



BTO 2019.209(s) | November 2019

BTO rapport

**Ontwikkeling van een
RT-PCR voor snelle detectie
van enterococcen**

Ontwikkeling van een RT-PCR voor snelle detectie van enterococcen

BTO 2019.209(s) | November 2019

Opdrachtnummer

402045/094

Projectmanager

Michiel Hootsmans

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Biologische veiligheid

Auteur(s)

Leo Heijnen, Peer Timmers, Goffe Elsinga

Kwaliteitsborger(s)

Gertjan Medema

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Keywords

RT-PCR, enterococcen, snelle detectie, methode, moleculair, DNA, RNA

Jaar van publicatie
2019

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

KWR

November 2019 ©

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

Samenvatting

Ontwikkeling van een RT-PCR voor snelle detectie van enterococci

Auteur(s) Leo Heijnen, Goffe Elsinga en Peer Timmers.

Voor snelle bepaling van de hygiënische betrouwbaarheid van drinkwater is, naast de beschikbare RT-PCR methode voor detectie van *E. coli*, ook een methode voor detectie van enterococci van groot belang. Binnen het geslacht van enterococci zijn veel verschillende soorten gerangschikt waarvan slechts een deel wordt aangetoond met de reguliere kweekmethode en kan worden gerelateerd aan fecale verontreinigingen. Voor de ontwikkeling van een nieuwe RT-PCR methode voor detectie van enterococci is er gekozen om met deze methode minimaal tien geselecteerde enterococci soorten te detecteren (*E. faecium*, *E. faecalis*, *E. durans*, *E. avium*, *E. gallinarum*, *E. moraviensis*, *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. hirae* en *E. haemoperoxidus*). De selectie van deze tien soorten is gemaakt op basis van een, door de drinkwaterlaboratoria uitgevoerde, inventarisatie. Deze inventarisatie is uitgevoerd aan de hand van literatuuronderzoek, fecesonderzoek en onderzoek naar de enterococci soorten die met de reguliere kweekmethode regelmatig zijn aangetroffen in Nederlands en Belgisch drinkwater. De tien geselecteerde enterococci soorten zijn, op basis van sequentieovereenkomst van het 16S rRNA gen, te verdelen in vier genetisch verwante groepen. Voor detectie van deze vier groepen zijn meerdere potentieel toepasbare primersets ontworpen, de reactieomstandigheden zijn geoptimaliseerd en de gevoeligheid en specificiteit is, op beperkte schaal, getest. De resultaten van deze analyses zijn gebruikt voor het selecteren van vier veelbelovende primersets. RT-PCR analyses op verdunningen van bekende enterococci soorten laat zien dat detectie van de tien geselecteerde soorten met voldoende gevoeligheid in potentie mogelijk is. Het gebruik van de ontwikkelde RT-PCR methoden op het RNA van bacteriën die niet behoren tot het enterococci geslacht en bacteriën die wel behoren tot de tien geselecteerde enterococci soorten geeft een eerste aanwijzing dat de methoden voldoende specifiek zijn. In tien drinkwatermonsters, afkomstig van verschillende locaties, waarin met kweek geen enterococci zijn aangetoond werden ook met RT-PCR geen enterococci aangetoond. Deze resultaten geven een eerste indicatie dat deze nieuwe methoden gebruikt kunnen worden voor gevoelige en specifieke detectie van enterococci in drinkwater. Om vast te stellen in hoeverre de resultaten met RT-PCR gelijkwaardig zijn aan resultaten verkregen met de kweekmethode zal een uitgebreide validatie volgens ISO 16140-2:2016 noodzakelijk zijn. Voordat gestart wordt met dit validatietraject is het van belang om onderzoek te doen naar de mogelijkheden voor het combineren van de primersets zodat detectie van de tien soorten in één reactie mogelijk is ("multiplex RT-PCR"). Deze multiplex RT-PCR maakt validatie en toepassing van de methode eenvoudiger en tegen lagere kosten mogelijk. Daarnaast is het, t.b.v. de bepaling van de "Relative Limit Of Detection (RLOD)" van belang om de beschikking te hebben over nauwkeurig gekwantificeerde celsuspensies van enterococci. Voor het samenstellen van deze celsuspensies is de ontwikkeling van een robuuste methode noodzakelijk.

Inhoud

Samenvatting	2
---------------------	----------

Inhoud3

1	Inleiding	5
1.1	Achtergrond	5
1.2	Selectie van enterococcen soorten	5
2	Resultaten van ontwikkelstappen	7
2.1	Primerontwerp	7
2.1.1	Verwantschap tussen sequenties van het 16S rRNA gen	7
2.1.2	Verkenning van de mogelijkheden voor ontwerpen van primersets	8
2.2	Optimalisatie reactietemperatuur en specificiteit van ontworpen primersets	10
2.2.1	Detectie <i>E. gallinarum</i> en <i>E. caselliflavus</i> (en <i>E. avium</i>)	10
2.2.2	Detectie <i>E. durans</i> , <i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> en <i>E. mundtii</i> (en <i>E. avium</i>)	11
2.2.3	Detectie <i>E. faecalis</i>	14
2.2.4	Detectie <i>E. haemoperoxidus</i> en <i>E. moraviensis</i>	15
2.2.5	Samenvattend: PCR op referentiestammen	16
2.2.6	Gebruik van een probe en efficiëntie van de qPCR-reacties	17
2.2.7	Conclusies: specificiteit van primers en efficiëntie PCR reacties	18
2.3	Gevoeligheid detectie van enterococcen met RT-PCR	18
2.3.1	RT-PCR voor detectie van <i>E. caselliflavus</i> , <i>E. gallinarum</i> en <i>E. faecium</i> (Reactie 1)	20
2.3.2	RT-PCR voor detectie van <i>Enterococcus faecalis</i> (Reactie 2)	22
2.3.3	RT-PCR voor detectie van <i>Enterococcus moraviensis</i> en <i>Enterococcus haemoperoxidus</i> (Reactie 3)	23
2.3.4	Conclusies gevoeligheids- en specificiteits-studies	24
2.4	Detectie in drinkwater	25
3	Conclusies en aanbevelingen	26
4	Literatuur	28
I	Bijlage: selectie van enterococcen soorten	29
II	Ontwerp van specifieke primers	33
III	Beknopt en voorlopig protocol	34

1 Inleiding

1.1 Achtergrond

Voor het bepalen van de hygiënische betrouwbaarheid van drinkwater wordt de detectie van de fecale indicatororganismen *E. coli* en enterococcen gebruikt. Hiervoor wordt het gebruik van tijdrovende (ca. 24 uur voor *E. coli* en 48 uur voor enterococcen) kweekmethoden (NEN-EN-ISO normen) in de Nederlandse wetgeving voorgeschreven. Snelle methoden zijn van groot belang om: 1) de microbiologische betrouwbaarheid snel te kunnen beoordelen en daarmee het risico op blootstelling aan pathogene micro-organismen te minimaliseren en 2) na het nemen van maatregelen na calamiteiten (optreden van besmettingen, ingrepen in het leidingnet) snel te kunnen vaststellen of de levering kan worden hervat en een kookadvies kan worden opgeheven. De ontwikkeling van RT-PCR methoden waarmee het genetisch materiaal (RNA) van *E. coli* kan worden aangetoond heeft geleid tot een methode waarmee binnen 4-6 uur uitsluitsel kan worden gegeven over de aanwezigheid van *E. coli* in het water. Deze RT-PCR methode is bij alle Nederlandse drinkwaterlaboratoria geïmplementeerd en er is ook bij de Belgische laboratoria van “De Watergroep” en “Pidpa” ervaring met deze methode. Validatie van de methode voor *E. coli* heeft aangetoond dat er weinig verschillen zijn tussen de analyseresultaten verkregen met deze nieuwe methode en de standaard (ISO 9308-1) kweekmethode (Heijnen 2017). Naar aanleiding van deze validatie heeft het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat de drinkwaterlaboratoria sinds april 2018 toestemming verleend om de RT-PCR als alternatieve methode voor detectie van *E. coli* toe te passen. Voor snelle actie na calamiteiten is er, naast een methode voor snelle detectie van *E. coli*, ook een snelle methode voor detectie van enterococcen noodzakelijk. Er is al een gevalideerde methode beschikbaar waarmee vier, door de WHO als meest specifiek-fecaal benoemde intestinale enterococcen soorten (*Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* en *E. durans*), kunnen worden aangetoond. Echter, doordat detectie bij het toepassen van deze methode vooral is beperkt tot deze vier intestinale enterococcen soorten, worden er verschillen waargenomen met de kweekmethode. Met de kweekmethode wordt namelijk een groter arsenaal aan enterococcen soorten gedetecteerd. Omdat niet kan worden uitgesloten dat een deel van deze verschillen relevant zijn voor het beoordelen van de hygiënische betrouwbaarheid is, na overleg met het RIVM, besloten om de huidige snelle methode uit te breiden tot een methode waarmee de meest relevante enterococcen soorten kunnen worden gedetecteerd die ook met de kweekmethode in drinkwater kunnen worden aangetoond.

1.2 Selectie van enterococcen soorten

Er is er een selectie gemaakt van tien meest relevante enterococcen soorten (Tabel 1) welke door de RT-PCR in ieder geval moeten worden gedetecteerd. De selectie van deze tien soorten is gemaakt op basis van een, door de drinkwaterlaboratoria, uitgevoerde inventarisatie. Bij deze inventarisatie speelden de volgende onderdelen een rol: 1) literatuuronderzoek, 2) fecesonderzoek en 3) een inventarisatie van de enterococcen soorten die met de reguliere kweekmethode regelmatig zijn aangetroffen in Nederlands en Belgisch drinkwater. De resultaten van deze inventarisatie zijn door de drinkwaterlaboratoria in een notitie vastgelegd en als Bijlage I aan deze rapportage toegevoegd.

Tabel 1. Selectie van de, op basis van de inventarisatie, geselecteerde 10 enterococcen

Geselecteerde soorten	
1	<i>Enterococcus faecium</i>
2	<i>Enterococcus faecalis</i>
3	<i>Enterococcus durans</i>
4	<i>Enterococcus hirae</i>
5	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
6	<i>Enterococcus mundtii</i>
7	<i>Enterococcus gallinarum</i>
8	<i>Enterococcus moraviensis</i>
9	<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>
10	<i>Enterococcus avium</i>

Voor de ontwikkeling van een RT-PCR methode voor detectie van enterococcen is er de keuze gemaakt om deze zo te ontwikkelen dat wordt voldaan aan de volgende criteria:

- Gevoelige detectie van de tien geselecteerde soorten (Tabel 1) in drinkwater.
 - o Detectie van additionele (niet behorend tot de tien) enterococcen soorten is daarbij geen probleem.
- Geen detectie van bacteriën in drinkwater behorend tot andere geslachten dan enterococcus.

2 Resultaten van ontwikkelstappen

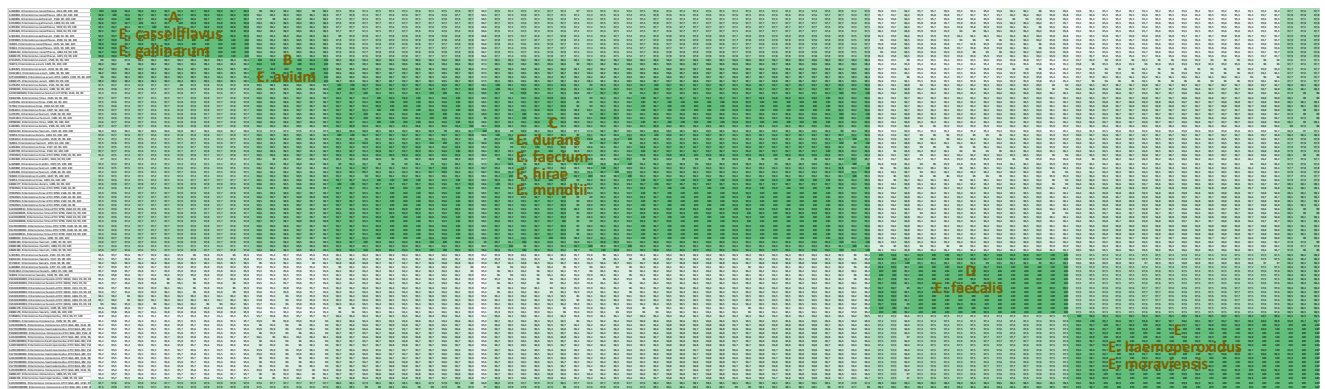
2.1 Primerontwerp

Voor de ontwikkeling van RT-PCR methoden voor specifieke en gevoelige detectie van tien enterococci soorten is eerst onderzocht welke mate van verwantschap er bestaat tussen de 16S rRNA genen van de tien geselecteerde enterococci soorten en vervolgens zijn potentieel toepasbare primers ontworpen voor specifieke detectie van deze tien soorten.

2.1.1 Verwantschap tussen sequenties van het 16S rRNA gen

Om een beeld te krijgen van de mate van verwantschap tussen de verschillende 16S sequenties van de geselecteerde enterococci soorten is een similariteits-matrix gemaakt van alle sequenties van referentiestammen ("type-strains") uit de SILVA NR database. Deze matrix (Figuur 1) maakt visueel duidelijk welke sequenties van de verschillende soorten meer of minder aan elkaar gerateerd zijn.

Figuur 1. Mate van verwantschap tussen de "type strains" van de 10 geselecteerde enterococci soorten



Similariteitsmatrix van 16S rRNA gensequenties van *Enterococcus* type strains van alle 10 soorten waarvoor primers gemaakt worden. De kleurcodering geeft de mate van similariteit aan (donkergroen = >98% similariteit)

De kleuren in de similariteitsmatrix laten zien in hoeverre de sequenties van de 16S rRNA genen verschillen tussen de verschillende enterococci soorten. De donkergroene gebieden in de matrix (met $\geq 98\%$ similariteit) maken duidelijk dat er clustering van de verschillende soorten optreedt in vijf groepen. In Tabel 2 is de gemiddelde similariteit van de 16S RNA genen van de verschillende groepen weergegeven.

