

BTO 2016.072 | september 2016

BTO rapport

Onderscheid tussen dode en levende bacteriën met qPCR

Optimalisatie en evaluatie van EMA en PMA voor
detectie van *Legionella pneumophila*

BTO

**Onderscheid tussen dode en levende bacteriën
door EMA of PMA en detectie met qPCR**

BTO 2016.072 | september 2016

Opdrachtnummer

400554/020

Projectmanager

Stefan Kools

Opdrachtgever

BTO - Thematisch onderzoek - Nieuwe meetmethoden
en sensing

Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

Auteurs

Bart Wullings, Ronald Italiaander en Paul van der
Wielen

Verzonden aan

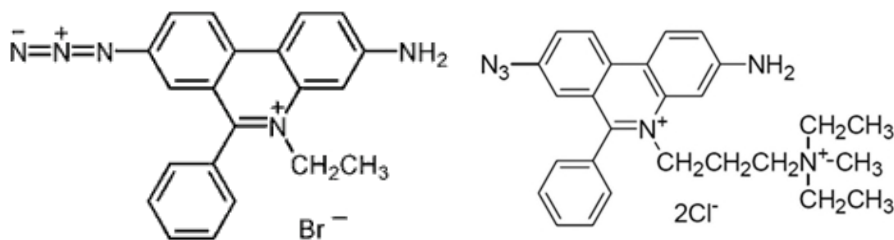
Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten en is
openbaar.

BTO Managementsamenvatting

EMA en PMA ongeschikt om verschil tussen dode en levende cellen te maken met kwantitatieve PCR

Auteurs: Drs. Bart A. Wullings, Ing. R. Italiaander en Dr. Paul W. J. J. van der Wielen

Kwantitatieve moleculaire detectiemethoden zoals kwantitatieve PCR (qPCR) zijn zeer geschikt voor een snelle risicobeoordeling van ongewenste micro-organismen in (drink)water. De detectie en kwantificatie van DNA heeft echter als nadeel dat geen onderscheid kan worden gemaakt tussen levende en dode cellen. Recente studies hebben gesuggereerd dat toepassing van de kleurstoffen EMA en PMA bij detectie van DNA gebruikt kunnen worden om alleen levende cellen aan te tonen. Hiervoor is een methode opgezet, getest en een standaardprotocol geoptimaliseerd. Gebruik van dit geoptimaliseerde protocol liet zien dat EMA en PMA methodiek niet te implementeren voor detectie van dode en levende *L. pneumophila* en verder onderzoek naar EMA of PMA voor detectie van dode of levende bacteriecellen te staken.



Structuurformule van EMA (links) en PMA (rechts).

Jaar van publicatie
2015

Meer informatie
Ir. B.A. Wullings
T 06 11 36 52 19
E bart.wullings@kwrwater.nl

Keywords
qPCR, detectie, dood, levend, EMA,
PMA, *Legionella pneumophila*

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

Watercycle
Research
Institute

BTO | April 2015 © KWR

Alle rechten voorbehouden.

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

Belang: onderscheid dood/levend bij qPCR analyse van belang bij risicobeoordeling

Voor een snelle risicobeoordeling van de aanwezigheid van mogelijk ziekteverwekkende micro-organismen, zoals *Legionella pneumophila* in water, zijn moleculair biologische detectiemethoden zeer geschikt. De meest gebruikte methode is de kwantitatieve PCR-methode (qPCR), die gericht is op kwantitatieve detectie door vermenigvuldiging van een kort kenmerkend DNA-fragment. De detectie en kwantificatie van DNA heeft echter als nadeel dat geen informatie wordt verkregen over de levensvatbaarheid van de aangetoonde micro-organismen. In specifieke situaties, zoals bij een risicobeoordeling van de aanwezigheid van *L. pneumophila*, is het van belang om inzicht te krijgen of het aangetoonde DNA afkomstig is van levende bacteriën. Recent zijn studies gepubliceerd waarbij hiervoor de stoffen EMA of PMA worden toegevoegd. Deze stoffen zouden cellen met beschadigde membranen kunnen binnendringen, waarna ze binden aan het DNA van dergelijke dode cellen, dat daardoor niet langer wordt vermenigvuldigd tijdens de qPCR-analyse.

Aanpak: optimalisatie EMA/PMA methode en toepassing op afgedode *L. pneumophila*

In een gezamenlijk onderzoek van het laboratorium van Vitens en KWR is de effectiviteit van deze DNA-bindende stoffen EMA en PMA onderzocht op *L. pneumophila* cellen en ander bacteriecellen uit praktijkwatermonsters. Daarbij is de invloed van verschillende condities op de effectiviteit van de methode onderzocht en de methode daarop geoptimaliseerd. De geoptimaliseerde methode is vervolgens getest op *L. pneumophila* cellen die waren behandeld met thermische desinfectie bij 70 of 80°C of chemische desinfectie met biociden.

Resultaten: EMA/PMA onvoldoende betrouwbaar om te onderscheiden tussen dood en levend

Het onderzoek naar de optimalisatie van de kleuringsmethode met EMA of PMA om dode en levende cellen met qPCR te kunnen onderscheiden heeft geresulteerd in een goed werkend standaardprotocol waarin o.a. de optimale concentratie EMA/PMA, belichtingstijd, incubatietijd en -temperatuur zijn vastgelegd. Kleuring van door thermische desinfectie afgedode *L. pneumophila* cellen uit leiding-, proces- en koelwater met dit standaardprotocol resulteerde in verlaging van het

PCR signaal met 1,6 tot $\geq 2,8$ logeenheden. Dit is echter meestal niet voldoende voor een volledig negatief PCR-signaal, terwijl alle legionellacellen wel zijn afgedood door de thermische desinfectie. Behandeling van *L. pneumophila* uit koelwater met de verschillende organische biocides resulteert na behandeling met EMA of PMA in een geringe reductie van het PCR signaal, terwijl *Legionella* niet meer aantoonbaar was met de kweekmethode. Voor praktijkmonsters zal de reductie in PCR signaal door toevoeging van EMA of PMA niet altijd afdoende zijn om het PCR signaal van dode cellen tot nul te reduceren.

Implementatie: EMA/PMA methode niet implementeren in de laboratoria

Op basis van de resultaten wordt geconcludeerd dat het toepassen van EMA of PMA over het algemeen te onbetrouwbaar is om onderscheid te maken tussen dode en levende cellen van *L. pneumophila* in natuurlijke watermonsters met de qPCR analyse, zeker wanneer het wordt gebruikt in combinatie met thermische desinfectie bij 60°C of behandeling met organische biocides of waterstofperoxide bij aantallen genkopieën boven $1,4 \times 10^3$ per liter. Op basis van de resultaten verkregen in deze studie wordt aanbevolen om het aantal dode en/of levende cellen van *L. pneumophila* in een watermonster over het algemeen niet te bepalen met het EMA of PMA procedé in combinatie met de qPCR voor *L. pneumophila*. Vanwege de wisselende resultaten die zijn behaald met het EMA of PMA procedé bij verschillende bacteriesoorten en/of toepassing van verschillende desinfectiemethoden op *L. pneumophila* wordt aanbevolen om geen aanvullend onderzoek uit te voeren naar het routinematig toepassen van EMA of PMA om dode en levende bacteriën met qPCR te kwantificeren. Het is wel raadzaam aanvullend onderzoek uit te voeren naar andere methodieken, zoals detectie van het messenger RNA (mRNA) als marker voor dood of levend.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Onderscheid tussen dode en levende bacteriën met qPCR* (BTO-2016.072).

Meer informatie

Paul van der Wielen
T 030 60 69 642

E paul.van.der.wielen@kwrwater.nl

KWR

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

Samenvatting

Aanleiding

Voor een snelle risicobeoordeling van de aanwezigheid van mogelijk ziekteverwekkende micro-organismen, zoals *Legionella pneumophila* in water, zijn moleculair biologische detectiemethoden zeer geschikt. De meest gebruikte methode is de kwantitatieve PCR-methode (qPCR) die gericht is op kwantitatieve detectie door vermenigvuldiging van een kort kenmerkend DNA-fragment. De voordelen van het inzetten van PCR-technieken zijn de zeer korte analysetijd (± 4 uur) en de grote specificiteit in vergelijking met traditionele veelal op kweek gebaseerde detectiemethoden. De detectie en kwantificatie van DNA heeft echter als nadeel dat geen informatie wordt verkregen over de levensvatbaarheid van de aangetoonde micro-organismen. In specifieke situaties, zoals bij een risicobeoordeling van de aanwezigheid van *L. pneumophila*, is het van belang om inzicht te krijgen of het aangetoonde DNA afkomstig is van levende bacteriën.

Beschadigd membraan als marker voor dode cellen

In de wetenschappelijke literatuur zijn verschillende publicaties verschenen waarin nieuwe technieken zijn beschreven voor het aantonen van specifiek levensvatbare micro-organismen. Een veelbelovende techniek is om met behulp van de DNA-bindende stof ethidiumbromidemonoazide (EMA) of propidiummonoazide (PMA), onderscheid te maken tussen cellen met een intact membraan (die als levensvatbare cellen worden beschouwd) en cellen met een beschadigd, permeabel membraan (die als dode cellen worden beschouwd). Daarbij is een cel met beschadigd membraan zeer waarschijnlijk niet meer levend en in staat infecties te veroorzaken; andersom is de uitslag minder eenduidig: ook dode cellen kunnen nog een intacte membraan hebben. Het onderscheid tussen cellen met intacte en beschadigde membranen is mogelijk doordat deze stoffen na passage door een beschadigd celmembraan onder invloed van licht aan het DNA in de cel binden waardoor DNA-detectie met behulp van PCR wordt verhinderd. Hoewel de twee stoffen EMA en PMA veel op elkaar lijken, zijn de verschillen tussen de moleculen (lading) mogelijk van invloed op de werking van deze stoffen.

Methodeoptimalisatie

Het onderzoek beschreven in deze rapportage omvat de resultaten van een gezamenlijk onderzoek van het Vitens laboratorium en het laboratorium van KWR, waarin de effectiviteit van deze DNA-bindende stoffen is onderzocht op voornamelijk *L. pneumophila* cellen. In een voorstudie is aangetoond dat de werking van deze stoffen sterk verschillend is tussen in het laboratorium gekweekte cellen en cellen uit natuurlijke milieus (bv. koelwater, proceswater en leidingwater), waarbij EMA/PMA beter lijken te werken bij in het laboratorium opgekweekte cellen dan cellen uit natuurlijke milieus. Om de effectiviteit voor praktijkrelevante situaties vast te stellen zijn om deze reden in dit onderzoek alleen natuurlijk gegroeide bacteriecellen geanalyseerd uit praktijkmonsters. De effectiviteit van de DNA-bindende kleurstoffen is uitgedrukt in logeenheden reductie van het DNA detectiesignaal met behulp van qPCR. Er is sprake van één log reductie wanneer, na behandeling met EMA of PMA, nog 10% van de *L. pneumophila* cellen in een monster het DNA wordt gedetecteerd met qPCR.

Bij aanvang van het onderzoek zijn de beschikbare protocollen van de laboratoria van Vitens en KWR samengevoegd, waarna verschillende aspecten van de experimentomstandigheden verder zijn geoptimaliseerd zoals o.a. de incubatietijd en -temperatuur van de kleuring, wijze en tijdsduur van de belichting, PCR DNA-fragmentlengte, toevoeging van deoxycholaat tijdens de kleuring en de concentratie van EMA en PMA. Een voorbeeld is dat bij een hogere incubatietemperatuur en -tijd, de werking (reducerend vermogen) van de stoffen op de dode cellen toeneemt, maar dit resulteert vervolgens ook in toenemende mate in kleuring van levende cellen (vals-negatief). Een invloed van de lengte van het PCR-fragment op de werking van PMA en EMA is in dit onderzoek niet aangetoond. Dit resultaat is in tegenstelling tot eerdere studies die in de literatuur zijn beschreven waar een langer PCR-fragment een hoger onderscheidend vermogen mogelijk maakt. In het onderzoek hebben we hierdoor de methode toegepast volgens NEN 6254 waarin een DNA-fragment van 150 bp wordt vermenigvuldigd. Ook de toevoeging van deoxycholaat bleek geen toegevoegde waarde te hebben voor de werking van EMA en/of PMA op de detectie van *L. pneumophila*. Onduidelijk is in hoeverre deze waarnemingen ook voor ander bacteriesoorten geldt. De optimale concentratie van EMA en PMA om onderscheid te kunnen maken tussen levende en dode cellen van *L. pneumophila* is vastgesteld op respectievelijk 10 µg/ml en 50 µg/ml in de oplossing.

Onderzoek in praktijkmonsters na thermische desinfectie

De geoptimaliseerde methode voor qPCR detectie van *L. pneumophila* met EMA of PMA is vervolgens experimenteel getoetst met verschillende koel-, leiding- en proceswatermonsters. Gedurende het onderzoek zijn de *L. pneumophila* cellen in deze monsters zowel voor als na thermisch afdoden geanalyseerd met qPCR en ter controle ook met de standaard kweekmethode. Thermische desinfectie wordt in de praktijk veel toegepast voor de bestrijding van *Legionella*. Uit onderzoek is gebleken dat thermische desinfectie relatief weinig effect heeft op de cel integriteit van natuurlijke monsters met *L. pneumophila* en dus op de detecteerbaarheid van het DNA na kleuring met EMA of PMA. In tabel 1 zijn de resultaten van een representatief experiment beschreven: de reductie van het PCR signaal na desinfectie bij 70 °C.

Tabel 1: Reductie van PCR signaal door EMA of PMA na desinfectie van 15 min. bij 70 °C

Monsteromschrijving	Kleuring	Kleuringstijd	Reductie (log)*	PCR signaal
Legionella pilot installatie	EMA	10 min.	2,4	+
	PMA		1,8	+
Koelwater	EMA	10 min.	2,3	+
	PMA		1,6	+
Proceswater	EMA	30 min.	≥ 2,8	-
	PMA		1,8	+

*Vermindering van detectiesignaal in logeenheden door passage van DNA-bindende kleurstoffen door het celmembraan

De tabel laat zien dat kleuring met EMA en PMA het PCR signaal met 1,6 tot ≥ 2,8 logeenheden verlaagd. Dit is echter meestal niet voldoende voor een volledig negatief PCR-signaal, terwijl alle *Legionella* cellen wel zijn afgedood door de thermische desinfectie. Alleen in het proceswatermonster na 30 min. incubatie bij 37 °C met EMA is een negatief PCR signaal waargenomen, maar bij deze behandeling bindt EMA ook aan het DNA van levende cellen zonder thermische behandeling (resultaten niet weergegeven). Een geoptimaliseerde EMA- of PMA-kleuring is dus niet voldoende in staat om na thermische desinfectie al het DNA in de dode cellen voor PCR detectie te reduceren tot een negatief PCR signaal. Voor een

Legionella risicobeoordeling is alleen afwezigheid van het PCR signaal acceptabel om een watersysteem veilig te verklaren. Er vindt echter wel behoorlijke reductie van signaal plaats waardoor bij lagere *L. pneumophila* aantallen ($<1,4 \times 10^3$ DNA kopieën/l) de reductie mogelijk wel afdoende is voor een negatief signaal.

Onderzoek in praktijkmonsters na chemische desinfectie

Aansluitend is de effectiviteit van de EMA en PMA incubatie experimenteel getoetst op monsters na chemische desinfecties/biocides, methoden die in de praktijk ook veel worden gebruikt voor bestrijding van *Legionella*. Behandeling van koelwater met de verschillende organische biocides (niet-oxidatief) resulteert na behandeling met EMA of PMA in een geringe reductie van het PCR signaal, terwijl *Legionella* niet meer aantoonbaar was met de kweekmethode. Voor praktijkmonsters zal de reductie in PCR signaal niet altijd afdoende zijn om het PCR signaal tot nul te reduceren. Alleen in de monsters na desinfectie met chloor is al het DNA afgebroken, wanneer *L. pneumophila* in het water aanwezig is. De reductie van het PCR signaal is na EMA behandeling gemiddeld iets groter dan na PMA behandeling.

Conclusies

Op basis van de resultaten van de experimenten wordt geconcludeerd dat:

- Het protocol voor toepassing van EMA en PMA met qPCR voor de detectie van *L. pneumophila* in laboratoriumcultures en natuurlijke monsters is geoptimaliseerd;
- De effectiviteit van EMA of PMA in combinatie met qPCR om dode en levende cellen te kwantificeren verschilt per bacteriesoort. Het is dus noodzakelijk om voor iedere afzonderlijke bacteriesoort het effect van EMA en PMA te onderzoeken en het procedé te optimaliseren;
- EMA en PMA worden ook opgenomen door onbehandelde cellen (dus zonder desinfectie) van *L. pneumophila*;
- *Legionella* cellen die zijn behandeld met thermische desinfectie bij 70°C, organische biocides of waterstofperoxide zijn niet meer kweekbaar en worden als dood beschouwd, maar EMA en PMA worden niet door al deze dode cellen van *L. pneumophila* opgenomen. De bottleneck van de EMA of PMA procedé is dus dat bij *L. pneumophila*, maar waarschijnlijk ook bij andere bacteriesoorten, het celmembraan niet of onvoldoende wordt beschadigd na celdood door o.a. thermische desinfectie bij 70°C, organische biocides of waterstofperoxide, waardoor EMA of PMA het celmembraan niet kan passeren en de procedé daardoor niet of onvoldoende werkt. Bij toepassing van EMA of PMA om dode en levende cellen van *L. pneumophila* te kwantificeren met qPCR worden bij toepassing van die desinfectiemethoden dode cellen dus ten onterecht als levend gedetecteerd;
- Het onderscheid maken tussen dode en levende cellen van *L. pneumophila* is vanwege bovenstaande conclusies dus over het algemeen onbetrouwbaar, zeker wanneer het in combinatie wordt gebruikt met thermische desinfectie bij 60°C of behandeling met organische biocides of waterstofperoxide bij aantallen genkopieën boven de $1,4 \times 10^3$ per liter;
- Bij toepassing van natriumhypochloriet (20 mg/l, 4 uur) wordt met het EMA of PMA procedé in combinatie met qPCR geen DNA gedetecteerd van cellen met een intact membraan. Zonder toepassing van het EMA of PMA procedé werd met qPCR echter ook geen genkopieën in de natriumhypochloriet behandelde watermonsters aangetroffen. In dit geval is het DNA door de chloorbehandeling waarschijnlijk al niet meer detecteerbaar met PCR, en heeft het EMA of PMA procedé dus geen toegevoegde waarde;

- De effectiviteit van de werking van EMA en PMA lijkt afhankelijk te zijn van type/herkomst van de monsters (laboratorium culturen versus natuurlijk gegroeide bacteriecellen);
- Het verschil in effectiviteit tussen EMA en PMA is gering. EMA geeft een iets grotere reductie maar ook een toename van binding aan DNA van mogelijk levende cellen (vals-negatief).

Aanbevelingen

Op basis van de resultaten verkregen in deze studie wordt aanbevolen om het aantal dode en/of levende cellen van *L. pneumophila* in een watermonster over het algemeen niet te bepalen met het EMA of PMA procedé in combinatie met de qPCR voor *L. pneumophila*, vooral wanneer deze monsters zijn genomen na thermische desinfectie, na behandeling met organische biocides/waterstofperoxide en de aantallen hoger zijn dan $1,4 \times 10^3$ genkopieën (gk) l⁻¹. Indien de aantallen *L. pneumophila* van de watermonsters lager zijn dan $1,4 \times 10^3$ gk l⁻¹ of zijn behandeld met natriumhypochloriet (20 mg/l, 4 uur) dan kan het EMA of PMA procedé wel worden toegepast om het aantal dode en levende cellen van *L. pneumophila* te kwantificeren. Wanneer desinfectiemethoden worden toegepast die niet zijn onderzocht in deze studie (bijvoorbeeld natriumhypochloriet bij lagere concentraties, chloordioxide, chlooramine, koper/zilverionisatie) dan dient eerst worden vastgesteld of het EMA of PMA procedé geschikt is om het aantal dode en levende *L. pneumophila* cellen met qPCR te kwantificeren.

Door de wisselende resultaten die zijn behaald met het EMA of PMA procedé bij verschillende bacteriesoorten en/of toepassing van verschillende desinfectiemethoden op *L. pneumophila* wordt aanbevolen om geen aanvullend onderzoek uit te voeren naar het routinematig toepassen van EMA of PMA om dode en levende bacteriën met qPCR te kwantificeren. Het is daarom raadzaam om aanvullend onderzoek uit te voeren naar andere methodieken zoals bijvoorbeeld de toepassing van detectie van het messenger RNA (mRNA) als marker voor dood of levend.

