

Snelle analyse van fecale vervuiling in drinkwater

Gerhard Wubbels (Waterlaboratorium Noord WLN), Gerrit Veenendaal (Waterleidingmaatschappij Drenthe), Mark Schaap (Waterbedrijf Groningen), Teo Lijzenga (Waterlaboratorium Noord WLN), Auke Douma (Waterlaboratorium Noord WLN)

Microbiologische controle van drinkwater gebeurt met de aloude kweektechnieken, waarbij het lang duurt (soms wel 44 uur) voordat de resultaten bekend zijn. Met nieuwe moleculaire technieken zijn bacteriën sneller aan te tonen. Waterlaboratorium Noord heeft methodes ontwikkeld waarmee fecale indicatoren in drinkwater binnen vier uur kunnen worden aangetoond. Dit biedt veel meerwaarde voor de veiligheid van ons drinkwater.

SAMENVATTING

Microbiologische controle van drinkwater gebeurt met de aloude kweektechnieken, waarbij het lang (soms wel 44 uur) duurt voordat de resultaten bekend zijn. Dat is niet zo erg als we die tijd hebben, maar als er na een ingreep in het leidingnet direct weer geleverd moet worden, dan levert dit veel onzekerheid op. Adviezen om het drinkwater voor gebruik dan maar eerst te koken, bereiken gemiddeld slechts vier van de vijf mensen die het aangaat.

Nieuwe moleculaire technieken, gebaseerd op detectie van genetisch materiaal van het doelorganisme, zijn anders dan de traditionele methoden niet afhankelijk van de groeisnelheid van een micro-organisme. Waterlaboratorium Noord (WLN) heeft een bestaande techniek voor het aantonen van genetisch materiaal zodanig aangepast dat in water (op het niveau van 1 bacterie per 100 milliliter) de aanwezigheid van *E. coli* en *intestinale enterokokken* binnen vier uur kan worden aangetoond. Onderzoek en de praktijk wijzen inmiddels op de grote voordelen van de tijdwinst die hiermee kan worden geboekt.

Drinkwater in Nederland is veilig en betrouwbaar. Dit wordt door de consument als vanzelfsprekend ervaren, maar dat is het niet. In Nederland wordt veel zorg besteed aan het produceren van veilig drinkwater, waardoor na-desinfectie met chloor in het distributienet niet nodig is. Dit betekent echter dat er geen chemische barrière aanwezig is in het distributienet en dat ziekteverwekkende bacteriën, als ze in het systeem terecht komen door buisbreuken of lekkages, enige tijd in het water kunnen overleven en mogelijk consumenten besmetten. Deze situaties worden door afspraken over hygiënisch werken en een uitgebreid bacteriologisch meetprogramma zoveel mogelijk gereduceerd.

Vooral hygiënisch werken na een ingreep in het distributienet is een essentiële factor om drinkwater betrouwbaar te houden. Het voorkomen van verontreinigingen is vele malen effectiever dan achteraf te moeten reinigen en desinfecteren. Omdat het onmogelijk is om alle water te onderzoeken wordt in kleine watervolumes beoordeeld of er schoon en verantwoord gewerkt is. Na een ingreep worden drinkwatermonsters onderzocht op de fecale indicatororganismen *E. coli* en *intestinale enterokokken*.

Dat gebeurt tot op heden met de (wettelijk voorgeschreven) klassieke kweekmethoden. Deze analyses duren minimaal 16 en maximaal 44 uur. In situaties waarin het water niet direct ter beschikking wordt gesteld aan de consument, is dit geen probleem. Echter, soms is het noodzakelijk dat het water na een ingreep direct weer wordt geleverd. In die gevallen is er onzekerheid over de betrouwbaarheid gedurende minimaal 44 uur. Dit wordt meestal ondervangen door het verstrekken van een kookadvies, maar hiermee worden niet alle consumenten in een risicogebied beschermd. Bekend is dat het kookadvies ongeveer 80 procent van de mensen bereikt. De overige 20 procent loopt daarmee een risico. Dat is één van de redenen om de analysetechnieken voor de fecale indicatoren te versnellen.

Alternatieve analysetechnieken

De laatste tien jaar zijn de ontwikkelingen van de moleculaire technieken in een stroomversnelling geraakt. Moleculaire technieken zijn gebaseerd op detectie van genetisch materiaal van het doelorganisme. Omdat moleculaire technieken onafhankelijk zijn van de groeisnelheid van het micro-organisme geeft dit een enorme tijdswinst ten opzichte van kweekmethoden.

