2	1,2E+09			3,0E+10
<i>E.coli</i>	24	7,9E+08	7,7E+08	1,6E+07	2,0	1,1E+09			4,6E+10
<i>E.coli</i>	48	7,0E+08	6,8E+08	2,0E+07	2,8	1,1E+09			5,2E+10
<i>E.coli</i>	192	3,4E+09	1,0E+08	3,3E+09	97,1	3,5E+07			5,5E+09

Experiment 2

TABEL 5: ANALYSERESULTATEN VAN DE VERSCHILLENDE DETECTIEMETHODEN NA INCUBATIE VAN OPHOPINGSPROEF MET *AEROMONAS*

Bacteriesoort	Incubatietijd (uren)	FCM				Kweek (kve/ml)	qPCR		
		Totaal	levend (cellen/ml)	Dood	(%) Dood		<i>L. pneumophila</i>	<i>Aeromonas</i> (gk/ml)	<i>E.coli</i>
<i>Aeromonas</i>	1	3,8E+03	< 1000	3,6E+03	95,8	4,5E+03		2,5E+06	
<i>Aeromonas</i>	8	8,6E+03	4,6E+03	4,0E+03	46,2	7,1E+04		4,7E+07	
<i>Aeromonas</i>	12	1,9E+07	1,9E+07	<1000	<0,5	3,0E+07		2,4E+09	
<i>Aeromonas</i>	24	8,1E+08	7,9E+08	2,3E+07	2,9	1,5E+09		2,7E+10	
<i>Aeromonas</i>	48	7,1E+08	6,7E+08	4,3E+07	6,1	3,1E+08		3,4E+10	
<i>Aeromonas</i>	168	9,9E+09	4,0E+09	5,9E+09	60,0	<3,3E+05		2,3E+10	

Experiment 3

TABEL 5: ANALYSERESULTATEN VAN DE VERSCHILLENDE DETECTIEMETHODEN NA INCUBATIE VAN OPHOPINGSPROEF MET *E. COLI*

Bacteriesoort	Incubatietijd (uren)	FCM				Kweek (kve/ml)	qPCR (gk/ml)		
		Totaal	levend	Dood	(%) Dood		<i>L. pneumophila</i>	<i>Aeromonas</i>	<i>E.coli</i>
<i>E. coli</i>	2,0	1,6E+03	<1000	1,4E+03	90	6,3E+01			1,5E+03
<i>E. coli</i>	4,0	4,5E+03	1,5E+03	2,9E+03	65	1,3E+04			7,1E+05
<i>E. coli</i>	6,0	6,8E+04	6,6E+04	2,5E+03	4	7,5E+05			4,0E+07
<i>E. coli</i>	12,0	1,7E+08	1,7E+08	8,7E+05	1	2,7E+08			1,9E+10
<i>E. coli</i>	168	1,4E+09	8,7E+08	5,1E+08	37	3,7E+08			2,1E+10
<i>E. coli</i>	336	1,6E+09	7,4E+07	1,5E+09	96	8,3E+06			4,6E+09

Experiment 4

TABEL 5: ANALYSERESULTATEN VAN DE VERSCHILLENDE DETECTIEMETHODEN NA INCUBATIE VAN VOORKWEKEN EN OPHOPINGSPROEVEN MET *L. PNEUMOPHILA*

Nummer		tijd	datum	uren	dagen	FCM cellen/ml				Kweek kve/ml	qPCR kopien/ml	Opmerkingen
						FCM Totaal	FCM levend	FCM Dood	% Dood			
1210	1 +AB	11:30	3-2-2016	24	1	<1000	<1000	<1000		3,8E+02		Alle 10 +AB en 10-AB kolven helder
1211	2+ AB					<1000	<1000	<1000		3,2E+02		Blijkbaar geen besmetting opgetreden
1212	3+ AB					<1000	<1000	<1000		4,4E+02		verder met kolven 1 en 2 van - en +AB
1213	4+AB					<1000	<1000	<1000		4,2E+02		In kweek ook andere kolonies op plaat te zien (alle kolven)
1214	5+ AB					<1000	<1000	<1000		5,4E+02		
1215	1-AB					<1000	<1000	<1000		4,5E+02		
1216	2-AB					<1000	<1000	<1000		4,8E+02		
1281	1 +AB	11:30	4-2-2016	48	2	<1000	<1000	<1000		Niet ingezet na overleg		Geen groei in de kolven, terwijl dit wel was verwacht
1282	2+ AB					<1000	<1000	<1000				Alleen -AB 2 enkele cellen
1283	1-AB					<1000	<1000	<1000				Alle 10 +AB en 10-AB kolven helder
1284	2-AB					<1000	<1000	<1000				
1362	1-AB	10:00	5-2-2016	72	3	1291	<1000	<1000		1,00E+04		FCM defect, getallen onbetrouwbaar
1363	2-AB					1,50E+07	1,42E+04	<1000		besmetting		Kolf -AB 2 troebel, overige helder
1364	1 +AB					<1000	<1000	<1000		1,7E+01		Kweek allen 0 ingezet+ reinstrijk -AB 1 en 2. (resultaat geschat)
1365	2+ AB					<1000	<1000	<1000		6,7E+00		1 -AB =Legionella, 2-AB = besmetting
1450	1-AB		8-2-2016		6	6,7E+08	6,4E+08	3,5E+07	5,2	0,0E+00		Kolf -AB 1t/m5 troebel (Roze stop!) overige helder Geen leg meer op de plaat alleen gele kolonies
1485	1-AB		10-2-2016		8	1,0E+09	9,3E+08	8,4E+07	8,3	0,0E+00		Kolf -AB 1t/m5 troebel (Roze stop!) overige helder. -AB 3t/m reingestroken
			16-2-2016		14							

Experiment 5

Plan *van aanpak*

Legionella stam blijkt opnieuw niet rein. Duplo erlenmeyers beiden op dag 1 al troebel. Dit kan geen legionella groei zijn. Blanco Media wel helder. Vermoeden dat de stam niet rein te strijken valt op (selectief) BCYE, en contaminerende stam(men) niet zichtbaar mee blijven groeien. Experiment herhalen met onderstaande aanpassingen:

MEDIUM

Toe te voegen oplossingen door tol filter halen

100 ml erlenmeyers 1 dag van te voren uitvullen en in de 37C stoof plaatsen

Alle werkzaamheden in de flowkast uitvoeren

Met en zonder AB

KOLONIE SUSPENSIE

Cultuur (s9) opnieuw reinstrijken op BCYE en BCYE +AB (meerdere platen)

Reine kolonies checken onder de binocular

Kolonie suspensie maken (ster.leidingwater)

Conc. bepalen met FCM--> In geval van meerdere wolken, andere kolonie suspenderen

AANENTEN 10 X BCYE groot schudplateau in de 37C stoof

10 X BCYE +AB Conc 500 (levende)cellen /ml >> 1 ml 2,5E+04 in 50 ml medium

DAG 1 Kolven die troebel zijn laten afvallen

Niet troebel inzetten: 2x BCYE

5x BCYE+ AB

DAG 2 (Vermoedelijk hier eerste groei leg zichtbaar op FCM)

Kolven die geen toename laten zien (FCM) laten afvallen

Bij groei doorgaan met: 2x BCYE

2x BCYE+ AB

Dus maximaal voor de overige 3 dagen 4 monsters