Voorwoord

Het is een lang gekoesterde wens om bij toepassing van moleculair biologische methoden onderscheid te kunnen maken tussen levende en dode bacteriecellen. Een publicatie in 2006 beschreef voor het eerst het gebruik van een specifieke DNA bindende kleurstof die het mogelijk maakte om, in combinatie met de qPCR, dit onderscheid te maken (Nocker & Camper, 2006). In vele daaropvolgende publicaties is de toepassing van de kleurstoffen beschreven voor verschillende bacteriesoorten in verschillende milieus. In de periode tussen 2010 tot 2013 zijn door het laboratorium van Vitens en het laboratorium van KWR afzonderlijk experimenten uitgevoerd met het gebruik van deze kleurstoffen. Namens Vitens zijn de experimenten door Adrie Atsma uitgevoerd en mede dankzij zijn inzet, hebben we deze studie kunnen voltooien. De auteurs van het rapport willen hem daarom ook van harte bedanken voor zijn inzet bij dit project. De resultaten van deze experimenten hebben geresulteerd in het opstellen van een onderzoeksplan dat de basis heeft gevormd voor dit onderzoek.

Inhoud

Samenvatting	3
Voorwoord	7
Inhoud	9
1 Inleiding	11
1.1 Aanleiding voor het onderzoek	11
1.2 Kleurstoffen EMA en PMA	11
1.3 Doelen van het onderzoek	12
2 Opzet van het onderzoek en gebruikte analysemethoden	13
2.1 Opzet van het onderzoek	13
2.2 Optimalisatie van de werkwijze	13
2.3 Praktijkrelevante desinfectiemethoden	15
2.4 Detectiemethoden	15
2.5 Overzicht watermonsters	16
2.6 “Standaard” experiment	17
2.7 Overzicht experimenten	18
3 Resultaten en discussie	19
3.1 Onderscheidend vermogen van EMA en PMA met in laboratorium gegroeide culturen	19
3.2 Optimalisatie werkwijze toepassing EMA en PMA	24
Standaard protocol:	31
3.3 Invloed van fysiologische staat <i>L. pneumophila</i> cellen	31
3.4 Onderscheidend vermogen van EMA en PMA na behandeling met praktijkrelevante desinfectiemethoden	33
4	

Conclusies en aanbevelingen	38
4.1 Conclusies	38
4.2 Aanbevelingen	39
5 Literatuur	40
Bijlage I	43
• Experimenten 2011 (VO)	43
Experiment 1	43
Experiment 2	44
Experiment 3	45
• Experimenten 2013-2014 (BTO)	46
Experiment 4	46
Experiment 5	47
Experiment 6	48
Experiment 7	49
Experiment 8	50
Experiment 9	51
Experiment 10	52
Experiment 11	53

1 Inleiding

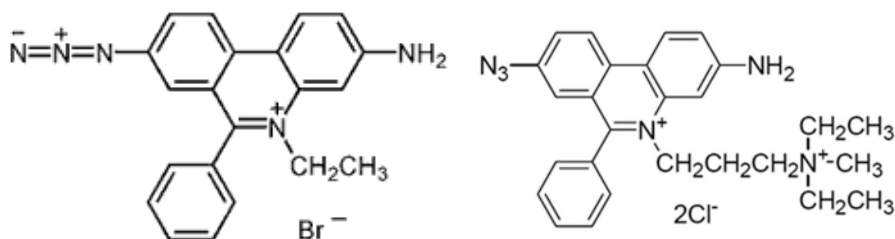
1.1 Aanleiding voor het onderzoek

Voor de detectie en kwantificatie van micro-organismen met behulp van moleculair microbiologische detectiemethoden wordt veelal gebruik gemaakt van PCR technieken die gericht zijn op het DNA van het organisme. Het grote voordeel van het inzetten van PCR-technieken is de (zeer) korte analyse tijd en grote nauwkeurigheid in vergelijking met de traditionele kweekmethoden. De detectie en kwantificatie van DNA heeft echter als nadeel dat er geen informatie wordt verkregen over de levensvatbaarheid van de aangetoonde micro-organismen, omdat de PCR-techniek zowel DNA van levende als dode cellen detecteert. Om een risicobeoordeling te geven over de aanwezigheid van pathogene micro-organismen of indicatororganismen in drinkwater en om effecten van beheersmaatregelen op pathogene organismen (bv hittebehandeling, UV) te bepalen is het van belang dat onderscheid kan worden gemaakt tussen levensvatbare en dode cellen.

In de wetenschappelijke literatuur zijn diverse publicaties verschenen waarin nieuwe technieken voor het aantonen van specifiek levensvatbare micro-organismen worden beschreven. In het BTO, maar ook in het onderzoek dat is uitgevoerd door drinkwaterlaboratoria, zijn verschillende methoden ontwikkeld en/of geoptimaliseerd die mogelijk onderscheid kunnen maken tussen actieve cellen en beschadigde of inactieve cellen (levende en dode) zoals detectie van *E. coli* met NASBA of RT-PCR en DNA-bindende kleurstoffen zoals EMA en PMA in combinatie met qPCR voor *Legionella pneumophila*. Het gebruik van deze technologieën is relatief nieuw en meer kennis en ervaring is nodig voordat de methoden in de dagelijkse drinkwaterpraktijk kunnen worden toegepast. Het is bijvoorbeeld nog onduidelijk in hoeverre deze methoden geschikt zijn voor het analyseren van micro-organismen die zijn beschadigd na toepassing van verschillende desinfectiemethoden (thermisch, UV, oxidatief). In dit kader is het ook van belang om te onderzoeken hoe lang DNA nog detecteerbaar is in een beschadigde (en/of inactieve) cel na een desinfectiebehandeling (temperatuur, oxidatief of UV) of in de tijd.

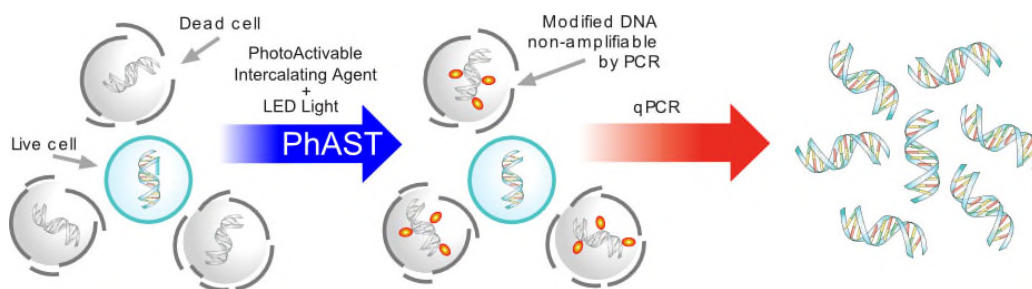
1.2 Kleurstoffen EMA en PMA

Eén van de methoden waarmee mogelijk onderscheid kan worden gemaakt tussen dood en levend bij toepassing van moleculair biologische methoden is het gebruik van de kleurstoffen ethidium bromide monoazide (EMA) en propidium monoazide (PMA) (Figuur 1.1).



FIGUUR 1.1 STRUCTUURFORMULE VAN EMA (LINKS) EN PMA (RECHTS).

Deze twee kleurstoffen zijn specifieke DNA-bindende kleurstoffen en het proces waarmee onderscheid kan worden gemaakt tussen dood en levend is weergegeven in Figuur 1.2. Theoretisch kunnen EMA en PMA alleen de bacteriecel binnentreden wanneer het celmembraan beschadigd (niet meer intact) is. Na fotolyse (cross-linken) binden EMA en PMA covalent aan nucleïnezuren (DNA) waardoor het niet meer mogelijk is om het DNA te vermeerderen met PCR. Met deze kleurstoffen zou het daarom mogelijk moeten zijn om onderscheid te maken tussen DNA afkomstig uit levende cellen (met een intacte membraan) en dode cellen (met een beschadigd membraan). In de wetenschappelijke literatuur zijn verschillende studies verschenen waar EMA en PMA zijn gebruikt in combinatie met qPCR om dode en levende cellen van bepaalde bacteriën te bepalen, maar de resultaten zijn wisselend. Het is niet duidelijk waar deze verschillen tussen studies door worden veroorzaakt, maar het lijkt erop dat de bacteriesoort, fysiologische staat van de bacteriecel en gebruikte methodologie een invloed hebben op de resultaten (Fittipaldi et al. 2012). Om te achterhalen of EMA en/of PMA succesvol kan worden gebruikt om onderscheid te maken tussen dode en levende bacteriën in het Nederlandse (drink)water is binnen het BTO een studie uitgevoerd naar optimalisatie en toepassing van deze methodiek voor detectie van levende cellen van *L. pneumophila*.



FIGUUR 1.2: DE WERKING VAN PMA OM ONDERSCHIED TE MAKEN TUSSEN LEVENDE EN DODE CELLEN MET BEHULP VAN QPCR. (UIT: WWW.GENIUL.COM)

1.3 Doelen van het onderzoek

- Optimalisatie en implementatie van een methode om onderscheid te maken tussen actieve en beschadigde of inactieve cellen (levend en dode) met behulp van de DNA-bindende kleurstoffen EMA en PMA in combinatie met qPCR;
- Evaluatie van het onderscheidend vermogen van EMA en PMA op *Legionella pneumophila* die op een natuurlijke wijze gegroeid zijn in praktijkwatermonsters;
- Effect van verschillende desinfectiemethoden op het onderscheidend vermogen van EMA en PMA op *L. pneumophila*.

2 Opzet van het onderzoek en gebruikte analysemethoden

Het beschreven onderzoek is een voortzetting van onderzoek dat is uitgevoerd door de laboratoria van Vitens en KWR in de periode 2010 tot 2013. In beide laboratoria zijn afzonderlijk, oriënterende experimenten uitgevoerd met zowel EMA als PMA om onderscheid te maken tussen levende en dode (micro)organismen (intact versus beschadigd celmembraan) met behulp van de qPCR methode. Vergelijking van de resultaten van deze experimenten resulteerde in verschillende nieuwe onderzoeksvragen die de basis vormden voor het onderzoek beschreven in dit rapport.

2.1 Opzet van het onderzoek

Op basis van het voorgaande onderzoek en nieuwe inzichten beschreven in de literatuur zijn verschillende aspecten van de EMA/PMA-methodiek verder geoptimaliseerd, geharmoniseerd en geëvalueerd. Eén van de opmerkelijkste observaties van het vooronderzoek was het grote verschil in effectiviteit van de kleurstoffen voor *L. pneumophila* bacteriecellen gegroeid onder laboratoriumcondities (rijk medium) en cellen die zijn gegroeid onder "natuurlijke" condities in o.a. koelwaterinstallaties, proceswater of leidingwater. Voor (routinematige) toepassing van de methode in praktijksituaties is het vooral van belang inzicht te krijgen in de werkzaamheid van de kleurstoffen op deze natuurlijk gegroeide bacteriepopulaties. Ook de werkzaamheid en het onderscheidend vermogen van de kleurstoffen na praktijkrelevante desinfectiemethoden is nader geanalyseerd. Het onderzoek heeft zich gericht op de volgende aspecten:

1. Harmonisatie en optimalisatie van de werkwijze;
 - i. Kleuring in suspensie of op filter
 - ii. Belichtingswijze en -tijd
 - iii. Optimalisatie concentratie EMA en PMA
 - iv. Incubatietemperatuur tijdens kleuring
 - v. Voorbehandeling met natriumdeoxycholaat;
 - vi. Invloed van de ampliconlengte op effectiviteit van de kleurstoffen;
2. Werking van de kleurstoffen na verschillende praktijkrelevante desinfectiemethoden.

Voor het onderzoek is *L. pneumophila* als doelorganisme geselecteerd. Ter vergelijking van de resultaten met *L. pneumophila* zijn in het vooronderzoek tevens enkele experimenten uitgevoerd met de voor drinkwater relevante micro-organismen *Escherichia coli* en *Aeromonas* spp.

2.2 Optimalisatie van de werkwijze

2.2.1 Kleuring van cellen in suspensie of op filter

In het vooronderzoek zijn door de laboratoria van Vitens en KWR verschillende protocollen toegepast. Het belangrijkste verschil was dat het Vitens laboratorium de kleuring uitvoerde in suspensie en het KWR laboratorium op het filter, na filtratie van het monster. De kleuring in suspensie is geënt op de werkwijze van de kweekmethode voor detectie van *Legionella*. Hiervoor worden de cellen na filtratie losgetrild van het filter en in suspensie gebracht. De EMA/PMA experimenten zijn uitgevoerd op deze cel suspensie. In vergelijking hiermee is de

kleuring rechtstreeks op het filter minder bewerkelijk omdat direct na de filtratie de kleuring kan worden gestart. Het is bij deze werkwijze echter niet mogelijk hetzelfde monster zowel met de kweekmethode als met de qPCR-methode te analyseren. Bij kleuring op het filter is het ook lastiger om verschillende variaties in de werkwijze zoals incubatietemperatuur te analyseren. Vanwege de problemen met filterkleuring is in dit onderzoek gekozen om bij alle experimenten de kleuring uit te voeren op geconcentreerde en vervolgens geresuspendeerde bacteriecellen.

2.2.2 Belichtingswijze, –tijd en temperatuur

Gedurende het onderzoek zijn verschillende lichtbronnen toegepast en vergeleken om het EMA en PMA in de monsters te cross-linken (Tabel 2.1). De verschillende lampen zijn geplaatst in een statief waarna de reactievaatjes met de monsters eronder zijn gelegd voor het proces van cross-linken van EMA/PMA met het DNA. Hierbij is waargenomen dat de gloeilamp van 650 Watt zoveel warmte produceert dat er een risico is dat de temperatuur in de monsters teveel oploopt. De PhastBlue belichter kwam gedurende het onderzoek beschikbaar. Deze belichter is specifiek ontwikkeld voor de EMA/PMA methode.

TABEL 2.1: DIVERSE LICHTBRONNEN VOOR CROSS-LINKEN VAN EMA EN PMA MET HET DNA

Lichtbron	Opmerking
Verlichting lab	Reguliere verlichting die bij normaal gebruik van toepassing is
Bureaulamp	25 Watt gloeilamp
Bureaulamp TL	2x 15 Watt
Gloeilamp 650 Watt	In te stellen van 0 tot 100%
LED lamp 16 Watt	Philips MASTER LEDspot PAR 38 MV
PhastBlue	genIUL (9000700)

Om de werking van EMA en PMA verder te optimaliseren, zijn in de verschillende experimenten zowel de kleuringstijd als ook de incubatietemperatuur van de monsters gedurende de kleuring gevarieerd. Een langere kleuringstijd zal mogelijk resulteren in een verbeterd onderscheidend vermogen van de kleurstoffen maar zal tegelijk de “hand on time” van de procedure doen toenemen. Een hogere incubatietemperatuur zal tot gevolg hebben dat de “vloeibaarheid” van de celmembranen toeneemt en daarmee waarschijnlijk ook de mogelijkheid van EMA en PMA om het celmembraan te passeren.

2.2.3 Gebruik Natriumdeoxycholaat

Gedurende het onderzoek is er een wetenschappelijke publicatie verschenen waarin is beschreven dat co-incubatie van natriumdeoxycholaat met PMA resulteert in een beter opname van PMA door dode *Salmonella*-cellen (Nkuipou-Kerfach et al., 2013). In het artikel staat ook dat de keerzijde van de behandeling voor *Listeria*-cellen is dat naast een betere opname van PMA in dode cellen, ook een toename van opname van PMA in levende cellen is vastgesteld. Dit resulteert in een vals negatieve afname van het kwantitatieve detectieresultaat met qPCR. In dit onderzoek is bepaald welk effect co-incubatie van verschillende concentraties natriumdeoxycholaat heeft op het onderscheidend vermogen van EMA en PMA op de opname van PMA en EMA in dode en levende *L. pneumophila* cellen.

2.2.4 Ampliconlengte

De inhibitie van EMA en PMA op de amplificatie van DNA in de PCR berust op het feit dat de moleculen een verbinding maken tussen de twee DNA-strengen waardoor deze niet meer uit elkaar kunnen smelten. Voor het vermenigvuldigen van het DNA tijdens de PCR (maar ook in de cel) is dit noodzakelijk. Het is aannemelijk dat hoe langer het DNA-fragment is dat wordt

vermenigvuldigd in de PCR, de kans ook toeneemt dat een EMA of PMA molecuul aan dit DNA fragment bindt. Ook in verschillende wetenschappelijke publicaties is dit aangetoond bij verschillende bacteriesoorten (Soejima et al., 2011b; Contreras et al., 2011; Burillo et al., 2004; Banihashemi et al., 2012; Fittipaldi et al., 2012). In enkele experimenten zijn twee verschillende qPCR-methoden naast elkaar toegepast om zo te onderzoeken of dit effect heeft op het onderscheidend vermogen voor *L. pneumophila*. In deze experimenten is naast de standaard NEN 6254 methode waarin een PCR-fragment van 150 bp. wordt vermenigvuldigd ook een methode toegepast die door Vitens is ontwikkeld en waarbij een DNA-fragment van ongeveer 800 bp. van *L. pneumophila* serogroep 1 wordt vermenigvuldigd.

2.3 Praktijkrelevante desinfectiemethoden

In praktijksituaties worden verschillende desinfectiemethoden toegepast om legionellabacteriën te bestrijden. Om de werking van EMA en PMA na toepassing van praktijkrelevante desinfectiemethoden te onderzoeken zijn de toegepaste middelen geselecteerd en geanalyseerd die het meest in de praktijk worden toegepast (Tabel 2.2). De concentratie die is toegepast is de maximale dosering voor een shockbehandeling (i.t.t. continudosering). Voor de biocides is dit op basis van de door de leverancier aangegeven concentratie en contacttijd geweest.

TABEL 2.2: OMSCHRIJVING DESINFECTIEMETHODEN VOOR LEGIONELLA

	Desinfectiemethode	Middel	Oxidatief	concentratie	contacttijd bij KT
1	Onbehandeld	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.	n.v.t.
2	Thermisch	verhitting	nee	70 °C	20 min
3	Thermisch	verhitting	nee	80 °C	20 min
4	Natriumhypochloriet	NaOCl (5% vrij chloor)	ja	20 mg/l	16 uur
5	Organische Biocide	Nalco 2510 (DBNPA) ¹	nee	50 ppm	16 uur
6	Organische Biocide	Nalco 73500 (gluraaraldehyde) ¹	nee	200 ppm	16 uur
7	Organische Biocide	Nalco 7330 (isothiazoline) ¹	nee	100 ppm	24 uur
8	Organische Biocide	Lubron DBNPA ²	nee	100 mg/l	16 uur
9	Organische Biocide	Lubron T (isothiazoline) ²	nee	240 mg/l	24 uur
10	Waterstofperoxide	H ₂ O ₂ (342 g/l stockoplossing)	ja	500 mg/l	24 uur

Beschikbaar gesteld door: ¹, Jaco Luijendijk, Nalco Europe BV, 's-Hertogenbosch NL en ², Frank Pasman, Lubron Waterbehandeling b.v., Oosterhout, Nederland

2.4 Detectiemethoden

2.4.1 qPCR met probe detectie

De PCR is een moleculaire detectiemethode waarbij een kenmerkende DNA-sequentie wordt vermeerderd met behulp van specifieke primers en een specifiek DNA-probe. Tijdens de DNA-vermenigvuldiging bindt deze fluorescent gelabelde DNA-probe aan het nieuw gevormde DNA. De toename in fluorescentie wordt "real-time" gemeten en door een kalibratielijn met bekende DNA-concentraties in hetzelfde experiment te analyseren is het mogelijk de oorspronkelijke DNA-concentratie van het target-DNA te berekenen. Door verschillende gelabelde DNA-probes toe te passen is het mogelijk meerdere DNA-fragmenten (max. 5) in één qPCR te kwantificeren (multiplex reactie). De NEN 6254 methode die in dit onderzoek is toegepast voor detectie van *L. pneumophila* omvat primers en probe voor detectie van *L. pneumophila* en een interne controle DNA. Deze interne controle (DNA-plasmide) die na de filtratie aan de monsters wordt toegevoegd geeft kwantitatief inzicht in

het rendement van de DNA-extractie en eventuele remming van de PCR. In het onderzoek zijn alle qPCR-resultaten gecorrigeerd voor het rendement van de interne controle (conform NEN 6254).

