

BTO 2018.070 | Juni 2018

BTO rapport

Validatie van een Real-time RT-PCR methode voor snelle detectie van intestinale enterococcen in gedistribueerd drinkwater

BTO

Validatie van een Real-time RT-PCR methode voor snelle detectie van intestinale enterococci in gedistribueerd drinkwater

BTO 2018.070 | Juni 2018

Opdrachtnummer

400554/178

Projectmanager

Stefan Kools

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Nieuwe meetmethoden en sensing

Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

Auteur(s)

Leo Heijnen

Verzonden aan

Jaar van publicatie
2018

Meer informatie

Leo Heijnen
T +31-306069743
E leo.heijnen@kwrwater.nl

Keywords

RT-PCR, fecale verontreiniging, snelle detectie, moleculaire methode, validatie, enterococci

Postbus 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 2018.070 | Juni 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

Validatie van een Real-time RT-PCR methode voor snelle detectie van intestinale enterococci in gedistribueerd drinkwater

Auteur Leo Heijnen

Voor het vaststellen van de hygiënische betrouwbaarheid van drinkwater zijn metingen van de fecale indicator organismen *E. coli* en intestinale enterococci wettelijk voorgeschreven. Vooral voor het efficiënt managen van calamiteiten is er de wens naar detectiemethoden waarmee deze indicator organismen snel kunnen worden aangetoond waardoor gezondheidsrisico's en overlast voor de consument kunnen worden beperkt. Voor snelle detectie van *E. coli* is er een gevalideerde snelle Real-time RT-PCR methode beschikbaar waarvoor IL&T (Inspectie Leefomgeving en Transport) op 23 april 2018 toestemming heeft gegeven om deze toe te passen als alternatieve methode. Naast metingen van *E. coli* zijn na werkzaamheden ook altijd metingen van intestinale enterococci vereist. Voor detectie van intestinale enterococci is een Real-time RT-PCR methode beschikbaar waarmee vier, door de WHO als meest specifiek-faecaal benoemde intestinale enterococci soorten (*Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* en *E. durans*), kunnen worden aangetoond. Als onderdeel van dit project is deze methode bij alle drinkwaterlaboratoria in Nederland en bij de Belgische laboratoria van De Watergroep en Pidpa geïmplementeerd en vervolgens is deze methode gevalideerd (volgens ISO16140-2: 2016). De resultaten van de validatie maken duidelijk dat de vier enterococci soorten met voldoende gevoeligheid en specificiteit kunnen worden aangetoond. Gedurende het validatietraject is, uit overleg met RIVM, duidelijk geworden dat het niet te verwachten is dat deze methode door IL&T zal worden geaccepteerd als alternatieve methode voor detectie van intestinale enterococci. Doordat de detectie wordt beperkt tot de vier intestinale enterococci soorten is er te verwachten dat er verschillen optreden met de kweekmethode waarvan niet kan worden uitgesloten dat deze verschillen relevant zijn voor het beoordelen van de hygiënische betrouwbaarheid. Voor een vervolgt raject wordt geadviseerd om de huidige snelle methode uit te breiden tot een methode waarmee alle enterococci kunnen worden gedetecteerd die met de kweekmethode in drinkwater worden aangetoond en mogelijk van fecale herkomst zijn.

Belang: door snelle methoden beperking van risico en overlast

Met snelle Real-time RT-PCR methoden is het mogelijk om binnen één dag te beoordelen of drinkwater hygiënisch betrouwbaar is. Dit maakt snelle reactie na calamiteiten mogelijk waardoor gezondheidsrisico's en overlast voor de consument (kookadvies) wordt beperkt.

Aanpak: implementatie en validatie in samenwerking met de drinkwaterlaboratoria.

In samenwerking met de waterlaboratoria is er een, door WLN ontwikkelde, methode geïmplementeerd bij alle laboratoria en aansluitend gevalideerd. Voor de validatie zijn de resultaten die worden verkregen met de RT-PCR vergeleken met de resultaten die

worden verkregen met de kweekmethode (volgens ISO 16140-2:2016).

Resultaten: specifieke en gevoelige detectie van de vier intestinale enterococci soorten.

Uit het onderzoek bleek dat de Real-time RT-PCR methode selectieve detectie van de vier intestinale enterococci mogelijk met een gevoeligheid die vergelijkbaar is met de kweekmethode.

Implementatie: Real-time RT-PCR voor detectie van intestinale enterococci geïmplementeerd.

Dit onderzoek heeft gezorgd voor implementatie van een snelle methode voor detectie van intestinale enterococci bij alle Nederlandse en het Belgische drinkwaterlaboratoria van De Watergroep. Voor wettelijke acceptatie is te verwachten dat de methode moet worden uitgebreid tot een methode waarmee detectie mogelijk is van alle enterococci soorten die kunnen voorkomen in drinkwater (en worden aangetoond met de kweekmethode) en mogelijk van fecale herkomst zijn.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in rapport BTO 2018.070.

Meer informatie

Leo Heijnen
T +31-306069743
E leo.heijnen@kwrwater.nl

KWR

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

Inhoud

Inhoud	2
1 Achtergronden	4
1.1 Inleiding	4
1.2 Keuze: RT-PCR methode voor detectie van intestinale enterococci	4
1.3 Validatie RT-PCR methode voor detectie van intestinale enterococci	5
1.4 Samenwerking drinkwaterlaboratoria	5
2 Beschrijving van de methoden	6
2.1 Referentie methode (kweek)	6
2.2 Alternatieve methode (Real-time RT-PCR)	6
2.3 Schematisch overzicht van de methoden	7
3 Validatie protocol	8
3.1 Methode vergelijkend onderzoek	8
3.2 Interlaboratorium onderzoek	14
3.3 Statistische analyses	15
4 Resultaten	16
4.1 Methode vergelijkende studie	16
4.2 Interlaboratorium onderzoek	20
5 Discussie en conclusies	21
5.1 Methode vergelijkende studie	21
5.2 Conclusies	22
6 Referenties	23
Appendix I Protocol Real-time RT-PCR voor detectie intestinale enterococci	24
Appendix I Ruwe data gevoeligheids studie	40
Appendix II Ruwe data RLOD bepaling	42
Appendix III Ruwe data Inclusiviteit	44
Appendix IV Ruwe Data Exclusiviteit	46

Deze validatiestudie was onderdeel van een samenwerking tussen de drinkwaterlaboratoria in Nederland en België. De deelnemende laboratoria en de bijbehorende drinkwaterbedrijven zijn in Tabel 1 weergegeven.

TABEL 1. SAMENWERKENDE DRINKWATERLABORATORIA EN DE DAARBIJ AANGESLOTEN DRINKWATERBEDRIJVEN

Drinkwaterbedrijf	Locatie	Aangesloten laboratorium	Afkorting
Vitens n.v.	Zwolle (Nederland)	Vitens laboratorium	Vitens
OASEN	Gouda (Nederland)	Vitens laboratorium	Vitens
Water Maatschappij Drenthe	Assen (Nederland)	Waterlab Noord	WLN
Waterbedrijf Groningen	Groningen (Nederland)	Waterlab Noord	WLN
Brabant Water	Breda (Nederland)	Aqualab Zuid	AqZ
Evides	Rotterdam (Nederland)	Aqualab Zuid	AqZ
Watermaatschappij Limburg	Maastricht (Nederland)	Aqualab Zuid	AqZ
Dunea	Zoetermeer (Nederland)	Het Waterlaboratorium	HWL
Waternet	Amsterdam (Nederland)	Het Waterlaboratorium	HWL
PWN	Velserbroek (Nederland)	Het Waterlaboratorium	HWL
Pidpa	Antwerpen (België)	Pidpa	PidPa
De Watergroep	Gent (België)	De Watergroep	De Watergroep
BTO-Participanten	Nieuwegein	KWR	KWR

Het laboratoriumwerk bij KWR is uitgevoerd door Goffe Elsinga, Gaby van Doorn, Carola Blokker en Anita van de Veen.

1 Achtergronden

1.1 Inleiding

Metingen van de fecale indicator organismen *E. coli* en intestinale enterococci zijn wettelijk voorgeschreven voor het vaststellen van de hygiënische betrouwbaarheid van drinkwater. Al geruime tijd is er in de drinkwatersector de wens een snelle detectiemethode voor de indicator organismen, als alternatief voor de tijdrovende kweekmethode, in gebruik te nemen. Snelle methoden maken snelle reactie na calamiteiten mogelijk waardoor gezondheidsrisico's en economische verliezen kunnen worden beperkt. In 2015 is in het BTO project "Implementatie en validatie van een snelle methode voor detectie van *E. coli*, een RT-PCR (Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction) methode voor detectie van het RNA bij alle drinkwaterlaboratoria geïmplementeerd. Na de implementatie is deze methode door KWR, in samenwerking met de drinkwaterlaboratoria gevalideerd volgens ISO 16140-2:2016 (Heijnen 2017). De resultaten van deze validatie geven aan dat de RT-PCR methode als alternatieve snelle methode gebruikt kan worden voor gevoelige detectie van *E. coli*. Naar aanleiding daarvan is vanuit de drinkwaterbedrijven bij IL&T (Inspectie Leefomgeving en Transport) het verzoek ingediend om deze methode in te mogen zetten voor detectie van *E. coli* in drinkwater als alternatief voor de kweekmethode en op 23 april 2018 is hiervoor de toestemming verleend.

Voor het vaststellen van de hygiënische betrouwbaarheid zijn, naast metingen van *E. coli*, na werkzaamheden ook altijd metingen van intestinale enterococci vereist, de beschikbaarheid van snelle methoden voor beide indicatororganismen is dan ook noodzakelijk.

1.2 Keuze: RT-PCR methode voor detectie van intestinale enterococci

Voor dit onderzoek is, in samenwerking met specialisten van de drinkwaterlaboratoria (Expertgroep RT-PCR en Contactgroep Biologie; CoBio), gekozen om de, door WLN ontwikkelde, RT-PCR methode voor detectie van intestinale enterococci te valideren. Bij deze methode wordt gebruik gemaakt van een mengsel van primers voor amplificatie en detectie van een fragment van het 16S rRNA gen. Met het gebruik van deze methode is detectie van intestinale enterococci beperkt tot de soorten waarvan bekend is dat deze het meest voorkomen in feces: *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* en *Enterococcus hirae* (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* en *E. hirae*). De keuze voor deze soorten is gebaseerd op de enterococci soorten die zijn beschreven in de WHO richtlijnen (WHO 2017) en worden gebruikt als indicator voor de aanwezigheid van fecale verontreiniging. Momenteel is het toepassen van ISO7899 wettelijk voorgeschreven voor het aantonen van (intestinale) enterococci en het is duidelijk dat met deze methode meerdere soorten (anders dan *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* en *E. hirae*) enterococci worden aangetoond waarvan inmiddels duidelijk is dat een deel van deze enterococci van fecale oorsprong kan zijn (Taucer-Kapteijn et al. 2017). Uit overleg met RIVM is duidelijk geworden dat te verwachten is dat IL&T geen toestemming zal geven om deze Real-time RT-PCR methode te gebruiken als alternatief voor de voorgeschreven kweekmethode (ISO7899). In vervolgonderzoek zal daarom uitbreiding moeten plaats vinden van de Real-time RT-PCR methode waardoor detectie mogelijk wordt van alle enterococci soorten die, op basis van de kweek, te verwachten zijn en waarvan fecale herkomst waarschijnlijk is.

1.3 Validatie RT-PCR methode voor detectie van intestinale enterococci

Voor de validatie van de RT-PCR methode voor detectie van intestinale enterococci is gebruik gemaakt van ISO 16140-2:2016. In deze ISO is vastgelegd hoe de verschillende stappen t.b.v. deze validatie moeten worden uitgevoerd.

Bij het gebruik van de kweekmethode voor het monitoren van de waterkwaliteit wordt voor de besluitvorming gebruik gemaakt van het criterium "afwezigheid van indicatororganismen in 100 ml" en wordt verder geen gebruik gemaakt van de kwantitatieve informatie van de kweek. Er is daarom gekozen om de kweek- en de RT-PCR methode bij deze validatie te beoordelen als kwalitatieve methode.

1.4 Samenwerking drinkwaterlaboratoria

Deze validatiestudie maakt onderdeel uit van een samenwerking tussen de drinkwaterlaboratoria in Nederland en België. De deelnemende drinkwaterlaboratoria en de drinkwaterbedrijven die aangesloten zijn bij deze laboratoria zijn weergegeven in Tabel 1. Gedurende deze samenwerking zijn de specialisten van deze laboratoria periodiek bij elkaar gekomen voor het uitwisselen van informatie en ervaringen, optimalisatie en standaardisatie van de methoden.

2 Beschrijving van de methoden

2.1 Referentie methode (kweek)

De methode zoals beschreven in NEN-EN-ISO 7899-2 is in dit validatietraject als referentiemethode gebruikt. De referentiemethode is aangepast voor selectieve detectie/identificatie van de vier intestinale enterococci soorten (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* en *E. hirae*). Voor deze identificatie op soort-niveau is door de drinkwaterlaboratoria MALDI-TOF MS gebruikt. Dit betekent dat een selectieve kweek op Slanetz and Bartley (S&B) medium is uitgevoerd gevolgd door een bevestiging op Gal Esculine Azide Agar (GEAA) en een identificatie van de gekweekte bacteriën met MALDI-TOF MS.

2.2 Alternatieve methode (Real-time RT-PCR)

De RT-PCR voor snelle detectie van intestinale enterococci is in dit validatietraject onderzocht als alternatieve methode. De SOP beschreven in Appendix I is hiervoor als basis gebruikt. Samengevat bestaat de methode uit de volgende onderdelen:

1. Basis

Bij deze methode worden (samengevat) de volgende stappen uitgevoerd:

- 100 ml water wordt gefiltreerd d.m.v. membraanfiltratie.
- De celwand van enterococci wordt gelyseerd door gebruik te maken van een combinatie van een enzymatische- (Lysozym) en chemische-reactie (Lysisbuffer Nuclisens methode, Biomerieux).
- RNA wordt geïsoleerd met de Nuclisens-methode (Biomerieux) met een systeem voor het hanteren van magnetische silica zoals "Kingfisher".
- Het RNA wordt omgezet naar cDNA (copyDNA) m.b.v. een reverse transcriptie reactie.
- Aansluitend wordt er m.b.v. PCR een fragment, met een lengte van 151 bp, van het 16S rRNA van de enterococci soorten *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* of *E. hirae* vermenigvuldigd en gedetecteerd (PCR).

2. Controles

Drie typen controles zijn bij elk experiment uitgevoerd: analyse van een "blanco" monster, een positief controle monster en, als daar aanleiding voor is, een controle waarmee wordt vastgesteld of er remming van de reactie optreedt (PCR remmings controle).

