



Bedrijfstakonderzoek
BTO 2024.089 | December 2024

Verkenning van de mogelijkheden van eenvoudige DNA- analysetechnieken zonder PCR

Colofon

Verkenning van de mogelijkheden van eenvoudige DNA-analysetechnieken zonder PCR

BTO 2024.089 | December 2024

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

Opdrachtnummer

402045-381

Projectmanager

Marcelle van der Waals

Opdrachtgever

BTO - Verkennend onderzoek

Auteur

Leo Heijnen

Kwaliteitsborger

Paul van der Wielen

Verzonden naar

Dit rapport is verspreid onder BTO-participanten.

Een jaar na publicatie is het openbaar.

Keywords

PCR; RNA; DNA; detectie; micro-organismen; virussen; bacteriën; Legionella; E. coli; pathogenen; fecale verontreinigingen

Jaar van publicatie

2024

Meer informatie

Leo Heijnen

T +31 (0)30 6069741

E leo.heijnen@kwrwater.nl

PO Box 1072

3430 BB Nieuwegein

The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511

E info@kwrwater.nl

I www.kwrwater.nl

KWR

December 2024 ©

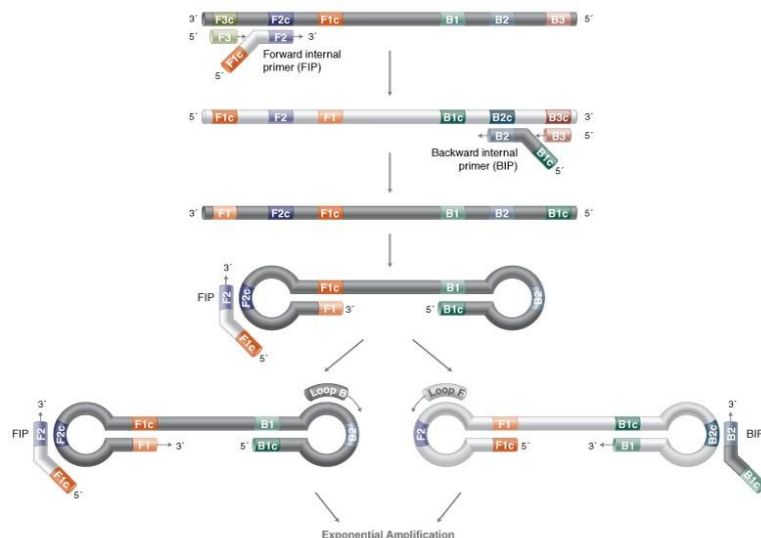
Alle rechten voorbehouden aan KWR. Niets uit deze uitgave mag - zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van KWR - worden verveelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevensbestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen,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

Managementsamenvatting

Eenvoudige DNA-analysetechnieken zonder PCR kunnen potentieel na optimalisatie mogelijkheden bieden voor snelle detectie van micro-organismen op locatie

Auteur: Leo Heijnen.

Sinds enige tijd zijn er technische mogelijkheden waarmee het erfelijk materiaal van micro-organismen zeer eenvoudig en zonder dure en verfijnde apparatuur specifiek kan worden aangetoond. Deze technologieën kunnen gebruikt worden als eenvoudig alternatief voor PCR en hiermee komen mogelijkheden voor detectie van micro-organismen op locatie binnen handbereik. Toepassing van deze technologieën kan, in potentie, snel inzicht geven in de aanwezigheid van risicovolle situaties, waarna met maatregelen de risico's kunnen worden beperkt. Er is een inventarisatie uitgevoerd naar de eigenschappen van beschikbare nieuwe analysetechnieken en daarbij is LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) geïdentificeerd als de meest veelbelovende methode. Aansluitend zijn op beperkte schaal tests uitgevoerd met LAMP-methoden voor detectie van *Escherichia coli* en *Legionella pneumophila*. De methoden zijn inderdaad eenvoudig uit te voeren, maar de gevoeligheid blijkt een factor 100-1000 minder dan qPCR en kwantificatie is slechts beperkt mogelijk. Hierdoor zijn de toepassingsmogelijkheden van deze LAMP-methoden voornamelijk beperkt. Er zijn echter ook LAMP-methoden beschreven waarvan de gevoeligheid vergelijkbaar is met die van qPCR, zodat te verwachten is dat optimalisatie uiteindelijk kan resulteren in LAMP-methoden waarmee ook *E. coli* en *L. pneumophila* met voldoende gevoeligheid op locatie kunnen worden aangetoond.



Principe van LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) als methode voor vermeerdering van een specifiek DNA-fragment van een specifiek micro-organisme

Belang: snelle detectie besmettingen op locatie verlaagt risico's

Om blootstelling aan (drink)watergerelateerde ziekteverwekkers te minimaliseren, is het nodig om snel maatregelen te treffen bij besmettingen. Daarvoor is het belangrijk methoden in te zetten die op locatie kunnen worden gebruikt en zo snel mogelijk inzicht geven in de aanwezigheid van besmettingen in water en in daaruit voortvloeiende risicovolle situaties. Sinds enige tijd zijn er technische

mogelijkheden waarmee het erfelijk materiaal van micro-organismen zeer eenvoudig en zonder dure en verfijnde apparatuur specifiek kan worden vermeerderd en aangetoond. Deze technologieën kunnen gebruikt worden als eenvoudig alternatief voor PCR en hiermee komen mogelijkheden voor detectie van micro-organismen op locatie binnen handbereik. Toepassing van deze technologieën kan, in potentie, snel inzicht geven in de aanwezigheid

van risicovolle situaties, waarna met maatregelen de risico's kunnen worden beperkt.

Aanpak: inventarisatie en experimentele tests

Er is in de wetenschappelijke literatuur een inventarisatie gedaan van beschikbare eenvoudige detectiemethoden voor DNA in (drink)water. Daarna zijn op beperkte schaal experimenten uitgevoerd om de eigenschappen te onderzoeken van de beschreven methoden voor detectie van *Escherichia coli* en *Legionella pneumophila*.

