Bedrijfstakonderzoek
BTO 2021.036| Juli 2021

Detectie en kwantificatie van specifieke micro-organismen met droplet digital PCR (ddPCR)

Bedrijfstakonderzoek

KWR

Bridging Science to Practice

Rapport

Detectie en kwantificatie van specifieke micro-organismen met droplet digital PCR (ddPCR)

BTO 2021.036| Juli 2021

Dit onderzoek is onderdeel van het collectieve Bedrijfstakonderzoek van KWR, de waterbedrijven en Vewin.

Opdrachtnummer
402045/036

Projectmanager
Michiel Hootsmans

Opdrachtgever
BTO - Thematisch onderzoek - Biologische veiligheid

Auteurs
Leo Heijnen en Goffe Elsinga

Kwaliteitsborger
Paul van der Wielen

Verzonden naar
Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Keywords
PCR; detectie; micro-organismen; DNA; RNA; moleculaire methoden

Jaar van publicatie
2021

Meer informatie
Leo Heijnen
T +316069743
E leo.heijnen@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

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

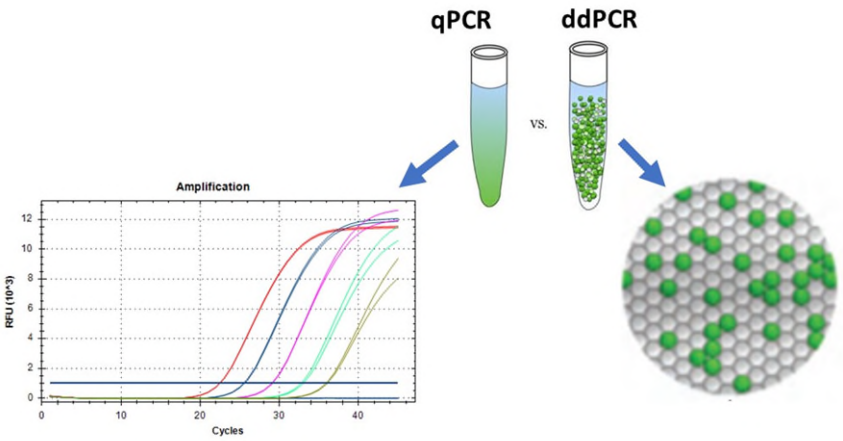
Juli 2021 ©
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier.

Managementsamenvatting

Detectie en kwantificatie van specifieke micro-organismen met droplet digital PCR (ddPCR) biedt voordelen, maar zal qPCR (nog) niet snel vervangen

Auteurs Leo Heijnen en Goffe Elsinga

Op basis van de nieuwe PCR-techniek *droplet digital PCR* (ddPCR) zijn methoden ontwikkeld voor de kwantificatie van enkele specifieke micro-organismen in (drink)water. De resultaten van deze ddPCR-methoden zijn vergeleken met resultaten verkregen met gebruikelijke qPCR-methoden die belangrijk zijn voor het bewaken van de microbiologische veiligheid. De uitvoering van analyses met ddPCR blijkt relatief kostbaar en arbeidsintensief. Voor nauwkeurige kwantificatie van lage concentraties biedt ddPCR enige meerwaarde. Het is niet te verwachten dat ddPCR-methoden de qPCR-analyses gaan vervangen, naar verwachting zal ddPCR voor toepassing vinden bij het kwantificeren van kalibratiesuspensies voor qPCR en specifieke vragen waarbij nauwkeurige kwantificatie relevant is.



Bij ddPCR vinden de PCR-reacties plaats in een groot aantal individuele, afgesloten reactiekamers en wordt een fluorescente kleuring gebruikt om de vermenigvuldiging van DNA in een reactiekamer aan te tonen. Nauwkeurige kwantificatie is mogelijk door de fluorescente reactiekamers te tellen.

Belang: PCR-methoden verbeteren om microbiologische veiligheid te vergroten

Voor het onderzoeken en monitoren van de microbiologische veiligheid van drinkwater is het belangrijk methoden te hebben om specifieke micro-organismen nauwkeurig te kwantificeren. Daarvoor gebruiken we steeds vaker technieken om een specifiek fragment van het erfelijk materiaal (DNA of RNA) van deze micro-organismen aan te tonen (PCR) en te kwantificeren (qPCR). Voor nauwkeurige kwantificatie van micro-organismen lijkt digital droplet PCR (ddPCR) veelbelovend. Bij ddPCR vinden de PCR-reacties plaats in een groot aantal individuele, afgesloten reactiekamers en wordt een fluorescente kleuring gebruikt om de vermenigvuldiging van DNA in een reactiekamer aan

te tonen. Nauwkeurige kwantificatie is mogelijk door de fluorescente reactiekamers te tellen. Daarom zijn hiervoor methoden ontwikkeld en getest.

Aanpak: ontwikkeling en toepassing van ddPCR voor onderzoeken van de meerwaarde van ddPCR
Er zijn ddPCR-methoden ontwikkeld en getest om te onderzoeken wat de meerwaarde is van ddPCR ten opzichte van qPCRvoor kwantificatie van diverse micro-organismen in water te onderzoeken.

Resultaten: nieuwe ddPCR methoden hebben voor sommige toepassingen meerwaarde
Er zijn ddPCR-methoden ontwikkeld voor specifieke detectie van diverse opportunistisch pathogene micro-organismen, (waaronder *Legionella pneumophila, Pseudomonas aeruginosa, Aspergillus fumigatus*), natuurlijke virussen (Virus 2314) en een fecaal indicatororganisme (mens-specifieke *Bacteroides*). De detectielimieten (Limit Of Detection, LOD) en de variatie van de meetwaarden van deze nieuwe methoden zijn bepaald en vergeleken met die van qPCR.

De detectielimieten van de ddPCR-methoden zijn vergelijkbaar met die van de qPCR-methoden: de aanwezigheid van één enkel DNA-molecuul in een reactie is detecteerbaar, maar kwantificatie wordt beïnvloed door de statistische verdeling van DNA-moleculen over de verschillende reacties (pakkans). De verschillen tussen beide technieken zijn klein, maar specifiek in reacties met lage concentraties micro-organismen is de variatie in de qPCR-resultaten groter en de interpretatie moeilijker dan bij ddPCR. Het onderzoek maakte ook duidelijk dat de kalibratiesuspensies die momenteel worden toegepast voor het kwantificeren van de geteste micro-organismen met qPCR niet altijd goed zijn gekwantificeerd. Voor het kwantificeren van deze kalibratiesuspensies levert ddPCR nauwkeuriger resultaten. De analyse van praktijkmonsters voor detectie van natuurlijk Virus 2314 en mens-specifieke *Bacteroides* laat zien dat er een duidelijke relatie is tussen meetwaarden verkregen met ddPCR en qPCR meetwaarden. In monsters met lage concentraties worden Virus 2314 en mens-specifieke *Bacteroides* vaker aangetoond met ddPCR dan met qPCR. Waarschijnlijk is ddPCR minder gevoelig voor de aanwezigheid van remmende stoffen in de reactie dan qPCR. Met de huidige apparatuur zijn de kosten (benodigde reagentia en “hands-on”-tijd) voor het uitvoeren van ddPCR circa 1,5 keer hoger dan voor qPCR. Daarnaast duurt het langer voordat ddPCR meetwaarden beschikbaar zijn (circa 3 uur voor qPCR tegen circa 5 uur voor ddPCR).

Toepassing: ddPCR heeft meerwaarde, maar zal qPCR (nog) niet vervangen
Vanwege de beperkte meerwaarde, hogere kosten en arbeidsintensieve laboratoriumwerkzaamheden is het niet te verwachten dat ddPCR analyses de qPCR analyses op korte termijn zullen vervangen. De ontwikkeling van eenvoudiger en snellere apparatuur zal een belangrijke stap zijn richting toepassing van ddPCR voor het drinkwateronderzoek. Inzet van ddPCR zal voorlopig vooral beperkt zijn tot analyses van monsters met lage concentraties doelorganismen in situaties waarin kleine verschillen tussen deze lage meetwaarden relevant zijn. Een belangrijke toepassing van ddPCR wordt vooral voorzien bij de kwantificatie van kalibratiesuspensies voor het maken van ijklijnen voor de nauwkeurige kwantificatie met qPCR. Een andere belangrijke toepassing is recent naar voren gekomen: vanwege de mogelijkheid om minimale sequentieverschillen te onderscheiden blijkt ddPCR zeer goed bruikbaar voor het onderscheiden van SARS-CoV-2 varianten in het riool (Heijnen, Elsinga et al. 2021).

Rapport
Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Detectie en kwantificatie van specifieke micro-organismen met droplet digital PCR* (*ddPCR*) (BTO 2021.036).

Inhoud

Rapport		**0**
Managementsamenvatting		**1**
Inhoud		**1**
1	Achtergrond	**3**
2	Materiaal en methoden	**5**
2.1	PCR (algemeen)	5
2.1.1	Kwantitatieve PCR: qPCR	6
2.1.2	Droplet digital PCR: ddPCR	8
2.1.3	Handelingen en kosten voor het uitvoeren van ddPCR en qPCR	11
2.1.4	Ontwikkeling en optimalisatie van de reactieomstandigheden voor ddPCR	12
2.1.5	Bepalen onderste analysegrens (LOD) en onderste kwantificatiegrens (LOQ) ddPCR en vergelijking met qPCR	13
2.1.6	Analyses praktijkmonsters	14
3	Resultaten	**15**
3.1	Ontwikkeling en optimalisatie van de methoden	15
3.2	Detectie van *Legionella pneumophila*	15
3.2.1	Vergelijking onderste analysegrens ddPCR met qPCR voor detectie van *Legionella pneumophila*	18
3.3	Detectie van *Pseudomonas aeruginosa*	20
3.3.1	Vergelijking onderste analysegrens ddPCR met qPCR voor detectie van *Pseudomonas aeruginosa*	20
3.4	Detectie van *Stenotrophomonas maltophilia*	22
3.5	Detectie van *Aspergillus fumigatus*	22
3.5.1	Vergelijking onderste analysegrens ddPCR met qPCR voor detectie van *Aspergillus fumigatus*	23
3.6	Detectie van de alternatieve virusindicator Virus 2314	24
3.6.1	Vergelijking onderste analysegrens ddPCR met qPCR voor detectie van Virus 2314	25
3.7	Detectie van mens specifieke *Bacteroides*	26
3.7.1	Vergelijking onderste analysegrens ddPCR met qPCR voor detectie van humane *Bacteroides*	27
3.8	Casestudies	28
3.8.1	ddPCR en qPCR voor detectie van humane *Bacteroides* in oppervlaktewater	28

4	**Discussie**	**32**
4.1	Algemeen	32
4.1.1	Ontwikkelde ddPCR methoden	32
4.1.2	Kosten voor uitvoering ddPCR en qPCR	32
4.2	Vergelijking qPCR- en ddPCR.	32
4.2.1	Analyse van verdunningsreeksen	32
4.2.2	Limit of Detection en Limit of Quantification	33
4.2.3	Casestudies	34
4.3	Betekenis voor toepassen van ddPCR en/of qPCR in de drinkwaterpraktijk	35
5	**Conclusies en aanbevelingen**	**37**
5.1	Conclusies	37
5.2	Aanbevelingen	38
6	**Literatuur**	**39**
I	**Optimalisatie reactieomstandigheden**	**41**
II	**Casestudies**	**43**

1 Achtergrond

Al enige jaren worden verschillende technieken waarbij PCR (Polymerase Chain Reaction) wordt gebruikt, uitgebreid toegepast voor het microbiologisch onderzoek van (drink)water. PCR maakt het mogelijk om een kenmerkend DNA fragment van een specifiek micro-organisme te vermeerderen, detecteren en kwantificeren. Voor kwantificatie van specifieke organismen met PCR zijn kwantitatieve PCR (qPCR) methoden beschikbaar. Bij qPCR wordt gebruik gemaakt van het verband tussen het aantal temperatuurcycli dat nodig is in de PCR voor het genereren van een detecteerbaar fluorescentiesignaal (C_q waarde) en de concentratie van het in het monster aanwezige specifieke DNA-fragment. Voor kwantificatie van het DNA worden de C_q waarden, verkregen bij het uitvoeren van een qPCR reactie op een bepaald doelsequentie in monsters met bekende concentraties (kalibratiesuspensies), gebruikt voor het genereren van een kalibratielijn en deze ijklijn wordt gebruikt voor het kwantificeren van de doelsequentie in monsters met onbekende concentratie. De nauwkeurigheid waarmee qPCR kan worden gebruikt voor kwantificatie is voor een groot deel afhankelijk van de nauwkeurigheid van de kalibratiesuspensie.

Digitale PCR (dPCR) is een variant op deze qPCR en waarmee de concentratie van een specifiek DNA-molecuul zeer gevoelig en nauwkeurig kan worden bepaald, zonder daarbij afhankelijk te zijn van een kalibratiesuspensie. Bij dPCR wordt het PCR mengsel verdeeld over een groot aantal individuele reactiekamers waarbij een PCR-reactie wordt uitgevoerd in elke reactiekamer. Voor het uitvoeren van dPCR zijn verschillende systemen beschikbaar. Zo is er een systeem waarbij een groot aantal reactiekamers (8.500 of 26.000) aanwezig zijn in een wegwerpsysteem van kunststof (zoals bv. het QIAcuity systeem van Qiagen). Een ander systeem maakt gebruik van druppels in een water-olie emulsie waarin de PCR reacties plaatsvinden in 10.000-20.000 druppels en dat droplet digital PCR (ddPCR) wordt genoemd (zoals de ddPCR systemen van Bio-Rad). Deze druppels gedragen zich dus als afgesloten “reactiekamers”. Na het verdelen van het reactiemengsel over de individuele druppels vindt een PCR reactie plaats waarbij, indien de doelsequentie in een druppel aanwezig is, vermeerdering van de doelsequentie (PCR-fragment) plaatsvindt en de vorming van een PCR-fragment resulteert in een fluorescentiesignaal in een druppel. Na het uitvoeren van de PCR reactie zullen er fluorescente druppels zijn doordat de doelsequentie (DNA stukje van het te detecteren organisme) in (een deel van) de druppels aanwezig is. Daarnaast zijn er ook druppels die niet fluoresceren, omdat de doelsequentie niet aanwezig is. Alle druppels worden na het uitvoeren van de PCR langs een fluorescentiedetector gevoerd, waarbij het aantal positieve en het aantal negatieve druppels wordt geteld. Met het resultaat van de (digitale) telling van het aantal negatieve en positieve druppels kan de concentratie van de doelsequentie in het monster nauwkeurig worden berekend zonder dat hiervoor PCR analyses van kalibratiesuspensies nodig zijn. Door het ontbreken van de noodzaak voor het gebruik van een gekwantificeerde suspensies is de kwantificatie niet meer afhankelijk van de kwaliteit van deze suspensies en de nauwkeurigheid waarmee deze gekalibreerd zijn. Daarnaast is met ddPCR kwantificatie van lage concentraties nauwkeuriger en de gevoeligheid hoger (Hindson, Chevillet et al. 2013, Falzone, Gattuso et al. 2020). Daarnaast blijkt ddPCR minder gevoelig voor de aanwezigheid van remmende stoffen (inhibitors) in de monsters (Singh, Sithebe et al. 2017). De meerwaarde van ddPCR (t.o.v. qPCR) is daarom vooral te verwachten bij het nauwkeurig kwantificeren van lage concentraties DNA-moleculen in een monster.
In dit project is de meerwaarde onderzocht van ddPCR ten opzichte van qPCR om doelsequenties van verschillende organismen in drinkwater te kwantificeren. Om een dergelijk onderzoek uit te voeren, zijn eerst bestaande qPCR methoden voor detectie van de volgende organismen geoptimaliseerd om te kunnen uitvoeren als ddPCR:

- Een alternatieve virus indicator
- mens-specifieke *Bacteroides*
- De opportunistische pathogene micro-organismen:
    - *Legionella pneumophila*
    - *Pseudomonas aeruginosa*
    - *Stenotrophomonas maltophilia*
    - *Aspergillus fumigatus*

Vervolgens is de onderste analysegrens van de ddPCR methoden bepaald en vergeleken met qPCR. Aansluitend zijn twee casestudies uitgevoerd om de eventuele meerwaarde van ddPCR te onderzoeken. Bij deze casestudies zijn de resultaten van analyses uitgevoerd met ddPCR vergeleken met de resultaten van qPCR. De casestudies zijn uitgevoerd op twee series praktijkmonsters:

- Het voorkomen van mens-specifieke *Bacteroides* in oppervlaktewatermonsters afkomstig van zwemwaterlocaties.
- Het voorkomen van alternatieve virusindicator in monsters afkomstig van diverse zuiveringsstappen van drinkwaterzuiveringen die oppervlaktewater gebruiken als grondstof.

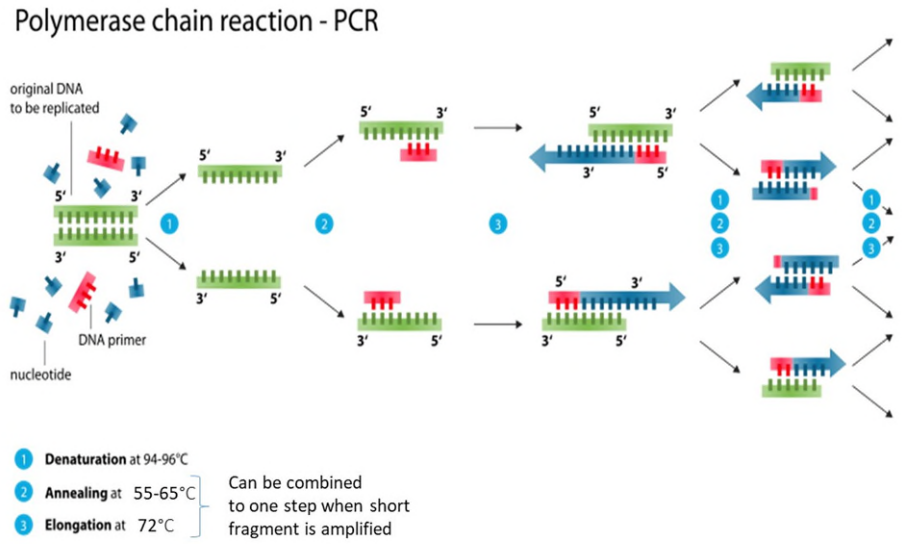
2 Materiaal en methoden

2.1 PCR (algemeen)

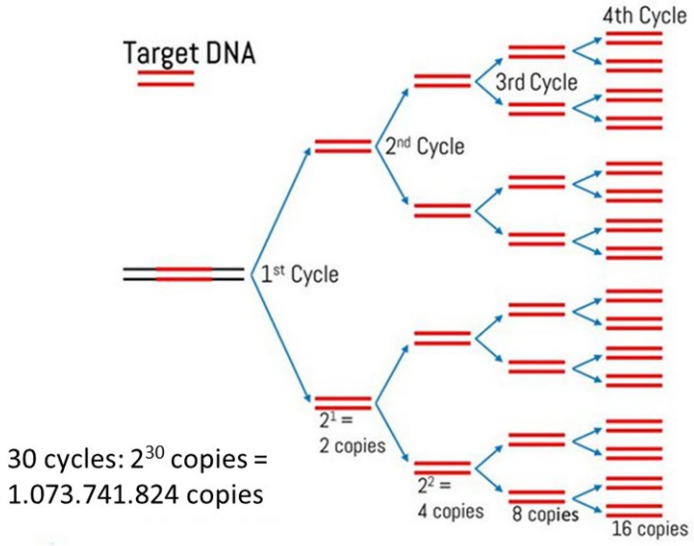
Bij het gebruik van PCR wordt een kenmerkend DNA fragment, via een enzymatische kettingreactie vermenigvuldigd (amplificatie). Voor deze amplificatie wordt gebruik gemaakt van synthetische DNA-moleculen (primers) die, door hun gekozen samenstelling (DNA-sequentie), specifiek binden aan het DNA van het doelorganisme. Na binding van deze primers vindt, onder invloed van temperatuurwisselingen en het Taq polymerase enzym, een verdubbeling van het kenmerkende DNA-fragment plaats (Figuur 1A). Door cyclische herhaling van dit proces zal de kettingreactie zorgen voor een verdubbeling van het DNA-fragment tijdens elke temperatuurcyclus (Figuur 1B) resulterend in ongeveer $1x10^9$ kopieën van het DNA-fragment na 30 temperatuurcycli.

Figuur 1. Schematische weergave van het PCR-proces voor vermeerdering van een DNA-fragment (A) en de verdubbeling na elke temperatuurcyclus (B)

A.



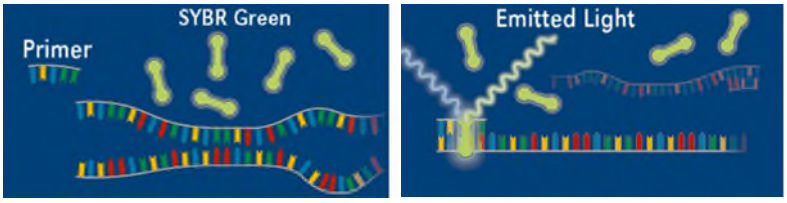
B.



2.1.1 Kwantitatieve PCR: qPCR

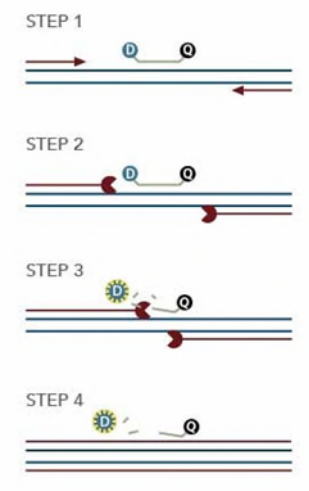
Wanneer een kwantitatieve qPCR wordt toegepast, dan wordt het vermeerderde kenmerkende DNA-fragment tijdens de PCR-reactie (in "Real-time") zichtbaar gemaakt door het gebruik van specifieke fluorescente DNA-probes of fluorescente kleurstoffen zoals SYBR-green of Eva-green. SYBR-green (en Eva-green) zijn fluorescerende kleurstoffen welke, na binding aan dubbelstrengs DNA, zorgen voor fluorescentie (Figuur 2).

