

Onderzoek naar alternatieve monstername voor moleculaire diagnostiek - Vermoldia



Onderzoek naar alternatieve monstername voor moleculaire diagnostiek - Vermoldia

Auteur(s)

Anniek de Jong

Julia Dorigo

Jan Warmink (Sylphium)

Eelco Wallaart (Sylphium)

Adrie Atsma (Vitens)

Miriam Dijkstra (Vitens)

Sharda van Willigen (Vitens)

Anneke Roosma (Vitens)

Opdrachtgever	Vitens Locatie Leeuwarden
Contactpersoon	Adrie Atsma
Trefwoorden	Sylphium, DFC, PCR, <i>E. coli</i> , <i>Legionella</i> , Enterococcen, monstername

Documentgegevens

Versie	1.0
Datum	06-02-2024
Projectnummer	11208261-002
Document ID	11208261-002-BGS-0002
Pagina's	38
Classificatie	
Status	definitief

Auteur(s)

	Anniek de Jong	Deltares
	Julia Dorigo	Deltares
	Jan Warmink	Sylphium
	Eelco Wallaart	Sylphium
	Adrie Atsma	Vitens
	Miriam Dijkstra	Vitens
	Anneke Roosma	Vitens
	Sharda van Willigen	Vitens

Samenvatting

Dit onderzoek richt zich op een nieuwe methode voor het conserveren van drinkwatermonsters voor moleculaire diagnostiek. Het vermoeden is dat het RNA/DNA in watermonsters na bemonstering niet voldoende geconserveerd is, wat kan leiden tot een lagere detectie van bacterieel RNA/DNA bij gebruik van bepaalde diagnostische methoden. Bij de huidige methodes worden watermonsters van de tap in steriele flessen met conserveringsmiddel genomen waarna deze flessen bij 5°C naar het laboratorium verstuurd en bewaard worden en over het algemeen binnen 24 uur na monstername worden verwerkt. De Dual Filter Capsule (DFC) methode van Sylphium biedt een alternatieve methode voor monstername. De DFC methode bestaat uit een filter capsule voor monstername, conservering na bemonstering, en een isolatie kit. De filtratie wordt tijdens de monstername uitgevoerd en het RNA/DNA wordt direct geconserveerd in de capsule. Ook kunnen deze filter capsule bij kamertemperatuur worden bewaard en vervoerd. De DFC methode heeft potentie, maar is nog niet toegepast voor bacteriologische RT-(q)PCR, qPCR of next generation sequencing (NGS) onderzoek in drinkwater gerelateerde matrices. In dit project is een vergelijkingsonderzoek uitgevoerd in het laboratorium of de DFC methode een geschiktere methode is voor RNA/DNA onderzoek in drinkwatermonsters dan de huidige detectie methodes (flessenbemonstering, filtratie in het laboratorium, en DNA isolatie met kit).

De DFC methode is getest voor detectie van *Legionella pneumophila*, waarbij de resultaten zijn vergeleken met de huidige detectie methode. De testen zijn uitgevoerd met kraanwatermonsters die zijn gemengd met oppervlaktewater en/of gecultiveerde cellen in verschillende concentraties. De DFC methode is effectief in het isoleren van DNA. Bij hoge concentraties *L. pneumophila* worden met de DFC methode ook hogere concentraties van de specifieke genen aangetoond dan met de huidige methode. Voor de lage concentraties zijn de resultaten van beide methodes vergelijkbaar.

Voor conservering van RNA is de DFC methode getest voor detectie van *E. coli* en Enterococci. Ook hier zijn verschillende testen uitgevoerd met kraanwatermonsters die zijn gemengd met oppervlaktewater, ijzer en mangaan houdend grondwater, en/of gecultiveerde cellen in verschillende concentraties. De isolatie van RNA met de DFC methode is nog niet optimaal. De Cq waarden van *E. coli*, Enterococci en de interne controle zijn hoger (wat lagere aantallen gen kopieën betekent) en fluctueren minder per watermonster dan wordt waargenomen bij de huidige detectie methode. De RNA isolatie werkt beter voor gram-negatieve bacteriën dan voor gram-positieve bacteriën. Er wordt verwacht dat optimalisatie voornamelijk zit in het gebruiken van het eiwit lysozym (naast de chemische lysis) voor betere degradatie van de celwanden. Het is opvallend dat voor de RNA isolatie minder remming lijkt op te treden met de DFC methode in oppervlaktewater- en grondwatermonster in vergelijking met de huidige methode, naar alle waarschijnlijkheid komt dit door de isolatie kit van de DFC methode.

De DFC methode heeft potentie om gebruikt te worden voor betere conservering van monsters, op basis van dit onderzoek, op dit moment alleen voor DNA analyses. In volgend onderzoek wordt aanbevolen om de mogelijk verminderde remming tijdens PCR verder te valideren met complexe water matrixen en organismen (voor DNA onderzoek), en om tijdsafhankelijkheid van het bewaren van de filter capsule mee te nemen. Ook kan er worden onderzocht of het opwerken van het volledige monster bij de DFC methode resulteert in lagere detectiegrenzen (momenteel wordt slechts 40-57% van het monstermateriaal gebruikt). Dit kan mogelijk ook worden behaald door een andere DNA isolatie kit te gebruiken dan de kit die wordt meegeleverd met de DFC methode. Verder kan worden onderzocht of het gebruik van het eiwit lysosym (naast de chemische lysis) in de RNA/DNA isolatie kit van Sylphium een beter celwanden kapot kan maken en zo hogere RNA concentraties genereert. Tot slot, kan onderzocht worden of de filter capsule gebruikt kan worden in de voorweek voor Vitens.

Inhoud

	Samenvatting	4
1	Inleiding	8
1.1	Aanleiding	8
1.2	Doel	9
1.3	Plan van aanpak	9
2	Materiaal & Methode	10
2.1	Prevalidatie <i>Legionella</i>	10
2.1.1	Bemonstering	10
2.1.2	Filtratie en DNA isolatie door Vitens	10
2.1.3	Filtratie en DNA isolatie door Deltares	11
2.1.4	Filtratie en DNA isolatie door Sylphium	11
2.1.5	qPCR	11
2.2	Prevalidatie <i>E. coli/Enterococcon</i>	11
2.2.1	Bemonstering testen	11
2.2.2	Bemonstering ringstudie 1: <i>E. coli</i>	12
2.2.3	Bemonstering ringstudie 2: <i>E. coli</i> en Enterococcon	13
2.2.4	Bemonstering ringstudie 3: <i>E. coli</i> en Enterococcon	14
2.2.5	Huidige methode uitgevoerd door Vitens (filtratie en rRNA isolatie)	15
2.2.6	Huidige methode uitgevoerd door Deltares (filtratie en rRNA isolatie)	16
2.2.7	DFC methode uitgevoerd door Sylphium	16
2.2.8	DFC methode uitgevoerd door Vitens en Deltares	17
3	Resultaten & Discussie	18
3.1	Prevalidatie <i>Legionella</i>	18
3.2	Prevalidatie <i>E. coli/Enterococcon</i>	19
3.2.1	Eerste test ronde	19
3.2.2	Tweede test ronde	19
3.2.3	Ringstudie 1: <i>E. coli</i>	20
3.2.4	Ringstudie 2: <i>E. coli</i> en Enterococcon	21
3.2.5	Ringstudie 3: <i>E. coli</i> en Enterococcon	24
4	Conclusie	27
5	Aanbevelingen	28
6	Referenties	30

A	Bijlage	31
A.1	Protocol voor bemonstering met de eDNA sampling set van Sylphium	31
A.2	Protocol voor de DNA isolatie van Legionella	32
A.3	Protocol voor de rRNA isolatie van E. coli huidige methode	33
A.4	Protocol voor RNA/DNA isolatie van water met de eDNA dual filter capsules van Sylphium	37

1 Inleiding

1.1 Aanleiding

Dit onderzoek is ontstaan naar aanleiding van discussies met betrekking tot conservering van drinkwatermonsters die speciaal bedoeld zijn voor moleculaire diagnostiek. Op dit moment worden drinkwatermonster genomen bij tappunten waarbij het water wordt verzameld in steriele flessen met conserveringsmiddel. Deze flessen worden vervolgens bij 5°C vervoerd en tijdelijk bij deze temperatuur opgeslagen (< 24 uur). Experts vermoeden dat het DNA en RNA gedurende deze bewaarperiode onvoldoende wordt geconserveerd, met als gevolg dat er minder of geen bacteriologisch RNA/DNA kan worden gedetecteerd met de Reverse Transcriptase Polymerase kettingreactie (RT-PCR) of kwantitatieve PCR (qPCR), terwijl deze (allicht) van origine er wel in heeft gezeten. Een verbetering in de RT-qPCR methode voor *E. coli* en Enterococcen (16S rRNA gen) en de qPCR voor *Legionella pneumophila* qua monstername en conservering is wenselijk.

Er bestaat een alternatieve monstername methode voor moleculaire diagnostiek door middel van een Dual Filter Capsule (DFC) methode. De DFC methode is door de firma Sylphium ontwikkeld en is bedoeld voor monstername ten behoeve van eDNA gerelateerde methodes. Het principe van de DFC methode is dat de filtratie gedurende de monstername van het water wordt uitgevoerd, waarna het RNA/DNA direct wordt geconserveerd en er dus geen afbraak van RNA/DNA plaats zou kunnen vinden (zie Figuur 1.1). Tevens vindt de lysis van de bacteriën hierin plaats, waardoor het RNA en DNA in de oplossing vrijkomen. Deze filter capsules kunnen na monstername, lysis en conservering bij kamertemperatuur worden bewaard en vervoerd. Sylphium claimt dat deze conservering beter is voor de kwaliteit van het RNA/DNA. Het RNA of DNA wordt vervolgens geïsoleerd met de RNA/DNA isolatie kit van Sylphium; deze combinatie van de filter capsule en de isolatie kit heet de DFC methode. De DFC methode lijkt potentie te hebben voor bacteriologische RT-(q)PCR, qPCR of Next Generation Sequencing (NGS) onderzoek in drinkwater gerelateerde matrices.



Figuur 1.1. De Dual Filter Capsule van Sylphium. Het water loopt met de richting van de pijl over het filter.

In een Proof of Concept (POC) die in november 2021 door Vitens, Deltares en Sylphium voor eDNA onderzoek is uitgevoerd lijkt bovenstaande hypothese bevestigd te worden [1]. In deze POC is de DFC methode getest en vergeleken met de huidige flesbemonstering, waaruit blijkt dat bij gebruik van de DFC methode significant meer waterpissebedden DNA wordt gedetecteerd (30% tot 50% meer genkopieën) in vergelijking met de huidige wijze van bemonsteren bij Vitens. Of dit ook voor drinkwaterbemonsteringen in combinatie met bacteriologie geldt wordt in dit onderzoek nader onderzocht. Zeker de mate waarin de lysis van gram-positieve bacteriën zoals Enterococcen plaatsvindt, is een onderdeel dat met de DFC methode nog onbekend is. Naast een verhoogde opbrengst en een betere conservering is de motivatie ook om een betere en gebruiksvriendelijker wijze van bemonstering voor moleculaire diagnostiek te verkrijgen. Voor het laboratorium van het Waterexpertisecentrum

(WEC) van Vitens is het voorbehandelen van DNA-onderzoek relatief veel werk; filtratieopstellingen RNA/DNA vrij maken, filtreren van het watermonster en de lysis van het filter. Door het gebruik van DFC methodes hoeven naar verwachting deze handelingen niet meer in het laboratorium te worden uitgevoerd, wat een tijdsbesparing oplevert van circa 1 uur per 10 monsters. Voor de monstername leidt het gebruik van DFC methode tot een extra handeling, namelijk de filtratie en conservering in het veld. Daarom wordt in dit onderzoek ook gekeken hoe de monstername van watermonsters met de DFC methode zo simpel mogelijk kan worden uitgevoerd. Een simpelere methode geeft ook lager risico op het maken van fouten. De DFCs zijn een stuk kleiner dan de huidige gebruikte monstername flessen en kunnen op kamertemperatuur worden bewaard gedurende weken, zonder aantoonbare afbraak van DNA, waardoor de monsters gemakkelijker te vervoeren en langer te bewaren zijn.

Deze methode is een innovatie op het gebied van monstername. Als de DFC methode daadwerkelijk 'beter' presteert dan de huidige flesbemonstering voor moleculaire testen, dan kan deze methode ook breder worden ingezet, ook buiten Vitens N.V. en in potentie ook gestandaardiseerd worden, zodat er consensus wordt bereikt over hoe drinkwatermonsters voor DNA/RNA-onderzoek moeten worden geconserveerd.