Een moleculaire techniek die veel gebruikt wordt is de *Polymerase Chain Reaction* (PCR). Hierbij wordt een specifiek deel van het genetisch materiaal (DNA) van het doelorganisme binnen circa twee uur met een factor van 1 miljard of meer vermenigvuldigd. Door nu het vermenigvuldigde DNA te labelen wordt het in hoge concentraties detecteerbaar. Wat een bacterie in feite doet door te groeien (steeds verdubbelen) en normaal gesproken minimaal 24 uur de tijd voor nodig heeft om een herkenbare kolonie te vormen, wordt nu kunstmatig in een apparaat gedaan binnen twee uur.

De PCR-techniek wordt al in veel branches toegepast. In water – voor het aantonen van *E. coli* en enterokokken op het niveau van 1 per 100 milliliter – is de techniek echter helaas te ongevoelig. Daarvoor is een afgeleide methode ontwikkeld die niet op DNA gericht is maar op RNA. Deze techniek staat bekend als RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*).

Waterlaboratorium Noord (WLN) heeft de RT-PCR aangepast voor het detecteren van *E. coli* en intestinale enterokokken.

Beide snelle analysemethoden (voor *E. coli* en voor intestinale enterokokken) zijn gebaseerd op de aanwezigheid van het 16S ribosomaal RNA in de bacteriecel. De hoeveelheid ribosomaal RNA (rRNA) is afhankelijk van de fysiologische toestand van de bacteriecel, hetgeen betekent dat de RT-PCR-methoden niet kwantitatief zijn.

Bacteriën vers uit het maagdarmkanaal zitten nog vol energie en voedingsstoffen en zijn volop in ontwikkeling. De cellen bevatten dan nog veel kopieën van het rRNA (enkele tienduizenden per cel). Een bacteriecel die al een tijdje in het water aanwezig is, zal niet veel activiteit meer vertonen en in een rustfase zijn. Het aantal rRNA-kopieën zal in deze cel dan ook veel lager zijn. Dode of bijna dode bacteriecellen bevatten weinig rRNA en worden dan ook niet aangetoond in de RT-PCR-analyse.

Dat de snelle analysemethoden de mate van besmetting niet kunnen kwantificeren is voor de beoogde toepassing van ondergeschikt belang. Om fecale micro-organismen in drinkwater aan te tonen volstaat het een methode te kiezen die een enkele bacteriecel in 100 milliliter kan detecteren (of ander gewenst volume). Het aantreffen van *E. coli* of intestinale enterokokken is een aanwijzing voor een fecale besmetting en dan moet actie worden ondernomen, ongeacht de hoeveelheid.

Om met zekerheid te kunnen aangeven of water hygiënisch betrouwbaar is, moeten met de indicatoren zowel *E. coli* als intestinale enterokokken worden geanalyseerd. *E. coli* is een gedefinieerde species en genetisch dan ook zeer conservatief, de enterokokken echter is een sterk diffuse genus die genetisch lastig te onderscheiden zijn. Het was dan ook de uitdaging onderscheid te kunnen maken tussen fecale en niet-fecale enterokokken.

De klassieke kweekmethoden zijn namelijk niet erg specifiek; ze tonen naast enterokokken van fecale oorsprong (intestinale enterokokken) nog enkele andere soorten aan, die mogelijk afkomstig zijn uit feces maar die ook voorkomen en groeien in de omgeving (planten, zand, insecten, water). Deze laatste groep heeft geen directe relatie met fecale besmetting en dus ook niet met ziekteverwekkers.

Het aantonen van deze soorten in de kweek wordt gezien als een niet te voorkomen bijgroei en geeft dus mogelijk 'vals alarm'. Tegenwoordig kunnen de laboratoria het verschil tussen de intestinale enterokokken en de overige enterokokken wel maken door het gebruik van de MALDI-TOF-techniek. Deze techniek is heel gevoelig, maar is ook afhankelijk van gekweekt materiaal.

Validatie

Bij zowel de *E. coli* als de intestinale enterokokken RT-PCR is met controlemonsters en praktijkmonsters bekeken of de resultaten overeenkomen met die van de wettelijke

kweekmethoden. In tabel 1 staan de prestatiekenmerken, bepaald volgens NEN-EN-ISO 16140, die daarbij zijn gevonden.

De resultaten van de snelle technieken en van de kweekmethoden liggen dicht bij elkaar en voldoen ruimschoots aan de validatie-eisen uit ISO.