In hoofdstuk 3.2.2. is naast NEN 6254 ook een door Vitens ontwikkelde qPCR-methode specifiek voor *L. pneumophila* s.g. 1 toegepast (primers lpneuhypprotF en lpneuhypprotR en probe lpneuhypprotP). Hierbij is ook een interne controle meegenomen en zijn de resultaten gecorrigeerd voor het rendement van de interne controle (conform NEN 6254).

2.4.2 Kweekmethode *Legionella*

De watermonsters zijn voorafgaande aan het onderzoek en na desinfectie geanalyseerd op de aanwezigheid van kweekbare legionellabacteriën conform NEN 6265 op Buffered Charcoal Yeast Extract agar (BCYE).

2.5 Overzicht watermonsters

In het onderzoek zijn zowel reïnculturen, die opgekweekt zijn in het laboratorium, als ook watermonsters afkomstig uit praktijksituaties (koeltorens, proceswater) of een proefinstallaties (pentamonitor) gebruikt (Tabel 2.3). Een voorwaarde waaraan de watermonsters moesten voldoen was dat de *L. pneumophila* concentratie hoog genoeg was ($>10^4$ genkopieën (gk)/PCR) om de reductie van detectiesignaal door toepassing van EMA en PMA na desinfectie vast te kunnen stellen. Hiervoor was het in enkele gevallen noodzakelijk de aanwezige *L. pneumophila* cellen uit verschillende watermonsters te verzamelen en te concentreren door middel van membraanfiltratie conform NEN 6265 of NEN 6254 en/of door centrifugatie waarbij de monsters 10 minuten zijn gecentrifugeerd bij 4000 x g. De koel- en proceswatermonsters zijn door het Vitens laboratorium verzameld door alle monsters eerst te screenen met de standaard kweekmethode. Het resterende concentraat afkomstig van de filtratie en resuspensie (ongeveer 5 ml) is bewaard en bij een positieve kweek is het concentraat vervolgens naar KWR vervoerd voor het onderzoek. Deze aanpak had wel tot gevolg dat deze monsters ongeveer een week in de koelkast zijn bewaard alvorens te worden getest in het onderzoek.

TABEL 2.3: OMSCHRIJVING WATERMONSTERS

Omschrijving/herkomst	Experiment	Herkomst cultuur
<i>L. pneumophila</i> , sg1, philadelphia, (ATCC 33152)	1	Reincultuur gekweekt op BCYE
<i>L. pneumophila</i> , eerstelijns controle Vitens laboratorium	4	Reincultuur gekweekt op BCYE
<i>Escherichia coli</i> WR1	2	Reincultuur gekweekt op LSA
<i>Aeromonas</i> M800	3	Reincultuur gekweekt op ADA
Proceswater (>5 x 10 ⁵ kve/l)	4	Milieustam <i>L. pneumophila</i> s.g. 2-14
<i>L. pneumophila</i> entfles ¹ nr. 67	5	Milieustam <i>L. pneumophila</i> s.g. 1
Pentamonitor ² water en ringen (M-101198 en M-101199)	6, 8	Milieustam (natuurlijk gegroeid ¹)
Proceswater samengesteld uit verschillende gepoolde proceswaters	7	Milieustam (natuurlijk gegroeid ¹)
Koelwatermonster (twee gepoolde koelwatermonsters)	9	Milieustam (natuurlijk gegroeid ¹)
Koelwatermonster	10, 11	Milieustam (natuurlijk gegroeid ¹)

¹Entfles is een laboratoriumcultuur van steriel drinkwater geaddeerd met enkele stukjes zacht plastic en geënt met koelwater dat besmet is met *L. pneumophila*; ²Pentamonitor is een monitor bestaande uit vijf kolommen waardoor water stroomt. In deze kolommen worden ringen geplaatst waar biofilmvorming op plaatsvindt. Aan de kolommen wordt *L. pneumophila* geënt waardoor groei van *L. pneumophila* in de biofilm op de ringen en in het water plaatsvindt, vergelijkbaar met een natuurlijke situatie.

2.6 “Standaard” experiment

Voor de verschillende experimenten in het onderzoek is een overeenkomende opzet gehanteerd. In elk experiment zijn op ieder watermonster de volgende analyses en behandelingen uitgevoerd:

1. Onbehandeld watermonster
2. Onbehandeld watermonster, met toevoeging van bijv. deoxycholaat (evt. conc. reeks)
3. Onbehandeld watermonster, zonder toevoegingen, EMA/PMA behandeling (evt. conc. reeks)
4. Onbehandeld watermonster, met toevoegingen, EMA/PMA behandeling
5. Gedesinfecteerd watermonster
6. Gedesinfecteerd watermonster, met toevoeging
7. Gedesinfecteerd watermonster, zonder toevoegingen, EMA/PMA behandeling
8. Gedesinfecteerd watermonster, met toevoegingen, EMA/PMA behandeling
9. Blanco's en interne controle
10. Standaard kweekmethode

Door deze monsters in elk experiment te analyseren is het mogelijk om alle mogelijke invloeden van het toevoegen van bijv. deoxycholaat of hogere incubatietemperatuur tijdens kleuring, nauwkeurig te analyseren/kwantificeren. Mogelijk “vals negatief” effect door de reductie van detectiesignaal door de EMA of PMA behandeling bij onbehandelde en mogelijk nog membraanintacte cellen, wordt met het analyseren van de monsters 3 en 4 inzichtelijk gemaakt.

2.7 Overzicht experimenten

In Tabel 2.4 zijn de elf experimenten kort samengevat, waarbij wordt aangegeven welke variabelen zijn onderzocht in de verschillende experimenten. In bijlage I zijn de condities waaronder de experimenten zijn uitgevoerd uitgebreider beschreven.

TABEL 2.4 DE VARIABELEN DIE ZIJN ONDERZOCHT IN DE ELF VERSCHILLENDE EXPERIMENTEN

Experiment	Organisme	Onderzochte variabelen
1	<i>L. pneumophila</i> labcultuur	Effect incubatietijd met EMA/PMA Effect concentratie EMA/PMA Effect thermische desinfectie (70°C, 30 min)
2	<i>E. coli</i> labcultuur	Effect concentratie EMA/PMA Effect thermische desinfectie (70°C, 30 min)
3	<i>Aeromonas</i> labcultuur	Effect concentratie EMA/PMA Effect thermische desinfectie (70°C, 30 min)
4	<i>L. pneumophila</i>	Effect kort versus lang DNA fragment Effect labcultuur versus proceswater Effect 650 Watt lamp versus Phastblue lamp Effect thermische desinfectie (80°C, 5 min)
5	<i>L. pneumophila</i> labcultuur	Effect toevoegen deoxycholaat Effect temperatuur incubatie PMA/EMA Effect thermische desinfectie (80°C, 15 min)
6	<i>L. pneumophila</i> pentamonitor	Effect toevoegen deoxycholaat Effect temperatuur incubatie PMA/EMA Effect thermische desinfectie (70°C, 15 min)
7	<i>L. pneumophila</i> proceswater	Effect temperatuur incubatie PMA/EMA Effect thermische desinfectie 70°C versus 80°C (15 min)
8	<i>L. pneumophila</i> pentamonitor	Effect verschillende concentraties deoxycholaat Effect thermische desinfectie (70°C, 15 min)
9	<i>L. pneumophila</i> koeltorenwater	Effect verschillende concentraties deoxycholaat Effect thermische desinfectie (70°C, 15 min)
10	<i>L. pneumophila</i> koeltorenwater	Effect toevoegen deoxycholaat Effect thermische desinfectie (70°C, 15 min)
11	<i>L. pneumophila</i> koeltorenwater	Effect verschillende desinfectiemethoden

3 Resultaten en discussie

In het onderzoek naar de optimalisatie en evaluatie van de DNA-bindende stoffen EMA en PMA in praktijkrelevante situaties om onderscheid te maken tussen intacte en membraanbeschadigde cellen, zijn in het vooronderzoek en aansluitende onderzoek in opdracht van BTO meer dan 41 experimenten uitgevoerd. Uit deze experimenten zijn 11 experimenten geselecteerd die representatief zijn en aantoonbaar maken wat de werking is van EMA en PMA bij de specifieke experimentele condities die zijn getest (Tabel 2.4). In Bijlage 1 zijn de resultaten van deze experimenten in detail weergegeven, in dit hoofdstuk zijn de belangrijkste resultaten van elk experiment samengevat. De watermonsters zijn zowel onbehandeld als na thermische desinfectie geanalyseerd. Hierbij is de aanname dat de cellen in de onbehandelde monsters levend zijn, terwijl de cellen in met desinfectie behandelde monsters dood zijn. Dit is gecontroleerd door de bacteriën ook te kweken en daarbij alleen monsters zijn geselecteerd waarbij het aantal kolonievormende eenheden in de onbehandelde monsters voldoende hoog waren (bij voorkeur $>10^3$ /ml) terwijl in de gedesinfecteerde monsters geen kweekbare bacteriën werden teruggevonden.

3.1 Onderscheidend vermogen van EMA en PMA met in laboratorium gegroeide culturen

In het vooronderzoek zijn verschillende experimenten met EMA en PMA uitgevoerd met in het laboratorium gegroeide bacterieculturen van *L. pneumophila*, *E. coli* en *Aeromonas* stam M800.

3.1.1 *L. pneumophila* (experiment 1)

In een eerste experiment is een *L. pneumophila* ATCC 33152 cultuur behandeld met EMA of PMA, waarbij ook het effect van thermische desinfectie voor 30 min bij 70°C is onderzocht. Tevens is in dit experiment onderzocht of de belichtingstijd met LED lampen (zie paragraaf 2.2.2) voor het cross-linken van de kleurstoffen aan het DNA van invloed is op de effectiviteit en reductie van het detectiesignaal. Tot slot zijn verschillende concentraties EMA en PMA toegepast.

In de onbehandelde monsters is een geringe reductie van detectiesignaal (log-afname van de genkopie concentratie van *L. pneumophila*) waargenomen (Tabel 3.1), maar deze reductie is duidelijk verschillend tussen EMA en PMA. Bij EMA is een reductie van 0,5 tot 1,1 log-eenheden waargenomen. EMA kan dus bij een deel van de onbehandelde cellen het membraan passeren en zo de detectie met qPCR verhinderen. De reductie van het aantal genkopieën neemt ook duidelijk toe bij een hogere EMA concentratie ($50 > 25 > 10$ µg/ml), terwijl de incubatietijd geen invloed lijkt te hebben. PMA resulteert in een minder grote reductie van het aantal genkopieën (0,2 logeenheid) die gelijk is bij hoge en lage concentratie PMA en bij korte of lange incubatietijd. De twee kleurstoffen geven dus een verschillend beeld over het aantal membraanintacte cellen in het monster.

Uit monster 12 blijkt dat een thermische behandeling van 30 min. bij 70°C vrijwel geen invloed heeft op het aantal genkopieën. Na EMA-behandeling is de reductie in het aantal genkopieën tot maximaal 4,1 log bij 50 µg/ml EMA en 15 min. cross-linken. De reductie door EMA is onvoldoende om alle aanwezige *L. pneumophila* DNA in de cellen te cross-linken. Ook de PMA-behandeling laat een reductie van het aantal genkopieën zien (maximaal 1,2 log bij 200 mg/ml PMA en 15 min. cross-linken), maar deze is aanzienlijk minder ten

opzichte van EMA. Het toepassen van een hogere concentratie EMA en PMA in de kleuring resulteert in een betere werking van de EMA- en PMA-behandeling (grotere afname van het aantal levende cellen). De resultaten van het onbehandelde water hebben echter laten zien dat die hogere concentraties mogelijk leiden tot vals-negatieven (levende cellen die door binding van DNA met EMA niet langer worden gekwantificeerd). Aanvullende experimenten zijn echter nodig om dit effect aan te tonen. Een toename van de incubatietijd van de behandelde monsters met EMA of PMA leidt over het algemeen ook tot een toename in reductie van het aantal genkopieën, maar dit effect is minder groot dan de invloed van de onderzochte concentraties EMA of PMA.

TABEL 3.1: REDUCTIE VAN HET AANTAL GENKOPIEËN VAN *L. PNEUMOPHILA* DOOR EEN EMA OF PMA BEHANDELING VAN EEN LABORATORIUM CULTUUR VAN *L. PNEUMOPHILA* (ATCC33152) NA THERMISCHE DESINFECTIE VAN 30 MIN. BIJ 70 °C

	Monsteromschrijving	<i>L. pneumophila</i> Reductie (log)		
1.	ATCC33152, ongekleurd	-		
2.	ATCC33152, EMA (10 µg/ml), LED-lamp 5 min	-0,5		
3.	ATCC33152, EMA (25 µg/ml), LED-lamp 5 min	-0,7		
4.	ATCC33152, EMA (50 µg/ml), LED-lamp 5 min	-0,9		
5.	ATCC33152, EMA (10 µg/ml), LED-lamp 15 min	-0,5		
6.	ATCC33152, EMA (25 µg/ml), LED-lamp 15 min	-0,7		
7.	ATCC33152, EMA (50 µg/ml), LED-lamp 15 min	-1,1		
8.	ATCC33152, PMA (50 µg/ml), LED-lamp 5 min	-0,2		
9.	ATCC33152, PMA (200 µg/ml), LED-lamp 5 min	-0,2		
10.	ATCC33152, PMA (50 µg/ml), LED-lamp 15 min	-0,2		
11.	ATCC33152, PMA (200 µg/ml), LED-lamp 15 min	-0,2		
12.	ATCC33152, 70°C ongekleurd	-0,04		
13.	ATCC33152, 70°C EMA (10 µg/ml), LED-lamp 5 min	-2,2		
14.	ATCC33152, 70°C EMA (25 µg/ml), LED-lamp 5 min	-2,8		
15.	ATCC33152, 70°C EMA (50 µg/ml), LED-lamp 5 min	-3,2		
16.	ATCC33152, 70°C EMA (10 µg/ml), LED-lamp 15 min	-2,5		
17.	ATCC33152, 70°C EMA (25 µg/ml), LED-lamp 15 min	-3,1		
18.	ATCC33152, 70°C EMA (50 µg/ml), LED-lamp 15 min	-4,1		
19.	ATCC33152, 70°C PMA (50 µg/ml), LED-lamp 5 min	-0,8		
20.	ATCC33152, 70°C PMA (200 µg/ml), LED-lamp 5 min	-1,0		
21.	ATCC33152, 70°C PMA (50 µg/ml), LED-lamp 15 min	-1,0		
22.	ATCC33152, 70°C PMA (200 µg/ml), LED-lamp 15 min	-1,2		

3.1.2 *E. coli* (experiment 2)

De werking van een EMA- en PMA-behandeling voor *E. coli* is onderzocht met laboratoriumstam WR1. In tegenstelling tot de experimenten met *L. pneumophila* is er weinig verschil in de resultaten van de EMA- of PMA-behandeling met de monsters die niet thermisch zijn gedesinfecteerd (Tabel 3.2). Beide methoden meten een reductie van 0,1 log, behalve wanneer de EMA concentratie 100 µg/ml is, dan wordt een reductie van 0,6 log eenheid waargenomen. De maximale reductie na thermische desinfectie is 2,1 tot 2,8

logeenheden voor PMA en 2,9 tot 3,2 logeenheden voor EMA. In dit geval is het verschil tussen PMA en EMA dus beperkt. Uit de resultaten volgt ook dat EMA resulteert in een lagere reductie van *E. coli* dan *L. pneumophila*, terwijl PMA juist een hogere reductie van *E. coli* dan *L. pneumophila* laat zien. Ook voor *E. coli* resulteert een hoge concentratie EMA of PMA op monsters na thermische behandeling tot een grotere afname van het aantal genkopieën.

TABEL 3.2: REDUCTIE VAN HET AANTAL GENKOPIEËN VAN *E. COLI* DOOR EMA OF PMA BEHANDELING VAN EEN LABORATORIUM CULTUUR VAN *E. COLI* (WR1) NA THERMISCHE DESINFECTIE VAN 30 MIN. BIJ 70 °C

	Monsteromschrijving	<i>E. coli</i> Reductie (log)		
1.	WR1, ongekleurd	-	PMA EMA	Onbehandeld
2.	WR1, EMA (10 µg/ml)	-0,1		
3.	WR1, EMA (100 µg/ml)	-0,6		
4.	WR1, PMA (50 µg/ml)	-0,1		
5.	WR1, PMA (200 µg/ml)	-0,1		
6.	WR1, 70°C ongekleurd	0,0	PMA EMA	70°C, 30 min.
7.	WR1, 70°C EMA (10 µg/ml)	-2,9		
8.	WR1, 70°C EMA (100 µg/ml)	-3,2		
9.	WR1, 70°C PMA (50 µg/ml)	-2,1		
10.	WR1, 70°C PMA (200 µg/ml)	-2,8		

3.1.3 *Aeromonas* stam M800 (experiment 3)

Het effect van EMA of PMA op niet gedesinfecteerde monsters van een in het laboratorium gegroeide *Aeromonas*-cultuur is sterk verschillend (Tabel 3.3). De grote reductie van detectiesignaal met EMA op niet gedesinfecteerde monsters toont aan dat het zeer waarschijnlijk is dat EMA het membraan van levende *Aeromonas*-cellen kan passeren. Het membraan van levende *Aeromonas* stam M800 cellen lijkt dus permeabel te zijn voor EMA. Dit wordt verder onderstreept door het feit dat een thermische behandeling niet resulteert in een additionele reductie met EMA, hoewel het aantal cellen in de monsters wel hoog genoeg is om een grotere reductie te meten. Een behandeling met PMA van de onbehandelde cellen resulteert in tegenstelling tot EMA in een beperktere afname van het aantal genkopieën (0,7-0,8 log), maar deze afname is wel groter dan is waargenomen voor *L. pneumophila* en *E. coli*. Na thermische behandeling is de reductie van het aantal genkopieën van de monsters met PMA aanzienlijk, tot maximaal 5,3 log afname van het aantal genkopieën. De reductie die met EMA en PMA is waargenomen lijkt minder afhankelijk te zijn van de concentratie EMA of PMA dan voor de andere twee geteste bacteriesoorten.

TABEL 3.3: REDUCTIE VAN HET AANTAL GENKOPIEËN VAN *AEROMONAS* STAM M800 DOOR EMA OF PMA BEHANDELING VAN EEN LABORATORIUM CULTUUR VAN *AEROMONAS* STAM M800 NA THERMISCHE DESINFECTIE VAN 30 MIN. BIJ 70 °C

	Monsteromschrijving	<i>Aeromonas</i> Reductie (log)		
1.	M800, ongekleurd	-	EMA PMA	Onbehandeld
2.	M800, EMA (10 µg/ml)	-3,3		
3.	M800, EMA (100 µg/ml)	-5,3		
4.	M800, PMA (50 µg/ml)	-0,7		
5.	M800, PMA (200 µg/ml)	-0,8		
6.	M800, 70°C ongekleurd	0,0	EMA PMA	70°C, 30 min.
7.	M800, 70°C EMA (10 µg/ml)	-4,0		
8.	M800, 70°C EMA (100 µg/ml)	-4,4		
9.	M800, 70°C PMA (50 µg/ml)	-5,3		
10.	M800, 70°C PMA (200 µg/ml)	-4,8		

3.1.4 Discussie onderscheidend vermogen EMA en PMA bij verschillende bacteriesoorten

De resultaten van de experimenten met *L. pneumophila*, *E. coli* en *Aeromonas* laten zien dat de invloed van EMA of PMA vergelijkbaar is wanneer ze worden toegepast op thermisch gedesinfecteerde monsters. Bij thermisch gedesinfecteerde *L. pneumophila* cellen werd wel een klein verschil tussen EMA en PMA waargenomen, waarbij EMA tot een grotere logreductie leidde dan PMA. Aanvullende experimenten lieten echter zien dat dit verschil niet statistisch significant is (paragraaf 3.4.1). Tevens werd waargenomen dat ook in niet-behandelde monsters met *L. pneumophila*, *E. coli* en *Aeromonas* een logreductie werd waargenomen. Blijkbaar zijn de twee stoffen ook in staat om het celmembraan van levende cellen te passeren, waarna ze kunnen binden aan het DNA. Voor *E. coli* was deze logreductie laag, terwijl voor *Aeromonas* deze logreductie van levende cellen relatief hoog was, vooral wanneer EMA werd toegepast. Eerder onderzoek heeft ook aangetoond dat EMA en PMA het celmembraan van levende bacteriën kan passeren, waardoor de fractie levende cellen wordt onderschat (Cawthorn and Witthuhn, 2008; Flekna et al., 2007; Kobayashi et al., 2009; Kralik et al., 2010; Liang et al., 2011; Loozen et al., 2011; Nocker and Camper, 2006; Nocker et al., 2006; Rueckert et al., 2005; Vesper et al., 2008; Yanez et al., 2011). Deze onderschatting is over het algemeen groter voor EMA dan voor PMA, zoals ook is waargenomen in onze studie voor *Aeromonas* stam M800 en in mindere mate *L. pneumophila*. Wanneer EMA of PMA worden toegepast is het dus van belang om te realiseren dat beide stoffen de fractie levende cellen kan onderschatten (vals-negatieve uitslag).