1.2 Doel

Het doel van dit onderzoek is om een indruk te krijgen over de werking en prestaties van de DFC methode ten opzichte van de huidige (Vitens) monstername (met steriele flessen met conserveringsmiddel) voor moleculair onderzoek.

Dit project bestaat uit de volgende subdoelen:

1. Prevalidatie van de DFC methode in vergelijking met de huidige bemonsteringsmethode voor detectie van *Legionella pneumophila*, *E. coli*, en Enterococci aan de hand van bemonsteringsrondes.
2. Prevalidatie van de detectielimieten bij bemonstering met de DFC methode in vergelijking met de huidige bemonsteringsmethode voor dezelfde bacteriën.

1.3 Plan van aanpak

Deltares (als onafhankelijke partij) gaat in samenwerking met Vitens en Sylphium de DFC methode (pre)valideren waarbij een vergelijkingsstudie wordt uitgevoerd. Hierbij worden de resultaten van de bemonstering en behandeling met de DFC methode vergeleken met de huidige wijze van bemonstering en RNA/DNA opwerking ten behoeve van moleculair onderzoek. Voor *Legionella* is er één prevalidatie uitgevoerd en voor *E. coli*/Enterokokken zijn er twee test rondes uitgevoerd en drie ringstudies.

In deze studie wordt ook gelet op de gevoeligheid van de DFC methode; dus kan met de DFC methode bijvoorbeeld 1 KVE doelorganisme/100 ml met PCR worden gedetecteerd. Na de prevalidatie volgt een rapportage met een evaluatiemoment om te besluiten of in een volgend project een uitgebreidere validatiestudie benodigd is en of de prevalidatie gegevens kunnen worden gepubliceerd.

2 Materiaal & Methode

2.1 Prevalidatie *Legionella*

2.1.1 Bemonstering

Op dinsdag 21-06-2022 zijn 10 watermonsters door Vitens voorbereid met verschillende concentraties *Legionella pneumophila* (Tabel 2.1). Deze monsters werden dezelfde dag door Vitens geanalyseerd, werden koel getransporteerd naar Deltares voor analyse. Ook werden de monsters gefiltreerd met de DFC filter capsules (Bijlage A.1). De DFC filter capsules zijn naar Sylphium getransporteerd voor DNA isolatie.

Tabel 2.1. Concentratie van *Legionella pneumophila* in de voorbereide watermonsters.

	Monster	Volume (mL)	
1	1L kraanwater ± 20 KVE/100 mL <i>L. pneumophila</i>	100	
2	1L kraanwater ± 20 KVE/100 mL <i>L. pneumophila</i>	100	
3	Oppervlaktewater A 10 mL + 1L kraanwater	100	Snekertrekvaart tegenover Vitens
4	Positief monsters A 500 mL + 1L kraanwater	100	<i>L. pneumophila</i> positief monster uit routine
5	Positief monsters B 50 mL + 950 mL kraanwater	100	<i>L. pneumophila</i> positief monster uit routine
6	1L kraanwater	100	
7	1L kraanwater	100	
8	± 100 KVE/100 mL <i>L. pneumophila</i>	100	
9	> 200 KVE/100 mL <i>L. pneumophila</i>	100	
10	Blanco	100	

2.1.2 Filtratie en DNA isolatie door Vitens

Voor de filtratie van het watermonster is een steriele filtratieopstelling gebruikt die is behandeld met een chlooroplossing, om eventuele restjes *Legionella*-DNA en -RNA te verwijderen. Vervolgens is er 100 mL monstervloeistof gefiltreerd over een 0,22 µm polycarbonaat filter (Millipore). De filters zijn bewaard bij -80°C tot de DNA isolatie plaatsvond. De DNA isolatie is uitgevoerd met de DNeasy PowerBiofilm Kit (Qiagen) volgens de instructies van de fabrikant met een aantal aanpassingen (Bijlage A.2 optie Vitens). Als startmateriaal is het filter gebruikt, direct na filtratie. Het gezuiverde DNA is in 100 µL elutiebuffer opgevangen.

Na de DNA isolatie werd het DNA nog verder opgezuiverd door een Sephadex kolom extractie toe te passen. Hiervoor werd de alcoholfase van de Sephadex kolom verwijderd door 1 min bij 4500 rpm te centrifugeren. De alcohol werd opgevangen in een schoon 1,5 mL cupje. De Sephadex kolom werd vervolgens in een schoon 1,5 mL cupje geplaatst en de elutiebuffer met het DNA werd op de Sephadex kolom gepipetteerd. Daarna werd de kolom gecentrifugeerd bij 4500 rpm voor 1 min. De kolom werd verwijderd en het gezuiverde DNA werd opgevangen in een nieuw 1,5 mL cupje.

2.1.3 Filtratie en DNA isolatie door Deltares

De watermonsters zijn op woensdag 22-06-2022 gekoeld naar Deltares gebracht (< 24 uur). Hier zijn de watermonsters gefiltreerd (100 mL over 0,22 µm cellulose ester filter; S-Pak Millipore). Het filter werd opgeslagen bij -80°C. Het DNA is geïsoleerd aan de hand van de DNeasy PowerBiofilm Kit (Qiagen). Als startmateriaal is het bevroren filter gebruikt (half filter) die met een steriele tandenstoker is verpulverd en aan de PowerBiofilm Bead Tube is toegevoegd. Vervolgens is het protocol gevolgd (Bijlage A.2 optie Deltares) en is het DNA geëluëerd in 100 µL elutiebuffer. Vervolgens is het DNA gezuiverd met een Sephadexkolom (zie protocol in sectie 2.1.2).

2.1.4 Filtratie en DNA isolatie door Sylphium

De filter capsules zijn opgestuurd (op kamertemperatuur) naar Sylphium waar de DNA isolatie is uitgevoerd volgens protocol van de DFC methode (Bijlage A.4). De DNA extracten (50 µL) zijn opgestuurd naar Deltares voor verdere analyse op de qPCR. In totaal is er uiteindelijk 40% van het totale watermonster opgewerkt, dus in theorie is dat 40 mL van de 100 mL (het protocol gebruikt niet alle monstervloeistof).

2.1.5 qPCR

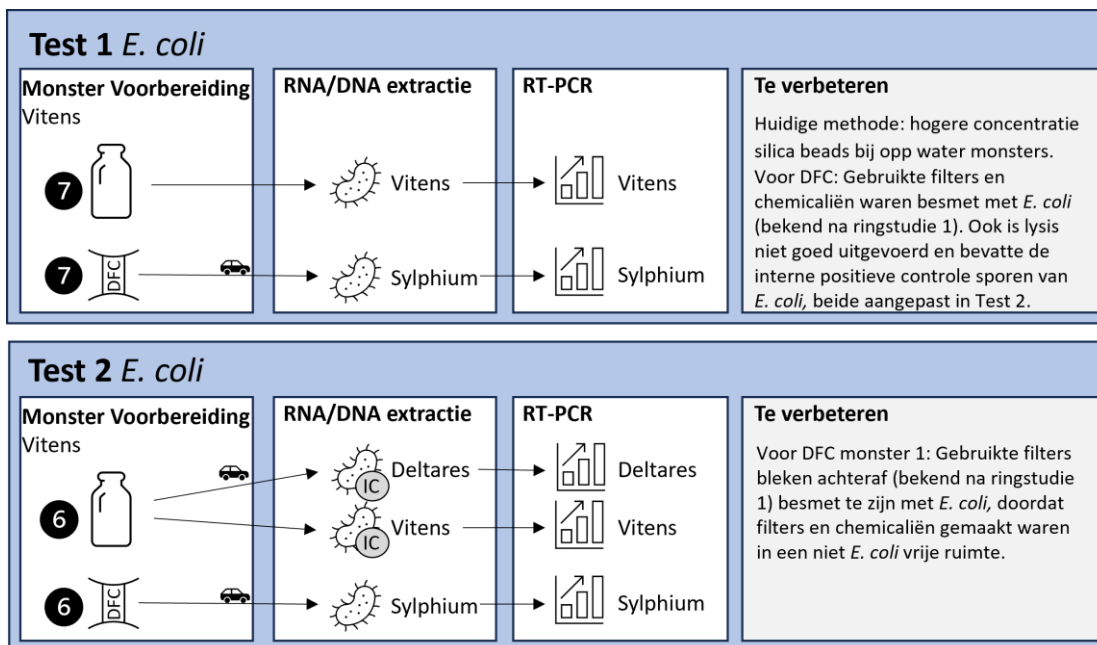
De qPCR van Vitens en Deltares is uitgevoerd op een C1000 Touch thermal cycler uitgerust met een CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories B.V.). Er is gebruik gemaakt van 96-well optical platen. Elke reactie bestond uit 10 µL DNA met 40 µL PCR mix (per reactie bestaande uit 15 µL PCR water, 25 µL Power mix (Biorad) 1 µL Primer/probe werkoplossing Lpneu/IC (sequenties zijn beschikbaar via NEN-6254) en 1 µL BSA). Voor de negatieve controle werd het DNA vervangen door DNA-vrij MiliQ, en voor de correctie van IC werd het DNA vervangen door DNA afkomstig van de IC welke is gebruikt bij het spiken van het monster tijdens de DNA isolatie. Kalibratielij werd opgezet in een viervoudige seriële verdunning. Per monsters werd de qPCR uitgevoerd met onverdund DNA. Voor de DNA monsters van Vitens zijn de qPCR's uitgevoerd door Vitens, de DNA monsters van Deltares en Sylphium zijn geanalyseerd door Deltares waarvoor de reagentia is aangeleverd door Vitens.

Het thermische programma voor detectie van *L. pneumophila* en interne controle bestond uit: initiële denaturatie stap op 95°C voor 3 min, denaturatie voor 10 sec. op 95°C, gevolgd door annealing stap op 58°C voor 60 sec. en een elongatie stap op 72°C voor 20 sec. In totaal werden er 42 cycli gedraaid met een meting op de fluoroforen Cy5 en HEX.

2.2 Prevalidatie *E. coli*/Enterococci

2.2.1 Bemonstering testen

Voordat de officiële ringstudie begon zijn er twee testen uitgevoerd om te bepalen of het protocol bij Deltares en Sylphium werkte. De eerste test is uitgevoerd op 02-02-2023 door Vitens en Sylphium en de tweede test op 28-02-2023 door Vitens, Sylphium en Deltares (Tabel 2.2 en 2.3). Voor beide testen bereidde Vitens de dag voor de experimenten de watermonsters voor met verschillende concentraties van *E. coli*. Ook werd door Vitens de filtratie uitgevoerd met de DFC filter capsule (Bijlage A.1). De watermonsters en de DFC filter capsules zijn gekoeld getransporteerd naar Deltares en Sylphium respectievelijk (< 24 uur zijn monsters verwerkt). Daarnaast is voor de 2^e test een interne controle (IC) toegevoegd bij de filtratie door Vitens en Deltares. Deze IC is gemaakt van *Thermus aquaticus* (in het vervolg TAQ IC genoemd). In tabel 2.2 en 2.3 zijn de gebruikte monsters en ingezette volumes weergegeven. Als controle zijn deze monsters ook door Vitens op kweek ingezet, zoals beschreven in standaard protocol voor detectie van *E. coli* (conform NEN 6261 (1990)). Een overzicht van de verschillende stappen en locaties is weergegeven in Figuur 2.1.



Figuur 2.1. Schematisch overzicht van de verschillende stappen en de locaties waar die zijn uitgevoerd voor de twee test rondes van *E. coli*. Het icoon van de auto geeft transport weer.