Tabel 2. Samenvatting van de similariteitsmatrix met hierin de gemiddelde sequentieovereenkomst

	Gemiddelde similariteit (%)	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. gallinarum</i>	<i>E. avium</i>	<i>E. durans</i> <i>E. faecium</i> <i>E. hirae</i> <i>E. mundtii</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>E. moraviensis</i> <i>E. haemoperoxidus</i>
A	<i>E. casseliflavus</i> <i>E. gallinarum</i>	99,8				
B	<i>E. avium</i>	98,3	99,9			
C	<i>E. durans</i> <i>E. faecium</i> <i>E. hirae</i> <i>E. mundtii</i>	97,6	98,5	99,5		
D	<i>E. faecalis</i>	95,9	95,6	96,2	99,8	
E	<i>E. moraviensis</i> <i>E. haemoperoxidus</i>	95,9	96,2	96,8	97,6	99,9

Samenvatting van de similariteitsmatrix van 16S rRNA gensequenties van *Enterococcus* type strains van alle 10 soorten waarvoor primers gemaakt worden. 'Soorten' die meer dan 98.7% similariteit vertonen worden beschouwd als officieel behorende tot dezelfde soort en zijn daarom geclusterd.

De matrix laat zien dat er binnen de tien geselecteerde enterococcen 'soorten' vijf clusters met sequenties met een hoge mate van similariteit te onderscheiden zijn. Deze 'soorten' vertonen een hogere similariteit dan 98.7% (de grenswaarde voor soorten (Stackebrandt 2006)(Stackebrandt 2006), en horen daarom op basis van sequentiesimilariteit van 16S rRNA gen officieel tot dezelfde soort en hebben we dan te maken met vijf soorten:.

- A. *E. casseliflavus* en *E. gallinarum*
- B. *E. avium*
- C. *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae* en *E. mundtii*
- D. *E. faecalis*
- E. *E. haemoperoxidus* en *E. moraviensis*

2.1.2 Verkenning van de mogelijkheden voor ontwerpen van primersets

Bij het verkennen van de mogelijkheden voor ontwerpen van primersets waarmee de soorten uit Tabel 2 specifiek kunnen worden aangetoond is in eerste instantie m.b.v. ARB software (Ludwig, Strunk et al. 2004)(Ludwig, Strunk et al. 2004) en de sequenties uit de Silva database (Yilmaz, Parfrey et al. 2014)(Yilmaz, Parfrey et al. 2014, release 132) onderzocht welke potentiële mogelijkheden er zijn.

In eerste instantie is onderzocht of er mogelijkheden zijn voor de ontwikkeling van één primerset waarmee de 5 clusters specifiek worden getarget zonder dat daarmee amplificatie van 16S rRNA sequenties van andere bacteriefamilies te verwachten is. *E. coli* positie 467 van het 16S rRNA gen is een zeer variabel gebied binnen het *Enterococcus* genus en lijkt in principe geschikt voor het maken van primers voor alle targets. Helaas is een primer in deze regio alleen te combineren met reverse primers die samen een product geven met een lengte van meer dan 160 bp. Vanwege de lengte van dit fragment is te verwachten dat amplificatie minder efficiënt plaats zal vinden waardoor detectie met hoge gevoeligheid niet te verwachten is. Er is daarna getracht primers te ontwikkelen specifiek voor de vijf (A-E) clusters uit Tabel 2, waarbij er maximaal 5 primersets nodig zullen zijn.

Voor de ontwikkeling van specifieke primersets voor specifieke detectie van de vijf clusters uit Tabel 2 zijn er drie opties onderzocht:

1. Uitbreiding van de reeds bestaande, door WLN ontwikkelde primersets (voor detectie van *Enterococcus faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* en *E. durans*) met primerparen waarmee een vergelijkbaar fragment wordt gedetecteerd van de soorten: *E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. gallinarum*, *E. moraviensis*, *E. haemoperoxidus* en *E. avium*

2. Beoordelen van door Maarten van der Salm ("Het Waterlaboratorium") ontworpen primersets
3. Ontwerp van nieuwe primersets

Bij het ontwerpen van primers is duidelijk geworden dat de mogelijkheden voor ontwerpen van specifieke primers, waarbij amplificatie plaats kan vinden van een kort fragment, vooral beperkt zijn tot één specifieke regio. Deze regio is gelegen tussen *E. coli* positie 87 en 201 van het 16S rRNA gen. In de tabel in bijlage II zijn de geselecteerde primers weergegeven met de corresponderende smelttemperaturen, *E. coli* posities en Gibbs vrije energie (ΔG) waarden voor het vormen van hairpins en homo-dimeren.

In de tabel in bijlage II zijn eigenschappen van primers die niet volledig aan alle eisen voldoen weergegeven in rood. Aan de hand van deze inventarisatie is een selectie gemaakt van twee groepen met primersets waarmee experimenteel onderzoek is gestart (Tabel 3). Met beide groepen van primers worden alle 10 *Enterococcus* soorten getarget. Bij één primergroep zijn 5 verschillende primerparen nodig voor het genereren van fragmenten met een lengte van 128-157 bp (bovenste deel Tabel 3) en een tweede groep (4 primerparen) waarmee fragmenten met een lengte van 78-82 worden gegenereerd (ontwerp Maarten van der Salm, onderste deel van Tabel 3).

Tabel 3. Potentieel toepasbare primersets voor specifieke detectie van de 10 geselecteerde enterococcen soorten

Ontwerpsnaam	Testnaam	Naam	Forward	Reverse	Target (met fragmentlengte)									
Nieuwe ontwerpen	Primersets	PCR	primer (5'-3')	primer (5'-3')										
Testsets														
Group12_F-R4	Ent_AB1F/Ent_AB1R	Ent_AB1	CTTGCTCCACCGAAAGAA	CCATCAGTGACGCAAAAG	128-156 bp	156	157	157						
Group3_F-Group3_R	Ent_C1F/Ent_C1R	Ent_C1	GCTTCTTTTCCACCGGA	CCATGCGGTTTCGATTGT					141	142	141	141,1MM		
Group3_F_mundtii-Group3_R	Ent_C2F/Ent_C1R	Ent_Mun1	GCTTCTTTTCCACCGGA	CCATGCGGTTTCGATTGT										
Group4b_F-Group4_R	Ent_D1F/Ent_D1R	Ent_D1	ATTGGAAAGAGGAGTGCG	GCCTTCTACCTTATGCC									128	
F4-R2	Ent_E1F/Ent_E1R	Ent_E1	CTCATTGAAAAGAGGAGTGCG	ATCAGTGACACCCGAAAG										151
ENTCm-fw1-ENTCm-Rev2	Ent_BC1F/Ent_A4R	Ent_A1	GTGGGTAACCTGCCATC	TTCTTCATCGCGAAATAGTG		82	82							151
ENTCm-fw1-ENTCm-Rev1	Ent_BC1F/Ent_C2R	Ent_BC1	GTGGGTAACCTGCCATC	AACCAWCGGTTTCGATTG				79	79	80	79	79		
ENTCm-fw2-ENTCm-Rev4	Ent_DE1F/Ent_D2R	Ent_D2	CGTGGGTAACCTACCATC	GCCATGCGGCATAAAGTG									79	
ENTCm-fw2-ENTCm-Rev3	Ent_DE1F/Ent_E2R	Ent_E2	CGTGGGTAACCTACCATC	CCATGCGGTTGCACTATTA										78
Probe														
P1(1 ^e generatie)	Probe toepasbaar voor alle PCR's. Eventueel optimaliseren													
	CTTGGAACAGGTGCTAATACCG													

Detectie van alle PCR-fragmenten is mogelijk met de probe die ook werd toegepast bij de 1^e generatie RT-PCR (voor detectie van de 4 soorten: *E. faecium*, *E. faecalis*, *E. hirae* en *E. durans*). Afhankelijk van de resultaten kan deze probe worden toegepast of kan er worden gekozen voor het ontwerpen van een nieuwe, geoptimaliseerde, probe. In tabel 2 is een overzicht gegeven van de eigenschappen van de ontworpen primerparen. Om een eerste indruk te krijgen van de specificiteit van de primerparen is onderzocht of amplificatie te verwachten is van andere bacteriesoorten bij toepassing van de verschillende primersets. Bij gebruik van 16S rRNA sequenties uit de SILVA database blijkt dat er geen 16S sequenties in de database aanwezig zijn waaraan de primers met een maximum van 4 mismatches (verdeeld over de beide primers) zullen binden. Hierdoor is niet te verwachten dat 16S sequenties van andere (niet-enterococci) bacteriesoorten efficiënt zullen worden geamplificeerd en gedetecteerd.

Tabel 4. Eigenschappen van de geselecteerde primerparen

Testnaam	Naam	Insilico PCR			Hetero-dimeerenergie	Targets met max. 4
		Ecoli positie	Tm	DeltaTm		
Primersets	PCR		(°C)	(°C)	DeltaG;kcal/mole	mismatches in 2 primers
Ent_AB1F/Ent_AB1R	Ent_AB1	82-201	59,5-58,5	1	-7.04	4 Alleen enterococcus
Ent_C1F/Ent_C1R	Ent_C1	67-183	59,9-60,5	0,6	-8.02	4 Alleen enterococcus
Ent_C2F/Ent_C1R	Ent_Mun1	67-183	61,9-60,5	1,4	-8.02	4 Alleen enterococcus
Ent_D1F/Ent_D1R	Ent_D1	92-190	57,7-59,1	1,4	-7.06	5 Alleen enterococcus
Ent_E1F/Ent_E1R	Ent_E1	88-201	58,7-58,9	0,2	-3.89	3 Alleen enterococcus
Ent_BC1F/Ent_A4R	Ent_A1	123-183	61,9-61,1	0,8	-5.02	3 Alleen enterococcus
Ent_BC1F/Ent_C2R	Ent_BC1	123-183	61,9-61,5	0,4	-6.36	4 Alleen enterococcus
Ent_DE1F/Ent_D2R	Ent_D2	122-183	61,2-61,5	0,3	-5.02	3 Alleen enterococcus
Ent_DE1F/Ent_E2R	Ent_E2	122-179	61,2-61,5	0,3	-5.02	3 Alleen enterococcus

Namen van primerparen, de *E. coli* positie van het 16S rRNA gen waar de primers binden, de smelttemperatuur van de primers en de hetero-dimeer energie van de primerparen. De laatste kolom geeft aan welke bacteriesoorten getarget kunnen worden met maximaal 4 primer-mismatches in de beide primers.

2.2 Optimalisatie reactietemperatuur en specificiteit van ontworpen primersets

Om de reactietemperatuur van de PCR-reacties te optimaliseren en een eerste indruk te krijgen van de specificiteit van de ontwikkelde primersets zijn er reacties uitgevoerd op DNA geïsoleerd uit bacteriesuspensies van goed gekarakteriseerde referentiestammen (Tabel 5). Door het uitvoeren van een 16S rRNA specifieke qPCR is eerst de globale concentratie 16S rRNA genkopieën in het geïsoleerde DNA bepaald en vervolgens zijn PCR-reacties uitgevoerd op twee 16S rRNA concentraties: $2,5 \times 10^5$ en $2,5 \times 10^1$ 16S kopieën per qPCR reactie. De PCR-reacties zijn uitgevoerd door het gebruik van een SYBR-green reactiemix waarmee alle dubbelstrengs DNA moleculen, die tijdens de reactie gevormd worden, zichtbaar gemaakt worden. SYBR-green maakt het mogelijk om ook de eventuele vorming van bij-producten (zoals primer-dimeren), die bij sub-optimale PCR-reacties gevormd kunnen worden, zichtbaar te maken. Voor het bepalen van de meest optimale temperatuur voor binding van de primers aan het DNA (annealing- of reactietemperatuur) zijn de reacties uitgevoerd in een gradiënt-PCR waarbij er een temperatuurgradiënt wordt aangelegd in het PCR-blok resulterend in verschillende reactietemperaturen (variërend tussen 53 en 62°C) in elke rij van het PCR-blok. Bij het beoordelen van de resultaten zijn de waarden waarbij het geamplificeerde DNA een detecteerbare hoeveelheid fluorescentiesignaal geeft (Cq waarde) vergeleken, lagere Cq waarden vormen een belangrijke aanwijzing voor efficiënter verlopende PCR-reacties.

Tabel 5. Toegepaste referentiestammen

Nr.	Stam	DSM nr.	ATCC nr.	KWR nr.
1	<i>Enterococcus mundtii</i>	4838	-	-
2	<i>Enterococcus gallinarum</i>	24841	-	-
3	<i>Enterococcus caselliflavus</i>	20680	-	-
4	<i>Enterococcus avium</i>	20679	-	-
5	<i>Enterococcus durans</i>	20633	-	-
6	<i>Enterococcus dispar</i>	6630	-	-
7	<i>Enterococcus faecium</i>	20477	-	-
8	<i>Enterococcus faecium</i>	-	19434	-
9	<i>Enterococcus faecalis</i>	20478	-	-
10	<i>Enterococcus faecalis</i>	-	19433	-
11	<i>Enterococcus hirae</i>	28619	-	-
12	<i>Enterococcus haemoperoxidus</i>	15920	-	-
13	<i>Enterococcus moraviensis</i>	15919	-	-
14	<i>Aerococcus viridans</i>	20311	-	-
15	<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	WR10
16	<i>Streptococcus anginosus</i>	20563	-	-
17	Kraanwater KWR	-	-	-

2.2.1 Detectie *E. gallinarum* en *E. caselliflavus* (en *E. avium*)

Voor detectie van *E. gallinarum* en *E. caselliflavus* zijn twee potentieel toepasbare primerparen beschikbaar: Ent_AB1 en Ent_A1 waarbij met het primerpaar Ent_AB1 ook *E. avium* aangetoond kan worden. In Tabel 6 (Ent_AB1) en Tabel 7 (Ent_A1) zijn de Cq waarden weergegeven van qPCR-reacties uitgevoerd bij (per rij) verschillende temperaturen op twee concentraties 16S rRNA genkopieën afkomstig van verschillende referentiestammen (en kraanwater).