Resultaten: LAMP-methode is eenvoudig en veelbelovend maar mist nog gevoeligheid

De *Loop Mediated Isothermal Amplification*- of LAMP-methode bleek het meest "volwassen" en veelbelovend voor toepassing in drinkwater. De onderzochte methoden voor detectie van *E. coli* en *L. pneumophila* zijn eenvoudig uit te voeren en hebben de potentie om ook op locatie te kunnen worden uitgevoerd, maar de gevoeligheid is nog niet voldoende: die blijkt een factor 100-1000 minder dan die van qPCR. Ook blijkt kwantificatie slechts beperkt mogelijk. Hierdoor zijn de toepassingsmogelijkheden van deze LAMP-methoden vooralsnog beperkt. Er zijn echter ook LAMP-methoden beschreven waarvan de gevoeligheid vergelijkbaar is met die van qPCR, zodat te verwachten is dat optimalisatie uiteindelijk

kan resulteren in methoden waarmee ook *E. coli* en *L. pneumophila* met voldoende gevoeligheid op locatie kunnen worden aangetoond.

Toepassing: microbiologische analyses op locatie lijken mogelijk te gaan worden

Dit onderzoek maakt duidelijk dat eenvoudige analysemethoden, zoals LAMP, de potentie hebben om specifieke micro-organismen op locatie aan te tonen. Op dit moment missen de beschikbare LAMP-methoden voor detectie van *E. coli* en *L. pneumophila* nog de benodigde gevoeligheid, maar het valt te verwachten dat optimalisatie zal resulteren in gevoeligere methoden met betere toepassingsmogelijkheden voor de drinkwatersector. Het is te verwachten dat optimalisatie vooral zal bestaan uit het ontwerpen van verbeterde primersets. Hiervoor is software beschikbaar maar blijkt het in de praktijk ook noodzakelijk om meerdere primersets te ontwerpen en experimenteel te onderzoeken welke sets het beste presteren.

Rapport

Dit onderzoek is beschreven in het rapport *Verkenning van de mogelijkheden van eenvoudige DNA-analysetechnieken zonder PCR* (BTO 2024.089).

Inhoud

Colofon	2
<i>Managementsamenvatting</i>	3
Inhoud	5
1 Introductie	6
2 Bureaustudie	7
2.1 Amplificatiemethoden van DNA voor detectie van micro-organismen	7
2.1.1 Detectie van micro-organismen met PCR	7
2.1.2 Alternatieve DNA-amplificatiemethoden	7
2.1.3 Detectie van de vorming van het amplificatieproduct	11
3 Toepassingsmogelijkheden voor drinkwateronderzoek	14
3.1 Methodeselectie	14
3.2 Detectie van fecale indicatoren met LAMP	15
3.3 Detectie van <i>Legionella pneumophila</i> met LAMP	16
4 Experimentele toepassing van LAMP voor detectie van <i>E. coli</i> en <i>L. pneumophila</i>	18
4.1 Achtergrond	18
4.2 Materiaal en Methoden	18
4.2.1 DNA monsters	18
4.2.2 LAMP reacties	18
4.3 Experimentele resultaten	20
4.3.1 Detectie van <i>E. coli</i>	20
4.3.2 Detectie van <i>Legionella pneumophila</i>	23
5 Conclusies en aanbevelingen	26
I Gebruikte literatuur	28

**Meer informatie**

Ing. Leo Heijnen
T 030-6069516
E Leo.heijnen@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

1 Introductie

Bij de toepassing van moleculair-biologische analysetechnieken wordt gebruik gemaakt van het erfelijk materiaal (DNA of RNA) voor detectie en identificatie van specifieke (micro-)organismen. De toepassing van deze snelle en gevoelige analysetechnieken hebben hun weg binnen het onderzoek van de drinkwatermicrobiologie gevonden en worden ook bij de drinkwaterlaboratoria regelmatig toegepast (zoals de RT-PCR voor het aantonen van *E. coli* en intestinale enterococcen). Het gebruik van de Polymerase Chain Reaction (PCR) vormt veelal de basis voor de toepassing van deze moleculair-biologische technieken. PCR maakt het mogelijk om een kenmerkend DNA-fragment zeer specifiek te vermeerderen (amplificeren) en zichtbaar te maken, op basis waarvan het bijbehorende (micro-)organisme kan worden aangetoond en gekwantificeerd (qPCR). De PCR-reactie is een enzymatische reactie die plaatsvindt onder invloed van snelle temperatuurswisselingen. Tijdens deze wisselingen van temperatuur vindt vermeerdering van een specifiek DNA-fragment plaats na specifieke binding van synthetische DNA-moleculen (primers) aan het DNA van het doelorganisme. Voor de uitvoering van analyses met PCR is specifieke apparatuur nodig, waarin de temperatuurswisselingen nauwkeurig kunnen plaatsvinden en de vermenigvuldiging van het PCR-fragment kan worden gedetecteerd door het meten van fluorescentielicht ontstaan na binding van een fluorescente kleurstof (zoals SYBR-green) aan het geamplificeerde dubbelstrengs DNA of na specifieke binding van een fluorescente probe aan het gevormde fragment.

Naast PCR zijn ook diverse alternatieve amplificatietechnieken beschikbaar gekomen, waarvan een aantal eenvoudig en bij een constante temperatuur en tegen lage kosten kunnen worden uitgevoerd. Hierdoor is er voor de uitvoering geen specifieke apparatuur noodzakelijk en kunnen deze wellicht eenvoudig en op locatie worden uitgevoerd. Dit kan mogelijkheden geven voor het uitvoeren van snelle microbiologische kwaliteitscontroles op locatie zodat, na het aantonen van ongewenste micro-organismen, snel en efficiënt gerichte acties kunnen worden ondernomen.

Om een eerste indruk te krijgen van de toepassingsmogelijkheden van deze detectiemethoden is binnen het in dit rapport beschreven onderzoek:

1. Een verkenning uitgevoerd van de beschikbare technologieën en hun mogelijkheden en beperkingen.
2. Een experimentele pilot uitgevoerd door de meest veelbelovende methoden uit onderdeel 1 toe te passen voor detectie van, voor de drinkwatersector, relevante micro-organismen.