Tabel 2.2. Test 1: Concentratie van *E. coli* in de voorbereide watermonsters. Spike laag is 7 KVE/100 mL *E. coli*, spike middel is 14 KVE/100 mL *E. coli* en spike hoog is 28 KVE/100 mL *E. coli*

	Monster	Volume (mL)
1	Kraanwater	100
2	Kraanwater met spike laag	100
3	Kraanwater met spike middel	100
4	Kraanwater met spike hoog	100
5	Kraanwater met oppervlaktewater en spike middel	100
6	Kraanwater met oppervlaktewater	100
7	Blanco	100

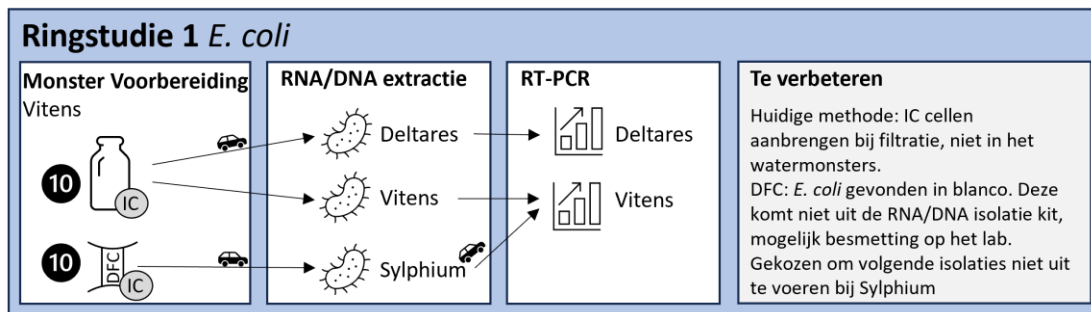
Tabel 2.3. Test 2: Concentratie van *E. coli* in de voorbereide watermonsters. Spike middel is 6 KVE/100 mL *E. coli* en spike hoog is 16 KVE/100 mL *E. coli*.

	Monster	Volume (mL)
1	Kraanwater	100
2	Kraanwater met spike middel	100
3	Kraanwater met spike hoog	100
4	Kraanwater met oppervlaktewater	100
5	Kraanwater met oppervlaktewater en spike middel	100
6	Blanco	100

2.2.2 Bemonstering ringstudie 1: *E. coli*

De ringstudie is uitgevoerd op 02-05-2023 waarbij de dag van te voren 10 watermonsters zijn voorbereid door Vitens met een verschillende concentratie van *E. coli* (Tabel 2.4). Bij deze ringstudie is de TAQ IC al toegevoegd aan het watermonsters (dusdanig dat er uiteindelijk een Cq waarde van 28-30 tijdens de (RT)-PCR wordt verkregen). Als controle zijn deze monsters ook door Vitens op kweek ingezet, conform Vitens voorschrift (NEN 6261 (1990)).

Deze ringstudie werd uitgevoerd door Vitens (huidige methode en de DFC methode), Sylphium (DFC methode) en door Deltares (huidige methode). Vitens heeft op de dag waarop de watermonsters zijn bereid deze direct gefiltreerd met de DFC filter capsules en geconserveerd (Bijlage A.1). De filter capsules zijn op kamertemperatuur naar Sylphium verstuurd en na ontvangst direct verwerkt. De watermonsters werden middels gekoeld transport naar Deltares gebracht en binnen < 24 uur geanalyseerd. Een overzicht van de verschillende stappen en locaties is weergegeven in Figuur 2.2.



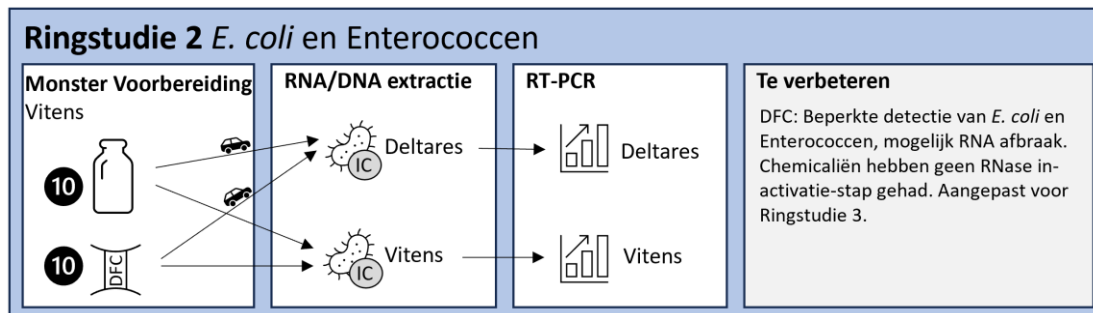
Figuur 2.2. Schematisch overzicht van de verschillende stappen en de locaties waar die zijn uitgevoerd voor de 1^e ringstudie van *E. coli*. Het icoon van de auto geeft transport weer.

Tabel 2.4. Concentratie van *E. coli* in de watermonsters van de 1^e ringstudie. Spike laag is 3 KVE/100 mL, spike middel is 7 KVE/100 mL, en spike hoog is 10 KVE/100 mL *E. coli*.

	Monster	Volume (mL)
1	Blanco	100
2	Kraanwater met spike middel	100
3	Kraanwater met spike hoog	100
4	Kraanwater	100
5	Kraanwater met 20 mL oppervlaktewater Burgum	100
6	Kraanwater met 20 mL oppervlaktewater Snekerkvaart	100
7	Kraanwater met 5 mL oppervlaktewater Burgum en 5 mL oppervlaktewater Snekerkvaart met spike middel	100
8	Kraanwater met 20 mL grondwater en spike middel	100
9	Kraanwater met spike laag	100
10	Kraanwater met spike laag	100

2.2.3 Bemonstering ringstudie 2: *E. coli* en Enterococci

Na de ringstudie met alleen *E. coli* is gekozen om een ringstudie uit te voeren waarin zowel *E. coli* zit als *Enterococci faecalis*. De gebruikte primers van de qPCR detecteren vier soorten Enterococci: *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. durans*, en *E. hirea*. Deze ringstudie vond plaats op 14-06-2023 waarbij de watermonsters de dag van te voren waren voorbereid door Vitens (Tabel 2.5). Dit keer was de TAQ IC niet toegevoegd aan de watermonsters, maar werd deze bij de filtratie toegevoegd (dusdanig dat er uiteindelijk een Cq waarde van 28-30 tijdens de (RT)-PCR werd verkregen). Deze ringstudie werd uitgevoerd door Vitens (huidige methode en de DFC methode) en door Deltares (huidige methode en DFC methode). Vitens heeft op de dag waarop de watermonsters zijn bereid deze direct gefiltreerd met de DFC filter capsules en geconserveerd (Bijlage A.1). De watermonsters en de DFC filter capsules werden middels koel transport naar Deltares gebracht en zijn binnen < 24 uur nadat de watermonsters waren gemaakt geanalyseerd. Een overzicht van de verschillende stappen en locaties is weergegeven in Figuur 2.3.



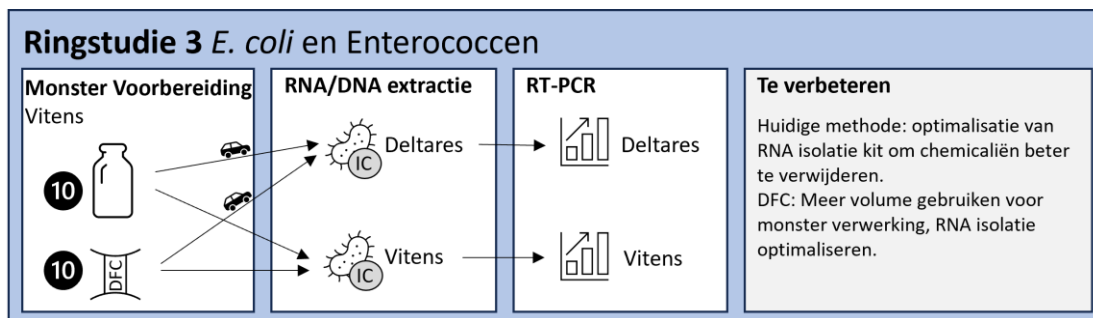
Figuur 2.3. Schematisch overzicht van de verschillende stappen en de locaties waar die zijn uitgevoerd voor de 2^e ringstudie van *E. coli* en Enterococcen. Het icoon van de auto geeft transport weer.

Tabel 2.5. Concentratie van *E. coli*/Enterococcen in de watermonsters van de 2^e ringstudie. Spike laag is 3 KVE/100 mL, spike middel is 7 KVE/100 mL, en spike hoog is 10 KVE/100 mL *E. coli*.

	Monster	Volume (mL)
1	Blanco	100
2	Kraanwater met 50 mL grondwater en spike middel	100
3	Kraanwater met spike hoog	100
4	Kraanwater met 20 mL oppervlaktewater Burgum	100
5	Kraanwater	100
6	Kraanwater met spike laag	100
7	Kraanwater met 5 mL oppervlaktewater Burgum en 5 mL oppervlaktewater Snekertravaart en spike middel	100
8	Kraanwater met spike middel	100
9	Kraanwater met spike laag	100
10	Kraanwater met 20 mL oppervlaktewater Snekertravaart	100

2.2.4 Bemonstering ringstudie 3: *E. coli* en Enterococcen

Deze studie is uitgevoerd op 22-11-2023, waarbij de watermonsters de dag van tevoren zijn voorbereid door Vitens (Tabel 2.6). De TAQ IC werd bij de filtratie toegevoegd (dusdanig dat er uiteindelijk een C_q waarde van 30-31 tijdens de (RT)-PCR werd verkregen). Deze ringstudie werd uitgevoerd door Vitens (huidige methode en de DFC methode) en door Deltares (huidige methode en DFC methode). Vitens heeft op de dag waarop de watermonsters zijn bereid deze direct gefiltreerd met de DFC filter capsules en geconserveerd (Bijlage A.1). De watermonsters en de DFC filter capsules werden middels koel transport naar Deltares gebracht en zijn binnen < 24 uur nadat de watermonsters waren gemaakt geanalyseerd. Een overzicht van de verschillende stappen en locaties is weergegeven in Figuur 2.4.



Figuur 2.4. Schematisch overzicht van de verschillende stappen en de locaties waar die zijn uitgevoerd voor de 3^e ringstudie van *E. coli* en Enterococcen. Het icoon van de auto geeft transport weer.

Tabel 2.6. Concentratie van *E. coli*/Enterococcen in de watermonsters van de 3^e ringstudie. Spike laag is 3 KVE/100 mL, spike middel is 7 KVE/100 mL, en spike hoog is 10 KVE/100 mL *E. coli*.

	Monster	Volume (mL)
1	Kraanwater met 5 mL oppervlaktewater Burgum en 5 mL oppervlaktewater Snekerrekvaart en spike middel	100
2	Kraanwater met 50 mL grondwater en spike middel	100
3	Kraanwater met spike laag	100
4	Kraanwater met 20 mL oppervlaktewater Burgum	100
5	Kraanwater	100
6	Blanco, PCR water	100
7	Kraanwater met spike laag	100
8	Kraanwater met 20 mL oppervlaktewater Snekerrekvaart	100
9	Kraanwater met spike middel	100
10	Kraanwater met spike hoog	100

2.2.5 Huidige methode uitgevoerd door Vitens (filtratie en rRNA isolatie)

Voor de filtratie en RNA isolatie van *E. coli* heeft Vitens een protocol gemaakt, deze staat beschreven in Bijlage A.3. Dit protocol is uitgevoerd voor zowel de twee testen als de ringstudies. De optionele opties uit het protocol zijn uitgevoerd voor:

- Test 2: aan monster 4 en 5 is een hogere concentratie silica beads toegevoegd.
- Ringstudie 1: monster 8 is herhaalt na toevoeging van ammonium oxalaat.

De RT-PCR is in de testen uitgevoerd in enkelvoud en voor de ringstudies in duplo. Voor de 3^e ringstudie werd ook een ijklijn in duplo meegenomen voor *E. coli* en IC.

Voor ringstudie 1 en 3 zijn ook eerstelijns controles (ELC) van *E. coli* en Enterococcen meegenomen. Hiervoor zijn de respectievelijke cryovials 30 minuten bij kamertemperatuur ontdooid. Vervolgens is elke stam gepipeteerd in 50-100 ml DNase/RNase vrij water en filtreer door een 0,4 µM polycarbonaat filter.

2.2.6 Huidige methode uitgevoerd door Deltares (filtratie en rRNA isolatie)

De tweede test en de ringstudies werden uitgevoerd door Deltares. Er waren een aantal aanpassingen in het protocol uit Bijlage A.3:

- Bij het onderdeel 'Filtratie en lysis' zijn in plaats van 13 mL buizen, 5 ml steriele epjes gebruikt voor de tweede test en ringstudie 1. Bij ringstudie 2 zijn 15 mL buizen gebruikt.
- Ook is bij 'Filtratie en lysis' een 37°C en 80°C blockheater vervangen door een broedstovf en waterbad respectievelijk op desbetreffende temperatuur.
- De 'RNA isolatie – washing' is uitgevoerd zonder een Kingfisher isolatie, het gebruikte protocol staat ook in Bijlage A.2 waarbij aangegeven is dat dat onderdeel alleen door Deltares is uitgevoerd.
- Voor de tweede test had Deltares niet de beschikking over een Thermomixer, daarom is er een stovf gebruikt van 60°C met 240 rpm. Bij de ringstudies was deze wel beschikbaar.