Naast het verschil in EMA en PMA werd ook waargenomen dat de drie geteste bacteriesoorten verschillend reageren wanneer het EMA of PMA procedé wordt toegepast. Na thermische desinfectie van 30 min bij 70°C werden geen kweekbare *L. pneumophila*, *E. coli* en *Aeromonas* stam M800 waargenomen. De logreductie die met EMA of PMA werd waargenomen verschilde echter, met de hoogste logreductie voor *Aeromonas* stam M800 en de laagste logreductie voor *E. coli*. Doordat EMA of PMA de cel binnendringt wanneer het celmembraan beschadigd is, is de mate waarin het celmembraan wordt beschadigd door de thermische desinfectie blijkbaar verschillend tussen bacteriesoorten. Intersoortelijke variatie is ook waargenomen in andere studies voor het effect van EMA of PMA op afgedode cellen (Contreras et al., 2011; Fitipaldi et al., 2012; Soejima et al., 2011a). Naast het verschil in mate van membraanbeschadiging, wordt ook het verschil in genkopieaantallen per cel en in

DNA-sequentie genoemd als mogelijke verklaring voor deze verschillen (Chang et al., 2010; Contreras et al., 2011; Dannelley et al., 1986; Fitipaldi et al., 2012). Voor onbehandelde cellen werden ook verschillen tussen bacteriesoorten waargenomen na toepassing van het EMA of PMA procedé. De mate van logreductie van *Aeromonas* stam M800 was daarbij veel hoger dan de mate van logreductie voor de andere twee bacteriesoorten. Doordat de invloed van EMA of PMA soortspecifiek is, kan het EMA of PMA procedé niet standaard voor alle bacteriesoorten worden toegepast. Daarom dient voor iedere bacteriesoort apart te worden vastgesteld of en hoe het EMA of PMA procedé werkt. Een gevolg van de soortspecifieke reactie op het EMA of PMA procedé betekent dat EMA of PMA niet te gebruiken zijn bij studies waar de samenstelling van de totale bacteriepopulaties wordt onderzocht (bv met behulp van next generation sequencing, t-RFLP), aangezien verschillende bacteriesoorten onderdeel uitmaken van deze bacteriepopulaties.

In de experimenten is ook onderzoek gedaan naar de optimale EMA en PMA concentratie en de incubatietijd. De hoogste logreductie van thermisch behandelde cellen werd over het algemeen waargenomen wanneer de hoogste concentratie EMA of PMA werd gebruikt. In sommige gevallen resulteerde de hoge concentratie echter ook in een relatief hoge logreductie van levende cellen (bijvoorbeeld 100 µg/ml EMA met *Aeromonas* stam M800), waardoor het beter is om een concentratie EMA of PMA te kiezen die resulteert in een relatief hoge logreductie van dode cellen, maar een lage logreductie van levende cellen. In de experimenten met *L. pneumophila*, *E. coli* en *Aeromonas* stam M800 werd waargenomen dat bij hogere concentraties EMA of PMA de logreductie van het aantal levende cellen (vals-negatief) toenam. Eerdere studies hebben ook geadviseerd om niet te hoge concentraties EMA of PMA te gebruiken. Verschillende studies hebben aangetoond dat een EMA-concentratie van 10 µg/ml het meest geschikt is (Minami et al., 2010; Shi et al., 2011; Soejima et al., 2011a; Wang et al., 2009). In een eerdere studie naar de optimale PMA concentratie om levende *L. pneumophila* cellen te detecteren, werd geconcludeerd dat 123 µg/ml PMA resulteerde in inhibitie van levende cellen, terwijl dit niet werd waargenomen wanneer 30 µg/ml PMA werd gebruikt (Yanez et al. 2011). In onze studie is een concentratie van 30 µg/ml PMA niet onderzocht, maar werd waargenomen dat 50 µg/ml PMA ook resulteerde in een beperkte inhibitie van levende cellen. Op basis van de resultaten van onze studie en eerder gepubliceerde studies is gekozen om een relatief lage concentratie EMA en PMA te gebruiken (10 µg/ml voor EMA en 50 µg/ml voor PMA), zodat de detectie van het aantal vals-negatieve cellen tijdens de experimenten laag is. De reacties met EMA en PMA bij *L. pneumophila* cellen zijn ook uitgevoerd met 5 min. of 15 min. incubatietijd. Aangezien dit geen aantoonbaar effect had op de resultaten is voor de verdere experimenten gekozen om een incubatietijd van 10 min. te hanteren.

TABEL 3.4: REDUCTIE VAN HET AANTAL GENKOPIEËN VAN *L. PNEUMOPHILA* DOOR EMA OF PMA BEHANDELING VAN *L. PNEUMOPHILA* (EERSTELIJN CONTROLE EN PROCESWATER) NA THERMISCHE DESINFECTIE VAN 5 MIN. BIJ 80 °C BEPAALD OP BASIS VAN TWEE VERSCHILLENDE QPCR-PROTOCOLLEN EN DOOR BELICHTING MET RESPECTIEVELIJK EEN 650W LAMP OF DE PHAST BLUE CROSS LINKER

	Monsteromschrijving	PCR-fragment				
		Kort (150 bp)	Lang (800 bp)			
		Reductie (log)	Reductie (log)			
1	Eerstelijn controle onbehandeld, ongekleurd			Eerstelijn controle	Phast Blue	
2	Eerstelijn controle onbehandeld, PMA (40 µg/ml)	-0,1	0,2			
3	Eerstelijn controle onbehandeld, EMA (10 µg/ml)	-1,4	-1,5			
4	Eerstelijn controle desinfectie, ongekleurd	-0,1	0,06			
5	Eerstelijn controle desinfectie, PMA (40 µg/ml)	-0,2	-0,1			
6	Eerstelijn controle desinfectie, EMA (10 µg/ml)	-1,6	-1,4			
7	Proceswater onbehandeld, ongekleurd			Proceswater		
8	Proceswater onbehandeld, PMA (40 µg/ml)	-0,1	-0,02			
9	Proceswater onbehandeld, EMA (10 µg/ml)	-0,5	-0,3			
10	Proceswater desinfectie, ongekleurd	0,4	0,7			
11	Proceswater desinfectie, PMA (40 µg/ml)	-0,2	0,2			
12	Proceswater desinfectie, EMA (10 µg/ml)	-0,2	-0,09			
13	Eerstelijn controle onbehandeld, ongekleurd			Eerstelijn controle	650W lamp	
14	Eerstelijn controle onbehandeld, PMA (40 µg/ml)	-0,1	-0,3			
15	Eerstelijn controle onbehandeld, EMA (10 µg/ml)	-1,1	-1,6			
16	Eerstelijn controle desinfectie, ongekleurd	-0,1	-0,09			
17	Eerstelijn controle desinfectie, PMA (40 µg/ml)	-0,3	-0,3			
18	Eerstelijn controle desinfectie, EMA (10 µg/ml)	-1,3	-1,9			
19	Proceswater onbehandeld, ongekleurd			Proceswater A		
20	Proceswater onbehandeld, PMA (40 µg/ml)	-0,2	-0,2			
21	Proceswater onbehandeld, EMA (10 µg/ml)	-0,7	-0,8			
22	Proceswater desinfectie, ongekleurd	0,02	0,03			
23	Proceswater desinfectie, PMA (40 µg/ml)	-0,01	-0,04			
24	Proceswater desinfectie, EMA (10 µg/ml)	-0,3	-0,5			

3.2 Optimalisatie werkwijze toepassing EMA en PMA

3.2.1 Concentratie EMA en PMA en incubatietijd EMA en PMA (experiment 1)

Deze resultaten zijn beschreven in paragraaf 3.1 en op basis daarvan is de keuze gemaakt om een EMA concentratie van 10 µg/ml en een PMA concentratie van 50 µg/ml te gebruiken in combinatie met een incubatietijd van 10 minuten (zie paragraaf 3.1.4).

3.2.2 Lamp voor crosslinken EMA/PMA met DNA (experiment 4)

Verschiede lampen kunnen worden gebruikt voor de crosslinkreactie tussen EMA/PMA en het DNA. Binnen dit onderzoek zijn verschillende lampen getest (zie Tabel 2.1 voor de lamptypen), maar de resultaten van deze testen zijn niet allemaal weergegeven. In Tabel 3.4 zijn de resultaten weergegeven van een vergelijking tussen een 650 Watt lamp en een Phast Blue lamp. De laatste lamp is speciaal ontwikkeld voor de EMA/PMA applicatie. Over het algemeen is de reductie in het aantal genkopieën van *L. pneumophila* hoger met de 650 Watt

lamp dan met Phast Blue lamp maar de verschillen zijn klein. Een mogelijke verklaring voor dit verschil is dat de temperatuur van het monster aanzienlijk kan toenemen met het gebruik van de 650 Watt lamp, wat mogelijk kan leiden tot afdoding en/of membraanbeschadiging van de bacteriecellen die worden belicht. Hierdoor is gekozen om bij de verdere experimenten de speciaal voor deze doeleinde ontwikkelde lamp (Phast Blue lamp) te gebruiken.

3.2.3 Ampliconlengte PCR (experiment 4)

Het effect van de ampliconlengte van het PCR-product op de werking van EMA en PMA is onderzocht door monsters met *L. pneumophila* te behandelen met EMA of PMA en vervolgens een kort fragment (150 baseparen) en een aanzienlijk langer fragment (800 baseparen) van *L. pneumophila* DNA te amplificeren. Het grootste effect van ampliconlengte op reductie van het aantal genkopieën wordt verwacht voor monsters die thermisch zijn behandeld. Daarom worden in de tekst alleen die monsters beschrijven, maar in Tabel 3.4 zijn de resultaten van alle monsters weergegeven. De ampliconlengte had niet veel effect op de mate van reductie van het aantal genkopieën van *L. pneumophila* (maximaal 0,2 log verschil tussen korte en lange ampliconlengte) opgekweekt in een rijk voedingsmedium en belicht na EMA of PMA behandeling met de Phast Blue lamp (Tabel 3.4). Over het algemeen waren de resultaten hetzelfde wanneer een 650 Watt lamp in plaats van de Phast Blue lamp werd gebruikt met deze *L. pneumophila* cellen. De uitzondering was echter de EMA behandeling, met die behandeling werd waargenomen dat de reductie met het lange fragment 0,6 logeenheid hoger was dan met het korte fragment (1,9 versus 1,3 logeenheden reductie, respectievelijk). Voor *L. pneumophila* uit het proceswater waren voor alle thermisch gedesinfecteerde monsters en voor zowel EMA- als PMA-behandelde monsters slechts kleine verschillen waargenomen in de mate van reductie tussen het korte en lange ampliconfragment. Uit deze resultaten wordt geconcludeerd dat de ampliconlengte weinig effect heeft op de reductie van het aantal genkopieën van *L. pneumophila* wanneer deze monsters worden geïncubeerd met EMA of PMA. Voor het vervolg van het onderzoek is dan ook de op NEN6254 gebaseerde qPCR-methode toegepast waarin een kort DNA fragment van 150 baseparen wordt geamplificeerd.

3.2.4 Incubatietemperatuur met EMA of PMA (experiment 5, 6 en 7)

Er zijn drie experimenten uitgevoerd waarbij twee verschillende incubatiemperaturen tijdens de kleuringsreactie naast elkaar zijn getest. In één experiment was dit kamertemperatuur versus 37°C en in de twee andere experimenten was dit 37°C versus 45°C. De resultaten van één van de twee experimenten waar 37°C versus 45°C is getest, zijn weergegeven in Tabel 3.5. De resultaten van de andere twee experimenten staan in bijlage 1 onder experiment 5 en 6. De logreductie van het aantal genkopieën van *L. pneumophila* was hoger wanneer de incubatie met EMA of PMA is uitgevoerd bij 37°C dan bij kamertemperatuur (Bijlage 1, experiment 5). Deze toename in reductie werd echter waargenomen voor cellen die niet en wel thermisch zijn gedesinfecteerd. Dit laat zien dat een hogere incubatietemperatuur leidt tot een meer doorlaatbaar membraan voor levende en dode cellen. Dit komt overeen met resultaten van eerder onderzoek, waar is waargenomen dat de temperatuur een invloed heeft op het membraanpermeabiliteit (van de Vossenberg et al., 1995). Wanneer de incubatietemperatuur met EMA of PMA verder werd verhoogd naar 45°C nam de mate van reductie nog verder toe (Tabel 3.5 en bijlage 1, experiment 6).

TABEL 3.5: REDUCTIE VAN HET AANTAL GENKOPIEËN VAN *L. PNEUMOPHILA* DOOR EMA OF PMA BEHANDELING VAN *L. PNEUMOPHILA* (PROCESWATER) NA THERMISCHE DESINFECTIE BIJ 70°C OF 80 °C, NA KLEURING BIJ 37°C OF 45°C.

		<i>L. pneumophila</i>		
	Monsteromschrijving	Reductie (log)		
1.	onbehandeld, ongekleurd		37°C	Onbehandeld
2.	onbehandeld, PMA (50 µg/ml)	-0,8		
3.	onbehandeld, EMA (10 µg/ml)	-1,6		
4.	onbehandeld, ongekleurd	-0,5	45°C	
5.	onbehandeld, PMA (50 µg/ml)	-1,4		
6.	onbehandeld, EMA (10 µg/ml)	-1,6		
7.	behandeld, ongekleurd	-0,5	37°C	desinf. 70°C
8.	behandeld, PMA (50 µg/ml)	-1,8		
9.	behandeld, EMA (10 µg/ml)	>-2,8		
10.	behandeld, ongekleurd	-0,01	45°C	
11.	behandeld, PMA (50 µg/ml)	-2,4		
12.	behandeld, EMA (10 µg/ml)	>2,7		
13.	behandeld, ongekleurd	-0,8	37°C	desinf. 80°C
14.	behandeld, PMA (50 µg/ml)	>-2,5		
15.	behandeld, EMA (10 µg/ml)	>2,4		
16.	behandeld, ongekleurd	-0,05	45°C	
17.	behandeld, PMA (50 µg/ml)	>-2,5		
18.	behandeld, EMA (10 µg/ml)	>-2,5		

3.2.5 Additie van deoxycholaat (experiment 5, 6, 8, 9 en 10)

De invloed van het toevoegen van deoxycholaat aan de incubatie met EMA of PMA is op twee manieren onderzocht. Er zijn drie experimenten uitgevoerd waarbij geen of 0,1% deoxycholaat (eindconcentratie) is toegevoegd en er zijn twee experimenten uitgevoerd waarbij geen; 0,1%; 1,0% en 2,5% deoxycholaat is toegevoegd.

De resultaten van wel of niet toevoegen van 0,1% deoxycholaat tijdens de incubatie met EMA of PMA zijn weergegeven in Tabel 3.6 (experiment 10) en in bijlage 1 (experiment 5, 6 en 10). Het toevoegen van 0,1% deoxycholaat aan *L. pneumophila* cellen gekweekt op een rijk voedingsmedium en niet met desinfectie behandeld resulteerde in een minder grote reductie van het aantal genkopieën dan wanneer geen deoxycholaat werd toegevoegd (Bijlage 1, experiment 5), maar het verschil was klein (0,1 tot 0,3 logeenheid). Bij het gebruik van *L. pneumophila* cellen die onder meer natuurlijke condities zijn gegroeid in een biofilmmonitor (de pentamonitor) is waargenomen dat in sommige gevallen de reductie met 0,1% deoxycholaat kleiner was dan zonder deoxycholaat (0 tot 0,1 logeenheid lager). Er waren echter ook niet gedesinfecteerde monsters waar de reductie met 0,1% deoxycholaat groter was dan zonder deoxycholaat (0,1 tot 0,3 logeenheid hoger)(Bijlage 1, experiment 6). Tot slot is voor *L. pneumophila* uit koeltorenwater waargenomen dat het toevoegen van 0,1% deoxycholaat leidde tot vergelijkbare reductie of 0,1 log meer reductie dan wanneer deoxycholaat niet werd toegevoegd (Tabel 3.6). Het toevoegen van deoxycholaat lijkt dus weinig effect te hebben op niet gedesinfecteerde *L. pneumophila* cellen die onder natuurlijke condities zijn gegroeid.

TABEL 3.6: REDUCTIE VAN HET AANTAL GENKOPIEËN VAN *L. PNEUMOPHILA* DOOR EMA OF PMA
BEHANDELING VAN *L. PNEUMOPHILA* (KOELTORENWATER NA THERMISCHE DESINFECTIE BIJ 70°C EN NA AL
DAN NIET TOEVOEGING VAN 0,1% DEOXYCHOLAAT

	Monsteromschrijving	<i>L. pneumophila</i> Reductie (log)	
1.	onbehandeld, - deoxycholaat, ongekleurd		Onbehandeld
2.	onbehandeld, + deoxycholaat, ongekleurd	-0,2	
3.	onbehandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	-0,7	
4.	onbehandeld, + deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	-0,8	
5.	onbehandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	-1,3	
6.	onbehandeld, + deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	-1,3	
7.	behandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	0,05	Desinfectie
8.	behandeld, + deoxycholaat, ongekleurd	0,04	
9.	behandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	-1,6	
10.	behandeld, + deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	-1,9	
11.	behandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	-2,3	
12.	behandeld, + deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	-2,1	

Het toevoegen van 0,1% deoxycholaat aan thermisch gedesinfecteerde *L. pneumophila* cellen die zijn gekweekt in een rijk medium leidde tot een hogere reductie wanneer de incubatie met EMA of PMA is uitgevoerd bij kamertemperatuur (Bijlage 1, experiment 5). De toename in reductie was daarbij 0,4 tot 0,7 logeenheid. Bij een incubatietemperatuur van 37°C is echter waargenomen met EMA dat een afname in reductie plaatsvindt door toevoeging van 0,1% deoxycholaat (0,6 logeenheid afname). PMA is onder deze condities met 0,1% deoxycholaat niet ingezet. Wanneer *L. pneumophila* cellen uit de biofilmmonitor worden geanalyseerd onder dezelfde condities, dan is waargenomen dat het toevoegen van 0,1% deoxycholaat resulteert in 0 tot 0,7 logeenheid meer reductie dan wanneer geen deoxycholaat is toegevoegd (Bijlage 1, experiment 6). Tot slot zijn op dezelfde wijze ook *L. pneumophila* cellen uit koeltorenwater geanalyseerd en daarbij is waargenomen dat het toevoegen van 0,1% deoxycholaat resulteert in een reductietoename van 0,3 logeenheid genkopieën voor incubatie met PMA, maar een reductieafname van 0,2 logeenheden is waargenomen na toevoegen van 0,1% deoxycholaat wanneer is geïncubeerd met EMA (Tabel 3.6). Het effect van toevoegen van 0,1% deoxycholaat wisselt dus tussen de verschillende experimenten en een eenduidig effect van toevoegen van 0,1% deoxycholaat tijdens de EMA/PMA behandeling op thermisch gedesinfecteerde *L. pneumophila* is niet waargenomen. In vervolg experimenten is daarom achterhaald wat het effect is van het toevoegen van verschillende concentraties deoxycholaat.