Figuur 2. Het gebruik van SYBR-green voor het zichtbaar maken van de vorming van PCR producten

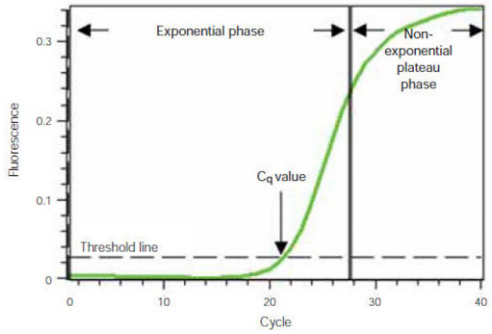


Fluorescente DNA-probes ("Dual labeled probes", "Taqman probes") zijn synthetische DNA moleculen waaraan een fluorescente groep is gekoppeld en een chemische groep die het fluorescentielicht absorbeert ("quencher") waardoor de intacte probe vrijwel niet fluoresceert. Tijdens de PCR-reactie zal een specifieke binding van de probe aan het gevormde PCR-fragment plaatsvinden (step 1 Figuur 3), waarna de probe tijdens de verdubbelingsreactie door het Taq polymerase enzym wordt afgebroken (step 3 Figuur 3) resulterend in een fysieke scheiding van quencher en fluorescente groep (step 4 Figuur 3). Door deze scheiding vindt geen absorptie meer plaats van het fluorescentielicht door de quencher waardoor de intensiteit van het fluorescentielicht toeneemt. Dit vrijgekomen fluorescentiesignaal wordt gedetecteerd door de qPCR apparatuur en na een aantal PCR cycli is het signaal dusdanig hoog dat het boven de achtergrondfluorescentie uitkomt (Cq waarde, Figuur 4), waarna een exponentiele toename van het fluorescentiesignaal gedurende de volgende cycli zichtbaar is. Aan het einde van deze exponentiele fase wordt, door een limiterende hoeveelheid reagentia (primers, probes en DNA-bouwstenen (nucleotiden)), een plateaufase bereikt waarbinnen het fluorescentiesignaal niet verder toeneemt.

Figuur 3. Het gebruik van dubbel gelabelde probes voor het zichtbaar maken van de vorming van PCR producten (figuur overgenomen van IDT Integrated DNA technologies)

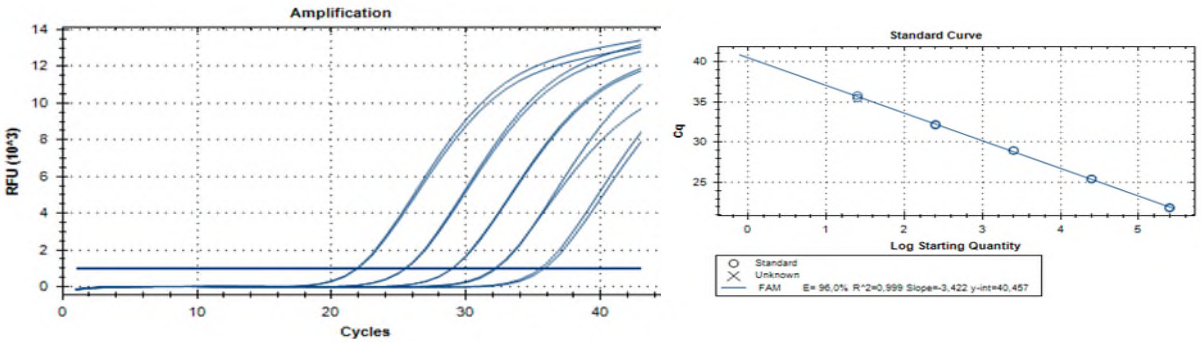


Figuur 4. Verloop van de sterkte van het fluorescentiesignaal tijdens een qPCR reactie en de weergave van de Cq waarde



Er is een logaritmische verband tussen de Cq waarde en de concentratie van het geamplificeerde kenmerkende DNA-fragment aan het begin van de PCR-reactie (Figuur 4). Door het uitvoeren van PCR-reacties op een verdunningsreeks met bekende concentraties (kallibratiesuspensies) van het kenmerkende DNA en de Cq waarden uit te zetten tegen de logaritme van de concentraties van het kenmerkende DNA-fragment is het mogelijk om een kalibratielijn (ook ijklijn genoemd) te genereren. Deze kalibratielijn wordt vervolgens gebruikt om de concentratie van het kenmerkende DNA-fragment in monsters met onbekende concentratie te bepalen. De nauwkeurigheid waarmee concentraties kunnen worden bepaald door toepassing van qPCR hangt voor een groot deel af van de nauwkeurigheid waarmee kallibratiesuspensies kunnen worden samengesteld.

Figuur 5. Amplificatiecurven op reeksen van 10-voudige verdunningen van target-DNA met bekende concentraties (links) en de daarbij behorende kalibratielijn op basis van Cq waarden en log van de startconcentraties



Voor het samenstellen van kallibratiesuspensies zijn er verschillende mogelijkheden:

1. Het gebruik van gekwantificeerd DNA geïsoleerd uit het doelorganisme

2. Het gebruik van bacteriële plasmiden met hierin de sequentie van het PCR-fragment van het doelorganisme (of meerdere PCR-fragmenten van meerdere doelorganismen)
3. Het gebruik van synthetische DNA moleculen met de sequentie van het PCR-fragment van het doelorganisme (of meerdere PCR-fragmenten van meerdere doelorganismen)

Voor het kwantificeren van deze kallibratiesuspensies zijn er de volgende mogelijkheden:

a) Fluorometrisch: de concentratie van de suspensie fluorometrisch vaststellen door toevoeging van een kleurstof (zoals SYBR-green) welke fluoresceert na binding aan ds DNA. Aan de hand van de hoeveelheid fluorescentielicht wordt de concentratie bepaald. De nauwkeurigheid van deze methode wordt beperkt door de (beperkte) nauwkeurigheid en de gevoeligheid van deze meting. De beperkte gevoeligheid maakt het onmogelijk om de concentratie in de suspensies, die men gebruikt voor het genereren van de ijklijn, te meten. Hierdoor wordt een suspensie met (zeer) hoge concentratie doorgemeten waarna veel verdunningsstappen nodig zijn voor de ijklijnsuspensies. Het grote aantal verdunningsstappen en beperkte betrouwbaarheid van de meting zorgt vervolgens voor beperkte betrouwbaarheid van de kwantificatie.
b) Absolute kwantificatie met ddPCR: bij deze aanpak vindt het kwantificeren van de callibratiesuspensies plaats door toepassen van absolute kwantificatie met ddPCR.
c) Indirecte kwantificatie door gebruik te maken van een interne controle fragment (IC) voor kwantificatie. Bij deze aanpak maakt de DNA-sequentie van het IC-fragment onderdeel uit van de synthetische kallibratiesuspensies. Het uitvoeren van een IC-specifieke PCR maakt het mogelijk om de concentraties van de kallibratiesuspensies te bepalen. Het gebruik van een IC-ijklijn waarbij ddPCR is gebruikt om deze te kwantificeren maakt het mogelijk om de concentratie van de kallibratiesuspensies nauwkeurig te bepalen.

Voor kwantificatie van micro-organismen met qPCR worden bij KWR ijklijnen gebruikt die zijn gebaseerd op verschillende suspensies (1-3) en op verschillende manieren zijn gekwantificeerd (a-c). Dit is het gevolg van veranderingen in de aanpak t.g.v. voortschrijdend inzicht en de beschikbaarheid van ddPCR. Bij het toepassen van kwantificatie met ddPCR is de kwantitatieve meting niet afhankelijk van de nauwkeurigheid van de bepaling van de concentratie in de kallibratiesuspensies (absolute kwantificatie) (White, Blainey et al. 2009, Taylor, Laperriere et al. 2017). Bij de nieuwere qPCR methoden op het KWR laboratorium is gebruik gemaakt van kallibratiesuspensies die met ddPCR zijn gekwantificeerd. In het onderzoek zijn de originele kallibratiesuspensies gebruikt voor kwantificatie met qPCR alsook de gecorrigeerde waarden weergegeven waarbij de absolute kwantificatie met ddPCR is gehanteerd als de “juiste” kwantitatieve waarden. In dit onderzoek is gebruik gemaakt van kallibratiesuspensies die op verschillende manieren zijn gekwantificeerd waardoor er verschillen kunnen ontstaan tussen verschillende methoden bij het vergelijken van ddPCR met qPCR.
In Tabel 1 is aangegeven op welke manier de, in dit onderzoek gebruikte, kallibratiesuspensies zijn gekwantificeerd.

Tabel 1. Gebruikte kallibratiesuspensies voor het genereren van qPCR ijklijnen

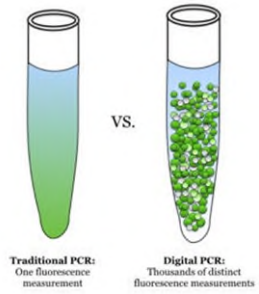
Organisme	Kwantificatie ijklijn suspensie
Legionella pneumophila	*ddPCR gekallibreerde IC*
Pseudomonas aeruginosa	*Fluorometrisch*
Aspergillus fumigatus	*Fluorometrisch*
Virus 2314	*ddPCR*
Mens-specifieke *Bacteroides*	*Fluorometrisch*

2.1.2 Droplet digital PCR: ddPCR

Bij het gebruik van ddPCR wordt een mengsel van DNA uit het te onderzoeken monster en de reagentia, voor het uitvoeren van PCR, verdeeld over een groot aantal individuele afgesloten druppels (droplets; Figuur 6). Bij KWR

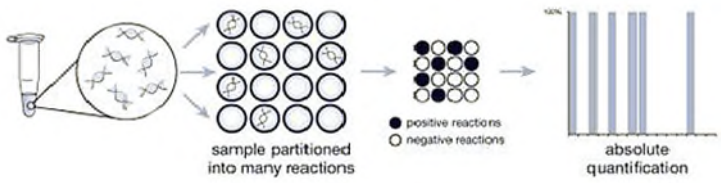
wordt gebruik gemaakt van het ddPCR systeem van Biorad, bij dit systeem worden de reagentia verdeeld over ca. 20.000 druppels met een volume van ca. 1 nl per druppel.

Figuur 6. qPCR reactie met alle DNA moleculen en reagentia verspreid door het reactievaatje (links) en ddPCR met DNA moleculen en reagentia verspreid over afgesloten druppels die zich gedragen als individuele reactiekamers (figuur overgenomen van Wikipedia).



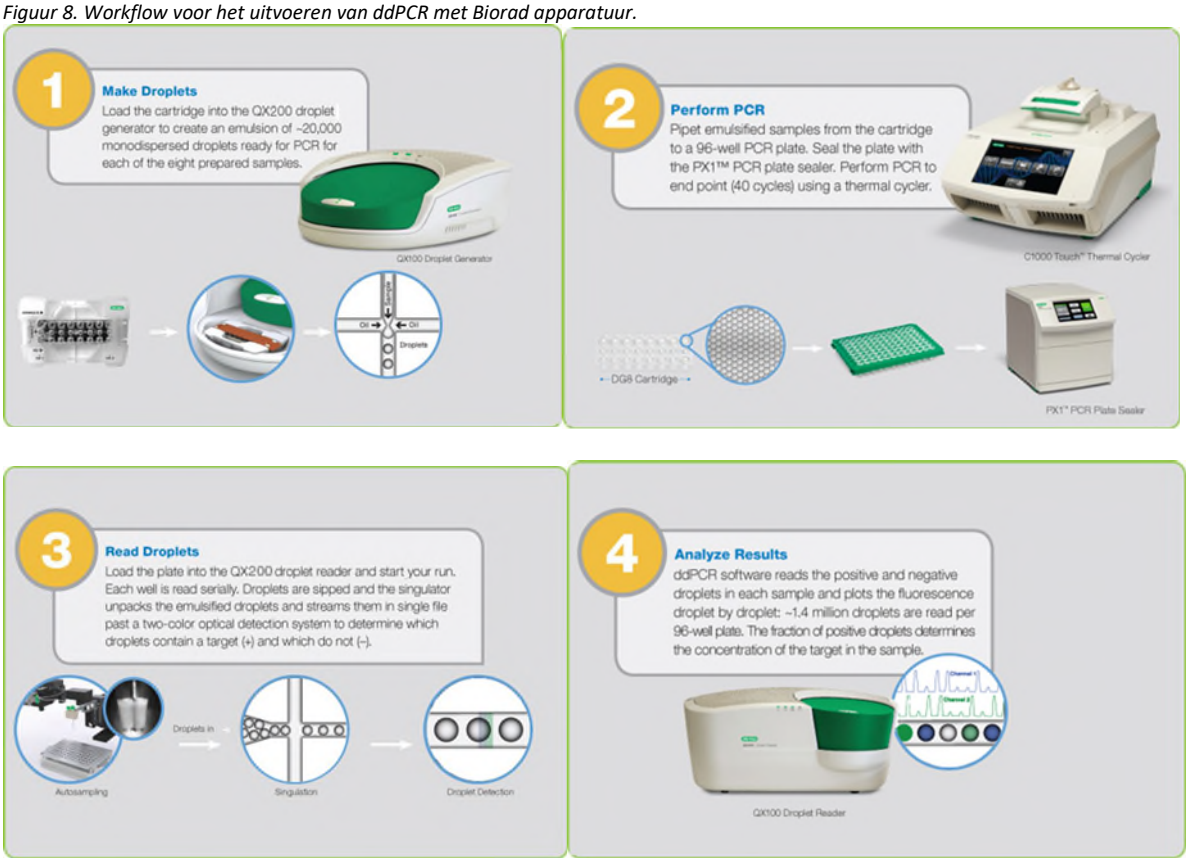
Door op de vloeistof, met hierin de druppels, een PCR-reactie uit te voeren zal er in druppels waarin het kenmerkende DNA-fragment aanwezig is, een fluorescentiesignaal ontstaan en in druppels waarin het kenmerkende DNA-fragment niet aanwezig is, zal geen fluorescentiesignaal ontstaan (Figuur 7).

Figuur 7. Principe van ddPCR: DNA wordt verdeeld over individuele druppels en PCR vindt plaats in deze druppels. Na de PCR-reactie zijn er positieve druppels (waarin amplificatie van target DNA heeft plaats gevonden) en negatieve druppels (waarin geen amplificatie heeft plaats gevonden)



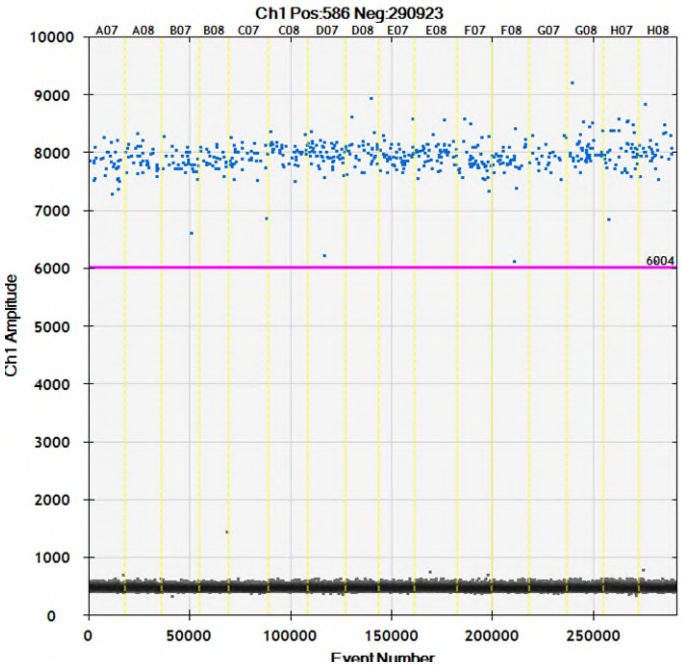
Voor het bepalen van het aantal druppels met sterk fluorescentiesignaal (positieve druppels) en het aantal druppels met zwak fluorescentiesignaal (negatieve druppels) wordt het reactiemengsel door een “Droplet reader” geleid. Deze “Droplet reader” is een eenvoudig soort flowcytometer die het aantal druppels kan tellen met een zwak fluorescentiesignaal (druppels waarin geen kenmerkend DNA-fragment aanwezig was en dus ook geen vermeerdering heeft plaats gevonden d.m.v. PCR) en het aantal druppels met een sterk fluorescentiesignaal (hierin was het kenmerkend DNA-fragment aanwezig en heeft vermeerdering d.m.v. PCR plaatsgevonden). Op basis van deze telling wordt de concentratie van het kenmerkende DNA-fragment nauwkeurig bepaald, zonder dat hiervoor kallibratiesuspensies nodig zijn. Voor het bepalen van de concentratie van het kenmerkende DNA-fragment wordt gebruik gemaakt van een statistische berekening waarbij het aantal positieve en het aantal negatieve druppels wordt betrokken waarbij wordt uitgegaan van een Poisson verdeling van de DNA-moleculen over de druppels (https://www.bio-rad.com/en-nl/applications-technologies/absolute-quantification-pcr-targets-with-droplet-digital-pcr-system?ID=MDV359ESH). De gehele workflow van de ddPCR staat ook gevisualiseerd in Figuur 8.

Figuur 8. Workflow voor het uitvoeren van ddPCR met Biorad apparatuur.



In Figuur 9 is een voorbeeld van het resultaat van analyses met ddPCR weergegeven. Deze plot geeft een telling weer van het aantal druppels, waarbij het grootste deel van de druppels zwak fluoresceren (negatieve druppels, weergegeven in grijs) en een deel van de druppels sterk fluoresceren (positieve druppels, weergegeven in blauw). Op basis van deze analyse wordt er een basislijn ingesteld (roze) waarmee wordt bepaald bij welk fluorescentiesignaal een druppel wordt beschouwd als positief.

Figuur 9. Voorbeeld van het resultaat van een analyse met ddPCR.



In de plot wordt sterkte van het fluorescentiesignaal in elke druppel weergegeven op de y-as en de basislijn waarboven de signaalsterkte van de druppels als positief worden beschouwd is zichtbaar in roze. De hoogte van deze basislijn kan door de onderzoeker worden ingesteld.

2.1.3 Handelingen en kosten voor het uitvoeren van ddPCR en qPCR

De uitvoering van ddPCR is anders dan de uitvoering van qPCR, waardoor verschillende handelingen ("hands-on") nodig zijn voor iedere methode. Tevens worden ook andere reagentia en verbruiksartikelen toegepast. Deze verschillen resulteren in verschillende kosten tussen qPCR en ddPCR alsook een verschil in analysetijd (Tabel 2).

Tabel 2. Overzicht van handelingen en kosten voor het uitvoeren van qPCR en ddPCR (voor ca. 32 monsters bij het gebruik van BioRad QX)

qPCR	Tijd (minuten)		ddPCR	Tijd (minuten)	
	"hands-on"	"hands off"		"hands-on"	"hands off"
Reactiemengsel samenstellen (Primers/probes/reagens mix)	30		Reactiemengsel samenstellen (Primers/probes/reagens mix/droplet-mix)	30	
Monsters/kalibratiesuspensie klaarzetten en DNA in PCR plaat pipetteren	30		Afzonderlijke reactievolumes maken met reactiemengsel en DNA	30	
DNA kalibratiesuspensie en controles pipetteren	5		Digestie met restrictie-enzym		15
Afdichten/Afdraaien/Thermocycler starten	5		Droplets genereren en in plaat pipetteren	60	
			Afdichten/Thermocycler starten	5	
qPCR (probe) run time		90-100	ddPCR run time		180
Uitlezen ddPCR ("droplet reader")					120
Uitwerken qPCR data	30		Analyse met "droplet reader"	30	
			Uitwerken ddPCR data	30	
Totaal "Hands on" tijd	100			185	
"Time to result"	200			500	
Kosten verbruiksartikelen	€ 300		€ 450		

Uit Tabel 1 volgt dat voor het uitvoeren van ddPCR ca. 85 minuten (grove schatting) meer "hands-on" tijd nodig is dan voor het uitvoeren van qPCR analyses. Een groot deel van deze benodigde extra tijd is nodig voor het maken van de druppels en het uitvoeren van een restrictiedigestie. Een groot deel van deze extra tijd kan worden beperkt door het toepassen van een automatisch systeem voor het genereren van druppels (Biorad, Auto DG). Voor het uitvoeren van ddPCR is bovendien meer "hands off" tijd nodig (ca. 300 min.) voor het uitvoeren van de PCR en het uitlezen van de resultaten. Tevens volgt uit Tabel 1 dat het uitvoeren van een ddPCR 4,70 € per monster duurder is dan het uitvoeren van qPCR. Deze hogere kosten door ddPCR worden veroorzaakt door de duurdere PCR-reagentia en de benodigde olie en cartridge voor het genereren van de druppels.

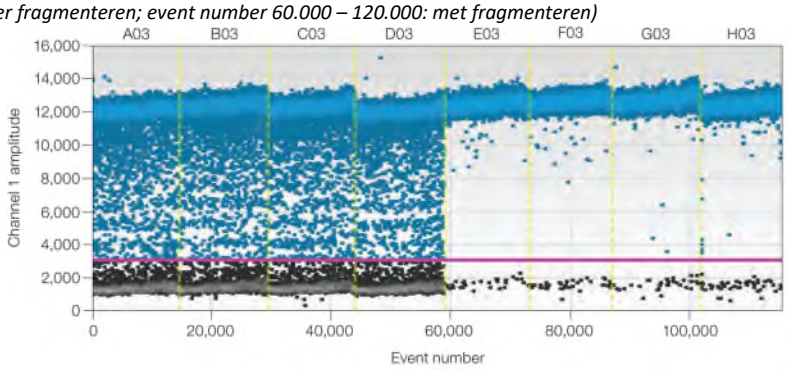
2.1.4 Ontwikkeling en optimalisatie van de reactieomstandigheden voor ddPCR

Voor de ontwikkeling en optimalisatie van ddPCR-methoden zijn de bij KWR aanwezige qPCR-methoden voor het detecteren van een aantal doelorganismen als uitgangspunt genomen. Aangezien over het algemeen de optimale reactieomstandigheden (temperatuurprofiel) in ddPCR anders zijn dan de reactieomstandigheden voor qPCR, zijn twee onderdelen van belang voor ontwikkeling en optimalisatie:

a) *Het optimaliseren van de temperatuur voor binding van de primers aan het kenmerkende DNA-fragment (annealingtemperatuur).*
b) *Fragmenteren van DNA door toepassing van een restrictie-enzym*

Ad a): Voor het optimaliseren van de annealingtemperatuur wordt de PCR uitgevoerd in een temperatuurgradiënt waarbij in elke rij van het PCR-block een andere temperatuur aanwezig is. Voor het beoordelen van de resultaten wordt gebruik gemaakt van de hoogste temperatuur waarbij de signaalsterkte in de druppels het hoogst is. De hoge annealingtemperatuur zorgt voor een kleinere kans op niet-specifieke binding van de primers aan het DNA, waardoor de vorming van niet-specifiek signaal wordt geminimaliseerd. De hoge signaalsterkte in de druppels zorgt ervoor dat een goed onderscheid gemaakt kan worden tussen negatieve en positieve druppels.
Ad b): Voor het uitvoeren van een optimale ddPCR is het, vooral bij aanwezigheid van hoge concentraties DNA, van belang om het DNA eerst te fragmenteren. Het fragmenteren zorgt ervoor de het kenmerkende DNA-fragment beter bereikbaar is voor de primers en probe, waardoor het kenmerkende DNA-fragment efficiënter kan worden geamplificeerd. Deze efficiënte amplificatie zorgt voor een hoog en uniform fluorescentiesignaal per druppel. Bij minder efficiënt verlopende amplificatie is er risico op het ontstaan van druppels met een variabele hoeveelheid fluorescentiesignaal per druppel. Deze druppels zijn dan zichtbaar in het gebied tussen de negatieve en positieve druppels (dit fenomeen wordt “rain” genoemd). Bij het optreden van “rain” is het moeilijk om positieve van negatieve druppels te onderscheiden en te bepalen waar in de plot (Figuur 9) de basislijn moet worden geplaatst. Voor het fragmenteren van het DNA wordt gebruik gemaakt van een enzym dat op specifieke herkenningsplaatsen in het DNA knipt (restrictie-enzym). Voor de toepassing bij ddPCR is het van belang om te selecteren voor een restrictie-enzym waarvan zeker is dat deze niet knipt in de sequentie van het kenmerkende DNA-fragment maar wel frequent knipt in de rest van de DNA-sequentie, waardoor het kenmerkende DNA-fragment intact blijft en al het andere DNA in relatief kleine fragmenten wordt geknipt. Een voorbeeld van het gebruik van een restrictie-enzym voor het fragmenteren van het DNA t.b.v. het minimaliseren van “rain” is weergegeven in Figuur 10.

