



BTO 2018.016 | Januari 2018

BTO rapport

EMA/PMA-qPCR
methodeontwikkeling
voor de detectie van
infectieuze en niet-
infectieuze
Adenovirussen in water

BTO

EMA/PMA-qPCR methodeontwikkeling voor de detectie van infectieuze en niet-infectieuze Adenovirussen in water

BTO 2018.016 | Januari 2018

Opdrachtnummer

400554-212

Projectmanager

Stefan Kools

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Nieuwe meetmethoden en sensing

Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

Auteurs

Nikki van Bel, Leo Heijnen, Anita van der Veen

Verzonden aan

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is na één jaar openbaar.

Jaar van publicatie
2018

Meer informatie
dr. Nikki van Bel
T 030-6069516
E Nikki.van.Bel@kwrwater.nl

Keywords
Adenovirus, EMA, PMA, qPCR

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

The logo for KWR (Watercycle Research Institute) features the letters 'KWR' in a bold, blue, sans-serif font. The 'K' and 'W' are connected, and the 'R' is slightly separated.

Watercycle
Research
Institute

BTO 2018.016 | Januari 2018 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

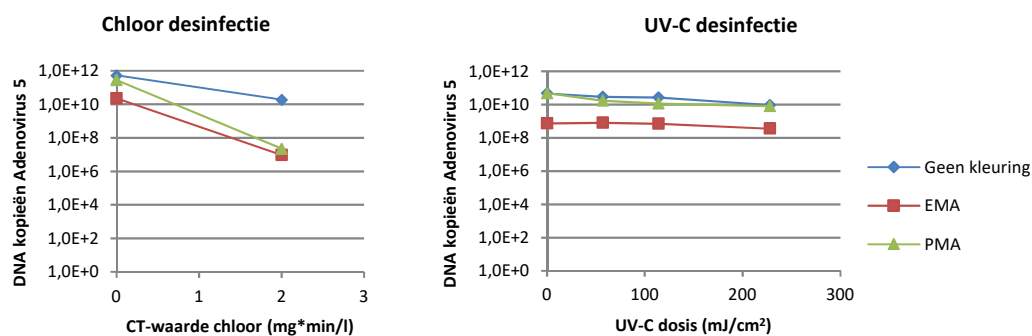
Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

BTO Managementsamenvatting

Moleculaire techniek EMA/PMA-qPCR niet geschikt om alleen infectieuze Adenovirussen te detecteren in water

Auteurs Nikki van Bel, Leo Heijnen

Een nieuwe moleculaire techniek, de EMA/PMA-qPCR, lijkt niet geschikt om infectieuze van niet-infectieuze Adenovirusdeeltjes te onderscheiden en zo mogelijk de Enterovirusanalyse te vervangen in de verplichte Analyse Microbiologische Veiligheid Drinkwater (AMVD). Adenovirus is een humaan pathogeen virus dat algemeen voorkomt in huishoudelijk afvalwater en in oppervlaktewater en is zeer resistent tegen UV desinfectie. Daarom speelt de vraag of Adenovirus het referentievirus zou moeten zijn, in plaats van Enterovirus (het huidige referentievirus), voor het ontwerp van veilige watersystemen. Recent is een snelle, goedkope moleculaire methode, de EMA/PMA-qPCR, gepubliceerd om infectieuze van niet-infectieuze Adenovirussen te onderscheiden. Uit dit onderzoek blijkt echter dat op onbehandeld oppervlaktewater, of bij UV-C desinfectie, een EMA of PMA voorbehandeling geen meerwaarde heeft boven de conventionele qPCR. Na chloordesinfectie geeft deze voorbehandeling wel een betere schatting van het aantal infectieuze virusdeeltjes vergeleken met de kweekmethode waarmee alleen infectieuze virusdeeltjes worden aangetoond. In het algemeen wordt met de EMA/PMA-qPCR echter het aantal infectieuze virusdeeltjes overschat omdat nog steeds zowel infectieuze als niet-infectieuze virusdeeltjes worden gemeten. Dit kan leiden tot onterechte, dure overdimensionering van drinkwaterzuiveringssystemen.



Desinfectie van Adenovirus 5 met chloor en UV-C en de mate waarin de afdoding van het virus wordt gedetecteerd door gebruik van de stoffen EMA en PMA in de qPCR.

Belang: Snelle en goedkope techniek om concentratie Adenovirus in water te bepalen

Adenovirus is een humaan pathogeen virus dat algemeen voorkomt in huishoudelijk afvalwater en in oppervlaktewater waar het afvalwater op wordt geloosd. Via water kan Adenovirus infecties veroorzaken bij de mens. Adenovirus komt voor in hogere concentraties in rioolwater en is zeer

resistent tegen UV desinfectie. Daarom speelt de vraag of Adenovirus het referentievirus zou moeten zijn, in plaats van Enterovirus (het huidige referentievirus), voor het ontwerp van veilige watersystemen. Hiervoor zijn betrouwbare Adenovirus analysemethoden en meetgegevens over Adenovirussen in ruw water nodig.

Er is bij KWR een qPCR methode beschikbaar voor Adenovirus type 40/41 (de wateroverdraagbare humane enterale adenovirustypen), maar deze overschat de concentratie van infectieuze Adenovirusdeeltjes in water omdat zowel infectieuze als niet-infectieuze virusdeeltjes worden gemeten. Dit kan leiden tot onterechte, dure overdimensionering van drinkwaterzuiveringssystemen.

Recente gegevens wijzen uit dat er in ruw water van Evides hogere concentratie Adenovirus aanwezig zijn dan Enterovirussen. Daarnaast is recent een snellere en goedkopere qPCR methode ontwikkeld die met behulp van de stoffen EMA en PMA beter onderscheid zou kunnen maken tussen infectieuze en niet-infectieuze virusdeeltjes. Of de methode toepasbaar is op Adenovirus in oppervlaktewater is niet bekend.

Aanpak: Adenovirus in verschillende condities blootstellen aan EMA of PMA gevolgd door qPCR.

Adenovirus 5 is gedoseerd aan steriel drinkwater en behandeld met UV-C straling en chloor desinfectie. Na blootstelling aan EMA of PMA is de qPCR uitgevoerd.

Daarnaast is Adenovirus 5 gedoseerd aan geconcentreerd oppervlaktewater om een mogelijk storende effect op EMA en PMA vast te kunnen stellen.

Resultaten: EMA en PMA verbeteren qPCR in het onderscheiden van infectieuze en niet-infectieuze virusdeeltjes na chloordesinfectie.

Een voorbehandeling van watermonsters met EMA of PMA geeft een betere schatting van het aantal

infectieuze Adenovirusdeeltjes als er een chloordesinfectie is toegepast.

Op onbehandeld oppervlaktewater of bij UV-C desinfectie heeft de EMA of PMA voorbehandeling geen meerwaarde en zijn de resultaten vergelijkbaar met de conventionele qPCR. Het aantal infectieuze virusdeeltjes wordt hierbij overschat.

Geconcentreerd oppervlaktewater lijkt de werking van EMA en PMA niet of in beperkte mate te remmen. Vervolgonderzoek is echter nodig om dit uit te sluiten.

Implementatie: EMA/PMA-qPCR niet geschikt voor bepalen infectieuze Adenovirussen in water.