In twee experimenten is bepaald wat het effect op de reductie van het aantal genkopieën is wanneer tijdens de incubatie met EMA en PMA 0%; 0,1%; 1,0% en 2,5% deoxycholaat wordt toegevoegd. De resultaten laten zien dat het toevoegen van de verschillende concentraties deoxycholaat geen invloed had op het aantal *L. pneumophila* cellen wanneer er geen EMA en PMA werd toegevoegd (Tabel 3.7, bijlage 1, experiment 9). Dit betekent dus dat het toevoegen van deoxycholaat geen invloed heeft op afsterving of groei van *L. pneumophila*. Toevoeging van de verschillende concentraties deoxycholaat tijdens de PMA behandeling van *L. pneumophila* cellen uit een biofilmmonitor die niet thermisch zijn gedesinfecteerd resulteert in een extra 0,9 logeenheid reductie in vergelijking met cellen waar geen deoxycholaat aan is toegevoegd (Tabel 3.7). Deze extra reductie is al waargenomen met 0,1% deoxycholaat en bleef op hetzelfde niveau wanneer de concentratie is verhoogd naar 2,5% deoxycholaat. Wanneer niet gedesinfecteerde *L. pneumophila* cellen uit koeltorenwater

zijn blootgesteld aan PMA behandeling met deoxycholaat dan waren de resultaten minder eenduidig (bijlage 1, experiment 9). 0,1% deoxycholaat resulteert in dezelfde reductie als zonder deoxycholaat, terwijl hogere concentraties deoxycholaat resulteert in een 0,2 tot 0,3 minder grote reductie. Incubatie onder dezelfde condities maar dan met EMA en *L. pneumophila* cellen uit de biofilmmonitor geeft met 0,1% deoxycholaat dezelfde reductie als zonder deoxycholaat, terwijl hogere concentraties deoxycholaat resulteren in een 0,2 tot 0,3 log lagere reductie (Tabel 3.7). Wanneer EMA op onbehandelde *L. pneumophila* cellen uit koeltorenwater is gebruikt dan is er wel een duidelijk trend waarneembaar na toevoeging van verschillende concentraties deoxycholaat (bijlage 1, experiment 9). Zonder toevoeging was de reductie 2,2 log, terwijl 0,1% deoxycholaat resulteert in 1,6 log reductie, 1,0% deoxycholaat in 0,6 log reductie en 2,5% deoxycholaat in een 0,5 log reductie. In dit geval lijkt een toenemende concentratie deoxycholaat dus te resulteren in een afnemende permeabiliteit van de membranen van de onbehandelde *L. pneumophila* cellen voor EMA. Het toevoegen van verschillende concentraties deoxycholaat aan thermisch gedesinfecteerde *L. pneumophila* cellen uit de biofilmmonitor resulteerde in kleinere verandering in de reductie van het aantal genkopieën. Zo werd een 0,2 tot 0,4 logeenheid meer reductie waargenomen bij de PMA behandelde monsters waar deoxycholaat aan is toegevoegd, waarbij het kleinste verschil in reductie (0,2 log) is waargenomen voor de hoogste deoxycholaat concentratie (Tabel 3.7). Wanneer EMA in plaats van PMA werd gebruikt dan was het effect van 0,1% deoxycholaat vergelijkbaar met 0% deoxycholaat, terwijl hogere concentraties deoxycholaat resulteren in kleinere reductie van het aantal membraanintacte cellen (2,1 log reductie versus 2,4 log reductie zonder toevoeging van deoxycholaat)(Tabel 3.7). De resultaten met thermisch behandelde *L. pneumophila* cellen uit koeltorenwater en verschillende concentraties deoxycholaat tijdens de EMA/PMA incubatie zijn moeilijker te interpreteren, omdat voor een groot aantal monsters het aantal gedetecteerde genkopieën onder de detectiegrens lag (Bijlage 1, experiment 9). Uit deze resultaten volgt wederom dat het toevoegen van deoxycholaat niet tot eenduidige resultaten leidt en over het algemeen niet leidt tot een verhoging van de detectie van het aantal dode cellen in het thermisch gedesinfecteerde water.

TABEL 3.7: REDUCTIE VAN HET AANTAL GENKOPIEËN VAN *L. PNEUMOPHILA* DOOR EMA OF PMA BEHANDELING VAN *L. PNEUMOPHILA* (WATER UIT EEN PENTAMONITOR) NA THERMISCHE DESINFECTIE BIJ 70°C EN NA TOEVOEGING VAN VERSCHILLENDE CONCENTRATIES DEOXYCHOLAAT

	Monsteromschrijving	<i>L. pneumophila</i> Reductie (log)	
1.	onbehandeld, - deoxycholaat, ongekleurd		Onbehandeld <i>L. pneumophila</i>
2.	onbehandeld, 0,1% deoxycholaat, ongekleurd	-0,08	
3.	onbehandeld, 1% deoxycholaat, ongekleurd	-0,01	
4.	onbehandeld, 2,5% deoxycholaat, ongekleurd	-0,06	
5.	onbehandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	-0,5	
6.	onbehandeld, 0,1% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	-1,4	
7.	onbehandeld, 1% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	-1,4	
8.	onbehandeld, 2,5% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	-1,4	
9.	onbehandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	-1,6	
10.	onbehandeld, 0,1% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	-1,6	
11.	onbehandeld, 1% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	-1,4	
12.	onbehandeld, 2,5% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	-1,3	
13.	behandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	-0,4	Thermische desinfectie
14.	behandeld, 0,1% deoxycholaat, ongekleurd	-0,4	
15.	behandeld, 1% deoxycholaat, ongekleurd	-0,4	
16.	behandeld, 2,5% deoxycholaat, ongekleurd	-0,4	
17.	behandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	-1,8	
18.	behandeld, 0,1% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	-2,2	
19.	behandeld, 1% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	-2,2	
20.	behandeld, 2,5% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	-2,0	
21.	behandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	-2,4	
22.	behandeld, 0,1% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	-2,5	
23.	behandeld, 1% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	-2,1	
24.	behandeld, 2,5% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	-2,1	

3.2.6 Discussie optimalisatie protocol

In verschillende experimenten is onderzocht in hoeverre het procedé van EMA en PMA voor detectie van dode en levende *L. pneumophila* met qPCR kan worden geoptimaliseerd. In het eerste experiment dat werd uitgevoerd zijn verschillende concentraties EMA en PMA en incubatietijden met EMA en PMA onderzocht. De resultaten, discussie en conclusie van deze experimenten zijn echter al beschreven in paragraaf 3.1.

De experimenten beschreven in deze paragraaf 3.2 hebben zich gericht op type lamp, ampliconlengte, incubatietemperatuur en de toevoeging van deoxycholaat. De invloed van deze factoren op de werking van EMA en PMA zijn gekozen omdat in eerdere publicaties is beschreven dat de werking van EMA of PMA met deze factoren kan worden geoptimaliseerd (Fittipaldi et al., 2012 en referenties daarin). De Phast Blue lamp, die speciaal is ontwikkeld om cellen te belichten (Fittipaldi et al., 2012), is vergeleken met een halogeen lamp. De logreductie was over het algemeen hoger met de halogeenlamp dan met de Phast Blue lamp (zowel voor onbehandelde als thermische gedesinfecteerde cellen), maar de verschillen waren klein. Deze hogere logreductie met halogeenlamp is waarschijnlijk veroorzaakt doordat de lamp de temperatuur van de monsters verhoogd, zoals is waargenomen in eerdere experimenten (Fittipaldi et al., 2012). Daarom is gekozen om in het standaardprotocol de Phast Blue lamp toe te passen, zoals ook door anderen is aanbevolen (Fittipaldi et al., 2012).

In het verleden is door andere onderzoekers waargenomen dat een langer ampliconlengte van het PCR-product tot een efficiënte reductie leidt van afgedode cellen dan een korter fragment (Banihashemi et al., 2012; Change et al., 2010; Contreras et al., 2011; Fittipaldi et al., 2012; Loozen et al., 2011; Luo et al., 2010; Martin et al., 2012; Soejima et al., 2008; Soejima et al., 2011a). Daarom is in deze studie het effect van ampliconlengte op de effectiviteit van het EMA of PMA procedé op thermisch gedesinfecteerde cellen onderzocht. In tegenstelling tot deze eerdere studies werd in onze studie geen duidelijk effect van ampliconlengte (150 versus 800 baseparen) op de effectiviteit van EMA of PMA waargenomen. De logreductie die werd waargenomen met het lange PCR-fragment (800 bp) was vergelijkbaar met de logreductie die werd waargenomen met het korte PCR-fragment (150 bp). Het is onduidelijk waarom in deze experimenten geen effect van ampliconlengte werd waargenomen, maar mogelijk is het verschil in ampliconlengte onvoldoende en/of 800 baseparen onvoldoende om een duidelijk verschil waar te kunnen nemen. In de literatuur zijn ampliconlengten van 100 baseparen tot 2840 baseparen getest. Bij een grotere ampliconlengte neemt echter de PCR efficiëntie af en daarmee ook de betrouwbaarheid van de kwantificatie. Tevens is bij een langer amplicon de detectie van het PCR product met een probe niet goed meer mogelijk. Mogelijk is ook de sequentie van het doelgen of de manier van afdoding van invloed op het effect van ampliconlengte op de efficiëntie van EMA en PMA (Chang et al., 2010; Contreras et al., 2011). Doordat in onze studie geen verschil werd waargenomen tussen het lange en korte PCR-fragment en een betrouwbare kwantificatie en detectie met een probe zeer belangrijk was, is besloten om in de gebruikte procedure de gestandaardiseerde qPCR voor *L. pneumophila* (met korte ampliconlengte) toe te passen (NEN 6254).

Het gebruik van een hogere incubatietemperatuur leidde tot een hogere mate van reductie nadat de monsters thermisch zijn behandeld. Daarnaast leidde een hogere incubatietemperatuur echter ook tot een hogere mate van reductie bij de monsters die niet thermisch zijn gedesinfecteerd. Een hogere incubatietemperatuur kan dus ook leiden tot meer vals-negatieven. Voor het standaardprotocol is gekozen voor een incubatietemperatuur van 37°C. Voor deze temperatuur is gekozen omdat bij 37°C de reductie van PCR-signaal na behandeling bijna maximaal was en de toename in vals-negatieve signaal beperkt.

In een eerdere studie is waargenomen dat het toevoegen van deoxycholaat resulteerde in een betere correlatie tussen qPCR genkopieën en kolonievormende eenheden van *Vibrio vulnificus* en *E. coli* (Lee and Levin, 2009b; Yang et al., 2011). Dit wordt veroorzaakt doordat deoxycholaat de instabiliteit van het celmembraan van dode cellen doet toenemen (Lee and Levin, 2009b), waardoor effectiever alleen levende cellen worden gedetecteerd. Het effect van toevoeging van deoxycholaat tijdens het EMA of PMA procedé om levende cellen van *L. pneumophila* te kwantificeren met qPCR werd daarom ook onderzocht. De resultaten lieten echter zien dat het toevoegen van deoxycholaat niet tot eenduidige uitkomsten resulteerde. Over het algemeen kan wel worden gesteld dat toevoeging van deoxycholaat niet resulteerde in een hogere logreductie na thermische desinfectie. De reden waarom in onze studie geen invloed van deoxycholaat is waargenomen in vergelijking tot een eerdere studie van Yang et al. (2011) zou kunnen zijn dat het effect van deoxycholaat bacteriesoort specifiek is. Nkuipou-Kenfack et al. (2013) hebben laten zien dat het toevoegen van deoxycholaat niet bij alle bacteriesoorten een positief effect had. Het zou ook kunnen zijn dat deoxycholaat alleen een invloed heeft wanneer de bacteriën zijn opgekweekt onder rijke condities in het laboratorium (zoals in de studie van Lee and Levin, 2008 en Yang et al., 2011). Doordat het toevoegen van deoxycholaat niet resulteerde in een hogere logreductie van *L. pneumophila* na thermische desinfectie is er voor gekozen om deoxycholaat niet toe te voegen in het standaardprotocol.

De resultaten van de experimenten waarbij de verschillende aspecten van de werkwijze van het toepassen van EMA en PMA voor *L. pneumophila* zijn geoptimaliseerd, heeft geresulteerd in een standaardprotocol. De achtergrond waarop de keuzes voor dit protocol zijn gemaakt zijn gebaseerd op een zo gering mogelijk vals-negatief effect van EMA en PMA en tegelijk een maximale reductie van PCR-signaal bij behandelde-dode-niet-kweekbare *L. pneumophila* cellen, zoals hierboven is beschreven.

Standaard protocol:

1. EMA-PMA behandeling in suspensie (losgetrilde celsuspensie conform NEN kweekmethode *L. pneumophila*) na concentratie door middel van centrifugatie;
2. Concentratie in kleuringsreactie: EMA 10 µg/ml en PMA 50 µg/ml;
3. Incubatietemperatuur kleuringsreactie: 37°C;
4. Incubatiетijd kleuringsreactie: 10 min.;
5. Belichting in 1,5 ml reactievaatje met behulp van Phast blue lamp;
6. Geen toevoeging van deoxycholaat;
7. Detectie van *L. pneumophila* DNA volgens NEN6254 (150 baseparen DNA-fragment);
8. Voor het vaststellen van een mogelijk vals-negatief effect in elk experiment watermonster zowel met als zonder EMA- of PMA-behandeling analyseren.

3.3 Invloed van fysiologische staat *L. pneumophila* cellen

Naast de invloed van verschillende fysiologische en chemische factoren op de werking van EMA en PMA, is ook onderzocht of de fysiologische status van de *L. pneumophila* cellen invloed heeft op de werking van EMA of PMA. De laboratoriumcondities waaronder de bacterieculturen zijn gegroeid, zoals hogere incubatietemperatuur en rijkere voedingscondities, hebben mogelijk invloed op de cel morfologie en daarmee mogelijk op de werking van EMA en PMA. Van *L. pneumophila* is bekend dat onder rijkere voedingscondities de cellen filamenteus van vorm zijn, in tegenstelling tot meer losse cellen onder natuurlijke condities. De invloed van de fysiologische status van de cel is onderzocht door het effect van PMA en EMA te testen op drie verschillende categorieën cellen: (i) *L. pneumophila* cellen die zijn opgegroeid als reïncultuur onder rijke voedingscondities na inoculatie met *L. pneumophila* stam uit de stammencollectie van KWR, (ii) *L. pneumophila* cellen die zijn opgegroeid in biofilm monitors waar een natuurlijke microbiële populatie in is ontwikkeld en die vervolgens zijn geënt met een *L. pneumophila* stam uit de KWR collectie en (iii) *L. pneumophila* cellen die van nature aanwezig waren in proceswater, koeltorenwater en drinkwater uit Aruba. Hierbij zijn de resultaten gemiddeld van de experimenten waarbij de cellen thermisch zijn gedesinfecteerd (minimaal 15 min. bij 70°C of 5 min. bij 80°C) en de monsters volgens standaardprocedé voor EMA en PMA (zie paragraaf 3.2.6) (met uitzondering van incubatietemperatuur die kamertemperatuur, 37°C of 44°C was) en waarbij nog een restsignaal waarneembaar was. Voor alle drie de categorieën cellen geldt dat het gemiddelde en de standaarddeviatie is gebaseerd op vier waarnemingen. De resultaten zijn weergegeven in Tabel 3.8.

TABEL 3.8. GEMIDDELDE REDUCTIE ($\pm$ STANDAARDDEVIATIE) VAN HET AANTAL GENKOPIEËN VAN *L. PNEUMOPHILA* DOOR EMA OF PMA BEHANDELING NA THERMISCHE DESINFECTIE VAN *L. PNEUMOPHILA* CELLEN VERKREGEN NA KWEEK ALS REINCULTUUR ONDER RIJKE VOEDINGSCONDIETIES, UIT EEN BIOFILMMONITOR GEËNT MET *L. PNEUMOPHILA* NADAT EEN NATUURLIJKE BIOFILM WAS ONTWIKKELD EN UIT WATERMONSTERS UIT DE PRAKTIJK (KOELTORENWATER, PROCESWATER EN DRINKWATER ARUBA)

Status cellen	EMA				PMA			
	Onbehandeld		Behandeld		Onbehandeld		Behandeld	
	$\bar{x}$	Stdev	$\bar{x}$	Stdev	$\bar{x}$	Stdev	$\bar{x}$	Stdev
Rijke voedingscondities	0,34	0,14	2,8	0,76	0,39	0,09	2,8	0,80
Biofilmmonitor	1,3	0,70	2,4	1,5	0,50	0,10	2,0	1,1
Watermonsters praktijk	1,2	0,53	2,0	1,2	0,75	0,52	1,5	0,92

Uit de resultaten volgt dat de cellen die als reincultuur zijn opgegroeid onder rijke voedingscondities en thermisch behandeld een hogere logreductie na EMA en PMA behandeling laten zien dan de cellen die zijn gegroeid in biofilm monitors met een natuurlijke microflora, terwijl de cellen uit praktijkmonsters de laagste logreductie laten zien. Een statistische analyse van deze gegevens liet zien dat de verschillen niet significant waren ($p > 0,01$; ANOVA). Maar door de hoge standaarddeviatie is de statistische power met $n=4$ waarschijnlijk te laag. De logreductie die werd waargenomen met EMA en PMA in onbehandelde cellen was ook niet significant verschillend tussen de verschillen categorieën cellen.

De meeste studies waarin het EMA of PMA procedé voor kwantificatie van levende bacteriën is onderzocht, zijn uitgevoerd met cellen die zijn gekweekt onder rijke voedingscondities in het laboratorium (Fittipaldi et al., 2012 en referenties daarin). Slechts enkele studies hebben ook de detectie van levende cellen met behulp van EMA of PMA in natuurlijke monsters onderzocht. De resultaten van die studies laten ook zien dat met het PMA-procedé geen duidelijke onderscheid kan worden gemaakt tussen levende en dode legionellacellen wanneer deze zijn afgedood door thermische desinfectie of met biocides (Taylor et al., 2014; Ditommaso et al., 2014).

De resultaten van deze en eerdere studies lijken dus aan te geven dat resultaten die worden behaald met het toepassen van het EMA of PMA procedé in combinatie met qPCR op bacteriecellen die zijn opgekweekt onder voedselrijke condities in het laboratorium niet kunnen worden gebruikt om de effectiviteit van EMA of PMA te achterhalen voor dezelfde bacteriesoort in natuurlijke monsters. Daarom is voor het effect van praktijkrelevante desinfectiemethoden voornamelijk de reductie van *L. pneumophila* in praktijkmonsters (koelwater, proceswater) onderzocht.

3.4 Onderscheidend vermogen van EMA en PMA na behandeling met praktijkrelevante desinfectiemethoden

3.4.1 Thermische desinfectie

Een vergelijking tussen EMA en PMA behandeling laat zien dat de waarneming in logreductie door thermische desinfectie niet significant verschilt ($p > 0.01$) tussen behandeling met EMA of PMA (geldt voor alle categorieën cellen (rijke voedingsbodem, biofilm monitormonsters en praktijkmonsters tezamen) (ANOVA) alsook voor iedere categorie cellen (rijke voedingscondities, biofilm monsters of praktijkmonsters) afzonderlijk (t-test). Bij de onbehandelde cellen wordt ook een onwenselijke logreductie gezien (vals-negatief). Wanneer alle categorieën cellen tezamen worden geanalyseerd dan blijkt EMA geen significant hogere logreductie te geven dan PMA ($p > 0,01$; ANOVA) in deze onbehandelde cellen. Hetzelfde resultaat werd gevonden wanneer iedere categorie cellen afzonderlijk worden geanalyseerd ($p > 0,01$; t-test). Uit de resultaten met een beperkt aantal waarnemingen blijkt dus dat het geen verschil maakt of de behandeling met EMA of PMA wordt uitgevoerd om de logreductie van thermisch gedesinfecteerde *L. pneumophila* cellen van verschillende monsters te bepalen.

Uit de kweekresultaten is gebleken dat geen kweekbare *L. pneumophila* cellen meer aanwezig zijn na thermische desinfectie bij 70°C of 80°C. Eerder onderzoek heeft ook laten zien dat thermische desinfectie bij 70 of 80°C voor een aantal seconden voldoende is om *L. pneumophila* af te doden (Bartram et al., 2007). Wanneer EMA of PMA in staat is om een onderscheid te maken tussen dode en levende cellen, zou een EMA en/of PMA procedé op thermisch behandelde cellen moeten resulteren in de maximale logreductie (in andere woorden zou er geen restsignaal meer moeten worden waargenomen). In totaal werden 20 experimenten onder standaardcondities (paragraaf 3.2.6) (behalve incubatietemperatuur met EMA en PMA, deze was kamertemperatuur, 37°C of 44°C) uitgevoerd waarbij praktijkmonsters en monsters van de biofilmmonitor thermisch zijn gedesinfecteerd. Bij zeven van de 15 experimenten is de thermische desinfectie uitgevoerd bij 70°C en bij deze zeven experimenten werd een restsignaal waargenomen en varieerde de maximale reductie tussen 0,17 en 2,8 logeenheden genkopieën voor EMA en 0,19 tot 2,4 logeenheden genkopieën voor PMA. In deze gevallen resulteerde het EMA of PMA procedé dus in de detectie van levende cellen terwijl die niet in het thermisch gedesinfecteerde monster aanwezig waren. Bij acht experimenten is de thermische desinfectie bij 80°C uitgevoerd en bij zeven van deze acht experimenten werd geen restsignaal waargenomen en was de logverwijdering dus maximaal ($> 1,7$ tot 2,8 logeenheden voor EMA en $> 1,6$ tot 3,3 logeenheden voor PMA).