- Bij het blanco controle monster RNA extractie Real-time RT-PCR uitgevoerd op een blanco monster waarbij filtratie is uitgevoerd van 100 ml DNA- en RNA-vrij water gefiltreerd.
- Bij een positief controlemonster is de analyse uitgevoerd op 100 ml DNA- en RNA-vrij water waaraan een gekwantificeerde hoeveelheid (ca. 50-70 KVE) *Enterococcus faecium* (stam WR63) is toegevoegd.
- Om te bepalen in hoeverre de Real-time RT-PCR analyses worden verstoord door de aanwezigheid van stoffen in de watermonsters die remming kunnen veroorzaken van de Real-time RT-PCR zijn er analyses uitgevoerd op de watermonsters waaraan een gekwantificeerde hoeveelheid (ca. 50-70 KVE) *Enterococcus faecium* (stam WR63) is toegevoegd. Deze remmingscontroles zijn uitgevoerd in situaties waarbij daar aanleiding voor was.

3. Real-time RT-PCR

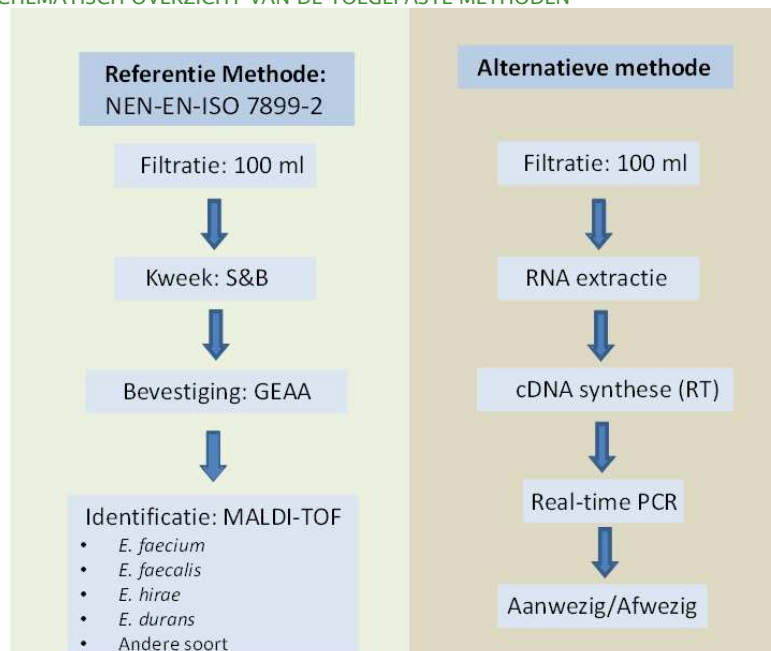
Bij de analyse van alle monsters zijn Real-time RT-PCR reacties in duplo uitgevoerd. Voor het uitvoeren van de Real-time RT-PCR reacties zijn er commercieel verkrijgbare reagentia van de firma Bionline toegepast:

- Voor de reverse transcriptase reactie: SensiFAST cDNA Synthesis Kit
- Voor de Real-time PCR: SensiMix II Probe Kit
- Het, uit het monster geïsoleerde, RNA is eerst omgezet naar cDNA (copy DNA) via een Reverse Transcriptase (RT) reactie. Vervolgens is d.m.v. een PCR reactie een specifiek fragment het 16S rRNA gen van *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* of *E. durans* geamplificeerd. Voor deze detectie worden voor elk monster één Real-time PCR reactie uitgevoerd met hierin een mengsel van primers voor detectie van de vier intestinale enterococci soorten. Deze primerset bevat:
 - o Een mengsel van twee forward primers:
 - Eén primer (met op één positie een “wobble base”) specifiek voor *Enterococcus hirae* en *Enterococcus faecium* en *Enterococcus durans*
 - Eén primer specifiek voor *Enterococcus faecalis*
 - o Eén “universele” reverse primer voor de vier soorten
 - o Eén probe voor de vier soorten
- o Het aantal PCR cycli, wat nodig is om een detecteerbaar fluorescentiesignaal te krijgen (Cq-waarde, wordt afhankelijk van de gebruikte apparatuur, ook Ct of Cp waarde genoemd) gebruikt om de aan- of afwezigheid van intestinale enterococci te bepalen.

2.3 Schematisch overzicht van de methoden

Een schematisch overzicht van de referentie- en alternatieve methode gebruikt in deze validatiestudie is weergegeven in Figuur 1.

FIGUUR 1. SCHEMATISCH OVERZICHT VAN DE TOEGEPASTE METHODEN



3 Validatie protocol

ISO 16140-2:2016 vormt de basis voor het validatieprotocol en is, i.s.m. met de expertgroep RT-PCR, specifiek gemaakt voor validatie van de Real-time RT-PCR voor detectie van intestinale enterococci. De validatie bestaat uit twee onderdelen:

- Een methode vergelijkend onderzoek, uitgevoerd door het organiserend laboratorium, waarbij de alternatieve methode wordt vergeleken met de referentiemethode.
- Interlaboratorium onderzoek waarbij de alternatieve- en de referentiemethode worden uitgevoerd door verschillende laboratoria

Bij de technische uitvoering van de validatie zijn de methoden beoordeeld als kwalitatieve methoden. Als matrix voor deze methode is gedistribueerd drinkwater gehanteerd.

3.1 Methode vergelijkend onderzoek

Het methode vergelijkend onderzoek bestaat uit de volgende drie onderdelen:

- Een vergelijkend onderzoek waarbij de resultaten van de referentie methode worden vergeleken met de resultaten van de alternatieve methode waarbij analyses worden uitgevoerd op natuurlijk en/of artificieel besmette monsters (wordt "sensitivity study" of "gevoeligheids studie" genoemd).
- Een vergelijkende studie waarbij het "relative level of detection" (RLOD) wordt bepaald in artificieel besmette monsters (RLOD-study).
- Een studie waarbij de inclusiviteit/exclusiviteit wordt bepaald van de alternatieve methode.

3.1.1 Gevoeligheidsstudie (5.1.3 in ISO 16140-2:2016)

Met de "gevoeligheidsstudie" is het verschil in gevoeligheid tussen de referentie- en alternatieve-methode bepaald. Deze studie wordt kan worden op natuurlijk en/of kunstmatig besmette monsters.

Bij het uitvoeren van een "gevoeligheidsstudie" heeft het de voorkeur om natuurlijk besmette monsters te analyseren. Echter, vanwege het sporadisch voorkomen van natuurlijk besmette monsters in de praktijk van de drinkwaterlaboratorium is deze optie niet praktisch haalbaar. Daarom is de gevoeligheidsstudie uitgevoerd op kunstmatig besmette drinkwatermonsters waarbij de monsters zijn besmet met fecaal besmet oppervlaktewater. Hiervoor zijn willekeurige monsters van drink- en oppervlaktewater, afkomstig van verschillende locaties in Nederland en België, door de samenwerkende drinkwaterlaboratoria aangeleverd en door KWR gebruikt voor het samenstellen van mengmonsters. Door het gebruik van drink- en oppervlaktewater afkomstig van verschillende geografische locaties is een variërende bacteriële gemeenschap in het drinkwater en een variërende verontreiniging nagebootst.

3.1.1.1 Gepaarde of ongepaarde studie (5.1.2 in ISO 16140-2:2016)

Omdat er geen gezamenlijke stap wordt toegepast voor de referentie- en alternatieve methode (zoals een verrijkingstap) is het onmogelijk om de referentiemethode en de alternatieve methode uit te voeren op exact dezelfde monsters. Bij deze validatiestudie worden verschillende testporties van hetzelfde monster met beide analysemethoden geanalyseerd. Hierdoor wordt de analysedata beschouwd als “ongepaarde” data

3.1.1.2 Selectie van categorieën en types (5.1.3.1 in ISO 16140-2:2016)

De scope van deze validatie is detectie van intestinale enterococci alleen in gedistribueerd drinkwater. Gedistribueerd drinkwater is daarom de enige categorie en type in deze validatiestudie.

3.1.1.3 Monsters samengesteld door mengen van drinkwater met oppervlaktewater

Kunstmatig besmette drinkwatermonsters zijn samengesteld door drinkwater te mengen met oppervlaktewater (met hierin intestinale enterococci). Willekeurige drinkwatermonsters (n=32) en oppervlaktewatermonsters (n=7) zijn verzameld door de drinkwaterlaboratoria van Vitens, WLN, AqZ, HWL en KWR in Nederland en “De Watergroep” en Pidpa in België. Voor het bepalen van de concentratie intestinale enterococci in de oppervlaktewatermonsters is op de dag van monsternamen een kweek ingezet volgens NEN-EN-ISO 7899-2 en vervolgens zijn de monsters verstuurd naar KWR. Twee dagen (48 uur) na monsternamen is de concentratie intestinale enterococci (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* en *E. durans*) bepaald door identificatie van gekweekte stammen met MALDI-TOF-MS en deze concentratie is door KWR gebruikt voor het samenstellen van 30 kunstmatig besmette watermonsters door oppervlaktewater te mengen met drinkwater tot een concentratie van 5 KVE intestinale enterococci per 100 ml. Analyses zijn uitgevoerd op 32 drinkwatermonsters zonder besmetting met oppervlaktewater (Tabel 2A) en 30 kunstmatig besmette drinkwatermonsters door menging van oppervlaktewater met drinkwater (Tabel 2B).

TABEL 2. MONSTERS VAN DRINKWATER (A) EN GECONTAMINEERDE DRINKWATERMONSTERS (B) DOOR MENGING VAN OPPERVLAKTEWATER MET DRINKWATER MONSTERS (MENGSEL).

Monster No.	Oorsprong Drinkwater (DW)
Drinkwatermonsters	
DW 1	Wijk bij Duurstede (KWR)
DW 2	Vianen (KWR)
DW 3	Amersfoort (KWR)
DW 4	Houten (KWR)
DW 5	Nieuwegein (KWR)
DW 6	Ps. Weesperkarspel-Rein (HWL)
DW 7	Ps. Leiduin-Rein (HWL)
DW 8	Ps. Katwijk-Rein (HWL)
DW 9	Ps. Scheveningen-Rein (HWL)
DW 10	Ps. Andijk-Rein (HWL)
DW 11	Meppel (Vitens)
DW 12	Vollenhove (Vitens)
DW 13	Garijp (Vitens)
DW 14	Burgum (Vitens)
DW 15	Zwolle (Vitens)
DW 16	Leeuwarden (Vitens)
DW 17	Scharmer (WLN)
DW 18	Assen (WLN)
DW 19	Wildervank (WLN)

DW20	Groningen (WLN)
DW21	Makkum (WLN)
DW22	Ijsselstein (KWR)
DW23	Meteren (KWR)
DW24	Wageningen (KWR)
DW25	WPC Balen (Pidpa)
DW26	Wijnegem (Pidpa)
DW27	Essen (Pidpa)
DW28	Westerlo (Pidpa)
DW29	Dordrecht (AqZ)
DW30	Vuren (AqZ)
DW31	Tilburg (AqZ)
DW32	Wijk bij Duurstede (KWR)

B

Monster No.	Nr Drinkwater (DW)	Oorsprong Oppervlaktewater (OW)
Mengmonsters: drinkwater/oppervlaktewater		
Meng 1	DW1	Bellingerweer Dalfsen (Vitens)
Meng 2	DW2	Bellingerweer Dalfsen (Vitens)
Meng 3	DW3	Bellingerweer Dalfsen (Vitens)
Meng 4	DW5	Bellingerweer Dalfsen (Vitens)
Meng 5	DW1	Vecht Dalfsen (Vitens)
Meng 6	DW2	Vecht Dalfsen (Vitens)
Meng 7	DW4	Vecht Dalfsen (Vitens)
Meng 8	DW5	Vecht Dalfsen (Vitens)
Meng 9	DW1	Vecht Dalfsen (Vitens)
Meng 10	DW3	Vecht Dalfsen (Vitens)
Meng 11	DW4	Vecht Dalfsen (Vitens)
Meng 12	DW5	Vecht Dalfsen (Vitens)
Meng 13	DW2	Potmarge Leeuwarden (Vitens)
Meng 14	DW3	Potmarge Leeuwarden (Vitens)
Meng 15	DW4	Potmarge Leeuwarden (Vitens)
Meng 16	DW5	Potmarge Leeuwarden (Vitens)
Meng 17	DW6	Slootwater Waarderpolder (HWL)
Meng 18	DW11	sloot kade Vollenhove (Vitens)
Meng 19	DW13	sloot kade Vollenhove (Vitens)
Meng 20	DW14	sloot kade Vollenhove (Vitens)
Meng 21	DW15	sloot kade Vollenhove (Vitens)
Meng 22	DW16	sloot kade Vollenhove (Vitens)
Meng 23	DW17	Noord-Willemskanaal (WLN)
Meng 24	DW18	Noord-Willemskanaal (WLN)
Meng 25	DW19	Noord-Willemskanaal (WLN)
Meng 26	DW20	Noord-Willemskanaal (WLN)
Meng 27	DW22	Laak thv WT Laakdal (Pidpa)
Meng 28	DW23	Laak thv WT Laakdal (Pidpa)
Meng 29	DW24	Laak thv WT Laakdal (Pidpa)
Meng 30	DW25	Laak thv WT Laakdal (Pidpa)

Samenstelling van 32 watermonsters met alleen drinkwater (DW, tabel A) of besmette drinkwatermonsters samengesteld door mengen van drinkwater (van 25 verschillende locaties) en oppervlaktewater (OW) van 7 verschillende locaties (Monster "Meng"). Monsters zijn afkomstig van verschillende locaties in Nederland (NL) en België (B)

3.1.2 Bepalen van de relatieve detectielimiet, RLOD (5.1.4 in ISO 16140-2:2016)

Er is een vergelijkende studie uitgevoerd waarbij de detectielimiet (LOD) van de alternatieve methode is vergeleken met de detectielimiet van de referentiemethode. Voor het bepalen van deze relatieve detectielimiet ("Relative Limit of Detection", RLOD) zijn er analyses uitgevoerd op drinkwatermonsters welke kunstmatig zijn besmet met bekende concentraties enterococci. Het drinkwater van het laboratorium van KWR (Nieuwegein) is gebruikt voor het samenstellen van de monsters. Aangezien bij de RT-PCR methode een mengsel van primers wordt gebruikt waarbij één primerpaar specifiek is voor detectie van *E. faecium* en *E. durans* en *E. hirae* en het andere primerpaar voor specifieke detectie van *E. faecalis* kan niet uitgesloten worden dat de LOD voor detectie van *E. faecium* anders is dan de LOD voor *E. faecalis*. Er is daarom gekozen om aparte analyses uit te voeren voor het bepalen van de RLOD voor detectie van zowel *E. faecium* als *E. faecalis*. Vitroids® (Sigma-Aldrich) zijn gebruikt voor het aanbrengen van kunstmatige besmettingen op verschillende besmettingsniveaus. Voor het bepalen van de RLOD van de methode voor detectie van *E. faecalis* zijn vitroids gebruikt met een concentratie van ca. 50 KVE *E. faecalis* ATCC19433 en voor het bepalen van de RLOD voor detectie van *E. faecium* zijn vitroids met een concentratie van 15-80 KVE *E. faecium* WDCM 00010 (ATCC 19434) gebruikt. De gemiddelde enterococci concentraties van drie vitroids uit één batch vitroids is gebruikt voor het samenstellen van de kunstmatig besmette drinkwatermonsters.

- De volgende besmettingsniveaus zijn samengesteld en geanalyseerd:

1^e niveau: geen enterococci.