Figuur 10. Voorbeeld van het gebruik van een restrictie-enzym voor het fragmenteren van DNA om hiermee “rain” te minimaliseren (event number 0 – 60.000: zonder fragmenteren; event number 60.000 – 120.000: met fragmenteren)



Uit praktische overwegingen wordt bij de selectie van een restrictie-enzym gekozen voor een enzym met hoge activiteit in de PCR-buffer. Hierdoor is het mogelijk om het enzym toe te voegen tijdens de PCR-reactie en het DNA te fragmenteren voordat de PCR-reactie wordt uitgevoerd. Voor elke nieuwe assay is het van belang om een restrictie-enzym te kiezen (waarmee geen digestie van het doelfragment plaats vindt) en experimenteel te testen. De volgende restrictie-enzymen komen in aanmerking:

- HaeIII met knipplaats: GG||CC
  CC||GG
- MseI met knipplaats: T||TAA
  AA||TT
- AluI met knipplaats: AG||CT
  TC||GA

- HinFI met knipplaats: G||ANTC
  CTNA||G

2.1.5 Bepalen onderste analysegrens (LOD) en onderste kwantificatiegrens (LOQ) ddPCR en vergelijking met qPCR

Voor het bepalen van de onderste analysegrens van ddPCR en de vergelijking met qPCR is gezuiverd DNA van de doelorganismen *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus* en *Stenotrophomonas maltophilia* gebruikt. Voor de qPCR-methoden om "mens-specifieke *Bacteroides*" en "alternatieve virusindicator" te detecteren, zijn de doelorganismen niet beschikbaar en is gezuiverd DNA van een watermonster met een hoge concentratie van het kenmerkende DNA-fragment gebruikt. De concentratie van het kenmerkende DNA-fragment van de doelorganismen in het gezuiverde DNA is eerst bepaald met ddPCR en vervolgens zijn analyses met ddPCR en qPCR uitgevoerd op verdunningen met bekende concentratie van dit gezuiverde DNA. Voor kwantificatie met qPCR is bij deze analyses gebruik gemaakt van de kalibratiesuspensies die bij KWR in gebruik zijn. De concentraties in deze kalibratiesuspensies zijn bepaald met ddPCR (kallibratiesuspensie voor *L. pneumophila* en alternatieve virusindicator 2314) of door meting van de DNA-concentraties met de Qubit fluorometer (kallibratiesuspensie voor *P. aeruginosa,* mens-specifieke *Bacteroides* en *A. fumigatus*).
Voor het bepalen van de onderste analysegrens van de ddPCR en qPCR was het doel om analyses uit te voeren op verdunningsreeksen met de volgende concentraties DNA van de verschillende organismen:

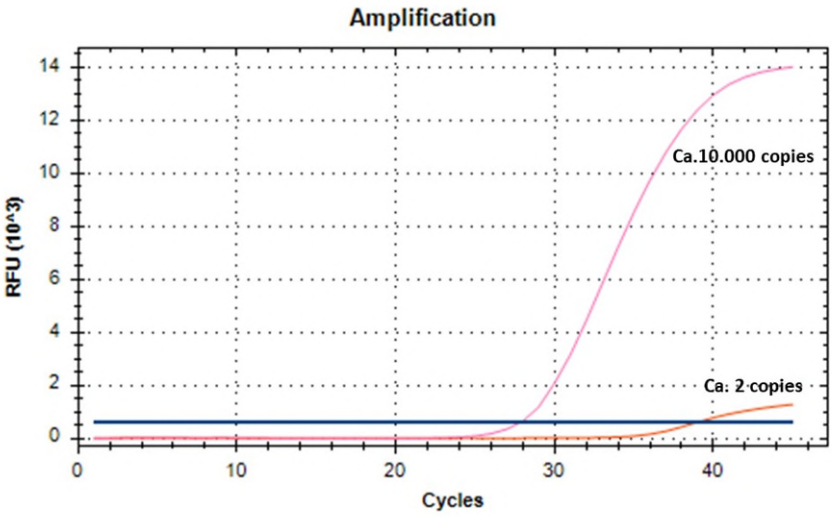
- 100 DNA kopieën/reactie: in 8-voud
- 10 DNA kopieën/reactie: in 8-voud
- 5 DNA kopieën/reactie: in 16-voud
- 3 DNA kopieën/reactie: in 24-voud
- 1 DNA kopie/reactie: in 24-voud

Onder LOD wordt de laagste concentratie bedoeld die nog met een bepaalde zekerheid kan worden aangetoond. Onder LOQ wordt de laagste concentratie verstaan die nog met een bepaalde zekerheid kan worden gekwantificeerd. Op basis van verkregen resultaten is de detectielimiet (limit of detection, LOD en limit of quantification LOQ) van de qPCR- en ddPCR-methoden bepaald. Voor de berekening van de LOD's is gebruik gemaakt van de methoden zoals beschreven in ISO 16140-2: 2016 (Anonymous 2016) en voor het uitvoeren van de berekeningen is gebruik gemaakt van de bij deze ISO meegeleverde Excelsheet (https://standards.iso.org/iso/16140/-5/ed-1/en/). De resultaten zijn weergegeven als $LOD_{50\%}$ (concentratie waarbij detectie plaats vindt in 50% van de monsters) en $LOD_{95\%}$ (concentratie waarbij detectie plaats vindt in 95% van de monsters). Voor het bepalen van de LOQ is gebruik gemaakt van eerder gepubliceerde richtlijnen (Forootan, Sjöback et al. 2017). In deze richtlijnen wordt gebruik gemaakt van de variatiecoëfficiënt: VC= 100X SD/gemiddelde concentratie (waarbij SD de standaarddeviatie is). Voor het bepalen van de LOQ wordt de laagste concentratie genomen waarbij in alle in replica's het doelorganisme wordt aangetoond en de VC tussen de metingen minder dan 35% is.

Voor het toetsen of qPCR meetwaarden uit deze experimenten significant verschillend zijn van ddPCR meetwaarden is een gepaarde T-toets gebruikt (in excel) waarbij de reeksen zijn beschouwd als significant verschillend als $p<0,05$.

Interpretatie van qPCR en ddPCR resultaten
Bij het toepassen van qPCR voor het kwantificeren van lage concentraties van het DNA van micro-organismen wordt er in de praktijk bij KWR (en de meeste andere laboratoria) gebruik van grenswaarden om te bepalen of het DNA in monsters aan- of afwezig is. Bij zeer lage concentraties is er, naast een hoge Ct waarde, ook een laag fluorescentiesignaal (Figuur 11). Dit lage fluorescentiesignaal maakt het aantonen en kwantificeren van zeer lage concentraties gevoelig voor artefacten waarbij door niet-specifieke afbraak van de probe aan het einde van de PCR-reactie enig fluorescentiesignaal kan ontstaan. Deze eigenschap zorgt ervoor dat, op basis van ervaringen in de praktijk, vaak een drempelwaarde wordt aangehouden. Deze dremplewaarde is een concentratie (of Ct waarde) waaronder de qPCR reactie, ondanks enig fluorescentiesignaal, als negatief wordt beschouwd. Deze drempelwaarde wordt op basis van praktische ervaringen vastgesteld. Voor de qPCR voor detectie van *L. pneumophila* wordt een drempelwaarde van 3 DNA-kopieen per reactie toegepast. Bij het toepassen van ddPCR wordt het fluorescentiesignaal niet verdund over het gehele reactiemengsel maar blijft dit signaal gelocaliseerd in de druppel. Dit betekent dat de concentratie alleen invloed heeft op het aantal fluorescerende druppels maar geen invloed heeft op de signaalsterkte in een druppel. Hierdoor is interpretatie van analyses met lage concentraties eenvoudiger mogelijk met ddPCR dan met qPCR en is het niet noodzakelijk drempelwaardes te hanteren.
Bij de interpretatie van de analyseresultaten in dit onderzoek is bij qPCR geen drempelwaarde toegepast, het gevolg van het gebruik van een drempelwaarde wordt voor elk experiment wel besproken.

Figuur 11. Voorbeeld van een qPCR reactie met veel DNA-kopieën (ca. 10.000) en weinig DNA-kopieen (ca. 2) per reactie.



2.1.6 Analyses praktijkmonsters

Voor de analyse van praktijkmonsters (casestudies) zijn oppervlaktewatermonsters gebruikt voor het kwantificeren van humane *Bacteroides* en monsters afkomstig van drinkwaterzuiveringen voor het kwantificeren van de alternatieve virusindicator 2314.
Isolatie van DNA uit oppervlaktewatermonsters is uitgevoerd met de standaardmethode die bij KWR wordt toegepast (Heijnen 2015). In kort, een volume van 50-200 ml is gefiltreerd over een membraanfilter (poriegrootte 0,2 µm) en de PowerBiofilm Kit van Qiagen (voorheen MoBIO) is gebruikt voor het isoleren van het DNA uit de, op het filter geconcentreerde, organismen. Na zuivering op een affiniteitskolom is het DNA geëlueerd in een volume van 100 µl. Voor elke analyse (qPCR en ddPCR) zijn de bepalingen in duplo uitgevoerd (op 5 µl eluaat, het equivalent van 2,5-10 ml oppervlaktewater), het gemiddelde van de duplo meetwaarden is in het rapport weergegeven. Alle metingen zijn gecorrigeerd voor de opbrengst van toegevoegd controle DNA (IC).
Voor de analyses van virus 2314 in water afkomstig van monsters uit drinkwaterzuiveringen is een volume water van ca. 1 liter gefiltreerd over een centriconfilter (ultrafiltratie) en vervolgens is het concentraat gebruikt voor isolatie van DNA (Powerbiofilm Kit). Het gezuiverde DNA is geëlueerd in 200 µl waarna qPCR en ddPCR analyses zijn in duplo zijn uitgevoerd op 5 µl eluaat (het equivalent van ca. 25 ml water). De metingen zijn gecorrigeerd voor de opbrengst van toegevoegd controle DNA (IC).

3 Resultaten

Binnen dit project was het uitgangspunt om methoden te ontwikkelen en de prestatiekenmerken te onderzoeken voor het kwantificeren van de volgende organismen met ddPCR:

- De opportunistische pathogene micro-organismen:
  - *Legionella pneumophila* (bacterie)
  - *Pseudomonas aeruginosa* (bacterie)
  - *Stenotrophomonas maltophilia* (bacterie)
  - *Aspergillus fumigatus* (schimmel)
- Een alternatieve virusindicator (virus)
- mens-specifieke *Bacteroides* (bacterie)

3.1 Ontwikkeling en optimalisatie van de methoden

De bestaande qPCR-methoden bij KWR voor het detecteren van de organismen zijn als uitgangspunt genomen. Voor het optimaliseren van de ddPCR-methoden zijn de volgende stappen uitgevoerd:

- Het optimaliseren van de temperatuur voor binding van de primers aan het target-DNA (annealingtemperatuur).
- Is onderzocht welk restrictieenzym kan worden toegepast voor het fragmenteren van DNA.

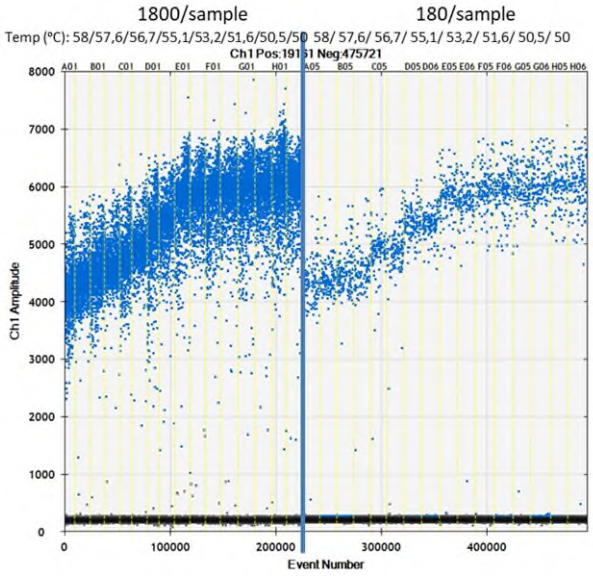
Voor de ontwikkeling van een ddPCR-methode voor de detectie van *L. pneumophila* wordt in paragraaf 3.2 uitgebreid ingegaan op de resultaten van deze optimalisatiestappen. Het resultaat van de stappen voor de ontwikkeling van ddPCR-methoden voor de andere organismen is vergelijkbaar met die van *L. pneumophila*. Voor de andere organismen is daarom alleen een korte samenvatting gegeven van de resultaten van de optimalisatiestappen.
Na optimalisatie van de methoden zijn analyses met qPCR en ddPCR uitgevoerd op verdunningsreeksen van de organismen om hiermee inzicht te krijgen in de onderste analysegrens (LOD) en de onderste kwantificatiegrens (LOQ) van de ontwikkelde ddPCR- methoden en de relatie met de onderste analysegrens met de qPCR-methoden.

3.2 Detectie van *Legionella pneumophila*

Voor detectie van *L. pneumophila* zijn de primers en probe van een eerder ontwikkelde qPCR gebruikt als startpunt (Wullings, Bakker et al. 2011). Bij het omzetten van de qPCR methode naar een methode voor ddPCR is eerst de annealingtemperatuur geoptimaliseerd. Hiervoor zijn ddPCR-analyses uitgevoerd bij verschillende annaealingtemperaturen door gebruik te maken van een gradiënt-PCR. Vervolgens is onderzocht welk restrictie-enzym kan worden gebruikt om het DNA in kleinere fragmenten te knippen, zodat een uniform fluorescentiesignaal in de druppels kan worden gewaarborgd.

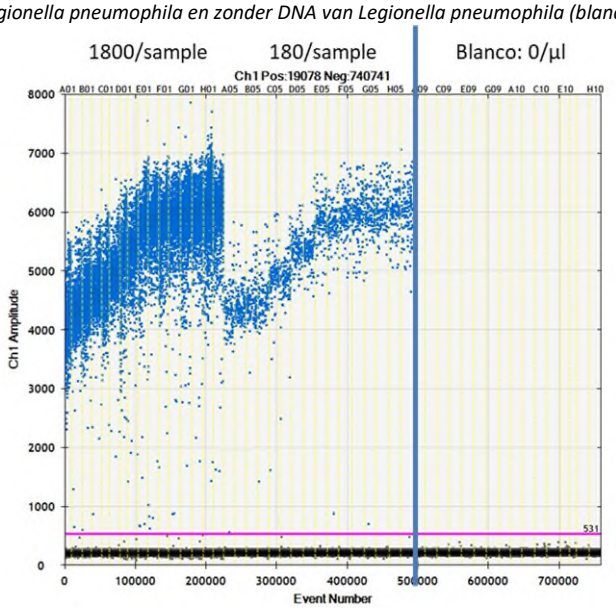
Optimalisatie annealingtemperatuur
In Figuur 12 zijn de resultaten samengevat van ddPCR-reacties uitgevoerd op twee concentraties van het kenmerkende DNA-fragment (1800 en 180 DNA kopieën per monster) en een gradiënt van annealingtemperaturen.

Figuur 12. Resultaten van analyses met ddPCR uitgevoerd op monsters met hierin 1800 of 180 DNA-kopieën Legionella pneumophila per monster waarbij de PCR is uitgevoerd met een gradiënt van annealingtemperaturen tussen 50 en 58°C



Bovenstaande analyses laten zien dat de signaalsterkte in de druppels gradueel toeneemt bij afname van de temperatuur van 58,0 tot 53,2°C. Bij temperaturen tussen 53,2 en 50,0°C neemt de signaalsterkte per druppel niet meer toe. Voor het selecteren van de optimale temperatuur waarbij de annealing van de PCR wordt uitgevoerd, is gekozen voor een zo hoog mogelijke temperatuur waarbij een zo hoog mogelijk fluorescentiesignaal wordt verkregen. Deze keuze wordt gemaakt omdat bij het gebruik van een hoge annealingtemperatuur de kans op niet specifieke binding van de primers aan ander DNA geminimaliseerd wordt en bij hoge fluorescentiesignalen is het mogelijk om goed onderscheid te maken tussen negatieve en positieve druppels. De resultaten geven aan dat de ddPCR reacties voor detectie van *L. pneumophila* het beste kunnen worden uitgevoerd bij een annealingtemperatuur van 53°C. Deze temperatuur is lager dan de temperatuur die wordt toegepast voor het uitvoeren van de qPCR voor *L. pneumophila* (60°C). Om inzicht te krijgen in het vermogen van de ddPCR om onderscheid te maken tussen positieve en negatieve druppels zijn er ook analyses uitgevoerd op monsters waaraan geen DNA van *L. pneumophila* is toegevoegd (blanco monsters), het resultaat van deze analyses is weergegeven in Figuur 13.

Figuur 13. Vergelijking van resultaten van Legionella pneumophila ddPCR op monsters met hierin 180 (rechts) of 1800 DNA-kopieën (links) van Legionella pneumophila en zonder DNA van Legionella pneumophila (blanco)

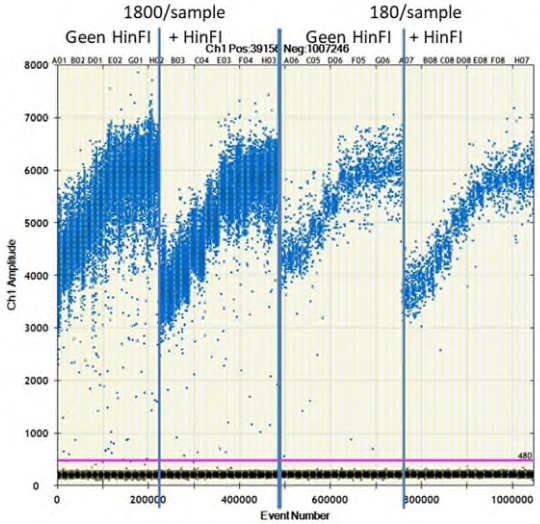


De analyse van de blanco monsters laat zien dat in deze monsters geen positieve druppels worden gevormd (met veel fluorescentiesignaal). Het signaal in de druppels van blanco monsters is zeer laag waardoor het verschil met positieve druppels zeer groot is en er dus goed onderscheid gemaakt kan worden tussen positieve en negatieve druppels.

Restrictie-enzym voor fragmenteren van DNA

Om te bepalen welk restrictie-enzym het beste kan worden toegepast voor het fragmenteren van het DNA is eerst, op basis van de DNA-sequentie van het target-fragment, "*in silico*" onderzocht welk restrictie-enzym toegepast kan worden. Vervolgens is experimenteel vastgesteld in hoeverre het geselecteerde restrictie-enzym inderdaad kan worden gebruikt. Voor de ddPCR van *L. pneumophila* lijkt het restrictie-enzym HinFI toepasbaar aangezien op basis van de sequentie van het PCR-fragment ("target DNA") voorspeld kan worden dat dit enzym geen knipplaats heeft in het kenmerkende DNA-fragment. Om het effect van de toepassing van dit enzym te onderzoeken zijn ddPCR-analyses uitgevoerd op met HinFI geknipt en ongeknipt DNA. In Figuur 14 is het effect van de toepassing van het restrictie-enzym HinfI zichtbaar gemaakt.

Figuur 14. Invloed van fragmenteren van DNA met HinFI op monsters met hierin 180 (rechts) of 1800 DNA-kopieën (links) van kenmerkend DNA-fragment van Legionella pneumophila bepaald met ddPCR



Bovenstaande analyses maken duidelijk dat er geen effect is van het toepassen van HinFI op het aantal positieve druppels, om onduidelijke redenen lijkt de signaalsterkte per positieve druppel enigszins af te nemen maar dit heeft geen invloed op het identificeren van positieve druppels. Het aantal druppels met laag fluorescentiesignaal ("rain") neemt t.g.v van het toepassen van digestie met HinFI wel af. Het is te verwachten dat het enzym HinFI (met een knipplaats in een herkenningssite van slechts 4 nucleotiden: G||ANTC) veel zal knippen in het andere DNA uit een monster waardoor het totale DNA gefragmenteerd raakt, maar niet het kenmerkende DNA-fragment van *L. pneumophila* (wat dus detecteerbaar blijft).

3.2.1 Vergelijking onderste analysegrens ddPCR met qPCR voor detectie van *Legionella pneumophila*

Voor het bepalen van de onderste analysegrens van ddPCR voor detectie van *L. pneumophila* zijn er analyses uitgevoerd op verdunningen met hierin concentraties van 60; 6; 3; 2; 0,6 en 0 DNA-kopieën van *L. pneumophila* (Tabel 3). Op dezelfde verdunningen van *L. pneumophila* DNA zijn ook analyses uitgevoerd met qPCR en de resultaten hiervan zijn samengevat in Tabel 4. Tot slot zijn per theoretische concentratie (60; 6; 3; 2; 0,6; en 0 DNA kopieën), op basis van de gemeten concentraties met qPCR en ddPCR, de gemiddelde concentraties, de standaard deviaties en de variatie coëfficiënten van de metingen bepaald en samengevat in Tabel 5.