3.4.2 Vergelijking praktijkrelevante desinfectiemethoden

Naast thermisch desinfecteren is het EMA of PMA procedé ook tweemaal getest op praktijkwatermonsters behandeld met andere desinfectiemethoden die in de praktijk worden toegepast om *L. pneumophila* af te doden (drinkwater, koeltorenwater en/of proceswater). In het tweede experiment (Tabel 3.9) is de maximale dosering toegepast volgens de productinformatie van de leverancier. De resultaten van deze experimenten toonden aan dat kweekbare *L. pneumophila* cellen niet werden waargenomen na de verschillende desinfectiestappen, terwijl een restsignaal van het EMA of PMA procedé in combinatie met qPCR werd waargenomen voor vrijwel alle desinfectiemethoden, met uitzondering van natriumhypochloriet. Bij de meeste desinfectiemethoden werden dus onterecht levende *L. pneumophila* cellen gedetecteerd met de qPCR na toepassen van het EMA of PMA procedé. Wanneer natriumhypochloriet als desinfectiemiddel wordt toegepast, is het EMA of PMA procedé wel in staat om verschil in dode en levende *L. pneumophila* cellen aan te tonen. Bij de watermonsters die zijn behandeld met natriumhypochloriet werd echter waargenomen

dat ook zonder toepassing van het EMA of PMA procedé er geen genkopieën met qPCR meer werden waargenomen. In dat geval was het toepassen van het EMA of PMA procedé dus niet nodig om met qPCR vast te stellen dat alle cellen zijn afgedood.

De logreductie die is waargenomen voor de verschillende desinfectiemethoden is ook onderling met elkaar vergeleken (Tabel 3.9). Na natriumhypochloriet heeft de thermische desinfectie de hoogste logreductie (1,1 tot 2,9 logreductie met EMA en 0,6 tot 1,9 logreductie met PMA), terwijl de andere desinfectiemethoden ongeveer vergelijkbare logreducties vertoonden (0,7 tot 1,0 logreductie voor EMA en 0,2 tot 0,5 logreductie voor PMA). Die logreductie is vergelijkbaar met de logreductie die voor onbehandelde *L. pneumophila* cellen met het EMA of PMA procedé werden waargenomen. Deze resultaten laten dus zien dat een groot aantal desinfectiemethode niet leidde tot een extra logreductie met het EMA of PMA procedé.

TABEL 3.9: REDUCTIE VAN HET AANTAL GENKOPIEËN VAN *L. PNEUMOPHILA* DOOR TOEPASSING VAN EMA OF PMA PROCEDÉ OP *L. PNEUMOPHILA* CELLEN UIT KOELTORENWATER DIE ZIJN BEHANDELD MET VERSCHILLENDE PRAKTIJKRELEVANTE DESINFECTIEMETHODEN

Desinfectie	Middel/methode	Temperatuur/ concentratie	Contacttijd	EMA/PMA	Koelwater A	Koelwater B
Onbehandeld	-	-	-	EMA	0,7	0,8
				PMA	0,3	0,4
Thermisch	Verhitting	70 °C	20 min.	EMA	1,1	1,3
				PMA	0,6	0,6
Thermisch	Verhitting	80 °C	20 min.	EMA	2,5	2,9
				PMA	1,4	1,9
Natriumhypochloriet	NaOCl (5% vrij chloor)	20 mg/l	4 uur	EMA	>3,8*	>4,5*
				PMA	>3,8*	>4,5*
Organische biocide	Nalco 2510 (DBNPA)	50 ppm	4 uur	EMA	0,9	0,9
				PMA	0,4	0,4
Organische biocide	Nalco 73500 (glutaaraldehyde)	200 ppm	4 uur	EMA	0,7	0,7
				PMA	0,3	0,2
Organische biocide	Nalco 7330 (isothiazoline)	100 ppm	24 uur	EMA	0,7	0,9
				PMA	0,4	0,3
Organische biocide	Lubron DBNPA	100 mg/l	4 uur	EMA	0,8	1,0
				PMA	0,3	0,5
Organische biocide	Lubron T	240 mg/l	24 uur	EMA	0,7	0,8
				PMA	0,3	0,3
Waterstofperoxide	H ₂ O ₂ (342 g/l stockoplossing)	500 mg/l	24 uur	EMA	0,7	0,9
				PMA	0,3	0,4

*DNA afgebroken, ook zonder EMA of PMA geen PCR signaal

3.4.3 Discussie praktijkrelevante desinfectiemethoden

De meeste experimenten zijn uitgevoerd met thermische desinfectie van 15 minuten bij 70°C of van 5 of 15 minuten bij 80°C. Experimenten met blootstelling van *L. pneumophila* aan verschillende temperaturen hebben laten zien dat er een redelijk lineair verband is tussen de decimale reductietijd en temperaturen tussen 50°C en 60°C. Bij 50°C was de decimale reductietijd 100 minuten, terwijl bij 60°C de decimale reductietijd enkele minuten is (van der Kooij, 2014 en referenties daarin). In een document opgesteld door de WHO is aangegeven dat *L. pneumophila* bij 70°C bijna instantaan wordt geïnactiveerd (Bartram et al., 2007). Een thermische desinfectiebehandeling bij 70°C gedurende 15 minuten of bij 80°C gedurende 5 of 15 minuten zal dus resulteren in een meer dan 10 log verwijdering van levende *L. pneumophila* cellen. De resultaten met het EMA of PMA procedé laten in sommige gevallen ook een maximale reductie zien (> 1,7 tot 3,7 logeenheden voor EMA en > 1,6 tot 3,4 logeenheden voor PMA), maar in andere gevallen was de verwijdering niet maximaal en werd slechts een 0,2 tot 3,6 logeenheden reductie waargenomen.

Uit de resultaten blijkt dus dat het toepassen van een EMA of PMA procedé om het aantal levende *L. pneumophila* cellen in thermisch gedesinfecteerde monsters te bepalen tot wisselende waarnemingen leidt. Bij een aantal monsters werd de maximale logreductie waargenomen (er werd geen restsignaal waargenomen), terwijl bij andere monsters maar een beperkte logreductie werd waargenomen. De monsters met de maximale reductie waren niet de monsters met de laagste aantallen *L. pneumophila*, maar monsters die zijn behandeld met de hoogste temperatuur (80°C). Thermische desinfectie bij 70°C leidde niet tot een maximale reductie wanneer het EMA of PMA procedé wordt toegepast. Hierdoor wordt voor watermonsters behandeld bij 70°C ten onrechte geconcludeerd dat nog levende cellen in de monsters aanwezig zijn. Waarschijnlijk resulteert een hogere temperatuur bij thermische desinfectie dus tot grotere beschadiging van het celmembraan. In de praktijk wordt thermisch beheer in relatie tot *L. pneumophila* over het algemeen uitgevoerd bij 60°C. Bij die temperatuur is het membraan van (een deel van) de dode cellen dus onvoldoende beschadigd om met het EMA of PMA procedé betrouwbaar te kunnen vaststellen of levende *L. pneumophila* cellen nog in het monster aanwezig zijn. De effectiviteit van het EMA of PMA procedé is daarbij echter ook afhankelijk van het aantal *L. pneumophila* cellen die in het watermonster aanwezig zijn. Wanneer die aantallen laag zijn, kan het EMA of PMA procedé mogelijk nog steeds een maximale reductie waarnemen (tot onder de detectiegrens van de qPCR methode).

Uit de resultaten bleek dat thermisch gedesinfecteerde praktijkmonsters bij 70°C een gemiddelde logreductie van $1,9 \pm 0,97$ ($74,1 \pm 9,2$ lagere aantallen) liet zien voor EMA en $1,5 \pm 0,68$ ($30,4 \pm 4,8$ keer lagere aantallen) lieten zien. Op basis van deze gemiddelde verwijdering en de detectiegrens van de qPCR methode (480 gk l^{-1} , uitgaande van een DNA-isolatie rendement van 25%) kan worden teruggerekend bij welke beginconcentratie van *L. pneumophila* (in genkopie per liter) de maximale verwijdering nog kan worden aangetoond van thermische desinfectie bij 70°C. Voor EMA is dit een beginconcentratie van $3,6 \times 10^4 \text{ gk l}^{-1}$ *L. pneumophila* en voor PMA $1,5 \times 10^4 \text{ gk l}^{-1}$ *L. pneumophila*. Doordat deze aantallen zijn berekend met een gemiddelde logverwijdering zullen zelfs met dergelijke aantallen *L. pneumophila* bij een groot deel van de monsters geen maximale reductie worden bereikt met het toepassen van het EMA of PMA procedé. Het is daarom beter om de beginconcentraties uit te rekenen waarbij met 95% van de monsters een maximale verwijdering wordt bereikt. Daarom is het 5 percentiel berekend van de gemeten logverwijdering bij thermische desinfectie bij 70°C, zodat kan worden gecalculleerd bij welke aantallen *L. pneumophila* in het watermonster in 95% van de gevallen een maximale logreductie kan worden weergegeven. Deze berekening resulteert dat deze aantallen *L. pneumophila* maximaal $1,3 \times 10^3 \text{ gk l}^{-1}$ mogen zijn voor het EMA procedé en $1,4 \times 10^3 \text{ gk l}^{-1}$ *L. pneumophila* voor het

PMA procedé. Bij deze berekening dient opgemerkt te worden dat de logverwijdering is gebaseerd op thermische desinfectie bij 70°C. Het is mogelijk dat bij 60°C de logverwijdering nog lager zal zijn, omdat het celmembraan van dode cellen mogelijk minder wordt beschadigd bij die temperatuur dan bij 70°C.

Uit de resultaten is ook gebleken dat wanneer het EMA of PMA procedé werd toegepast op onbehandelde *L. pneumophila* cellen voor alle 15 experimenten een logreductie van 0,43 tot 2,2 (EMA) of 0,10 tot 1,4 (PMA) is waargenomen. De verwachting is dat gedurende de korte incubatietijd met EMA of PMA geen cellen afsterven, waardoor het dus lijkt of levende cellen ook EMA of PMA opnemen, mogelijk omdat de membraan sublethaal is beschadigd. Aanvullende experimenten zijn echter nodig om definitief vast te stellen of levende cellen ook EMA of PMA opnemen.

Op basis van de resultaten met EMA of PMA op praktijkmonsters die wel of niet thermisch gedesinfecteerd zijn, wordt daarom geconcludeerd dat het toepassen van een EMA of PMA procedé in combinatie met de qPCR methode niet routinematig gebruikt kan worden om het aantal levende en dode *L. pneumophila* cellen in watermonsters te bepalen wanneer deze thermisch zijn gedesinfecteerd.

Naast thermische desinfectie is ook het effect onderzocht van andere (niet-oxidatieve) desinfectiemiddelen op de kwantitatieve detectie van dode en levende *L. pneumophila* cellen met het EMA of PMA procedé. Voor de meeste van deze desinfectiemiddelen werd geen afname van het aantal met qPCR gedetecteerde levende *L. pneumophila* cellen waargenomen met EMA of PMA. Het aantal kweekbare *L. pneumophila* cellen was na desinfectie met deze middelen vrijwel niet te bepalen door de grote mate van bijgroei op de agarplaten. Het lijkt er daarom op dat het EMA of PMA procedé in combinatie met qPCR voor *L. pneumophila* ook niet toepasbaar is voor watermonsters die met de meeste van deze middelen zijn gedesinfecteerd. Dit betekent waarschijnlijk dat deze middelen in staat zijn om de *L. pneumophila* cellen af te doden, zonder dat het celmembraan dusdanig beschadigd raakt dat EMA of PMA het celmembraan kan passeren. Een uitzondering op deze middelen is natriumhypochloriet. Met dit desinfectiemiddel werd de maximale verwijdering van *L. pneumophila* waargenomen met het EMA of PMA procedé. Deze maximale reductie werd echter ook waargenomen zonder toepassing van het EMA of PMA procedé, wat betekent dat niet alleen de bacteriecellen zijn afgestorven, maar dat ook het DNA dusdanig kapot is gemaakt dat de qPCR niet in staat is om het genfragment te amplificeren. In dat geval is de gewone qPCR (dus zonder toepassing van het EMA of PMA procedé) in staat om het aantal levende *L. pneumophila* cellen te kwantificeren. Het is echter wel mogelijk dat het DNA minder schade ondervindt wanneer een lagere concentratie natriumhypochloriet of een kortere contacttijd wordt gebruikt. In dat geval is het mogelijk dat het toepassen van het EMA of PMA procedé beter in staat is om het aantal levende *L. pneumophila* cellen te detecteren. In de praktijk worden shockdoseringen met lagere concentraties en kortere contacttijden echter niet toegepast. Voor de meeste desinfectiemethoden lijkt het EMA of PMA procedé dus minder geschikt om de mate van levende *L. pneumophila* cellen vast te stellen in praktijkwatermonsters en kan de toepassing leiden tot een vals-positief resultaat. In dat geval is de desinfectiemethode voldoende om het aantal kweekbare *L. pneumophila* cellen onder de detectiegrens te brengen, maar wordt op basis van het EMA of PMA procedé geconcludeerd dat aanvullende desinfectie nodig is. Op basis van deze resultaten wordt geconcludeerd dat het EMA of PMA procedé in de meeste gevallen niet geschikt lijkt te zijn om vast te stellen of na een desinfectiestap met één van de geteste middelen (met uitzondering van hypochloriet) er nog levende *L. pneumophila* cellen in het watermonster aanwezig zijn.

Tot slot is door andere onderzoekers waargenomen dat verschillende chemische condities van het watermonster ook van invloed kunnen zijn op de werking van het EMA of PMA. Voorbeelden hiervan zijn zoutconcentratie, troebelheid en pH, maar daarbij werd een verstoring waargenomen bij condities (hoge zoutconcentratie, hoge troebelheid en lage pH) die niet voorkomen in de natuurlijke monsters die zijn geanalyseerd (Barth et al., 2012; Bae and Wuertz, 2009; Luo et al., 2010; Shi et al., 2011; Wagner et al., 2008). Naast deze factoren is ook gesuggereerd dat het gehalte aan organisch stof de werking van EMA en PMA kan beïnvloeden, omdat de negatief geladen EMA of PMA moleculen binden aan het positief geladen organisch materiaal, waardoor minder EMA of PMA beschikbaar is om de cellen te penetreren (Pisz et al., 2007). Aanvullende experimenten zijn echter nodig om te achterhalen waarom er verschillen tussen vergelijkbare monsters zijn waargenomen.

4 Conclusies en aanbevelingen

4.1 Conclusies

- Het protocol voor toepassing van EMA en PMA met qPCR voor de detectie van *L. pneumophila* in laboratoriumcultures en natuurlijke monsters is geoptimaliseerd;
- De effectiviteit van EMA of PMA in combinatie met qPCR om dode en levende cellen te kwantificeren verschilt per bacteriesoort. Het is dus noodzakelijk om voor iedere afzonderlijke bacteriesoort het effect van EMA en PMA te onderzoeken en het procedé te optimaliseren;
- EMA en PMA worden ook opgenomen door onbehandelde cellen (dus zonder desinfectie) van *L. pneumophila*;
- *Legionella* cellen die zijn behandeld met thermische desinfectie bij 70°C, organische biocides of waterstofperoxide zijn niet meer kweekbaar en worden als dood beschouwd, maar EMA en PMA worden niet door al deze dode cellen van *L. pneumophila* opgenomen. De bottleneck van de EMA of PMA procedé is dus dat bij *L. pneumophila*, maar waarschijnlijk ook bij andere bacteriesoorten, het celmembraan niet of onvoldoende wordt beschadigd na celdood door o.a. thermische desinfectie bij 70°C, organische biocides of waterstofperoxide, waardoor EMA of PMA het celmembraan niet kan passeren en de procedé daardoor niet of onvoldoende werkt. Bij toepassing van EMA of PMA om dode en levende cellen van *L. pneumophila* te kwantificeren met qPCR worden bij toepassing van die desinfectiemethoden dode cellen dus ten onterecht als levend gedetecteerd;
- Het onderscheid maken tussen dode en levende cellen van *L. pneumophila* is vanwege bovenstaande conclusies dus over het algemeen onbetrouwbaar, zeker wanneer het in combinatie wordt gebruikt met thermische desinfectie bij 60°C of behandeling met organische biocides of waterstofperoxide bij aantallen genkopieën boven de $1,4 \times 10^3$ per liter;
- Bij toepassing van natriumhypochloriet (20 mg/l, 4 uur) wordt met het EMA of PMA procedé in combinatie met qPCR geen DNA gedetecteerd van cellen met een intact membraan. Zonder toepassing van het EMA of PMA procedé werd met qPCR echter ook geen genkopieën in de natriumhypochloriet behandelde watermonsters aangetroffen. In dit geval is het DNA door de chloorbehandeling waarschijnlijk al niet meer detecteerbaar met PCR, en heeft het EMA of PMA procedé dus geen toegevoegde waarde;
- De effectiviteit van de werking van EMA en PMA lijkt afhankelijk te zijn van type/herkomst van de monsters (laboratorium culturen versus natuurlijk gegroeide bacteriecellen);
- Het verschil in effectiviteit tussen EMA en PMA is gering. EMA geeft een iets grotere reductie maar ook een toename van binding aan DNA van mogelijk levende cellen (vals-negatief).

4.2 Aanbevelingen

Op basis van de resultaten verkregen in deze studie wordt aanbevolen om het aantal dode en/of levende cellen van *L. pneumophila* in een watermonster over het algemeen niet te bepalen met het EMA of PMA procedé in combinatie met de qPCR voor *L. pneumophila*, vooral wanneer deze monsters zijn genomen na thermische desinfectie, na behandeling met organische biocides/waterstofperoxide en de aantallen hoger zijn dan $1,4 \times 10^3$ gk l⁻¹. Indien de aantallen *L. pneumophila* van de watermonsters lager zijn dan $1,4 \times 10^3$ gk l⁻¹ of zijn behandeld met natriumhypochloriet (20 mg/l, 4 uur) dan kan het EMA of PMA procedé wel worden toegepast om het aantal dode en levende cellen van *L. pneumophila* te kwantificeren. Wanneer desinfectiemethoden worden toegepast die niet zijn onderzocht in deze studie (bijvoorbeeld natriumhypochloriet bij lagere concentraties, chloordioxide, chlooramine, koper/zilverionisatie) dan dient eerst worden vastgesteld of het EMA of PMA procedé geschikt is om het aantal dode en levende aantallen *L. pneumophila* met qPCR te kwantificeren.

Door de wisselende resultaten die zijn behaald met het EMA of PMA procedé bij verschillende bacteriesoorten en/of toepassing van verschillende desinfectiemethoden op *L. pneumophila* wordt aanbevolen om geen aanvullend onderzoek uit te voeren naar het routinematig toepassen van EMA of PMA om dode en levende bacteriën met qPCR te kwantificeren. Het is daarom raadzaam om aanvullend onderzoek uit te voeren naar andere methoden zoals de toepassing van detectie van het messenger RNA (mRNA) als marker voor dood of levend.

5 Literatuur

- Bae, S., Wuertz, S., 2009. Discrimination of viable and dead fecal Bacteroidales bacteria by quantitative PCR with propidium monoazide. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 2940–2944.
- Banihashemi, A., Van Dyke, M.I., Huck, P.M., 2012. Long-amplicon propidium monoazide-PCR enumeration assay to detect viable *Campylobacter* and *Salmonella*. *J. Appl. Microbiol.* 113:863-873
- Barth Jr., V.C., Cattani, F., Ferreira, C.A.S., de Oliveira, S.D., 2012. Sodium chloride affects propidium monoazide action to distinguish viable cells. *Anal. Biochem.* 428, 108–110.
- Bartram, J., Chartier, Y., Lee, J.V., Pond, K., Surman-Lee, S., 2007. *Legionella* and the prevention of legionellosis. World Health Organization, Genève, Switzerland.
- Burillo, S., et al., 2004. Interactions between the nitrogen signal transduction protein PII and N-acetyl glutamate kinase in organisms that perform oxygenic photosynthesis. *J. Bacteriol.*, 186:3346-3354.
- Cawthorn, D.M., Witthuhn, R.C., 2008. Selective PCR detection of viable *Enterobacter sakazakii* cells utilizing propidium monoazide or ethidium bromide monoazide. *Appl. Environ. Microbiol.* 105, 1178–1185.
- Chang, B., Taguri, T., Sugiyama, K., Amemura-Maekawa, J., Kura, F., Watanabe, H., 2010. Comparison of ethidium monoazide and propidium monoazide for the selective detection of viable *Legionella* cells. *Jpn. J. Infect. Dis.* 63, 119–123.
- Contreras, P.J., Urrutia, H., Sossa, K., Nocker, A., 2011. Effect of PCR amplicon length on suppressing signals from membrane-compromised cells by propidium monoazide treatment. *J. Microbiol. Methods* 87, 89–95.
- Dannelley, J.M., Boyce, L., Gaubatz, J.W., 1986. Efficiency of photoaffinity labeling DNA homopolymers and copolymers with ethidium monoazide. *Photochem. Photobiol.* 43, 7–11.
- Ditommaso, S., Ricciardi, E., Giacomuzzi, M., Arauco Rivera, S.R., Ceccarelli, A., Zotti, C. M. 2014. Overestimation of the *Legionella* spp. load in environmental samples by quantitative real-time PCR: pretreatment with propidium monoazide as a tool for the assessment of an association between *Legionella* concentration and sanitary risk. *Diagnos. Microbiol. Infect. Dis.* 80:260-266
- Fittipaldi, M., A. Nocker, and F. Codony, Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. *J Microbiol Methods*, 2012. 91(2): p. 276-89
- Flekna, G., Stefanic, P., Wagner, M., Smulders, F.J., Mozina, S.S., Hein, I., 2007. Insufficient differentiation of live and dead *Campylobacter jejuni* and *Listeria monocytogenes* cells

by ethidium monoazide (EMA) compromises EMA/real-time PCR. *Res. Microbiol.* 158, 405–412.