Het vermogen van EMA en PMA om infectieuze van niet-infectieuze Adenovirussen te onderscheiden is laag wanneer de virussen bestraald zijn met UV. Bij chloor lijken de EMA en PMA kleuring beter te presteren, en het effect van andere zuiveringsprocessen is nog niet onderzocht. Voorlopig wordt daarom aanbevolen om de hier beschreven EMA/PMA-qPCR methode voor Adenovirussen niet in te zetten als mogelijke vervanging voor de enterovirussen in het kader van de AMVD. Hiervoor is uitgebreid verder onderzoek noodzakelijk.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport *EMA/PMA-qPCR methodeontwikkeling voor de detectie van infectieuze en niet-infectieuze Adenovirussen in water* (BTO-2018.016).

Inhoud

Inhoud	2
1 Inleiding	3
1.1 Aanleiding	3
1.2 Onderzoeksvraag	4
2 Materiaal en methoden	5
2.1 Adenovirus 5 virus	5
2.2 UV en chloordesinfectie van Adenovirus 5 in drinkwater	5
2.3 EMA en PMA behandeling van Adenovirus 5 in drinkwater	5
2.4 EMA en PMA behandeling van Adenovirus 5 in oppervlaktewater	6
2.5 qPCR, primers, probes	6
2.6 Celkweek-PCR	7
3 Resultaten en discussie	8
3.1 UV- en chloordesinfectie van Adenovirus 5 in drinkwater	8
3.2 Effect van watermatrix op EMA- en PMA-kleuring van Adenovirus 5	11
4 Conclusies en aanbevelingen	17
4.1 Conclusies	17
4.2 Aanbevelingen	17
5 Referenties	18

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

Adenovirus is een humaan pathogeen virus dat algemeen voorkomt in huishoudelijk afvalwater en in oppervlaktewater waar het afvalwater op wordt geloosd. Via water kan Adenovirus infecties veroorzaken bij de mens. Adenovirus komt voor in hogere concentraties in riool- en rivierwater (10^3 - 10^5 DNA kopieën/l; BTO 2011.010 en BTO 2013.012) en is zeer resistent tegen UV desinfectie. Daarom speelt zowel nationaal (in de Werkgroep Infectierisico) als internationaal (US EPA, Australische en ontwikkeling van Europese hergebruikrichtlijnen) de vraag of Adenovirus een referentievirus zou moeten worden voor het ontwerp van veilige watersystemen. Om te kunnen beoordelen of Adenovirus geschikter is als referentievirus dan Enterovirus, zijn betrouwbare Adenovirus analysemethoden en meetgegevens over Adenovirussen in ruw water nodig.

Bij KWR is een qPCR methode beschikbaar voor Adenovirus type 40/41 (de wateroverdraagbare humane enterale adenovirustypen), maar deze overschat de concentratie van infectieuze Adenovirusdeeltjes in water omdat zowel infectieuze als niet-infectieuze virusdeeltjes worden gemeten (BTO 2011.010). Dit zou kunnen leiden tot onterechte, dure overdimensionering van drinkwaterzuiveringssystemen. Sinds de totstandkoming van het vijfjarenprogramma van het thema Nieuwe Meetmethoden en Sensoring is er een kweekmethode voor (non-enterale) Adenovirussen beschikbaar gekomen bij het RIVM. Daarmee zijn gegevens verzameld over het voorkomen van infectieuze Adenovirussen in ruw water van Evides, die aangeven dat de concentratie infectieuze Adenovirussen in ruw water hoger is dan voor infectieuze Enterovirussen (de huidige referentievirusgroep). Daarnaast is er in Duitsland recent een qPCR-methode ontwikkeld die specifiek is voor infectieus Adenovirus. Met behulp van EMA (ethidium monoazide) en/of PMA (propidium monoazide) zou onderscheid gemaakt kunnen worden tussen virussen met een intact en niet-intact membraan of capsid. Het Adenovirus heeft een intact capsid nodig om te overleven en mensen te kunnen infecteren, bij beschadiging van het capsid kan het virus zijn infectiviteit verliezen. EMA en PMA kunnen bij een niet-intact capsid het virusdeeltje ingaan, daar aan het DNA binden en zorgen voor crosslinking van het DNA. Hierdoor is detectie van deze DNA-moleculen met qPCR niet meer mogelijk. Als een virusdeeltje een niet-intact capsid heeft (en daardoor niet-infectieus is), zal het DNA dus niet gedetecteerd worden met de qPCR. De eerste resultaten laten zien dat de metingen met EMA/PMA-qPCR beter overeenkomen met de Adenovirus-celkweekmethode dan de normale qPCR (Leifels, 2015). Na inactivatie met hitte, UV of chloor wordt met de celkweekmethode respectievelijk ongeveer 5 log, 3 log en 6 log inactivatie gemeten, terwijl met de normale qPCR geen inactivatie kan worden aangetoond. Met de EMA/PMA-qPCR wordt ongeveer 3 log, 1 log en 3 log inactivatie gemeten.

De EMA/PMA-qPCR laat dus na afdoding door verhitting, chloor of UV-desinfectie wel beduidend meer inactivatie zien dan de reguliere qPCR, maar niet in dezelfde mate als de celkweekmethode. Na een dergelijke behandeling zouden Adenovirussen nog steeds in beperkte mate gedetecteerd worden, waardoor de concentratie infectieus Adenovirus mogelijk onterecht te hoog zou worden ingeschat. Of dit ook het geval is voor Adenovirus die geen behandeling zijn ondergaan anders dan lozing en verblijf in oppervlaktewater, is niet bekend en mogelijk is optimalisatie van de methode nodig. Het voordeel van de EMA/PMA-qPCR methode is dat deze beduidend minder bewerkelijk en duur is vergeleken met de celkweekmethode.

1.2 Onderzoeksvraag

Is de EMA/PMA-qPCR methode toepasbaar voor detectie van infectieuze Adenovirussen in drinkwater en geconcentreerd oppervlaktewater?

2 Materiaal en methoden

2.1 Adenovirus 5 virus

De Adenovirus 5 stock die voor deze experimenten is gebruikt, is afkomstig van Mats Leifels van de Ruhr Universiteit Bochum. Dit virus is opgegroeid zoals beschreven in Leifels, 2015. Hiervoor zijn 293T cellen in een kweekfles opgegroeid in DMEM medium met 10% FBS (Fetal Bovine Serum) en 1% penicilline-streptomycine. Adenovirus 5 is gedoseerd aan een confluente laag cellen en na 60-90 minuten is DMEM medium toegevoegd. De geïnfecteerde cellen produceren virus dat vrij komt in het medium. Na enkele dagen is dit medium geogst, zijn cellen en celrestanten verwijderd en is de virusstock ingevroren bij -80°C.