Tabel 3. Legionella pneumophila ddPCR-resultaten op monsters met 60; 6; 3; 2; 0,6 en 0 DNA-kopieën per reactie.

	DNA kopieën per reactie										
ddPCR conc.	**60**	**6**	**3**		**2**			**0,6**			**0**
A	72,0	9,4	1,6	5,6	3,4	1,4	1,6	0,0	1,4	1,4	
B	46,0	9,6	1,4	2,8	4,0	1,4	1,2	0,0	1,4	1,2	
C	76,0	4,2	4,2	2,8	1,6	1,2	6,4	2,6	0,0	0,0	
D	52,0	14,2	1,4	3,2	1,2	1,4	0,0	0,0	2,6	0,0	
E	56,0	8,2	1,4	2,8	2,6	2,6	1,4	0,0	1,4	0,0	0,0
F	44,0	9,0	1,4	2,8	0,0	0,0	0,0	1,2	3,6	2,6	0,0
G	56,0	8,2	0,0	5,6	4,2	5,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0
H	76,0	6,2	5,6	1,4	0,0	0,0	6,4	0,0	1,6	1,4	0,0
DNA kopieën Gemeten (gem)	59,8	8,6	2,8		2,0			1,0			0,0

Tabel 4. Legionella pneumophila qPCR resultaten op monsters met 60; 6; 3; 2; 0,6 en 0 DNA kopieën per reactie. In het bovenste deel van de tabel zijn de Cq waarden weergegeven en in het onderste deel het aantal gemeten DNA-kopieën (gemeten op basis van het relateren van de Cq waarden aan Cq waarden van kallibratiesuspensies (figuur 5)

	DNA kopieën per reactie										
qPCR Cq	**60**	**6**	**3**		**2**			**0,6**			**0**
A	33,6										
B	33,7	37,0	39,2	39,2	39,1	39,1	39,2	N/A	N/A	38,5	
C	33,5	36,1	37,6	39,1	38,2	N/A	37,0	N/A	39,1	N/A	
D	33,3	37,2	37,1	37,6	37,3	40,3	37,4	39,0	N/A	N/A	
E	33,5	36,7	37,5	N/A	39,0	37,4	39,0	N/A	N/A	39,1	N/A
F	33,2	36,1	38,6	37,0	37,3	37,1	39,0	N/A	39,1	N/A	N/A
G	33,6	36,8	39,1	38,0	39,0	38,0	39,1	N/A	N/A	N/A	N/A
H	33,6	37,0	37,2	37,5	39,3	37,4	38,1	39,0	39,1	N/A	N/A
qPCR conc.											
A	65,6										
B	61,3	6,7	1,5	1,5	1,6	1,6	1,5	0,0	0,0	2,3	
C	69,9	12,2	4,3	1,6	3,0	0,0	6,5	0,0	1,6	0,0	
D	80,1	5,8	6,3	4,5	5,2	0,7	4,9	1,7	0,0	0,0	
E	70,0	7,9	4,7	0,0	1,7	4,9	1,7	0,0	0,0	1,6	0,0
F	85,3	11,9	2,2	6,5	5,2	6,0	1,7	0,0	1,6	0,0	0,0
G	65,5	7,5	1,6	3,3	1,7	3,3	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0
H	63,7	6,5	5,8	4,6	1,4	5,0	3,2	1,7	1,6	0,0	0,0
DNA kopieen> Gemeten (gem)	**70,2**	**8,4**	**3,5**		**3,0**			**0,6**			**0**

Tabel 5. Gemiddelde gemeten concentraties, de standaard deviaties (SD), de procentuele coëfficiënt van variatie (%VC) en het percentage positieve monsters op basis van resultaten van Legionella pneumphila metingen met qPCR en ddPCR op monsters met 60; 6; 3; 2; 0,6 en 0 DNA kopieën per reactie.

		qPCR					ddPCR			
		Conc.			% positieve		Conc.			% positieve
Concentratie	N	Gemiddeld	SD	% VC	monsters	N	Gemiddeld	SD	% VC	monsters
60	8	70,2	7,8	11	100	8	59,8	12,3	21	100
6	7	8,4	2,4	29	100	8	8,6	2,7	31	100
3	14	3,5	2,0	58	93	16	2,8	1,7	61	94
2	21	3,0	1,9	63	95	24	2,0	1,9	99	71
0,6	21	0,6	0,8	144	33	24	1,0	1,1	107	54
0	4	0,0	0,0	ND	0	4	0,0	0,0	ND	0

De (hoogste) concentraties van 60 en 6 kopieën per reactie worden met qPCR en ddPCR in alle reacties gedetecteerd en een concentratie van 3 kopieën/reactie nog in vrijwel alle reacties. De concentraties van 2 en 0,6 kopieën/reactie worden, zoals verwacht, in slechts een deel van de geanalyseerde monsters aangetoond. Bij het toepassen van qPCR zijn in deze experimenten alle gemeten concentraties meegenomen in de analyses en is er geen drempelwaarde voor lage concentraties toegepast (zoals besproken in paragraaf 2.1.5). Als er wel een drempelwaarde van 3 kopieën/reactie zou worden toegepast op de qPCR resultaten dan zou geen van de reacties met 0,6 DNA-kopieën/reactie worden beschouwd als positief, slechts 10 reacties (48%) met een concentratie van 2 kopieën/reactie en 8 reacties (57%) met 6 kopieën/reactie. De verschillen tussen de metingen met qPCR en ddPCR zijn klein, bij statistische toetsing zijn de resultaten van ddPCR en qPCR metingen van de monsters met verschillende concentraties (60, 6, 3, 2 en 0,6 kopieën) statistisch niet verschillend (T-toets, $p>0,05$). Als er met qPCR geen drempelwaarde wordt toegepast voor de maximale Ct waarde of minimaal aantal DNA-kopieën waarboven (Ct) of waaronder (DNA-kopieën) detectie als betrouwbaar wordt beschouwd dan lijkt het met beide technieken mogelijk om concentraties tot 1 DNA-kopie per reactie aan te tonen. Er is dan weinig verschil is in het percentage positieve monsters bij een concentratie van 2 DNA-kopieën per reactie (95% met qPCR en 71% met ddPCR) en 0,6 DNA-kopieën per reactie (33% met qPCR en 54% met ddPCR). Kennelijk wordt het aantonen van deze lage concentraties genkopieën vooral beïnvloed door het kansproces, waarbij op basis van een kansverdeling een kopie wel of niet in een reactie aanwezig kan zijn. Dat resulteert in verdunningen waarin slechts in een deel *L. pneumophila* wordt aangetoond.

LOD en LOQ

De resultaten beschreven in de tabellen 3 en 4 zijn gebruikt voor het bepalen van de LOD van de ddPCR en de qPCR methode, de resultaten zijn weergegeven in Tabel 6. De resultaten van Tabel 5 laten zien dat er geen duidelijk verschil is in gevoeligheid tussen ddPCR en qPCR. De resultaten maken tevens duidelijk dat in 95% van de gevallen bij een genkopieconcentratie van ongeveer 3 genkopieën per reactie een concentratie wordt opgepikt voor het kenmerkende DNA-fragment van *L. pneumophila*.

Tabel 6. LOD (in DNA kopieën per reactie) van de ddPCR en qPCR methode voor detectie van Legionella pneumophila

Methode	$LOD_{50\%}$			$LOD_{95\%}$			LOQ
	Detectie	Onderste	Bovenste	Detectie	Onderste	Bovenste	
	Limiet	95% betrouwbaarheid		Limiet	95% betrouwbaarheid		(%VC<35%)
ddPCR	0,69	0,48	1,00	2,98	2,06	4,31	8
qPCR	0,82	0,58	1,15	3,54	2,52	4,96	8

3.3 Detectie van *Pseudomonas aeruginosa*

Voor de ontwikkeling van een ddPCR-methode voor detectie van *P. aeruginosa* is uitgegaan van de methode die eerder is ontwikkeld (van der Wielen 2011). Ook voor deze methode is de annealingtemperatuur geoptimaliseerd en is onderzocht welk restrictie-enzym kan worden toegepast voor het fragmenteren van het DNA. Een annealingtemperatuur van 54°C was optimaal. Voor het fragmenteren van DNA is de toepassing van een restrictie-enzym HaeIII bruikbaar (zie bijlage I.I voor een samenvatting van de resultaten).

3.3.1 Vergelijking onderste analysegrens ddPCR met qPCR voor detectie van *Pseudomonas aeruginosa*

Voor het bepalen van de onderste analysegrens van ddPCR voor detectie van *P. aeruginosa* zijn analyses uitgevoerd op monsters met hierin de theoretische concentraties van 100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën per monster. In Tabel 7 zijn de met ddPCR gemeten concentraties in deze monsters weergegeven. Op dezelfde verdunningen van het DNA van *P. aeruginosa* zijn ook analyses met qPCR uitgevoerd, de resultaten van deze analyses zijn samengevat in Tabel 8. Tot slot zijn per theoretische concentratie (100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën), op basis van de gemeten concentraties met qPCR en ddPCR, de gemiddelde concentraties, de standaard deviaties en de VC's van de metingen bepaald en samengevat in Tabel 9.

Tabel 7 Pseudomonas aeruginosa ddPCR-resultaten op monsters met 100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën per reactie.

	DNA kopieën per reactie										
ddPCR conc.	**100**	**10**	**5**		**3**			**1**			**0**
A	128,0	12,0	4,4	13,6	3,6	4,4	4,8	1,6	0,0	0,0	
B	128,0	8,2	7,8	1,6	4,2	7,2	3,0	1,6	0,0	0,0	
C	90,0	9,2	7,2	3,6	3,6	8,6	4,2	3,2	4,6	1,4	
D	120,0	12,0	5,0	3,2	4,0	3,4	2,8	4,4	0,0	0,0	
E	104,0	10,4	7,6	3,6	7,6	1,6	3,0	2,6	0,0	4,2	0,0
F	104,0	15,0	6,8	9,8	4,6	4,6	4,2	1,4	1,4	0,0	0,0
G	116,0	13,6	1,6	9,2	1,8	3,2	1,4	1,4	1,6	3,0	0,0
H	112,0	10,6	1,6	6,0	3,4	1,4	4,4	0,0	3,0	0,0	0,0
DNA kopieën Gemeten (gem)	112,8	11,4	5,8		4,0			1,5			0,0

Tabel 8. Pseudomonas aeruginosa qPCR-resultaten op monsters met 100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën per reactie. In het bovenste deel van de tabel zijn de Cq-waarden weergegeven en in het onderste deel het aantal gemeten DNA-kopieën (gemeten op basis van het relateren van de Cq-waarden aan Cq-waarden van kallibratiesuspensies)

	DNA kopieën per reactie										
qPCR Cq	**100**	**10**	**5**		**3**			**1**			**0**
A	32,5	35,4	38,8	36,2	37,4	37,4	36,9				
B	32,1	34,8	36,7	35,8	37,2	37,6	36,8	39,1	N/A	N/A	
C	32,0	36,1	36,0	39,0	37,3	38,6	37,0	N/A	37,8	38,6	
D	32,1	35,0	37,0	37,1	37,5	37,0	37,4	37,9	38,7	38,9	
E	32,2	35,2	36,4	36,7	37,8	37,6	36,9	38,5	37,9	N/A	N/A
F	32,4	35,1	37,0	37,2	37,4	37,8	37,3	38,3	41,1	N/A	N/A
G	32,4	35,4	36,2	36,6	37,3	36,7	37,4	N/A	39,2	N/A	N/A
H	32,4	35,8	36,0	39,1	37,5	36,9	38,2	N/A	N/A	N/A	N/A
qPCR conc.											
A	318,9	45,2	4,8	27,3	12,3	12,5	17,0				
B	404,5	66,5	19,8	36,3	13,6	10,5	18,4	3,9	0,0	0,0	
C	449,3	28,3	30,5	4,3	13,4	5,7	15,7	0,0	9,3	5,3	
D	396,7	59,4	16,2	14,6	11,8	16,2	12,5	8,7	5,3	4,4	
E	377,3	51,3	23,7	19,3	9,4	10,8	16,6	6,1	9,1	0,0	0,0
F	328,7	57,1	16,3	14,0	12,0	9,4	13,1	6,6	1,0	0,0	0,0
G	332,5	45,1	27,9	20,5	12,9	19,5	12,3	0,0	3,7	0,0	0,0
H	343,8	36,2	30,7	4,0	11,7	17,3	7,3	0,0	0,0	0,0	0,0
DNA kopieën Gemeten (gem)	369,0	48,6	19,4		13,0			3,0			0,0

Tabel 9. Gemiddelde concentraties op basis van resultaten van Pseudomonas aeruginosa metingen met qPCR en ddPCR op monsters met 100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën per reactie.

	qPCR								ddPCR				
					Gecorrigeerd*								
Concentratie Theoretisch	N	Conc. Gemiddeld	SD	%VC	Conc. Gem.	SD	%VC	% positieve monsters	N	Conc. Gem.	SD	% VC	% positieve monsters
100	8	369,0	42,8	12	104,1	12,1	12	100	8	112,8	12,2	11	100
10	8	48,6	11,7	24	13,7	3,3	24	100	8	11,4	2,1	18	100
5	16	19,4	9,5	49	5,5	2,7	49	100	16	5,8	3,3	56	100
3	24	13,0	3,3	26	3,7	0,9	26	100	24	4,0	1,8	45	100
1	21	3,0	3,4	112	0,9	1,0	112	50	24	1,5	1,5	104	58
0	4	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0	4	0,0	0,0	0	0

* Gecorrigeerd met een factor 3,5 vanwege kwantificatieverschil tussen ddPCR en qPCR

Uit de resultaten volgt dat de gemeten concentraties van het kenmerkende DNA-fragment van *P. aeruginosa* met ddPCR goed overeenkomen met de verwachte concentraties in de monsters. Dit was te verwachten omdat ddPCR is gebruikt voor het kwantificeren van de gebruikte DNA-suspensie van *P. aeruginosa*. Opvallend is wel dat de met qPCR gemeten concentraties significant hoger zijn dan de concentraties gemeten met ddPCR (T-toets, $p<0,05$; gemiddeld 3,5 keer hoger op basis van de gemiddelden van de metingen van monsters met 100 en 10 kopieën). Waarschijnlijk is het verschil tussen de gemeten qPCR- en ddPCR-waarden veroorzaakt doordat de concentraties in de kallibratiesuspensies die worden gebruikt voor het maken van een ijklijn voor kwantificatie met qPCR zijn bepaald met concentratiemetingen van het DNA met behulp van een fluorometer en niet met de ddPCR, zoals is gedaan voor de kalibratiesuspensies van *L. pneumophila*. Aangezien de gemeten concentratie met absolute kwantificatie (ddPCR) niet afhankelijk is van juiste kwantificatie van de kallibratiesuspensie is te verwachten dat de ddPCR waarden een beter beeld geven van de werkelijke concentraties. Daarom is in Tabel 10 een kolom toegevoegd waarin waarden zijn weergegeven die gecorrigeerd zijn voor de factor 3,5. Er is geen significant verschil tussen de gemeten concentraties met ddPCR en de gecorrigeerde qPCR meetwaarden (T-toets, $p>0,05$). Het percentage positieve monsters bij een theoretische concentratie van 1 kopie per reactie is voor qPCR (50%) vergelijkbaar met ddPCR wat suggereert dat de geanalyseerde concentratie in die monsters werkelijk dichtbij 1 kopie/reactie is.

De resultaten beschreven in de tabellen 7 en 8 zijn gebruikt voor het bepalen van de LOD van de ddPCR- en de qPCR-methode voor detectie van een kenmerkend DNA-fragment van *P. aeruginosa* (Tabel 10). De resultaten laten geen verschil in gevoeligheid zien tussen ddPCR en qPCR en maken duidelijk dat voor beide methoden de $LOD_{50\%}$ ca. 0,67 en de $LOD_{95\%}$ ca. 2 DNA-kopieën is.

Tabel 10. LOD (in DNA kopieën per reactie) van de ddPCR- en qPCR- methode voor detectie van Pseudomonas aeruginosa

Methode	$LOD_{50\%}$			$LOD_{95\%}$			LOQ
	Detectie Limiet	Onderste 95% betrouwbaarheid	Bovenste	Detectie Limiet	Onderste 95% betrouwbaarheid	Bovenste	(%VC<35%)
ddPCR	0,67	0,45	1,00	2,91	1,96	4,31	11,4
qPCR	0,67	0,45	1,00	2,91	1,96	4,31	48,6* (13,9**)

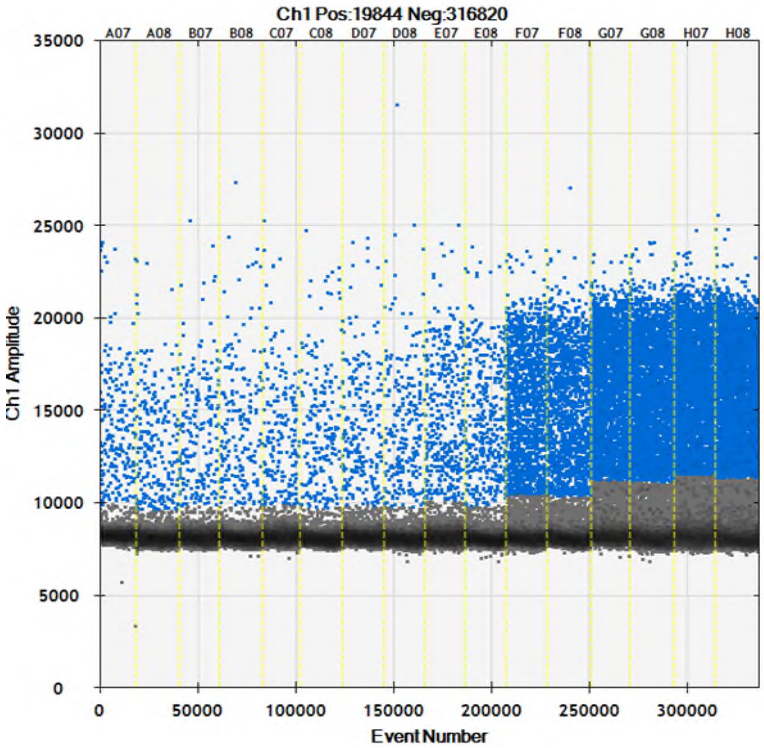
*De waarde als wordt uitgegaan van kwantificatie d.m.v. een ijklijnsuspensie (qPCR)

**De waarde als wordt uitgegaan van absolute kwantificatie met ddPCR (correctie van een factor 3,5)

3.4 Detectie van *Stenotrophomonas maltophilia*

Voor detectie van *S. maltophilia* is uitgegaan van een eerder ontwikkelde methode (da Silva Filho, Tateno et al. 2004, van der Wielen 2011), waarmee een fragment van het *chitA* gen van *S. maltophilia* wordt geamplificeerd. Bij deze PCR is geen probe beschikbaar en de ontwikkeling van een probe waarmee alle *S. maltophilia* taxons kunnen worden gedetecteerd is, vanwege een hoge mate van sequentievariatie, binnen het *chitA* gen niet eenvoudig en valt buiten de scope van dit onderzoek. Er is daarom gekozen om voor het uitvoeren van ddPCR reagentia te gebruiken waaraan de fluorescente kleurstof "Eva-Green" is toegevoegd. Deze kleurstof is vergelijkbaar met SYBR-green en fluoresceert sterk na (niet-specifieke) binding aan dubbelstrengs DNA. Bij de vorming van een PCR-fragment in een *druppel*, waarin DNA van *S. maltophilia* aanwezig is, zal de *druppel* t.g.v. de binding van Eva-green aan het gevormde fragment gaan fluoresceren. Voor het optimaliseren van de annealingtemperatuur is een gradiënt-PCR uitgevoerd en de resultaten van dit experiment zijn samengevat in Figuur 15.

Figuur 15. Resultaten van analyses met ddPCR uitgevoerd op monsters met hierin 180 (links) of 1800 DNA-kopieën (rechts) Stenotrophomonas maltophilia per monster waarbij de PCR is uitgevoerd met een gradiënt van annealingtemperaturen tussen 50 en 58℃



De resultaten laten zien dat geen duidelijk onderscheid te maken is tussen positieve en negatieve *druppel*s. Op advies van de leverancier van de ddPCR reagentia (Biorad) zijn pogingen gedaan om de reactieomstandigheden te optimaliseren door het testen van verschillende concentraties primers, maar dit leverde geen verbetering op. Ook het fragmenteren van het DNA met het restrictie-enzym MseI leverde geen verbetering op. Waarschijnlijk is de moeilijkheid voor het ontwikkelen van een ddPCR voor detectie van *S. maltophilia* het gevolg van de afwezigheid van een geschikte probe voor detectie van het gevormde fragment, mogelijk in combinatie met het relatief lange PCR-fragment (ca. 150 bp). Voor de ontwikkeling van een ddPCR voor detectie van *S. maltophilia* zullen dus alternatieve primers en een probe moeten worden ontwikkeld waarmee bij voorkeur een fragment met een lengte van maximaal 100 bp wordt geamplificeerd en gedetecteerd.

3.5 Detectie van *Aspergillus fumigatus*

Voor de ontwikkeling van een ddPCR methode voor detectie van *A. fumigatus* is uitgegaan van de methode die eerder is ontwikkeld (Challier, Boyer et al. 2004, van der Wielen and van der Kooij 2013) waarmee een deel van het

28S rRNA gen wordt gedetecteerd. Ook voor deze methode is de annealingtemperatuur geoptimaliseerd en is onderzocht welk restrictie-enzym kan worden toegepast voor het fragmenteren van het DNA. Een annealingtemperatuur van 60°C was optimaal, voor het fragmenteren van DNA is de toepassing van het restrictie-enzym MseI bruikbaar.

3.5.1 Vergelijking onderste analysegrens ddPCR met qPCR voor detectie van *Aspergillus fumigatus*

Voor het bepalen van de onderste analysegrens van ddPCR en qPCR voor detectie van *A. fumigatus* zijn analyses uitgevoerd op monsters met hierin concentraties van 100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën per monster die met ddPCR zijn bepaald. In Tabel 11 zijn de met ddPCR gemeten concentraties van deze monsters weergegeven. Op dezelfde verdunningen van het DNA van *A. fumigatus* DNA zijn ook analyses met qPCR uitgevoerd, de resultaten van deze analyses zijn samengevat in Tabel 12. Tot slot zijn per theoretische concentratie (100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën), op basis van de gemeten concentraties met qPCR en ddPCR, de gemiddelde concentraties, de standaard deviaties en de VC's van de metingen bepaald en samengevat in Tabel 13.