2 Bureaustudie

2.1 Amplificatiemethoden van DNA voor detectie van micro-organismen

2.1.1 Detectie van micro-organismen met PCR

Sinds de ontwikkeling van de Polymerase Ketting Reactie (PCR) door Karry Mullis in 1983 [1], heeft de toepassing van de PCR-technologie een vlucht genomen en is deze uitgegroeid tot de standaardtechnologie voor snelle vermenigvuldiging (amplificatie) en detectie van specifieke DNA- (PCR) of RNA-fragmenten (RT-PCR). Binnen het microbiologische onderzoek van drinkwater worden PCR-technieken uitgebreid toegepast om de aanwezigheid en concentratie van specifieke micro-organismen te bepalen of om de verwijdering van ongewenste micro-organismen in de zuivering te onderzoeken.

Vanwege de snelheid van PCR ten opzichte van de traditionele kweekmethoden zijn door de drinkwatersector methoden ontwikkeld waarmee het RNA van de fecale indicatoren *E. coli* en intestinale enterococci kan worden aangetoond met RT-PCR (Reverse Transcriptase-PCR). Door toepassing van deze beide RT-PCR's kan snel inzicht worden verkregen in de hygiënische betrouwbaarheid van gedistribueerd drinkwater. Deze methoden worden veel toegepast in situaties waarbij de analysesnelheid van belang is, zoals na calamiteiten of ingrepen en reparaties in het distributienet. Ook voor het aantonen en kwantificeren van opportunistische pathogene micro-organismen, zoals *Legionella pneumophila*, zijn er snelle PCR-methoden ontwikkeld [2], gevalideerd en gestandaardiseerd tot een NEN-norm (NEN 6254+c1:2013 nl). Deze ontwikkelingen hebben geresulteerd in de implementatie van PCR-technieken bij alle drinkwaterlaboratoria in Nederland en Vlaanderen en maken duidelijk dat binnen de drinkwatersector behoefte is om dergelijke snelle, gevoelige en specifieke methoden toe te passen.

Voor het uitvoeren van analyses met PCR zijn echter specifieke vaardigheden en kennis nodig en wordt gebruik gemaakt van geavanceerde apparatuur voor het isoleren van DNA en RNA (nucleïnezuren) uit een watermonster en voor het uitvoeren van de PCR-analyses. Vanwege de benodigde lage detectiegrens (b.v. afwezigheid van fecale indicatoren in 100 ml drinkwater) zijn de kwaliteitseisen hoog en dienen PCR-analyses te worden uitgevoerd door goed getrainde analisten in een goed uitgerust laboratorium. Dit zorgt ervoor dat veel kosten gemaakt worden, en tijd verloren gaat, voor monsternamen en transport van het monster naar het laboratorium. De mogelijkheid om analyses snel en eenvoudig op locatie ("on-site") uit te kunnen voeren heeft daarom grote voordelen. Er zijn al geruime tijd handzame isolatiemethoden en PCR-systemen beschikbaar waarmee PCR-analyses in principe op locatie kunnen worden uitgevoerd (zoals: <https://www.luminultra.com/tech/genecount-qpcr/>; <https://biomeme.com/>; <https://udetect.nl/>). Voor het uitvoeren van deze methoden is nog steeds relatief veel handwerk nodig en is de behaalde detectiegrens nog te hoog om betrouwbaar te kunnen toepassen voor drinkwater.

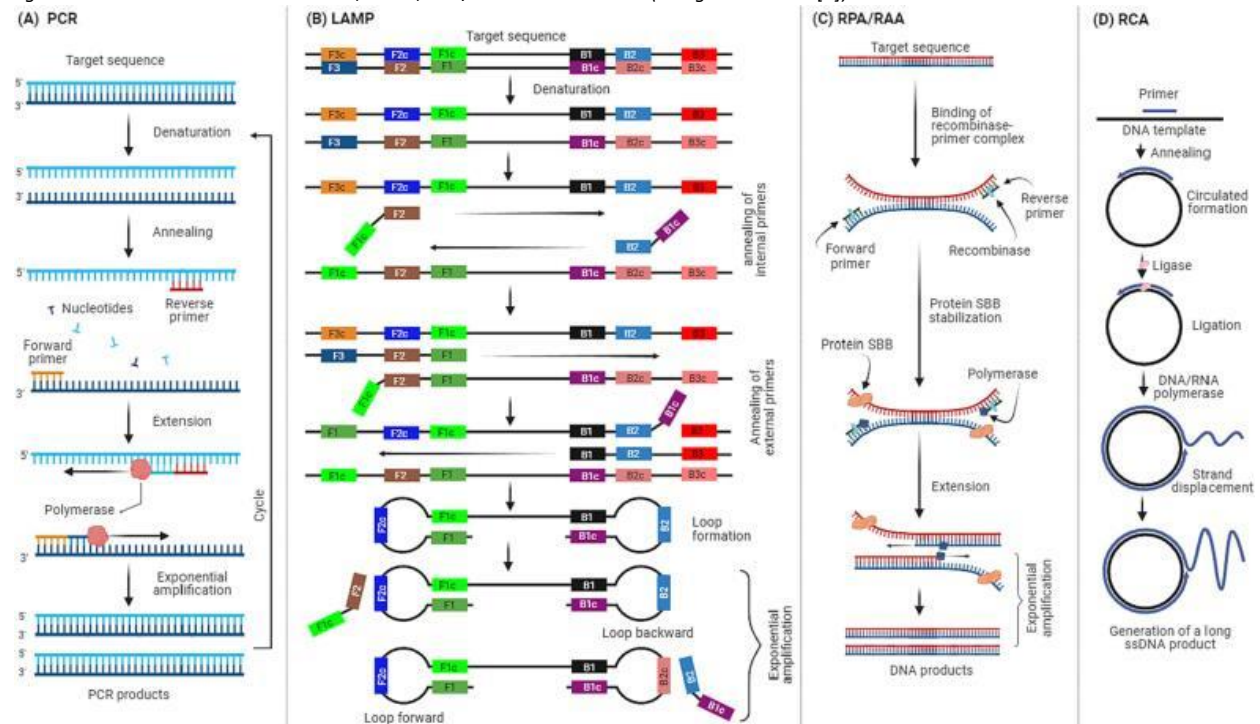
Naast de PCR-methode zijn er diverse alternatieve technieken ontwikkeld waarmee het ook mogelijk is om DNA-sequenties specifiek te vermeerderen en detecteren. Deze alternatieve methoden kunnen in korte tijd (<1 uur) worden uitgevoerd bij één constante temperatuur (isotherm) en de reacties lijken te kunnen plaatsvinden in aanwezigheid van stoffen die bij PCR-analyses vaak storend zijn. Hierdoor zijn de analyses met eenvoudigere apparatuur uit te voeren en zijn de kwaliteitseisen voor de isolatie van nucleïnezuren minder hoog. Deze alternatieve methoden lijken daarom eenvoudiger uit te voeren en zijn daarmee waarschijnlijk geschiktere kandidaten voor de ontwikkeling van on-site analysemethoden dan de PCR-methode.