Ook zijn voor een aantal monsters de optionele opties uit het protocol uitgevoerd:

- Ringstudie 1: aan monster 2 zijn meer silica beads toegevoegd omdat er klontering ontstond (zie stap 7 RNA isolatie – lysis, Bijlage A.3)
- Ringstudie 2: monster 2 is herhaalt na toevoeging van ammonium oxalaat (zie Bijlage A.3).
- Bij Ringstudie 1 en 2 is de RT-PCR in duplo uitgevoerd voor de monsters en in enkelvoud voor de IC. Bij ringstudie 3 zijn ze beide in duplo uitgevoerd waarbij ook een ijklijn in duplo is meegenomen voor *E. coli* en IC.

2.2.7 DFC methode uitgevoerd door Sylphium

Het proces van rRNA isolatie is volledig gelijk aan dat van DNA isolatie zoals beschreven in Bijlage 4.A.

Bij de eerste en tweede test rondes en voor de 1^e ringstudie zijn DFC filter capsules met de lysis buffer opgestuurd naar Sylphium waar de RNA isolatie binnen 24 uur is uitgevoerd volgens het protocol (Bijlage A.4) waarbij in 50 µL is geëluëerd. De qPCR is voor de twee test rondes ook uitgevoerd bij Sylphium, voor de ringstudie werd het DNA opgestuurd naar Vitens waar de qPCR is uitgevoerd. Er zijn in totaal twee kanttekeningen te maken:

- In de eerste test ronde zijn er filter capsules en chemicaliën gebruikt die besmet waren met *E. coli*. Dit kwam doordat filters en chemicaliën gemaakt waren in een niet *E. coli* vrije ruimte.
- In de tweede test ronde is monster 1 gefilterd met een filter capsule dat besmet was met *E. coli* (doordat filters gemaakt was in een niet *E. coli* vrije ruimte), omdat er te weinig nieuwe filters beschikbaar waren bij Vitens.

2.2.8 DFC methode uitgevoerd door Vitens en Deltares

Voor de 2^e en 3^e ringstudie werd de DFC methode uitgevoerd door Vitens en Deltares. Vitens heeft de watermonsters in duplo gefiltreerd en geconserveerd, waarna één van de duplo's naar Deltares is verstuurd. Vervolgens hebben beide bedrijven het RNA geïsoleerd volgens het protocol (Bijlage A.4) met een aantal aanpassingen:

- Stap 2: Deze epjes werden in duplo voorbereid waarbij er 850 µL S4 toegevoegd werd.
- Na stap 7 werden aan elke buis de 100 µL TAQ IC cellen, die ook gebruikt werden bij de huidige flesbemonstering methode, toegevoegd. Deze cellen zaten overnacht in de lysis buffer.
- Stap 10: per monster werd deze stap in duplo uitgevoerd.
- Stap 11: de back-up monsters werden bewaard bij -80°C.
- Stap 12: er werd 10 minuten gecentrifugeerd op 11.000 x g.
- Stap 13: er werd gecentrifugeerd op 11.000 x g
- Stap 14: pellet werd opgelost in 50 µL S6 elutiebuffer. Vervolgens werden de duplo monsters gepooled zodat er in totaal per monster 100 µL RNA was geïsoleerd.

De RT-PCR werd door beide bedrijven in duplo ingezet.

Er zijn nog twee kanttekeningen te maken bij de monsters die zijn geïsoleerd door Deltares:

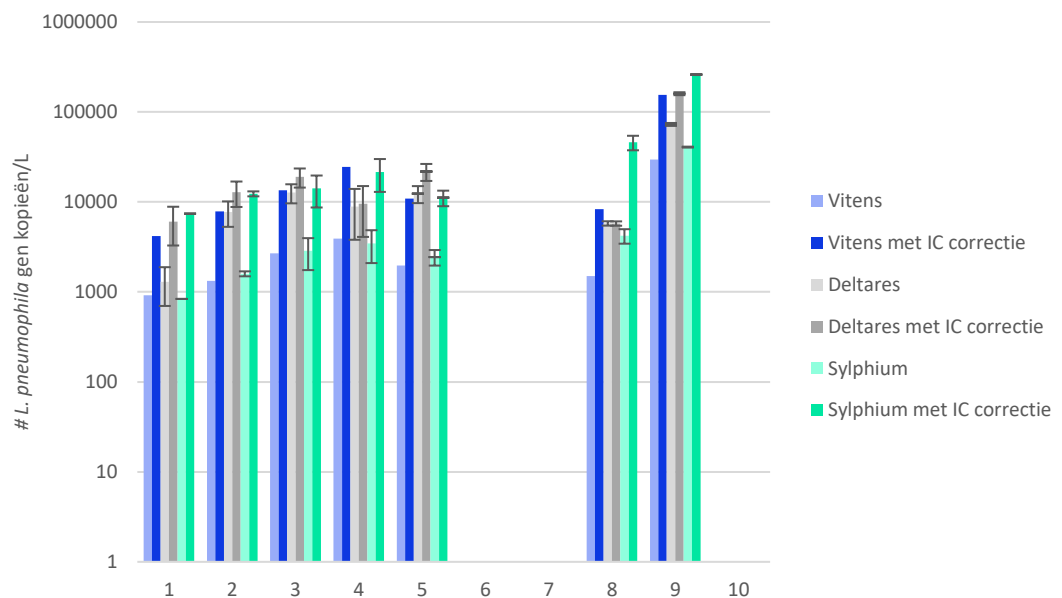
- Monster 7 bevat 3 mL i.p.v. 4 mL aan monstermateriaal dat door het filter is gelopen
- Monster 11 heeft 50 µL TAQ cellen i.p.v. 100 µL

3 Resultaten & Discussie

3.1 Prevalidatie *Legionella*

Met zowel de huidige laboratorium methodes (bemonstering, transport, filtratie en DNA isolatie) als met de DFC methode (DFC filtratie, conservering en isolatie met Sylphium kit) werd *Legionella pneumophila* gedetecteerd in de 10 onderzochte watermonsters (Figuur 3.1). Bij een hogere concentratie aan *L. pneumophila* (monster 8 spike middel en monster 9 spike hoog) geeft de DFC methode de hoogste aantal genkopieën. Voor de andere vijf monsters zijn de verschillen tussen de huidige methode en het gebruik van de DFC methode beperkt. Beide methodes detecteren geen *L. pneumophila* in monster 6 (kraanwater), monster 7 (kraanwater) en monster 10 (blanco) zoals verwacht.

De DFC methode geeft, na IC correctie, betere resultaten bij hogere concentratie van *L. pneumophila*. Wanneer de concentratie laag is geven de DFC en huidige methode dezelfde resultaten. Zowel Vitens als Deltares hebben *Legionella* met hetzelfde protocol gekwantificeerd, maar de resultaten van Deltares zonder IC correctie zijn hoger. Hoe dit komt is nog niet bekend.



Figuur 3.1: Aantal gedetecteerde genkopieën van *Legionella pneumophila* per L water. De samenstelling van de watermonsters staat weergegeven in Tabel 2.1. Vitens en Deltares is met de huidige methode, Sylphium met de DFC methode.

3.2 Prevalidatie *E. coli*/Enterococcon

3.2.1 Eerste test ronde

Sylphium heeft een protocol ontwikkelt om met de DFC methode rRNA van *E. coli* te isoleren. In de eerste testronde zijn zeven watermonsters geanalyseerd met de huidige flessenmethode (door Vitens) als met de DFC methode (door Sylphium) (Tabel 3.2, Figuur 2.1). De Cq waarden van Sylphium zijn hoger dan die van Vitens, wat betekent dat er minder *E. coli* rRNA uit de monsters is geïsoleerd door Sylphium. Dit komt doordat de lysis stap niet afdoende is uitgevoerd. In de normale handelingen op het lab komen de DFC filters met lysis/conserveringsbuffer op kamertemperatuur binnen waardoor de lysis stap al is uitgevoerd in de filter zelf. Dit keer werden de filters met gekoeld transport afgeleverd bij Sylphium en is direct gestart met de RNA isolatie zonder dat de filters eerst op kamertemperatuur waren gekomen. Ook had Sylphium geen rekening gehouden met het feit dat het DNA van de Interne Positieve Controle dat in de lysis/conserveringsbuffer zit van de Syphium kit, met Taq DNA polymerase is gemaakt die in *E. coli* is geproduceerd, waardoor er van nature sporen van *E. coli* RNA/DNA in de lysis/conserveringsbuffer zit. Dit is voor verder onderzoek aangepast.

Bij Vitens heeft de interne controle bij de oppervlaktewatermonsters een hogere Cq waarde in vergelijking met de andere monsters. In het oppervlaktewater zitten meer storende bestanddelen die remming in de RT-qPCR veroorzaken. Er is besloten om in het vervolg bij de oppervlaktewatermonsters waar klontering optreedt van de silica beads een hogere concentratie silica beads toe te voegen zodat meer RNA uit het monster hieraan kan binden (zie optie *vieze monsters* in het onderdeel Filtratie monsters en lysis stap, Bijlage A.3).

Tabel 3.2: Resultaten van de eerste test RT-qPCR voor *E. coli* van Vitens en Sylphium. K = kraanwater, O = oppervlaktewater, l = laag, m = middel, h = hoog, voor de concentratie van de spike zie materiaal en methode. *E. coli* werd bij geen methode aangetroffen in de cDNA en RT mix.

Sample	Vitens		Sylphium	Kweek	
	<i>E. coli</i> Cq	IC Cq	<i>E. coli</i> Cq	KVE/100 mL	
1	K	n.a.	28,09	n.a.	0 / 0
2	K + spike l	30,77	28,17	n.a.	6 / 8
3	K + spike m	28,65	27,11	n.a.	14 / 16
4	K + spike h	28,13	26,39	36,10	31 / 32
5	K + O + spike middel	31,58	33,48	37,80	29 / 21
6	K + O	35,54	34,27	32,50	13 / 13
7	Blanco	n.a.	27,19	35,80	n.v.t.

3.2.2 Tweede test ronde

De RT-PCR voor *E. coli* zijn door de drie betrokken partijen van dit project uitgevoerd (Figuur 2.2). De resultaten van Vitens en Deltares, die gelijke protocollen hebben gebruiken, waren overeenkomstig (Tabel 3.3). De Cq waarden van Sylphium zijn over het algemeen hoger; mogelijk heeft komt dit doordat Sylphium maar 40% van het monster gebruikt heeft ten opzichte van Vitens en Deltares hebben gebruikt. De oppervlaktewatermonster die op de huidige methode geanalyseerd zijn, laten remming zien. Deze remming lijkt minder aanwezig te zijn bij het gebruik van de DFC methode, wanneer er naar de Cq van *E. coli* wordt gekeken. Sylphium heeft de IC niet meegenomen waardoor remming bij gebruik van deze methode niet kan worden vastgesteld.

Monster 1 was bij Sylphium besmet met *E. coli*. Er werd eerst gedacht dat dit kwam doordat de filters en chemicaliën mogelijk te oud waren, maar achteraf (na ringstudie 1) bleek dit te komen doordat filters en chemicaliën gemaakt waren in een niet *E. coli* vrije ruimte (zie 2.2.5). Vitens had vier nieuwe filter capsules van Sylphium ontvangen in plaats van vijf, daarom is ervoor gekozen om voor monster 1 een filter capsule en chemicaliën te gebruiken die nog aanwezig waren bij Vitens.

Op basis van deze resultaten is besloten om door te gaan met het ringonderzoek.

Tabel 3.3: Resultaten van de tweede test RT-qPCR voor *E. coli* door Vitens, Deltares en Sylphium. K = kraanwater, O = oppervlaktewater, l= laag, h= hoog, voor de concentratie van de spike zie Tabel 2.3. *E. coli* werd bij geen methode aangetroffen in de cDNA en RT mix. * toevoeging van silica beads

Sample	Vitens		Deltares		Sylphium	Kweek	
	E. coli Cq	IC Cq	E. coli Cq	IC Cq	E. coli Cq	KVE/100mL	
1	K	n.a.	27,53	n.a.	27,77	31,5	0
2	K + spike l	31,0	27,26	31,55 (±0,22)	27,82	33,5	11
3	K + spike h	30,1	27,64	30,30 (±0,07)	27,99	32,9	21
4	K + O	n.a.	31,20*	n.a.	33,34	n.a.	0
5	K + O + spike l	35,7	31,91*	36,44 (±0,06)	31,20	33,7	9
6	Blanco	n.a.	26,15	n.a.	27,57	n.a.	n.v.t.