Tabel 11. Aspergillus fumigatus ddPCR-resultaten op monsters met 100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën per reactie.

	DNA kopieën per reactie										
ddPCR conc.	**100**	**10**	**5**		**3**			**1**			**0**
A	126,0	5,2	2,8	4,4	0,0	1,6	2,8	1,6	1,4	1,4	
B	100,0	18,0	4,8	2,8	0,0	1,6	2,8	3,2	3,0	2,8	
C	98,0	8,2	12,0	1,6	1,6	5,6	0,0	0,0	0,0	1,4	
D	98,0	12,0	1,6	10,2	0,0	4,2	2,8	1,4	0,0	0,0	
E	112,0	11,6	3,0	6,2	3,2	4,4	6,0	1,6	1,2	1,4	0,0
F	130,0	21,0	4,2	6,8	1,6	4,8	6,6	1,4	1,4	1,2	0,0
G	104,0	12,0	3,2	6,0	1,6	4,2	0,0	0,0	1,2	2,8	0,0
H	114,0	9,4	4,8	4,6	4,2	0,0	0,0	1,4	0,0	0,0	0,0
DNA kopieën Gemeten (gem)	110,3	12,2	4,9		2,5			1,2			0,0

Tabel 12. Aspergillus fumigatus qPCR resultaten op monsters met 100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën per reactie. In het bovenste deel van de tabel zijn de Cq-waarden weergegeven en in het onderste deel het aantal gemeten DNA-kopieën (gemeten op basis van het relateren van de Cq-waarden aan Cq-waarden van kallibratiesuspensies)

	DNA kopieën per reactie										
qPCR Cq	**100**	**10**	**5**		**3**			**1**			**0**
A	32,59	37,47	36,61	38,57	N/A	38,11	37,11				
B	32,51	36,23	36,57	36,72	38,94	37,42	37,14	N/A	N/A	N/A	
C	32,76	35,4	36,39	37,25	38,51	37,47	38,56	38,13	N/A	N/A	
D	32,54	35,82	36,65	N/A	38,87	N/A	37,96	N/A	N/A	N/A	
E	32,71	36,1	36,8	37,3	37,17	37,94	37,49	37,56	N/A	38,14	N/A
F	32,52	35,96	38,27	38,38	36,85	38,16	37,51	N/A	N/A	N/A	N/A
G	32,62	35,36	N/A	37,27	37,71	37,3	37,21	37,95	N/A	N/A	N/A
H	32,63	36,22	38,24	37,47	N/A	37,61	N/A	N/A	38,96	N/A	N/A
qPCR conc.											
A	293,8	9,7	17,6	4,5	0,0	6,2	12,5				
B	310,7	23,0	18,2	16,3	3,4	10,1	12,2	0,0	0,0	0,0	
C	261,6	41,3	20,6	11,3	4,7	9,6	4,5	6,1	0,0	0,0	
D	303,9	30,6	17,1	0,0	3,6	0,0	6,9	0,0	0,0	0,0	
E	271,4	25,2	15,4	10,9	12,0	7,0	9,5	9,1	0,0	6,1	0,0
F	309,1	27,9	5,5	5,1	14,9	5,9	9,4	0,0	0,0	0,0	0,0
G	288,9	42,4	0,0	11,1	8,2	10,9	11,6	6,9	0,0	0,0	0,0
H	286,9	23,3	5,6	9,7	0,0	8,8	0,0	0,0	3,4	0,0	0,0
DNA kopieen> Gemeten (gem)	**290,8**	**30,5**	**10,5**		**7,3**			**1,5**			**0**

Tabel 13. Gemiddelde concentraties op basis van resultaten van Aspergillus fumigatus metingen met qPCR en ddPCR op monsters met 100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën per reactie.

		qPCR								ddPCR			
					Gecorrigeerd*								
Concentratie Theoretisch	N	Conc. Gemiddeld	SD	%VC	Conc. Gem.	SD	%VC	% positieve monsters	N	Conc. Gem.	SD	% VC	% positieve monsters
100	8	290,8	16,4	6	113,0	6,4	6	100	8	112,8	11,7	10	100
10	8	27,9	9,9	35	10,9	3,8	35	100	8	11,4	3,6	32	100
5	16	10,6	6,4	60	4,1	2,6	63	100	16	5,8	2,8	48	100
3	24	7,2	4,3	60	2,8	1,7	60	100	24	4,0	2,1	53	100
1	21	1,5	2,8	188	0,6	1,1	188	50	24	1,5	1,0	66	58
0	4	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0	4	0,0	0,0	0	0

*De waarden als wordt uitgegaan van absolute kwantificatie met ddPCR van de DNA suspensie van *Aspergillus fumigatus* (correctie van een factor 2,6)

Zoals verwacht liggen de met ddPCR gemiddeld gemeten concentraties van het kenmerkende DNA-fragment van *A. fumigatus* ook dicht bij de concentraties in de monsters. Bij het gebruik van qPCR zijn de gemeten concentraties genkopieën significant hoger dan de met ddPCR bepaalde concentraties (T-toets, $p<0,05$; gemiddeld 2,6 keer hoger). Waarschijnlijk is het verschil tussen de gemeten qPCR- en ddPCR-waarden ook hier veroorzaakt doordat de concentraties in de kallibratiesuspensies die worden gebruikt voor het maken van een ijklijn voor kwantificatie met qPCR zijn bepaald met behulp van een fluorometer en niet met de ddPCR, zoals is gedaan voor de kalibratiesuspensies van *L. pneumophila*. Vanwege deze kwantificatieverschillen en de verwachting dat de ddPCR waarden correct zijn, zijn in Tabel 13 ook gecorrigeerde meetwaarden (met een factor 2,6) weergegeven. Bij het corrigeren van de qPCR meetwaarden is geen significant verschil waargenomen tussen de gemeten concentraties met ddPCR en de gecorrigeerde qPCR meetwaarden (T-toets, $p>0,05$). De resultaten beschreven in de tabellen 11 en 12 zijn gebruikt voor het bepalen van de LOD en LOQ van de ddPCR- en de qPCR-methode voor het kenmerkende DNA-fragment van *A. fumi*gatus en deze resultaten zijn weergegeven in Tabel 14. De resultaten van bovenstaande analyses laten, bij correctie van de qPCR meetwaarden, een klein verschil in gevoeligheid zien tussen ddPCR en qPCR. Bij deze methode lijkt de qPCR een enigszins lagere LOD te hebben dan de ddPCR. Het %VC tussen de meetwaarden is voor de kwantificatie van lage concentraties (≈1 kopie) met qPCR hoger dan met ddPCR. Dit betekent dat er minder variatie is tussen de ddPCR meetwaarden dan tussen de qPCR meetwaarden. De LOQ is vanwege de enigszins lagere VC, voor ddPCR lager dan voor qPCR. De kwantificaties met qPCR laten zien dat de bij deze methode gebruikte Kallibratiesuspensie zeer waarschijnlijk niet goed zijn gekwantificeerd, er wordt aanbevolen om deze suspensies met ddPCR te kwantificeren.

Tabel 14. LOD (in DNA-kopieën per reactie) van de ddPCR- en qPCR-methode voor detectie van Aspergillus fumigatus

Methode	$LOD_{50\%}$			$LOD_{95\%}$			LOQ
	LOD	Onderste	Bovenste	LOD	Onderste	Bovenste	(%VC<35%)
		95% betrouwbaarheid			95% betrouwbaarheid		
ddPCR	1,52	1,08	2,14	6,57	4,67	9,25	11,4
qPCR	1,02	0,72	1,44	4,41	3,12	6,24	290,8* (113**)

*De waarde als wordt uitgegaan van kwantificatie d.m.v. een ijklijnsuspensie (qPCR)

**De waarde als wordt uitgegaan van absolute kwantificatie met ddPCR (correctie van een factor 2,6)

3.6 Detectie van de alternatieve virusindicator Virus 2314

Voor de ontwikkeling van een ddPCR-methode voor detectie van een alternatieve virusindicator is uitgegaan van de methode die recent door KWR is ontwikkeld (Hornstra, Rodrigues da Silva et al. 2019). Er is gekozen om de ddPCR te ontwikkelen voor kwantificatie van virus 2314. Voor detectie van dit virus was bij de start van dit onderzoek geen

probe beschikbaar. Vanwege het probleem om een goede ddPCR-methode te ontwikkelen voor detectie van *Stenotrophomonas maltophila* zonder probe, is er gekozen om voor detectie van virus 2314 eerst een probe te ontwerpen. Vervolgens is de annealingtemperatuur geoptimaliseerd en is onderzocht welk restrictie-enzym kan worden toegepast voor het fragmenteren van het DNA. Een annealingtemperatuur van 54˚C was optimaal, voor het fragmenteren van DNA is de toepassing van een restrictie-enzym HaeIII bruikbaar (zie bijlage I.II voor een korte samenvatting van de resultaten).

3.6.1 Vergelijking onderste analysegrens ddPCR met qPCR voor detectie van Virus 2314

Voor het bepalen van de onderste analysegrens van de ddPCR voor detectie van Virus 2314, zijn analyses uitgevoerd op een oppervlaktewatermonster waarin de concentratie Virus 2314 met ddPCR is bepaald. ddPCR- en qPCR-analyses zijn daarna uitgevoerd op verdunningen met hierin de theoretische concentraties van 100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA kopieën per monster. In Tabel 15 zijn de met ddPCR gemeten concentraties in deze monsters weergegeven. Op dezelfde verdunningen van virus 2314 DNA zijn ook analyses met qPCR uitgevoerd en de resultaten van deze analyses zijn samengevat in Tabel 16. Tot slot zijn per theoretische concentratie (100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën), op basis van de gemeten concentraties met qPCR en ddPCR, de gemiddelde concentraties, de standaarddeviaties en de VC's van de metingen bepaald en samengevat in Tabel 17.

Tabel 15. Virus 2314 ddPCR-resultaten op monsters met 100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën per reactie.

	DNA kopieën per reactie										
ddPCR conc.	**100**	**10**	**5**		**3**			**1**			**0**
A	144,0	8,0	6,4	2,2	1,6	1,6	0,0	0,0	2,8	0,0	
B	112,0	11,2	9,2	4,6	7,6	3,0	0,0	1,8	1,4	0,0	
C	90,0	16,8	3,2	4,2	5,8	0,0	10,0	1,6	0,0	0,0	
D	88,0	7,4	1,6	2,4	3,2	1,4	0,0	0,0	1,4	0,0	
E	114,0	7,6	8,8	4,4	4,2	5,8	6,0	0,0	0,0	0,0	0,0
F	102,0	8,4	3,4	7,6	1,4	4,6	2,8	1,6	0,0	0,0	0,0
G	76,0	4,6	1,6	11,8	6,0	5,6	8,0	1,4	1,4	1,6	0,0
H	98,0	3,4	8,2	10,6	3,0	5,4	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0
DNA kopieën Gemeten (gem)	103,0	8,4	5,6		3,6			0,7			0,0

Tabel 16. Virus 2314 qPCR-resultaten op monsters met 100, 20, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën per reactie. In het bovenste deel van de tabel zijn de Cq-waarden weergegeven en in het onderste deel het aantal gemeten DNA-kopieën (gemeten op basis van het relateren van de Cq-waarden aan Cq-waarden van kallibratiesuspensies)

	DNA kopieën per reactie										
qPCR Cq	**100**	**10**	**5**		**3**			**1**			**0**
A	31,51	35,46	39,2	35,41	36,26	36,61	37,93	34,3	38,37	38,42	
B	31,17	34,79	35,28	35,47	36,13	36,08	36,04	37,84	35,31	38,29	
C	31,37	36,31	34,74	36,8	37,51	36,09	38,07	37,08	36,97	37,77	
D	31,09	34,21	34,6	35,43	35,55	36,31	36,54	N/A	38,74	38,82	
E	31,39	34,76	35,19	35,09	N/A	35,89	37,01	38,75	37,9	38,41	N/A
F	31,35	34,35	36,38	36,36	36,09	N/A	36,08	N/A	37,51	N/A	N/A
G	31,28	34,29	36,08	35,97	37,33	35,9	36,38	N/A	35,38	N/A	N/A
H	31,33	34,39	35,95	35,9	35,6	35,64	35,8	38,23	N/A	N/A	N/A
qPCR conc.											
A	74,9	4,9	0,4	5,0	2,8	2,2	0,9	0,4	0,7	0,6	
B	94,4	7,8	5,5	4,9	3,1	3,2	3,3	0,9	5,4	0,7	
C	82,2	2,7	8,1	1,9	1,2	3,2	0,8	1,6	1,7	1,0	
D	100,1	11,6	8,9	5,0	4,6	2,7	2,3	0,0	0,5	0,5	
E	81,4	7,9	5,9	6,3	0,0	3,6	1,7	0,5	0,9	0,6	0,0
F	83,4	10,5	2,6	2,6	3,2	0,0	3,2	0,0	1,2	0,0	0,0
G	87,8	10,9	3,2	3,4	1,3	3,6	2,6	0,0	5,2	0,0	0,0
H	84,8	10,2	3,5	3,6	4,4	4,3	3,9	0,7	0,0	0,0	0,0
DNA kopieen> Gemeten (gem)	**86,1**	**8,3**	**4,4**		**2,7**			**1,0**			**0**

Tabel 17. Gemiddelde concentraties op basis van resultaten van Virus 2314 metingen met qPCR en ddPCR op monsters met 100, 10, 5, 3, 1 en 0 DNA-kopieën per reactie.

	qPCR					ddPCR				
Concentratie Theoretisch	N	Conc. Gemiddeld	SD	% VC	% positieve monsters	N	Conc. Gemiddeld	SD	% VC	% positieve monsters
100	8	86,1	7,4	9	100	8	103,0	19,5	19	100
10	8	8,3	3,0	35	100	8	8,4	3,9	46	100
5	16	4,4	2,3	51	100	16	5,6	3,2	57	100
3	24	2,7	1,3	49	92	24	3,6	2,8	78	79
1	24	1,0	1,4	144	33	24	0,7	0,9	127	71
0	4	0,0	0,0	0	0	4	0,0	0,0	0	0

De resultaten laten zien dat het met zowel ddPCR als qPCR mogelijk is om de verschillende concentraties te meten. De concentraties van 100, 10 en 5 DNA-kopieën per reactie worden in alle reacties aangetoond, de lagere concentraties van 3 en 1 DNA-kopie per reactie worden, door statistische variatie in de verdeling van deze lage aantallen, slechts in een deel van de reacties aangetoond. De met ddPCR en qPCR gemiddelde gemeten concentraties van Virus 2314 liggen dichtbij elkaar. Dit is te verwachten omdat bij deze PCR de voor qPCR kwantificatie gebruikte kallibratiesuspensies gekalibreerd zijn met ddPCR. Er is er geen significant verschil tussen de gemeten concentraties met ddPCR en de gecorrigeerde qPCR meetwaarden (T-toets, $p>0,05$). De resultaten beschreven in de tabellen 14 en 15 zijn gebruikt voor het bepalen van de LOD van het kenmerkende DNA-fragment van Virus 2314 met behulp van de ddPCR en de qPCR methode en deze resultaten zijn weergegeven in Tabel 18. Het percentage positieve monsters bij een theoretische concentratie van 3 kopieën en 1 kopie per reactie is voor qPCR hoger (resp. 92 en 71%) dan bij ddPCR (resp. 79 en 41%). Het gevolg daarvan is dat de LOD van qPCR voor detectie van Virus 2314 enigszins lager is dan de LOD van ddPCR, Virus 2314 kan met qPCR dus enigszins gevoeliger worden gedetecteerd dan met ddPCR.

Tabel 18. LOD (in DNA kopieën per reactie) van de ddPCR en qPCR methode voor detectie van virus 2314

Methode	$LOD_{50\%}$			$LOD_{95\%}$			LOQ
	Detectie Limiet	Onderste 95% betrouwbaarheid	Bovenste 95% betrouwbaarheid	Detectie Limiet	Onderste 95% betrouwbaarheid	Bovenste 95% betrouwbaarheid	(%VC<35%)
qPCR	0,67	0,46	0,98	2,90	1,98	4,25	86,1
ddPCR	1,18	0,84	1,66	5,10	3,62	7,17	103,0

3.7 Detectie van mens specifieke *Bacteroides*

Voor de ontwikkeling van een ddPCR-methode voor detectie van humane *Bacteroides* is uitgegaan van de methode die eerder is ontwikkeld (Heijnen and Learbuch 2013, Heijnen 2015). Bij deze PCR wordt een deel van het 16S rRNA gen van, specifiek in de darmen van mensen voorkomende, *Bacteroides*-bacteriën gedetecteerd. Ook voor deze methode is de annealingtemperatuur geoptimaliseerd en is onderzocht welk restrictie-enzym kan worden toegepast voor het fragmenteren van het DNA. Een annealingtemperatuur van 53˚C was optimaal, voor het fragmenteren van DNA is de toepassing van een restrictie-enzym AluI bruikbaar (zie bijlage I.III voor de resultaten).

3.7.1 Vergelijking onderste analysegrens ddPCR met qPCR voor detectie van humane *Bacteroides*

Voor het bepalen van de onderste analysegrens voor detectie van humane *Bacteroides* zijn analyses uitgevoerd op DNA afkomstig van een rioolwatermonster, waarin de concentratie humane *Bacteroides* in eerste instantie met behulp van qPCR (inclusief de ijklijn die bij KWR beschikbaar is) zijn bepaald. Op basis van de met qPCR gemeten concentraties zijn verdunningen (100; 10; 5; 3; 1 en 0 DNA-kopieën per monster) samengesteld en analyses uitgevoerd met ddPCR en qPCR. In Tabel 19 zijn de met ddPCR gemeten concentraties in deze monsters weergegeven en in Tabel 20 de met qPCR gemeten concentraties. Bij het toepassen van ddPCR worden lagere concentraties waargenomen dan de concentraties die, op basis van qPCR metingen, verwacht werden (Tabel 19). Bovendien wordt bij een concentratie van 10 kopieën per reactie al geen signaal meer aangetoond in 2 monsters met qPCR en 3 monsters met ddPCR (n=8). Dit is waarschijnlijk het gevolg van de kallibratiesuspensie die voor het genereren van een ijklijn voor kwantificatie van humane *Bacteroides* wordt gebruikt. Deze kallibratiesuspensie is alleen met een fluorometrische meting (QuBit) in 2013 gekalibreerd (Heijnen and Learbuch 2013) en blijkt, op basis van de absolute kwantificatie met ddPCR te resulteren in concentraties die gemiddeld 9,4 keer hoger zijn dan de met ddPCR bepaalde concentraties. De qPCR meetwaarden zijn daarom met een factor 9,4 gecorrigeerd en deze gecorrigeerde meetwaarden zijn weergegeven in Tabel 21. Er is er geen significant verschil tussen de gemeten concentraties met ddPCR en de gecorrigeerde qPCR meetwaarden (T-toets, p>0,05). Op basis van de gemeten concentraties met qPCR en ddPCR zijn, per concentratie, de gemiddelde concentraties, de standaard deviaties en de VC's van de metingen bepaald en samengevat in Tabel 21.

Tabel 19. Humane Bacteroides ddPCR-resultaten op monsters met 100; 10; 5; 3; 1 en 0 DNA-kopieën per reactie.

	DNA kopieën per reactie (op basis van kwantificatie met qPCR)										
	100	10	5		3			1			0
ddPCR conc.	Gemeten concentraties (met ddPCR)										
A	10,6	1,8	7,2	0	0	1,6	0	0	0	0	
B	17,6	0	0	3,4	1,6	2,8	0	0	0	0	
C	20	1,6	1,6	1,6	1,4	2,2	0	1,4	0	0	
D	12,6	0	1,6	1,4	0	0	0	0	0	0	
E	12,6	5	1,6	0	0	0	0	0	0	0	0,0
F	10,4	1,6	0	0	1,4	0	0	0	0	0	0,0
G	18,2	1,6	1,4	2	1,6	0	1,6	0	0	0	0,0
H	21,6	1,6	0	0	1,6	0	0	0	1,4	0	0,0
DNA kopieën Gemeten (gem)	15,5	1,7	1,4		0,7			0,1			0,0

Tabel 20. Humane Bacteroides qPCR-resultaten op monsters met 100; 10; 5; 3; 1 en 0 DNA-kopieën per reactie. In het bovenste deel van de tabel zijn de Cq-waarden weergegeven en in het onderste deel het aantal gemeten DNA-kopieën (gemeten op basis van het relateren van de Cq-waarden aan Cq-waarden van kallibratiesuspensies)

	DNA kopieën per reactie										
qPCR Cq	16	1,6	0,8		0,5			0,2			0
A	34,0	37,8	38,2	N/A	N/A	N/A	38,6	N/A	N/A	N/A	
B	34,2	36,7	36,9	37,9	37,0	N/A	N/A	37,8	N/A	N/A	
C	33,3	36,8	N/A	N/A	N/A	N/A	38,0	N/A	N/A	N/A	
D	34,2	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	38,0	N/A	N/A	
E	33,9	N/A	37,8	37,8	38,8	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
F	34,4	N/A	N/A	N/A	N/A	37,8	38,7	N/A	N/A	N/A	N/A
G	34,4	37,7	38,0	37,2	N/A	N/A	N/A	36,9	37,7	N/A	N/A
H	34,1	36,2	37,8	N/A	38,9	37,8	37,9	N/A	N/A	N/A	N/A
qPCR conc.											
A	148,9	10,5	8,0	0,0	0,0	0,0	6,0	0,0	0,0	0,0	
B	127,9	22,1	20,2	9,9	17,8	0,0	0,0	10,0	0,0	0,0	
C	239,5	20,3	0,0	0,0	0,0	0,0	8,9	0,0	0,0	0,0	
D	128,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	9,1	0,0	0,0	
E	155,9	0,0	10,1	10,2	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	
F	109,9	0,0	0,0	0,0	0,0	10,1	5,7	0,0	0,0	0,0	0,0
G	116,3	10,9	9,2	15,8	0,0	0,0	0,0	19,3	10,9	0,0	0,0
H	135,6	31,6	10,5	0,0	4,8	10,1	9,5	0,0	0,0	0,0	0,0
	145,3	11,9	5,9		3,2			2,1			0,0

Een vergelijkbaar percentage monsters is positief in de monsters waar met ddPCR 1,6 DNA-kopieën per reactie werd aangetroffen (75% ddPCR versus 63% qPCR). Bij een concentratie van 0,8 DNA kopieën per reactie, bepaald met ddPCR, waren deze percentages 56% voor ddPCR en 50% voor qPCR. Deze resultaten suggereren dat detectie van slechts één DNA kopie met zowel qPCR als ddPCR mogelijk is. Zoals de VC laat zien neemt de variatie in ddPCR en qPCR metingen toe met het afnemen van de concentraties. Er is weinig verschil in de VC tussen qPCR en ddPCR metingen. De spreiding in de meetwaarden voor beide technieken is dus vergelijkbaar, wat resulteert in een zelfde LOQ (Tabel 21).