Kobayashi, H., Oethinger, M., Tuohy, M.J., Hall, G.S., Bauer, T.W., 2009. Unsuitable distinction between viable and dead *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermis* by ethidium bromide monoazide. *Lett. Appl. Microbiol.* 48, 633–638.

Kralik, P., Nocker, A., Pavlik, I., 2010. *Mycobacterium avium* subsp. *paratuberculosis* viability determination using F57 quantitative PCR in combination with propidium monoazide treatment. *Int. J. Food Microbiol.* 141 (Suppl. 1), S80–S86.

Lee, J.L., Levin, R.E., 2009. Discrimination of viable and dead *Vibrio vulnificus* after refrigerated and frozen storage using EMA, sodium deoxycholate and real-time PCR. *J. Microbiol. Methods* 79, 184–188.

Liang, N., Dong, J., Luo, L., Li, Y., 2011. Detection of viable *Salmonella* in lettuce by propidium monoazide real-time PCR. *J. Food Sci.* 76 (4), M234–M237.

Loozen, G., Boon, N., Pauwels, M., Quirynen, M., Teughels, W., 2011. Live/dead realtime polymerase chain reaction to assess new therapies against dental plaque related pathologies. *Mol. Oral Microbiol.* 26, 253–261.

Luo, J.F., Lin, W.T., Guo, Y., 2010. Method to detect only viable cells in microbial ecology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 377–384.

Martin, B., Raurich, S., Garriga, M., Aymerich, T., 2012. Effect of amplicon length in propidium monoazide quantitative PCR for the enumeration of viable cells of *Salmonella* in cooked ham. *Food Anal. Methods* <http://dx.doi.org/10.1007/s12161-012-9460-0>.

Minami, J., Yoshida, K., Soejima, T., Yaeshima, T., Iwatsuki, K., 2010. New approach to use ethidium monoazide as an analytical tool. *J. Appl. Microbiol.* 109, 900–909.

Nkuiipou-Kenfack, E., et al., 2013. Improving efficiency of viability-PCR for selective detection of live cells. *J. Microbiol. Methods*, 93:20–24.

Nocker, A., Camper, A.K., 2006. Selective removal of DNA from dead cells of mixed bacterial communities by use of ethidium monoazide. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 1997–2004.

Nocker, A., Cheung, C.Y., Camper, A.K., 2006. Comparison of propidium monoazide and ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. *J. Microbiol. Methods* 67, 310–320.

Pisz, J.M., Lawrence, J.R., Schafer, A.N., Siciliano, S.D., 2007. Differentiation of genes extracted from nonviable versus viable micro-organisms in environmental samples using ethidium monoazide bromide. *J. Microbiol. Methods* 71, 312–318.

Rueckert, A., Ronimus, R.S., Morgan, H.W., 2005. Rapid differentiation and enumeration of the total, viable vegetative cell and spore content of thermophilic bacilli in milk powders with reference to *Anoxybacillus flavithermus*. *J. Appl. Microbiol.* 99, 1246–1255.

- Shi, H., Xu, W., Luo, Y., Chen, L., Liang, Z., Zhou, X., et al., 2011. The effect of various environmental factors on the ethidium monoazide and quantitative PCR method to detect viable bacteria. *J. Appl. Microbiol.* 111, 1194–1204.
- Soejima, T., Iida, K., Qin, T., Taniai, H., Seki, M., Yoshida, S., 2008. Method to detect only live bacteria during PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.* 46, 2305–2313.
- Soejima, T., Schlitt-Dittrich, F., Yoshida, S., 2011a. Polymerase chain reaction length dependent ethidium monoazide suppression power for heat-killed Enterobacteriaceae. *Anal. Biochem.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2011.06.027>.
- Soejima, T., Schlitt-Dittrich, F., Yoshida, S., 2011b. Rapid detection of viable bacteria by nested polymerase chain reaction via long DNA amplification after ethidium monoazide treatment. *Anal. Biochem.* 418, 37–43.
- Taylor, M.J., Bentham, R.H., Ross, K.E. 2014. Limitations of using propidium monoazide with qPCR to discriminate between live and dead *Legionella* in biofilm samples. *Microbiol. Insights* 7:15-224.
- Van der Kooij, D., (2014). *Legionella* in drinking-water supplies, in *Microbial Growth in Drinking Water Supplies. Problems, Causes, Controls and Research Needs*, edited by D. Van der Kooij and P. W. J. J. Van der Wielen, pp. 291-337, IWA Publishing, London, UK.
- Van de Vossenberg, J.L., Ubbink-kok, T., Elferink, M.G., Driessen, A.J., Konings, W.N., 1995. Ion permeability of the cytoplasmic membrane limits the maximum growth temperature of bacteria and archaea. *Mol. Microbiol.* 18, 925–932.
- Vesper, S., McKinstry, C., Hartmann, C., Neace, M., Yoder, S., Vesper, A., 2008. Quantifying fungal viability in air and water samples using quantitative PCR after treatment with propidium monoazide (PMA). *J. Microbiol. Methods* 72, 180–184.
- Wang, L., Li, Y., Musthapha, A., 2009. Detection of viable *Escherichia coli* O157:H7 by ethidium monoazide real time PCR. *J. Appl. Microbiol.* 107, 1719–1728.
- Yañez, M.A., Nocker, A., Soria-Soria, E., Múrtula, R., Martinez, L., Catalán, V., 2011. Quantification of viable *Legionella pneumophila* cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *J. Microbiol. Methods* 85, 124–130.
- Yang, X., Badoni, M., Gill, C.O., 2011. Use of propidium monoazide and quantitative PCR for differentiation of viable *Escherichia coli* from *E. coli* killed by mild or pasteurizing heat treatments. *Food Microbiol.* 28, 1478–1482.

Bijlage I

Experimenten 2011 (VO)

Experiment 1

- Datum experiment: 21-02-2011
- Organisme: *L. pneumophila* (type Philadelphia, s.g. 1, ATCC 33152)
- Herkomst cultuur: laboratorium (reincultuur in rijkmedium)
- Methode van afdoding: thermisch (70°C, 30 min)
- Kweekresultaten: onbehandeld $2,6 \times 10^5$ kve/ml, na desinfectie <10 kve/ml
- Resultaten qPCR zijn gecorrigeerd voor rendement IC
- Log reductie ten opzichte van het onbehandeld en ongekleurd monster (nr1)

	Monsteromschrijving	IC Rendement (%)	<i>L.pneumophila</i>			
			qPCR (gk/ml)	Reductie (log)		
1.	Lpneu ongekleurd	48,8	1,9 x 10 ⁶	-	EMA	onbehandeld <i>L. pneumophila</i>
2.	Lpneu EMA (10 µg/ml), LED-lamp 5 min	41,6	6,0 x 10 ⁵	-0,5		
3.	Lpneu EMA (25 µg/ml), LED-lamp 5 min	47,8	3,8 x 10 ⁵	-0,7		
4.	Lpneu EMA (50 µg/ml), LED-lamp 5 min	39,4	2,3 x 10 ⁵	-0,9		
5.	Lpneu EMA (10 µg/ml), LED-lamp 15 min	46,7	6,5 x 10 ⁵	-0,5	EMA	
6.	Lpneu EMA (25 µg/ml), LED-lamp 15 min	49,5	3,9 x 10 ⁵	-0,7		
7.	Lpneu EMA (50 µg/ml), LED-lamp 15 min	40,1	1,7 x 10 ⁵	-1,1		
8.	Lpneu PMA (50 µg/ml), LED-lamp 5 min	44,3	1,3 x 10 ⁶	-0,2	PMA	
9.	Lpneu PMA (200 µg/ml), LED-lamp 5 min	47,6	1,2 x 10 ⁶	-0,2		
10.	Lpneu PMA (50 µg/ml), LED-lamp 15 min	47,1	1,2 x 10 ⁶	-0,2	PMA	
11.	Lpneu PMA (200 µg/ml), LED-lamp 15 min	36,8	1,3 x 10 ⁶	-0,2		
12.	70°C ongekleurd	42,5	1,8 x 10 ⁶	-0,04		Thermische desinfectie (70°C)
13.	70°C EMA (10 µg/ml), LED-lamp 5 min	44,0	1,3 x 10 ⁴	-2,2	EMA	
14.	70°C EMA (25 µg/ml), LED-lamp 5 min	42,1	3,0 x 10 ³	-2,8		
15.	70°C EMA (50 µg/ml), LED-lamp 5 min	49,9	1,3 x 10 ³	-3,2		
16.	70°C EMA (10 µg/ml), LED-lamp 15 min	48,7	6,4 x 10 ³	-2,5		
17.	70°C EMA (25 µg/ml), LED-lamp 15 min	39,2	1,4 x 10 ³	-3,1		
18.	70°C EMA (50 µg/ml), LED-lamp 15 min	44,5	1,6 x 10 ²	-4,1		
19.	70°C PMA (50 µg/ml), LED-lamp 5 min	40,7	2,8 x 10 ⁵	-0,8	PMA	
20.	70°C PMA (200 µg/ml), LED-lamp 5 min	50,9	2,0 x 10 ⁵	-1,0		
21.	70°C PMA (50 µg/ml), LED-lamp 15 min	51,3	1,8 x 10 ⁵	-1,0	PMA	
22.	70°C PMA (200 µg/ml), LED-lamp 15 min	51,1	1,3 x 10 ⁵	-1,2		

Experiment 2

- Datum experiment: 28-03-2011
- Organisme: *E. coli* (stam WR1)
- Herkomst cultuur: laboratorium (reincultuur in rijkmedium)
- Methode van afdoding: thermisch (70°C, 30 min)
- Na desinfectie geen groei op agarmedium aangetoond
- Resultaten qPCR zijn gecorrigeerd voor rendement IC
- Log reductie ten opzichte van het onbehandeld en ongekleurd monster (nr1)

	Monsteromschrijving	IC Rendement (%)	<i>E. coli</i>			
			qPCR (gk/ml)	Reductie (log)		
1.	WR1 ongekleurd	27,2	$6,2 \times 10^6$	-	EMA PMA	WR1
2.	WR1 EMA (10 µg/ml)	32,1	$5,1 \times 10^6$	-0,1		
3.	WR1 EMA (100 µg/ml)	40,1	$1,5 \times 10^6$	-0,6		
4.	WR1 PMA (50 µg/ml)	39,2	$4,8 \times 10^6$	-0,1		
5.	WR1 PMA (200 µg/ml)	33,1	$5,1 \times 10^6$	-0,1		
6.	WR1 70°C ongekleurd	27,9	$5,7 \times 10^6$	0,0	EMA PMA	70°C, 30 min.
7.	WR1 70°C EMA (10 µg/ml)	26,5	$8,2 \times 10^3$	-2,9		
8.	WR1 70°C EMA (100 µg/ml)	11,0	$3,6 \times 10^3$	-3,2		
9.	WR1 70°C PMA (50 µg/ml)	8,5	$5,1 \times 10^4$	-2,1		
10.	WR1 70°C EMA (200 µg/ml)	10,2	$1,1 \times 10^4$	-2,8		

Experiment 3

- Datum experiment: 28-03-2011
- Organisme: *Aeromonas* (stam M800)
- Herkomst cultuur: laboratorium (reincultuur in rijkmedium)
- Methode van afdoding: thermisch (70°C, 30 min)
- Na desinfectie geen groei op agarmedium aangetoond
- Resultaten qPCR zijn gecorrigeerd voor rendement IC
- Log reductie ten opzichte van het onbehandeld en ongekleurd monster (nr1)

	Monsteromschrijving	IC Rendement (%)	<i>Aeromonas</i>			
			qPCR (gk/ml)	Reductie (log)		
1.	M800 ongekleurd	36,8	1,03E+08	-	EMA PMA	M800
2.	M800 EMA (10 µg/ml)	25,9	5,16E+04	-3,3		
3.	M800 EMA (100 µg/ml)	28,1	4,65E+02	-5,3		
4.	M800 PMA (50 µg/ml)	36,7	2,22E+07	-0,7		
5.	M800 PMA (200 µg/ml)	34,9	1,53E+07	-0,8		
6.	M800 70°C ongekleurd	39,8	9,68E+07	0,0	EMA PMA	70°C, 30 min.
7.	M800 70°C EMA (10 µg/ml)	35,5	1,12E+04	-4,0		
8.	M800 70°C EMA (100 µg/ml)	25,7	4,19E+03	-4,4		
9.	M800 70°C PMA (50 µg/ml)	21,1	4,76E+02	-5,3		
10.	M800 70°C EMA (200 µg/ml)	34,3	1,55E+03	-4,8		

Experimenten 2013-2014 (BTO)

Experiment 4

- Datum experiment: 17-07-2013
- Organisme: *L. pneumophila* (eerstelijns controle Vitens en milieustam)
- Herkomst cultuur: laboratorium (el.) (eerste lijncontrole Vitens) en proceswater (pw) (*L. pneumophila* s.g. 2-14)
- Methode van afdoding: thermisch (80°C, 5 min)
- Belichting met Phast Blue lamp of 650W lamp
- Kweekresultaten: onbehandeld $>5 \times 10^5$ KVE/l, na desinfectie niet aangetoond
- Resultaten qPCR zijn gecorrigeerd voor rendement IC
- qPCR kort fragment (NEN6254): 150 bp, lang fragment (Vitens methode): ± 800 bp.
- Log reductie ten opzichte van het onbehandeld en ongekleurd monster (nr1)

	Monsteromschrijving	IC	Kort PCR-fragment		Lang PCR-fragment				
		Rendement	qPCR	Reductie	qPCR	Reductie			
		(%)	(gk/ml)	(log)	(gk/ml)	(log)			
1	El. onbehandeld, ongekleurd	29,0	2,4 x 10 ⁴		2,4 x 10 ³		Eerstelijnscontrole	Phast Blue	
2	El. onbehandeld, PMA (40 µg/ml)	34,8	1,9 x 10 ⁴	-0,1	3,6 x 10 ³	0,2			
3	El. onbehandeld, EMA (10 µg/ml)	37,2	1,1 x 10 ³	-1,4	6,8 x 10 ¹	-1,5			
4	El. desinfectie, ongekleurd	35,4	2,1 x 10 ⁴	-0,1	2,7 x 10 ³	0,06			
5	El. desinfectie, PMA (40 µg/ml)	35,3	1,5 x 10 ⁴	-0,2	1,8 x 10 ³	-0,1			
6	El. desinfectie, EMA (10 µg/ml)	39,5	6,7 x 10 ²	-1,6	1,0 x 10 ²	-1,4			
7	Pw. onbehandeld, ongekleurd	31,0	8,5 x 10 ³		8,9 x 10 ²		Proceswater		650W lamp
8	Pw. onbehandeld, PMA (40 µg/ml)	37,1	6,8 x 10 ³	-0,1	8,5 x 10 ²	-0,02			
9	Pw. onbehandeld, EMA (10 µg/ml)	39,8	3,0 x 10 ³	-0,5	4,5 x 10 ²	-0,3			
10	Pw. desinfectie, ongekleurd	6,4	1,9 x 10 ⁴	0,4	3,9 x 10 ³	0,7			
11	Pw. desinfectie, PMA (40 µg/ml)	41,0	5,4 x 10 ³	-0,2	1,3 x 10 ³	0,2			
12	Pw. desinfectie, EMA (10 µg/ml)	36,1	5,7 x 10 ³	-0,2	7,2 x 10 ²	-0,09			
13	EL. onbehandeld, ongekleurd	31,5	4,3 x 10 ⁴		8,3 x 10 ³		Eerstelijnscontrole	650W lamp	
14	El. onbehandeld, PMA (40 µg/ml)	39,4	3,3 x 10 ⁴	-0,1	3,8 x 10 ³	-0,3			
15	El. onbehandeld, EMA (10 µg/ml)	41,0	3,1 x 10 ³	-1,1	2,0 x 10 ²	-1,6			
16	El. desinfectie, ongekleurd	37,8	3,3 x 10 ⁴	-0,1	6,7 x 10 ³	-0,09			
17	El. desinfectie, PMA (40 µg/ml)	33,4	2,0 x 10 ⁴	-0,3	3,9 x 10 ³	-0,3			
18	El. desinfectie, EMA (10 µg/ml)	31,2	2,1 x 10 ³	-1,3	1,0 x 10 ²	-1,9			
19	Pw. onbehandeld, ongekleurd	34,4	1,2 x 10 ⁴		1,8 x 10 ³		Proceswater A		650W lamp
20	Pw. onbehandeld, PMA (40 µg/ml)	33,0	7,9 x 10 ³	-0,2	1,1 x 10 ³	-0,2			
21	Pw. onbehandeld, EMA (10 µg/ml)	35,1	2,8 x 10 ³	-0,7	2,9 x 10 ²	-0,8			
22	Pw. desinfectie, ongekleurd	34,1	1,3 x 10 ⁴	0,02	1,9 x 10 ³	0,03			
23	Pw. desinfectie, PMA (40 µg/ml)	30,2	1,2 x 10 ⁴	-0,01	1,6 x 10 ³	-0,04			
24	Pw. desinfectie, EMA (10 µg/ml)	30,6	5,9 x 10 ³	-0,3	5,8 x 10 ²	-0,5			

Experiment 5

- Datum experiment: 31-10-2013
- Organisme: *L. pneumophila* (s.g.1, milieustam)
- Herkomst cultuur: laboratorium (entfles)
- Methode van afdoding: thermisch (80°C, 15 min)
- Kleuring bij KT of 37°C
- Toevoeging van 0,1% deoxycholaat (eindconcentratie)
- Kweekresultaten: onbehandeld 2×10^4 KVE/ml, na desinfectie niet aangetoond
- Resultaten qPCR zijn gecorrigeerd voor rendement IC
- Log reductie ten opzichte van het onbehandeld en ongekleurd monster (nr1)

	Monsteromschrijving	IC	<i>L. pneumophila</i>		
		Rendement (%)	qPCR (gk/ml)	Reductie (log)	
1.	onbehandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	39,4	$2,3 \times 10^5$		kleuring KT
2.	onbehandeld, + deoxycholaat, ongekleurd	42,5	$2,8 \times 10^5$	0,1	
3.	onbehandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	47,8	$9,7 \times 10^4$	-0,4	
4.	onbehandeld, + deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	44,8	$2,0 \times 10^5$	-0,05	
5.	onbehandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	41,5	$1,2 \times 10^5$	-0,3	
6.	onbehandeld, + deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	42,3	$2,4 \times 10^5$	0,03	
7.	onbehandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	41,3	$3,5 \times 10^5$	0,2	kleuring 37°C
8.	onbehandeld, + deoxycholaat, ongekleurd	38,2	$3,5 \times 10^5$	-0,01	
9.	onbehandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	48,1	$1,6 \times 10^5$	-0,4	
10.	onbehandeld, + deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	43,5	$2,1 \times 10^5$	-0,2	
11.	onbehandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	45,7	$1,5 \times 10^5$	-0,4	
12.	onbehandeld, + deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	45,7	$1,7 \times 10^5$	-0,3	
13.	behandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	41,5	$6,0 \times 10^4$	-0,6	kleuring KT
14.	behandeld, + deoxycholaat, ongekleurd	48,8	$6,4 \times 10^4$	-0,5	
15.	behandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	50,7	$4,7 \times 10^2$	-2,7	
16.	behandeld, + deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	47,8	$1,7 \times 10^2$	-3,1	
17.	behandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	48,3	$1,1 \times 10^3$	-2,3	
18.	behandeld, + deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	54,7	$2,1 \times 10^2$	-3,0	
19.	behandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	27,4	$1,2 \times 10^5$	-0,5	kleuring 37°C
20.	behandeld, + deoxycholaat, ongekleurd	34,0	$1,3 \times 10^5$	-0,5	
21.	behandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	30,8	$2,5 \times 10^2$	-3,2	
22.	behandeld, + deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	43,5	n.a.	n.a.	
23.	behandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	46,3	$5,5 \times 10^1$	-3,8	
24.	behandeld, + deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	51,5	$2,3 \times 10^2$	-3,2	