Tabel 6. Resultaten gradiënt-PCR met primerpaar Ent_AB1 op DNA van *E. gallinarum*, *E. caselliflavus* en *E. avium*

	Annealing temp. (°C)	<i>E. gallinarum</i>				<i>E. caselliflavus</i>				<i>E. avium</i>			
		2,50E+05		2,50E+01		2,50E+05		2,50E+01		2,50E+05		2,50E+01	
A	62	30,3	28,5	N/A	N/A	32,0	33,0	N/A	N/A	27,8	27,4	N/A	N/A
B	61,5	26,5	26,3	N/A	N/A	29,7	29,8	N/A	N/A	25,5	25,4	N/A	N/A
C	60,5	24,6	24,5	N/A	N/A	27,6	27,7	N/A	N/A	24,4	24,0	39,9	N/A
D	58,7	24,0	24,0	N/A	38,3	26,7	26,4	N/A	N/A	23,0	23,0	37,1	37,6
E	56,6	24,4	24,4	N/A	39,2	26,7	26,6	N/A	N/A	23,2	23,2	37,0	38,6
F	54,8	25,0	25,0	N/A	38,3	26,9	27,2	N/A	39,5	24,0	24,2	39,0	39,4
G	53,6	25,2	25,2	N/A	38,6	27,1	27,0	N/A	N/A	24,5	24,5	N/A	39,3
H	53	25,5	25,3	38,3	40,0	27,3	27,2	39,4	N/A	24,7	24,7	39,3	39,8

De Cq waarden van duplo-reacties zijn weergegeven. Hoge Cq waarden in rood en lage in het groen.

De analyses met primerpaar Ent_AB1 laten zien dat de hoge concentraties worden gedetecteerd met een optimale reactietemperatuur tussen 56,6 en 60,5 °C. De lage concentraties worden alleen gedetecteerd in een beperkt aantal van de monsters bij reactietemperaturen lager dan 60,5 °C. De vorming van PCR-fragmenten alleen bij lagere temperaturen suggereert dat dit het gevolg is van amplificatie van niet-specifieke producten.

Tabel 7. Resultaten gradiënt-PCR met primerpaar Ent_A1 op DNA van *E. gallinarum*, *E. caselliflavus* en DNA uit drinkwater

	Annealing temp. (°C)	<i>E. gallinarum</i>				<i>E. caselliflavus</i>				Kraanwater	
		2,50E+05		2,50E+01		2,50E+05		2,50E+01		2,50E+05	
A	62,0	21,3	21,2	34,3	34,8	21,5	21,5	37,1	34,4	N/A	N/A
B	61,5	21,3	21,1	34,6	35,8	21,5	21,4	34,9	36,1	N/A	N/A
C	60,5	21,1	21,1	34,8	36,1	21,3	21,3	36,0	36,7	N/A	N/A
D	58,7	21,1	21,1	34,8	34,1	21,4	21,4	35,1	35,9	N/A	N/A
E	56,6	21,2	21,1	34,9	34,0	21,5	21,5	35,3	34,2	N/A	N/A
F	54,8	21,2	21,3	34,6	35,2	21,7	21,7	35,2	35,2	N/A	N/A
G	53,6	21,4	21,3	35,0	36,0	21,8	21,8	36,0	36,3	N/A	38,9
H	53,0	21,6	21,4	35,3	36,1	21,8	21,9	35,1	36,1	39,4	38,3

De Cq waarden van duplo-reacties zijn weergegeven. Hoge Cq waarden in groen en lage in het rood

Bij het gebruik van primerpaar Ent_A1 voor detectie van *E. gallinarum* en *E. caselliflavus* wordt de hoge concentratie gedetecteerd met Cq waarden die lager zijn dan de Cq waarden welke worden verkregen bij het toepassen van PCR Ent_AB1. De Cq waarden met primerpaar Ent_A1 vertonen weinig variatie t.g.v. verschillende reactietemperaturen. Detectie van de lage concentratie vindt plaats in alle *E. gallinarum* en *E. caselliflavus* monsters. In de monsters waarbij DNA uit kraanwater is gebruikt voor het uitvoeren van PCR-reacties met de Ent_A1 primerset wordt alleen laat in de PCR-reactie (hoge Cq waarde) bij lage temperaturen een PCR-fragment gevormd. Deze resultaten maken duidelijk dat de PCR-reacties voor detectie van *E. gallinarum* en *E. caselliflavus* efficiënter verlopen met primerpaar Ent_A1 dan met Ent_AB1.

Conclusie

Bovenstaande resultaten geven aan dat primerpaar Ent_A1 de voorkeur heeft boven primerpaar Ent_AB1 voor detectie van *E. gallinarum* en *E. caselliflavus*.

2.2.2 Detectie *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae* en *E. mundtii* (en *E. avium*)

Voor detectie van *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae* en *E. mundtii* zijn twee potentieel toepasbare primerparen beschikbaar: Ent_C1 en Ent_BC1 waarbij met het primerpaar Ent_BC1 ook *E. avium* aangetoond kan worden. In

Tabel 8 en Tabel 9 zijn de Cq waarden weergegeven van reacties uitgevoerd met primerparen Ent_C1 en Ent_BC1 uitgevoerd op DNA van referentiestammen.

Tabel 8. Resultaten gradiënt-PCR met primerpaar Ent_C1 op DNA van *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. avium* en Kraanwater (Nieuwegein)

	Annealing temp. (°C)	2,50E+05 <i>E. durans</i>		2,50E+05 <i>E. faecium</i>		2,50E+05 <i>E. hirae</i>		2,50E+05 <i>E. mundtii</i>		2,50E+05 Kraanwater		2,50E+05 <i>E. avium</i>	
A	62	27,9	27,5	29,6	29,6	31,8	31,7	27,8	27,7	N/A	N/A	N/A	N/A
B	61,5	27,0	26,9	29,2	29,0	31,0	31,1	26,8	26,7	N/A	N/A	N/A	N/A
C	60,5	26,7	26,7	29,5	29,2	31,2	31,1	26,1	26,1	N/A	N/A	N/A	N/A
D	58,7	28,6	28,5	31,3	31,2	33,2	32,7	26,6	26,4	N/A	N/A	N/A	N/A
E	56,6	32,4	32,7	33,6	33,3	35,3	34,4	27,8	28,0	N/A	N/A	N/A	N/A
F	54,8	34,5	35,0	35,4	35,3	37,5	37,7	29,5	29,9	N/A	37,8	N/A	N/A
G	53,6	36,3	36,9	37,3	36,3	38,4	39,1	31,1	31,2	N/A	36,6	N/A	N/A
H	53	36,4	37,2	37,2	37,6	39,0	39,7	31,4	31,9	38,2	N/A	N/A	N/A

De Cq waarden van duplo-reacties zijn weergegeven. Hoge Cq waarden in groen en lage in het rood

Met Ent_C1 vindt alleen detectie plaats van *E. durans*, *E. faecium*, *E. mundtii* en *E. hirae* en wordt *E. avium* niet gedetecteerd. In drie monsters met DNA uit kraanwater wordt, bij een lage reactietemperatuur van <54,8°C, een PCR-fragment gevormd na het uitvoeren van veel cycli (hoge Cq waarde). Er zijn grote verschillen tussen de Cq waarden bij een lage reactietemperatuur (hoge Cq) en de hogere temperaturen, waarmee wordt aangegeven dat detectie afhankelijk is van de toegepaste temperatuur en daardoor waarschijnlijk minder robuust verloopt.

Tabel 9. Resultaten gradiënt-PCR met primerpaar Ent_BC1 op DNA van *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii*, *E. avium* en Kraanwater (Nieuwegein)

	Annealing temp. (°C)	2,50E+05 <i>E. durans</i>		2,50E+05 <i>E. faecium</i>		2,50E+05 <i>E. hirae</i>		2,50E+05 <i>E. mundtii</i>		2,50E+05 Kraanwater		2,50E+05 <i>E. avium</i>	
A	62,0	22,0	22,0	23,1	23,1	24,6	24,6	23,0	23,0	N/A	N/A	25,4	24,8
B	61,5	21,9	21,8	23,0	23,0	24,5	24,5	23,0	23,0	N/A	N/A	24,5	24,5
C	60,5	21,7	21,7	22,9	22,8	24,4	24,4	22,9	23,0	N/A	38,2	24,4	24,6
D	58,7	21,8	21,7	23,0	22,9	24,6	24,6	23,2	23,3	37,3	37,9	24,8	24,8
E	56,6	22,0	22,0	23,3	23,3	24,9	25,0	23,6	23,7	36,4	35,7	25,2	25,2
F	54,8	22,4	22,4	23,7	23,6	25,3	25,4	24,1	24,1	35,5	35,9	25,7	25,6
G	53,6	22,5	22,6	24,0	24,0	25,6	25,6	24,3	24,3	36,3	35,8	25,8	25,9
H	53,0	22,9	22,8	24,1	24,1	25,8	25,8	24,5	24,5	36,1	36,3	26,0	26,1

De Cq waarden van duplo-reacties zijn weergegeven. Hoge Cq waarden in groen en lage in het rood

Bij het gebruik van primerpaar Ent_BC1 (Tabel 9) vindt detectie plaats van *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii* en ook *E. avium*. De Cq waarden voor detectie van *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae* en *E. mundtii* zijn duidelijk lager dan bij het gebruik van primerpaar Ent_C1. Zeer laat in de reacties (hoge Cq waarden) wordt ook bij het DNA uit kraanwater met de PCR een signaal aangetoond. Dit treedt op bij hoge concentraties DNA uit kraanwater en zonder het gebruik van een probe. Verder onderzoek moet uitwijzen in hoeverre er ook een signaal wordt aangetoond bij het gebruik van een probe en bij aanwezigheid van lagere (en voor de praktijk relevante) concentraties. De verkregen Cq waarden zijn minder afhankelijk van de toegepaste reactietemperatuur waardoor te verwachten is dat PCR-reacties met dit primerpaar robuust verlopen.

Omdat het primerpaar Ent_C1 niet perfect bindt aan het DNA van *E. mundtii* is er voor specifieke detectie van *E. mundtii* een extra primerpaar ontworpen (Ent_Mun1). Dit primerpaar is getest op verschillende concentraties DNA van *E. mundtii* (Tabel 10).

Tabel 10. Resultaten gradiënt-PCR met primerpaar Ent_Mun1 op verschillende concentraties DNA van *E. mundtii* en DNA uit kraanwater (Nieuwegein)

	Annealing temp. (°C)	<i>Enterococcus Mundtii</i>						<i>Kraanwater</i>	
		2,50E+05		2,50E+02		2,50E+01		2,50E+05	
A	62	22,4	22,3	32,4	32,6	36,5	35,5	N/A	N/A
B	61,5	22,4	22,3	32,4	32,7	35,9	35,6	N/A	N/A
C	60,5	22,4	22,7	33,0	32,3	38,3	37,2	N/A	N/A
D	58,7	23,1	23,0	33,1	33,3	36,2	36,8	N/A	N/A
E	56,6	23,7	23,8	34,0	33,8	36,4	36,3	N/A	N/A
F	54,8	24,1	24,2	34,0	34,6	36,3	36,5	N/A	37,5
G	53,6	24,4	24,3	34,8	35,0	37,0	38,6	39,4	37,7
H	53	24,8	24,5	35,6	34,9	37,1	38,2	38,1	37,2

De Cq waarden van duplo-reacties zijn weergegeven. Hoge Cq waarden in groen en lage in het rood

De resultaten voor detectie van *E. mundtii* met primerpaar Ent_Mun1 (Tabel 10) laten zien dat robuuste detectie van het DNA van *E. mundtii* met dit primerpaar mogelijk is bij het gebruik van verschillende annealingtemperaturen. Alleen bij lage temperaturen vindt ook bij een hoge concentratie DNA van kraanwater enige amplificatie plaats (met hoge Cq waarde).

Conclusies

Bovenstaande resultaten geven aan dat primerpaar Ent_BC1 de voorkeur heeft boven primerpaar Ent_C1 voor detectie van *E. durans*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. mundtii* en ook *E. avium*. Bij de keuze van Ent_BC1 zou het gebruik van de specifieke PCR voor detectie van alleen *E. mundtii* (Ent_Mun1) niet nodig zijn omdat *E. mundtii* ook wordt gedetecteerd met Ent_BC1.

2.2.3 Detectie *E. faecalis*

Voor detectie van *E. faecalis* zijn twee potentieel toepasbare primerparen ontworpen: Ent_D1 en Ent_D2. Deze zijn getest op DNA van twee *E. faecalis* referentiestammen (ATCC19434 en DSM 20478) en DNA uit kraanwater als negatieve controle. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in Tabel 11 en Tabel 12.

Tabel 11. Resultaten gradiënt-PCR met primerpaar Ent_D1 voor detectie van *E. faecalis* en DNA uit kraanwater (Nieuwegein)

	Annealing temp. (°C)	<i>E. faecalis</i> (ATCC19433)				<i>E. faecalis</i> (DSM 20478)				<i>Kraanwater</i>	
		2,50E+05		2,50E+01		2,50E+05		2,50E+01		2,50E+05	
A	62	27,4	26,6	N/A	N/A	26,6	26,9	N/A	N/A	N/A	N/A
B	61,5	25,4	25,0	N/A	N/A	25,2	25,1	N/A	N/A	N/A	N/A
C	60,5	23,5	23,3	N/A	N/A	23,2	23,2	N/A	N/A	N/A	N/A
D	58,7	22,1	22,0	35,9	39,2	21,8	21,7	N/A	N/A	N/A	N/A
E	56,6	21,8	21,5	N/A	35,2	21,4	21,4	33,8	33,8	N/A	N/A
F	54,8	21,6	21,5	N/A	N/A	21,4	21,4	N/A	N/A	N/A	N/A
G	53,6	21,7	21,6	N/A	N/A	21,5	21,5	N/A	N/A	N/A	N/A
H	53	22,1	21,7	38,0	N/A	21,6	21,5	39,1	N/A	N/A	N/A

De Cq waarden van duplo-reacties zijn weergegeven. Hoge Cq waarden in groen en lage in het rood

Met primerpaar Ent_D1 (Tabel 11) is detectie mogelijk van de hoge concentratie DNA van de beide *E. faecalis* soorten met een optimale reactietemperatuur tussen ca. 55 en 60°C en wordt geen DNA uit kraanwater gedetecteerd. Alleen de hoge concentratie *E. faecalis* DNA wordt reproduceerbaar aangetoond, de lage concentratie (25 DNA-kopieën) wordt slechts in een beperkt deel van de reacties gedetecteerd.