Tabel 21. Gemiddelde concentraties op basis van resultaten van humane Bacteroides metingen met qPCR en ddPCR op monsters met 100; 10; 5; 3; 1 en 0 DNA kopieën per reactie.

	qPCR								ddPCR				
					Gecorrigeerd*								
Concentratie Theoretisch	N	Conc. Gemiddeld	SD	%VC	Conc. Gem.	SD	%VC	% positieve monsters	N	Conc. Gem.	SD	% VC	% positieve monsters
100	8	145,3	38,4	26	15,5	4,1	26	100	8	15,5	4,1	27	100
10	8	11,9	11,1	93	1,3	1,2	93	63	8	1,7	1,4	88	75
5	16	5,9	6,5	110	0,6	0,7	110	50	16	1,4	1,8	132	56
3	24	3,2	4,8	148	0,3	0,5	148	38	24	0,7	0,9	135	38
1	21	2,1	4,9	238	0,2	0,5	238	17	24	0,1	0,4	332	8
0	4	0,0	0,0	0	0,0	0,0	0	0	4	0,0	0,0	0	0

*De waarden als wordt uitgegaan van absolute kwantificatie met ddPCR van de DNA suspensie van humane Bacteroides (correctie van een factor 9,4)

De resultaten beschreven in de tabellen 18 en 19 zijn gebruikt voor het bepalen van de LOD en LOQ van de ddPCR en de qPCR methode waarbij met ddPCR gemeten concentraties zijn gebruikt. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 22. De LOD en LOQ van de ddPCR zijn zeer vergelijkbaar met de LOD en LOQ van de qPCR.

Tabel 22. LOD (in DNA kopieën per reactie) van de ddPCR en qPCR methode voor detectie van mens-specifieke Bacteroides

Methode	$LOD_{50\%}$			$LOD_{95\%}$			LOQ
	Detectie Limiet	Onderste 95% betrouwbaarheid	Bovenste 95% betrouwbaarheid	Detectie Limiet	Onderste 95% betrouwbaarheid	Bovenste 95% betrouwbaarheid	(%VC<35%)
ddPCR	0,83	0,55	1,25	3,59	2,39	5,39	15,5
qPCR	0,80	0,53	1,19	3,44	2,31	5,14	15,5

3.8 Casestudies

Er zijn, in overleg met de themagroep “hygiëne en veiligheid” twee casestudies uitgevoerd om te onderzoeken welke meerwaarde het gebruik van ddPCR kan hebben bij het analyseren van praktijkmonsters:

- Het gebruik van ddPCR voor detectie van humane *Bacteroides* in oppervlaktewater.
- Het gebruik van ddPCR voor detectie van de alternatieve virusindicator Virus 2341 in water afkomstig uit verschillende drinkwaterzuiveringen

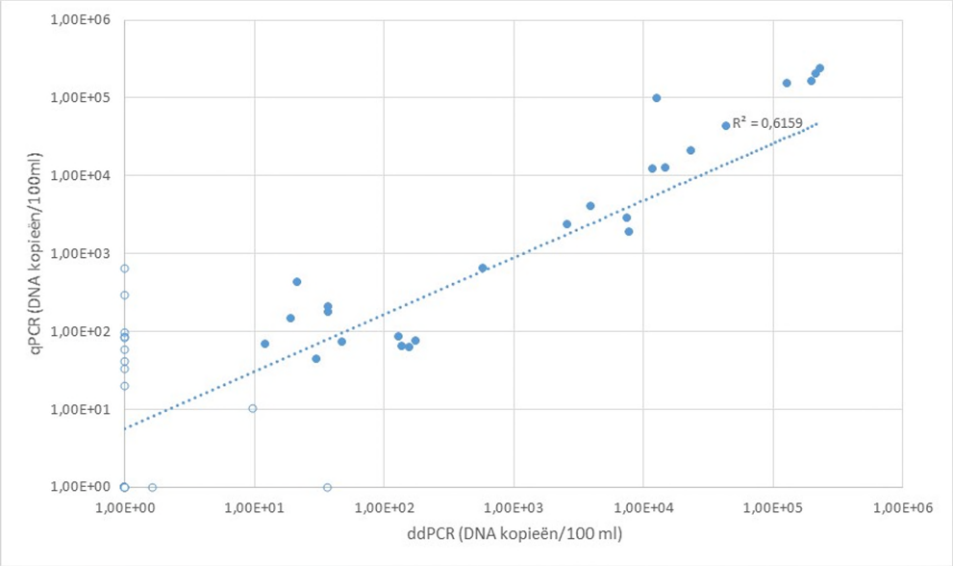
Bij deze casestudies was het onderzoeken van de relatie tussen de concentraties verkregen met ddPCR en qPCR de belangrijkste vraag. Er zijn daarom analyses uitgevoerd op praktijkmonsters afkomstig van verschillende projecten waarbij al analyses met qPCR zijn uitgevoerd

3.8.1 ddPCR en qPCR voor detectie van humane *Bacteroides* in oppervlaktewater

Om te onderzoeken welke relatie er is tussen concentraties genkopieën van humane *Bacteroides* gemeten met qPCR en ddPCR, zijn analyses uitgevoerd op 48 oppervlaktewatermonsters afkomstig van onderzoek in opdracht van waterschappen en Rijkswaterstaat. Deze monsters zijn vooral afkomstig van zwemwaterlocaties waar regelmatig problemen optreden met fecale verontreiniging. Op deze locaties worden metingen uitgevoerd t.b.v.

bronopsporing (waaronder humane *Bacteroides*-analyses met qPCR) om daarmee inzicht te krijgen in de invloed van relevante fecale verontreinigingsbronnen (Heijnen, Learbuch et al. 2014, Heijnen 2015, Heijnen 2015). In bijlage II zijn de qPCR en ddPCR meetwaarden van deze monsters weergegeven. In Figuur 16 zijn de met ddPCR en qPCR gemeten concentraties van het kenmerkende DNA-fragment van humane *Bacteroides* in deze oppervlaktewatermonsters tegen elkaar uitgezet waarbij de qPCR meetwaarden zijn gecorrigeerd voor de afwijking (factor 9,4) geïntroduceerd door de toegepaste ijklijn. Uit de resultaten van de bepaling van de onderste analysegrens (paragraaf 3.7.1.) volgde dat het gebruik van de kallibratiesuspensie in de qPCR-analyses resulteerde in een kwantificatie van het kenmerkende DNA-fragment van humane Bacteroides die een factor 9,4 hoger is dan de resultaten van de ddPCR (waarin geen gebruik wordt gemaakt van deze kalibratiesuspensies om de aantallen te kwantificeren). Zoals ook in paragraaf 3.7.1. werd opgemerkt is dit zeer waarschijnlijk het gevolg van het gebruik van DNA-concentratie metingen met behulp van de fluorometer voor het kwantificeren van de concentraties in de ijklijn die is gebruikt bij de qPCR analyses.

Figuur 16. Relatie tussen de concentratie DNA-kopieën van humane Bacteroides, gemeten met qPCR en ddPCR



De meetwaarden zijn op een lineaire (bovenste figuur) en dubbel-logaritmische schaal weergegeven. De trendlijn geeft een Pearson correlatie weer (Power). De monsters waarin, met één of beide analyses, geen humane Bacteroides werden aangetroffen zijn weergegeven met open symbolen (met een concentratie van de theoretische onderste analysegrens van 1.0E+00 kopieën/100 ml)

Bovenstaande resultaten laten zien dat de er een significant (Pearson Regressie analyse, $p<0,05$) en sterk ($R^2=0,62$) lineair verband is tussen de meetwaarden bepaald met ddPCR en qPCR. .
Van de 48 onderzochte oppervlaktewatermonsters is in 26 monsters humane *Bacteroides* aangetoond met zowel qPCR als ddPCR, terwijl in tien monsters met qPCR en ddPCR geen humane *Bacteroides* is aangetoond. In negen monsters is alleen met ddPCR humane *Bacteroides* aangetoond, en in drie monsters alleen met qPCR (Tabel 23).

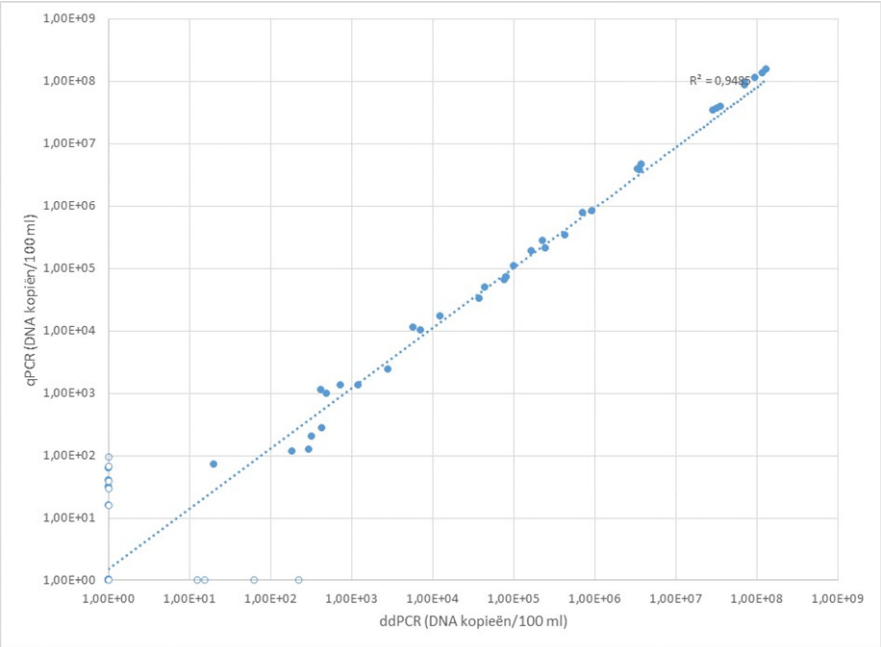
Tabel 23. Aantal en percentage humane Bacteroides positieve en negatieve monsters met qPCR en ddPCR

		qPCR	
		Pos	*Neg*
ddPCR	*Pos*	26 (54,2%)	9 (18,8%)
	Neg	3 (6,3%)	10 (20,8%)

Het groter aantal positieve monsters met ddPCR betekent mogelijk dat humane *Bacteroides* enigszins gevoeliger kan worden aangetoond in oppervlaktewatermonsters met ddPCR dan met qPCR.

Om te onderzoeken welke relatie er is tussen concentraties van het kenmerkende DNA-fragment van Virus 2314 gemeten met qPCR en ddPCR, zijn analyses uitgevoerd op 88 monsters afkomstig van vijf verschillende drinkwaterzuiveringen. Om een indruk te krijgen van de mogelijkheden van ddPCR en de relatie met qPCR is gekozen om monsters te analyseren van locaties waar hoge concentraties Virus 2314 verwacht worden en locaties waar de concentraties laag zijn. De resultaten van deze metingen zijn weergegeven in bijlage II.II, de relaties tussen de concentraties bepaald met qPCR en ddPCR in de monsters zijn weergegeven in Figuur 17.

Figuur 17. Relatie tussen de concentratie DNA-kopieën van Virus 2314, gemeten met qPCR en ddPCR



De meetwaarden zijn op een lineaire (bovenste figuur) en dubbel-logaritmische schaal weergegeven. De trendlijn geeft een geeft een Pearson correlatie weer (Power). De monsters waarin, met één of beide methoden, geen Virus 2314 werden aangetroffen zijn weergegeven met open symbolen (met een concentratie van de theoretische onderste analysegrens van 1.0E+01 kopieën/100 ml)

Bovenstaande resultaten laten zien dat een significant (Pearson Regressie correlatie $p<0,05$) en sterk ($R^2=0,95$) lineair verband is tussen de meetwaarden bepaald met ddPCR en qPCR. In tegenstelling tot kwantificatie van humane *Bacteroides* in oppervlaktewater, wordt voor kwantificatie van Virus 2314 met qPCR in watermonsters uit verschillende zuiveringen gebruik gemaakt van een met ddPCR gekwantificeerde DNA-suspensie voor het genereren van een ijkijn.

Bij lage concentraties ($<\approx 10^2$ kopieën/100 ml) Virus 2314 wordt het DNA van het virus in een deel van de monsters aangetoond met alleen ddPCR of qPCR. De resultaten uit Tabel 24 maken duidelijk dat Virus 2314 in 39,8% van de gevallen met beide methoden wordt gedetecteerd en in 44,3% van de gevallen met beide methoden niet word gedetecteerd. Daarnaast worden bij vier monsters (4,5%) virus 2314 alleen met qPCR gedetecteerd en bij tien monsters alleen met ddPCR (11,4%). Het groter aantal positieve monsters met ddPCR kan ook bij de Virus 2314 specifieke PCR betekenen dat Virus 2314 enigszins gevoeliger kan worden aangetoond in oppervlaktewatermonsters met ddPCR. Ook bij deze ddPCR is, op basis van de onderste analysegrens (paragraaf 3.6.1), niet te verwachten dat lage concentraties beter kunnen worden gedetecteerd met ddPCR dan met qPCR. Wellicht dat het verschil ook hier het gevolg is van een mindere gevoeligheid van de ddPCR dan qPCR voor de aanwezigheid van stoffen uit het milieu die PCR-reacties kunnen remmen (zoals eerder aangetoond: (Dingle, Sedlak et al. 2013, Racki, Dreo et al. 2014)).

Tabel 24. Aantal en percentage Virus 2314 positieve en negatieve monsters met qPCR en ddPCR

		qPCR	
		Pos	*Neg*
ddPCR	*Pos*	35 (39,8%)	10 (11,4%)
	Neg	4 (4,5%)	39 (44,3%)

4 Discussie

4.1 Algemeen

4.1.1 Ontwikkelde ddPCR methoden

In dit onderzoek zijn ddPCR methoden ontwikkeld voor detectie en kwantificatie van *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aspergillus fumigatus*, de alternatieve virusindicator Virus 2314 en mens-specifieke *Bacteroides*. Bij de ontwikkeling van deze ddPCR-methoden zijn de eerder ontwikkelde qPCR-methoden als basis gebruikt en konden deze redelijke eenvoudig en snel geoptimaliseerd worden voor ddPCR. Voor detectie van *Stenotrophomonas maltophilia* bleek het echter niet mogelijk een ddPCR-methode te ontwikkelen waarbij gebruik werd gemaakt van de primers die ook voor qPCR worden gebruikt. Het is mogelijk dat het fragment, dat tijdens de PCR wordt gevormd, te lang is (ca. 150 bp) waardoor de amplificatie ervan met variabele efficiëntie verloopt waardoor er *druppel*s gevormd worden met veel fluorescentie en *druppel*s met aanzienlijk minder fluorescente. Hierdoor is het niet goed meer mogelijk om onderscheid te maken tussen *druppel*s waarin geen DNA van *S. maltophilia* aanwezig is (negatieve *druppel*s) en *druppel*s waarin dit DNA wel aanwezig is (positieve *druppel*s). Het is ook een mogelijkheid dat er in de druppels meerdere fragmenten gevormd worden welke, door het gebruik van EVA-green als niet specifieke kleurstof (in plaats van een specifieke probe), druppels ontstaan met een varierend fluorescentieniveau. Voor de ontwikkeling van een ddPCR voor *S. maltophilia* is te verwachten dat de ontwikkeling van alternatieve primers, waarmee een korter fragment (<100 bp) wordt geamplificeerd, en een probe voor detectie van dit fragment, van belang is. In de literatuur zijn ondertussen enkele qPCR assays voor detectie van *S. maltophilia* beschreven waarbij een kort DNA-fragment wordt geamplificeerd met probedetectie (Melloul et al. 2016, Rios-Licea et al. 2010). Het is aan te bevelen om te testen of deze qPCR assays geschikt zijn voor de detectie van *S. maltophilia* in (drink)watermonsters.

4.1.2 Kosten voor uitvoering ddPCR en qPCR

De kosten voor het uitvoeren van ddPCR zijn hoger dan de kosten voor het uitvoeren van qPCR. Wanneer 32 monsters worden geanalyseerd dan zijn de kosten voor reagentia en verbruiksgoederen voor ddPCR ca €14,00 tegen ca. €9,40 per monster voor qPCR (de qPCR kosten zijn inclusief de ijklijn die mee moet worden genomen om de concentraties in de monsters met qPCR te kunnen kwantificeren). Voor de uitvoering van ddPCR moeten ook meer handelingen worden verricht waardoor het uitvoeren van 32 ddPCR-reacties ca. 180 minuten kost (5,6 min. per monster), terwijl het uitvoeren van 32 qPCR-reacties (inclusief de ijklijn) circa 100 minuten kost (3,1 min. per monster). Bij routinematig gebruik van ddPCR is een besparing in de tijdbesteding van ca. één uur in de workflow mogelijk door de aanschaf van een automatische Droplet Generator (Auto DG) waarmee de monsters en reagentia in een geautomatiseerd systeem over de *druppel*s verdeeld worden. Naast de benodigde tijd voor de uitvoering van ddPCR is ook meer ("hands-off") tijd nodig voor het genereren van data. Bij het gebruik van qPCR wordt immers de data al tijdens de qPCR gegenereerd (Real-time PCR) terwijl dit bij ddPCR in twee stappen gebeurd: eerst een PCR (die langer duurt dan qPCR) gevolgd door het scannen van het reactiemengsel voor het kwantificeren van negatieve druppels (200 min. qPCR/420 min. ddPCR)

4.2 Vergelijking qPCR- en ddPCR.

4.2.1 Analyse van verdunningsreeksen

Voor het vergelijken van de resultaten verkregen met qPCR en ddPCR zijn meervoudige analyses uitgevoerd op verdunningsreeksen van het DNA van de te detecteren micro-organismen (*L. pneumophila*, *P. aeruginosa* en *A.*

fumigatus) of op het DNA van watermonsters waarin de te detecteren micro-organismen in hoge concentraties aanwezig zijn (alternatieve virusindicator en mens-specifieke *Bacteroides*). De concentraties in deze monsters zijn eerst met ddPCR bepaald en vervolgens zijn op de verdunningsreeksen van deze monsters kwantificaties uitgevoerd met qPCR en ddPCR.

Voor een aantal methoden (*P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en mens-specifieke *Bacteroides*) is het opvallend dat er significante verschillen zijn in de resultaten van kwantificatie met ddPCR en kwantificatie met qPCR. Dit is zeer waarschijnlijk het gevolg van twee typen ijklijnen die in dit onderzoek gebruikt zijn voor kwantificatie met qPCR: ijklijnen gekwantificeerd d.m.v. fluorescente meting en ijklijnen gekwantificeerd met ddPCR. Voor kwantificatie van *P. aeruginosa*, *A. fumigatus* en mens-specifieke *Bacteroides* zijn ijklijnen gebruikt waarbij de concentraten van de ijklijnsuspensies zijn gekwantificeerd met een fluorescentiemeting (en niet met ddPCR). Het was te verwachten dat er weinig kwantitatieve verschillen zijn tussen ddPCR en qPCR bij het gebruik van ijklijnen welke gekwantificeerd zijn met ddPCR. Bij kwantificeren van ijklijnen door meting van fluorescentie wordt de meting, vanwege de beperkte gevoeligheid, uitgevoerd op een geconcentreerde DNA-suspensie waarna een groot aantal verdunningsstappen moeten worden toegepast om suspensies samen te stellen die bruikbaar zijn voor het genereren van ijklijnen. De beperkte betrouwbaarheid van de fluorescentiemeting en het grote aantal verdunningsstappen maakt deze kallibratiesuspensies minder betrouwbaar. Deze qPCR kallibratiesuspensies zijn gemaakt voordat ddPCR bij KWR beschikbaar was (vóór 2015) en al langere tijd in gebruik. Voor het bepalen van de concentraties in deze suspensies is gebruik gemaakt van een fluorometrische meting (met een QuBit fluorometer). Zoals ook in ander onderzoek is vastgesteld heeft het de voorkeur om qPCR kallibratiesuspensies te kwantificeren met ddPCR (Cao, Raith et al. 2015, Xue, Caton et al. 2018), omdat die nauwkeuriger het aantal genkopieën in de kalibratiesuspensies bepaald dan de fluorometrische metingen.
De qPCR analyses voor opportunistische pathogenen en humaanspecifieke *Bacteroides* die in het verleden zijn uitgevoerd op (drink)watermonsters zijn gekwantificeerd met ijklijnen waarbij de concentratie genkopieën is bepaald met een fluorometrische meting. Dat betekent dat de resultaten van die analyses een overschatting hebben gegeven van het aantal genkopieën dat in deze eerder geanalyseerde monsters zijn waargenomen. Aangezien veel van de metingen met qPCR op (drinkwater)monsters echter gericht waren op het meten van verschillen (tussen locaties of “in de tijd”), hebben deze overschatte waarden veelal geen invloed gehad op de conclusies die uit de resultaten van deze metingen zijn getrokken. Voor nauwkeurigere kwantificatie met qPCR wordt echter wel aanbevolen om ddPCR te gebruiken voor het kwantificeren van het DNA dat wordt gebruikt voor het genereren van kallibratiesuspensies.