- 5 filtraties (100 ml) voor analyse met kweek
- 5 filtraties (100 ml) voor analyse met Real-time RT-PCR

2^e niveau: 0,7 KVE/100 ml

- 20 filtraties (100 ml) voor analyse met kweek
- 20 filtraties (100 ml) voor analyse met Real-time RT-PCR

3^e niveau: 1,5 KVE/100 ml

- 10 filtraties (100 ml) voor analyse met kweek
- 10 filtraties (100 ml) voor analyse met Real-time RT-PCR

4^e niveau: 5 KVE/100 ml

- 5 filtraties (100 ml) voor analyse met kweek
- 5 filtraties (100 ml) voor analyse met Real-time RT-PCR

Om een goede indruk te krijgen van de concentratie kweekbare enterococci in de monsters met een concentratie van 0,7 KVE/100 ml zijn van deze monsters additionele analyses met kweek uitgevoerd door volumes van 1 liter (in 3-voud) te analyseren met kweek.

3.1.3 Inclusiviteit en exclusiviteit (5.1.5 in ISO 16140-2:2016)

De inclusiviteit en exclusiviteit van de Real-time RT-PCR methode is getest op een selectie van goed geïdentificeerde bacteriestammen. Voor het bepalen van de inclusiviteit en exclusiviteit zijn Real-time RT-PCR analyses uitgevoerd op bacteriële celsuspensie waarin de hoeveelheid cellen is genormaliseerd tot een aantal dat tussen 10 en 100 keer hoger is dan het minimale detectieniveau van de alternatieve methode.

Het samenstellen van deze bacteriële suspensies is als volgt uitgevoerd:

- Bacteriële kolonies zijn gekweekt op niet selectief agar medium.
- Vanuit een losliggende verse kolonie is er voor elke bacteriestam een homogene celsuspensie in steriele PBS (1 mM KH₂PO₄, 155 mM NaCl, 3 mM Na₂HPO₄ pH 7.4).
- De concentratie cellen in elke suspensie is bepaald met flowcytometrie waarbij SYBR green is gebruikt voor kleuring van de cellen.
- Op basis van de celtelling zijn er verdunningen gemaakt (in PBS) met een concentratie van 50-100 cellen/100µl.

- Een volume van 100µl van deze suspensie is gebruikt voor het isoleren van RNA en vervolgens is er op elk geïsoleerd RNA twee (duplo) Real-time RT-PCR reacties uitgevoerd. De gemiddelde Cq waarde van deze duplo reacties is gebruikt voor de interpretatie van het resultaat.
- Ter controle en voor het bepalen van concentratie kweekbare enterococci cellen in de suspensies is, van 100µl elke celsuspensie, ook kweek uitgevoerd van enterococci op S&B en niet-enterococci op LLA agarmedium.

De analyses voor het bepalen van de inclusiviteit en exclusiviteit zijn uitgevoerd op een goed geïdentificeerde collectie enterococci en niet-enterococci stammen. Een deel van deze stammen is afkomstig van referentiecollections en een ander deel van de stammen is afkomstig uit watermonsters of feces en is verzameld door de verschillende drinkwaterlaboratoria. De, door de drinkwaterlaboratoria verzamelde, enterococci stammen zijn door het laboratorium van "De Watergroep" tot op soortniveau geïdentificeerd met een voor "De Watergroep" gecertificeerde methode voor identificatie van enterococci met MALDI-TOF-MS.

Stammen voor testen van de inclusiviteit (n=57, Tabel 3).

De collectie bestaat uit:

- Referentiestammen afkomstig van stammencollections:
 - *E. faecium*:
 - ATCC19434/DSMZ 20477
 - WR63
 - *E. faecalis*:
 - ATCC19433/DSMZ 20478
 - DSMZ 20478
 - *E. hirae*:
 - DSMZ 28619
 - DSMZ 20160
 - *E. durans*:
 - DSMZ 20633
- Stammen geïsoleerd door de drinkwaterlaboratoria:
 - *E. faecalis*: 13 stammen
 - *E. hirae*: 12 stammen
 - *E. faecium*: 15 stammen
 - *E. durans*: 10 stammen

TABEL 3. INTESTINALE ENTEROCOCCI STAMMEN VOOR INCLUSIVITEIT

Nr.	Soort	Naam	Herkomst	Lab
1	<i>Enterococcus faecalis</i>	ATCC19433	Referentiestam	DSMZ
2	<i>Enterococcus faecium</i>	ATCC19434	Referentiestam	DSMZ
3	<i>Enterococcus faecium</i>	WR63	Referentiestam	DSMZ
4	<i>Enterococcus hirae</i>	DSMZ 28619	Referentiestam	DSMZ
5	<i>Enterococcus durans</i>	DSMZ 20633	Referentiestam	DSMZ
6	<i>Enterococcus faecalis</i>	DSM 20478	Referentiestam	DSMZ
7	<i>Enterococcus hirae</i>	DSM 20160	Referentiestam	DSMZ
8	<i>Enterococcus faecalis</i>	Vitens 2	Oppervlaktewater	Vitens
9	<i>Enterococcus faecalis</i>	Vos 3/1	Feces Vos	HWL
10	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hooglander 8/3	Feces Hooglander	HWL
11	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hooglander 10/4	Feces Hooglander	HWL
12	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hond 7/1	Feces Hond	HWL
13	<i>Enterococcus faecalis</i>	Hond 11/2	Feces Hond	HWL

14	<i>Enterococcus faecalis</i>	Mens 1/1	Feces Mens	HWL
15	<i>Enterococcus faecalis</i>	Mens 4/1	Feces Mens	HWL
16	<i>Enterococcus faecalis</i>	Vitens 7	drinkwater	HWL
17	<i>Enterococcus faecalis</i>	Mens 13/1	Feces Mens	HWL
18	<i>Enterococcus faecalis</i>	Mens 19/1	Feces Mens	HWL
19	<i>Enterococcus faecalis</i>	Gans 1/1	Feces Gans	HWL
20	<i>Enterococcus faecalis</i>	Vitens 1	Oppervlaktewater	HWL
21	<i>Enterococcus hirae</i>	Vos 12/1	Feces Vos	HWL
22	<i>Enterococcus hirae</i>	Schaap 1/1	Feces Schaap	HWL
23	<i>Enterococcus hirae</i>	Schaap 4/1	Feces Schaap	HWL
24	<i>Enterococcus hirae</i>	Hooglander 6/1	Feces Hooglander	HWL
25	<i>Enterococcus hirae</i>	Hond 8/5	Feces Hond	HWL
26	<i>Enterococcus hirae</i>	Hond 2/1	Feces Hond	HWL
27	<i>Enterococcus hirae</i>	Hond 13/7	Feces Hond	HWL
28	<i>Enterococcus hirae</i>	Mens 10/1	Feces Mens	HWL
29	<i>Enterococcus hirae</i>	Mens 10/7	Feces Mens	HWL
30	<i>Enterococcus faecium</i>	Vos 4/1	Feces Vos	HWL
31	<i>Enterococcus faecium</i>	Vos 6/1	Feces Vos	HWL
32	<i>Enterococcus faecium</i>	Hooglander 6/3	Feces Hooglander	HWL
33	<i>Enterococcus faecium</i>	Hond 8/1	Feces Hond	HWL
34	<i>Enterococcus faecium</i>	Hond 10/1	Feces Hond	HWL
35	<i>Enterococcus faecium</i>	Mens 9/1	Feces Mens	HWL
36	<i>Enterococcus faecium</i>	Mens 18/1	Feces Mens	HWL
37	<i>Enterococcus faecium</i>	Mens 20/1	Feces Mens	HWL
38	<i>Enterococcus faecium</i>	Mens 11/4	Feces Mens	HWL
39	<i>Enterococcus hirae</i>	Vitens 19	Oppervlaktewater	HWL
40	<i>Enterococcus hirae</i>	Vitens 98	Oppervlaktewater	HWL
41	<i>Enterococcus durans</i>	Vos 10/1	Feces Vos	HWL
42	<i>Enterococcus durans</i>	Vos 13/3	Feces Vos	HWL
43	<i>Enterococcus hirae</i>	Vitens 97	Oppervlaktewater	HWL
44	<i>Enterococcus durans</i>	Hond 13/3	Feces Hond	HWL
45	<i>Enterococcus durans</i>	Hond 4/4	Feces Hond	HWL
46	<i>Enterococcus durans</i>	Hond 8/10	Feces Hond	HWL
47	<i>Enterococcus durans</i>	Mens 1/2	Feces Mens	HWL
48	<i>Enterococcus durans</i>	Mens 7/1	Feces Mens	HWL
49	<i>Enterococcus durans</i>	Mens 7/10	Feces Mens	HWL
50	<i>Enterococcus faecium</i>	Vitens 35	Grondwater	HWL
51	<i>Enterococcus faecium</i>	Vitens 37	Grondwater	HWL
52	<i>Enterococcus faecium</i>	Vitens 15	Oppervlaktewater	HWL
53	<i>Enterococcus faecium</i>	Vitens 16	Oppervlaktewater	HWL
54	<i>Enterococcus faecium</i>	Vitens 14	Oppervlaktewater	HWL
55	<i>Enterococcus faecium</i>	Vitens 26	Oppervlaktewater	HWL
56	<i>Enterococcus durans</i>	Vitens 20	Oppervlaktewater	HWL
57	<i>Enterococcus durans</i>	Vitens 18-1	Oppervlaktewater	HWL

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

ATCC: American Type Culture Collection

Stammen voor het bepalen van de exclusiviteit (n=57, Tabel 4).

Deze stammen bestaan uit:

- o *Enterococci* stammen die niet behoren tot de doelsoorten waarvoor de Real-time RT-PCR ontwikkeld is: stammen van 8 verschillende *enterococci* soorten.

- o Stammen met een grote diversiteit van verschillende bacteriële soorten die aanwezig kunnen in water (n=30).

TABEL 4. ONDERZOCHE NIET-INTESTINALE ENTEROCOCCEN STAMMEN

	Soort	Naam van de stam	Herkomst
1	<i>Enterococcus mundtii</i>	Vitens 81	Vitens
2	<i>Enterobacter aerogenes</i>	EPA202/ATCC13048	KWR
3	<i>Enterobacter cloacae</i>	WR3	Controlestam
4	<i>Staphylococcus warneri</i>	WR51	Controlestam
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	WR10	Controlestam
6	<i>Citrobacter freundii</i>	DSM30039	DSMZ
7	<i>Escherichia coli</i>	WR1	Controlestam
8	<i>Klebsiella oxytoca</i>	DSM5175	DSMZ
9	<i>Serratia marcescens</i>	DSM30121	DSMZ
10	<i>Kluyvera ascorbata</i>	DSM4611	DSMZ
11	<i>Pantoea agglomerans</i>	DSM3493	DSMZ
12	<i>Cronobacter sakazakii</i>	DSM4485	DSMZ
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	DSM30104	DSMZ
14	<i>Aeromonas hydrophila</i>	DSM6173	DSMZ
15	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	ATCC49642 (P17)	Controlestam
16	<i>Legionella pneumophila</i>	ATCC33152	ATCC
17	<i>Aquaspirillum sp.</i>	ATCC49643 (NOX)	Controlestam
18	<i>Salmonella panama</i>	SP5	Controlestam
19	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	A3	Controlestam
20	<i>Salmonella typhimurium</i>	NCTC12484 (WG49)	Controlestam
21	<i>Legionella anisa</i>	ATCC 35291	ATCC
22	<i>Escherichia fergusonii</i>	DSM13698	DSMZ
23	<i>Aeromonas veronii</i>	ATCC35624	ATCC
24	<i>Aerococcus viridans</i>	DSM20311	DSMZ
25	<i>Enterococcus gallinarum</i>	WR78	Controlestam
26	<i>Enterococcus dispar</i>	DSM6630	DSMZ
27	<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	DSM15920	DSMZ
28	<i>Enterococcus aquamarinus</i>	DSM17690	DSMZ
29	<i>Enterococcus moraviensis</i>	DSM15919	DSMZ
30	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	DSM20680	DSMZ

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

ATCC: American Type Culture Collection

3.2 Interlaboratorium onderzoek

Met het interlaboratorium onderzoek worden eventuele verschillen in de gevoeligheid van de alternatieve methode ten opzichte van de referentiemethode onderzocht bij het uitvoeren van de methoden door verschillende laboratoria waarbij identieke monsters worden geanalyseerd. Vanwege de verwachting dat deze methode in de huidige vorm niet wettelijk zal worden geaccepteerd als alternatieve methode voor detectie van intestinale enterococci is er binnen dit project nog geen interlaboratoriumonderzoek uitgevoerd wat voldoet aan de criteria zoals die zijn gesteld in ISO16140-2: 2016. Voor het uitvoeren van een dergelijk interlaboratorium onderzoek is wel onderstaand plan opgesteld.

Met het interlaboratorium onderzoek dienen ten minste 10 datasets te worden gegenereerd. De deelnemers zijn afkomstig van minimaal vijf verschillende organisaties. Maximaal drie datasets kunnen worden gegenereerd binnen één organisatie. Analisten welke betrokken zijn

bij de bereiding van de monsters voor het interlaboratorium onderzoek mogen niet deelnemen aan het interlaboratorium onderzoek.

De, voor de validatie de RT-PCR voor intestinale enterococci relevante onderdelen van het protocol zijn als volgt:

- De natuurlijke bacteriële flora van de testmonsters dient vergelijkbaar te zijn met de flora in praktijkmonsters.
- Monsters worden samengesteld door het organiserend laboratorium. Het protocol voor het samenstellen van homogene de monsters is gegeven in annex B en annex C van ISO 16140-2. Voor het samenstellen van kunstmatig besmette monsters wordt gebruik gemaakt van referentiemateriaal van één specifieke enterococcus soort (*E. faecium* of *E. faecalis*).
- Minimaal drie besmettingsniveaus worden gebruikt:
 - o Negatieve controle
 - o Eén niveau waarbij slechts een deel van de monsters positief zal zijn: deze concentratie is gebaseerd op de RLOD bepaling en dit zal een theoretische concentratie van 1 KVE/100 ml zijn.
 - o Eén niveau met een hogere concentratie: ca. 5 KVE/100 ml
- Minimaal acht "blinde" replica's op elk besmettingsniveau worden geanalyseerd met beide methoden (alternatieve- en referentiemethode) door elk deelnemend laboratorium.
 - o Dit houdt in dat elk laboratorium 48 resultaten genereert (acht replica's met drie niveaus en twee methoden)
- Voor ongepaarde studies, zoals deze, wordt één testportie gebruikt voor de alternatieve methode en een andere identieke testportie wordt gebruikt voor het uitvoeren van de referentiemethode.
- De analyse van de monsters vindt bij elk deelnemend laboratorium plaats op een van te voren afgesproken tijdstip.
- In totaal worden minimaal 480 resultaten gegenereerd (240 met elke methode).

Het organiserend laboratorium verzamelt alle gegenereerde data en bepaald welke resultaten bruikbaar zijn voor de analyses. Het organiserend laboratorium verzamelt ruwe data en bepaald of alle analyses (referentie en alternatieve) zijn uitgevoerd op de afgesproken manieren. Resultaten mogen worden verwijderd uit de dataset als er voldoende bewijs is dat de resultaten zijn verkregen onder ongeschikte omstandigheden.