3.2.3 Ringstudie 1: *E. coli*

De ringstudie naar *E. coli* is door alle drie de leden van dit project uitgevoerd (Figuur 2.3). Ook hier is dankzij het gebruik van de IC, remming bij de PCR voor *E. coli* goed waarneembaar (Tabel 3.4). De monsters die besmet zijn met *E. coli* én waar grondwater of oppervlaktewater aan is toegevoegd hebben hoge Cq waarden bij de IC (monster 5 tot en met 8). De Cq waarden van de IC bij Sylphium liggen over het algemeen wat hoger. Dit komt waarschijnlijk doordat er minder monstermateriaal in bewerking is genomen. Wat ook opvalt is dat de DFC methode bij een monster met relatief veel *E. coli* én in oppervlaktewater of grondwater zit lagere Cq waardes geeft ten opzichte van Vitens en Deltares (bijvoorbeeld monster 5 en monster 8). Er is hier dus minder remming waargenomen tijdens de PCR, dat de resultaten van de Cq van de IC bevestigd.

Er is wel een variatie tussen Vitens en Deltares die niet was verwacht (in de tweede test ronde lagen de Cq waarden dicht bij elkaar). Ook heeft Deltares remming in beide blanco's (monster 1 en de proces blanco) (Tabel 3.4), wat niet werd gezien bij de test ronde (Tabel 3.3). Bij deze ringstudie waren de TAQ IC cellen al aan de watermonsters toegevoegd voordat de watermonsters naar Deltares zijn gebracht, terwijl bij de tweede test de TAQ IC cellen direct op het filter zijn aangebracht vlak voor de filtratie van het water. Mogelijk mengen de TAQ IC cellen niet goed met het water of plakken ze aan de wanden van de fles. In de volgende ringstudie worden de TAQ IC cellen apart aangeleverd, zodat ze weer vlak voor de filtratie kunnen worden toegevoegd.

Bij de methode van Sylphium werd *E. coli* gevonden in de blanco. Vitens heeft de RNA/DNA isolatie kit van Sylphium (onderdeel van de DFC methode) getest op aanwezigheid van *E. coli*; deze bleek vrij van *E. coli* te zijn. Mogelijk is er een besmetting met *E. coli* op het lab van Sylphium waar de isolatie is uitgevoerd, omdat zij veel experimenten met *E. coli* uitvoeren. Daarom is ervoor gekozen om de 2^e ringstudie uit te voeren bij Vitens en Deltares.

Tabel 3.4: Resultaten van de ringstudie RT-qPCR voor *E. coli* door Vitens, Deltares en Sylphium. K = kraanwater, OB = oppervlaktewater Burgum, OS = oppervlaktewater Snekertravaart, G = grondwater, l= laag, m=middel, h= hoog, ELC = eerstelijns controle, voor de concentratie van de spike zie Tabel 2.4. *E. coli* werd bij geen methode aangetroffen in de cDNA en RT mix. * toevoeging van silica beads

Sample		Vitens		Deltares		Sylphium		Kweek
		<i>E. coli</i> Cq	IC Cq	<i>E. coli</i> Cq	IC Cq	<i>E. coli</i> Cq	IC Cq	KVE/100 mL
1	Blanco	n.a.	30,28 ±0,03	n.a.	36,24	34,71 ±0,16	32,65 ±0,22	0/0
2	K + spike m	32,83 ±0,01	29,49 ±0,01	34,10 ±0,06	28,49*	34,26 ±0,12	31,61 ±0,03	4/9
3	K + spike h	33,1 ±0,03	30,14 ±0,02	32,40 ±0,06	29,51	34,51 ±0,46	32,33 ±0,14	4/13
4	K	n.a.	29,57 ±0,02	n.a.	33,42	35,08 ±0,09	32,58 ±0,23	0/0
5	K + OB	38,28 ±0,38	32,88 ±0,02	n.a.	34,84	32,49 ±0,28	32,82 ±0,26	1/0
6	K + OS	34,74 ±0,5	31,70 ±0,00	39,07 ±0,16	35,32	34,38 ±0,31	32,38 ±0,06	4/7
7	K + OB + OS + spike m	34,39 ±0,04	31,73 ±0,03	31,82 ±0,00	29,19	34,76 ±0,22	31,68 ±0,22	4/8
8	K + G + spike m	38,36 ±0,71	35,6 ±0,21	37,41 ±0,07	33,14	31,06 ±0,03	32,46 ±0,36	5/8
8+	8+ammonium oxalaat	34,85 ±0,33	34,99 ±0,15	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	
9	K + spike l	33,58 ±0,03	29,43 ±0,09	32,13 ±0,08	29,44	34,94 ±0,46	32,31 ±0,09	1/2
10	K + spike l	33,88 ±0,19	30,51 ±0,02	36,21 ±0,38	32,20	34,09 ±0,38	32,64 ±0,13	1/1
	ELC	28,26 ±0,03	28,57 ±0,19	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	94
	Proces blanco	n.a.	28,56 ±0,08	35,22 ±0,08	31,50	n.a.	n.a.	0

3.2.4 Ringstudie 2: *E. coli* en Enterococcen

De ringstudie naar *E. coli* en Enterococcen is door Vitens en Deltares uitgevoerd voor zowel de huidige methode als met de DFC methode (Figuur 2.4). Dit keer komen de resultaten van de huidige methode bij beide labs (Vitens en Deltares) beter overeen (Tabel 3.5). Dat toont aan dat de TAQ IC cellen bij de filtratiestap moeten worden toegevoegd en niet van te voren moeten worden gemengd met het watermonster.

De isolatie van RNA met de DFC methode is niet verbeterd ten opzichte van de vorige ringstudie. De blanco's zijn nu wel goede blanco's, maar de detectie van zowel *E. coli* als Enterococcen sp. is beperkt. Met de huidige methode worden *E. coli* en Enterococcen RNA gen kopieën aangetoond, met zelfde orde grote van resultaten door Vitens en Deltares. Het is opvallend dat de Cq van de IC bij de Sylphium methode ook niet beduidend lager is voor complexere water matrixen dan de huidige methode. De IC komt in veel gevallen bij Sylphium zelfs later op dan bij de huidige methode (bij Vitens Cq 30 vs 34; Deltares Cq 31 vs 37). Mogelijk komt dit door de lagere input aan IC voor de isolatie. In totaal is 57% van de watermonster geanalyseerd met de DFC methode, voor de huidige methode is dit 100%. Al verwacht je dan geen 6 Cq verschil per monster.

Het isoleren van Enterococcon RNA lukt maar beperkt met de DFC methode. Bij 1 watermonster (nr. 4) is de Cq waarde voor Enterococcon met de DFC methode lager dan de huidige methode. Bij de andere oppervlaktewater- en grondwatermonsters geeft de huidige methode hogere concentraties Enterococcon.

Op dit moment lijkt het erop dat de DFC methode met de huidige chemicaliën nog niet goed RNA kan isoleren/conserveren. Het kan zijn dat het RNA in de filter capsule afbreekt. De conserveringstermijn van een RNA monster op het DFC is nog niet bepaald. Ook is er op de gebruikte chemicaliën geen RNase in-activatie-stap uitgevoerd, wat van invloed kan zijn op de verkregen resultaten. Er is besloten om de ringstudie te herhalen met een RNA/DNA isolatie kit van Sylphium waarbij het RNase is geïnactiveerd.

Tabel 3.5: 2^e ringstudie RT-qPCR voor *E. coli*/Enterococcen. K = kraanwater, OB = oppervlaktewater Burgum, OS = oppervlaktewater Snekerterkvaart, G = grondwater, AmmO = ammonium oxalaat, l= laag, m=middel, h= hoog, concentratie van de spike zie Tabel 2.5. Het cDNA en RT-mix bevatten geen *E. coli* en Enterococcen. *helft van TAQ IC volume toegevoegd.

Sample		Vitens			Deltares			DFC methode – Vitens			DFC methode – Deltares			KVE/100 mL	
		<i>E. coli</i> Cq	Ent Cq	IC Cq	<i>E. coli</i> Cq	Ent Cq	IC Cq	<i>E. coli</i> Cq	Ent Cq	IC Cq	<i>E. coli</i> Cq	Ent Cq	IC Cq	<i>E. coli</i>	Ent
1	Blanco	n.a.	n.a.	30,04 ±0,01	n.a.	n.a.	31,08 ±0,04	37,33 ±0,65	n.a.	33,74 ±0,06	34,99 ±0,08	n.a.	36,87 ±0,13	0	0
2	K + G + spike m	34,63 ±0,41	33,80 ±2,44	33,79 ±0,18	34,65 ±0,69	37,27 ±0,27	31,30 ±0,17	37,26 ±1,12	37,42 ±0,87	35,24 ±0,45	33,30 ±0,16	39,76	36,47 ±0,64	8	12
	2+ AmmO	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	31,50 ±0,13	32,75 ±0,26	32,16 ±0,15	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.		
3	K + spike h	29,53 ±0,07	27,58 ±0,41	28,97 ±0,01	30,32 ±0,07	30,67 ±0,04	30,29 ±0,16	34,87 ±0,31	39,91	33,85 ±0,18	34,92 ±0,48	n.a.	36,28 ±0,06	12	4
4	K + OB	n.a.	37,91 ±0,35	36,25 ±0,60	n.a.	37,59 ±0,31	37,29 ±0,06	38,15	31,11 ± 0,06	34,71 ±0,64	35,11 ±0,47	33,81 ±0,01	35,07 ±0,12	60	71
5	K	n.a.	39,11 ±0,57	29,80 ±0,09	n.a.	n.a.	29,78 ±0,01	34,10 ±0,23	n.a.	34,88 ±0,58	36,28 ±0,76	n.a.	36,33 ±0,25	0	0
6	K + spike l	30,92 ±0,36	29,67 ±0,49	29,87 ±0,02	30,69 ±0,02	36,24 ±0,66	30,00 ±0,04	38,20 ±0,06	n.a.	34,21 ±0,21	36,19 ±0,01	n.a.	36,82 ±0,34	1	2
7	K + OB + OS + spike m	32,93 ±0,24	32,64 ±0,03	35,21 ±0,01	33,40 ±0,06	31,26 ±0,10	31,07 ±0,08	36,28 ±0,55	33,05 ±0,01	36,10 ±0,62	36,42 ±0,45	36,19 ±0,23	36,96 ± 0,33	9+	18
8	K + spike m	30,75 ±0,12	30,21 ±0,11	28,62 ±0,01	31,40 ±0,01	31,98 ±0,12	30,28 ±0,06	37,95	37,81	34,98 ±0,13	38,92 ±0,43	n.a.	38,82	5	5
9	K + spike l	32,35 ±0,16	30,74 ±0,32	28,87 ±0,24	31,07 ±0,05	33,32 ±0,02	30,07 ±0,02	39,17	33,46 ±0,06	34,75 ±0,37	38,35 ±1,36	n.a.	39,81 ±0,25	1	1
10	K + OS	33,66 ±0,05	n.a.	33,97 ±0,52	32,19 ±0,00	n.a.	30,75 ±0,06	36,18 ±0,37	n.a.	36,36 ±0,55	34,83 ±0,32	35,13 ±0,10	36,30 ±0,04	10	1
	Proces blanco	n.a.	33,98 ±0,10	29,59 ±0,25	n.a.	n.a.	32,16 ±0,11	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	36,01 ±0,01	n.a.	33,74 ±0,12	n.v.t.	n.v.t.
	IC Sylphium	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.a.	n.a.	n.a.	37,51 ±0,51	37,65 ±0,53	38,99 ±0,91*	n.v.t.	n.v.t.

3.2.5 Ringstudie 3: *E. coli* en Enterococcen

De ringstudie naar *E. coli* en Enterococcen is nogmaals door Vitens en Deltares uitgevoerd voor zowel de huidige methode als met de DFC methode, dit keer met de RNA/DNA isolatie kit van Sylphium die een RNase in-activatie-stap heeft ondergaan (Figuur 2.5).

Ook dit keer komen de resultaten van Vitens en Deltares voor zowel de huidige methode als de DFC methode redelijk overeen (Tabel 3.6). Bij beide organisaties worden in verschillende monsters *E. coli* en/of Enterococcen aangetoond in redelijk vergelijkbare concentraties. Deze methode is voor isolatie uit te voeren door verschillend laboratoria.