2.1.2 Alternatieve DNA-amplificatiemethoden

Een overzicht van de meest relevante alternatieve isotherme DNA-amplificatiemethoden is beschreven in Yan *et al.* [3]. Daarnaast is een vergelijking van de eigenschappen van deze isotherme analysemethoden beschreven in een recente review [4]. Uit deze twee artikelen wordt duidelijk dat veel van deze alternatieve amplificatiemethoden uitgebreid zijn getest voor het detecteren van pathogene micro-organismen in voedingsmiddelen.

In de deze rapportage worden vooral mogelijkheden van de drie technieken LAMP (Loop-mediated isothermal amplification), RPA (Recombinase polymerase amplification)/RAA (Recombinase aided amplification) en RCA (Rolling circle amplification) met elkaar vergeleken. Een schematisch overzicht van de reacties die plaats vinden bij deze drie technieken en PCR is weergegeven in Figuur 1 en ieder van de methoden wordt in onderstaande paragrafen verder uitgelegd.

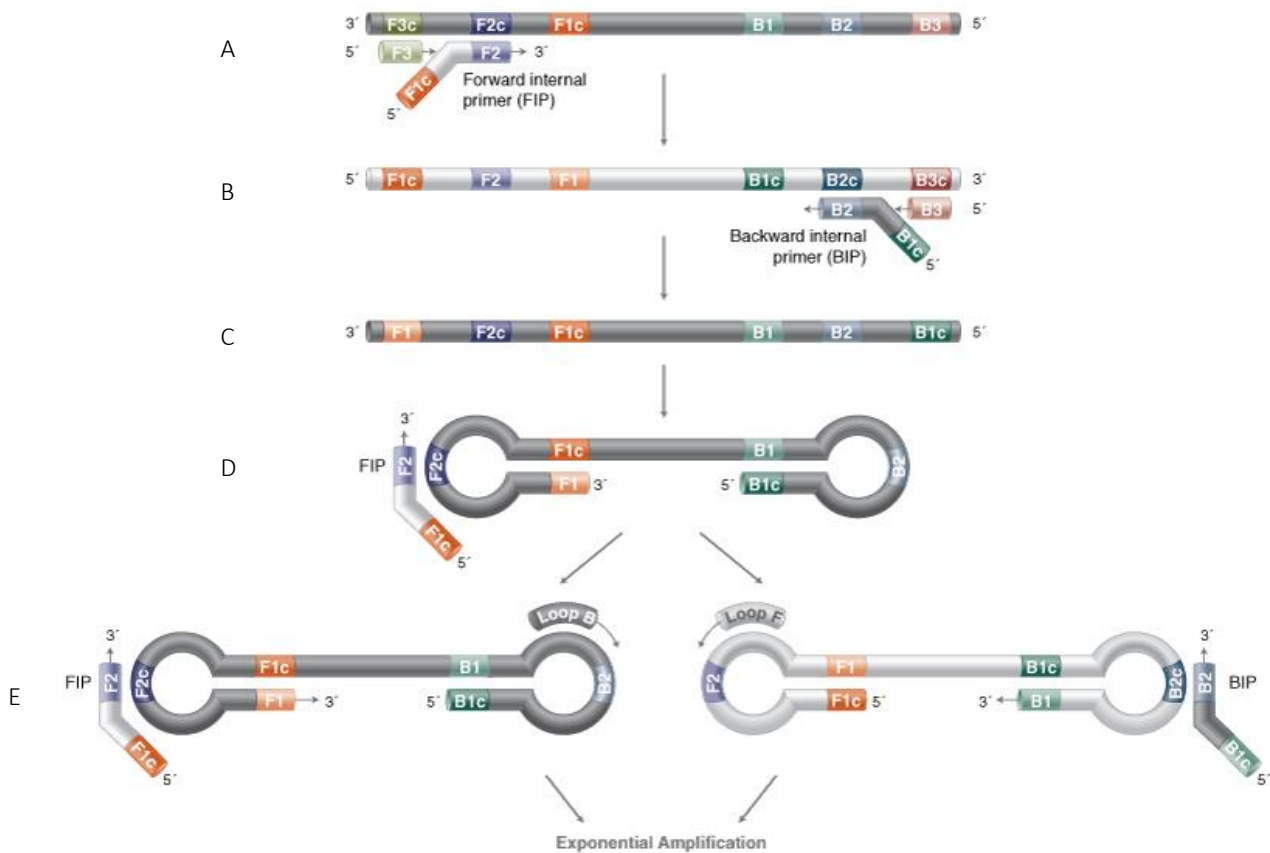
Figuur 1. Schematisch overzicht van PCR, LAMP, RPA/RAA en RCA reacties (overgenomen van [4])