Protocol voor het interlaboratorium onderzoek:

- Er worden drie ringonderzoeken gehouden met vijf deelnemers (WLN, Vitens, HWL, Aqualabzuid, De Watergroep, Pidpa) waarbij in totaal minimaal 10 datasets worden gegenereerd.
- Verdeeld over drie ringonderzoeken worden kunstmatig besmette drinkwatermonsters aangeboden waarbij referentiemateriaal van één intestinale enterococci soort (Vitroids) wordt gebruikt voor het aanbrengen van de besmetting:
 - o 8 negatieve controles: drinkwater
 - 8X kweek en 8X RT-PCR
 - o 8 monsters: drinkwater met ca. 1 KVE/100 ml intestinale enterococci
 - 8X kweek en 8X RT-PCR
 - o 8 monsters: drinkwater met ca. 5 KVE/100 ml intestinale enterococci
 - 8X kweek en 8X RT-PCR

3.3 Statistische analyses

Alle statistische analyses zijn uitgevoerd zoals beschreven in ISO 16140-2:2016.

4 Resultaten

4.1 Methode vergelijkende studie

De methode vergelijkende studie bestaat uit:

- Een gevoeligheidsstudie
- Studie voor het bepalen van de RLOD
- Studie voor het bepalen van de inclusiviteit en exclusiviteit

4.1.1 Gevoeligheidsstudie

De gevoeligheidsstudie is uitgevoerd op drinkwatermonsters die kunstmatig besmet zijn door het drinkwater te mengen met oppervlaktewater met hierin een bekende concentratie intestinale enterococci. De drink- en oppervlaktewatermonsters zijn aangeleverd door medewerkers van de deelnemende laboratoria (Tabel 2) en zijn afkomstig van willekeurige locaties in de nabijheid van deze laboratoria. Hierdoor is een collectie drink- en oppervlaktewatermonsters verkregen met wisselende herkomst en daardoor een variabele microbiële samenstelling (Tabel 2).

Analyses zijn uitgevoerd op 62 watermonsters beschreven in Tabel 2. Deze collectie bestaat uit 32 drinkwatermonsters en 30 oppervlaktewatermonsters waaraan oppervlaktewater is toegevoegd. Ruwe data van de analyses zijn weergegeven in Appendix I en samengevat t.b.v. statistische analyses in Tabel 5.

TABEL 5. OVERVIEW OF THE STATISTICAL ANALYSIS OF DATA OBTAINED WITH THE REFERENCE AND ALTERNATIVE METHOD ANALYSES OF ALL SAMPLES, PARTLY CONTAMINATED WITH SURFACE WATER

	Positief met referentie methode (R+)	Negatief met referentie methode (R-)
Positief met alternatieve methode (A+)	+/+ Positive Agreement (PA) 29	-/+ Positive Deviation (PD) 0
Negatief met alternatieve methode (A-)	+/- Negative Deviation (ND) 1	-/- Negative Agreement (NA) 32

Gevoeligheid voor de alternatieve methode:

$$SE_{alt} = \frac{PA + PD}{PA + ND + PD} \cdot 100\% = \frac{29 + 0}{29 + 1 + 0} \cdot 100\% = 96,7\%$$

Gevoeligheid voor de referentie methode:

$$SE_{ref} = \frac{PA + ND}{PA + ND + PD} \cdot 100\% = \frac{29 + 1}{29 + 1 + 0} \cdot 100\% = 100\%$$

Relatieve juistheid/gevoeligheid

$$AC = \frac{PA + NA}{N} \cdot 100\% = \frac{29 + 32}{62} \cdot 100\% = 98,4\%$$

Vals positieve ratio (FP) voor de alternatieve methode:

$$FPR = \frac{FP}{NA} \cdot 100\%$$

FP (false positive, vals positief) is een positief resultaat bij de alternatieve methode waarbij de bevestiging aangeeft dat het monster niet positief is. Het is in het geval van deze RT-PCR methode niet mogelijk om de FP te bepalen omdat het met de RT-PCR methode niet mogelijk

is om een bevestiging uit te voeren van de positieve reacties (zoals wel mogelijk is bij methoden waar een ophoping wordt toegepast).

Er zijn geen fals-positieve resultaten waargenomen bij de analyse van monsters waaraan geen verontreinigd oppervlaktewater is toegevoegd.

De aanvaardbare limiet (Acceptability Limit, AL) voor een niet gepaarde studie met één categorie is: $ND - PD = 3$. De geobserveerde waarde voor $ND - PD = 1$. Dit geeft aan dat de aanvaardbare limiet niet wordt overschreden.

4.1.2 Studie voor het bepalen van de relatieve detectielimiet (RLOD)

Voor het bepalen van de RLOD zijn analyses uitgevoerd met kweek en Real-time RT-PCR op experimenteel besmette drinkwatermonsters waarbij besmettingen zijn aangebracht op vier niveaus:

- 1^e niveau: 0 KVE/100 ml (n=5)
- 2^e niveau: 0.7 KVE /100 ml (n=20)
- 3^e niveau: 1,5 KVE /100 ml (n=10)
- 4^e niveau: 5 KVE /100 ml (n=5)

De ruwe data van de geanalyseerde monsters is weergegeven in Appendix II de resultaten zijn samengevat in Tabel 6 (*E. faecalis*) en Tabel 7 (*E. faecium*).

TABEL 6. SAMENVATTING VAN DE RESULTATEN VAN ANALYSES OP VERSCHILLENDE BESMETTINGSNIVEAU'S T.B.V DE RLOD BEPALING VOOR *E. FAECALIS*

	positief	negatief
Niveau 1: 0 KVE/100 ml		
Referentie methode	0	5
Alternatieve methode	0	5
Niveau 2: 0,7 KVE/100 ml		
Referentie methode	10	9
Alternatieve methode	6	14
Niveau 3: 1,5 KVE/100 ml		
Referentie methode	8	2
Alternatieve methode	6	4
Niveau 4: 5 KVE/100 ml		
Referentie methode	5	0
Alternatieve methode	5	0

TABEL 7. SAMENVATTING VAN DE RESULTATEN VAN ANALYSES OP VERSCHILLENDE BESMETTINGSNIVEAU'S T.B.V DE RLOD BEPALING VOOR *E. FAECIUM*

	positief	negatief
Niveau 1: 0 KVE/100 ml		
Referentie methode	0	5
Alternatieve methode	0	5
Niveau 2: 0,7 KVE/100 ml		
Referentie methode	10	10
Alternatieve methode	15	5
Niveau 3: 1,5 KVE/100 ml		
Referentie methode	6	4
Alternatieve methode	7	3
Niveau 4: 5 KVE/100 ml		
Referentie methode	5	0
Alternatieve methode	5	0

Voor het berekenen van de RLOD is gebruik gemaakt van het programma op de ISO website (version 2, 2013-11-20). De resultaten van de RLOD berekeningen zijn samengevat in Tabel 8.

TABEL 8. RLOD BEREKENINGEN

Name	RLOD berekeningen						
	RLOD	RLODL	RLODU	b=ln(RLOD)	sd(b)	z-Test statistic	p-value
<i>E. faecalis</i>	1,857	0,857	4,026	0,619	0,387	1,601	0,109
<i>E. faecium</i>	0,578	0,291	1,148	-0,549	0,344	1,598	1,890

De aanvaardbare limiet (Acceptable limit, AL) voor deze ongepaarde dataset is: 2.5. Dit betekent dat, met RLOD's van 1,857 en 0,578 voor respectievelijk *E. faecalis* als *E. faecium*, de RLOD voor detectie van beide soorten acceptabel is. De RLOD voor detectie van *E. faecium* is <1 (0,578), dit betekent dat de LOD van deze methode lager is dan de LOD van de referentiemethode (kweek). De RLOD voor detectie van *E. faecalis* is hoger en >1 (1,857) wat wil zeggen dat de LOD van de RT-PCR voor detectie van *E. faecalis* hoger is dan de LOD van de referentiemethode (kweek). Deze resultaten geven aan dat de LOD voor detectie van *E. faecium* met Real-time RT-PCR lager is dan de LOD voor detectie van *E. faecalis* met Real-time RT-PCR.

4.1.3 Inclusiviteit en exclusiviteit study (5.1.5 in ISO 16140-2:2016)

De inclusiviteit is getest op 57 stammen van intestinale enterococci (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* en *E. hirae* zoals weergegeven in Tabel 3). De exclusiviteit is getest op 30 stammen die niet behoren tot de intestinale enterococci (Tabel 4). De ruwe experimentele data is weergegeven in Appendix III (inclusiviteit) en Appendix IV (exclusiviteit) en de resultaten zijn samengevat in Tabel 9 (inclusiviteit) en Tabel 10 (exclusiviteit).

4.1.3.1 Inclusiviteit

Alle 57 onderzochte stammen van intestinale enterococci zijn positief met Real-time RT-PCR.

TABEL 9. RESULTATEN VAN DE INCLUSIVITEIT TESTS

No.	Naam	Referentie methode	
		Alternatieve methode RT-PCR	S&B + GEAA MALDI-TOF
Positief/Negatief(Pos/Neg)			
1	<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	Pos	Pos
2	<i>E. faecium</i> ATCC 19434	Pos	Pos
3	<i>E. faecium</i> WR63	Pos	Pos
4	<i>E. hirae</i> DSMZ 28619	Pos	Pos
5	<i>E. durans</i> DSMZ 20633	Pos	Pos
6	<i>E. faecalis</i> DSM 20478	Pos	Pos
7	<i>E. hirae</i> DSM 20160	Pos	Pos
8	<i>E. faecalis</i> Vitens 2	Pos	Pos
9	<i>E. faecalis</i> Vos 3/1	Pos	Pos
10	<i>E. faecalis</i> Hooglander 8/3	Pos	Pos
11	<i>E. faecalis</i> Hooglander 10/4	Pos	Pos
12	<i>E. faecalis</i> Hond 7/1	Pos	Pos
13	<i>E. faecalis</i> Hond 11/2	Pos	Pos
14	<i>E. faecalis</i> Mens 1/1	Pos	Pos
15	<i>E. faecalis</i> Mens 4/1	Pos	Pos
16	<i>E. faecalis</i> Vitens 7	Pos	Pos

17	<i>E. faecalis</i> Mens 13/1	Pos	Pos
18	<i>E. faecalis</i> Mens 19/1	Pos	Pos
19	<i>E. faecalis</i> Gans 1/1	Pos	Pos
20	<i>E. faecalis</i> Vitens 1	Pos	Pos
21	<i>E. hirae</i> Vos 12/1	Pos	Pos
22	<i>E. hirae</i> Schaap 1/1	Pos	Pos
23	<i>E. hirae</i> Schaap 4/1	Pos	Pos
24	<i>E. hirae</i> Hooglander 6/1	Pos	Pos
25	<i>E. hirae</i> Hond 8/5	Pos	Pos
26	<i>E. hirae</i> Hond 2/1	Pos	Pos
27	<i>E. hirae</i> Hond 13/7	Pos	Pos
28	<i>E. hirae</i> Mens 10/1	Pos	Pos
29	<i>E. hirae</i> Mens 10/7	Pos	Pos
30	<i>E. faecium</i> Vos 4/1	Pos	Pos
31	<i>E. faecium</i> Vos 6/1	Pos	Pos
32	<i>E. faecium</i> Hooglander 6/3	Pos	Pos
33	<i>E. faecium</i> Hond 8/1	Pos	Pos
34	<i>E. faecium</i> Hond 10/1	Pos	Pos
35	<i>E. faecium</i> Mens 9/1	Pos	Pos
36	<i>E. faecium</i> Mens 18/1	Pos	Pos
37	<i>E. faecium</i> Mens 20/1	Pos	Pos
38	<i>E. faecium</i> Mens 11/4	Pos	Pos
39	<i>E. hirae</i> Vitens 19	Pos	Pos
40	<i>E. hirae</i> Vitens 98	Pos	Pos
41	<i>E. durans</i> Vos 10/1	Pos	Pos
42	<i>E. durans</i> Vos 13/3	Pos	Pos
43	<i>E. hirae</i> Vitens 97	Pos	Pos
44	<i>E. durans</i> Hond 13/3	Pos	Pos
45	<i>E. durans</i> Hond 4/4	Pos	Pos
46	<i>E. durans</i> Hond 8/10	Pos	Pos
47	<i>E. durans</i> Mens 1/2	Pos	Pos
48	<i>E. durans</i> Mens 7/1	Pos	Pos
49	<i>E. durans</i> Mens 7/10	Pos	Pos
50	<i>E. faecium</i> Vitens 35	Pos	Pos
51	<i>E. faecium</i> Vitens 37	Pos	Pos
52	<i>E. faecium</i> Vitens 15	Pos	Pos
53	<i>E. faecium</i> Vitens 16	Pos	Pos
54	<i>E. faecium</i> Vitens 14	Pos	Pos
55	<i>E. faecium</i> Vitens 26	Pos	Pos
56	<i>E. durans</i> Vitens 20	Pos	Pos
57	<i>E. durans</i> Vitens 18-1	Pos	Pos

4.1.3.2 Exclusiviteit

Alle 30 onderzochte bacteriestammen die niet behoren tot de intestinale enterococci zijn negatief met Real-time RT-PCR. Dit is inclusief zeven stammen behorende tot verschillende enterococci soorten: *E. mundtii*, *E. gallinarum*, *E. dispar*, *E. haemoperoxidus*, *E. aquamarinus*, *E. moraviensis* en *E. casseliflavus*.

TABEL 10. RESULTATEN VAN DE EXCLUSIVITEIT TESTS

No.	Naam	Alternatieve methode	Referentie methode	
		RT-PCR	S&B + GEAA	S&B + GEAA MALDI-TOF
Positief/Negatief (Pos/Neg)				
1	<i>Enterococcus mundtii</i>	Neg	Pos	Neg
2	<i>Enterobacter aerogenes</i>	Neg	Neg	Neg
3	<i>Enterobacter cloacae</i>	Neg	Neg	Neg
4	<i>Staphylococcus warneri</i>	Neg	Neg	Neg
5	<i>Staphylococcus aureus</i>	Neg	Neg	Neg
6	<i>Citrobacter freundii</i>	Neg	Neg	Neg
7	<i>Escherichia coli</i>	Neg	Neg	Neg
8	<i>Klebsiella oxytoca</i>	Neg	Neg	Neg
9	<i>Serratia marcescens</i>	Neg	Neg	Neg
10	<i>Kluyvera ascorbata</i>	Neg	Neg	Neg
11	<i>Pantoea agglomerans</i>	Neg	Neg	Neg
12	<i>Cronobacter sakazakii</i>	Neg	Neg	Neg
13	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Neg	Neg	Neg
14	<i>Aeromonas hydrophila</i>	Neg	Neg	Neg
15	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Neg	Neg	Neg
16	<i>Legionella pneumophila</i>	Neg	Neg	Neg
17	<i>Aquaspirillum sp.</i>	Neg	Neg	Neg
18	<i>Salmonella panama</i>	Neg	Neg	Neg
19	<i>Flavobacterium johnsoniae</i>	Neg	Neg	Neg
20	<i>Salmonella typhimurium</i>	Neg	Neg	Neg
21	<i>Legionella anisa</i>	Neg	Neg	Neg
22	<i>Escherichia fergusonii</i>	Neg	Neg	Neg
23	<i>Aeromonas veronii</i>	Neg	Neg	Neg
24	<i>Aerococcus viridans</i>	Neg	Neg	Neg
25	<i>Enterococcus gallinarum</i>	Neg	Pos	Neg
26	<i>Enterococcus dispar</i>	Neg	Neg	Neg
27	<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	Neg	Pos	Neg
28	<i>Enterococcus aquamarinus</i>	Neg	Pos	Neg
29	<i>Enterococcus moraviensis</i>	Neg	Pos	Neg
30	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	Neg	Pos	Neg

4.2 Interlaboratorium onderzoek

Er is er binnen dit project nog geen interlaboratoriumonderzoek uitgevoerd wat voldoet aan de criteria zoals die zijn gesteld in ISO16140-2: 2016. Het is te verwachten dat de methode in de huidige vorm niet wettelijk zal worden geaccepteerd als alternatieve methode voor detectie van intestinale enterococci. Vanwege de hoge kosten voor het organiseren en uitvoeren van een interlaboratoriumonderzoek is er, in samenspraak met de expertgroep RT-PCR, gekozen om een interlaboratoriumonderzoek volgens ISO16140-2: 2016 pas uit te voeren zodra er een aangepaste methode beschikbaar is die in aanmerking komt voor wettelijke acceptatie.