2.2 UV en chloordesinfectie van Adenovirus 5 in drinkwater

Adenovirus 5 is verdund in steriel drinkwater waaraan natriumhypochloriet is toegevoegd tot een concentratie van 2 mg/l vrij chloor. De pH van het water tijdens de chloordesinfectie was 8,0 – 8,1. Na 1 minuut incubatie bij kamertemperatuur is het chloor geneutraliseerd door natriumthiosulfaat toe te voegen tot een concentratie van 30 mg/l. De chloorconcentratie is met indicatorstrips (0 – 10 mg/l, Hach-Lange) gemeten in het drinkwater met daarin de virussuspensie. De meting is meteen na toevoeging van chloor, na 1 minuut incubatie en na neutralisatie uitgevoerd. Vanwege het kleine volume waarin de desinfectiereacties zijn uitgevoerd, is de concentratie vrij chloor gecontroleerd met indicatorstrips en niet met de nauwkeurigere fotometrische cuvettest.

De virusoplossingen zijn bewaard bij -80°C en later gebruikt voor de EMA- en PMA-behandeling voorafgaand aan de qPCR analyse of voor de celkweekmethode.

In een collimated beam opstelling is Adenovirus 5 bestraald met UV-C licht. Hiervoor is 50 µl Adenovirus 5 ($4,4 \times 10^7$ virusdeeltjes) toegevoegd aan 35 ml steriel leidingwater. Deze oplossing is in een petrischaaltje op ijs onder een UV-C lamp (254 nm) geplaatst en bestraald gedurende 30, 60 en 90 seconden. De UV-dosis is gelijk aan 57 mJ/cm², 114 mJ/cm² en 228 mJ/cm². De UV-dosis en intensiteit van de lamp tijdens de bestraling is met sensoren gecontroleerd. De virusoplossing is in porties van 5 ml ingevroren en later gebruikt voor de EMA- en PMA-behandeling of de celkweekmethode.

2.3 EMA en PMA behandeling van Adenovirus 5 in drinkwater

Van zowel EMA (ethidium monoazide) als PMA (propidium monoazide) is een 10 mM stockoplossing gemaakt en bewaard bij -20°C. Hiervoor is 1 mg PMA toegevoegd aan 195,7 µl DMSO, en 5 mg EMA toegevoegd aan 1190 µl DMSO. Van deze stock is 3 µl toegevoegd aan 300 µl watermonster en het monster is op ijs, in het donker, geïncubeerd gedurende 30 minuten. In deze periode kunnen EMA en PMA door openingen in het capsid van het virus hechten aan het DNA. Het watermonster is in de Phast Blue lamp gedurende 15 minuten belicht (50 - 60 Hz, 60 W). Door de belichting worden de EMA en PMA moleculen gecrosslinkt aan het DNA. Het DNA is geïsoleerd met de Power Biofilm Kit van Sanbio volgens protocol LMB-069.

2.4 EMA en PMA behandeling van Adenovirus 5 in oppervlaktewater

Om een mogelijk storend effect van de watermatrix op de EMA en PMA behandeling te onderzoeken, is de procedure uit paragraaf 2.3 toegepast op geconcentreerd oppervlaktewater waaraan Adenovirus 5 is gedoseerd. Hiervoor is 100 liter water uit het Lekkanaal bemonsterd en geconcentreerd met hemoflow en centricon tot 11 ml concentraat. Aan 5 ml van dit concentraat is 100 µl Adenovirus 5 ($8,8 \times 10^7$ virusdeeltjes) gedoseerd. Het mengsel is 1 uur geïncubeerd om hechting van het virus aan aanwezige deeltjes mogelijk te maken. Vervolgens is dit concentraat verdund met steriel drinkwater (zonder dosering van Adenovirus, kolommen in Tabel 1) of verdund in dezelfde watermatrix (rijen in Tabel 1). Daarnaast is aan 5 ml steriel drinkwater 100 µl Adenovirus 5 gedoseerd en is deze verdund in steriel drinkwater (laatste kolom, Tabel 1).

TABEL 1. VERDUNNINGSREEKS VAN CONCENTRAAT MET DAARAAN GEDOSEERD ADENOVIRUS 5. VERTICAAL IS DE VERDUNNING VAN HET MONSTER IN DEZELFDE WATERMATRIX GEGEVEN. HORIZONTAAL IS DE VERDUNNING VAN CONCENTRAAT IN DRINKWATER GEGEVEN.

Verdunningsfactor in de eigen watermatrix	Lekkanaalwaterconcentraat (ml) : drinkwater (ml)			
	1,0 : 0	0,65 : 0,35	0,35 : 0,65	0 : 1,0
1:1	X	X	X	X
1:10	X	X	X	X
1:100	X	X	X	X

Aan 300 µl concentraat uit Tabel 1 is 3 µl 10 mM EMA of PMA toegevoegd (eindconcentratie 100 µM) en geïncubeerd op ijs gedurende 30 minuten. Daarna zijn de monsters belicht met de Phast Blue en is het DNA geïsoleerd met de Power Biofilm Kit van Sanbio volgens protocol LMB-069.

2.5 qPCR, primers, probes

Voor de qPCR zijn primers gebruikt zoals beschreven in Tabel 2 en Leifels, 2016.

TABEL 2. NUCLEOTIDENSEQUENTIE VAN DE PROBE EN PRIMERS OM ADENOVIRUS 5 VOOR DE QPCR.

Probe	HAdV P	Sequentie
Forward primer	AQ 1	[6FAM] TGC ACC AGA CCC GGG CTC AGG TAC TCC GA GCC ACG GTG GGG TTT CTA AAC TT
Reverse primer	AQ 2	GCC CCA GTG GTC TTA CAT GCA CAT C

Het volgende qPCR programma is gebruikt:

- 15 min., 95°C
- 15 sec., 95°C
- 60 sec., 60°C
- 5 sec., 78°C

Er zijn 45 cycli uitgevoerd.

2.6 Celkweek-PCR

Van een aantal watermonsters (onbehandeld, UV, chloor) is door het RIVM (Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie) het aantal infectieuze virusdeeltjes bepaald. De celkweek-PCR methode die hiervoor is gebruikt, is een MPN methode. De methode is een combinatie van celkweek, waarbij een cellaag geïnfecteerd wordt met het watermonster, en PCR, waarmee vastgesteld wordt of Adenovirus aanwezig is in de celkweek. Van het watermonster worden decimale verdunningen gemaakt die in twee- of viervoud worden toegevoegd aan de cellaag. Gebaseerd op het aantal positieve celkweken en de verdunning wordt de concentratie berekend. De resultaten worden uitgedrukt in het aantal Infectieuze PCR Detecteerbare Eenheden per liter (IPDE/liter).

3 Resultaten en discussie

3.1 UV- en chloordesinfectie van Adenovirus 5 in drinkwater

De Adenovirus qPCR met EMA of PMA kleuring is opgezet door Mats Leifels van de Ruhr Universiteit Bochum (Leifels, 2015). Bij KWR is een qPCR beschikbaar voor de Adenovirus typen 40 en 41, maar de EMA en PMA kleuring is opgezet voor Adenovirus type 5. Om na te gaan of met deze nieuwe methode bij KWR dezelfde resultaten worden behaald als in bovengenoemd artikel, is ervoor gekozen om met Adenovirus 5 de eerste experimenten uit te voeren. Eerst is het experiment uit bovengenoemd paper herhaald, daarna is een mogelijk remmend effect van geconcentreerd oppervlaktewater op de werking van EMA, PMA en de qPCR met hetzelfde Adenovirus 5 onderzocht.