E. coli wordt aangetoond met de DFC methode, alleen zijn de concentraties lager dan met de huidige methode. Van elk watermonster is ongeveer 57% in behandeling genomen voor verdere isolatie in tegenstelling tot 100% voor de huidige methode. Als deze factor in de berekeningen wordt meegenomen (niet gedaan in de tabel) zou er wel een kleiner verschil in Cq moeten zijn dan er nu wordt aangetoond. Voor ELC, de proces blanco en IC Sylphium is wel de volledig waterige oplossing gebruikt voor de isolatie en ook deze verschillen in Cq waarden met de huidige methode. Het valt wel op de Cq waarden voor de watermonsters die grondwater én oppervlaktewater bevatten en geanalyseerd zijn met de DFC methode een kleiner verschil in Cq waarden hebben ten opzicht van de huidige methode dan de watermonsters die alleen gespiked zijn of blanco's zijn. Zoals eerder ook al geobserveerd heeft de DFC methode dus minder last van remming bij complexe water matrixen.

Bij de DFC methode worden geen of lagere concentraties Enterococcen gedetecteerd dan verwacht. Mogelijk is de gebruikte lysis niet in staat om Enterococ-cellen kapot te krijgen (gram-positief), waardoor er geen Enterococ 16S rRNA genen vrij kunnen komen, wat de target is voor detectie van Enterococcen met de RT-qPCR. De interne controle (*Thermus aquaticus*) is ook toegevoegd aan de DFC methode en ook hier worden lagere concentraties gemeten in vergelijking met de huidige monsternamen. Ondanks dat *T. aquaticus* een gram-negatieve bacterie is, heeft deze bacterie wel een harde celwand die lastiger is open te breken. Er wordt aangeraden om naast chemische lysis ook lysozym te gebruiken om de cellen van *T. aquaticus* kapot te kunnen krijgen. Het is niet direct mogelijk om lysozym toe te voegen in de RNA/DNA isolatie van Sylphium, omdat een van de buffers Betamercaptoethanol bevat. Enzymen zijn in feite eiwitten en worden door deze stof afgebroken.

Tabel 3.6: 3^e ringstudie voor de huidige methode van de RT-qPCR voor E. coli/Enterococcen. K = kraanwater, OB = oppervlaktewater Burgum, OS = oppervlaktewater Snekerterkvaart, G = grondwater, l= laag, m=middel, h= hoog, ELC = eerstelijns controle, voor de concentratie van de spike zie Tabel 2.6. E. coli en Enterococcen werden bij geen methode aangetroffen in de cDNA en RT mix. Het aantal genkopieën (Kopie) zijn de gegeneerde getallen van de PCR module, dus de waarden van 4 µL vanuit het eluaat dat afkomstig is uit 100 mL water zonder correctie van IC.

Sample		Vitens					Deltares					Kweek	
		IC		E. coli		Ent	IC		E. coli		Ent	E. coli	Ent
		Cq	Kopie	Cq	Kopie (SQ)	Cq	Cq	Kopie	Cq	Kopie	Cq		
1	K + OB + OS + spike m	30,41 ±0,02	1063,4 ±1,1	30,91 ±0,14	376,3 ±34,2	31,26 ±0,02	33,82 ±0,01	59,36 ±0,59	32,03 ±0,03	108,07 ±2,43	34,15 ±0,00	8	9
2	K + G + spike m	30,18 ±0,04	1234,2 ±30,5	33,05 ±0,07	88,3 ±4,2	31,74 ±0,02	33,04 ±0,06	101,81 ±4,03	33,26 ±0,27	45,9 ±8,83	n.a.	7	8
3	K + spike l	29,45 ±0,10	1972,6 ±122,9	33,04 ±0,08	88,7 ±5,0	32,55 ±0,30	32,28 ±0,18	172,67 ±21,30	35,18 ±0,32	11,77 ±2,62	36,47 ±0,33	4	0
4	K + OB	31,54 ±0,03	512,9 ±9,1	30,33 ±0,03	555,5 ±12,3	37,48 ±0,40	34,38 ±0,11	40,46 ±3,07	32,94 ±0,17	56,91 ±6,84	36,95 ±0,31	3	5
5	K	29,40 ±0,01	2037,3 ±10,6	38,74 ±0,00	1,9 ±0,00	n.a.	31,61 ±0,19	274,47 ±35,47	n.a.	n.a.	n.a.	0	0
6	Blanco	29,36 ±0,01	2090,7 ±5,9	39,46 ±0,00	0,00 ±0,00	n.a.	30,98 ±0,05	424,13 ±15,31	38,29 ±0,16	1,29 ±0,14	n.a.	0	0
7	K + spike l	29,64 ±0,03	1745,2 ±36	30,90 ±0,17	380,1 ±44,7	39,62 ±0,00	31,53 ±0,01	288,54 ±2,5	34,19 ±0,02	23,5 ±0,38	35,51 ±0,13	8	5
8	K + OS	30,13 ±0,01	1270,0 ±7,4	32,44 ±0,28	134,8 ±26,1	35,91 ±0,34	32,09 ±0,08	196,29 ±10,81	36,89 ±0,33	3,51 ±0,81	n.a.	2	0
9	K + spike m	29,98 ±0,09	2667,9 ±146,4	30,36 ±0,13	544,9 ±48,4	30,29 ±0,01	32,28 ±0,04	171,78 ±4,59	32,69 ±0,08	68,06 ±3,65	33,39 ±0,09	10	6
10	K + spike h	29,36 ±0,09	2092,0 ±126,9	30,02 ±0,02	682,8 ±8,2	30,71 ±0,23	31,26 ±0,03	349,53 ±7,19	31,58 ±0,15	148,93 ±15,29	31,14 ±0,11	6	3
	ELC	30,42 ±0,08	1055,4 ±52	26,94 ±0,02	5512,1 ±84,9	25,74 ±0,03	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	80	
	Proces blanco	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	31,49 ±0,54	307,59 ±112,30	39,20	0,68 ± 0	37,59 ±0,08	n.v.t	n.v.t

Tabel 3.6: 3^e ringstudie voor de DFC methode van de RT-qPCR voor E. coli/Enterococcen. K = kraanwater, OB = oppervlaktewater Burgum, OS = oppervlaktewater Snekerterkvaart, G = grondwater, l= laag, m=middel, h= hoog, ELC = eerstelijns controle, voor de concentratie van de spike zie Tabel 2.6. E. coli en Enterococcen werden bij geen methode aangetroffen in de cDNA en RT mix. Het aantal genkopieën (Kopie) zijn de gegenereerde getallen van de PCR module, dus de waarden van 4 µL vanuit het eluaat dat afkomstig is uit 100 mL water zonder correctie van IC.

Sample		DFC methode - Vitens					DFC methode - Deltares					Kweek	
		IC		E. coli		Ent	IC		E. coli		Ent	E. coli	Ent
		Cq	Kopie	Cq	Kopie	Cq	Cq	Kopie	Cq	Kopie	Cq		
1	K + OB + OS + spike m	34,95 ±0,16	63,0 ±6,3	33,10 ±0,05	82,02 ±2,43	n.a.	34,13 ±0,02	14,13 ± 0,02	33,42 ±0,25	18,02 ±3,14	n.a.	8	9
2	K + G + spike m	38,15 ±0,29	8,0 ±1,5	37,79 ±0,71	4,05 ±1,81	n.a.	38,54 ±0,70	0,82 ± 0,36	n.a.	n.a.	n.a.	7	8
3	K + spike l	35,13 ±0,18	56,2 ±6,4	37,53 ±0,00	4,51 ±0,00	n.a.	33,80 ±0,38	17,85 ± 4,47	33,56 ±0,32	16,47 ±3,74	n.a.	4	0
4	K + OB	35,79 ±0,30	36,8 ±7,0	32,72 ±0,30	106,34 ±20,56	n.a.	34,37 ±0,30	12,15 ± 2,37	32,85 ±0,14	26,88 ±2,58	38,71	3	5
5	K	36,01 ±0,40	32,2 ±8,2	38,25 ±0,79	3,01 ±1,49	n.a.	35,01 ±0,17	7,95 ± 0,9	36,35±0,32	2,28 ±0,51	n.a.	0	0
6	Blanco	35,04 ±0,09	59,6 ±3,5	37,67 ±0,33	4,17 ±0,89	n.a.	34,07 ±0,04	14,7 ± 0,4	37,44 ±0,69	1,11 ±0,52	n.a.	0	0
7	K + spike l	35,25 ±0,48	53,0 ±16,0	37,88 ±0,76	3,81 ±1,81	n.a.	34,53 ±0,36	11,04 ± 2,57	38,11 ±0,64	0,68 ±0,3	n.a.	8	5
8	K + OS	35,06 ±0,02	58,7 ±0,6	32,80 ±0,05	99,61 ±3,2	n.a.	33,98 ±0,19	15,64 ± 1,9	33,80 ±0,02	13,71 ±0,17	38,92 ±1,24	2	0
9	K + spike m	36,10 ±0,33	30,3 ±6,5	37,83 ±0,90	4,04 ±2,24	n.a.	33,68 ±0,19	19,03 ± 2,32	36,68 ±0,58	1,86 ±0,74	n.a.	10	6
10	K + spike h	35,00 ±0,07	60,8 ±2,7	38,14 ±0,00	3,02 ±0,00	n.a.	34,20 ±0,19	13,57 ±1,73	37,74 ±0,61	0,88 ±0,37	n.a.	6	3
	ELC	35,86 ±0,02	34,8 ± 0,5	32,98 ±0,07	88,70 ±4,17	34,57 ± 0,59	35,82 ±0,03	4,66 ±0,1	35,71 ±0,42	3,63 ±1,06	36,31 ±0,13	80	
	Proces blanco	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	36,57 ±0,45	2,89 ±0,84	39,12 ±0,06	0,32 ±0,01	n.a.	n.v.t.	n.v.t.
	IC Sylphium	35,98 ±0,24	32,4 ±5,0	36,61 ±0,00	8,2 ±0,01	0,00 ± 0,00	34,75 ±0,06	9,38 ±0,36	37,43 ±0,90	2,53 ±2,63	n.a.	n.v.t.	n.v.t.

4 Conclusie

In dit project is onderzocht of een nieuwe methode van watermonstername beter DNA en RNA conserveert en of dit geïmplementeerd kan worden in de moleculaire diagnostiek voor de matrix (drink)water. Deze **nieuwe methode, de DFC methode van Sylphium, lijkt goed in staat te zijn DNA te isoleren van gram-negatieve bacteriën in complexe water matrixen en voor grote volumes.**

Na correctie met de IC zijn de resultaten van **de huidige en de DFC methode voor lage concentratie *L. pneumophila* gelijk en voor hogere concentratie van *L. pneumophila* zelfs hoger met de DFC methode.** De detectielimieten voor detectie van *L. pneumophila* zijn niet in detail onderzocht. Voor alle monsters waar met de huidige methode DNA werd gevonden, werd dit ook met DFC methode geobserveerd.

Bij de eerste ringstudie van *E. coli* is het opvallend dat er **minder remming lijkt op te treden met de DFC methode in oppervlaktewater- en grondwatermonster in vergelijking met de huidige methode.** Dit komt overeen met de resultaten van het project Hybiscan waarin ook deze methode wordt toegepast (project van Vitens, Sylphium en Deltares [2]).

De isolatie van RNA met de Sylphium methode is nog niet optimaal en de gebruikte chemicaliën kunnen het RNA nog niet goed isoleren en/of conserveren. De Cq waarden van *E. coli*, Enterococcen en de IC zijn hoog en fluctueren minder dan werd verwacht wanneer de resultaten worden vergeleken met de huidige methode. **De RNA isolatie van gram-negatieve bacteriën (*E. coli*) is beduidend beter dan gram-positieve bacteriën (Enterococcen).** Maar lysis van gram-negatieve bacteriën met een hardere celwand, zoals *T. aquaticus* in de IC, is ook nog niet optimaal. De 3^e ringstudie toont aan dat uitvoering van de RNase-inactivatie stap voor gram-positieve bacteriën (enterococcen) niet het cruciale punt is. Er wordt verwacht dat optimalisatie voornamelijk zit in het gebruiken van een lysozym (naast de chemische lysis) voor betere degradatie van de celwanden.