Tabel 12. Resultaten gradiënt-PCR met primerpaar Ent_D2 voor detectie van *E. faecalis* en DNA uit kraanwater (Nieuwegein)

	Annealing temp. (°C)	<i>E. faecalis</i> (ATCC19433)				<i>E. faecalis</i> (DSM 20478)				<i>Kraanwater</i>	
		2,50E+05		2,50E+01		2,50E+05		2,50E+01		2,50E+05	
A	62	24,7	24,7	37,7	N/A	24,8	24,9	38,6	N/A	N/A	N/A
B	61,5	24,9	24,8	38,5	39,4	25,0	24,9	N/A	39,9	N/A	N/A
C	60,5	25,1	25,1	N/A	39,8	25,2	25,2	39,3	39,2	N/A	N/A
D	58,7	25,9	25,7	39,6	N/A	26,0	26,0	N/A	N/A	N/A	N/A
E	56,6	26,9	27,1	N/A	N/A	27,1	27,1	N/A	N/A	N/A	N/A
F	54,8	28,2	28,3	N/A	N/A	28,3	28,2	N/A	N/A	N/A	N/A
G	53,6	28,7	28,9	N/A	N/A	29,1	29,1	N/A	N/A	N/A	N/A
H	53	28,8	29,1	N/A	N/A	29,4	29,3	N/A	N/A	N/A	N/A

De Cq waarden van duplo-reacties zijn weergegeven. Hoge Cq waarden in groen en lage in het rood

Met primerpaar Ent_D2 (Tabel 12) is detectie mogelijk van de hoge concentratie DNA van beide enterococci soorten met een optimale reactietemperatuur tussen ca. 58 en 62°C en wordt geen signaal verkregen met DNA uit kraanwater gedetecteerd. De Cq waarden van PCR-reacties uitgevoerd met Ent_D2 zijn over het algemeen hoger dan reacties uitgevoerd met Ent_D1. Alleen de hoge concentratie *E. faecalis* DNA wordt reproduceerbaar aangetoond, de lage concentratie (25 DNA-kopieën) wordt slechts in een beperkt deel van de reacties gedetecteerd.

Bovenstaande resultaten geven aan dat detectie van lage concentraties met beide primerparen niet goed mogelijk lijkt. Aanvullende experimenten binnen dit project zullen aangeven in hoeverre dit gevoelige detectie van *E. faecalis* belemmert.

Conclusies

Bovenstaande resultaten geven aan dat te verwachten is dat de primerparen Ent_D1 en Ent_D2 niet optimaal zijn voor detectie van *E. faecalis*. Als alternatief voor gevoelige detectie van *E. faecalis* is in de vervolgstappen van dit onderzoek het gebruik van de primers F3_R1 uit de, door HWL ontwikkelde en eerder gevalideerde methode (Heijnen 2018) onderzocht (paragraaf 2.3.2).

2.2.4 Detectie *E. haemoperoxidus* en *E. moraviensis*

Voor detectie van *E. haemoperoxidus* en *E. moraviensis* zijn de primerparen Ent_E1 en Ent_E2 ontworpen. Deze zijn getest op DNA van *E. haemoperoxidus* en *E. moraviensis* en DNA uit kraanwater als negatieve controle.

Tabel 13. Resultaten gradiënt-PCR met primerpaar Ent_E1 voor detectie van *E. haemoperoxidus* en *E. moraviensis* en DNA uit kraanwater (Nieuwegein)

	Annealing temp.	<i>E. haemoperoxidus</i>				<i>E. moraviensis</i>				<i>Kraanwater</i>	
		2,50E+05		2,50E+01		2,50E+05		2,50E+01		2,50E+05	
A	62	26,4	26,1	N/A	N/A	22,4	22,5	37,3	34,7	N/A	N/A
B	61,5	25,6	25,5	N/A	N/A	22,1	22,1	36,0	36,7	N/A	N/A
C	60,5	25,1	25,0	N/A	36,0	21,8	21,8	35,9	36,8	N/A	N/A
D	58,7	24,5	24,4	N/A	N/A	21,6	21,6	36,0	36,4	N/A	N/A
E	56,6	24,3	24,3	N/A	N/A	21,7	21,7	38,1	35,3	39,5	N/A
F	54,8	24,4	24,4	N/A	35,9	21,8	21,8	36,5	N/A	38,0	38,9
G	53,6	24,5	24,5	37,3	38,3	22,0	22,0	38,8	37,3	38,8	39,0
H	53	24,7	24,5	N/A	N/A	22,0	22,0	36,7	39,4	38,6	N/A

De Cq waarden van duplo-reacties zijn weergegeven. Hoge Cq waarden in groen en lage in het rood

Bij het toepassen van primerpaar Ent_E1 (Tabel 13) wordt zowel *E. haemoperoxidus* als *E. moraviensis* gedetecteerd. De Cq waarden voor detectie van *E. haemoperoxidus* zijn hoger dan de Cq waarden voor *E. moraviensis*. Dit kan betekenen dat de qPCR voor *E. moraviensis* beter verloopt dan de qPCR voor detectie van *E. haemoperoxidus* maar het kan ook het gevolg zijn van een hogere concentratie DNA van *E. moraviensis* dan *E. haemoperoxidus*. De lage concentratie *E. moraviensis* wordt in vrijwel alle monsters gedetecteerd. Enige

achtergrond, met hoge Cq waarden, ontstaat bij het toepassen van een lage reactietemperatuur bij toevoeging van DNA uit kraanwater.

Vergelijkbare resultaten worden verkregen bij het toepassen van het primerpaar Ent_E2 (Tabel 14). Bij het gebruik van Ent_E2 ontstaat geen achtergrond bij het toevoegen van DNA van *Streptococcus anginosus* en de eerste indruk is dat de lage concentraties DNA van *E. haemoperoxidus* en *E. moraviensis* beter worden gedetecteerd met Ent_E2.

Tabel 14. Resultaten gradiënt-PCR met primerpaar Ent_E2 voor detectie van *E. haemoperoxidus* en *E. moraviensis* en DNA uit kraanwater (Nieuwegein)

	Annealin g temp.	<i>E. haemoperoxidus</i>				<i>E. moraviensis</i>				<i>Kraanwater</i>	
		2,5E+05		2,5E+01		2,5E+05		2,5E+01		2,5E+05	
A	62	24,3	24,2	N/A	N/A	22,0	22,0	34,8	34,8	N/A	N/A
B	61,5	24,2	24,2	N/A	37,3	22,0	22,0	34,9	34,8	N/A	N/A
C	60,5	24,3	24,3	N/A	38,0	22,0	22,0	37,3	37,2	N/A	N/A
D	58,7	24,5	24,5	38,0	38,3	22,3	22,3	36,8	35,4	N/A	N/A
E	56,6	25,0	25,0	37,9	37,2	22,8	22,7	36,3	39,5	N/A	N/A
F	54,8	25,6	25,7	39,3	38,7	23,4	23,4	38,4	37,5	N/A	N/A
G	53,6	26,1	26,1	38,3	N/A	23,8	23,8	37,6	36,8	N/A	N/A
H	53	26,3	26,3	39,3	N/A	24,4	24,2	38,3	38,2	N/A	N/A

De Cq waarden van duplo-reacties zijn weergegeven. Hoge Cq waarden in groen en lage in het rood

Conclusies

Bovenstaande resultaten geven aan dat de verschillen tussen beide primerparen voor detectie van *E. haemoperoxidus* en *E. moraviensis* klein zijn. Vanwege de afwezigheid van achtergrond met primerpaar Ent_E2 en de enigszins betere detectie van lage concentraties *E. haemoperoxidus* en *E. moraviensis* is er enige voorkeur voor het gebruik van Ent_E2

2.2.5 Samenvattend: PCR op referentiestammen

Er zijn PCR-reacties uitgevoerd met de geselecteerde primerparen (Ent_A1, Ent_BC1, Ent_D2, Ent_E2) op de hoge concentratie DNA (ca. $2,5 \times 10^5$ 16S kopieën per reactie) van de verschillende enterococci soorten om vast te stellen in hoeverre de ontworpen primersets specifiek zijn voor specifieke detectie van de enterococci soorten waarvoor ze ontworpen zijn. Vanwege de mogelijke minder efficiënte PCR's voor detectie van *E. faecalis* zijn in dit experiment de beide primerparen uit Tabel 3 getest maar is ook de primerset uit eerder onderzoek EntF3_EntR1 onderzocht. Om vast te stellen of het mogelijk is om voor alle potentieel bruikbare PCR-methoden dezelfde reactieomstandigheden te gebruiken zijn bij dit experiment zijn voor alle primerparen dezelfde reactieomstandigheden, met een reactietemperatuur van 58°C gebruikt. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in Tabel 15.

Tabel 15. Onderzoeken van de specificiteit van de primersets op DNA van referentiestammen

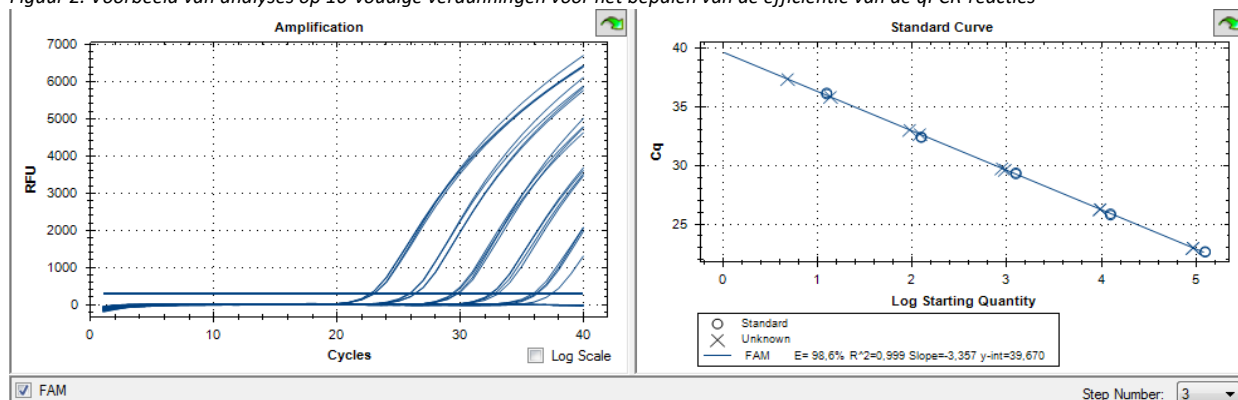
Nr.	Specificiteit> Stam	E. gallinarum E. caselliflavus		E. durans E. faecium E. hirae E. mundtii		Primers uit deze studie (Tabel 3)				Oude primers E. faecalis		E. moraviensis E. haemoperoxidus	
		Ent_A1	Ent_A2	Ent_BC1	Ent_BC2	E. faecalis Ent_D2	E. faecalis Ent_D1	E. faecalis Ent_F3	E. faecalis Ent_R1	E. faecalis Ent_F3	E. faecalis Ent_R1	Ent_E2	Ent_E2
1	<i>E. mundtii</i>	NA	NA	23,3	23,2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
2	<i>E. gallinarum</i>	20,6	20,7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
3	<i>E. caselliflavus</i>	21,0	21,1	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
4	<i>E. avium</i>	NA	NA	24,4	24,4	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
5	<i>E. durans</i>	NA	NA	21,8	21,8	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
6	<i>E. dispar</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
7	<i>E. faecium</i>	NA	NA	23,8	23,6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
8	<i>E. faecium</i>	NA	NA	23,5	23,5	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
9	<i>E. faecalis</i>	NA	NA	NA	NA	27,4	27,3	23,5	23,5	22,8	22,8	NA	NA
10	<i>E. faecalis</i>	NA	NA	NA	NA	27,0	27,1	23,3	23,4	22,5	22,5	NA	NA
11	<i>E. hirae</i>	NA	NA	24,7	24,7	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
12	<i>E. haemoperoxidus</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	24,3	24,3
13	<i>E. moraviensis</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	22,1	22,1
14	<i>A. viridans</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
15	<i>S. aureus</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
16	<i>S. anginosus</i>	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
17	Kraanwater KWR	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

Deze resultaten laten zien dat met de ontworpen primerparen specifieke detectie van de 10 geselecteerde enterococci soorten mogelijk is. Voor detectie van *E. faecalis* worden met de oude primerset (EntF3_EntR1) lagere Cq waarden gevonden dan met de nieuw ontworpen primers waardoor mogelijk het oude primerpaar beter geschikt is voor detectie van lage concentraties.

2.2.6 Gebruik van een probe en efficiëntie van de qPCR-reacties

Om zeker te zijn van een goede specificiteit en geen last te hebben van incidentele detectie van bijproducten (primer-dimers) heeft het de voorkeur om een probe toe te passen om de vermeerdering van het specifieke DNA-fragment tijdens PCR-reacties te detecteren. Toepassing van een probe maakt het bovendien mogelijk om methoden te ontwikkelen waarmee meerdere targets in één reactie kunnen worden gedetecteerd (zoals *E. coli* en enterococci samen of detectie van een Interne controle). Door reacties uit te voeren op (10-voudige) verdunningsreeksen van het DNA van de verschillende enterococci soorten is de efficiëntie van de verschillende PCR-reacties bepaald. Voor het bepalen van deze efficiënties wordt er uitgegaan dat er bij een 100% efficiënte PCR-reactie een verdubbeling van de DNA-concentratie plaats vindt tijdens elke PCR-cyclus. Een voorbeeld van analyses uitgevoerd voor het bepalen van de efficiëntie van de PCR-reacties is weergegeven in Figuur 2.