Aan steriel drinkwater is een hoge concentratie Adenovirus 5 gedoseerd zodat een verwachte log afdoding van 6 log zichtbaar gemaakt kan worden. Dit watermonster is bestraald met UV-C licht (0 – 228 mJ/cm²) of gedesinfecteerd met chloor (0 – 2 mg*min/l). Deze watermonsters zijn geïncubeerd zonder kleurstof, of met de kleurstof EMA of PMA. Na de DNA isolatie is de qPCR uitgevoerd. Deze qPCR-resultaten zijn onderling vergeleken en ook met de resultaten van de celkweek-PCR uitgevoerd door het RIVM.

Het aantal DNA kopieën van het onbehandelde watermonster (0 mJ UV/cm² en 0 mg chloor*min/l in Tabel 3) varieert tussen de verschillende kleuringen (-, EMA of PMA in Tabel 3). Zonder EMA of PMA kleuring worden de meeste DNA kopieën gemeten, bij de EMA kleuring ligt het aantal DNA kopieën 1,4 – 1,8 log lager. PMA kleuring heeft nauwelijks effect en het aantal DNA kopieën is vergelijkbaar met de '-' condities zonder kleurstof. Het gekweekte Adenovirus 5 dat is toegediend aan het steriele drinkwater bevat naar verwachting zowel infectieuze als niet-infectieuze virusdeeltjes (onder andere veroorzaakt bij de viruskweek en door het invriezen en ontdooien van de virus stock). De EMA-kleuring lijkt dit verschil (gedeeltelijk) zichtbaar te maken, terwijl de PMA-kleuring dit nauwelijks doet. Vergelijking met de kweekresultaten laat zien dat het aantal DNA kopieën ongeveer 2 log hoger is dan het aantal infectieuze virusdeeltjes.

Desinfectie met chloor geeft een sterke daling van het aantal DNA kopieën. Zonder kleuring met EMA of PMA daalt het aantal waargenomen DNA kopieën met 1,5 log, bij dosering van EMA of PMA is deze afname van DNA kopieën groter (in totaal 3,4 en 4,1 log; Tabel 4 en Figuur 1). Chloor desinfectie beschadigt het virus capside zodat EMA en PMA aan het DNA kunnen hechten en zo de qPCR remmen, hierdoor worden minder DNA kopieën waargenomen in de qPCR. De kweekresultaten laten echter slechts een daling van het aantal kweekbare Adenovirussen van 2,5 log zien.

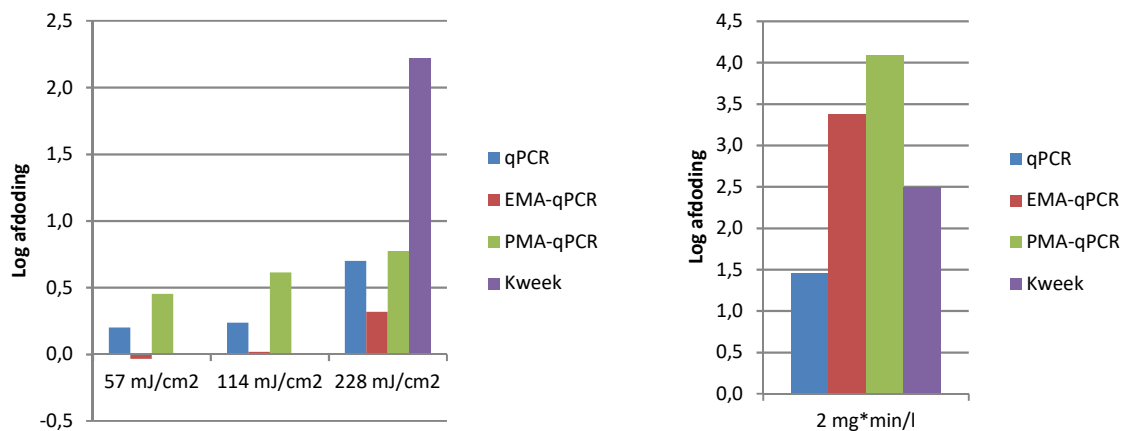
Desinfectie met UV-C straling heeft een zeer beperkt effect op het aantal DNA kopieën (Tabel 3). Met de conventionele qPCR, zonder kleurstof, wordt bij UV-C desinfectie met 57, 114 of 228 mJ/cm² slechts 0,2 – 0,7 log lager aantal DNA kopieën gemeten (Tabel 4 en Figuur 1). Dit is vergelijkbaar met wanneer het watermonster is geïncubeerd met EMA (0 – 0,3 log) of PMA (0,5 – 0,8 log; Tabel 4). De kweekresultaten laten echter een grotere afname van het aantal kweekbare virussen zien (2,2 log bij 228 mJ/cm²).

TABEL 3. UV- EN CHLOORDESINFECTIE VAN ADENOVIRUS 5. GEGEVEN IS HET AANTAL GENKOPIEËN/L EN IPDE/L. DE QPCR IS UITGEVOERD ZONDER (-), MET EMA OF MET PMA VOORBEHANDELING. HET BEPALEN VAN INFECTIEUZE ADENOVIRUSSEN IS GEGEVEN IN INFECTIEUZE PCR DETECTEERBARE EENHEDEN PER LITER (IPDE/L).

		qPCR (DNA kopieën/l)			Kweek (ipde/l)
		-	EMA	PMA	
UV	0 mJ/cm ²	4,6x10 ¹⁰	7,3x10 ⁸	4,7x10 ¹⁰	4,6x10 ⁸
	57 mJ/cm ²	2,9x10 ¹⁰	7,9x10 ⁸	1,7x10 ¹⁰	
	114 mJ/cm ²	2,7x10 ¹⁰	7,0x10 ⁸	1,2x10 ¹⁰	
	228 mJ/cm ²	9,2x10 ⁹	3,5x10 ⁸	8,0x10 ⁹	2,8x10 ⁶
Chloor	0 mg*min/l	5,3x10 ¹¹	2,3x10 ¹⁰	2,8x10 ¹¹	2,6x10 ⁹
	2 mg*min/l	1,9x10 ¹⁰	9,5x10 ⁶	2,2x10 ⁷	8,4x10 ⁶

TABEL 4. EFFECT VAN UV EN CHLOORDESINFECTIE VAN ADENOVIRUS 5 OP DE AFNAME VAN HET AANTAL DNA KOPIEËN OF INFECTIEUZE VIRUSSEN, IN LOG AFDODING. DE QPCR IS UITGEVOERD ZONDER (-), MET EMA OF MET PMA VOORBEHANDELING. HET BEPALEN VAN INFECTIEUZE ADENOVIRUSSEN IS GEGEVEN IN INFECTIEUZE PCR DETECTEERBARE EENHEDEN PER LITER (IPDE/L).