2.1.2.1 LAMP (Loop-mediated isothermal amplification)

Het principe van LAMP is al beschreven in 2000 [5]. Met het gebruik van LAMP is het mogelijk om, via een isotherme reactie, specifieke nucleïnezuuren aan te tonen met een gevoeligheid die vergelijkbaar is met PCR. De LAMP reactie verloopt sneller dan PCR en vindt plaats bij een constante temperatuur van ca. 65°C. De reactie vindt plaats onder invloed van minimaal vier primers (synthetische DNA-moleculen) om het proces te laten verlopen en optimaal zes primers om daarmee de snelheid en gevoeligheid te verbeteren. Het principe van de LAMP reactie verloopt via een complex proces en is weergegeven in Figuur 1b en Figuur 2; voor verdere verduidelijking kan gebruik gemaakt worden van de animatie op youtube (<https://www.youtube.com/watch?v=UJE9SBMrh20>). In het kort begint het LAMP proces met specifieke binding van de F2 regio van de FIP primer aan het complementaire deel op het doelwit DNA (F2c, Figuur 2A). Deze binding vindt plaats onder invloed van een speciaal DNA polymerase (BstI) waarmee de beide DNA-strengen eerst uit elkaar gedreven worden ("strand displacement") en er aansluitend een complementaire DNA-streng wordt gesynthetiseerd. Deze FIP primer is verlengd met een sequentie die complementair is aan de F1 regio (F1c). In de volgende stap bindt de F3 primer aan het complementaire deel (F3c) van de doelwit DNA-streng, deze binding zorgt vervolgens voor scheiding van de beide DNA-strengen. Het proces herhaald zich vervolgens op de nieuw gevormde DNA-streng waarbij de B2 regio van de BIP-primer (eveneens verlengd met een sequentie complementair aan de B1 regio, B1c) specifiek zal binden en het DNA-polymerase zal zorgen voor de synthese van een nieuwe DNA-streng (Figuur 2B) en de binding van primer B3 aansluitend zorgt voor scheiding van de beide strengen. Tijdens de volgende stap zal de F1 regio binden aan de F1c en de B1 regio zal binden aan B1c waardoor er een lus structuren (loop) gevormd worden aan beide uiteinden van de gesynthetiseerde DNA-streng (Figuur 2D). Alle beschikbare primers hebben vervolgens een bindingsplaats op de gevormde DNA moleculen en kunnen, na binding nieuwe complementaire moleculen vormen waardoor exponentiele vermeerdering plaatsvindt. Toevoeging van additionele loop primers (LoopF en LoopB, Figuur 2E) zal de vorming van amplificatieproducten verder bevorderen en daarmee de reactietijd verkorten en gevoeligheid verbeteren.

Figuur 2. Principe van de LAMP reactie



De belangrijkste positieve en negatieve eigenschappen van de toepassing van LAMP voor detectie van micro-organismen in voedingsmiddelen zijn eerder beschreven [4]:

Positieve eigenschappen:

- Reactietijd <1 uur.
- Zeer gevoelig, mogelijk gevoeliger dan qPCR.
- Specificiteit vergelijkbaar met qPCR.
- Minder gevoelig voor storende stoffen in de monstermatrix.
- Snelle en eenvoudige uitvoering is mogelijk
- Gebruiker heeft niet veel kennis nodig
- Achtergrondsignaal en reactietijd kan worden beperkt door het gebruik van zes primers.
- Mogelijkheid voor multiplex reacties (aantonen van meerdere organismen in één reactie).
- Commercieel verkrijgbare geoptimaliseerde mengsels van reagentia
- Mogelijk om het analyseresultaat waar te nemen zonder apparatuur (troebelheid).
- Goedkoper dan PCR-gebaseerde methoden.

Negatieve eigenschappen:

- Door de hoge gevoeligheid van LAMP, heeft de methode ook een hoge gevoeligheid voor achtergrondsignaal en (kruis)contaminatie (aerosolen). Dit wordt deels ondervangen door:
 - o Het gebruik van 6 primers waardoor achtergrondsignaal kan worden geminimaliseerd.
 - o Achtergrond signaal door verontreiniging van monsters met amplificatieproducten kan worden geminimaliseerd door het inbouwen van Uracil i.p.v. Thymine tijdens de amplificatiereactie en behandeling met uracil-N-glycosylase (UNG) om Uracil bevattend amplificatieproduct af te breken.
- Complex ontwerp van primers

- Ontwerp is sterk afwijkend van het ontwerp van PCR-primers en omzetten van bestaande PCR-methoden (met de daarbij behorende PCR-primers) naar LAMP-methoden is daardoor niet eenvoudig.
- Voor ontwerpen van primers is (online) software beschikbaar (<https://primerexplorer.jp/e/> en <https://lamp.neb.com/#!/>). Deze software helpt bij het ontwerpen van geschikte primersets maar het blijft echter van belang om meerdere sets te ontwerpen en testen om daarna de beste set te selecteren.
- Reagentia dienen bij lage temperatuur ($\sim 4^{\circ}\text{C}$) bewaard te worden, waardoor bij on-site gebruik koeling noodzakelijk is.
- Bij LAMP wordt een eindpuntmeting gebruikt, hiermee is geen directe kwantificatie mogelijk. Door het uitvoeren van meerdere reacties op verschillende monsterverduunningen is het mogelijk om, met een “Meest Waarschijnlijk Aantal” (Most Probable Number, MPN) aanpak inzicht te krijgen in de concentratie.

2.1.2.2 RPA/RAA

Het principe van Recombinase Polymerase Amplification (RPA) of Recombinase Aided Amplification (RAA) is in 2006 ontwikkeld [6] en in Figuur 1c is schematisch weergegeven op welke manier RPA/RAA gebruikt wordt om specifieke DNA-sequenties te amplificeren. Bij het RPA/RAA proces wordt gebruik gemaakt van recombinase- en polymerase-enzymen en specifieke primers. Nadat het recombinase-enzym de DNA-strengen uit elkaar duwt kunnen de primers specifiek binden en zorgt het polymerase-enzym (faag T4 polymerase bij RPA en een bacterieel polymerase bij RAA) aansluitend voor het vermenigvuldigen van de DNA-strengen. Het proces is goed vergelijkbaar met het proces dat bij PCR plaats vindt alleen bij RPA/RAA wordt het recombinase-enzym gebruikt als alternatief voor de verhittingsstap bij PCR om de DNA-strengen van elkaar los te krijgen. Hierdoor is een cyclische verhittingsstap niet nodig en kan de reactie plaatsvinden bij één constante temperatuur.

De belangrijkste positieve en negatieve eigenschappen van de toepassing van RPA of RAA voor detectie van micro-organismen in voedingsmiddelen zijn eerder beschreven [4]:

Positieve eigenschappen:

- Reactietijd $< \frac{1}{2}$ uur.
- Gevoeligheid en specificiteit vergelijkbaar met qPCR.
- Weinig gevoelig voor storende stoffen in monster.
- Mogelijkheid voor multiplex reacties (aantonen van meerdere organismen in één reactie).
- Primers en probes die gebruikt worden voor qPCR zijn vaak ook bruikbaar voor RPA (soms is wel enige optimalisatie noodzakelijk).