Figuur 2. Voorbeeld van analyses op 10-voudige verdunningen voor het bepalen van de efficiëntie van de qPCR-reacties



In Tabel 16 is een samenvatting weergegeven van de efficiënties van de verschillende qPCR-reacties. De efficiënties van alle reacties benaderen de 100% waardoor de conclusie kan worden getrokken dat de reacties efficiënt verlopen.

Tabel 16. Efficiënties van de PCR-reacties bepaald op verdunningsreeksen van DNA van enterococci

Primerset	PCR efficiënties	
Ent_A1	<i>E. caselliflavus</i>	97,2
	<i>E. gallinarum</i>	98,2
Ent_BC1	<i>E. avium</i>	100
	<i>E. durans</i>	99,9
	<i>E. faecium</i>	100,4
	<i>E. faecium</i>	97,9
	<i>E. hirae</i>	102,5
	<i>E. mundtii</i>	99,7
Ent_D2	<i>E. faecalis</i>	97,1
Ent_E2	<i>E. haemolyticus</i>	105,9
	<i>E. moraviensis</i>	98,5

2.2.7 Conclusies: specificiteit van primers en efficiëntie PCR reacties

Uit de resultaten van bovenstaande experimenten zijn, op basis van de specificiteit van de ontworpen primers en de efficiëntie van de PCR-reacties, de in tabel 17 weergegeven veelbelovende primersets, geselecteerd voor verder onderzoek. Voor al deze geselecteerde primersets kan probe P1 (Tabel 3) worden toegepast als probe.

Een korte verkenning van de mogelijkheden om, door het combineren van de specifieke primers, meerdere reacties in één keer uit te voeren liet zien dat Ent_A1 kan worden gecombineerd met Ent_BC1 waardoor detectie van zeven enterococci soorten in één reactie mogelijk wordt. Het combineren van alle primersets in één reactie gaat vooralsnog ten koste van de gevoeligheid van de RT-PCR. Verdere optimalisatie is nodig om te onderzoeken in hoeverre alle primerparen kunnen worden gecombineerd in één reactie (Multiplex RT-PCR).

Tabel 17. Veelbelovende primersets voor detectie van de 10 geselecteerde enterococci soorten

Tabel 17: Veenbelovende primersets voor detectie van de 16 geselecteerde enterobacteriële soorten				
	Soort	Primerpaar	Combinatie	
1	<i>E. caselliflavus</i>	Ent_A1: Ent_BC1F/Ent_A4R	Combineren in één reactie lijkt mogelijk	Reactie 1
2	<i>E. gallinarum</i>			
3	<i>E. avium</i>	Ent_BC1: Ent_BC1F/Ent_C2R		
4	<i>E. durans</i>			
5	<i>E. faecium</i>			
6	<i>E. hirae</i>			
7	<i>E. mundtii</i>			
8	<i>E. faecalis</i>	Ent_D1: Ent_D1F/Ent_D1R Of primerpaar uit eerder onderzoek: Ent_F3/Ent_R1?		Reactie 2
9	<i>E. haemoperoxidus</i>	Ent_E2: EntDE1F/Ent_E2R		Reactie 3
10	<i>E. moraviensis</i>			

2.3 Gevoeligheid detectie van enterococci met RT-PCR

De hierboven beschreven experimenten hebben inzicht gegeven in de mogelijke bruikbaarheid van de verschillende primerparen voor specifieke detectie van de tien geselecteerde enterococci soorten met qPCR. Voor het verkrijgen van de benodigde gevoeligheid van de methode (van 1 cel per 100ml drinkwater) is het van belang om

de methode, door het gebruik van RT-PCR, te richten op detectie van RNA van enterococci. Door de aanwezigheid van hoge concentraties 16S rRNA in elke bacteriële cel zal detectie van RNA (met RT-PCR) zorgen voor een hogere gevoeligheid van de methode. Voor het krijgen van een eerste indruk van de mogelijkheden voor het toepassen van de ontwikkelde primerparen voor gevoelige detectie van de geselecteerde enterococci soorten met RT-PCR zijn er RT-PCR reacties uitgevoerd op gekwantificeerde verdunningsreeksen van referentiestammen van enterococci. Voor het uitvoeren van de RT-PCR reacties zijn verschillende primerparen gecombineerd om daarmee te komen tot drie verschillende reacties waarmee de tien soorten kunnen worden aangetoond (Tabel 17). Voor het uitvoeren van de analyses met RT-PCR is gebruik gemaakt van de Evoscript mix van Roche Life sciences, een voorlopig en beknopt protocol voor de uitvoering van de RT-PCR analyses is weergegeven in bijlage III.

Bij het bepalen van de gevoeligheid van de ontwikkelde methoden is de beschikbaarheid van nauwkeurig gekwantificeerde celsuspensies essentieel. Voor detectie van *E. faecalis* en *E. faecium* is er gebruik gemaakt van Vitroids (SigmaAldrich). Vitroids bevatten een nauwkeurig gekwantificeerde concentratie kweekbare cellen en zijn gebruikt voor het samenstellen van verdunningsreeksen van celsuspensies met een bekend aantal kweekbare cellen. De concentratie kweekbare enterococci cellen in de Vitroids is eerst bepaald door het uitvoeren van kweek op S&B platen (in 5-voud) en aansluitend is de gemeten concentratie gebruikt voor het maken van verdunningsreeksen waarop vervolgens RT-PCR reacties zijn uitgevoerd. Voor de andere acht enterococci soorten zijn er geen Vitroids beschikbaar. Voor deze soorten is flowcytometrie gebruikt om de cellen van een verse celsuspensie te kwantificeren en aansluitend is kweek uitgevoerd op de gekwantificeerde suspensies. Bij het gebruik van deze aanpak voor het maken van gekwantificeerde suspensie van *E. coli* (Heijnen 2017) was er een goede overeenkomst tussen de tellingen met flowcytometrie en het aantal kweekbare *E. coli*'s. Bij het maken van enterococci suspensies waren de flowcytometrische tellingen lastig te interpreteren vanwege grote verschillen in signaalsterkte tussen de getelde deeltjes en was de overeenkomst tussen de flowcytometrische tellingen en de telling met kweek niet éénduidig. Mogelijk is dit het gevolg van de vorming van ketens van cellen met een variabel aantal cellen per keten waardoor het kan voorkomen dat een variabel aantal cellen door de flowcytometer kan worden geteld als één deeltje. Voor de uiteindelijke validatie van de methode (bepalen van de RLOD volgens ISO16140-2:2016) is het van belang om de beschikking te hebben over een goede methode voor het samenstellen van nauwkeurig gekwantificeerde suspensies. Aanvullend vervolgonderzoek is nodig voor de ontwikkeling van een dergelijke methode.

De kwantificering met kweek is in dit onderzoek gebruikt als uitgangspunt voor het samenstellen van gekwantificeerde celsuspensies t.b.v. het bepalen van de gevoeligheid van de methoden.

Er zijn experimenten uitgevoerd om een eerste indruk van de gevoeligheid van de RT-PCR methoden voor detectie van de enterococci soorten welke zijn weergegeven in Tabel 18. Er is gekozen om de gevoeligheidsstudie uit te voeren voor elk primerpaar waarbij de voor elk primerpaar minimaal één target-soort is getest. Voor de soorten waarvoor geen vitroids beschikbaar zijn is de keuze gemaakt om twee soorten te testen.

Tabel 18. Enterococci stammen gebruikt voor gevoeligheidsstudie

Soort	Stam	Kwantificatie	RT-PCR (Tabel 17)
<i>E. casseliflavus</i>	HWL 5368495	Kweek	Reactie 1
<i>E. gallinarum</i>	DSM 24841	Kweek	Reactie 1
<i>E. faecium</i>	ATCC® 19434	Vitroids WDCM 00010	Reactie 1
<i>E. faecalis</i>	ATCC® 19433	Vitroids WDCM 00009	Reactie 2
<i>E. haemoperoxidus</i>	DSM 15920	Kweek	Reactie 3
<i>E. moraviensis</i>	DSM 15919	Kweek	Reactie 3

Om vast te stellen in hoeverre andere enterococci soorten ook worden gedetecteerd bij toepassing van de geselecteerde primerparen zijn er ook reacties uitgevoerd op een verzameling andere enterococci soorten en een aantal andere bacteriesoorten (niet-enterococci). De gebruikte stammen zijn weergegeven in Tabel 19. Deze

reacties zijn uitgevoerd op RNA wat is geïsoleerd uit een suspensie bepaalde concentratie cellen, zoals bepaald met de kweekmethode (concentraties zijn weergegeven in Tabel 19).

Tabel 19. Geselecteerde enterococci en niet-enterococci soorten voor het bepalen van de specificiteit

Soort	Stam		Concentratie (KVE/reactie)
	Nr	Herkomst	
<i>E. malodoratus</i>	HWL_5379037	HWL	100
<i>E. faecium</i>	HWL_5380066	HWL	100
<i>E. hirae</i>	HWL_5380053-2	HWL	100
<i>E. mundtii</i>	HWL_5370460-1	HWL	100
<i>E. faecalis</i>	HWL_5370460-7	HWL	75
<i>E. durans</i>	HWL_5370460-10	HWL	100
<i>E. thailandicus</i>	HWL_5410422	HWL	100
<i>E. phoeniculus</i>	HWL_5410422-10	HWL	100
<i>E. avium</i>	DSM_20679	DSM	100
<i>E. haemoperoxidus</i>	DSM_15920	DSM	100
<i>E. moraviensis</i>	DSM_15919	DSM	100
<i>Aerococcus viridans</i>	DSM_20311	DSM	100
<i>Staphylococcus aureus</i>	WR1	Labreferentie	100
<i>Streptococcus anginosus</i>	DSM_20563	DSM	125

2.3.1 RT-PCR voor detectie van *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* en *E. faecium* (Reactie 1)

Gevoeligheid van "Reactie 1" voor detectie van *E. casseliflavus* en *E. gallinarum*

Om een eerste indruk te krijgen van de gevoeligheid waarmee "Reactie 1" kan worden gebruikt voor specifieke detectie van *E. casseliflavus*, *E. gallinarum* en *E. faecium* zijn er RT-PCR reacties uitgevoerd op verdunningsreeksen van deze enterococci soorten. De resultaten van RT-PCR reacties op verdunningen van *E. casseliflavus* en *E. gallinarum* zijn weergegeven in Tabel 20.

Tabel 20. Samenvatting resultaten voor bepalen van de gevoeligheid van "Reactie 1" voor detectie van *E. casseliflavus* (A) en *E. gallinarum* (B)

A				B			
	Reactie 1				Reactie 1		
	KVE/Reactie	Cq 1	Cq 2		KVE/Reactie	Cq 1	Cq 2
<i>E. casseliflavus</i>	2840,0	22,5	22,7	<i>E. gallinarum</i>	265,0	21,2	21,0
<i>E. casseliflavus</i>	2840,0	25,1	25,0	<i>E. gallinarum</i>	265,0	20,5	20,7
<i>E. casseliflavus</i>	1420,0	22,7	22,4	<i>E. gallinarum</i>	132,5	21,3	21,1
<i>E. casseliflavus</i>	1420,0	23,0	23,0	<i>E. gallinarum</i>	132,5	21,3	21,5
<i>E. casseliflavus</i>	710,0	23,7	23,5	<i>E. gallinarum</i>	66,3	22,1	22,0
<i>E. casseliflavus</i>	710,0	29,0	28,9	<i>E. gallinarum</i>	66,3	22,3	22,2
<i>E. casseliflavus</i>	284,0	22,9	22,6	<i>E. gallinarum</i>	26,5	23,5	23,7
<i>E. casseliflavus</i>	284,0	22,6	22,3	<i>E. gallinarum</i>	26,5	23,8	24,0
<i>E. casseliflavus</i>	142,0	23,3	23,4	<i>E. gallinarum</i>	13,3	24,5	24,5
<i>E. casseliflavus</i>	142,0	24,6	24,7	<i>E. gallinarum</i>	13,3	24,3	24,2
<i>E. casseliflavus</i>	56,8	25,8	25,8	<i>E. gallinarum</i>	5,3	26,3	26,2
<i>E. casseliflavus</i>	56,8	25,4	25,1	<i>E. gallinarum</i>	5,3	26,2	26,2
<i>E. casseliflavus</i>	28,4	27,3	27,4	<i>E. gallinarum</i>	2,7	27,3	27,2
<i>E. casseliflavus</i>	28,4	27,6	27,4	<i>E. gallinarum</i>	2,7	27,5	27,5
<i>E. casseliflavus</i>	2,8	30,4	30,6	<i>E. gallinarum</i>	0,3	30,8	30,5

Bovenstaande analyses laten zien dat lage concentraties *E. casseliflavus* en *E. gallinarum* in dit experiment gedetecteerd kunnen worden met de ontwikkelde RT-PCR methoden.

Gevoeligheid van Reactie 1 voor detectie van *E. faecium*

Voor het detecteren van *E. faecium* is ook "Reactie 1" (Tabel 17) gebruikt. De resultaten van RT-PCR reacties op verdunningen van *E. faecium* zijn samengevat in Tabel 21.

Tabel 21. Samenvatting van resultaten voor het bepalen van de gevoeligheid van "Reactie 1" voor detectie van *E. faecium*

	KVE/Reactie Gem.	Reactie 1	
		Cq 1	Cq 2
<i>E. faecium</i>	80	30,3	31,6
<i>E. faecium</i>	80	30,4	30,4
<i>E. faecium</i>	40	31,2	31,4
<i>E. faecium</i>	40	31,1	31,4
<i>E. faecium</i>	24	34,4	36,0
<i>E. faecium</i>	24	31,3	30,6
<i>E. faecium</i>	16	35,9	35,2
<i>E. faecium</i>	16	32,7	35,0
<i>E. faecium</i>	8	34,3	34,1
<i>E. faecium</i>	8	34,8	34,3
Blanco	0	N/A	N/A

Deze resultaten laten zien dat concentraties *E. faecium* van 8 tot 80 KVE/reactie reproduceerbaar kunnen worden gedetecteerd met RT-PCR.