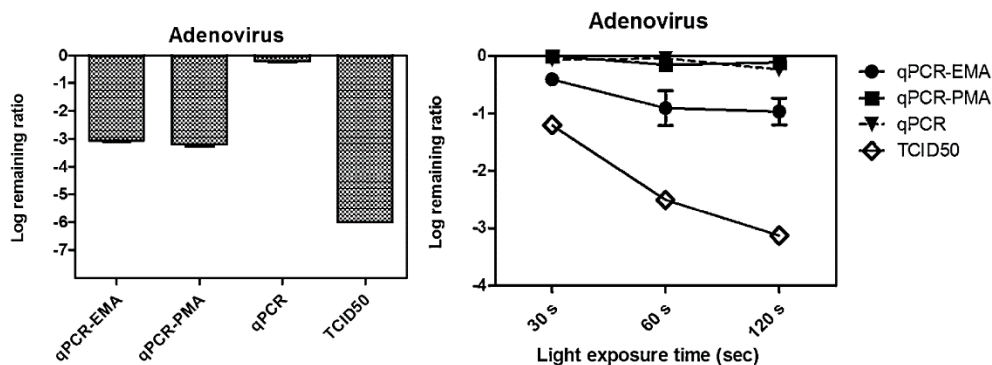
		Log afdoding door UV en chloordesinfectie			
		-	qPCR		Kweek
			EMA	PMA	
UV	0 mJ/cm ²				
	57 mJ/cm ²	0,2	0,0	0,5	
	114 mJ/cm ²	0,2	0,0	0,6	
	228 mJ/cm ²	0,7	0,3	0,8	2,2
Chloor	0 mg*min/l				
	2 mg*min/l	1,5	3,4	4,1	2,5



FIGUUR 1. EFFECT VAN UV EN CHLOORDESINFECTIE OP ADENOVIRUS 5 OP DE AFNAME VAN HET AANTAL DNA KOPIEËN OF INFECTIEUZE VIRUSSEN, IN LOG AFDODING. DE EXACTE AANTALLEN ZIJN GEGEVEN IN TABEL 4. DE QPCR IS UITGEVOERD ZONDER, MET EMA OF MET PMA VOORBEHANDELING. HET BEPALEN VAN INFECTIEUZE ADENOVIRUSSEN IS GEGEVEN IN INFECTIEUZE PCR DETECTEERBARE EENHEDEN PER LITER (IPDE/L).

De daling in het aantal waargenomen Adenovirus DNA kopieën, zoals gemeten met qPCR, na behandeling met chloor is vergelijkbaar met de literatuur. In Figuur 1 is de afdoding 1,5 log (geen kleuring), 3,4 log (EMA) en 4,1 log (PMA), terwijl in de literatuur ongeveer 3 log (EMA en PMA) of 0,5 log afdoding (geen kleuring) wordt aangetoond (Figuur 2, afkomstig uit Leifels, 2015). Met de kweek wordt in ditzelfde artikel echter een veel grotere daling van het aantal kweekbare Adenovirussen aangetoond (ongeveer 6 log), wat niet overeenkomt met de resultaten in dit onderzoek. Dit suggereert wel dat de kweekanalyse in dit onderzoek mogelijk een te hoog aantal virusdeeltjes is aangetoond wat leidt tot een minder grotere daling in log eenheden. Echter, de pH en chloorconcentratie tijdens en aan het einde van de desinfectiereactie kunnen de effectiviteit van chloor sterk beïnvloeden. De pH en eindconcentratie chloor bij de experimenten in Figuur 2 worden niet genoemd in het artikel waardoor vergelijking niet mogelijk is. Chloordesinfectie heeft een negatief effect op de integriteit van het virus capside waardoor EMA en PMA het virus-DNA kunnen bereiken en de qPCR remmen. Echter, het verschil in de daling, in log eenheden, van het aantal DNA kopieën met de EMA/PMA-qPCR en het aantal kweekbare virussen met de kweek laat zien dat niet van alle niet-infectieuze virusdeeltjes het capside zodanig beschadigd is dat de EMA of PMA behandeling effectief is.

Na UV-C bestraling daalt wel het aantal kweekbare Adenovirus 5 virusdeeltjes, maar het virus capside lijkt intact te blijven waardoor EMA en PMA het DNA niet kunnen bereiken. Deze resultaten komen redelijk overeen met het experiment uit Leifels, 2015 (Figuur 2 in dit rapport). Met de kweekmethode is er een daling van het aantal kweekbare virusdeeltjes van ongeveer 3 log, met de qPCR wordt slechts een 0 – 1 log lager aantal DNA kopieën gemeten. De qPCR methode met EMA of PMA kleuring lijkt daarom geen goede methode om het aantal infectieuze Adenovirusdeeltjes in water te bepalen als een deel hiervan mogelijk niet meer infectieus is door UV straling. Dit kan bijvoorbeeld drinkwater na UV desinfectie in de zuivering zijn, maar ook oppervlaktewater waarin Adenovirus geïnactiveerd kan worden door UV-straling van de zon.



FIGUUR 2. CHLOORDESINFECTIE VAN ADENOVIRUS 5 MET EEN CT-WAARDE VAN 2 MG*MIN/L (LINKS) EN UV DESINFECTIE VAN ADENOVIRUS 5 (RECHTS). EFFECTIVITEIT VAN DESINFECTIE IS BEPAALD MET QPCR, EMA-QPCR, PMA-QPCR EN DE KWEEKMETHODE GEBASEERD OP TCID50. 30, 60 EN 90 SECONDEN UV-STRALING KOMT OVEREEN MET 57, 114 EN 228 MJ/CM² UIT: LEIFELS, 2015.

Uit bovenstaande resultaten blijkt dat een voorbehandeling van het watermonster met EMA of PMA een betere schatting geeft van het aantal infectieuze deeltjes Adenovirus als er een chloor-desinfectie is toegepast. Echter, de EMA/PMA-qPCR resultaten geven nog steeds een hoger gehalte dan met de celkweek aan infectieuze virusdeeltjes wordt gemeten. Daarnaast heeft voor onbehandeld oppervlaktewater of bij UV-C desinfectie de EMA of PMA voorbehandeling geen meerwaarde en zijn de resultaten vergelijkbaar met de conventionele qPCR waarmee het aantal infectieuze virusdeeltjes wordt overschat.

3.2 Effect van watermatrix op EMA- en PMA-kleuring van Adenovirus 5

De voornaamste mogelijke toepassing van de EMA/PMA-qPCR is om het aantal infectieuze Adenovirusdeeltjes te bepalen in oppervlaktewater, in reinwater en in water in de zuivering dat verschillende zuiveringsstappen heeft doorlopen. Hiermee kan de effectiviteit van de zuivering in het verwijderen van virussen uit het water worden bepaald. Bovenstaande experimenten zijn uitgevoerd in drinkwater, wat een ideale watermatrix is omdat er waarschijnlijk nauwelijks tot geen stoffen in aanwezig zijn die de qPCR of de behandeling met EMA of PMA kunnen remmen. Echter, in oppervlaktewater zijn deze stoffen mogelijk wel aanwezig en worden tijdens het concentreren van groot-volume monsters geconcentreerd. Hierdoor zijn deze mogelijk in relatief hogere concentraties aanwezig. Om het mogelijk remmende en/of storende effect van geconcentreerd oppervlaktewater op de EMA/PMA-qPCR te bepalen, is oppervlaktewater geconcentreerd en geïncubeerd met gekweekt Adenovirus 5 om hechting van het virus aan deeltjes plaats te kunnen laten vinden.