5 Discussie en conclusies

ISO 16140-2:2016 is in deze studie gebruikt voor het valideren van een Real-time RT-PCR methode voor detectie van een fragment van het 16S rRNA gen van intestinale enterococci (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* en *E. durans*). De standaard kweekmethode, zoals beschreven in NEN-EN-ISO 7899-2 is gebruikt als referentiemethode waarbij deze methode is uitgebreid met identificatie van de bevestigde enterococci tot op soortniveau met MALDI-TOF-MS. Voor het monitoren van drinkwaterkwaliteit wordt afwezigheid van indicatororganismen in 100 ml als criterium voor het nemen van beslissingen en daarbij wordt verder geen gebruik gemaakt van kwantitatieve informatie verkregen met de kweekmethode. Daarom zijn de referentiemethode en de alternatieve methode in deze studie beschouwd als kwalitatieve methoden.

De validatiestudie bestaat uit twee fasen:

- Een methode vergelijkende studie: de resultaten hiervan zijn beschreven in dit rapport.
- En interlaboratorium studie: deze is niet binnen dit project uitgevoerd.

5.1 Methode vergelijkende studie

De methode vergelijkende studie bestaat uit drie onderdelen:

- Een gevoeligheidsstudie
- Studie voor het bepalen van de RLOD
- Studie voor het bepalen van de inclusiviteit en exclusiviteit

5.1.1 Een gevoeligheidsstudie

Binnen deze gevoeligheidsstudie worden analyses van gecontamineerde monsters uitgevoerd en aansluitend worden de resultaten van de alternatieve methode vergeleken met de resultaten verkregen met de referentiemethode.

Deze studie is uitgevoerd op kunstmatig besmette drinkwatermonsters waarbij de besmetting is aangebracht door:

- Het mengen van drinkwater van verschillende herkomst met besmet oppervlaktewater afkomstig van diverse locaties tot een concentratie van ca. 5 KVE/100 ml.

De resultaten van deze gevoeligheidsstudie zijn samengevat in Tabel 11.

TABEL 11. SAMENGEVATTE RESULTATEN VAN DE GEVOELIGHEIDSSSTUDIE

Parameter	Waarde
Gevoeligheid voor de alternatieve methode	96,7%
Gevoeligheid voor de referentie methode	100%
Relatieve juistheid	98,4%
ND-PD (Acceptability Limit, Aanvaardbare limiet = 3)	1

De gevoeligheid voor de alternatieve methode (96,7%) is lager dan de gevoeligheid voor de referentiemethode (100%). Dit verschil is het gevolg van één monster waarin geen signaal werd gedetecteerd en wel enterococci werden gekweekt. De concentratie enterococci in dit monster (Monster "Meng17", Appendix I) was slechts 1 KVE/100 ml zodat het, op basis van statistische verdeling van de cellen, goed mogelijk is dat in de 100 ml fractie die in bewerking is genomen voor Real-time RT-PCR geen cel aanwezig was.

De aanvaardbare limiet voor Negatieve Deviatie (ND) – Positieve Deviatie (PD) voor deze niet gepaarde studie is 3. In deze studie is $ND-PD = 1$ waardoor wordt voldaan aan de aanvaardbare limiet waarmee wordt aangegeven dat de alternatieve en de referentiemethode een afwijking vertonen die binnen de aanvaardbare limiet valt.

5.1.2 Een studie voor het bepalen van de relatieve detectielimiet (RLOD)

De bepaling van de RLOD's voor detectie van *E. faecium* en *E. faecalis* zijn apart uitgevoerd omdat deze beide soorten in de Real-time RT-PCR worden gedetecteerd met verschillende primerparen en er daardoor mogelijk een verschil in RLOD te verwachten is. Voor het bepalen van de RLOD's zijn er analyses uitgevoerd op drinkwatermonsters welke zijn gecontamineerd met *E. faecium* en *E. faecalis* op vier contaminatieniveaus (5; 1,5; 0,7 and 0 KVE/100 ml) waarbij gebruik gemaakt is van Vitroids® referentie materiaal. De RLOD voor detectie van *E. faecalis* is 1,857 (95% betrouwbaarheidsinterval: 0,857-4,026) en de RLOD voor detectie van *E. faecium* is 0,578 (betrouwbaarheidsinterval: 0,291-1,148). De aanvaardbare limiet is 2,5 zodat de RLOD's voor detectie van beide enterococci soorten voldoen aan deze limiet. Het is opvallend dat de RLOD voor detectie van *E. faecalis* duidelijk hoger is dan de RLOD voor detectie van *E. faecium*. De hogere RLOD voor detectie van *E. faecalis* suggereert dat *E. faecalis* minder gevoelig kan worden gedetecteerd met de Real-time RT-PCR dan *E. faecium*. Bovendien geeft de RLOD van >1 aan dat *E. faecalis* minder gevoelig kan worden gedetecteerd met Real-time RT-PCR dan met de referentiemethode. Het is echter niet duidelijk waardoor dit verschil veroorzaakt wordt. Mogelijk dat de PCR voor detectie van *E. faecalis* minder efficiënt verloopt dan de PCR voor detectie van *E. faecium* waardoor lage concentraties minder goed detecteerbaar zijn. Voor vervolgonderzoek wordt geadviseerd om eerst te onderzoeken in hoeverre er verschillen zijn in de efficiëntie van de beide PCR-methoden en afhankelijk daarvan te onderzoeken of er mogelijkheden zijn om geoptimaliseerd primersequenties te ontwerpen.

5.1.3 Inclusiviteit/exclusiviteit

Alle 57 (100% inclusiviteit) onderzochte intestinale enterococci stammen zijn positief met Real-time RT-PCR methode en de 30 onderzochte bacteriestammen die niet behoren tot de intestinale enterococci zijn negatief (100% exclusiviteit) met Real-time RT-PCR. Het is daarbij opvallend dat ook de onderzochte enterococci stammen die niet behoren tot de intestinale enterococci soorten (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans* en *E. hirae*) negatief zijn met de Real-time RT-PCR.

5.2 Conclusies

De resultaten van deze studie laten zien dat de gevoeligheid, RLOD, inclusiviteit en exclusiviteit van de Real-time RT-PCR voor detectie van intestinale enterococci (*E. faecalis*, *E. faecium*, *E. hirae* en *E. durans*) voldoet aan de criteria zoals beschreven in ISO16140-2: 2016. Voor vervolgonderzoek wordt aanbevolen om de methode aan te passen zodat detectie mogelijk wordt van alle enterococci soorten die van fecale herkomst kunnen zijn en kunnen worden aangetroffen in drinkwater.

6 Referenties

- Heijnen, L. (2017) Validation of an RT-PCR method for rapid detection of *E. coli* in distributed drinking water. KWR report KWR 2017.098.
- Huijsdens, X.W., Linskens, R.K., Mak, M., Meuwissen, S.G.M., Vandenbroucke-Grauls, C.M.J.E. and Savelkoul, P.H.M. (2002) Quantification of Bacteria Adherent to Gastrointestinal Mucosa by Real-Time PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 40(12), 4423-4427.
- Martins, M.T., Rivera, I.G., Clark, D.L., Stewart, M.H., Wolfe, R.L. and Olson, B.H. (1993) Distribution of uidA gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of beta-glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl-beta-D-glucuronide media. *Appl Environ Microbiol* 59(7), 2271-2276.
- Schets, F.M. and Havelaar, A.H. (1991) Comparison of indole production and β -glucuronidase activity for the detection of *Escherichia coli* in a membrane filtration method. *Letters in Applied Microbiology* 13(6), 272-274.
- Taucer-Kapteijn, M., Hoogenboezem, W., Hoogenboezem, R., de Haas, S. and Medema, G. (2017) Source tracking of *Enterococcus moraviensis* and *E. haemoperoxidus*. *J Water Health* 15(1), 41-49.
- WHO (2017) Guidelines for drinking-water quality: Fourth edition incorporating the first addendum. WHO publication.

Appendix I Protocol Real-time RT-PCR voor detectie intestinale enterococci

I.1 Isolation of nucleic acid from water samples

Isolation of RNA for consecutive molecular biological research

1. **Subject**

This protocol describes a non-proprietary method for the isolation of RNA from drinking water.

2. **Application**

This protocol applies to the isolation of RNA from drinking water.

3. **Principle**

RNA has a short lifespan, especially outside the cell. Only active cells produce large quantities of RNA. Hence RNA is ideally used for the detection of active micro-organisms. The sample is filtered through a suitable membrane filter. The bacterial RNA is then isolated from the filter, purified and eluted in a buffer.

4. **Definitions**

DNA sequence

A DNA-strand is made up of separate nucleotides. Each nucleotide consists of a phosphate group, a sugar (deoxyribose) and a base. A DNA-strand is built from a sequence of four possible nucleotides (guanine, cytosine, adenine and thymine). This sequence determines the genetic information (Fig. 1). The nucleotide sequence of a DNA-strand is called DNA-sequence.

RNA-sequence

An RNA strand is made up of separate nucleotides. Each nucleotide consists of a phosphate group, a sugar (ribose) and a base. A DNA-strand is built from a sequence of four possible nucleotides (guanine, cytosine, adenine and thymine). This sequence determines the genetic information (Fig. 1). The nucleotide sequence of an RNA strand is called RNA-sequence. RNA is a single stranded copy of the DNA and is used as a code for protein synthesis.

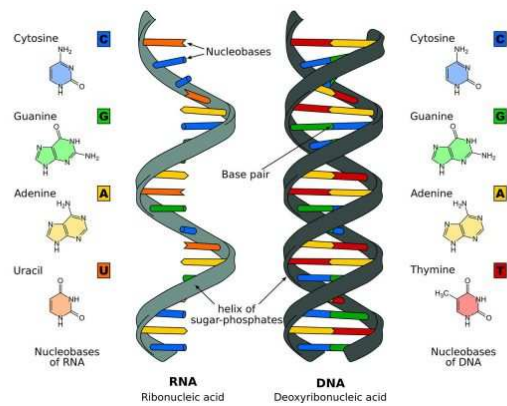


Fig. 1. (Spunk / Wikimedia Commons / CC BY-SA 3.0) Double-stranded DNA consisting of nucleotides whose sequence determines the genetic code and which, according to the key-lock principle, serve as a template in DNA amplification. A single-stranded copy of DNA, RNA, is made in the cell. RNA moves freely in the cell and is used as a template for protein synthesis.

RNA-template

An RNA-template is a specific RNA-fragment that serves as a template for DNA amplification during Reverse Transcriptase (as, for example, in the protocol "Analysis of *E. coli* based on Real-time RT-PCR").

5. Reagents

5.1 DNA/RNA/DNase/RNase-free water

5.2 Positive control of the target genus or organism

Add 50 cfu of the control strain to 100 ml of DNA/RNA/DNase/RNase-free water (5.1)

5.3 TE-Buffer

5.4 Lysozyme 10 mg/ml

5.5 Lysis buffer, e.g. NucliSENS Biomerieux

5.6 Extraction of reagents, e.g. NucliSENS Magnetic Extraction Reagents Biomerieux:

Magnetic Silica beads
Wash Buffer 1
Wash Buffer 2
Wash Buffer 3
Elution Buffer

6. Equipment and tools

6.1 Laboratory gloves, latex and powder free.

6.2 Calibrated micropipettes of various volumes.

6.3 Sterile DNase/RNase-free barriertips of various volumes.

6.4 PCR tubes / 96-well plates and sealing

6.5 Micro-centrifuge

6.6 Thermomixer

- 6.7 Vortex
- 6.8 UV-cabinet, DNA-free
- 6.9 UV-cabinet in which DNA-material is used.
- 6.10 Centrifuge
- 6.11 Real-time PCR device
- 6.12 Safe-lock tubes (Eppendorf tubes)
- 6.13 Filtration funnel with a polycarbonate membrane (Ø47mm and 0.4µm pore size)
- 6.14 Membrane filtration setup
- 6.15 Magnetic rack or magnetic pen
- 6.16 Inoculation loops
- 6.17 Optional: suction pump
Optional: DNA extraction robot, e.g. KingFisher mL. Thermo Electron. This protocol describes how to perform the analysis using the KingFisher mL.

7. Method

7.1 Control samples

Method blank

Each analysis run includes a method blank to check for RNA contamination. The sample consists of 100 ml of DNA/RNA/DNase/RNase-free water (5.1) that will be analysed exactly as the other samples.

Positive control

For each analysis run a positive control sample (5.2) is analysed. exactly as the other samples.

7.2 RNA isolation:

There are many different DNA/RNA extraction kits available. When selecting a kit, it is important to test whether the RNA yield is adequate and that there is no contamination of RNA from the organism of interest present in the products of the kit.

The protocol described here uses the NucliSENS extraction kit (Biomerieux) and is based on the procedure described by the supplier of the NucliSENS kit (Biomerieux).

8.2.1 Lysis

- Filter 100 ml sample through a 0.4 µm filter.
- Fold the filter as shown in figure 2.

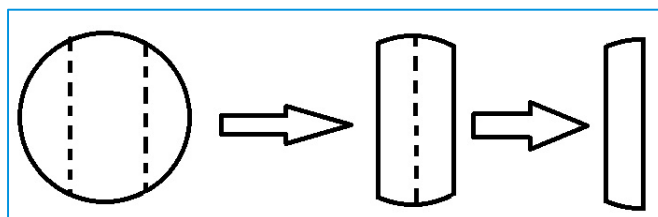


Figure 2: Folding the filter.

- Transfer the filter into an Safe lock tube (6.1.2).
- Add 1 ml of sample to the filter. For the controls, add 1 ml of DNA/RNA/DNase/RNase-free water (5.1) to the filter (6.12).
- Add 10 µl of lysozyme (10mg/mL) to each tube (5.4).
- Vortex for 10 sec.
- Place the tubes at 37 °C for 30 minutes.