In dit onderzoek is ook de huidige methode gevalideerd voor detectie van *L. pneumophila* en voor detectie van *E. coli*/Enterococcen met RT-PCR, doordat dezelfde monsters door zowel Vitens als Deltares zijn onderzocht met dezelfde methodes. **Zowel de resultaten van de detectie van *L. pneumophila* als *E. coli*/Enterococcen komen in de laboratoria redelijk goed overeen, wat aantoont dat beide protocollen uit te voeren zijn door verschillende partijen.** De resultaten van *L. pneumophila* komen na IC-correctie overeen. Voor de detectie van *E. coli*/Enterococcen bleek dat het toevoegen van de TAQ IC cellen op het filter en niet in het watermonster cruciaal is voor een juiste cq van de IC.

5 Aanbevelingen

Er zijn verschillende punten die verbeterd kunnen worden of die verder onderzocht kunnen worden.

Aanbevelingen voor de DFC methode van Sylphium:

1. De DFC methode verwijderd mogelijk beter verontreinigingen in vergelijking met de huidige methode en lijkt daardoor minder last te hebben van remming bij PCR van moeilijker water matrixen zoals oppervlaktewater en grondwater. Er kan worden getest of de RNA/DNA isolatie kit die wordt gebruikt in de DFC methode inderdaad DNA beter isoleert.
2. Volgens Sylphium hoeft de DNA isolatie door gebruik van DFC filter capsules met conservering niet direct plaatst te vinden, maar kan ook na vele dagen of weken worden gedaan zonder aantoonbare afname in hoeveelheid en kwaliteit van het DNA. Er kan worden gevalideerd wat de tijdsafhankelijkheid is voor verschillende water matrixen in combinatie met verschillende organismen van interesse.
3. Hoeveelheid monsters waarvan DNA wordt geïsoleerd verhogen (op dit moment is het tussen de 40-60% van het monster), zodat je een hogere DNA opbrengst krijgt.
4. De RNA isolatie van de DFC methode moet worden geoptimaliseerd. Toevoegen van lysozym kan de detectie van voornamelijk gram-positieve bacteriën verbeteren. Er zou dan wel een lysisbuffer moeten worden gebruikt die geen eiwit afbrekende stoffen bevat zoals Beta-mercaptoethanol.
5. Er kan ook worden onderzocht of alleen de filter capsule van de DFC methode een verbetering geeft in monsternamen en conservering. Watermonsters zouden met de filter capsule kunnen worden genomen en vervolgens verder opgewerkt worden volgens de huidige methode (dus met de huidige DNA isolatie kit waarin lysis chemicaliën in zitten in plaats van de DNA isolatie kit van Sylphium).
6. Ook is het interessant om de DFC methode te gebruiken met een voorweek methode, waarbij na filtratie in plaats van lysis buffer de filter capsule wordt voorzien van een bouillon. In het bouillon worden de eventueel aanwezige *E. coli* of Enterococci voor korte tijd opgekweekt, waarna uit het bouillon het DNA/RNA wordt geïsoleerd en op PCR wordt ingezet.
7. Er kan een kosten-batenanalyse worden opgesteld waarin uiteengezet wordt hoeveel tijd en geld de huidige manier van monsternemen, filtratie en RNA/DNA isolatie kost versus de DFC methode.
8. Voor de DFC bemonstering zou een speciaal koppelstukje tussen de kraan en de filter capsule moeten worden gemaakt die eenvoudig te reinigen (voorkeur autoclaveerbaar) is. Bij de bemonstering voor het eDNA (Hybiscan [2]) is voor de bemonstering aan de tap gebruik gemaakt van een Gardena aansluiting. Gevolg is dat deze constructie tijdens de filtratie vaak lekt tussen de tap en filter.
9. Daarnaast is het interessant om grotere volumes met de DFC methode te bemonsteren (5 tot 10 liter). Mede omdat deze methode minder remming vertoont voor complexere water matrixen is de verwachting dat er meer DNA/RNA kan worden geïsoleerd in vergelijking met de huidige methode (waarbij 100 tot 500 mL in bewerking wordt genomen). Mogelijk kan er via deze wijze een beter beeld worden verkregen van de daadwerkelijke aanwezigheid van bijvoorbeeld *E. coli* of Enterococci, omdat er simpelweg meer volume wordt bemonsterd.
10. Tot slot kan het principe wat bij punt 9 is weergegeven (meer volume) ook interessant zijn voor NGS achtige methodes. Des te meer volume er wordt bemonsterd, des te meer DNA er wordt verzameld voor NGS, waarbij er een beter beeld kan worden verkregen van de daadwerkelijk aanwezige (microbiële) populatie.

Aanbevelingen voor de huidige methode voor L. pneumophila:

1. Er kan worden getest of het invriezen en verpulveren van een filter bij de DNA isolatie (methode gebruikt door Deltares) betere resultaten oplevert dan direct door te gaan met de DNA isolatie na filtratie (methode gebruikt door Vitens). Deltares had initieel hogere aantallen gen kopieën, mogelijk omdat zij het filter invriezen en dan verpulveren in plaats van meteen door te gaan met het protocol.

Aanbevelingen voor de huidige methode voor RT-PCR E. coli/Enterococcon:

1. De TAQ IC moet pas worden gebruikt wanneer de watermonsters worden gefiltreerd.
2. Het lijkt erop dat de magnetic beads die worden gebruikt bij de isolatie methode niet alle stoffen uit het monster verwijderen. Het is goed om voor de huidige RT-PCR naar een alternatieve isolatie methoden te kijken.

6 Referenties

1. de Jong, A., van der Waals, M. & van der Zaan, B. (2022). eDNA voor de detectie van waterdiertjes in het distributienetwerk van Vitens. Project nummer 11206956 BGS, Deltares.
2. de Jong A, Dorigo J, Warmink J, Wallaart E, Atsma A, Dijkstra M, Roosma A. (2024). Mogelijke inzet eDNA voor screening op hydrobiologische parameters. Project nummer 11208260 BGS, Deltares.

A Bijlage

A.1 Protocol voor bemonstering met de eDNA sampling set van Sylphium

1. Zuig 100 mL watermonster op in de bijgeleverde spuit
2. Verwijder de luer lock cap (blauwe of rode dopje) van de eDNA Dual Filter Capsule en plaats hier de spuit op de filter capsule aan de kant van de pijl en filtreer het water.
3. Zorg dat al het water over het filter is gelopen en de filter droog is.
4. Sluit de filter capsule af door de luer lock cap op het uiteinde te draaien waar het water uitkwam (boven de Sylphium tekst).
5. Injecteer de lysis/conservatie buffer in het filter met de kleine bijgeleverde spuit. Deze breng je in vanaf de onderkant (volg de pijl op het filter capsule).
6. Sluit ook deze ingang van de filter capsule met een luer lock cap.

A.2 Protocol voor de DNA isolatie van Legionella

Dit protocol maakt gebruik van de DNeasy PowerBiofilm Kit (Qiagen) waaraan een aantal aanpassingen zijn gedaan.

Belangrijke punten voordat er wordt gestart:

Verwarm MBL en MR bij 55°C voor 10 minuten of plaats de oplossing gedurende 20-30 minuten in een stoof van 44°C. Deze vloeistoffen moeten worden opgewarmd om te zorgen dat alle neerslag goed oplost. De oplossing moet warm zijn tijdens gebruik.

Voor gebruik oplossing PW schudden.

Protocol

1. Pipeteer 10 µL interne controle, het monster (de filter) en 350 µL voorverwarmde MBL in een beatbeatcupje.
2. Pipeteer 100 µL FB in cupje met monstermateriaal en vortex 3 seconden.
3. Incubeer het cupje 5 minuten bij 65°C in een thermoblok.
4. Laat de cupjes 5 minuten afkoelen op ijs of in de koelkast.
5. Cupjes 3 seconden afdraaien.
6. Beadbeat de cupjes in de Powerlyzer (3200 rpm en 30 s)
7. Laat de cupjes 5 minuten afkoelen op ijs.
8. Draai de beatcupjes af gedurende 1 minuut bij 13000 x rcf.
9. Pipeteer de vloeistof uit de beadbeattube (zonder beats mee te pipetteren) in een vers steriel 2 mL cupje.
10. Voeg aan de vloeistof 100 µL Solution IRS oplossing toe en vortex 3 seconden.
11. Laat het cupje 5 minuten op ijs of in de koelkast staan.
12. Centrifugeer het cupje 1 minuut bij 13000 x rcf.
13. Voeg na centrifugeren de heldere vloeistof uit het cupje toe aan voorverwarmde 900 µL MR. Resuspendeer de vloeistof.
14. Filtratie

A. Bij Vitens

1. Plaats de filterkolommen op de manifold. Draai de kraan van de afzuiging van de manifold open. Draai de kraantjes onder de filteradapters open.
2. Pipeteer alle heldere vloeistof met MR over de waskolommen.
3. Was de kolommen door 650 µL PW over de kolommen te pipetteren.
4. Was de kolommen nogmaals door 650 µL ethanol over de kolommen te pipetteren.
5. Sluit de kraantjes nadat de vloeistof uit de kolommen is verdwenen.
6. Plaats de filterkolommen in een schoon 1,5 mL cupje en centrifugeer deze 2 minuten bij 13000 x rcf.

B. Bij Deltares

1. Laad 650 µL van het supernatant over de MB Spin Column en centrifugeer 1 minuut bij 13000 x rcf. Verwijder de flow-through en herhaal deze stap tot alle supernatant over het filter is gegaan.
2. Plaats de MB Spin Column in een nieuw steriel 2 mL cupje
3. Voeg 650 µL PW toe en centrifugeer 1 minuut bij 13000 x rcf. Verwijder de flow-through.
4. Voeg 650 µL ethanol toe en centrifugeer 1 minuut bij 13000 x rcf.
5. Verwijder de flow-through en centrifugeer nogmaals voor 2 minuten bij 13000 x rcf.
15. Plaats de filterkolommen in een schoon 1,5 mL cupje
16. Pipeteer 100 µL EB op de filterkolom.
17. Draai de cupjes vervolgens af bij 13000 x rcf voor 1 minuut.
18. Verwijder de kolommen. Het DNA zit in de vloeistof onder in de 1,5 mL cupjes.

A.3 Protocol voor de rRNA isolatie van *E. coli* huidige methode

Dit protocol maakt gebruik van de volgende reagentia:

- *E. coli* primers (Biolegio) en probe (Biolegio XS-Probe)

Forward primer:	5'-CAT GCC GCG TGT ATG AAG AA-'3
Reverse primer:	5'-CGG GTA ACG TCA ATG AGC AA-'3
Probe:	Texas Red- 5' TAT TAA CTT TAC TCC CTT CCT CCC CGC TGA A '3-BHQ

- *Enterococcus faecalis* (Biolegio) en probe (Biolegio XS-probe) (sequenties niet voor publicatie)
- *T. aquaticus* primers en probe (sequenties niet voor publicatie)
- NucliSENS Lysis buffer
- NucliSENS Magnetic Extraction Reagents bestaande uit silica, washbuffer 1 tot en met 3
- Bioline SensiFAST cDNA Synthesis Kit TwoStep bestaande uit TransAmp Buffer en Reverse transcriptase
- Bioline SensiMIX II Probe NO-ROX Kit
- DNase/RNase vrij water (Millipore H2OMB0124)
- Lysozyme 10 mg/mL

Filtratie monsters en lysis stap

1. Maak één oplossing van water + lysozyme naar de hoeveelheid monsters die je hebt. Per monster gebruik je 1 mL water en 10 µL lysozyme (10 mg/mL). Vul dit vervolgens per monster uit in een 13 mL buis.
2. Voeg 100 µL TAQ IC op het 0,4 µm polycarbonaatfilter en filter vervolgens in enkelvoud 100 mL watermonster.
3. Zuig het filter net droog.
4. Breng het filter in een buis met 1 mL water en 10 µL lysozyme (10 mg/mL).
5. Schroef de dop op de buis en houd de buis op de kop zodat de lysozyme over het filter loopt. 'Sla' vervolgens het filter naar beneden in de buis zodat het in de oplossing zit.
6. Incubeer de buizen voor 15 minuten bij 37°C in een broedstoof.
7. Incubeer de buizen vervolgens voor 2 minuten bij 80°C in een blockheater.
8. Laat de buizen 2 minuten afkoelen op ijs.
9. Giet de lysisbuffer (NucliSENS) bij het monster in de buis.
10. Incubeer de buizen voor 15 minuten bij kamertemperatuur.