4.2.2 Limit of Detection en Limit of Quantification

Met de analyses van de verdunningsreeksen van DNA is voor elke methode de “Limit Of Detection” (LOD) en de “Limit of Quantification” (LOQ) bepaald en is de LOD/LOQ van ddPCR vergeleken met de LOD/LOQ van qPCR (Tabel 25). De LOD’s zijn voor alle methoden dicht bij de 1 genkopie per reactie en variëren van 0,54 (ddPCR voor *P. aeruginosa*) tot 1,52 (ddPCR voor *A. fumigatus*) genkopieën per reactie. Deze resultaten laten dus zien dat detectie van 1 DNA kopie per reactie mogelijk is bij toepassing van deze ddPCR- en qPCR-methoden. Bij twee PCR-assays is de LOD van de qPCR lager dan de LOD van ddPCR (*A. fumigatus* en Virus 2314) en bij twee PCR-assays is dit omgekeerd (*L. pneumophila, P. aeruginosa*). De LOD van de PCR-assay voor mens-specifieke *Bacteroides* was hetzelfde voor qPCR en ddPCR. Bij één PCR-assay is de LOQ van de qPCR lager dan de LOQ van ddPCR (Virus 2314) en bij twee is dit omgekeerd (*P. aeruginosa* en *A. fumigatus*). Bij de overige twee assays (*L. pneumophila* en humaan-specifieke Bacteriodes) was de LOQ van de ddPCR en qPCR hetzelfde. Het verschil in de LOD’s van ddPCR en qPCR is echter erg klein voor alle vijf PCR-assays, waardoor de conclusie getrokken kan worden dat er weinig verschil is in de gevoeligheid tussen qPCR en ddPCR. Hierbij moet wel opgemerkt worden dat bij beide technieken alle analysesignalen zijn meegenomen. Voor qPCR betekent dit dat ook reacties met hoge Ct waarden (Ct>38) zijn beoordeeld als positief (DNA van organisme aanwezig). Vanwege het lage fluorescentiesignaal dat wordt verkregen bij deze hoge Ct waarden wordt, in de praktijk, getwijfeld aan de betrouwbaarheid van dergelijke signalen en wordt er vaak een arbitraire drempelwaarde, waarboven een qPCR signaal niet meer als betrouwbaar wordt beschouwd,

aangehouden (vaak Ct >38). Bij het gebruik van een geoptimaliseerde ddPCR-methode is de sterkte van het fluorescentiesignaal niet afhankelijk van de concentratie maar zal in elke *druppel*, waarin het kenmerkende DNA-fragment aanwezig is, een vergelijkbaar signaal ontstaan. Hierdoor is de interpretatie van de verkregen data bij vooral lage concentraties eenvoudiger, wat resulteert in een lagere LOD voor ddPCR dan qPCR in de praktijk. Bij het toepassen van een qPCR grenswaarde van Ct>38 waarboven het resultaat van een qPCR reactie als negatief wordt beschouwd is de LOD van de qPCR voor alle onderzochte methoden aanzienlijk hoger dan de LOD van de ddPCR methoden. De analyses laten ook zien dat de hoge Ct-waarden (>38), welke worden waargenomen bij lage concentraties met de qPCR-analyse, zeer waarschijnlijk wel het gevolg zijn van de aanwezigheid van één enkele DNA-kopie in de qPCR reactie. Dit onderzoek geeft aan dat de aanwezigheid van het te detecteren organisme in monsters met deze hoge Ct waarden betrouwbaar kan worden aangetoond met qPCR waardoor er weinig verschil is tussen de qPCR en ddPCR LOD's. De analyses van de LOD en LOQ hebben zich echter wel beperkt tot het analyseren van verdunde DNA-suspensies waarbij de qPCR reacties niet worden beïnvloed door eventuele matrixeffecten, het is daarom nog onduidelijk of deze lage concentraties ook kunnen worden aangetoond in praktijkmonsters. Doordat PCR reacties bij ddPCR plaats vindt door reactie met individuele DNA moleculen in druppels is de variatie in signaalsterkte tussen druppels zeer beperkt en daardoor eenvoudig interpreteerbaar. Bij zeer lage concentraties in qPCR reacties is de signaalsterkte laag waardoor het verkregen signaal lastiger te beoordelen is (zie voorbeeld Figuur 11). Verdere toepassing in de praktijk zal duidelijk maken of het gebruik van hoge Ct-waarden bij de qPCR niet leidt tot vals-positieve uitslagen. Over het algemeen zijn de verschillen in LOQ tussen qPCR en ddPCR ook klein. De LOQ van de PCR-assay voor *A. fumigatus* lijkt hierop, met een hogere LOQ voor qPCR, een uitzondering. Echter, dit grote verschil in de LOQ wordt bepaald door een klein verschil in de VC tussen twee verdunningen (Tabel 13) waarbij de VC voor ddPCR 32% is en de VC voor qPCR 35% (bij een concentratie van 11 DNA-kopieën). Dit kleine verschil in VC heeft veel invloed op de (theoretische) LOQ terwijl de gevonden verschillen tussen beide methoden klein zijn.

Tabel 25. LOD's en LOQ's van de ddPCR methoden en de qPCR methoden bij het meenemen van alle signalen en alleen signalen met Ct waarden <38 cycli

Methode	*L. pneumophila*		*P. aeruginosa*		*A. fumigatus*		Virus 2314		Mens-specifieke *Bacteroides*	
	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ	LOD	LOQ
ddPCR	0,7	8	0,5	11,4	1,5	11,4	1,2	103,0	0,8	15,5
qPCR	0,8	8	0,6*	13,7*	1,0*	113*	0,7	86,1	0,8*	15,5*
qPCR (Ct<38)	2,9		1,7		2,7		1,3			

**Gecorrigeerd vanwege afwijking in de concentraties van de ijklijnsuspensies*

- Bij de analyses uitgevoerd voor het bepalen van de LOD's met qPCR en ddPCR zijn de VC's van vrijwel alle analyses, op concentraties lager dan 10 DNA-kopieën per reactie, hoger bij het gebruik van qPCR dan bij het gebruik van ddPCR. Dit geeft aan dat qPCR leidt tot meer variatie in de meetwaarden bij analyse van monsters met lage concentraties DNA-kopieën dan ddPCR.

4.2.3 Casestudies

Om de toepassing van ddPCR op praktijkmonsters te onderzoeken en te vergelijken met qPCR zijn analyses uitgevoerd op:

- Mens-specifieke *Bacteroides* in oppervlaktewatermonsters
- Virus 2314 in monsters uit drinkwaterzuiveringen die oppervlaktewater gebruiken voor de productie van drinkwater.

Bij beide analyses is een significant en zeer sterk lineair verband waargenomen tussen de concentraties bepaald met ddPCR en de concentraties bepaald met qPCR (op lineaire en loglineaire schaal). Bij de mens-specifieke *Bacteroides*-metingen zijn de vergeleken qPCR-concentraties gecorrigeerd vanwege afwijkingen veroorzaakt doordat de concentraties in de kalibratiesuspensie die bij de qPCR-methode wordt gebruikt, is bepaald met een

fluorometer en, zoals in paragraaf 4.2.1 beschreven is deze meting niet nauwkeurig. Bij de vergeleken meetwaarden van natuurlijk Virus 2314 is de kallibratiesuspensie wel gekwantificeerd met ddPCR en voor de resultaten van deze analyse laat geen significante verschillen zien tussen de concentraties bepaald met qPCR of ddPCR. Voor beide datasets (humaan-specifieke *Bacteroides* en Virus 2314) zijn meer monsters positief met ddPCR dan met qPCR (Tabel 26). Dit hogere aantal positieve monsters met ddPCR dan qPCR is op basis van de waargenomen vergelijkbare LOD tussen ddPCR en qPCR niet te verwachten. Eerdere studies hebben beschreven dat ddPCR een verminderde gevoeligheid heeft voor inhibitors van de PCR-reactie dan qPCR (Dingle, Sedlak et al. 2013, Rački, Dreo et al. 2014). Het is daarom waarschijnlijk dat het verschil in aantal positieve monsters tussen ddPCR en qPCR in de hier beschreven studie het gevolg is van verminderde gevoeligheid van ddPCR voor de aanwezigheid van stoffen die een remmend effect hebben (inhibitors) op het verloop van de PCR reactie. De metingen van de opbrengst van het toegevoegde controle-DNA (interne controle: IC) gaven in de geanalyseerde monsters echter geen aanleiding om de aanwezigheid van PCR-remmende stoffen te verwachten. Mogelijk dat de opbrengst van de IC geen goede maat is voor het monitoren van remming van qPCR reacties in monsters met lage concentraties. Mogelijk dat het effect van remming groter is op de detecteerbaarheid van deze zeer lage concentraties dan op de detecteerbaarheid van de relatief hoge IC concentraties. Verder onderzoek wordt aanbevolen om meer inzicht te krijgen in het gebruik van IC voor het monitoren van remming.

Tabel 26. Aantal en percentage positieve praktijkmonsters voor detectie van Virus 2314 en mens-specifieke Bacteroides met ddPCR en qPCR

Methode	*Virus 2314 (n=88)*	*Mens-specifieke Bacteroides (n=48)*
ddPCR	45 (51,1%)	35 (72,8%)
qPCR	39 (44,3%)	29 (60,4%)

4.3 Betekenis voor toepassen van ddPCR en/of qPCR in de drinkwaterpraktijk

De resultaten van dit onderzoek maken duidelijk dat de toepassing van ddPCR voor de drinkwaterpraktijk (als alternatief voor qPCR) resulteert in hogere analysekosten (reagentia, apparatuur en “hands on” tijd) waarbij het met ddPCR langer duurt voordat de analyseresultaten beschikbaar zijn. Tegenover deze kosten en tijd staat het voordeel van de mogelijkheid tot ‘absolute’ kwantificatie waardoor de nauwkeurigheid van kwantificatie niet afhankelijk is van de beschikbaarheid van goede nauwkeurig gekwantificeerde kallibratiesuspensies (voor het genereren van ijklijnen). Zoals dit onderzoek duidelijk maakt, en ook wordt bevestigd door ander onderzoek (Xue, Caton et al. 2018), is het gebruik van ddPCR voor het kwantificeren van de kallibratiesuspensies van grote meerwaarde voor het maken van betrouwbare ijklijnen waarmee nauwkeuriger kwantificatie met qPCR mogelijk is. De analyse van verdunningsreeksen maakt duidelijk dat er vrijwel geen verschillen zijn tussen qPCR en ddPCR meetwaarden en dat ook de LOD’s en LOQ’s van de onderzochte methoden vergelijkbaar zijn. De variatie tussen meetwaarden in monsters met lage concentraties is met ddPCR enigszins lager dan qPCR. Daarnaast blijkt uit de analyse van praktijkmonsters dat detectie van lage concentraties mens-specifieke *Bacteroides* en Virus 2314 in een groter deel van de monsters plaats vindt met ddPCR dan met qPCR, waarschijnlijk t.g.v. verminderde gevoeligheid voor remmende stoffen (Cao, Raith et al. 2015). In een recente studie naar de toepassing van ddPCR voor detectie van verschillende mens-specifieke fecale DNA-merkers worden vergelijkbare resultaten gevonden (Nshimyimana, Cruz et al. 2019), ook in deze studie zijn de verschillen tussen ddPCR en qPCR klein. De hogere nauwkeurigheid door de toepassing van ddPCR is echter zeer beperkt en het is zeer de vraag of de beperkte voordelen (minder variatie en minder PCR-remming) opwegen tegen de nadelen (meer kosten en tijd en analyse). Dit zal in sterke mate afhangen van de toepassing van de analyses. In situaties waarbij lage concentraties of PCR-remming te verwachten zijn en dit niet opgelost kan worden door de analyse van aangepaste volumes is de toepassing van ddPCR te overwegen. Voor het samenstellen van betrouwbare ijklijnen is het kwantificeren van kallibratiesuspensies met ddPCR de aangewezen methode.

De eigenschap dat bij ddPCR de reactie plaats vindt in een afgesloten druppel waarbij één individueel DNA-molecuul een reactie aangaat met specifieke PCR primers/probes maakt het zeer goed mogelijk om onderscheid te maken tussen meerdere DNA-sequenties die minimaal van elkaar verschillen (tot slechts één nucleotide). Van deze

eigenschap is, zeer recent, gebruik gemaakt bij identificeren van varianten van het SARS-CoV-2 virus in rioolwater (Heijnen, Elsinga et al. 2021). Mogelijk zijn er toepassingen te bedenken zijn waarbij deze eigenschap toegevoegde waarde heeft voor het drinkwateronderzoek. Er kan daarbij gedacht worden aan identificatie van specifieke virussen of specifieke bacteriestammen met pathogene eigenschappen (zoals b.v. het onderscheiden van pathogene *L. pneumophila* stammen).

5 Conclusies en aanbevelingen

5.1 Conclusies

- Voor het uitvoeren van ddPCR zijn reagentia en gebruiksartikelen duurder dan voor het uitvoeren van qPCR. Daarnaast is de benodigde “hands-on” tijd voor het inzetten van de PCR-reacties en de uitvoering van de PCR-reacties in de machine langer voor ddPCR dan voor qPCR. Vanuit oogpunt van kosten- en tijdbesparing is het dus aantrekkelijker om qPCR dan ddPCR uit te voeren.

- Betrouwbare ddPCR-methoden zijn ontwikkeld waarmee de volgende micro-organismen kwantitatief in water kunnen worden gedetecteerd:
    - *Legionella pneumophila*
    - *Pseudomonas aeruginosa*
    - *Aspergillus fumigatus*
    - Alternatieve virusindicator Virus 2314
    - Mens-specifieke *Bacteroides*

  Een betrouwbare ddPCR-methode voor de kwantitatieve detectie van *Stenotrophomonas maltophilia* kon niet worden ontwikkeld op basis van de huidige qPCR-methode voor dit organisme.

- Een aantal van de gebruikte ijklijnen voor kwantificatie met qPCR bleek minder nauwkeurig doordat deze met een fluorometer zijn gekwantificeerd. DNA-suspensies voor het genereren van ijklijnen waarbij kwantificatie met ddPCR is uitgevoerd zijn goed bruikbaar voor nauwkeurige kwantificatie met qPCR.

- Het is van belang om ddPCR te gebruiken voor het bepalen van de concentraties in de kallibratiesuspensies welke worden gebruikt voor het genereren van ijklijnen t.b.v. kwantificatie met qPCR.

- De limit of detection (LOD) van de onderzochte qPCR- en ddPCR-methoden ligt dicht bij de 1 DNA-kopie per reactie. Wanneer echter voor qPCR een grenswaarde van 38 cycli wordt aangehouden voor de qPCR (in plaats van de 40 cycli die worden uitgevoerd), dan is de LOD voor de qPCR-methoden hoger dan die voor de ddPCR-methoden. Verder onderzoek moet inzicht geven in de bruikbaarheid van qPCR analyses voor praktijkmonsters met hoge (>38) Cq waarden.

- Interpretatie van lage meetwaarden in artificiële monsters is met ddPCR eenvoudiger doordat voldoende fluorescentiesignaal gevormd wordt in individuele druppels. De spreiding van de meervoudige analyses van de meetwaarden met < 10 DNA-kopieën per reactie is met ddPCR lager dan met qPCR, dus met ddPCR worden lage concentraties aan DNA-kopieën nauwkeuriger bepaald dan met qPCR.

- De concentraties DNA-kopieën van humaan-specifieke *Bacteroides* in oppervlaktewater en van Virus 2314 in watermonsters uit de drinkwaterzuivering laten een significant, sterk en 1:1 verband zien tussen concentraties gemeten met ddPCR en qPCR. Wanneer de concentraties DNA-kopieën tevens zijn bepaald met een betrouwbare kalibratiesuspensie voor de qPCR dan zijn de gemeten concentraties met qPCR en ddPCR niet significant verschillend van elkaar. Beide methoden kunnen dus betrouwbaar worden ingezet om het aantal genkopieën in een watermonster te bepalen.

- De ddPCR-methode detecteert frequenter lage concentraties DNA-kopieën van humaan-specifieke *Bacteroides* in oppervlaktewater en van Virus 2314 in watermonsters uit de drinkwaterzuivering dan de qPCR-methode. Bij lage concentraties DNA-kopieën in een watermonsters is het toepassen van de ddPCR-methode dus betrouwbaarder dan de qPCR-methode, de verschillen zijn echter klein.

5.2 Aanbevelingen

Vanwege de hogere kosten en langere analysetijden voor het uitvoeren van ddPCR wordt niet geadviseerd om routinematige qPCR analyses te vervangen door ddPCR. De toepassing van ddPCR zal vooral overwogen moeten worden bij de analyses waarbij lage concentraties worden verwacht en het belang van nauwkeurige kwantificatie van deze lage concentraties groot is.

Het is belangrijk dat ddPCR wordt gebruikt voor het bepalen van de concentraties van de kallibratiesuspensies die worden gebruikt voor het genereren van de ijklijnen die worden toegepast bij kwantificatie met qPCR. Er wordt aanbevolen om ddPCR gekwantificeerde ijklijnen te gaan gebruiken voor alle qPCR analyses.

Het is aanbevelingswaardig om een verbeterde qPCR-methode en ddPCR-methode te ontwikkelen voor S. *maltophilia*, waarbij een kleiner kenmerkend DNA-fragment wordt geamplificeerd en een fluorescerende probe in plaats van SYBR-green als fluorescentiesignaal wordt gebruikt. Reeds gepubliceerde qPCR-methode met deze eigenschappen voor de detectie van S. maltophilia zijn een goed startpunt voor de ontwikkeling van een dergelijke methode.

Aanvullend onderzoek is nodig om vast te stellen of het gebruik van hoge Ct-waarden bij de qPCR-methode leidt tot meer vals-positieve uitslagen dan wanneer ddPCR wordt toegepast.

6 Literatuur

Anonymous (2016). "Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method (ISO 16140-2:2016)." NEN-EN-ISO.
Cao, Y., M. R. Raith and J. F. Griffith (2015). "Droplet digital PCR for simultaneous quantification of general and human-associated fecal indicators for water quality assessment." Water Res **70**: 337-349.
Challier, S., S. Boyer, E. Abachin and P. Berche (2004). "Development of a serum-based Taqman real-time PCR assay for diagnosis of invasive aspergillosis." J Clin Microbiol **42**(2): 844-846.
da Silva Filho, L. V., A. F. Tateno, F. Velloso Lde, J. E. Levi, S. Fernandes, C. N. Bento, J. C. Rodrigues and S. R. Ramos (2004). "Identification of Pseudomonas aeruginosa, Burkholderia cepacia complex, and Stenotrophomonas maltophilia in respiratory samples from cystic fibrosis patients using multiplex PCR." Pediatr Pulmonol **37**(6): 537-547.
Dingle, T. C., R. H. Sedlak, L. Cook and K. R. Jerome (2013). "Tolerance of droplet-digital PCR vs real-time quantitative PCR to inhibitory substances." Clin Chem **59**(11): 1670-1672.
Falzone, L., G. Gattuso, C. Lombardo, G. Lupo, C. M. Grillo, D. A. Spandidos, M. Libra and M. Salmeri (2020). "Droplet digital PCR for the detection and monitoring of Legionella pneumophila." Int J Mol Med **46**(5): 1777-1782.
Forootan, A., R. Sjöback, J. Björkman, B. Sjögreen, L. Linz and M. Kubista (2017). "Methods to determine limit of detection and limit of quantification in quantitative real-time PCR (qPCR)." Biomol Detect Quantif **12**: 1-6.
Heijnen, L. (2015). "Eigenschappen van DNA-merkers voor fecale verontreiniging." BTO rapport **BTO 2015.023**
Heijnen, L. (2015). "Identificeren van de bron van fecale besmettingen." DPW rapport **KWR 2015.036**
Heijnen, L., G. Elsinga, M. de Graaf, R. Molenkamp, M. P. G. Koopmans and G. Medema (2021). "Droplet digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 signature mutations of variants of concern in wastewater." Sci Total Environ **799**: 149456.
Heijnen, L., G. Elsinga, M. de Graaf, R. Molenkamp, M. P. G. Koopmans and G. Medema (2021). "Droplet Digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 variants of concern in wastewater." medRxiv: 2021.2003.2025.21254324.
Heijnen, L. and K. Learbuch (2013). "Ontwikkeling en toepassing van kwantitatieve PCR methoden voor het identificeren van de bron van fecale besmettingen " BTO rapport **BTO 2013.014**.
Heijnen, L., K. Learbuch, E. Kardinaal, S. Rotteveel, H. Ruiter and I. Leenen (2014). "Fecale verontreiniging in zwemwater identificeren met DNA-merkers." H2O **April 2014**.
Hindson, C. M., J. R. Chevillet, H. A. Briggs, E. N. Gallichotte, I. K. Ruf, B. J. Hindson, R. L. Vessella and M. Tewari (2013). "Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR." Nature Methods **10**(10): 1003-1005.
Hornstra, L. M., T. Rodrigues da Silva, B. Blankert, L. Heijnen, E. Beerendonk, E. R. Cornelissen and G. Medema (2019). "Monitoring the integrity of reverse osmosis membranes using novel indigenous freshwater viruses and bacteriophages." Environmental Science: Water Research & Technology **5**(9): 1535-1544.
Nshimyimana, J. P., M. C. Cruz, S. Wuertz and J. R. Thompson (2019). "Variably improved microbial source tracking with digital droplet PCR." Water Res **159**: 192-202.
Racki, N., T. Dreo, I. Gutierrez-Aguirre, A. Blejec and M. Ravnikar (2014). "Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples." Plant Methods **10**(1): 42.
Rački, N., T. Dreo, I. Gutierrez-Aguirre, A. Blejec and M. Ravnikar (2014). "Reverse transcriptase droplet digital PCR shows high resilience to PCR inhibitors from plant, soil and water samples." Plant Methods **10**(1): 42.
Singh, G., A. Sithebe, A. M. Enitan, S. Kumari, F. Bux and T. A. Stenström (2017). "Comparison of droplet digital PCR and quantitative PCR for the detection of Salmonella and its application for river sediments." J Water Health **15**(4): 505-508.
Taylor, S. C., G. Laperriere and H. Germain (2017). "Droplet Digital PCR versus qPCR for gene expression analysis with low abundant targets: from variable nonsense to publication quality data." Scientific Reports **7**(1): 2409.
van der Wielen, P. W. and D. van der Kooij (2013). "Nontuberculous mycobacteria, fungi, and opportunistic pathogens in unchlorinated drinking water in The Netherlands." Appl Environ Microbiol **79**(3): 825-834.
van der Wielen, P. W. J. J. I., R.; Heijnen, L. (2011). "Kwantitatieve PCR-methoden voor opportunistisch ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater." BTO report **BTO 2011.034(S)**.
White, R. A., 3rd, P. C. Blainey, H. C. Fan and S. R. Quake (2009). "Digital PCR provides sensitive and absolute calibration for high throughput sequencing." BMC Genomics **10**: 116.

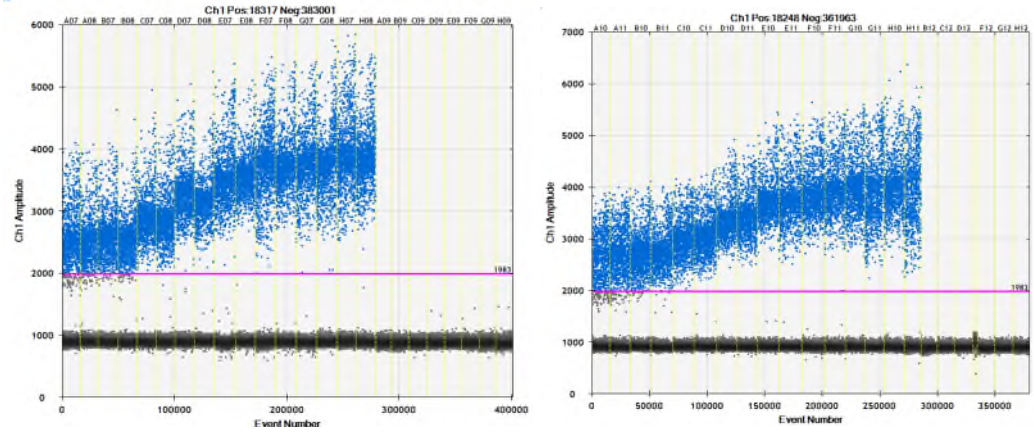
Wullings, B. A., G. Bakker and D. van der Kooij (2011). "Concentration and Diversity of Uncultured Legionella spp. in Two Unchlorinated Drinking Water Supplies with Different Concentrations of Natural Organic Matter." Applied and Environmental Microbiology **77**(2): 634-641.
Xue, J., K. Caton and S. P. Sherchan (2018). "Comparison of next-generation droplet digital PCR with quantitative PCR for enumeration of Naegleria fowleri in environmental water and clinical samples." Lett Appl Microbiol **67**(4): 322-328.