Remark:

The operations described above are essential for RNA isolation of gram-positive bacteria, such as enterococci. However, this procedure is also applicable for gram-negative bacteria like *E. coli*.

- For each sample and control, centrifuge the lysis tube at 2700rpm for 30 seconds to remove the solution from the cap.
- Open the safe lock tube and transfer the entire contents to the lysis tube.
- Vortex for 30 seconds.
- Incubate for 15 minutes at room temperature.
- Vortex for 30 seconds.
- Fix the filter between the lid and the tube, using an inoculation loop.
- Centrifuge the tubes at 2700rpm for 30 seconds.
- Remove and dispose the filter.

8.2.2 Binding

- Vortex the silica suspension
- Add 50 µl of magnetic silica suspension to each sample.
- Keep the silica in a homogeneous suspension by vortexing it briefly before each addition.
- Incubate for 15 minutes at room temperature.

8.2.3 Transfer into the Kingfisher

For each sample, take a Kingfisher mL Tube Strip and prepare with the following buffers.

- Tube A: 350 µl Wash Buffer 1 (Optionally including magnetic silica, see 8.2.4)
- Tube B: 350 µl Wash Buffer 1
- Tube C: 500 µl Wash Buffer 2
- Tube D: 500 µl Wash Buffer 2
- Tube E: 500 µl Wash Buffer 3

8.2.4 Washing

Transfer the magnetic silica to tube A of the KingFisher Tube strip using the magnetic pen. Alternatively, centrifuge the lysis tube for 2 minutes at 2700 rpm, open the lysis tube and remove the supernatant, add 350 µl Wash buffer 1. Transfer the contents of the tube (magnetic silica and 350 µl Wash buffer 1) to tube A of the Kingfisher tube strip. Place the tube strip in the rack and the tube-rack in the KingFisher.

8.2.5 Starting the KingFisher mL

Place the Kingfisher mL Tip Comb in the Kingfisher to protect the magnetic rods.

- Start the Kingfisher program.
- Meanwhile, prepare a new KingFisher mL Tube Strip for each sample: Tube A: During the break of the Kingfisher protocol, change the strips and press start to resume the protocol and transfer the silica with elution buffer from tube A into a cup.
- Alternatively, prepare a Safe lock tube (6.12) with 50µl of elution buffer for each sample. Once the KingFisher mL protocol has ended, take the tube strips from the device and use the magnetic pen to transfer the silica into the appropriate Safe lock tube with elution buffer.

8.2.6 Elution

- Incubate for 5 minutes at 60 °C and 1400rpm in the thermomixer (6.6).
- Place the tubes in a magnetic rack.
- Pipette the eluate, without silica, into a clean Safe lock tube (6.12).

The eluate, DNA/RNA in a buffered solution, is used for consecutive molecular biological analysis, such as Real-time (RT-)PCR. It can be stored in a freezer (-70 ± 10) °C.

I.2 Real-time RT-PCR for specific detection of *E. coli*

1. **Subject**

This protocol describes a non-proprietary method for detection of the presence or absence of intestinal enterococci (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* en *E. durans*) in water using Real-time Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (Real-time RT-PCR).

2. **Application**

This method applies to the determination of the presence or absence of intestinal enterococci ribosomal RNA in water. The lower analysis limit is 1 cfu/100 ml, unless the nature or the volume of disruptive components in the matrix interfere with the determination (PCR efficiency).

3. **Terms and definitions**

DNA sequence

A DNA-strand is made up of separate nucleotides. Each nucleotide consists of a phosphate group, a sugar (deoxyribose) and a base. A DNA-strand is build from a sequence of four possible nucleotides (guanine, cytosine, adenine and thymine). This sequence determines the genetic information (Fig. 1). The nucleotide sequence of a DNA-strand is called DNA-sequence.

RNA-sequence

An RNA strand is made up of separate nucleotides. Each nucleotide consists of a phosphate group, a sugar (ribose) and a base. A DNA-strand is build from a sequence of four possible nucleotides (guanine, cytosine, adenine and thymine). This sequence determines the genetic information (Fig. 1). The nucleotide sequence of an RNA strand is called RNA-sequence. RNA is a single stranded copy of the DNA and is used as a code for protein synthesis.

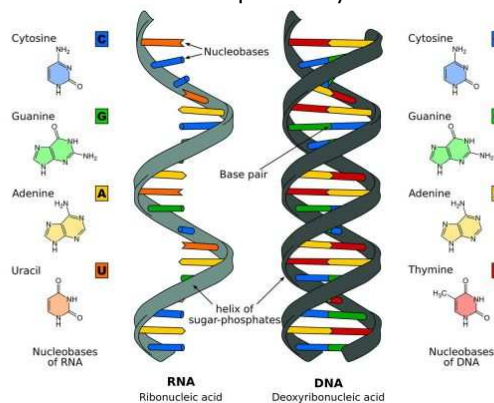


Fig. 1. (Sponk / Wikimedia Commons / CC BY-SA 3.0) Double-stranded DNA consisting of nucleotides whose sequence determines the genetic code and which, according to the key-lock principle, serve as a template in DNA amplification. A single-stranded copy of DNA, RNA, is made in the cell. RNA moves freely in the cell and is used as a template for protein synthesis.

Reverse Transcription

In Reverse Transcription, RNA is converted into complementary DNA (cDNA). cDNA is more stable than RNA and can be used in consecutive molecular biological

analyses, such as Real-time PCR. Reverse Transcriptase is the enzyme that converts target RNA into cDNA. The HawkZ05 Fast One-step RT-PCR Master mix contains Reverse Transcriptase.

PCR cycle

In a single PCR cycle, the DNA template of interest is doubled. Each cycle covers three successive phases: denaturation (double-stranded DNA is split into single-stranded DNA), annealing (primer and probe annealing) and elongation (formation of new DNA strands).

Note

Appendix 1 shows the course of a Real-time PCR cycle in schematic form and describes it in more detail.

Reverse Transcriptase Real-time PCR

PCR or polymerase chain reaction is a technique which amplifies a fragment of DNA, specific to a particular organism (DNA template). Real-time Reverse Transcriptase (RT) PCR is a technique whereby, prior to conventional PCR amplification, all RNA present is converted into cDNA (complementary DNA), which then serves as a target for subsequent PCR amplification. The addition 'Real-time' refers to the way of obtaining the result of the PCR reaction, i.e. the multiplication of the specific DNA fragment can be followed during the analysis on a computer screen of the PCR measuring device.

Note

Appendix 2 shows the process of a Reverse Transcriptase Real-time PCR analysis in schematic form and describes it in more detail.

Taq polymerase

The specific multiplication of the DNA template takes place at relatively high temperatures. Therefore, Taq-polymerase is used, which is a naturally thermostable enzyme obtained from the bacterium *Thermus aquaticus* and occurs in hot water sources and geysers. The HawkZ05 Fast One-step RT-PCR Master mix contains Taq-polymerase.

Primers (reverse and forward)

Single-stranded DNA fragments (oligonucleotides) which serve as a starting point for reverse transcription and DNA amplification. The sequence of the primers determines which DNA template is produced. The length of a primer varies between 15 and 30 nucleotides. The reverse and forward primers each attach to one of the two complementary (matching) DNA or RNA strands.

Probe

A probe is a single-stranded DNA fragment, labelled with a fluorescent dye. Additionally, each probe has a molecule attached to it that extinguishes the fluorescent signal (quencher). Taq-polymerase is able to degrade a probe so that the dye and quencher disconnect and the fluorescent signal can be detected with the aid of a Real-time PCR device.

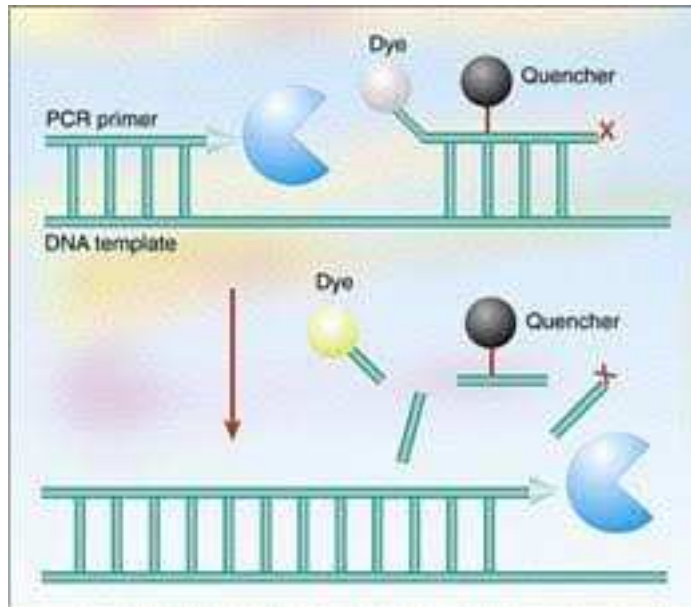


Fig. 2. Schematic representation of a fluorescent probe in action.

RNA-template

An RNA template is a specific RNA-fragment that serves as a template for DNA amplification during Real-time PCR. The target RNA, which is used to detect *E. coli*, is located on the 16S ribosomal RNA gene. DNA formed in the Real-time RT-PCR is 97 base pairs long. The forward primer attaches at nucleotide position 369-388 and the reverse primer at nucleotide position 444-464, while the probe attaches at position 411-441.

Cq-value

The quantification-cycle value is the number of PCR cycles needed to multiply the DNA exponentially, at which point the graph exceeds the detection limit (threshold). The threshold line represents the detection limit above which the fluorescent signal is detected. The Cq-value is the intersection of the graph representing the number of fluorescence units with the detection limit (Fig. 3). The threshold line is placed at the point where the S-curves rise fastest.

One-step Real-time Reverse Transcriptase PCR amplification mix

An Real-time RT-PCR amplification mix is a mix that contains all the components necessary to convert target RNA into cDNA and trigger the subsequent PCR reaction. An Real-time RT-PCR amplification mix consists of:

- master mix;
- primers (forward and reverse);
- probe;
- elution buffer

Two-step Reverse Transcriptase Real-time PCR

Alternatively, the conversion of RNA into cDNA, and the PCR reaction to this cDNA, proceed in two separate steps. In this case, a cDNA synthesis mix and a separate real time PCR amplification mix are used.

cDNA synthesis mix

A cDNA synthesis mix contains all the components necessary to convert target RNA into cDNA. A cDNA synthesis mix contains:

- Reverse transcriptase mix
- random hexamer primers
- PCR water

Real time PCR amplification mix

A Real-time RT-PCR amplification mix contains all the components necessary to allow target cDNA to multiply in a Real-time RT-PCR reaction. A Real-time RT-PCR amplification mix consists of:

- Master mix;
- Primers (forward and reverse);
- Probes;
- Elution Buffer or PCR water.

Inhibition

The RNA isolate of the sample may contain small residues of the substances present in the water. Some of these substances may adversely affect the PCR reaction, reducing the efficiency of the target-DNA production. If this occurs, there is inhibition. This analysis includes a control to determine the degree of inhibition in the PCR reaction.

4. Point of departure

RNA has a short lifespan, especially outside the cell, and is only produced in large quantities in active cells. It is, therefore, used for the molecular biological detection of active micro-organisms. In the analysis described here, Reverse Transcriptase is used to convert it into cDNA. This cDNA can then be detected in the Real-time PCR analysis of *E. coli*. This method is aimed at determining the presence or absence of intestinal enterococci as in one or more cfu per 100 ml.

5. Safety

In addition to the usual safety measures, take the following into account: working with micro-organisms carries a number of risks.

6. Controls

7.1 First-line control

In addition to the analysis sample, first-line controls are included, all of which are prepared according to protocol 'Research into *E. coli* & Intestinal enterococci based on Reverse Transcriptase PCR (RT-PCR): RNA Isolation and extraction'. The RNA solutions obtained through the above protocol are used as starting material for the RT-PCR.

7.2 Mix control

For each batch of amplification mix, a duplicate mix control is used. No template is added to the mix control. For the mix control, the Cq value should be greater than or equal to 35 cycles.

Note

If the result does not meet this requirement, the prepared amplification mix has been contaminated. Determine the cause and the consequences this has had for the analysed samples. If the amplification mix is indeed found to be contaminated, the RNA isolates examined with this amplification mix must be repeated.

7.3 Positive control

Per PCR plate, two positive controls are used. When the wells are injected, 2.0 µl RNA isolate derived from intestinal enterococci is added for the purpose of the positive control. The positive control must have a Cq value between 24 and 30 cycles.

Note

If the result does not meet the requirement, identify the cause and determine the consequences for the analysed samples of the entire PCR plate.

7.4 Blank control

Per PCR plate, two blank controls are used. To this end, an RNA isolate is made from 100 ml of PCR water. When injecting, 2.0 µl RNA isolate from the blank control is added to the negative control well. The blank controls must have Cq values greater than or equal to 35 cycles.

Note

If the blank control result does not meet the requirement, identify the cause and determine the consequences for the analysed samples of the entire PCR plate.

7.5 Inhibition control

This control determines whether any inhibition of the PCR reaction caused by the RNA isolates is permissible. All RNA isolates are used in quadruple. Per RNA isolate, one duplicate is analysed without further additives in order to determine the presence or absence of intestinal enterococci. 1 µl of the RNA isolate for the positive control is added to the other duplicates. In order to determine whether any inhibition that has taken place is permissible, the duplicates of the sample with added positive control are compared with the positive control.

Note

If no RNA of intestinal enterococci was found in the relevant sample, this might be due to the inhibition of the PCR reaction, and the result should be considered unreliable. Intestinal enterococci shall then have to be determined again through the culture method. If, on the other hand, RNA of intestinal enterococci is found in spite of the inhibition, the result can be considered as reliable. The inhibition may have affected the PCR, but not enough to negate reliable measurement.

7.6 Second-line control

Each year, a comparative study is conducted in which the results of the Real-time RT-PCR for intestinal enterococci are interpreted by individual analysts for one or more samples, using samples with an concentration of intestinal enterococci of 3 to 10 cfu/100 ml. In case of deviating results, a subsequent cause analysis should lead to improvement. The results of this second-line control are evaluated and recorded in writing.

7.7 Third-line control

For this type of analysis collaborative studies for Reverse Transcriptase Real-time PCR are conducted. In case of deviating results, a subsequent cause analysis should lead to improvement. The results of this second-line control are evaluated and recorded in writing.

7. Reagents

Only use reagents and chemicals of a quality suitable for PCR, unless otherwise stated. Said reagents and chemicals can be stored for up to two years after preparation or opening, unless otherwise stated. If no storage conditions are specified, store at room temperature.

a. RNase away

RNase away is a cleanser that removes RNase and DNA from surfaces and pipettes. It is used to clean the UV cabinets, worktops, pipettes and filtration banks before RNA isolation begins.

b. Water (H₂O), sterile UPW

c. Elution Buffer

d. Primers and Probe for intestinal enterococci.

The stock solution of primers and probes (100 µM) is stored at (-18 ± 3) °C for 2 years. Before use, the stock solution should be diluted with PCR water to a concentration of 10 µM. The working solution is stored in a refrigerator at (5 ± 3) °C for 3 months.