Specificiteit van "Reactie 1" voor detectie van enterococci soorten

In Tabel 22 is het resultaat van analyses met "Reactie 1" op het RNA van verschillende bacteriesoorten weergegeven.

Tabel 22. Samenvatting van resultaten van analyses met "Reactie 1" op RNA geïsoleerd uit verschillende bacteriesoorten

Soort	Concentratie (KVE/reactie)	Reactie 1	
		Cq 1	Cq 2
<i>E. malodoratus</i>	100	N/A	N/A
<i>E. faecium</i>	100	32	32,02
<i>E. hirae</i>	100	28,38	28,54
<i>E. mundtii</i>	100	29,87	29,47
<i>E. faecalis</i>	75	N/A	N/A
<i>E. durans</i>	100	26,21	26,24
<i>E. thailandicus</i>	100	25,11	25,04
<i>E. phoeniculica</i>	100	N/A	N/A
<i>E. avium</i>	100	27,94	26,97
<i>E. haemoperoxidus</i>	100	N/A	N/A
<i>E. moraviensis</i>	100	N/A	N/A
<i>Aerococcus viridans</i>	100	N/A	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i>	100	N/A	N/A
<i>Streptococcus anginosus</i>	125	N/A	N/A

Deze resultaten maken duidelijk dat detectie van de onderzochte *Aerococcus*, *Staphylococcus* en *Streptococcus* stammen niet plaats vindt. Zoals te verwachten is worden de enterococci soorten *E. avium*, *E. durans*, *E. hirae*, RNA van een andere *E. faecium* stam en *E. mundtii* wel gedetecteerd. Ook detectie van *E. thailandicus* vindt plaats terwijl het RNA van de onderzochte enterococci soorten *E. malodoratus*, *E. faecalis*, *E. phoeniculica*, *E. haemoperoxidus* en *E. moraviensis* niet wordt gedetecteerd.

2.3.2 RT-PCR voor detectie van *Enterococcus faecalis* (Reactie 2)

Gevoeligheid RT-PCR voor detectie van *E. faecalis*

Vitroids met hierin cellen van *E. faecalis* zijn gebruikt voor een het onderzoeken van de gevoeligheid van RT-PCR voor detectie van *E. faecalis*. Aangezien de eerdere experimenten nog geen volledige duidelijkheid hadden gegeven over de bruikbaarheid van de verschillende primerparen voor detectie van *E. faecalis* zijn de analyses in dit experiment uitgevoerd met primerpaar Ent_D2 ("Reactie 2") en het EntF3/EntR1 primerpaar uit eerder onderzoek ("1^e generatie").

Tabel 23. Samenvatting resultaten voor het bepalen van de gevoeligheid van RT-PCR's uitgevoerd met de nieuw ontworpen Ent_D1 primers en de 1^e generatie primers (EntF3/EntR1) voor detectie van *E. faecalis*

	KVE/reactie			Nieuwe primers: Ent_D1		1e gen. Primers: EntF3/EntR1	
	Gem.	Range		Cq 1	Cq 2	Cq 1	Cq 2
<i>E. faecalis</i>	60	48	72	N/A	N/A	32,5	33,2
<i>E. faecalis</i>	60	48	72	N/A	N/A	30,7	31,0
<i>E. faecalis</i>	30	24	36	38,8	38,4	28,7	29,2
<i>E. faecalis</i>	30	24	36	36,9	36,4	28,8	29,1
<i>E. faecalis</i>	18	14,4	21,6	39,0	38,5	28,3	28,4
<i>E. faecalis</i>	18	14,4	21,6	38,1	38,0	29,5	29,1
<i>E. faecalis</i>	12	9,6	14,4	N/A	N/A	32,3	32,0
<i>E. faecalis</i>	12	9,6	14,4	37,1	39,2	29,4	29,2
<i>E. faecalis</i>	6	4,8	7,2	39,2	38,6	29,2	28,2
<i>E. faecalis</i>	6	4,8	7,2	N/A	N/A	31,2	30,5
Blanco		0	0	N/A	N/A	N/A	N/A

De resultaten laten zien dat met de nieuw ontwikkelde primerset (Ent_D1) in een vrij groot aantal monsters geen *E. faecalis* wordt gedetecteerd. Met de 1^e generatie primers wordt *E. faecalis* in alle onderzochte monsters aangetoond. Het is wel opvallend dat er geen relatie lijkt te zijn tussen het aantal enterococci in de monsters en de Cq waarden van de RT-PCR terwijl te verwachten is dat hogere concentraties enterococci resulteert in lager Cq waarden (zoals wel het geval is voor *E. faecium*). Om beter inzicht te krijgen in het gebruik van de 1^e generatie primers voor detectie van lage concentratie *E. faecalis* is het experiment herhaald waarbij analyses zijn uitgevoerd op lagere concentraties *E. faecalis*. De resultaten van dit experiment zijn samengevat in Tabel 24.

Tabel 24. Samenvatting resultaten van bepalen van de gevoeligheid van nieuw ontworpen en 1^e generatie primers voor detectie van *E. faecalis*

	KVE/reactie			1e gen. Primers: EntF3/EntR1	
	Gem	Range		Cq 1	Cq 2
<i>E. faecalis</i>	20	16	24	30,7	31,2
<i>E. faecalis</i>	6	4,8	7,2	35,5	34,3
<i>E. faecalis</i>	6	4,8	7,2	35,1	33,9
<i>E. faecalis</i>	4	3,2	4,8	35,5	38,0
<i>E. faecalis</i>	4	3,2	4,8	35,5	34,8
<i>E. faecalis</i>	2	1,6	2,4	36,1	38,1
<i>E. faecalis</i>	2	1,6	2,4	35,6	38,7
<i>E. faecalis</i>	2	1,6	2,4	37,0	38,4
<i>E. faecalis</i>	2	1,6	2,4	35,4	36,9
<i>E. faecalis</i>	1	0,8	1,2	38,1	36,4
<i>E. faecalis</i>	1	0,8	1,2	37,2	N/A
<i>E. faecalis</i>	1	0,8	1,2	38,0	N/A
<i>E. faecalis</i>	1	0,8	1,2	38,0	N/A
<i>E. faecalis</i>	1	0,8	1,2	N/A	37,0
Blanco		0	0	N/A	N/A

De resultaten van dit experiment laten zien dat detectie van lage concentraties *E. faecalis* mogelijk is met het gebruik van de 1^e generatie primers. Zoals verwacht, is een toename van de Cq waarden zichtbaar bij een afname van de concentratie.

Specificiteit van “Reactie 2” voor detectie van *E. faecalis*

Om te bepalen in hoeverre detectie van andere bacteriesoorten en andere enterococci-soorten kan plaats vinden bij het gebruik van de 1^e generatie *E. faecalis* specifieke primers zijn er RT-PCR reacties uitgevoerd op het RNA van bekende bacteriestammen. In Tabel 25 zijn de resultaten van deze samengevat.

Tabel 25. Samenvatting van resultaten van analyses met de 1^e generatie *E. faecalis* (“Reactie 2”) specifieke primers op RNA geïsoleerd uit verschillende bacteriesoorten

Soort	Stam	Concentratie (KVE/reactie)	Reactie 2 (1e generatie primers)	
			Cq 1	Cq 2
<i>E. caselliflavus</i>	HWL_5368495	100	N/A	N/A
<i>E. malodoratus</i>	HWL_5379037	100	N/A	N/A
<i>E. faecium</i>	HWL_5380066	100	37,46	38,37
<i>E. hirae</i>	HWL_5380053-2	100	34,18	34,43
<i>E. mundtii</i>	HWL_5370460-1	100	N/A	N/A
<i>E. faecalis</i>	HWL_5370460-7	75	32,74	33,25
<i>E. durans</i>	HWL_5370460-10	100	34,28	34,19
<i>E. thailandicus</i>	HWL_5410422	100	39,81	37,29
<i>E. phoeniculica</i>	HWL_5410422-10	100	N/A	N/A
<i>E. avium</i>	DSM_20679	100	N/A	N/A
<i>E. haemoperoxidus</i>	DSM_15920	100	34,47	34,44
<i>E. moraviensis</i>	DSM_15919	100	36,83	36,04
<i>Aerococcus viridans</i>	DSM_20311	100	N/A	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i>	WR1	100	N/A	N/A
<i>Streptococcus anginosus</i>	DSM_20563	125	N/A	N/A

Deze analyses laten zien dat met het gebruik van deze primers geen detectie plaats vindt van de onderzochte *Aerococcus*, *Staphylococcus* en *Streptococcus* stammen. Detectie van het RNA van een aantal andere enterococci stammen vindt wel plaats. Van een deel van deze enterococci soorten verloopt de RT-PCR niet efficiënt de Cq waarden zijn hoog (zoals *E. thailandicus*, *E. faecium* en *E. moraviensis*) zodat verwacht mag worden dat dit in praktijksituaties, bij aanwezigheid van lage concentraties, niet zal plaats vinden. Detectie van het RNA van een aantal andere enterococci (zoals *E. hirae* en *E. durans*) vindt efficiënter plaats waardoor mogelijk kruisreacties bij aanwezigheid van deze enterococci te verwachten zijn. Aangezien deze “kruisreagerende enterococci soorten” behoren tot de tien geselecteerde soorten zal het aantonen van deze soorten niet leiden tot onjuiste conclusies.

2.3.3 RT-PCR voor detectie van *Enterococcus moraviensis* en *Enterococcus haemoperoxidus* (Reactie 3)

Gevoeligheid van “Reactie 3” voor detectie van *E. moraviensis* en *E. haemoperoxidus*

Om een indruk te krijgen van de gevoeligheid waarmee “Reactie 3” kan worden gebruikt voor specifieke detectie van *E. moraviensis* en *E. haemoperoxidus* zijn er RT-PCR reacties uitgevoerd op verdunningsreeksen van, met kweek gekwantificeerde, celsuspensies van deze soorten. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in Tabel 26.

Tabel 26. Samenvatting resultaten voor het bepalen van de gevoeligheid van RT-PCR's uitgevoerd met de primers van "reactie 3" voor detectie van *E. haemoperoxidus* (A) en *E. moraviensis* (B)

A				B			
	KVE/Reactie	Reactie 3			KVE/Reactie	Reactie 3	
	Gem	Cq 1	Cq 2		Gem	Cq 1	Cq 2
<i>E. haemoperoxidus</i>	510	26,4	26,3	<i>E. moraviensis</i>	2675	21,7	21,9
<i>E. haemoperoxidus</i>	510	26,2	26,2	<i>E. moraviensis</i>	2675	21,1	21,4
<i>E. haemoperoxidus</i>	255	26,9	26,9	<i>E. moraviensis</i>	1338	22,1	22,3
<i>E. haemoperoxidus</i>	255	26,6	26,8	<i>E. moraviensis</i>	1338	22,0	22,1
<i>E. haemoperoxidus</i>	128	27,5	27,5	<i>E. moraviensis</i>	669	22,8	22,8
<i>E. haemoperoxidus</i>	128	26,7	26,9	<i>E. moraviensis</i>	669	23,6	23,5
<i>E. haemoperoxidus</i>	51	29,1	29,0	<i>E. moraviensis</i>	268	23,3	23,6
<i>E. haemoperoxidus</i>	51	29,3	29,4	<i>E. moraviensis</i>	268	23,8	24,1
<i>E. haemoperoxidus</i>	26	31,9	32,1	<i>E. moraviensis</i>	134	25,1	25,1
<i>E. haemoperoxidus</i>	26	29,1	29,2	<i>E. moraviensis</i>	134	24,8	24,8
<i>E. haemoperoxidus</i>	10	30,4	30,2	<i>E. moraviensis</i>	54	26,4	26,2
<i>E. haemoperoxidus</i>	10	31,1	30,8	<i>E. moraviensis</i>	54	26,4	26,4
<i>E. haemoperoxidus</i>	5	32,8	33,2	<i>E. moraviensis</i>	27	32,4	33,1
<i>E. haemoperoxidus</i>	5	36,4	35,8	<i>E. moraviensis</i>	27	30,9	30,9
<i>E. haemoperoxidus</i>	0	N/A	N/A	<i>E. moraviensis</i>	3	33,7	34,7

De resultaten van dit experiment laten zien dat detectie van lage concentraties *E. moraviensis* en *E. haemoperoxidus* mogelijk is met het gebruik van de primers uit "Reactie 3 (Ent_E2)". Zoals verwacht, is een toename van de Cq waarden zichtbaar bij een afname van de concentratie.

Specificiteit van "Reactie 3" voor detectie van *E. moraviensis* en *E. haemoperoxidus*

Om te bepalen in hoeverre detectie van andere bacteriesoorten en andere enterococcen-soorten kan plaats vinden bij het gebruik van de *E. moraviensis* en *E. haemoperoxidus* specifieke primers van "Reactie 3" zijn er RT-PCR reacties uitgevoerd op het RNA van bekende bacteriestammen. In Tabel 27 zijn de resultaten van deze analyses samengevat.

Tabel 27. Samenvatting van resultaten van analyses met de "Reactie 3" primers (specifiek voor *E. moraviensis* en *E. haemoperoxidus* op RNA geïsoleerd uit verschillende bacteriesoorten.