I Optimalisatie reactieomstandigheden

I.I Pseudomonas aeruginosa

Primerpaar: PaerF/PaerR
Temperatuur gradient:

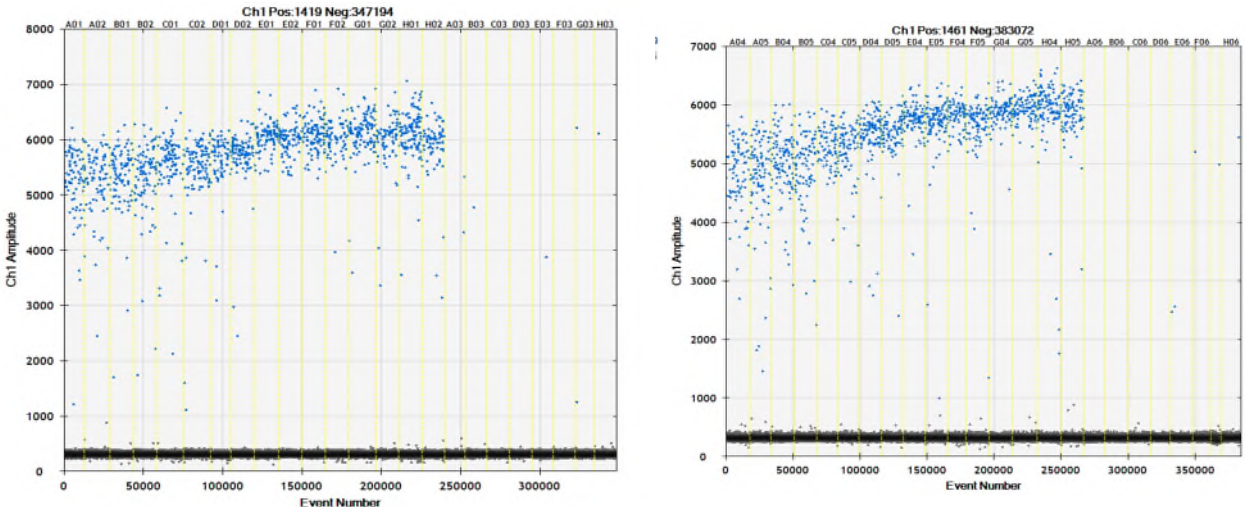
- Zonder digestie (links)
- Digestie met restrictieenzym



I.II Virusindicator 2314

2314-F	ACCAGGGGCGGTGTATATTG
2314-R	GACGCCGTTGAAATGTCAGG
2314_P-A	TAGTCCATGCTGACCCACCTAACGT

Restrictieenzym HaeIII



Gradiënt PCR zonder restrictie-enzym (links)/Met Restrictieenzym (Links)

I.III Humane bacteroides

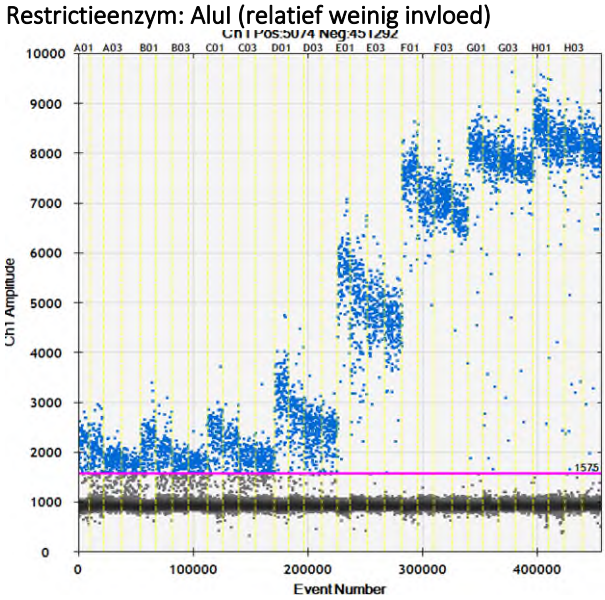
Primers en probes:

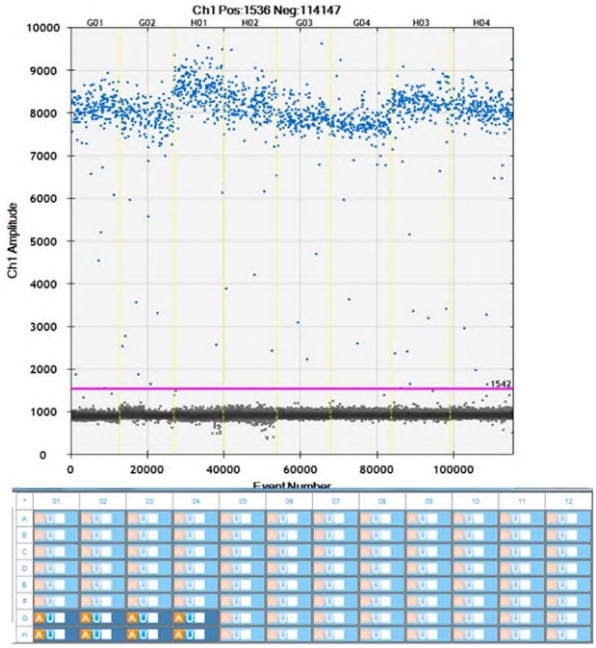
HF183F
HF183R
SSHBac-Pr

Temperatuurgradient: 53-63°C

Geselecteerde temperatuur: 60°C

Restrictieenzym: AluI (relatief weinig invloed)





G1/G2/H1/H2 (zonder restrictie) + G3/G4/H3/H4 (met restrictie)

II Casestudies

II.I Humane Bacteroides in oppervlaktewater

LMB Monstercode	Datum Monstername	Rendement IC (%)	qPCR	ddPCR
			DNA kopieën/100ml	
LMB-73588-OW	2-4-2019	33,8	1,48E+04	1,26E+04
LMB-73589-OW	2-4-2019	37,0	4,39E+04	4,30E+04
LMB-73590-OW	2-4-2019	39,3	8,85E+03	5,00E-02
LMB-73592-OW	2-4-2019	45,4	2,60E+03	2,37E+03
LMB-73591-OW	2-4-2019	30,7	3,96E+03	4,05E+03
LMB-73978-OW	8-4-2019	46,0	0,00E+00	0,00E+00
LMB-73979-OW	8-4-2019	36,0	0,00E+00	0,00E+00
LMB-73976-OW	8-4-2019	34,0	2,98E+01	4,39E+01
LMB-83311-OW	25-4-2019	36,9	3,61E+01	0,00E+00
LMB-75215-OW	6-5-2019	37,1	9,69E+00	1,00E+02
LMB-83320-OW	14-5-2019	31,7	0,00E+00	0,00E+00
LMB-75942-OW	20-5-2019	49,8	0,00E+00	2,94E+02
LMB-75943-OW	20-5-2019	37,5	0,00E+00	0,00E+00
LMB-83073-OW	21-5-2019	35,7	0,00E+00	3,33E+01
LMB-83327-OW	27-5-2019	36,2	0,00E+00	0,00E+00
LMB-83326-OW	28-5-2019	53,1	3,69E+01	1,78E+02
LMB-83325-OW	28-5-2019	46,1	0,00E+00	8,70E+01
LMB-78864-OW-A	6-6-2019	39,5	2,10E+02	4,24E+02
LMB-77641-OW	6-6-2019	41,0	1,36E+02	6,44E+01
LMB-78282-OW	6-6-2019	35,9	0,00E+00	6,43E+02
LMB-78283-OW	6-6-2019	45,6	0,00E+00	8,32E+01
LMB-76991-OW	6-6-2019	43,7	2,13E+05	2,03E+05
LMB-76988-OW	6-6-2019	60,1	2,35E+04	2,09E+04
LMB-76990-OW	6-6-2019	45,3	5,83E+02	6,48E+02
LMB-76989-OW	6-6-2019	39,4	1,19E+04	1,21E+04
LMB-76987-OW	6-6-2019	40,6	1,74E+02	7,45E+01
LMB-83333-OW	12-6-2019	44,4	1,90E+01	1,45E+02
LMB-77281-OW	13-6-2019	51,5	2,31E+05	2,36E+05
LMB-77279-OW	13-6-2019	42,7	2,00E+05	1,62E+05
LMB-77277-OW	13-6-2019	44,4	1,28E+05	1,53E+05
LMB-77278-OW	13-6-2019	52,3	1,03E+05	9,72E+04
LMB-77280-OW	13-6-2019	47,4	7,83E+03	1,09E+04
LMB-77444-OW	17-6-2019	53,3	4,75E+01	7,39E+01
LMB-77443-OW	17-6-2019	49,9	3,71E+01	2,06E+02
LMB-77445-OW	17-6-2019	48,0	0,00E+00	0,00E+00
LMB-83338-OW	25-6-2019	39,4	0,00E+00	0,00E+00
LMB-83342-OW	9-7-2019	46,5	0,00E+00	0,00E+00
LMB-78864-OW-B	15-7-2019	49,1	0,00E+00	5,82E+01
LMB-83345-OW	23-7-2019	50,7	0,00E+00	4,15E+01
LMB-83346-OW	23-7-2019	55,5	0,00E+00	0,00E+00
LMB-79639-OW	29-7-2019	45,9	1,06E+01	0,00E+00
LMB-83082-OW	12-8-2019	37,5	0,00E+00	0,00E+00
LMB-81224-OW	26-8-2019	47,1	0,00E+00	9,84E+01
LMB-83086-OW	2-9-2019	48,0	1,20E+01	6,88E+01
LMB-83362-OW	3-9-2019	47,0	0,00E+00	0,00E+00
LMB-82059-OW	9-9-2019	12,8	1,57E+02	6,25E+01
LMB-82058-OW	9-9-2019	54,2	1,29E+02	8,55E+01
LMB-83368-OW	16-9-2019	37,3	7,41E+03	2,85E+03

II.II Natuurlijke virussen 2314 in de zuivering

Monster Code	Datum Monstername	Bedrijf	Code Locatie	Rendement %	qPCR	ddPCR
					DNA kopieën/L	
LMB-77585	18-6-2019	De Watergroep	Kanaal Kortrijk Bossuit	0,6	1,31E+08	1,56E+08
LMB-77586	19-6-2019	De Watergroep	Kanaal Kortrijk Bossuit	31,2	1,18E+08	1,37E+08
LMB-71040	11-2-2019	De Watergroep	Na Nitrificatoren	72,2	9,55E+07	1,12E+08
LMB-77587	19-6-2019	De Watergroep	Na Nitrificatoren	38,6	7,06E+07	9,56E+07
LMB-71039	11-2-2019	De Watergroep	Kanaal Kortrijk Bossuit	78,4	7,15E+07	8,73E+07
LMB-71681	25-2-2019	De Watergroep	Na Nitrificatoren	107,7	3,54E+07	3,89E+07
LMB-71680	25-2-2019	De Watergroep	Kanaal Kortrijk Bossuit	107,9	3,19E+07	3,61E+07
LMB-77588	19-6-2019	De Watergroep	Na defosfortatie filters	55,8	2,92E+07	3,43E+07
LMB-72379	6-3-2019	WML (Heel)	0045RUO0100 - Lateraalkanaal	71,5	3,79E+06	4,65E+06
LMB-71684	25-2-2019	De Watergroep	Na de Gavers bassin	90,6	3,43E+06	3,95E+06
LMB-71043	11-2-2019	De Watergroep	Na de Gavers bassin	94,0	3,55E+06	3,83E+06
LMB-71682	25-2-2019	De Watergroep	Na defosfortatie filters	77,3	9,22E+05	8,36E+05
LMB-72380	6-3-2019	WML (Heel)	0045BS10501 - Spaarbekken	80,4	7,16E+05	7,91E+05
LMB-71041	11-2-2019	De Watergroep	Na defosfortatie filters	80,7	4,27E+05	3,45E+05
LMB-77589	19-6-2019	De Watergroep	Na de Gavers bassin R	34,9	2,28E+05	2,74E+05
LMB-71042	11-2-2019	De Watergroep	Na vlokkenfilter	88,6	2,44E+05	2,13E+05
LMB-77590	19-6-2019	De Watergroep	Na vlokkenfilter	69,2	1,64E+05	1,90E+05
LMB-77592	19-6-2019	De Watergroep	Na AKF	72,1	9,94E+04	1,08E+05
LMB-71045	11-2-2019	De Watergroep	Na AKF	74,5	8,00E+04	7,17E+04
LMB-71683	25-2-2019	De Watergroep	Na vlokkenfilter	85,1	7,65E+04	6,55E+04
LMB-71046	11-2-2019	De Watergroep	Na Reinwaterkelder	83,8	4,45E+04	4,89E+04
LMB-71686	25-2-2019	De Watergroep	Na AKF	88,0	3,74E+04	3,24E+04
LMB-77593	19-6-2019	De Watergroep	Na Reinwaterkelder	73,8	1,25E+04	1,71E+04
LMB-78116	26-6-2019	WLN (Drenthe)	Rivierwater Drentse Aa	70,0	5,69E+03	1,13E+04
LMB-78117	26-6-2019	WLN (Drenthe)	Rivierwater Drentse Aa	73,4	7,03E+03	1,03E+04
LMB-71685	25-2-2019	De Watergroep	Na UF	86,8	2,80E+03	2,45E+03
LMB-71044	11-2-2019	De Watergroep	Na UF	68,3	1,20E+03	1,36E+03
LMB-78118	26-6-2019	WLN (Drenthe)	Effluent mengbekken	69,9	7,31E+02	1,34E+03
LMB-71687	25-2-2019	De Watergroep	Na Reinwaterkelder	78,2	4,13E+02	1,12E+03
LMB-78119	26-6-2019	WLN (Drenthe)	Coagulatie Aanvoer FD	62,8	4,83E+02	9,92E+02
LMB-78120	26-6-2019	WLN (Drenthe)	Voeding actief kool filters	75,5	4,24E+02	2,73E+02
LMB-78121	26-6-2019	WLN (Drenthe)	Aanvoer UV - desinfectie (AKF 1-6)	75,0	3,21E+02	2,02E+02
LMB-71390	18-2-2019	WLN (Drenthe)	Effluent mengbekken	24,0	2,97E+02	1,25E+02
LMB-78122	26-6-2019	WLN (Drenthe)	Aanvoer langzame zand filters	74,7	1,82E+02	1,18E+02
LMB-78126	26-6-2019	Oasen (De Steeg)	Verzameld R Water OGW De Steeg	67,6	0,00E+00	9,48E+01
LMB-71393	18-2-2019	WLN (Drenthe)	Aanvoer UV - desinfectie (AKF 1-6)	87,4	1,99E+01	7,27E+01
LMB-72383	6-3-2019	PS Heel (WML)	0045VFG0100 - Na snelfiltratie	59,1	0,00E+00	6,76E+01
LMB-72070	4-3-2019	Oasen (De Steeg)	Verzameld Voorfiltraat OGW	69,5	0,00E+00	6,29E+01
LMB-70591	4-2-2019	WLN (Drenthe)	Aanvoer cascade (verzameld filtaat L	77,9	0,00E+00	4,00E+01
LMB-71391	18-2-2019	WLN (Drenthe)	Coagulatie - Aanvoer FDP/GB (na menger)	77,8	0,00E+00	3,94E+01
LMB-71395	18-2-2019	WLN (Drenthe)	Aanvoer cascade (verzameld filtaat L	95,2	0,00E+00	3,22E+01
LMB-70589	4-2-2019	WLN (Drenthe)	Aanvoer UV - desinfectie (AKF 1-6)	90,9	0,00E+00	2,99E+01
LMB-72386	6-3-2019	PS Heel (WML)	0045RWL0100 - Rein	75,6	0,00E+00	1,59E+01
LMB-71396	18-2-2019	WLN (Drenthe)	Rein oppervlaktewater (3l)	88,4	0,00E+00	1,59E+01
LMB-70586	4-2-2019	WLN (Drenthe)	Rivierwater Drentse Aa	0,6	0,00E+00	0,00E+00
LMB-70587	4-2-2019	WLN (Drenthe)	Effluent mengbekken	13,9	2,20E+02	0,00E+00
LMB-70588	4-2-2019	WLN (Drenthe)	Voeding actief kool filters	89,6	0,00E+00	0,00E+00
LMB-70590	4-2-2019	WLN (Drenthe)	Aanvoer langzame zand filters	87,0	0,00E+00	0,00E+00
LMB-70592	4-2-2019	WLN (Drenthe)	Rein oppervlaktewater	70,5	0,00E+00	0,00E+00
LMB-70593	4-2-2019	WLN (Drenthe)	Rein oppervlaktewater (3l)	88,6	0,00E+00	0,00E+00
LMB-71389	18-2-2019	WLN (Drenthe)	Rivierwater Drentse Aa	0,7	0,00E+00	0,00E+00
LMB-71392	18-2-2019	WLN (Drenthe)	Voeding actief kool filters	79,4	0,00E+00	0,00E+00
LMB-71394	18-2-2019	WLN (Drenthe)	Aanvoer langzame zand filters	91,9	1,24E+01	0,00E+00
LMB-71397-	19-2-2019	KWR	blanco	65,0	0,00E+00	0,00E+00
LMB-71047	11-2-2019	KWR	PCR water	69,8	0,00E+00	0,00E+00
LMB-71688	25-2-2019	KWR	PCR water	70,4	0,00E+00	0,00E+00
LMB-72069	4-3-2019	Oasen (De Steeg)	Verzameld R Water OGW De Steeg	63,9	0,00E+00	0,00E+00
LMB-72071	4-3-2019	Oasen (De Steeg)	Verzameld Nafiltraat OGW	59,6	0,00E+00	0,00E+00
LMB-72072	4-3-2019	Oasen (De Steeg)	Verzameld effluent Koolfilters OGW	65,6	0,00E+00	0,00E+00
LMB-72073	4-3-2019	Oasen (De Steeg)	UV Desinfectie OGW 1 AF	60,5	0,00E+00	0,00E+00
LMB-72074	4-3-2019	Oasen (De Steeg)	Mengkelder DGW/OGW	59,9	0,00E+00	0,00E+00
LMB-72075	4-3-2019	Oasen (De Steeg)	Effluent onthardingsreactoren	59,2	0,00E+00	0,00E+00
LMB-72076	4-3-2019	Oasen (De Steeg)	Effluent Carry over filtratie A	64,6	0,00E+00	0,00E+00
LMB-72077	4-3-2019	Oasen (De Steeg)	Uitgaand reinwater ZS De Steeg A	76,8	0,00E+00	0,00E+00
LMB-72078	5-3-2019	blanco PCR	blanco PCR	63,5	0,00E+00	0,00E+00
LMB-73307	28-3-2019	Oasen (De Steeg)	Verzameld R Water OGW De Steeg	1,3	0,00E+00	0,00E+00
LMB-73308	28-3-2019	Oasen (De Steeg)	Verzameld Voorfiltraat OGW	63,8	0,00E+00	0,00E+00
LMB-73309	28-3-2019	Oasen (De Steeg)	Verzameld Nafiltraat OGW	62,9	0,00E+00	0,00E+00
LMB-73310	28-3-2019	Oasen (De Steeg)	Verzameld effluent Koolfilters OGW	68,2	0,00E+00	0,00E+00
LMB-73311	28-3-2019	Oasen (De Steeg)	UV Desinfectie OGW 1 AF	72,8	0,00E+00	0,00E+00
LMB-73312	28-3-2019	Oasen (De Steeg)	Mengkelder DGW/OGW	68,1	0,00E+00	0,00E+00
LMB-73313	28-3-2019	Oasen (De Steeg)	Effluent onthardingsreactoren	63,0	0,00E+00	0,00E+00
LMB-73314	28-3-2019	Oasen (De Steeg)	Effluent Carry over filtratie A	63,4	0,00E+00	0,00E+00
LMB-73315	28-3-2019	Oasen (De Steeg)	Uitgaand reinwater ZS De Steeg A	66,0	0,00E+00	0,00E+00
LMB-73316	28-3-2019		blanco PCR	63,3	0,00E+00	0,00E+00
LMB-72381	6-3-2019	PS Heel (WML)	0045RUG0401 - Gez. r 4	72,1	0,00E+00	0,00E+00
LMB-72382	6-3-2019	PS Heel (WML)	0045RUG0301 - Gez. r 3	68,2	6,21E+01	0,00E+00
LMB-72384	6-3-2019	PS Heel (WML)	0045CEU0100 - Na UV	77,0	0,00E+00	0,00E+00
LMB-72385	6-3-2019	PS Heel (WML)	0045KGF0100 - Na AKF	73,8	0,00E+00	0,00E+00
LMB-72387	6-3-2019	KWR	Blanco water	70,4	0,00E+00	0,00E+00
LMB-77591	19-6-2019	De Watergroep	Na UF	62,7	1,51E+01	0,00E+00
LMB-77594	20-6-2019	KWR	PCR water	75,1	0,00E+00	0,00E+00
LMB-78123	26-6-2019	WLN (Drenthe)	Aanvoer cascade (verzameld filtaat L	69,2	0,00E+00	0,00E+00
LMB-78124	26-6-2019	WLN (Drenthe)	Rein oppervlaktewater	68,7	0,00E+00	0,00E+00
LMB-78125	26-6-2019	Oasen (De Steeg)	Verzameld R Water OGW De Steeg	63,0	0,00E+00	0,00E+00
LMB-78127	26-6-2019	Oasen (De Steeg)	Verzameld Nafiltraat OGW	63,1	0,00E+00	0,00E+00
LMB-78128	26-6-2019	Oasen (De Steeg)	Verzameld effluent Koolfilters OGW	73,0	0,00E+00	0,00E+00
LMB-78129	27-6-2019	KWR	blanco	67,3	0,00E+00	0,00E+00