Van het geconcentreerde oppervlaktewater is het natuurlijk aanwezige aantal DNA kopieën Adenovirus 5 bepaald, voordat de gekweekte Adenovirus 5 is gedoseerd. Hieruit blijkt dat er $3,1 - 4,5 \times 10^7$ genkopieën per liter aanwezig zijn (Tabel 5). Kleuring met EMA en PMA geeft vergelijkbare getallen als wanneer geen kleurstof wordt gebruikt. Zeer waarschijnlijk is in oppervlaktewater zowel infectieus als niet-infectieus Adenovirus 5 aanwezig, waarvan de verhouding onbekend is.

Het verschil tussen de conventionele qPCR waarmee DNA van infectieuze en niet-infectieuze deeltjes wordt gedetecteerd, en de EMA/PMA-qPCR die alleen DNA van infectieuze deeltjes zou moeten detecteren, is niet terug te zien in de resultaten. Hier zijn een aantal mogelijke verklaringen voor: 1) Alle Adenovirusdeeltjes in het oppervlaktewater zijn infectieus en EMA en PMA kunnen het DNA niet bereiken; 2) Er zijn zowel infectieuze als niet-infectieuze Adenovirusdeeltjes aanwezig, maar het virus capsid is intact waardoor dit verschil niet kan worden aangetoond met EMA en/of PMA; 3) De watermatrix waarin de virusdeeltjes zich bevinden verstoort de werking van EMA en PMA, maar niet de qPCR.

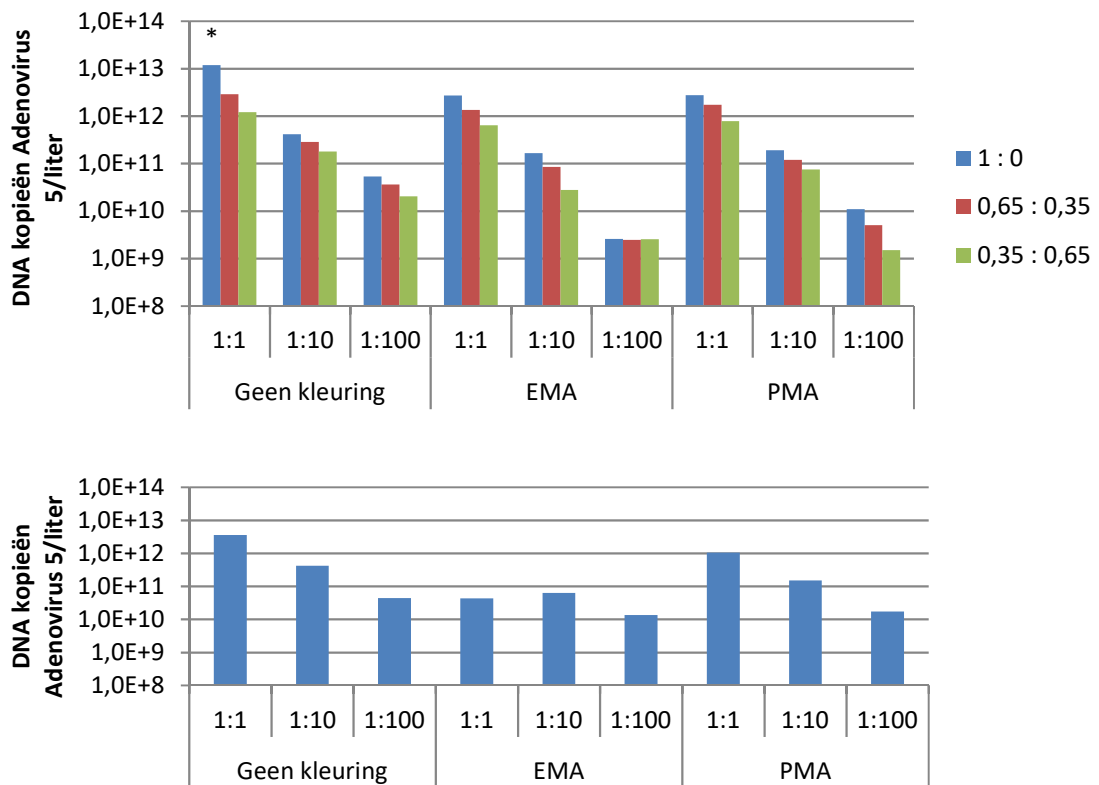
TABEL 5. AANTAL GENKOPIEËN VAN ADENOVIRUS 5 DAT VAN NATURE AANWEZIG IS IN HET LEKKANAALWATER NA CONCENTRATIE.

Behandeling	DNA kopieën Adenovirus 5/liter
Geen kleuring	$3,13 \times 10^7$
EMA	$3,23 \times 10^7$
PMA	$4,52 \times 10^7$

De eerste optie is onwaarschijnlijk vanwege het feit dat in vers Adenovirusmateriaal al het grootste deel niet-infectieus is en in water inactivatie/beschadiging plaatsvindt door UV-straling van de zon en reactieve zuurstof in het water, de tweede optie is mogelijk gezien de resultaten uit het eerste experiment met UV desinfectie. Om meer duidelijkheid te krijgen over de derde optie, is een verdunningsreeks uitgevoerd van het oppervlaktewaterconcentraat, met Adenovirus 5, in steriel drinkwater of in hetzelfde oppervlaktewaterconcentraat. Door te verdunnen in drinkwater neemt de concentratie mogelijk aanwezig remmende stoffen af en daalt ook de virusconcentratie in het watermonster. De verdunning in eigen watermatrix, oppervlaktewaterconcentraat, verlaagt alleen het aantal virusdeeltjes, maar niet de mogelijk aanwezige remmende stoffen. De resultaten van deze verdunningsreeksen zijn weergegeven in Tabel 6 en Figuur 3. Hierin zijn duidelijk de verdunningen zichtbaar. De 1:10 en 1:100 verdunningen geven echter bijna nergens een versterkte daling van het qPCR signaal (meer dan 10x of 100x lager). Dit duidt mogelijk op een remmend effect van hogere virusconcentratie. Om de verschillende condities goed met elkaar te vergelijken zijn de resultaten gecorrigeerd voor de verdunning in de eigen watermatrix (1:1 – 1:100 verdunning, Figuur 4) of voor de verdunning in steriel drinkwater (0,35 – 0,65 verdunning, Figuur 5).

TABEL 6. DETECTIE VAN ADENOVIRUS 5 GEDOSEERD AAN OPPERVLAKTEWATERCONCENTRAAT MET QPCR. GEGEVEN IS HET AANTAL DNA KOPIEËN ADENOVIRUS 5 PER LITER. *: RECOVERY VAN DE DNA ISOLATIE ERG LAAG (1%) EN DAARDOOR MINDER BETROUWBAAR.