Forward primers:

F1 *hirae-faecium*. Sequentie: 5'-TCC ACC GGA AAA AGA GGA GT-3'

F2 *durans*. Sequentie: 5'-TCC ACC GGA AAA AGA AGA GT-3'

F3 *faecalis*. Sequentie: 5'-CTC AAT TGG AAA GAG GAG TGG-3'

Reverse primer:

R1 *hir-dur-fae-fae*. Sequentie: 5'- ATC AGC GAC ACC CGA AAG -3'

Probe:

Enterococ PR. Sequentie: 5'-CTT GGA AAC AGG TGC TAA TAC CG-3'

The probe should have a fluorophore (e.g. FAM) on the 5' and a suitable quencher on the 3', e.g. BHQ1.

Note: Probes should be, as much as possible, protected from light. Light may affect the fluorescent dye attached to the probe. If this happens, the maximum fluorescence cannot be achieved. Once the amplification mix has been transferred to a PCR plate, it should be used as soon as possible for the further running of the procedure.

e. cDNA synthesis and amplification mix (see section 4 for definitions).

Described below are examples of how to prepare the amplification mix. The user is free to use another cDNA synthesis or (RT)-PCR mix.

i. Two-Step Real-time RT-PCR: Biorad Sensifast kit

1. Reverse Transcriptase chemicals for the conversion of RNA into cDNA.

The composition of Biorad Sensifast RT PCR chemicals per reaction.

Component	For each reaction
5x Transamp Buffer	4 µl
Reverse Transcriptase	1 µl
Water (8.2)	10 µl
Elution buffer with RNA	5 µl
Total	20 µl

2. Real-time PCR

For the PCR, the following mix composition per reaction is used:

Component	For each reaction
2x SensiMix II Probe No-ROX	25 µl
Forward primer F1 (10 uM)	0,7 µl
Forward primer F2 (10 uM)	0,7 µl
Forward primer F3 (10 uM)	0,7 µl
Reverse primer R1 (10 uM)	2 µl
Ecoli 16S Probe (10 uM)	1 µl
Water (PCR grade)	15.9 µl
cDNA solution	4 µl
Total	50 µl

8. **Equipment and tools**

- a. Membrane filtration setup
The membrane filtration setup used must be sterile and free of DNA/DNase/RNA/RNase. For this purpose, the membrane filtration unit is autoclaved on a weekly basis and cleaned with RNase away before every RNA isolation.
- b. Refrigerator, set at $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$
- c. Freezer set to $(-18 \pm 3) ^\circ\text{C}$
- d. Biological material; Positive control:
Vitroids containing 50 cfu of *Enterococcus faecium* are used as positive control.
- e. Laboratory gloves, powder-free.
- f. Calibrated micropipettes with various volumes.
- g. Sterile DNase/RNase-free barrier tips with various volumes.
- h. 96-well plates and sealing
- i. Micro centrifuge
- j. Vortex
- k. UV cabinet for operations without free DNA/RNA material.
- l. UV cabinet for operations with free DNA/RNA material.
- m. Real-time PCR Device
- n. 0.2 ml safe-lock tubes

9. **PCR programs**

- 10.1 The PCR program for One-Step Real-time RT-PCR (when using Roche chemicals (8.5.2)).

Thermal profile:

- 55°C 05:00 minutes Tm low
- 60°C 05:00 minutes Aptamer dissociation
- 65°C 05:00 minutes Tm high (Secondary structures)
- 50* (92°C/00:05 → 61°C/00:40 → 72°C/00:01) Amplification

10.2 Equipment settings for the Two-Step Real-time RT-PCR (when using Bioline chemicals (8.5.1)).

For cDNA Synthesis, use the following program on the PCR device (9.13):

- 25°C 10:00 minutes Primer annealing.
- 42°C 15:00 minutes Reverse transcription
- 85°C 05:00 minutes Inactivation
- 4°C Hold

For the Real-time RT-PCR, use the following program:

- 95°C 10:00 minutes Polymerase activation
- 40* (95°C/00:10s and 62°C/00:10s + Plate read)

10. Sample analysis

Preferably begin the analysis immediately after sampling. If this is not possible, store the sample at $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ and process it within 24 hours.

11.1 Procedure for the preparation of the PCR plate

Prepare the cDNA synthesis/amplification mixes shortly before use.

- When using a two-step Real-time RT-PCR: Take a 96-well plate and pipette the required amount of cDNA Synthesis mix (8.5.1) for each sample into a well. The number of wells to be filled is the number of samples plus three (for the blank, positive and cDNA synthesis mix controls). Add the necessary amount of RNA solution, centrifuge the plate at 2000 rpm for 30 seconds and run the cDNA synthesis reaction in the PCR machine as described by the manufacturer of the cDNA synthesis kit (for an example, see 9).
- For both methods (using mix 8.5.1 or 8.5.2.): Pipette the necessary amount of (RT)-PCR mix into the wells to be used in a 96-well plate. The number of wells to be filled is the number of samples times four plus six (one-step Real-time RT-PCR) or eight (two-step Real-time RT-PCR) wells for the controls
- Transfer, in quadruplicate, the required amount of DNA or RNA solution obtained from sample material to a well with amplification mix.
- Also, add 1.0 μl RNA solution from the first-line control to two of these four wells. Add this to the samples and the blank, not to the control sample.
- The negative, blank and positive controls are analysed in duplicate.
- In the two-step method, a cDNA synthesis mix control is also used in duplicate.
- Centrifuge the 96-well plate for 30 seconds at 2000 rpm in the plate or spin centrifuge.
- Place the PCR plate into the machine and start the appropriate PCR temperature program (for an example, see 9).

12. Waste processing

Dispose of the microbiological waste and PCR plates in the appropriate waste drums.

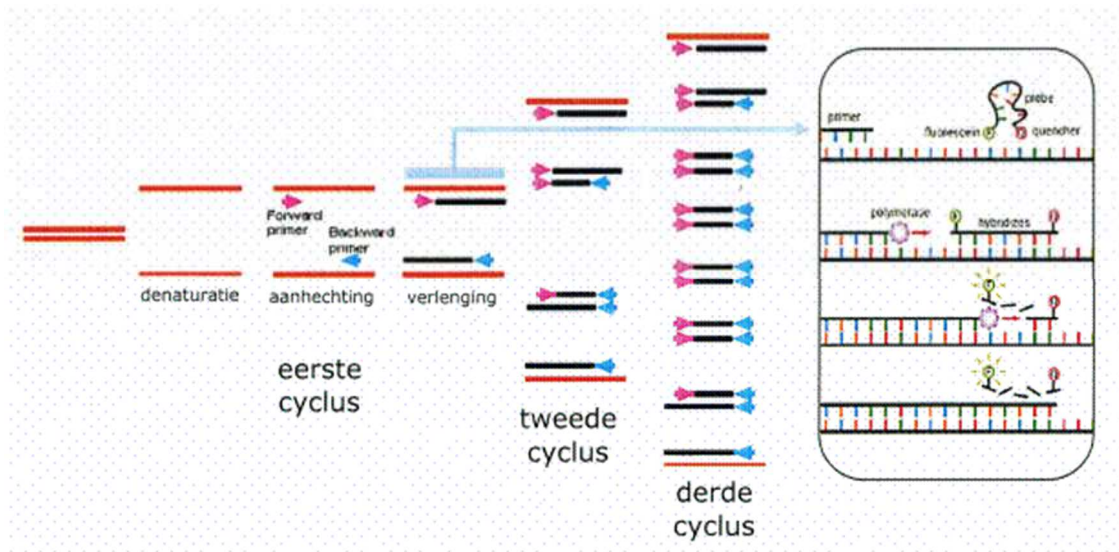
13. Literature

- NPR 6268: Algemene principes bij kwaliteitsborging van bacteriologisch onderzoek van water.
- Nederlandse Vereniging voor Microbiologie, Veilig werken met micro-organismen, parasieten en cellen in laboratoria en andere werkruimten 4^e druk, 2010.
- *Huijsdens, X.W., Linskens, R.K., Mak, M., Meuwissen, S.G., Vandenbroucke Grauls, C.M. and Savelkoul, P.H. (2002) Quantification of bacteria adherent to gastrointestinal mucosa by realtime PCR. J. Clin. Microbiol. 40, 4423-4427.*

14. Appendices

Appendix 1: Schematic representation of the consecutive PCR cycles

Appendix 2: Schematic representation of the Reverse Transcriptase PCR.



The different PCR cycles are shown in the figure above. The PCR reaction proceeds in three separate steps per cycle.

Step 1: Denaturation

The helical structure of the double-stranded DNA is lost by heating at 95 °C. This results in two complementary (opposite) DNA strands. The DNA polymerase is also activated during this step. The DNA polymerase is an enzyme complex involved in DNA replication (steps 2 and 3).

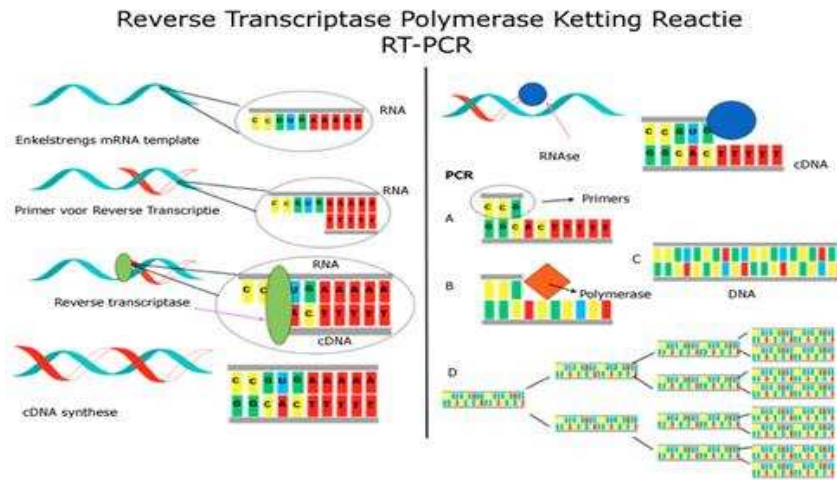
Step 2: Attachment

At a temperature between 50 and 70 °C, the probe and the primers attach to both DNA strands. The probe attaches to the DNA molecule at a specific location and depends on the DNA sequence (target DNA). The 5' end of the forward primer binds to the 3' end of the single-stranded DNA molecule. The 5' end of the reverse primer binds to the 3' end of the other complementary DNA molecule. The DNA polymerase binds to the 3' ends of both primers and now begins to extend both DNA strands, using the (externally added) nucleotides in the amplification mix.

Step 3: Extension

At a temperature of approximately 70 °C, both DNA strands are further extended. When the DNA polymerase encounters the probe, it is degraded. As long as the probe remains intact, the fluorescent signal of the dye is extinguished by the quencher. At the moment that the probe is degraded, the distance between the dye and the quencher increases. This allows the fluorescent signal of the dye to be detected with the aid of Real-time PCR equipment.

As a result of the above steps, two identical DNA strands have emerged. Each PCR run covers approximately 35 cycles. At the end of a run, exponential multiplication will have resulted in a great many copies of the same DNA template. Together with the increase of the DNA template, the fluorescent signal increases.



Step 1: RNA isolation (not in diagram)

The total single-stranded RNA is isolated from water. To this end, water is filtered, and the filter is placed in a lysis buffer. In this buffer, the existing cells are disrupted. DNA and RNA then bind to the added silica. The silica with attached nucleic acids undergoes a sequence of extraction steps, leaving eluted purified RNA (dissolved in a buffer).

Step 2: Attachment

The buffered RNA is added to the Real-time RT-PCR amplification mix. The amplification mix contains primers for reverse transcription, which bind to the RNA template (in this case the *E. coli* 16S rRNA).

Step 3: Reverse Transcription

The primers serve as the binding place and starting point of the Reverse Transcriptase enzyme. This enzyme turns RNA into cDNA (complementary DNA). It copies the RNA code and produces the complementary RNA strand in DNA form. This is the reverse process of what normally happens in the cell, where the DNA forms the template for RNA production. The process within the cell is called transcription. Hence the name 'reverse transcription' for the artificial, reverse process performed in this analysis.

Step 4: Degradation of RNA

The RNA of interest has been copied to cDNA. RNA and cDNA together form a double helix of complementary strands. This type of double helix is inert and cannot be used any further in the molecular biological analysis. The part of the helix that has our interest is cDNA. RNA in the double helix, as well as the remaining RNA in solution, are degraded by an enzyme called RNase.

Step 5: PCR

In order to make cDNA demonstrable, it is further multiplied to detectable amounts by the PCR. The workings of the PCR are shown schematically in Appendix 1.