Negatieve eigenschappen:

- Een factor vijf duurder dan qPCR vanwege complex reactiemengsel met meerdere (dure) enzymen. Ondertussen zijn geoptimaliseerde reactiemengsels commercieel verkrijgbaar geworden, waardoor de prijs mogelijk lager gaat worden.
- Kwantificatie is alleen mogelijk via een MPN aanpak

2.1.2.3 RCA

Het principe van Rolling Circle Amplification (RCA) is al in 1998 ontwikkeld [7]. In Figuur 1d is schematisch weergegeven op welke manier RCA gebruikt wordt om specifieke DNA-sequenties te amplificeren. Bij RCA wordt het mechanisme dat in bacteriën plaatsvindt voor het kopiëren (vermenigvuldigen) van plasmiden nagebootst. Er wordt gebruik gemaakt van een (vrijwel) circulaire DNA-primer waarvan een deel specifiek aan het DNA van het doelorganisme kan binden. Via een ligatiereactie wordt de circulaire DNA-primer gesloten. Een 2e primer bindt vervolgens aan deze gevormde circulaire structuur, waarna een DNA-polymerase de circulaire structuur vermenigvuldigt.

De belangrijkste positieve en negatieve eigenschappen van de toepassing van RCA voor detectie van micro-organismen in voedingsmiddelen zijn eerder beschreven [4]:

Positieve eigenschappen:

- Gevoeligheid en specificiteit vergelijkbaar met qPCR
- Minder gevoelig voor remmende stoffen
- Mogelijkheid voor multiplex detectie van meerdere organismen in één reactie.

Negatieve eigenschappen:

- Nog relatief weinig toepassingen beschreven
- De samenstelling van de reagentia is nog niet uitgekristalliseerd, hieraan wordt nog veel geoptimaliseerd .
- Ontwerpen van primers en probes is lastig.
- De reactietijd is langer dan de reactietijd voor het uitvoeren van LAMP (enkele uren vs. < 1 uur)
- Kwantificatie is alleen mogelijk via een MPN aanpak

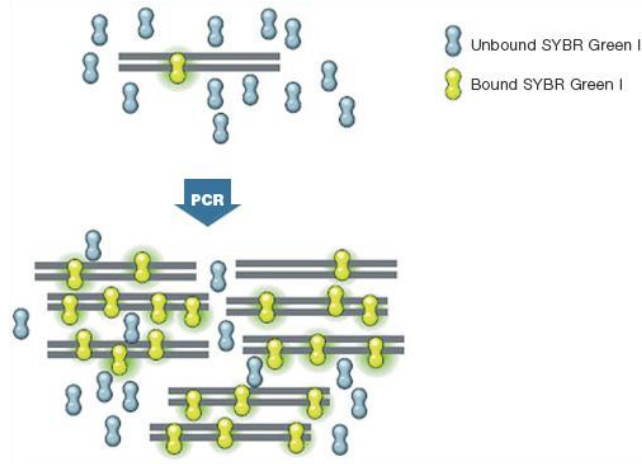
2.1.3 Detectie van de vorming van het amplificatieproduct

Om DNA-amplificatiemethoden in te kunnen zetten als detectie- of kwantificatiemethoden zijn er ook methoden nodig om de vorming van het specifieke amplificatieproduct te kunnen volgen. Voor de hierboven beschreven amplificatiemethoden zijn verschillende detectiemethoden beschikbaar voor het aantonen van het amplificatieproduct. In deze paragraaf worden de belangrijkste methoden kort besproken.

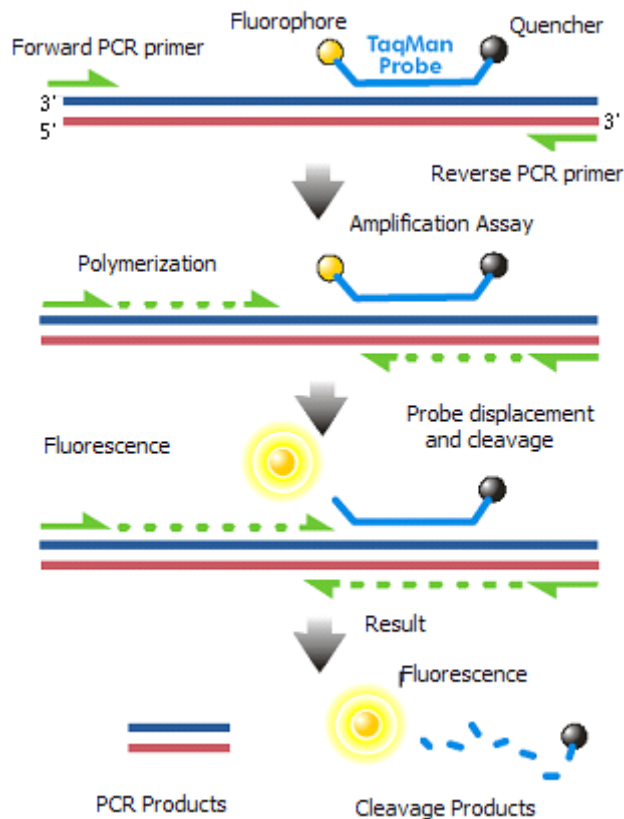
Detectie van amplificatieproducten bij PCR

Voor detectie van de vorming van het amplificatieproduct kan bij qPCR gebruik gemaakt worden van fluorescente kleurstoffen (zoals SYBR-green) die niet-specifiek binden aan dubbelstrengs DNA en pas na binding aan dubbelstrengs DNA gaan fluoresceren (Figuur 3) of van specifieke probes die binden aan specifiek stuk DNA-sequentie en na binding gaan fluoresceren (Figuur 4). Bij het gebruik van specifieke probes wordt vooral gebruik gemaakt van dubbelgelabelde probes (ook Taqman probes genoemd). Deze dubbelgelabelde probes zijn synthetische DNA-moleculen, waarvan de sequentie zodanig is ontworpen dat deze probe efficiënt en specifiek bindt aan het gevormde amplificatieproduct. Deze probe is aan één uiteinde voorzien van een fluorescente groep (fluorofoor) en aan het andere uiteinde van een quencher. Deze quencher zal de energie van de fluorofoor absorberen zolang deze groepen gebonden zijn aan hetzelfde molecuul. Tijdens de PCR-reactie zal het Taq polymerase de gebonden probe afbreken, waardoor de fluorofoor en quencher fysiek worden gescheiden en de quencher het fluorescentielicht niet meer kan absorberen, wat resulteert in een meetbaar fluorescentiesignaal.