DNA kopieën Adenovirus 5/liter		Lekkanaalwaterconcentraat : drinkwater			
Geen kleuring	Verdunning in watermatrix	1 : 0	0,65 : 0,35	0,35 : 0,65	0 : 1
		1:1	1,2x10 ¹³ *	2,9x10 ¹²	1,2x10 ¹²
	1:10	4,1x10 ¹¹	2,8x10 ¹¹	1,8x10 ¹¹	4,2x10 ¹¹
	1:100	5,4x10 ¹⁰	3,6x10 ¹⁰	2,0x10 ¹⁰	4,4x10 ¹⁰
EMA	1:1	2,7x10 ¹²	1,3x10 ¹²	6,3x10 ¹¹	4,3x10 ¹⁰
	1:10	1,7x10 ¹¹	8,5x10 ¹⁰	2,8x10 ¹⁰	6,2x10 ¹⁰
	1:100	2,6x10 ⁹	2,5x10 ⁹	2,5x10 ⁹	1,4x10 ¹⁰
PMA	1:1	2,7x10 ¹²	1,7x10 ¹²	7,8x10 ¹¹	1,0x10 ¹²
	1:10	1,9x10 ¹¹	1,2x10 ¹¹	7,5x10 ¹⁰	1,5x10 ¹¹
	1:100	1,1x10 ¹⁰	5,0x10 ⁹	1,5x10 ⁹	1,7x10 ¹⁰



FIGUUR 3. AANTAL DNA KOPIEËN ADENOVIRUS 5 IN OPPERVLAKTEWATERCONCENTRAAT (BOVEN) EN DRINKWATER (ONDER) MET QPCR. GEGEVEN IS HET AANTAL DNA KOPIEËN ADENOVIRUS 5 PER LITER. *: RECOVERY VAN DE DNA ISOLATIE ERG LAAG (1%), HET RESULTAAT IS DAARDOOR MINDER BETROUWBAAR.

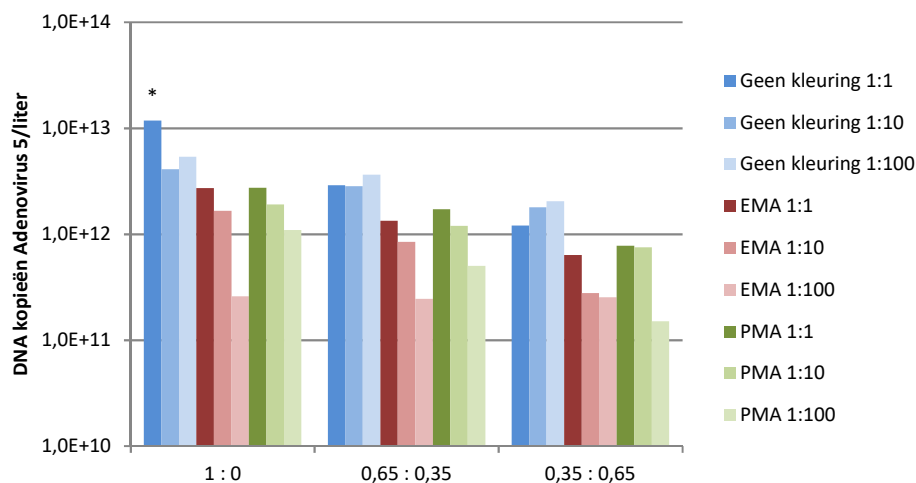
Correctie van de resultaten uit Tabel 6 voor 1:1, 1:10 of 1:100 verdunning in de eigen watermatrix laat zien dat zonder EMA of PMA behandeling de verdunningen nauwelijks effect hebben op het aantal genkopieën dat wordt gemeten met de qPCR (blauw in Figuur 4). Deze aantallen zijn vrij stabiel. Uitzondering is de referentieconditie (* in Figuur 4) die sterk hoger is. Echter, de recovery van de DNA isolatie was erg laag (1%) waardoor dit resultaat minder betrouwbaar is. Het aantal genkopieën dat wordt gemeten zonder EMA of PMA behandeling is voor elke conditie hoger dan wanneer één van beide stoffen wordt toegevoegd.

Bij gebruik van EMA of PMA is er wel een effect van de verdunning zichtbaar. Bij een hogere verdunning (1:10 en 1:100) in de eigen watermatrix worden, na correctie voor deze verdunning, tot 1 log minder DNA kopieën gemeten (lichtrood en lichtgroen in Figuur 4). Dit geldt voor zowel de watermonsters met alleen oppervlaktewaterconcentraat (1 : 0) als de watermonsters die verdund zijn met drinkwater (0,65 : 0,35 en 0,35 : 0,65). In de 1:10 en 1:100 verdunningen is de virusconcentratie lager en worden versterkt minder DNA kopieën gemeten met de qPCR.

Vergelijking van de onverdunde watermonsters (1:1, geen kleuring, EMA en PMA) binnen één watermatrix, laat zien dat het aantal gemeten DNA kopieën in de EMA en PMA condities consequent iets lager is dan wanneer geen kleurstof wordt gedoseerd. Het verschil tussen geen kleuring en EMA of PMA is groter bij de onderlinge vergelijking van de 1:10 en 1:100 verdunde watermonsters. EMA en PMA lijken een sterker remmend effect te hebben bij lagere virusconcentraties, wat overeenkomt met wat in de vorige paragraaf is beschreven. Ondanks dat EMA en PMA het aantal gemeten DNA kopieën verlagen, is de daling beperkt.

TABEL 7. AANTAL GENKOPIEËN ADENOVIRUS 5 IN HET WATERMONSTER, GECORRIGEERD VOOR VERDUNNING IN DE EIGEN WATERMATRIX. *: RECOVERY VAN DE DNA ISOLATIE ERG LAAG (1%) EN DAARDOOR MINDER BETROUWBAAR.

Adenovirus 5/liter		Lekkanaalwaterconcentraat : drinkwater		
	Gecorrigeerd voor verdunning in eigen watermatrix	1 : 0	0,65 : 0,35	0,35 : 0,65
Geen kleuring	1:1	1,18x10 ^{13*}	2,89x10 ¹²	1,21x10 ¹²
	1:10	4,11x10 ¹²	2,84x10 ¹²	1,79x10 ¹²
	1:100	5,36x10 ¹²	3,63x10 ¹²	2,04x10 ¹²
EMA	1:1	2,72x10 ¹²	1,34x10 ¹²	6,34x10 ¹¹
	1:10	1,66x10 ¹²	8,46x10 ¹¹	2,78x10 ¹¹
	1:100	2,58x10 ¹¹	2,45x10 ¹¹	2,54x10 ¹¹
PMA	1:1	2,73x10 ¹²	1,72x10 ¹²	7,75x10 ¹¹
	1:10	1,90x10 ¹²	1,20x10 ¹²	7,51x10 ¹¹
	1:100	1,09x10 ¹²	5,00x10 ¹¹	1,50x10 ¹¹

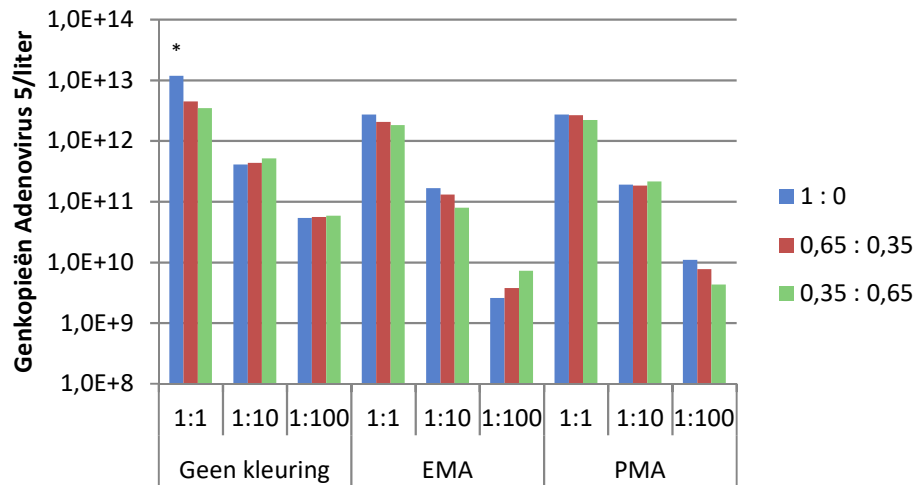


FIGUUR 4. AANTAL GENKOPIEËN ADENOVIRUS 5 IN HET WATERMONSTER, GECORRIGEERD VOOR VERDUNNING IN DE EIGEN WATERMATRIX. *: RECOVERY VAN DE DNA ISOLATIE IS ERG LAAG (1%) EN DAARDOOR MINDER BETROUWBAAR.