Soort	Stam	Concentratie (KVE/reactie)	Reactie 3	
			Cq 1	Cq 2
<i>E. caselliflavus</i>	HWL_5368495	100	N/A	N/A
<i>E. malodoratus</i>	HWL_5379037	100	N/A	N/A
<i>E. faecium</i>	HWL_5380066	100	N/A	N/A
<i>E. hirae</i>	HWL_5380053-2	100	N/A	N/A
<i>E. mundtii</i>	HWL_5370460-1	100	N/A	N/A
<i>E. faecalis</i>	HWL_5370460-7	75	N/A	N/A
<i>E. durans</i>	HWL_5370460-10	100	N/A	N/A
<i>E. thailandicus</i>	HWL_5410422	100	N/A	N/A
<i>E. phoenicula</i>	HWL_5410422-10	100	N/A	N/A
<i>E. gallinarum</i>	DSM_24841	100	N/A	N/A
<i>E. avium</i>	DSM_20679	100	N/A	N/A
<i>E. haemoperoxidus</i>	DSM_15920	100	29,04	28,97
<i>E. moraviensis</i>	DSM_15919	100	26,68	26,59
<i>Aerococcus viridans</i>	DSM_20311	100	N/A	N/A
<i>Staphylococcus aureus</i>	WR1	100	N/A	N/A
<i>Streptococcus anginosus</i>	DSM_20563	125	N/A	N/A

Bovenstaande resultaten maken duidelijk dat met de primers voor "Reactie 3" alleen *E. moraviensis* en *E. haemoperoxidus* worden gedetecteerd, de onderzochte andere enterococcen soorten en *Aerococcus*, *Staphylococcus* en *Streptococcus* worden met dit primerpaar niet aangetoond.

2.3.4 Conclusies gevoeligheids- en specificiteits-studies

De resultaten van de gevoeligheidsstudies laten zien dat:

- Er te verwachten is dat gevoelige detectie van de 10 geselecteerde soorten mogelijk is met de in dit rapport beschreven methoden.

- De in Tabel 17 weergegeven combinaties van primerparen kunnen hiervoor worden toegepast.
 - o Voor gevoelige detectie van *E. faecalis* lijken de nieuw ontwikkelde primersets niet geschikt, hiervoor kan de eerder ontwikkelde 1^e generatie RT-PCR (met primers EntF3/EntR1) worden gebruikt.

De resultaten van de specificiteitsstudies laten zien dat:

- Alleen detectie van enterococci te verwachten met de drie verschillende primersets

Uitgebreider validatieonderzoek (volgens ISO 16140-2:2016) is nodig om te bepalen wat de detectielimiet (Limit of detection: LOD) van de methode exact is en hoe deze zich verhoudt tot de LOD van de kweekmethode (Relative limit of detection: RLOD). Daarnaast zullen analyses op RNA uit een grotere groep enterococci en niet-enterococci beter inzicht geven in de inclusiviteit en exclusiviteit van de methoden.

2.4 Detectie in drinkwater

Om een eerste indruk te krijgen van de eventuele aanwezigheid van bacteriën in drinkwater waarvan het RNA kan zorgen voor kruisreacties met de ontwikkelde primers zijn er analyses uitgevoerd op RNA geïsoleerd uit tien drinkwatermonsters afkomstig van tien verschillende locaties. De resultaten van deze analyses zijn samengevat in Tabel 28.

Tabel 28. Analyse van drinkwatermonsters

Herkomst drinkwater	S&B (CFU/100 ml)	Reactie 1		Reactie 2		Reactie 3	
		<i>E. caselliflavus</i> , <i>E. gallinarum</i>					
		<i>E. avium</i> , <i>E. durans</i>				<i>E. haemolyticus</i>	
		<i>E. faecium</i> , <i>E. hirae</i> , <i>E. mundtii</i>		<i>E. faecalis</i>		<i>E. moravicus</i>	
		Cq1	Cq2	Cq1	Cq2	Cq1	Cq2
Meteren	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Nieuwegein	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Wijk bij Duurstede	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Wageningen	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Houten	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Gouda	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Utrecht	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Graven	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Rotterdam	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
Sleeuwijk	0	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

De resultaten laten zien dat de onderzochte drinkwatermonsters geen bacteriën aanwezig zijn die aanleiding geven tot het optreden van kruisreacties met de ontwikkelde primersets. De analyse van een grote collectie van drinkwatermonsters waarin, met de kweekmethode, enterococci worden aangetoond en een collectie monsters waarin met kweek geen enterococci worden aangetoond zal beter inzicht geven in de gevoeligheid van de methode (volgens ISO 16140-2:2016) voor het detecteren van enterococci in drinkwater.

3 Conclusies en aanbevelingen

Door analyse van 16S rRNA sequenties van een groot aantal enterococcen soorten zijn er verschillende primersets ontworpen waarmee specifieke detectie van 10 geselecteerde enterococcen soorten mogelijk is. De analyse van de 16S rRNA sequenties maakt duidelijk dat deze 10 soorten te verdelen zijn in de volgende vier groepen:

- A. *Enterococcus caselliflavus* en *Enterococcus gallinarum*
- B. *Enterococcus avium*, *Enterococcus durans*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus hirae* en *Enterococcus mundtii*
- C. *Enterococcus faecium*
- D. *Enterococcus haemolyticus* en *Enterococcus moraviensis*

Uit een eerste verkenning van de mogelijkheden om meerdere primerparen te combineren, voor detectie van meerdere soorten, in één RT-PCR reactie bleek dat de primerparen voor detectie van groep A en B (primersets Ent_A1 en Ent_BC1) kunnen worden gecombineerd zonder daarmee de gevoeligheid negatief te beïnvloeden. Het combineren van alle primerparen in één reactie (multiplex) is vooralsnog niet mogelijk maar wel wenselijk. De beschikbaarheid van een multiplex RT-PCR maakt de uitvoering van de methode aanzienlijk eenvoudiger tegen minder kosten. Aanvullend onderzoek, waarbij verschillende primerconcentraties, reactieomstandigheden en reagentia worden onderzocht, wordt geadviseerd voor de ontwikkeling van een multiplex RT-PCR.

Op basis van een beperkte validatiestudie wordt geconcludeerd dat:

- Er niet te verwachten is dat met het gebruik van deze primersets ook bacteriën van andere verwante bacteriefamilies (zoals staphylococcen, streptococcen of aerococcen) worden gedetecteerd (“exclusiviteit”).
 - Het onderzoeken van meer stammen in validatieonderzoek volgens ISO 16140-2:2016 zal nodig zijn om hierover meer zekerheid te krijgen.
- Analyses op verdunningsreeksen van verschillende enterococcen soorten geeft een eerste indicatie dat lage concentraties met de nieuw ontwikkelde RT-PCR methoden kunnen worden gedetecteerd.
 - Uitgebreid validatieonderzoek volgens ISO 16140-2:2016 zal nodig zijn om te bepalen of de gevoeligheid van RT-PCR vergelijkbaar is met de gevoeligheid van de kweekmethode (“Relative Limit Of Detection”: RLOD bepaling).
- Onderzoek van 10 drinkwatermonsters laat zien dat er niet te verwachten is dat er in drinkwater bacteriën aanwezig zijn waarmee kruisreacties mogelijk zijn.
 - Onderzoeken van meer drinkwatermonsters zal nodig zijn om hierover meer zekerheid te krijgen. Data hiervoor zal worden verzameld via de “sensitivity study” volgens ISO 16140-2:2016 en door het uitvoeren van dubbele analyses (“schaduwdraaien”: RT-PCR en kweek) door de drinkwaterlaboratoria.
 - Er is nog geen duidelijkheid in hoeverre detectie van lage concentraties enterococcen in drinkwater mogelijk is met de ontwikkelde RT-PCR methoden. Data hiervoor zal worden verzameld via de “sensitivity study” volgens ISO 16140-2:2016 en door het uitvoeren van dubbele analyses (“schaduwdraaien”: RT-PCR en kweek) door de drinkwaterlaboratoria.

Uitgaande van deze conclusies zijn er voldoende aanwijzingen dat de ontwikkelde RT-PCR methoden mogelijk bruikbaar zijn als alternatief voor de kweekmethode. Er wordt daarom aanbevolen om, via een validatietraject volgens ISO16140-2:2016, vast te stellen of de resultaten verkregen met de kweekmethode gelijkwaardig zijn aan de resultaten verkregen met deze nieuw ontwikkelde RT-PCR methode. Voordat gestart wordt met dit validatietraject wordt geadviseerd om extra onderzoek uit te voeren om:

- Een methode te ontwikkelen waarmee het mogelijk wordt om nauwkeurig gekwantificeerde enterococce suspensies samen te stellen.
 - De eerste ervaringen met het samenstellen van nauwkeurig gekwantificeerde enterococce suspensies binnen dit onderzoek bleek, waarschijnlijk t.g.v. de vorming van ketens van enterococce, lastig. Voor het bepalen van de RLOD is de beschikbaarheid van nauwkeurig gekwantificeerde enterococce suspensies essentieel. Door het toepassen van specifieke groeicondities of het gebruik van sonificatie op enterococce suspensies zal worden onderzocht met welke methode suspensies met losliggende cellen kunnen worden gemaakt.
- Multiplex RT-PCR te ontwikkelen waarmee één RT-PCR reactie nodig zal zijn voor het detecteren van de 10 geselecteerde enterococce soorten.
 - Multiplex RT-PCR zal het validatietraject aanmerkelijk vereenvoudigen en zal ook de uiteindelijke een efficiënter toepassing van de RT-PCR methode in de praktijk van een drinkwaterlaboratorium mogelijk maken.

4 Literatuur

Heijnen, L. (2017). "Validation of a real-time RT-PCR method for rapid detection of E. coli in distributed drinking water." KWR report 2017.098

Heijnen, L. (2018). "Validatie van een Real-time RT-PCR methode voor snelle detectie van intestinale enterococci in gedistribueerd drinkwater." BTO rapport 2018.070

Ludwig, W., O. Strunk, R. Westram, L. Richter, H. Meier, Yadhukumar, A. Buchner, T. Lai, S. Steppi, G. Jobb, W.

Forster, I. Brettske, S. Gerber, A. W. Ginhart, O. Gross, S. Grumann, S. Hermann, R. Jost, A. König, T. Liss, R.

Lusmann, M. May, B. Nonhoff, B. Reichel, R. Strehlow, A. Stamatakis, N. Stuckmann, A. Vilbig, M. Lenke, T.

Ludwig, A. Bode and K. H. Schleifer (2004). "ARB: a software environment for sequence data." Nucleic Acids Res **32**(4): 1363-1371.

Stackebrandt, E. (2006). "Taxonomic parameters revisited : tarnished gold standards." Microbiol. Today **33**: 152-155.

Yilmaz, P., L. W. Parfrey, P. Yarza, J. Gerken, E. Pruesse, C. Quast, T. Schweer, J. Peplies, W. Ludwig and F. O.

Glockner (2014). "The SILVA and "All-species Living Tree Project (LTP)" taxonomic frameworks." Nucleic Acids Res **42**(Database issue): D643-648.

I Bijlage: selectie van enterococcen soorten

Ontwikkelen van een enterokokken RT-PCR methode als snel alternatief voor de NEN-EN-ISO 7899-2:2000

Inleiding

Een snelle en accurate controle van het drinkwater op aanwezigheid van fecale indicator organismen helpt de drinkwaterbedrijven een goede volksgezondheid te bewaken. In 2018 is de snelle methode Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) voor detectie van de afwezigheid van *E. coli* RNA door IL&T geaccepteerd. Naast de snelle RT-PCR methode voor detectie van het RNA van *E. coli*, wensen drinkwaterbedrijven ook een snelle methode voor detectie van enterokokken in drinkwater als alternatief voor de NEN-EN-ISO 7899-2:2000 methode. De drinkwaterlaboratoria willen daarom een enterokokken RT-PCR ontwikkelen, gevolgd door een validatietraject met als doel ook voor deze methode wettelijke acceptatie te krijgen.

De WHO richtlijn beschrijft vier enterokokkensoorten waarvan de relatie met fecale bronnen duidelijk en geaccepteerd is: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans* en *E. hirae*. Naast deze soorten kunnen op basis van feces-, literatuur- en MALDI-TOF onderzoek van drinkwater in Nederland en België, zes andere enterokokkensoorten eveneens in verband worden gebracht met fecale origine (bijlage 1). Deze zes soorten (*E. casseliflavus*, *E. mundtii*, *E. gallinarum*, *E. moraviensis*, *E. haemoperoxidus* en *E. avium*) en de vier door WHO beschreven soorten zijn geselecteerd voor de ontwikkeling van de RT-PCR.

De voorgestelde opzet voor het de ontwikkeling en validatie van de methode wordt beschreven in het plan van aanpak (23 oktober verzonden naar RIVM). In deze memo wordt uiteengezet waarom de keuze voor tien enterokokkensoorten als target van de RT-PCR volgens de Nederlandse en Belgische drinkwaterlaboratoria (tabel I.1) de beste keuze is. Het is wenselijk als RIVM deze uiteenzetting wil onderschrijven of verwerpen voordat gestart wordt met praktijkonderzoek.

Tabel I.1. Samenwerkende drinkwaterlaboratoria en de aan hen gelieerde drinkwaterbedrijven

Drinkwaterlaboratorium (DWL)	Locatie	Drinkwaterbedrijf (DWB)
Aqualab Zuid	Werkendam, NL	• Brabant Water • Evides • Watermaatschappij Limburg
De Watergroep	Gent, B	• De Watergroep
Het Waterlaboratorium	Haarlem, NL	• Dunea • Waternet • PWN
Pidpa	Antwerpen, B	• Pidpa
Vitens laboratorium	Leeuwarden, NL	• Vitens N.V. • OASEN
Waterlab Noord	Glimmen, NL	• Water Maatschappij Drenthe • Waterbedrijf Groningen
Water-link	Antwerpen, B	• Water-link

Detectie van enterokokkensoorten met behulp van NEN-EN-ISO 7899-2:2000 en bevestiging met MALDI-TOF

Dankzij de bevestiging van kolonies met behulp van MALDI-TOF, als vervanging voor de klassieke bevestiging volgens de ISO 7899-2:2000 methode, kunnen Nederlandse en Belgische drinkwaterlaboratoria de enterokokkensoorten snel identificeren. Het op naam brengen van bacterie-isolaten geeft een voortschrijdend inzicht in het voorkomen van enterokokkensoorten in drinkwater in de praktijk.