*Alleen uitvoeren voor vieze monsters of als de PCR niet heeft gewerkt:
Maak ammoniumoxalaat oplossing met pH 3,0: hiervoor 71,055 g ammoniumoxalaat-monohydraat van Honeywell Fluka oplossen in DNase/RNase vrij water tot een eindvolume van 1000 ml. Het ammoniumoxalaatmonohydraat lost pas op na het verlagen van de pH naar pH 3,0. De pH kan worden verlaagd door toevoeging van Zoutzuur (HCL). De oplossing door filtratie over een membraanfilter met een poriëgrootte van 0,2 µm steriliseren. De oplossing kan worden bewaard bij kamertemperatuur. Na verloop van tijd kan er neerslag ontstaan in de oplossing, deze neerslag kan door middel van verwarmen weer worden opgelost.*

- *Na stap 3: Indien er een gele of bruin gekleurde laag op het filter achterblijft pipetteer dan 10 ml 0,5 mol/L ammoniumoxalaat op het filter.*
- *Laat het ammoniumoxalaat 10 seconden inwerken op het filter.*
- *Spoel de oplossing ammoniumoxalaat weg met behulp van het vacuüm.*
- *Spoel het filter na met 10 ml DNase/RNase vrij water. Indien er nog ijzer deeltjes zichtbaar zijn op het filter, herhaal bovenstaande 3 stappen.*
- *Vervolg het protocol vanaf stap 4.*

RNA isolatie - Lysis

1. Incubeer de buizen voor 15 minuten bij 37°C in een blockheater.
2. Vortex de buizen met filters 3 seconden.
3. Klem het filter, met behulp van een entnaald, tussen deksel en buis.
4. Centrifugeer de buizen gedurende 1 minuut bij 2700 rpm.
5. Verwijder het filter met een entnaald.
6. Vortex de silica-oplossing (NucliSENS Magnetic Extraction Reagents) 10 seconden.
7. Voeg aan elk monster 50 µL silica beads toe.
Voor oppervlaktewater is de volgende stap uitgevoerd op klontering van de beads te verminderen: Een mengsel van 940 µL NucliSENS lysis buffer met 60 µL beads wordt toegevoegd aan het monster. Vortex dit voorzichtig en laat het 10 minuten staan bij kamertemperatuur.
8. Hou de silica in de monsters homogeen door de monsters af en toe te vortexen.
9. Incubeer de buizen 10 minuten bij kamertemperatuur. Zwenk zo nu en dan voorzichtig de buizen, gedurende de incubatie.
10. Centrifugeer de lysistube 2 minuten bij 2700 rpm.

RNA isolatie – Washing (Vitens)

Voor de washing wordt gebruik gemaakt van de Kingfisher (Thermofisher). De wasbuffers zijn een onderdeel van NucliSENS Magnetic Extraction Reagents.

1. Elk sample heeft een tubestrip in een tubestriptray.
2. Vortex washbuffer 1 en pipetteer in de tweede positie van elke tubestrip 350 µL. Let op dat de washbuffer goed is opgelost dit kan worden versneld door deze te verwarmen.
3. Pipetteer in de derde en vierde positie van elke tubestrip 500 µL washbuffer 2.
4. Pipetteer in de vijfde positie van elke tubestrip 500 µL washbuffer 3.
5. Open de lysistube en giet het supernatant af.
6. Pipetteer 350 µL washbuffer 1 in de tube. Gebruik hiervoor de extra lange pipetpunten van 1 mL om besmetting te voorkomen.
7. Resuspendeer de vloeistof en breng de complete vloeistof over in de eerste positie van de tubestrip.
8. Plaats de tubestriptray in het KingFisher apparaat en zet boven elke gebruikte rij een tipcomb.
9. Zet het KingFisher apparaat aan en start het programma "RNAIsolationBiomerie".
10. Pak een tweede tubestriptray en zet hierin de zelfde hoeveelheid tubestrips zoals in de eerste tubestriptray.
11. Pipetteer in de eerste positie van elke tubestrip 100 µL washbuffer 3.

12. Haal de tubestriptray uit de KingFisher apparaat en plaats de tweede tubestriptray in het apparaat. Laat de tipcomb zitten.
13. Druk op start.
14. Gooi de inhoud van de eerste tubestriptray weg.
15. Haal de tweede tubestriptray uit het apparaat wanneer deze klaar is.
16. Pipetteer de volledige inhoud van de eerste positie van de tubestriptray in een eppendorf cupje.
17. Plaats de cupjes 5 minuten in de thermomixer van 60°C bij 800 rpm.

RNA isolatie – Washing (Deltares)

1. Vortex washbuffer 1. Pipetteer 350 µL washbuffer 1 in de lysis tube.
2. Resuspendeer de vloeistof en breng de complete vloeistof over in een 1,5 mL epje.
3. Vortex, en zet het epje op de magneet en laat het 2 min magnetiseren
4. Verwijder de vloeistof zonder de pellet aan te raken
5. Haal het epje van het rek. Voeg 350 uL washbuffer 1 toe, vortex, magenetiseer, en verwijder de vloeistof.
6. Haal het epje van het rek. Voeg 500 uL washbuffer 2 toe, vortex, magenetiseer, en verwijder de vloeistof.
7. Haal het epje van het rek. Voeg 500 uL washbuffer 2 toe, vortex, magenetiseer, en verwijder de vloeistof.
8. Haal het epje van het rek. Voeg 500 uL washbuffer 3 toe, vortex, magenetiseer, en verwijder de vloeistof.
9. Haal het epje van het rek. Voeg 100 uL washbuffer 3 toe, vortex.
10. Plaats dit epje 5 minuten in de thermomixer van 60°C, bij 800 rpm.

cDNA synthese

1. Maak de cDNA synthese mix (Bioline SensiFAST cDNA Synthese Kit TwoStep) volgens Tabel A2.1 per monster

Tabel A2.1 Samenstelling cDNA synthese mix

Component	Volume (µL)
5x Transamp Buffer	4
Reverse Transcriptase	1
Water	5
Totaal	10

2. Pipetteer 10 µL cDNA synthese mix per monster in een 96 well plaat.
3. Voor de blanco wordt één well gevuld met alleen cDNA synthese mix
4. Neem de cupjes uit de thermomixer en plaats deze in een magneet rek.
5. Pipetteer van elk monster 10 µL eluaat over in een welletje van de 96 wells plaat, die gevuld is met de cDNA synthese mix.
6. Sluit de gevulde 96 wells plaat met Optical Sealing Tape.
7. Centrifugeer de plaat kort bij 2000 rpm in de plaatcentrifuge.
8. Gebruik voor de cDNA synthese het volgende programma op het CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories B.V.)-apparaat:
 - 25°C 10:00 minuten Primer annealing
 - 42°C 15:00 minuten Reverse transcriptatie
 - 85°C 05:00 minuten Inactivatie
 - 4°C Hold

RT-qPCR

1. De RT-qPCR mastermix bestaat uit wordt gemaakt door 420 µL DNase/RNase vrij water en 500 µL Boline SensiMIX II probe NO-ROX kit toe te voegen aan het een cupje waar de gevriesdroogde primers en probes voor *E. Coli* en Enterococceen inzitten (Biologio). De oplossing wordt gehomogeniseerd door een paar keer te resuspenderen. Een cupje van deze mix is genoeg voor 20 reacties.
2. Maak de IC mastermix voor de interne controle door aan het cupje met de gevriesdroogde primers en probe voor IC 250 µL sensimix toe te voegen. Dit is genoeg voor 10 reacties.
3. Neem een nieuwe 96 wells plaat en pipetteer per reactie 46 µL RT-qPCR mix. Alle monsters worden in duplo ingezet. Daarnaast worden nog controles voor de cDNA synthese mix en de RT-qPCR mix meegenomen om te kijken of deze blanco zijn. Voor de cDNA synthese mix controle vul een welletje van de 96 wells plaat met 46 µL RT-qPCR mix en 4 µL cDNA van de cDNA synthese mix controle. Om te controleren of de RT-qPCR mix blanco is pipetteer een welletje met alleen 46 µL rRT-PCR mix.
4. Voor de IC wordt ook per reactie 46 µL IC mix aan de 96 wells plaat toegevoegd in enkelvoud.
5. Verwijder voorzichtig het Optical Sealing Tape van de cDNA synthese PCR plaat nadat het programma op het CFX96 Touch™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Laboratories B.V.) is afgerond.
6. Pipeteer van elk monster in duplo 4 µL cDNA over in een welletje van de 96 wells plaat, die gevuld is met de RT-qPCR mix en in enkelvoud 4 µL cDNA over in een welletje van de 96 wells plaat die gevuld is met IC mix.
7. Sluit de 96 wells plaat af met Optical sealing tape.
8. Centrifugeer de plaat kort bij 2000 rpm in de plaatcentrifuge.
9. Gebruik voor de RT-qPCR het volgende programma op het CFX-PCR-apparaat:

95°C	10:00 minuten	Polymerase activatie	
95°C	00:10 minuten		
62°C	00:10 minuten	Plate read	40x
4°C		Hold	

A.4 Protocol voor RNA/DNA isolatie van water met de eDNA dual filter capsules van Sylphium

Deze isolatie is uitgevoerd met de RNA/DNA isolatie kit van Sylphium.

1. Bereid 15 mL buizen voor met 750 μ L S2 (phase separation solution). Maak evenveel buizen als het aantal monsters plus één extra buis. Deze extra buis is de interne negatieve controle (INC).
2. Bereid epjes van 2 mL voor met 100 μ L S3 (precipitation solution) en 900 μ L S4 (precipitation solution). Bereid zoveel epjes als er monsters zijn, bereid ook één extra buisje. Deze extra buis wordt de interne negatieve controle (INC) van Sylphium gebruikt die is bijgeleverd in de kit.
3. Incubeer de DFC met de preservatievloeistof gedurende 60 minuten bij 55-60 °C om al het DNA uit het celmateriaal vrij te maken (lysis). Monsters ouder dan één dag zijn al bij kamertemperatuur gelyseerd en kunnen direct in stap 4 worden gebruikt.

Stap 4 tot 9 wordt uitgelegd in een instructievideo (<https://www.youtube.com/watch?v=Yk3jwSW9gGQ>):

4. Verwijder de luer lock van de filter capsule (kant waar de pijl op het label naar wijst)
5. Sluit een steriele 60 mL spuit aan
6. Verwijder de tweede dop en trek langzaam aan de spuit totdat de vloeistof zich in de spuit bevindt. Om zo groot mogelijk volume eruit te krijgen kan er lucht in de filterscapsule worden gespoten (op en neer pipeteren met de spuit).
7. Voeg de vloeistof in de spuit toe aan de 15 mL buis met 750 μ L S2. Meng de inhoud van de buis door te schudden.
8. Voor het maken van de INC wordt 1 mL S1 (interne negatieve controle) toegevoegd aan een extra 15 mL buis. Meng door te schudden.
9. Centrifugeer de monsters bij $\sim 4.000 \times g$ gedurende 5 minuten. Er worden twee lagen gevormd. De bovenste laag is de water fase en bevat het RNA/DNA. Tussen de twee fasen kan een kleine vaste laag van gedenatureerde eiwitten ontstaan.
10. Breng maximaal 1000 μ L van de waterlaag over naar het bereide mengsel (S3 en S4) in de 2 mL epjes en meng goed door voorzichtig te schudden. Let op, kom niet met de pipet punt in de vaste laag.
11. Koel af tot -20°C gedurende tenminste 30 minuten.
12. Breng de overgebleven waterlaag ($\pm 1000 \mu\text{L}$) over in een lege 2 mL epje en gebruik deze als back-up. Bewaar deze buis in een vriezer bij -20°C . Als er geen back-up nodig is, kunnen deze monsters in de isolatie worden gebruikt om extra RNA/DNA te isoleren.
13. Centrifugeer de monsters 30 minuten (voor kleine eDNA-fragmenten) of 5 minuten voor genomisch DNA (bacteriën, enz.) op maximale snelheid ($\geq 13.000 \text{ g}$).
14. Verwijder het supernatant door decanteren en pipetteren.
15. Voeg 500 μ L S5 (wash solution) toe, meng en centrifugeer de monsters gedurende 2 minuten op maximale snelheid ($\geq 13.000 \text{ g}$).
16. Verwijder het supernatant volledig. Herhaal deze stap om PCR-remmende stoffen te verwijderen. Los de pellet op in 100 μ L S6 (eDNA conservatiebuffer).

Vervolgens vond de cDNA synthese en de RT-PCR plaats volgens het protocol van Vitens beschreven in bijlage A.2

Deltares is een onafhankelijk kennisinstituut voor toegepast onderzoek op het gebied van water en ondergrond. Wereldwijd werken we aan slimme oplossingen voor mens, milieu en maatschappij.

Deltares

www.deltares.nl