Figuur 3. Schematische weergave van het gebruik van SYBR-green voor het (niet specifiek) detecteren van het amplificatieproduct (figuur afkomstig van BioRAD website)



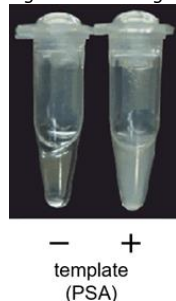
Figuur 4. Schematische weergave van het gebruik van dubbelgelabelde (Taqman) probes voor het (specifiek) detecteren van het amplificatieproduct (figuur is afkomstig van Wikipedia)



Detectie van amplificatieproducten

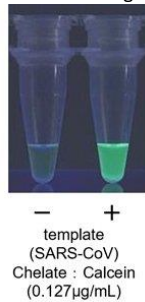
Voor detectie van de amplificatieproducten bij de besproken alternatieve isotherme amplificatiereacties is het mogelijk om, net als bij PCR, gebruik te maken van niet-specifieke fluorescente kleurstoffen zoals SYBR-green. Voor het meten van deze fluorescente kleurstoffen, en het monitoren van de vorming van fluorescentie tijdens de amplificatiereactie, is een eenvoudige fluorescentiemeter voldoende (of kan ook gebruik gemaakt worden van qPCR apparatuur). Bij het toepassen van LAMP zijn er ook eenvoudigere mogelijkheden om de vorming van amplificatieproducten visueel zichtbaar te maken, door bijvoorbeeld gebruik te maken van de vorming van magnesiumpyrofosfaat dat als een bijproduct tijdens de LAMP-reactie wordt gevormd. De vorming van hoge concentraties magnesiumpyrofosfaat is aan het einde van de reactie visueel zichtbaar als troebelheid (Figuur 5) en kan tijdens de reactie worden gevolgd met een troebelheidsmeter.

Figuur 5. Vorming van magnesiumpyrofosfaat (t.g.v. de vorming van amplificatieproduct) zorgt voor een troebel reactiemengsel



Een andere methode voor visuele detectie tijdens de LAMP-reactie is de toevoeging van calceïne (een fluorescerende stof) en mangaanionen die de fluorescentie van calceïne quenchen. Het pyrofosfaat, dat tijdens de LAMP-reactie wordt gevormd, slaat neer met de mangaanionen, waardoor het calceïne gaat fluoresceren. Deze fluorescentie is visueel zichtbaar (Figuur 6) of kan tijdens de reactie worden gevolgd met een fluorescentiemeter.

Figuur 6. Vorming van magnesiumpyrofosfaat (t.g.v. de vorming van amplificatieproduct) zorgt voor verminderde quenching van het fluorescentiesignaal door calceïne, waardoor fluorescentie visueel zichtbaar wordt.



Bij het toepassen van LAMP als detectiemethode zal de vorming van amplificatieproducten ook resulteren in een verandering van de pH, deze pH-verandering kan zichtbaar gemaakt worden met een indicator die van kleur verandert (van roze naar geel), zie Figuur 7. Deze kleurverandering kan als eindpuntsmeting visueel of met een colorimeter worden afgelezen.

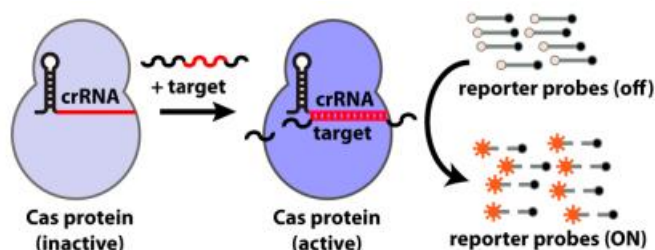


Figuur 7. Colorimetrische detectie van het resultaat van de LAMP-reactie

Bij het gebruik van de RPA/RAA-methode kunnen de visuele detectiemethoden op basis van SYBR-green, dubbelgelabelde fluorescentieprobe, troebelheid of fluorescentiesignaal van calceïne niet worden toegepast. Vaak wordt een fluorescente probe gebruikt die enigszins lijkt op de standaard dubbelgelabelde qPCR probes, maar waarvan het ontwerp sterk afwijkt wat betreft de lengte van de probe en de plaatsing van fluorofoor en quencher [8]. Bij de toepassing van RCA wordt ook specifieke detectie van de amplificatieproducten toegepast. Daarvoor zijn er verschillende mogelijkheden waaronder het gebruik van specifieke fluorescente hybridisatieprobes zoals molecular beacons. [8].

Een relatief nieuwe methode voor specifieke detectie van de amplificatieproducten is het combineren van de amplificatiemethode met het CRISPR-Cas systeem als detectiemethode (Figuur 7). Bij het CRISPR-Cas systeem wordt gebruik gemaakt van universele reporter DNA-probes waaraan een fluorescente groep en een quencher gebonden zijn. De specifieke binding van het Cas-RNA (crRNA) aan het amplificatieproduct activeert het Cas-eiwit waarna de reporterprobes worden afgebroken waardoor de quencher en fluorescente groep worden gescheiden zodat er fluorescentielicht ontstaat die met een fluorescentiemeter kan worden gedetecteerd. Met deze toepassing van CRISPR-Cas kan de vorming van een klein aantal amplificatieproducten resulteren in de afbraak van meerdere een groot aantal reporterprobes (als reactie op binding van crRNA), waardoor zeer gevoelige en specifieke detectie van het gevormde amplificatieproduct mogelijk is. Dit resulteert in een snelle en gevoelige detectiemethode.