Experiment 6

- Datum experiment: 18-11-2013
- Organisme: *L. pneumophila* (milieustam)
- Herkomst cultuur: Pentamonitor (na overnacht circulatie bij 37°C)
- Methode van afdoding: thermisch (70°C, 15 min)
- Kleuring van 30 min. bij 37°C of 45°C
- Toevoeging van 0,1% deoxycholaat (eindconcentratie)
- Kweekresultaten: onbehandeld $4,7 \times 10^3$ KVE/l, na desinfectie niet aangetoond
- Resultaten qPCR zijn gecorrigeerd voor rendement IC
- Log reductie ten opzichte van het onbehandeld en ongekleurd monster (nr1)

	Monsteromschrijving	IC	<i>L. pneumophila</i>		
		Rendement (%)	qPCR (gk/ml)	Reductie (log)	
1.	onbehandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	34,0	$2,3 \times 10^4$		kleuring 37°C
2.	onbehandeld, + deoxycholaat, ongekleurd	33,4	$2,3 \times 10^4$	-0,4	
3.	onbehandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	41,3	$6,0 \times 10^3$	-0,6	
4.	onbehandeld, + deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	40,2	$8,0 \times 10^3$	-0,6	
5.	onbehandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	40,9	$5,9 \times 10^3$	-0,6	
6.	onbehandeld, + deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	42,5	$7,4 \times 10^3$	-0,5	
7.	onbehandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	35,1	$2,8 \times 10^4$	0,03	kleuring 45°C
8.	onbehandeld, + deoxycholaat, ongekleurd	41,7	$2,9 \times 10^4$	0,01	
9.	onbehandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	48,0	$6,5 \times 10^3$	-0,6	
10.	onbehandeld, + deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	36,2	$3,8 \times 10^3$	-0,9	
11.	onbehandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	38,7	$4,4 \times 10^3$	-0,8	
12.	onbehandeld, + deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	38,3	$3,8 \times 10^3$	-0,9	
13.	behandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	32,8	$3,1 \times 10^4$	0,08	kleuring 37°C
14.	behandeld, + deoxycholaat, ongekleurd	42,5	$2,5 \times 10^4$	0,0	
15.	behandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	43,4	$1,9 \times 10^3$	-1,1	
16.	behandeld, + deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	42,0	$1,9 \times 10^3$	-1,1	
17.	behandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	37,4	$2,6 \times 10^3$	-1,0	
18.	behandeld, + deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	46,7	$5,7 \times 10^2$	-1,7	
19.	behandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	39,6	$2,7 \times 10^4$	-0,01	kleuring 45°C
20.	behandeld, + deoxycholaat, ongekleurd	40,3	$2,8 \times 10^4$	0,01	
21.	behandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	36,1	$8,4 \times 10^2$	-1,5	
22.	behandeld, + deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	46,4	$6,3 \times 10^2$	-1,6	
23.	behandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	49,2	$4,6 \times 10^2$	-1,8	
24.	behandeld, + deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	49,3	$2,6 \times 10^2$	-2,0	

Experiment 7

- Datum experiment: 2-12-2013
- Organisme: *L. pneumophila* (milieustam)
- Herkomst cultuur: Proceswater (pooled)
- Methode van afdoding: thermisch (70°C, 15 min en 80°C)
- Kleuring van 30 min. bij 37°C of 45°C
- Kweekresultaten: niet te bepalen door overgroeien agarmedium
- Resultaten qPCR zijn gecorrigeerd voor rendement IC
- Log reductie ten opzichte van het onbehandeld en ongekleurd monster (nr1)

	Monsteromschrijving	IC	<i>L. pneumophila</i>			
		Rendement	qPCR	Reductie		
		(%)	(gk/ml)	(log)		
1.	onbehandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	8,4	3,0 x 10 ⁵		37°C	Onbehandeld
2.	onbehandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	22,2	4,4 x 10 ⁴	-0,8		
3.	onbehandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	37,6	7,9 x 10 ³	-1,6		
4.	onbehandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	32,8	1,1 x 10 ⁵	-0,5	45°C	
5.	onbehandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	47,7	1,3 x 10 ⁴	-1,4		
6.	onbehandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	30,2	7,9 x 10 ³	-1,6		
7.	behandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	35,5	9,0 x 10 ⁴	-0,5	37°C	desinf. 70°C
8.	behandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	42,2	1,5 x 10 ³	-1,8		
9.	behandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	30,7	<1,6 x 10 ²	>-2,8		
10.	behandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	28,0	8,8 x 10 ⁴	-0,01	45°C	
11.	behandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	28,2	3,8 x 10 ²	-2,4		
12.	behandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	28,2	<1,8 x 10 ²	>2,7		
13.	behandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	40,6	4,4 x 10 ⁴	-0,8	37°C	desinf. 80°C
14.	behandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	35,7	<1,4 x 10 ²	>-2,5		
15.	behandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	27,6	<1,8 x 10 ²	>2,4		
16.	behandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	32,7	3,9 x 10 ⁴	-0,05	45°C	
17.	behandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	42,5	<1,2 x 10 ²	>-2,5		
18.	behandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	36,3	<1,4 x 10 ²	>-2,5		

Experiment 8

- Datum experiment: 11-11-2013
- Organisme: *L. pneumophila* (milieustam)
- Herkomst cultuur: Pentamonitor (na overnacht circulatie bij 37°C)
- Methode van afdoding: thermisch (70°C, 15 min)
- Kleuring 15 min. bij 37°C
- Toevoeging van verschillende concentraties deoxycholaat (eindconcentratie)
- Kweekresultaten: onbehandeld $1,6 \times 10^6$ KVE/l, na desinfectie niet aangetoond
- Resultaten qPCR zijn gecorrigeerd voor rendement IC
- Log reductie ten opzichte van het onbehandeld en ongekleurd monster (nr1)

	Monsteromschrijving	IC	<i>L. pneumophila</i>		
		Rendement (%)	qPCR (gk/ml)	Reductie (log)	
1.	onbehandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	39,9	$6,7 \times 10^5$		Onbehandeld <i>L. pneumophila</i>
2.	onbehandeld, 0,1% deoxycholaat, ongekleurd	48,4	$5,6 \times 10^5$	-0,08	
3.	onbehandeld, 1% deoxycholaat, ongekleurd	47,3	$6,5 \times 10^5$	-0,01	
4.	onbehandeld, 2,5% deoxycholaat, ongekleurd	50,2	$5,9 \times 10^5$	-0,06	
5.	onbehandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	49,9	$2,2 \times 10^5$	-0,5	
6.	onbehandeld, 0,1% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	44,3	$2,7 \times 10^4$	-1,4	
7.	onbehandeld, 1% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	38,8	$2,8 \times 10^4$	-1,4	
8.	onbehandeld, 2,5% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	38,7	$3,0 \times 10^4$	-1,4	
9.	onbehandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	39,1	$1,8 \times 10^4$	-1,6	
10.	onbehandeld, 0,1% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	47,9	$1,5 \times 10^4$	-1,6	
11.	onbehandeld, 1% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	36,9	$3,0 \times 10^4$	-1,4	
12.	onbehandeld, 2,5% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	37,7	$3,1 \times 10^4$	-1,3	
13.	behandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	45,0	$3,0 \times 10^5$	-0,4	Thermische desinfectie
14.	behandeld, 0,1% deoxycholaat, ongekleurd	38,2	$3,0 \times 10^5$	-0,4	
15.	behandeld, 1% deoxycholaat, ongekleurd	54,8	$2,8 \times 10^5$	-0,4	
16.	behandeld, 2,5% deoxycholaat, ongekleurd	54,7	$2,5 \times 10^5$	-0,4	
17.	behandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	44,1	$1,0 \times 10^4$	-1,8	
18.	behandeld, 0,1% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	46,0	$4,5 \times 10^3$	-2,2	
19.	behandeld, 1% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	38,0	$4,6 \times 10^3$	-2,2	
20.	behandeld, 2,5% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	42,0	$6,4 \times 10^3$	-2,0	
21.	behandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	48,3	$3,0 \times 10^3$	-2,4	
22.	behandeld, 0,1% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	48,1	$2,1 \times 10^3$	-2,5	
23.	behandeld, 1% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	51,1	$4,9 \times 10^3$	-2,1	
24.	behandeld, 2,5% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	51,9	$5,0 \times 10^3$	-2,1	

Experiment 9

- Datum experiment: 13-11-2013
- Experiment 7 en 8 overeenkomend, verschillende temperatuur thermische desinfectie en watertype
- Organisme: *L. pneumophila* (milieustam)
- Herkomst cultuur: Water koeltoren
- Methode van afdoding: thermisch (80°C, 15 min)
- Kleuring: 15 min. bij 37°C
- Toevoeging van 0,1% deoxycholaat (eindconcentratie)
- Kweekresultaten: onbehandeld < 30 KVE/ml (cellen niet meer kweekbaar)
- Resultaten qPCR zijn gecorrigeerd voor rendement IC
- Log reductie ten opzichte van het onbehandeld en ongekleurd monster (nr1)

	Monsteromschrijving	IC	<i>L. pneumophila</i>		
		Rendement (%)	qPCR (gk/ml)	Reductie (log)	
1.	onbehandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	38,9	$6,0 \times 10^4$		Onbehandeld <i>L. pneumophila</i>
2.	onbehandeld, 0,1% deoxycholaat, ongekleurd	38,7	$5,7 \times 10^4$	-0,02	
3.	onbehandeld, 1% deoxycholaat, ongekleurd	41,0	$5,2 \times 10^4$	-0,06	
4.	onbehandeld, 2,5% deoxycholaat, ongekleurd	45,1	$5,4 \times 10^4$	-0,05	
5.	onbehandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	41,6	$1,2 \times 10^4$	-0,7	
6.	onbehandeld, 0,1% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	39,9	$1,1 \times 10^4$	-0,7	
7.	onbehandeld, 1% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	40,3	$2,2 \times 10^4$	-0,4	
8.	onbehandeld, 2,5% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	38,5	$2,0 \times 10^4$	-0,5	
9.	onbehandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	52,5	$3,6 \times 10^2$	-2,2	
10.	onbehandeld, 0,1% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	51,6	$1,5 \times 10^3$	-1,6	
11.	onbehandeld, 1% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	41,4	$1,6 \times 10^4$	-0,6	
12.	onbehandeld, 2,5% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	47,0	$2,0 \times 10^4$	-0,5	
13.	behandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	44,3	$1,8 \times 10^4$	-0,5	Thermische desinfectie
14.	behandeld, 0,1% deoxycholaat, ongekleurd	40,7	$1,6 \times 10^4$	-0,6	
15.	behandeld, 1% deoxycholaat, ongekleurd	48,4	$2,0 \times 10^4$	-0,5	
16.	behandeld, 2,5% deoxycholaat, ongekleurd	60,3	$2,1 \times 10^4$	-0,5	
17.	behandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	47,8	$<1,0 \times 10^2$	>-2,7	
18.	behandeld, 0,1% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	45,0	$<1,0 \times 10^2$	>-2,7	
19.	behandeld, 1% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	40,2	$<1,0 \times 10^2$	>-2,7	
20.	behandeld, 2,5% deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	36,6	$<1,0 \times 10^2$	>-2,7	
21.	behandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	50,1	$<1,0 \times 10^2$	>-2,7	
22.	behandeld, 0,1% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	45,6	$<1,0 \times 10^2$	>-2,7	
23.	behandeld, 1% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	52,8	$9,6 \times 10^2$	-1,8	
24.	behandeld, 2,5% deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	47,6	$6,9 \times 10^2$	-1,9	

Experiment 10

- Datum experiment: 14-11-2013
- Organisme: *L. pneumophila* (milieustam)
- Herkomst cultuur: Water koeltoren
- Methode van afdoding: thermisch (70°C, 15 min)
- Kleuring: 15 min. bij 37°C
- Toevoeging van 0,1% deoxycholaat (eindconcentratie)
- Kweekresultaten: onbehandeld < 30 KVE/ml (cellen niet meer kweekbaar)
- Resultaten qPCR zijn gecorrigeerd voor rendement IC
- Log reductie ten opzichte van het onbehandeld en ongekleurd monster (nr1)

	Monsteromschrijving	IC	<i>L. pneumophila</i>		
		Rendement (%)	qPCR (gk/ml)	Reductie (log)	
1.	onbehandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	50,3	$1,4 \times 10^5$		Onbehandeld
2.	onbehandeld, + deoxycholaat, ongekleurd	47,0	$9,8 \times 10^4$	-0,2	
3.	onbehandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	39,1	$2,9 \times 10^4$	-0,7	
4.	onbehandeld, + deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	46,4	$2,5 \times 10^4$	-0,8	
5.	onbehandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	50,6	$7,7 \times 10^3$	-1,3	
6.	onbehandeld, + deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	48,4	$7,4 \times 10^3$	-1,3	
7.	behandeld, - deoxycholaat, ongekleurd	33,8	$1,6 \times 10^5$	0,05	Desinfectie
8.	behandeld, + deoxycholaat, ongekleurd	46,3	$1,6 \times 10^5$	0,04	
9.	behandeld, - deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	44,8	$3,7 \times 10^3$	-1,6	
10.	behandeld, + deoxycholaat, PMA (50 µg/ml)	44,9	$1,7 \times 10^3$	-1,9	
11.	behandeld, - deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	43,1	$7,0 \times 10^2$	-2,3	
12.	behandeld, + deoxycholaat, EMA (10 µg/ml)	45,5	$1,2 \times 10^3$	-2,1	

Experiment 11

- Datum experiment: 14-11-2013
- Organisme: *L. pneumophila* (milieustam)
- Herkomst cultuur: Water koeltoren
- Methode van afdoding: verschillende methoden
- Kleuring: 30 min. bij 37°C
- Concentratie PMA: 50 µg/ml en EMA: 10 µg/ml
- Resultaten qPCR zijn gecorrigeerd voor rendement IC
- Log reductie ten opzichte van het onbehandeld en ongekleurd monster (nr1 en nr4)

	Monsteromschrijving	IC	<i>L. pneumophila</i>	
		Rendement (%)	qPCR* (gk/ml)	Reductie (log)
1	M-143085 onbehandeld, ongekleurd	43,1	$6,6 \times 10^3$	
2	M-143085 onbehandeld, PMA	50,6	$3,3 \times 10^3$	-0,3
3	M-143085 onbehandeld, EMA	48,2	$1,4 \times 10^3$	-0,7
4	M-143088 onbehandeld, ongekleurd	54,6	$3,1 \times 10^4$	
5	M-143088 onbehandeld, PMA	55,8	$1,2 \times 10^4$	-0,4
6	M-143088 onbehandeld, EMA	50,7	$4,6 \times 10^3$	-0,8
7	M-143085 70 °C, ongekleurd	44,9	$1,2 \times 10^4$	0,3
8	M-143085 70 °C, PMA	47,0	$2,9 \times 10^3$	-0,6
9	M-143085 70 °C, EMA	45,5	$8,9 \times 10^2$	-1,1
10	M-143088 70 °C, ongekleurd	61,3	$3,1 \times 10^4$	0,0
11	M-143088 70 °C, PMA	56,9	$8,3 \times 10^3$	-0,6
12	M-143088 70 °C, EMA	54,1	$1,4 \times 10^3$	-1,3
13	M-143085 80 °C, ongekleurd	42,9	$5,8 \times 10^3$	-0,1
14	M-143085 80 °C, PMA	49,5	$2,1 \times 10^2$	-1,4
15	M-143085 80 °C, EMA	58,4	$1,7 \times 10^1$	-2,5
16	M-143088 80 °C, ongekleurd	61,8	$2,1 \times 10^4$	-0,2
17	M-143088 80 °C, PMA	60,2	$2,9 \times 10^2$	-1,9
18	M-143088 80 °C, EMA	43,7	$2,9 \times 10^1$	-2,9
19	M-143085 NaOCl, ongekleurd	38,5	n.a.	>-3,9
20	M-143085 NaOCl, PMA	44,1	n.a.	>-3,9
21	M-143085 NaOCl, EMA	44,4	n.a.	>-3,9
22	M-143088 NaOCl, ongekleurd	55,2	n.a.	>-4,5
23	M-143088 NaOCl, PMA	49,3	n.a.	>-4,5
24	M-143088 NaOCl, EMA	44,0	n.a.	>-4,5
25	M-143085 Nalco 2510, ongekleurd	45,3	$8,8 \times 10^3$	0,1
26	M-143085 Nalco 2510, PMA	48,4	$3,3 \times 10^3$	-0,4
27	M-143085 Nalco 2510, EMA	49,5	$1,1 \times 10^3$	-0,9
28	M-143088 Nalco 2510, ongekleurd	61,6	$2,9 \times 10^4$	0,0
29	M-143088 Nalco 2510, PMA	58,2	$1,1 \times 10^4$	-0,4
30	M-143088 Nalco 2510, EMA	48,0	$3,6 \times 10^3$	-0,9
31	M-143085 Nalco 73500, ongekleurd	39,7	$6,5 \times 10^3$	0,0
32	M-143085 Nalco 73500, PMA	32,5	$3,0 \times 10^3$	-0,3
33	M-143085 Nalco 73500, EMA	50,0	$1,4 \times 10^3$	-0,7
34	M-143088 Nalco 73500, ongekleurd	57,3	$1,6 \times 10^4$	-0,3
35	M-143088 Nalco 73500, PMA	52,0	$8,9 \times 10^3$	-0,2
36	M-143088 Nalco 73500, EMA	49,0	$3,3 \times 10^3$	-0,7
37	M-143085 Nalco 7330, ongekleurd	33,6	$8,5 \times 10^3$	0,1
38	M-143085 Nalco 7330, PMA	45,8	$3,7 \times 10^3$	-0,4

39	M-143085 Nalco 7330, EMA	51,5	$1,6 \times 10^3$	-0,7
40	M-143088 Nalco 7330, ongekleurd	62,4	$4,1 \times 10^4$	0,1
41	M-143088 Nalco 7330, PMA	47,8	$2,1 \times 10^4$	-0,3
42	M-143088 Nalco 7330, EMA	52,9	$5,5 \times 10^3$	-0,9
43	M-143085 Lubron DBNPA, ongekleurd	53,3	$9,7 \times 10^3$	0,1
44	M-143085 Lubron DBNPA, PMA	53,7	$4,4 \times 10^3$	-0,3
45	M-143085 Lubron DBNPA, EMA	44,7	$1,4 \times 10^3$	-0,8
46	M-143088 Lubron DBNPA, ongekleurd	57,2	$3,0 \times 10^4$	-0,1
47	M-143088 Lubron DBNPA, PMA	49,3	$9,4 \times 10^3$	-0,5
48	M-143088 Lubron DBNPA, EMA	45,8	$2,8 \times 10^3$	-1,0
49	M-143085 Lubron T, ongekleurd	46,2	$9,3 \times 10^3$	0,1
50	M-143085 Lubron T, PMA	53,6	$4,3 \times 10^3$	-0,3
51	M-143085 Lubron T, EMA	53,8	$1,8 \times 10^3$	-0,7
52	M-143088 Lubron T, ongekleurd	45,3	$3,3 \times 10^4$	0,0
53	M-143088 Lubron T, PMA	41,5	$1,7 \times 10^4$	-0,3
54	M-143088 Lubron T, EMA	48,8	$5,1 \times 10^3$	-0,8
55	M-143085 Waterstofperoxide, ongekleurd	52,6	$9,8 \times 10^3$	0,1
56	M-143085 Waterstofperoxide, PMA	49,1	$4,8 \times 10^3$	-0,3
57	M-143085 Waterstofperoxide, EMA	42,1	$2,0 \times 10^3$	-0,7
58	M-143088 Waterstofperoxide, ongekleurd	42,9	$3,3 \times 10^4$	0,0
59	M-143088 Waterstofperoxide, PMA	44,7	$1,3 \times 10^4$	-0,4
60	M-143088 Waterstofperoxide, EMA	43,2	$3,9 \times 10^3$	-0,9

*, geen *L. pneumophila* DNA aangetoond