Tabel 1: Een vergelijking van de resultaten van de snelle RT-methoden met die van de wettelijk voorgeschreven analysemethoden (kweek) voor *E. coli* (links) en enterokokken (rechts)

<i>E. coli</i> RT versus NEN-ISO 9308-1 (2011-2014, n=292)		Enterokokken RT versus NEN-ISO 7899-2 (2014, n=142)	
Nauwkeurigheid	89%	Nauwkeurigheid	85%
Specificiteit	88%	Specificiteit	81%
Gevoeligheid	92%	Gevoeligheid	92%

Praktijkwaarde snelle analysemethoden

In Groningen en Drenthe zijn goede ervaringen opgedaan met de snelle *E. coli* methode (RT-PCR *E. coli*) van WLN. Bij ingrepen waar een verhoogd risico bestaat door omstandigheden waaronder reparaties uitgevoerd moeten worden is binnen vier uur bekend of *E. coli* aanwezig is. Bij reparaties waar doorlevering noodzakelijk was, is vanaf 2010 naast de klassieke methode ook de snelle methode voor *E. coli* gebruikt om de veiligheid van de consument eerder te kunnen garanderen. In drie jaar tijd zijn er 400 monsters geanalyseerd met RT-PCR *E. coli* en *E. coli*-kweekmethode (NEN-EN-ISO 9308-1).

Ook in de praktijk is gebleken dat beide methoden vergelijkbare resultaten opleveren. De nauwkeurigheid en specificiteit van de RT-PCR-methode te opzichte van de kweekmethode waren respectievelijk 90 procent en 92 procent, wat in dezelfde lijn ligt als gevonden bij de validatie (zie de tabel). Het aantal positieve monsters ligt bij de moleculaire methode iets hoger dan de kweekmethode maar gezien de selectiviteit van de kweekmethode is dit te verwachten. 11 procent van de monsters was niet te beoordelen voor de RT-PCR-methode vanwege verstoring van de analyse door de matrix. Nadere analyse gaf aan dat het meestal directe brandkraanmonsters betrof.

Dat de snelle methoden van veel waarde zijn voor de waterbedrijven is de afgelopen jaren meerdere malen gebleken. In een aantal projecten waarbij grote reparaties of ingrepen moesten worden verricht is de watervoorziening veel sneller weer in bedrijf gekomen dankzij snel inzicht in de waterkwaliteit en de risico's. Dit wordt geïllustreerd door de volgende situatie uit de praktijk.

Bij een standaard monitoringscontrole van reinwatertanks in een gebied dat van drinkwater voorzien moet worden, werden in het weekeinde coliformen en enterokokken aangetoond. De MALDI-TOF-techniek (matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight analyzer) toonde aan dat het ging om respectievelijk *Citrobacter freundii* en *Enterococcus phoeniculicola*. Van de coliforme bacterie is bekend dat hij in feces kan voorkomen en dat hij ook kan nagroeien in het water. Van de aangetroffen enterokokken was alleen bekend dat ze ooit een keer waren aangetroffen bij een tropische vogel. Op basis van deze informatie werd besloten om kookadvies te verstrekken aan het hele voorzieningsgebied achter de reinwatertanks.

De volgende dag zijn in het voorzieningsgebied en de reinwatertanks monsters genomen voor de snelle *E. coli* methode en de snelle enterokokken-methode. In overleg met de overheid werd besloten dat het resultaat van de snelle methoden leidend zou zijn voor het opheffen of in stand houden van het kookadvies. Dit leidde ertoe dat na een tweede controleronde het kookadvies alweer ingetrokken kon worden, een tijdwinst van bijna 40 uur ten opzichte van de klassieke kweekmethoden.

Hoe verder?

Iedereen in de drinkwaterbranche in Nederland is het erover eens dat moleculaire technieken een grote toegevoegde waarde hebben bij monitoring van de waterkwaliteit. Dat we in de komende jaren meer gebruik gaan maken van deze nieuwe technieken is evident. Deze methoden voor het aantonen van fecale indicatoren zijn een mooie aanzet tot het introduceren van routinematige PCR-analyses. Momenteel lopen er meerdere trajecten om de E. coli RT-PCR zowel nationaal als internationaal erkend te krijgen als valide analysemethode voor het aantonen van E. coli in drinkwater. De eerste signalen zijn positief en daarmee loopt Nederland voorop.

*Dit artikel is ook gepubliceerd in Water Matters van oktober 2015.
Water Matters is het halfjaarlijkse kenniskatern van H2O.*