Correctie van de resultaten uit Tabel 6 voor de verdunning in steriel drinkwater (1 : 0 – 0,35 : 0,65) laat zien dat een lagere concentratie oppervlaktewaterconcentraat voor de meeste condities geen effect heeft (Figuur 5). Het aantal DNA kopieën is vergelijkbaar binnen één 1:1, 1:10 of 1:100 verdunning. Uitzondering zijn de EMA en PMA kleuring op het 1:100 verdunde watermonster. Het lagere aantal DNA kopieën bij gebruik van PMA bij een 0,35 : 0,65 verdunning vergeleken met de 1 : 0 verdunning suggereert dat bij een lagere hoeveelheid oppervlaktewaterconcentraat PMA effectiever is en de qPCR sterker remt. Bij gebruik van EMA is het andersom, waarbij de 0,35 : 0,65 verdunning een hoger aantal DNA kopieën heeft dan de 1 : 0 verdunning. EMA zou dan juist effectiever zijn als er meer oppervlaktewater aanwezig is. De verschillen zijn echter klein, en voornamelijk in de 1:100 verdunning zichtbaar.

TABEL 8. AANTAL GENKOPIEËN ADENOVIRUS 5 IN HET WATERMONSTER, GECORRIGEERD VOOR VERDUNNING IN STERIEL DRINKWATER. *: RECOVERY VAN DE DNA ISOLATIE ERG LAAG (1%) EN DAARDOOR MINDER BETROUWBAAR.

Adenovirus 5/liter		Lekkanaalwaterconcentraat : drinkwater		
	Gecorrigeerd voor verdunning in steriel drinkwater	1 : 0	0,65 : 0,35	0,35 : 0,65
Geen kleuring	1:1	1,18x10 ^{13*}	4,45x10 ¹²	3,44x10 ¹²
	1:10	4,11x10 ¹¹	4,36x10 ¹¹	5,12x10 ¹¹
	1:100	5,36x10 ¹⁰	5,59x10 ¹⁰	5,82x10 ¹⁰
EMA	1:1	2,72x10 ¹²	2,06x10 ¹²	1,81x10 ¹²
	1:10	1,66x10 ¹¹	1,30x10 ¹¹	7,94x10 ¹⁰
	1:100	2,58x10 ⁹	3,76x10 ⁹	7,26x10 ⁹
PMA	1:1	2,73x10 ¹²	2,64x10 ¹²	2,21x10 ¹²
	1:10	1,90x10 ¹¹	1,84x10 ¹¹	2,15x10 ¹¹
	1:100	1,09x10 ¹⁰	7,70x10 ⁹	4,29x10 ⁹



FIGUUR 5. AANTAL GENKOPIEËN ADENOVIRUS 5 IN HET WATERMONSTER, GECORRIGEERD VOOR DE VERDUNNING IN STERIEL DRINKWATER. *: RECOVERY VAN DE DNA ISOLATIE ERG LAAG (1%) EN DAARDOOR MINDER BETROUWBAAR.

Bovenstaande experimenten suggereren dat de EMA en PMA kleuring niet geremd wordt door de aanwezigheid van geconcentreerd oppervlaktewater. Echter, de verschillen zijn klein en mogelijk is, ondanks de verdunning in steriel drinkwater, de concentratie stoffen die mogelijk aanwezig zijn in het oppervlaktewater nog steeds te hoog en wordt de werking van EMA en PMA verstoord. Om hier zekerheid over te krijgen zou het oppervlaktewaterconcentraat verder verdund moeten worden in steriel drinkwater. Maar dat wordt minder relevant omdat de verdunning ook de detectiegrens van de methode navenant negatief beïnvloedt.

4 Conclusies en aanbevelingen

4.1 Conclusies

Een voorbehandeling van het watermonster met EMA of PMA geeft een betere schatting van het aantal infectieuze Adenovirusdeeltjes als er een chloordesinfectie is toegepast. Maar er vindt nog steeds een overschatting plaats ten opzichte van de kweekmethode.

Op onbehandeld oppervlaktewater of bij UV-C desinfectie heeft de EMA of PMA voorbehandeling geen meerwaarde en zijn de resultaten vergelijkbaar met de conventionele qPCR waarmee het aantal gedetecteerde virusdeeltjes veel hoger is dan met de celkweekmethode.

Geconcentreerd oppervlaktewater lijkt de werking van EMA en PMA niet of in beperkte mate te remmen. Vervolgonderzoek is echter nodig om dit te bevestigen of uit te sluiten, maar dit lijkt momenteel weinig zinvol.

4.2 Aanbevelingen

Het vermogen van EMA en PMA om infectieuze van niet-infectieuze Adenovirussen te onderscheiden is laag wanneer de virussen bestraald zijn met UV. Bij chloor lijken de EMA en PMA kleuring beter te presteren, en het effect van andere zuiveringsprocessen is nog niet onderzocht. Voorlopig wordt daarom aanbevolen om de hier beschreven EMA/PMA-qPCR methode voor Adenovirussen niet in te zetten als mogelijke vervanging voor de enterovirussen in het kader van de AMVD. Hiervoor is uitgebreid verder onderzoek noodzakelijk. Mogelijk kan toevoeging van proteïnase K een beschadigd capsid beter doordringbaar maken voor EMA of PMA, zoals ook voor MS2 na UV desinfectie is gevonden (BTO 2013.027s).

5 Referenties

- BTO 2011.010. Virusverwijdering door drinkwaterzuiveringsprocessen; de waarde van somatische fagen, F-specifieke fagen en Adenovirussen.
- BTO 2013.012. Virusverwijdering uit oppervlaktewater door coagulatie/sedimentatie en snelle zandfiltratie.
- BTO 2013.027(s). De inactivatie van MS2 door lage druk en midden druk UV.
- BTO 2015.074. Onderscheid tussen dode en levende bacteriën met qPCR.
- Leifels M, Jurzik L, Wilhelm M, Ahmed Hamza I – Use of ethidium monoazide and propidium monoazide to determine viral infectivity upon inactivation by heat, UV-exposure and chlorine – 2015, International Journal of Hygiene and Environmental Health, vol 218, pp 686-693
- Leifels M, Hamza IA, Krieger M, Wilhelm M, Mackowiak M, Jurzik L – From lab to lake – Evaluation of current molecular methods for the detection of infectious enteric viruses in complex water matrices in an urban area – 2016, PLOS One, 11 (11): e0167105