Uit een inventarisatie van het voorkomen van enterokokkensoorten in Nederland en Vlaanderen blijkt dat de keuze voor deze tien soorten een goed uitgangspunt is voor de ontwikkeling van een RT-PCR methode (tabel I.2 en I.3), die in potentie gelijkwaardig is aan de NEN-EN-ISO 7899-2:2000 methode. De meest voorkomende soorten zijn *E. casseliflavus*, *E. faecalis*, *E. mundtii*, *E. faecium*, *E. hirae*, *E. durans*, *E. gallinarum* en *E. moraviensis*.

Tabel I.2. Totaal aantal kve per soort geïsoleerd uit distributienetten van verschillende drinkwaterbedrijven in Nederland en België tussen 2014 en 2017.

	HWL	AQZ	Vitens	De Watergroep	Totaal
<i>E. casseliflavus</i>	15	65	11	45	136
<i>E. faecalis</i>	4	44	19	57	124
<i>E. mundtii</i>	23	36	22		81
<i>E. faecium</i>	5	20		45	70
<i>E. moraviensis</i>	38		8		46
<i>E. hirae</i>	1			21	22
<i>E. durans</i>		1		13	14
<i>E. gallinarum</i>		5		5	10
<i>E. termitis</i>	5				5
<i>E. gilvus</i>	1				1
<i>E. silesiacus</i>	1				1
Totaal	93	171	60	186	510

Tabel I.3. Relatieve (%) verdeling van enterokokkensoorten in DW monsters (data AQZ, HWL, WLN, Vitens, De Watergroep, Pidpa en Water-Link) voor de periode tussen juni 2017 en juli 2018.

Targetorganisme van RT-PCR van tien soorten	Soortnaam	Voorkomen in # monsters	(%)	Gelijktijdig voorkomen van <i>E. coli</i>
x	<i>E. casseliflavus</i>	139	34,1	+
x	<i>E. mundtii</i>	69	16,9	+
x	<i>E. faecium</i>	78	19,1	+
x	<i>E. faecalis</i>	66	16,2	+
x	<i>E. hirae</i>	24	5,9	+
x	<i>E. gallinarum</i>	8	2,0	+
x	<i>E. haemoperoxidus</i>	6	1,5	
x	<i>E. durans</i>	5	1,2	
	<i>E. termitis</i>	4	1,0	
x	<i>E. moraviensis</i>	2	0,5	
	<i>E. malodoratus</i>	2	0,5	
	<i>E. gilvus</i>	2	0,5	
x	<i>E. avium</i>	2	0,5	
	<i>E. vilorum</i>	1	0,2	
		408	100,0	

Op basis van de verzamelde dataset zou minimaal 97,8% van de drinkwatermonsters waarin met kweek enterokokken werden aangetroffen, ook met gebruik van de te ontwikkelen RT-PCR methode gericht op tien enterokokkensoorten positief zijn.

Vanwege de genetische verwantschap tussen enterokokkensoorten is het zeer aannemelijk, dat de RT-PCR methode meer dan tien enterokokkensoorten zal detecteren. Gezien de specificiteit van de RT-PCR niet beperkt wordt tot deze tien soorten, zal een hoger percentage dan 97,8% overeenkomstigheid met de kweekmethode worden aangetroffen. Daarnaast wordt verwacht dat met de RT-PCR methode vaker *E. durans* en *E. avium* worden aangetroffen. Dat zijn de soorten die met de bevestiging volgens de ISO 7899-2:2000 methode mogelijk worden gemist, maar duidelijk geassocieerd zijn met de fecale bronnen (zie Bijlage I.1). Dit zal een verbetering van de detectie van de aanwezigheid van Enterokokken betekenen ten opzichte van de huidige kweekmethode.

Hierbij wordt voorgesteld om een RT-PCR methode te ontwerpen gericht op de tien enterokokkensoorten, waarna deze methode getoetst wordt in een validatiestudie. De hypothese van de validatiestudie is de gelijkwaardigheid van de RT-PCR methode gericht op de beschreven tien enterokokkensoorten aan kweek volgens NEN-EN-ISO 7899-2:2000. We verzoeken het RIVM aan de hand van deze memo aan te geven of zij het gekozen traject kunnen onderschrijven.

Bijlage I.1: Het voorkomen van enterokokkensoorten in de darm van warmbloedige dieren.

Onderzoek waarbij feces van meerdere gastheren werd onderzocht op de samenstelling van enterokokkensoorten laat zien dat sommige soorten enterokokken (zoals *E. moraviensis* en *E. haemoperoxidus*) gastheerspecifiek kunnen zijn en dat de verdeling van de soorten per gastheer kan variëren (Tabel I.4). *E. moraviensis*, *E. haemoperoxidus* en *E. termitis* zijn genetisch zeer verwant en kwamen in dit onderzoek ook in dezelfde gastheer voor (ganzen). Ganzen zijn bekende dragers van mens pathogene organismen (Graczyk et al., 1998; Zhou et al., 2004; Feare et al., 1999; Moriarty et al., 2011). Enterokokkensoorten die wijzen op ganzen origine zijn daardoor in drinkwater onderzoek relevant. Tevens blijkt dat *E. avium* naast *E. faecium* en *E. faecalis* een veel voorkomende enterokok is in menselijke feces (Tabel 4 en (Carvalho et al., 2006; Layton et al., 2010)). Dat maakt dat ook deze soort relevant is voor de detectie van fecale besmetting in drinkwater, ondanks het feit dat deze soort niet vaak in drinkwatermonsters werd gedetecteerd met kweek volgens NEN-EN-ISO 7899-2:2000 gevolgd door bevestiging met MALDI-TOF.

Tabel I.4. Relatieve (%) verdeling van enterokokkensoorten in feces van geselecteerde gastheren met behulp van de SBA+MALDI-TOF (Taucer-Kapteijn et al., 2016).

<i>Enterococcus</i> spp.	red fox	rabbit	sheep	highland cattle	dog	human	goose
<i>E. faecalis</i>	39.6	0.9		35.3	54.2	27.2	29.4
<i>E. faecium</i>	23.7			5.9	11.8	35.1	7.8
<i>E. hirae</i>	25.5		69.0	5.9	18.1	2.3	
<i>E. durans</i>	4.9		2.4		8.3	3.8	
<i>E. casseliflavus</i>	1.0		5.6	52.9	2.1	2.6	5.2
<i>E. gallinarum</i>		98.1	9.5		1.4	2.0	3.9
<i>E. mundtii</i>	2.9		13.5		0.7	5.8	8.7
<i>E. moraviensis</i>	0.3	0.9					23.8
<i>E. haemoperoxidus</i>							11.3
<i>E. avium</i>					2.8	18.7	
<i>E. gilvus</i>	0.3						4.3
<i>E. termitis</i>							3.5
<i>E. saccharolyticus</i>						2.3	
<i>E. silesiacus</i>							2.2
<i>E. aquamarinus</i>	1.0						
<i>E. thailandicus</i>					0.7		
<i>E. malodoratus</i>	0.5						
<i>E. sulfurens</i>	0.3						

II Ontwerp van specifieke primers

Ontwerpnaam	F/R	Testnaam	Specificiteit**	Sequentie (5'-3')	% GC	Smelttemp. (°C)	E coli positie	Energie hairpin Delta G; kcal/mole	Energie dimeren Delta G; kcal/mole	Basepairs
<i>1e generatie: detectie 4 soorten</i>										
F1	F	Ent_F1	hirae, faecium	TCCACCGGAAAAAGAGGAGT	50	63,1	87	-0,8	-9.75	
F2	F	Ent_F2	durans	TCCACCGGAAAAAGAGAGT	45	61,3	87	-0,01	-9.75	
F3	F	Ent_F3	faecalis	CTCAATTGGAAAGAGGAGTGG	47,6	60,4	87	-0,14	-9.27	
R1	R	Ent_R1	hirae, durans, faecium	ATCAGCGACACCCGAAAG	55,6	61,8	201	-1,63	-3.61	
<i>Nieuw ontworpen primers</i>										
F4	F	Ent_F1F	moraviensis, haemoperoxidus	CTCATTTGAAAAGAGGAGTGG	42,9	58,7	88	-0,14	-3.89	
F6	F	Ent_F1F	casseliflavus, gallinarum	TCCACGGAAAGAAAAAGAGT	40	59,5	87	1,34	-3.61	
F7	F	Ent_C2F	mundtii	TCCACCGGGAAAAAGAGGAGT	55	65	87	-0,99	-9.75	
F9	F	Ent_B1F	avium	TCCACGGAAAGAAAAAGAGT	45	61,3	87	-0,86	-4.64	
Group12_F	F	Ent_AB1F	casseliflavus, gallinarum, avium	CTTGCTCCACCGGAAAGAA	50	59,5	82	0,65	-3.61	
Group4b_F	F	Ent_D1F	faecalis	ATTGGAAAGAGGAGTGGC	50	59,1	92	0,98	-3.14	
Group3_F	F	Ent_C1F	hirae, durans, faecium	GCTTCTTTTCCACCGGA	50	59,9	67	-0,01	-9.75	
Group3_F_mundtii	F	Ent_C3F	mundtii	GCTTCTTTTCCACCGGA	55,6	61,9	67	-0,55	-9.75	
R4=Group123R	R	Ent_AB1R	casseliflavus, gallinarum, avium	CCATCAGTGACGCAAAAG	50	58,5	201	-0,23	-3.61	
Group123R=R4	R	Ent_AB1R	casseliflavus, gallinarum, avium	CCATCAGTGACGCAAAAG	50	58,5	201	-0,21	-3.61	
R2	R	Ent_E1R	moraviensis, haemoperoxidus	ATCAGTGACACCCGAAAG	50	58,9	201	1,07	-3.61	
R5	R	Ent_A2R	casseliflavus, gallinarum	CCATCAGTGACGCAAAAGCG	55	63,9	199	-2,37	-6.75	
R6	R	Ent_A3R	casseliflavus, gallinarum	CCATCAGTGACGCAAAAGC	52,6	61,5	200	-0,23	-3.61	
Group4_R	R	Ent_D1R	faecalis	CGCTTCACTCTTATGCT	50	57,7	190	0,9	-3.14	
Group3_R	R	Ent_C1R	hirae, durans, faecium	CCATCGGGTTTCGATTC	50	60,5	183	-1,52	-6.76	
<i>HWL ontwerp</i>										
ENTCm-fw1 (HWL)	F	Ent_BC1F	feadium, durans, hirae, mundtii, casseliflavus, avium, gallinarum	GTGGGTAACCTGCCATC	61,1	61,9	123	-3,3	-8.09	
ENTCm-fw2 (HWL)	F	Ent_DE1F	faecalis, moraviensis, haemoperoxidus	CGTGGTAACCTACCCATC	57,9	61,2	122	-4,5	-10.4	
ENTCm-Rev1 (HWL)	R	Ent_A2R	feadium, durans, hirae, mundtii, avium	AACCAWCGGGTTTCGATTG	47,4	61,1-61,5	183	-2	-6.76	
ENTCm-Rev2 (HWL)	R	Ent_A4R	casseliflavus, gallinarum	TTCTTCATGCGGAAAATAGT	40,9	61,1	183	-1,8	-6.59	
ENTCm-Rev3 (HWL)	R	Ent_E2R	moraviensis, haemoperoxidus	CCATCGGGTGTGCATATT	50	61,5	179	-1,5	-9.45	
ENTCm-Rev4 (HWL)	R	Ent_D2R	faecalis	GCCATCGGGCAATAACTG	55,6	61,5	183	-2,6	-6.57	

Isolatie van RNA:

Isolatie van RNA wordt uitgevoerd zoals eerder beschreven in het RT-PCR protocol voor detectie van *E. coli* (Heijnen 2017).

Sequenties van primers en probe:

PCR name	F/R	Primers		Enterococcus									
		Primer name	Sequentie	caselliflavus	gallinarum	avium	durans	faecium	hirae	mundtii	faecalis	haemoperoxidus	moraviensis
Ent_A1	F	Ent_BC1F	5'-GTGGGTAACCTGCCATC-3'										
	R	Ent_A4R	5'-TTCTTCCATGCGGAAAATAGTG-3'										
Ent_BC1	F	Ent_BC1F	5'-GTGGGTAACCTGCCATC-3'										
	R	Ent_C2R	5'-AACCAWCGGTTTCGATTG-3'										
Ent_F3	F	Ent_F3F	5'-CTCAATTGGAAAGAGGAGTGG-3'										
	R	Ent_F3R	5'-ATCAGCGACACCCGAAAG-3'										
Ent_E2	F	Ent_DE1F	5'-CGTGGGTAACCTACCCATC-3'										
	R	Ent_E2R	5'-CCATGCGGTGTCGACTATTA-3'										
		Ent_P1 (Probe)	5'-CTTGGAACAGGTGCTAATACC G-3'										

Samenstelling reactiemengsels:

Reactie 1	
µl per reactie	
4	5x Evoscript RNA probes Master*
9,4	PCR grade H2O
0,4	Ent_BC1F (10 µM)
0,4	Ent_A4R (10 µM)
0,4	Ent_C2R (10 µM)
0,4	Ent_P1 (Probe) (10 µM)
15	Reactie Mix
5	Sample RNA
* Roche Life Sciences	

Reactie 2	
µl per reactie	
4	5x Evoscript RNA probes Master*
9,8	PCR grade H2O
0,4	Ent_F3 (10 µM)
0,4	Ent_R1 (10 µM)
0,4	Ent_P1 (Probe) (10 µM)
15	Reactie Mix
5	Sample RNA
* Roche Life Sciences	

Reactie 3	
µl per reactie	
4	5x Evoscript RNA probes Master*
9,8	PCR grade H2O
0,4	Ent_DE1F (10 µM)
0,4	Ent_E2R (10 µM)
0,4	Ent_P1 (Probe) (10 µM)
15	Reactie Mix
5	Sample RNA
* Roche Life Sciences	

Reactie omstandigheden:

15 minuten	60°C	
10 minuten	95°C	
15 seconden	95°C	} 40 cycli
30 seconden	58°C	
30 seconden	40°C	