Appendix I Ruwe data gevoeligheids studie

Monster	Drinkwater	Oppervlaktewater	RT-PCR				Kweek	
			Cq 1	Cq 2	Cq gem	Pos/Neg	Pos/Neg	KVE/100 ml
DW 1	Wijk bij Duurstede (KWR)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW 2	Vianen (KWR)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW 3	Amersfoort (KWR)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW 4	Houten (KWR)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW 5	Nieuwegein (KWR)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW 6	Ps. Weesperkarspel-Rein (HWL)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW 7	Ps. Leiduin-Rein (HWL)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW 8	Ps. Katwijk-Rein (HWL)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW9	Ps. Scheveningen-Rein (HWL)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW10	Ps. Andijk-Rein (HWL)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW11	Meppel (Vitens)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW12	Vollenhove(Vitens)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW13	Garijp (Vitens)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW14	Burgum (Vitens)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW15	Zwolle (Vitens)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW16	Leeuwarden (Vitens)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW17	Scharmer (WLN)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW18	Assen (WLN)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW19	Wildervank (WLN)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW20	Groningen (WLN)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW21	Makkum (WLN)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW22	Ijsselstein (KWR)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW23	Meteren (KWR)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW24	Wageningen (KWR)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW25	WPC Balen (Pidpa)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW26	Wijnegem (Pidpa)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW27	Essen (Pidpa)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW28	Westerlo (Pidpa)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW29	Dordrecht (AqZ)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW30	Vuren (AqZ)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW31	Tilburg (AqZ)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
DW32	Werkendam (AqZ)		N/A	N/A	N/A	Neg	Neg	0
Meng 1	DW1	Bellingerweer Dalfsen (Vitens)	35.3	34.4	34.8	Pos	Pos	5
Meng 2	DW2	Bellingerweer Dalfsen (Vitens)	35.1	34.5	34.8	Pos	Pos	2
Meng 3	DW3	Bellingerweer Dalfsen (Vitens)	36.3	36.2	36.2	Pos	Pos	7
Meng 4	DW5	Bellingerweer Dalfsen (Vitens)	34.7	34.6	34.7	Pos	Pos	3
Meng 5	DW1	Vecht Dalfsen (Vitens)	34.9	34.9	34.9	Pos	Pos	1
Meng 6	DW2	Vecht Dalfsen (Vitens)	31.6	31.6	31.6	Pos	Pos	5
Meng 7	DW4	Vecht Dalfsen (Vitens)	34.6	34.6	34.6	Pos	Pos	3
Meng 8	DW5	Vecht Dalfsen (Vitens)	36.6	36.6	36.6	Pos	Pos	3
Meng 9	DW1	Vecht Dalfsen (Vitens)	36.1	36.1	36.1	Pos	Pos	5
Meng 10	DW3	Vecht Dalfsen (Vitens)	36.7	36.7	36.7	Pos	Pos	6
Meng 11	DW4	Vecht Dalfsen (Vitens)	38.0	38.0	38.0	Pos	Pos	4
Meng 12	DW5	Vecht Dalfsen (Vitens)	37.9	37.9	37.9	Pos	Pos	7
Meng 13	DW2	Potmarge Leeuwarden (Vitens)	32.4	32.4	32.4	Pos	Pos	3
Meng 14	DW3	Potmarge Leeuwarden (Vitens)	34.1	34.1	34.1	Pos	Pos	1
Meng 15	DW4	Potmarge Leeuwarden (Vitens)	33.7	33.7	33.7	Pos	Pos	2
Meng 16	DW5	Potmarge Leeuwarden (Vitens)	31.8	31.8	31.8	Pos	Pos	4
Meng 17	DW6	Slootwater Waarderpolder (HWL)	N/A	N/A	N/A	Neg	Pos	1
Meng 18	DW11	sloot kade Vollenhove (Vitens)	35.9	35.7	35.8	Pos	Pos	4
Meng 19	DW13	sloot kade Vollenhove (Vitens)	36.6	37.0	36.8	Pos	Pos	2
Meng 20	DW14	sloot kade Vollenhove (Vitens)	35.7	35.7	35.7	Pos	Pos	2
Meng 21	DW15	sloot kade Vollenhove (Vitens)	34.5	34.8	34.6	Pos	Pos	1
Meng 22	DW16	sloot kade Vollenhove (Vitens)	35.5	35.0	35.2	Pos	Pos	3
Meng 23	DW17	Noord-Willemskanaal (WLN)	39.9	39.8	39.9	Pos	Pos	2
Meng 24	DW18	Noord-Willemskanaal (WLN)	36.4	36.0	36.2	Pos	Pos	1
Meng 25	DW19	Noord-Willemskanaal (WLN)	39.0	39.3	39.1	Pos	Pos	1
Meng 26	DW20	Noord-Willemskanaal (WLN)	34.1	33.8	33.9	Pos	Pos	1
Meng 27	DW22	Laak thv WT Laakdal (Pidpa)	32.0	32.1	32.03	Pos	Pos	7
Meng 28	DW23	Laak thv WT Laakdal (Pidpa)	34.2	34.1	34.19	Pos	Pos	9
Meng 29	DW24	Laak thv WT Laakdal (Pidpa)	34.0	34.1	34.06	Pos	Pos	10
Meng 30	DW25	Laak thv WT Laakdal (Pidpa)	34.0	33.8	33.90	Pos	Pos	10

Appendix II Ruwe data RLOD bepaling

A. E. faecalis Code Opdrachtgever	RT-PCR			Kweek		
	Aan/afwezig (+/-)	Enterococci Cq1 Cq2		KVE/100ml	Aan/afwezig (+/-)	Gemiddeld KVE/100ml
Blanc	-	N/A	N/A			
Blanc	-	N/A	N/A			
0 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	0
0 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	2	+	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	1	+	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	1	+	
0,7 KVE/100 ml	+	35.4	35.4	0	-	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	1	+	
0,7 KVE/100 ml	+	35.8	35.9	0	-	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	0.7
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	1	+	
0,7 KVE/100 ml	+	38.6	38.1	1	+	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0,7 KVE/100 ml	+	33.1	33.1	2	+	
0,7 KVE/100 ml	+	33.9	34.2	2	+	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	39.9	1	+	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	2	+	
0,7 KVE/100 ml	+	33.7	33.6	0	-	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
1,5 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	1	+	
1,5 KVE/100 ml	+	34.1	34.2	0	-	
1,5 KVE/100 ml	+	35.9	36.1	1	+	
1,5 KVE/100 ml	+	32.8	32.7	4	+	
1,5 KVE/100 ml	+	34.4	34.5	0	-	1.6
1,5 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	2	+	
1,5 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	2	+	
1,5 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	2	+	
1,5 KVE/100 ml	+	34.7	34.7	2	+	
1,5 KVE/100 ml	+	33.9	33.7	2	+	
5 KVE/100 ml	+	32.8	32.7	6	+	
5 KVE/100 ml	+	31.6	31.4	3	+	
5 KVE/100 ml	+	34.1	33.9	6	+	4.8
5 KVE/100 ml	+	31.8	31.6	2	+	
5 KVE/100 ml	+	32.4	32.6	7	+	
0,7 KVE/100ml- 1 liter filtr.				6		8,3 KVE/1 liter
0,7 KVE/100ml- 1 liter filtr.				11		
0,7 KVE/100ml- 1 liter filtr.				8		(= 0,8 KVE/100ml)

Ruwe data en interpretatie van de resultaten van experimenten voor het bepalen van de RLOD van de Real-time RT-PCR methode voor detectie van E. faecalis.

Code Opdrachtgever	RT-PCR			Kweek		
	Aan/afwezig (+/-)	Enterococci		KVE/100ml	Aan/afwezig (+/-)	Gemiddeld KVE/100ml
		Cq1	Cq2			
Blanc	-	N/A	N/A			
Blanc	-	N/A	N/A			
0 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	0
0 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0,7 KVE/100 ml	+	33.2	32.8	1	+	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	1	+	
0,7 KVE/100 ml	+	37.0	36.9	0	-	
0,7 KVE/100 ml	+	34.2	34.7	0	-	
0,7 KVE/100 ml	+	35.6	35.8	0	-	
0,7 KVE/100 ml	+	34.1	34.3	0	-	
0,7 KVE/100 ml	+	34.5	34.8	1	+	
0,7 KVE/100 ml	+	34.7	34.5	0	-	
0,7 KVE/100 ml	+	35.0	34.8	0	-	0.6
0,7 KVE/100 ml	+	33.4	33.2	2	+	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	1	+	
0,7 KVE/100 ml	+	35.1	35.1	1	+	
0,7 KVE/100 ml	+	34.3	34.8	0	-	
0,7 KVE/100 ml	+	34.1	34.4	2	+	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	1	+	
0,7 KVE/100 ml	+	34.5	34.7	1	+	
0,7 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	0	-	
0,7 KVE/100 ml	+	35.3	35.3	0	-	
0,7 KVE/100 ml	+	36.4	36.5	0	-	
0,7 KVE/100 ml	+	35.1	34.9	1	+	
1,5 KVE/100 ml	+	34.3	34.7	2	+	
1,5 KVE/100 ml	+	35.0	35.0	4	+	
1,5 KVE/100 ml	+	33.7	33.6	0	-	
1,5 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	3	+	
1,5 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	1	+	1.3
1,5 KVE/100 ml	+	34.8	35.0	0	-	
1,5 KVE/100 ml	+	35.9	35.6	0	-	
1,5 KVE/100 ml	+	34.9	35.4	2	+	
1,5 KVE/100 ml	+	35.4	35.0	0	-	
1,5 KVE/100 ml	-	N/A	N/A	1	+	
5 KVE/100 ml	+	32.1	32.1	9	+	
5 KVE/100 ml	+	33.9	34.1	6	+	
5 KVE/100 ml	+	32.9	32.9	7	+	6.2
5 KVE/100 ml	+	33.2	32.8	5	+	
5 KVE/100 ml	+	32.1	32.4	4	+	
0,7 KVE/100ml- 1 liter filtr.				5		6,7 KVE/1 liter
0,7 KVE/100ml- 1 liter filtr.				9		
0,7 KVE/100ml- 1 liter filtr.				6		(= 0,7 KVE/100ml)

Ruwe data en interpretatie van de resultaten van experimenten voor het bepalen van de RLOD van de Real-time RT-PCR methode voor detectie van *E. faecium*.

Appendix III Ruwe data Inclusiviteit

Nr		Kweek S&B		RT-PCR			+/-
		kve/RNA-isolatie	Cq1	Cq2	Cq gem		
1	E. faecalis ATCC 19433	31	30.3	30.3	30.3		+
2	E. faecium ATCC 19434	8	29.5	29.4	29.4		+
3	E. faecium WR63	198	28.8	28.3	28.5		+
4	E. hirae DSMZ 28619	1	32.4	32.5	32.4		+
5	E. durans DSMZ 20633	3	35.7	35.9	35.8		+
6	E. faecalis DSM 20478	43	33.2	32.5	32.9		+
7	E. hirae DSM 20160	271	27.9	27.3	27.6		+
8	E. faecalis Vitens 2	39	34.2	33.4	33.8		+
9	E. faecalis Vos 3/1	100	33.8	32.8	33.3		+
10	E. faecalis Hooglander 8/3	117	32.3	31.6	31.9		+
11	E. faecalis Hooglander 10/4	117	33.5	32.6	33.1		+
12	E. faecalis Hond 7/1	53	35.2	34.7	34.9		+
13	E. faecalis Hond 11/2	35	34.1	34.1	34.1		+
14	E. faecalis Mens 1/1	45	33.7	33.6	33.6		+
15	E. faecalis Mens 4/1	75	31.0	31.1	31.0		+
16	E. faecalis Vitens 7	173	30.6	30.8	30.7		+
17	E. faecalis Mens 13/1	94	30.2	30.3	30.2		+
18	E. faecalis Mens 19/1	70	33.5	33.4	33.4		+
19	E. faecalis Gans 1/1	119	31.8	31.6	31.7		+
20	E. faecalis Vitens 1	64	34.2	34.1	34.1		+
21	E. hirae Vos 12/1	146	31.1	31.1	31.1		+
22	E. hirae Schaap 1/1	235	27.0	26.7	26.8		+
23	E. hirae Schaap 4/1	102	27.8	27.9	27.8		+
24	E. hirae Hooglander 6/1	151	26.9	26.9	26.9		+
25	E. hirae Hond 8/5	125	28.1	28.1	28.1		+
26	E. hirae Hond 2/1	180	26.5	26.7	26.6		+
27	E. hirae Hond 13/7	141	28.6	29.1	28.8		+
28	E. hirae Mens 10/1	109	27.8	27.7	27.8		+
29	E. hirae Mens 10/7	122	28.8	28.6	28.7		+
31	E. faecium Vos 4/1	170	27.3	27.4	27.4		+
32	E. faecium Vos 6/1	78	28.9	28.7	28.8		+
33	E. faecium Hooglander 6/3	172	28.0	28.0	28.0		+
34	E. faecium Hond 8/1	100	28.3	28.4	28.3		+
35	E. faecium Hond 10/1	207	27.2	26.6	26.9		+
36	E. faecium Mens 9/1	113	29.1	28.4	28.7		+
37	E. faecium Mens 18/1	80	28.5	27.9	28.2		+
38	E. faecium Mens 20/1	86	28.4	27.8	28.1		+
39	E. faecium Mens 11/4	135	29.5	28.8	29.2		+
40	E. hirae Vitens 19	96	28.1	27.5	27.8		+
41	E. hirae Vitens 98	89	27.5	26.9	27.2		+
42	E. durans Vos 10/1	73	30.1	29.5	29.8		+
43	E. durans Vos 13/3	40	31.1	31.1	31.1		+
44	E. hirae Vitens 97	72	27.7	27.8	27.7		+
45	E. durans Hond 13/3	82	28.6	29.0	28.8		+
46	E. durans Hond 4/4	77	30.2	30.3	30.2		+
47	E. durans Hond 8/10	54	29.3	29.4	29.4		+
48	E. durans Mens 1/2	67		28.5	28.5		+
49	E. durans Mens 7/1	119		27.3	27.3		+
50	E. durans Mens 7/10	21	30.5	30.5	30.5		+
51	E. faecium Vitens 35	105	26.4	26.4	26.4		+
52	E. faecium Vitens 37	156	27.3	27.4	27.4		+
53	E. faecium Vitens 15	168	26.3	26.4	26.3		+
54	E. faecium Vitens 16	174	26.7	26.7	26.7		+
55	E. faecium Vitens 14	54	28.7	28.6	28.6		+
56	E. faecium Vitens 26	113	27.9	27.9	27.9		+
57	E. durans Vitens 20	92	30.1	30.2	30.2		+
58	E. durans Vitens 18-1	84	30.1	30.0	30.1		+

Resultaten van de inclusiviteits tests. De enterococci concentratie van de 100 µl suspensie welke is gebruikt voor isolatie van RNA is bepaald op S&B medium in duplo, het gemiddelde

van deze duplo is weergegeven. De C_q waardes van de twee Real-time RT-PCR analyses en het gemiddelde van deze twee metingen is weergegeven.

Appendix IV Ruwe Data Exclusiviteit

		Kweek		RT-PCR		
		S&B	LLA (8,0)	Cq1	Cq2	+/-
		kve/RNA-isolatie	kve/RNA-isolatie			
1	E. mundtii	115		N/A	N/A	-
2	Enterobacter aerogenes	0	8	N/A	N/A	-
3	Enterobacter cloacae	0	11	N/A	N/A	-
4	Staphylococcus warneri	0	247	N/A	N/A	-
5	Staphylococcus aureus	0	19	N/A	N/A	-
6	Citrobacter freundii	0	13	N/A	N/A	-
7	Escherichia coli	0	47	N/A	N/A	-
8	Klebsiella oxytoca	0	21	N/A	N/A	-
9	Serratia marcescens	0	79	N/A	N/A	-
10	Kluyvera ascorbata	0	27	N/A	N/A	-
11	Pantoea agglomerans	0	41	N/A	N/A	-
12	Cronobacter sakazakii	0	124	N/A	N/A	-
13	Klebsiella pneumoniae	0	198	N/A	N/A	-
14	Aeromonas hydrophila	0	57	N/A	N/A	-
15	Pseudomonas fluorescens	0	10	N/A	N/A	-
16	Legionella pneumophila	0	2	N/A	N/A	-
17	Aquaspirillum sp.	0	46	N/A	N/A	-
18	Salmonella panama	0	11	N/A	N/A	-
19	Flavobacterium johnsoniae	0	40	N/A	N/A	-
20	Salmonella typhimurium	0	42	N/A	N/A	-
21	Legionella anisa	0	15	N/A	N/A	-
22	Escherichia fergusonii	0	36	N/A	N/A	-
23	Aeromonas veronii	0	6	N/A	N/A	-
24	Aerococcus viridans	0	1	N/A	N/A	-
25	Enterococcus gallinarum	94	72	N/A	N/A	-
26	Enterococcus dispar	0	69	N/A	N/A	-
27	Enterococcus haemoperoxidus	33	30	N/A	N/A	-
28	Enterococcus aquamarinus	4	0	N/A	N/A	-
29	Enterococcus moraviensis	52	39	N/A	N/A	-
30	Enterococcus casseliflavus	77	72	N/A	N/A	-

Resultaten van de exclusiviteits tests. De enterococci concentratie van de 100 µl suspensie welke is gebruikt voor isolatie van RNA is bepaald op S&B en op LLA medium in duplo, het gemiddelde van deze duplo is weergegeven. De Cq waarden van de twee Real-time RT-PCR analyses en het gemiddelde van deze twee metingen is weergegeven.