Figuur 8. CRISPR-Cas voor specifieke en gevoelige detectie van de amplificatieproducten gegenereerd met LAMP, RPA/RAA of RCA



Naast de detectie van amplificatieproducten op basis van fluorescentie of troebelheid zijn er ook diverse prototypen van biosensors ontwikkeld waarmee de amplificatieproducten kunnen worden gedetecteerd [9]. Dit zijn bijvoorbeeld geminiaturiseerde systemen ("chips") en eenvoudige "dip-stick", of "paper microfluidics" (zoals SARS-CoV2 zelftests) systemen [10]. Toepassing van deze mogelijkheden zijn op dit moment echter nog zeer experimenteel en is daarom niet meegenomen binnen de scope van dit onderzoek.

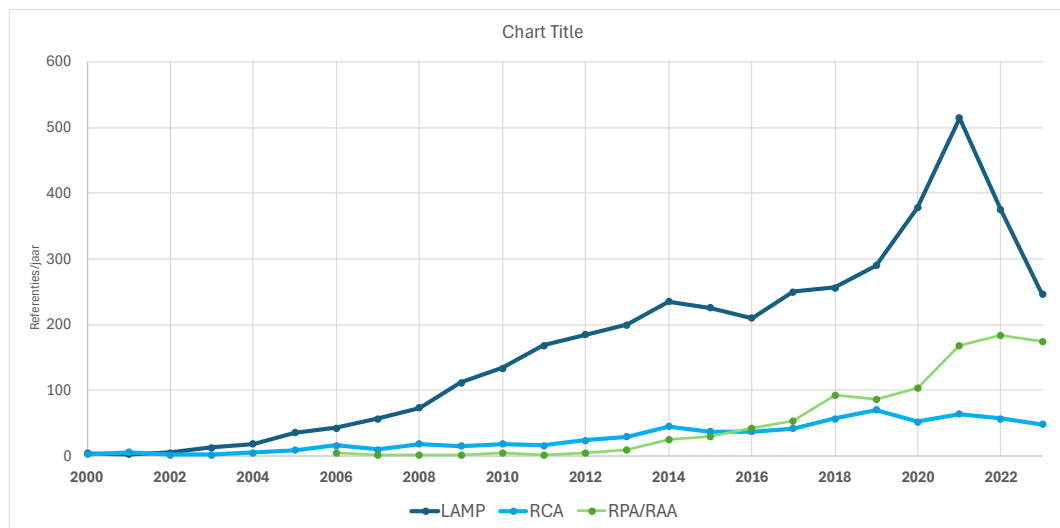
3 Toepassingsmogelijkheden voor drinkwateronderzoek

3.1 Methodeselectie

Binnen dit verkennend onderzoek is, na een verkenning gedaan naar de toepassingsmogelijkheden van de verschillende alternatieve amplificatietechnieken voor het drinkwateronderzoek. Aansluitend is er een methode geselecteerd voor experimenteel onderzoek.

Populariteit

Om een globale indruk te krijgen van de te verwachten toepasbaarheid van de alternatieve amplificatiemethoden is gekeken naar de populariteit van de verschillende methoden, en de ontwikkeling daarin. Hiervoor is het jaarlijks aantal citaties in PubMed® (<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/>) onderzocht en weergegeven in Figuur 9.



Figuur 9. Het jaarlijks aantal referenties voor de zoektermen "nucleic acid", "amplification", "detection" en respectievelijk LAMP of RCA of RPA+RAA in de PubMed® is weergegeven.

De figuur laat zien dat verreweg het meeste aantal referenties gevonden worden voor de LAMP-methode, wat een indicatie is dat, van de drie amplificatiemethoden, de toepassing van LAMP voor amplificatie en detectie van DNA of RNA het meest wordt toegepast in onderzoeken. Het is wel opvallend dat de meeste artikelen over LAMP zijn verschenen in 2020 en vooral 2021. Waarschijnlijk heeft de Covid-pandemie daar een rol bij gespeeld. Tijdens de pandemie was er veel behoefte aan eenvoudige en snelle tests die op locatie kunnen worden uitgevoerd voor het bepalen van de aanwezigheid van het SARS-CoV-2 virus. Verder valt op dat de aandacht voor het gebruik van RCA als amplificatie- en detectiemethode beperkt is en ook slechts weinig lijkt toe te nemen. Voor de publicaties over de toepassing van de RPA/RAA-methode is wel een geleidelijke stijging sinds 2014 zichtbaar. Het is goed mogelijk dat deze stijging ook het gevolg is van het beschikbaar komen van commercieel verkrijgbare reactiemengsels bij de firma TwistDx (<https://www.twistdx.co.uk/rpa/>) waardoor deze techniek eenvoudiger uitvoerbaar is geworden. Uit deze Pubmed®-analyse wordt geconcludeerd dat van de drie alternatieve amplificatiemethoden de LAMP-methode het best is onderzocht en het meest wordt toegepast, gevolgd door de RPA/RAA-methode. Een analyse uit 2019 [11] maakt ook duidelijk dat LAMP de meest populaire isotherme amplificatiemethode is voor het uitvoeren van analyses in voeding en water.

Keuze van de te testen methode

Binnen de beperkte omvang van het VO-project is het niet mogelijk om meerdere alternatieve amplificatiemethoden te testen en de resultaten met elkaar te vergelijken. Er is daarom gekozen om één methode te selecteren, te onderzoeken of er een procedure beschreven is voor het aantonen van micro-organismen met deze methode die voor de drinkwaterbereiding relevant zijn en vervolgens materialen aan te schaffen waarmee enkele experimenten uitgevoerd kunnen worden om een eerste indruk te krijgen over de toepassingsmogelijkheden van deze methode.

Uit de beschrijving van de positieve en negatieve eigenschappen van de drie alternatieve amplificatiemethoden (zie paragraaf 2.1 t/m 2.3) (Yan *et al.*, 2014; Ndraha *et al.*, 2023) volgt dat met LAMP en RPA/RAA de kortste reactietijden te verwachten zijn (<1 uur). Daarnaast is te verwachten dat met LAMP de hoogste gevoeligheid behaald kan worden. Er wordt ook aangegeven dat de LAMP-reactie minder gevoelig zal zijn voor de aanwezigheid van interfererende sequenties en stoffen die de reactie remmen dan de andere amplificatiemethoden. Een nadeel van LAMP is dat voor deze methode minimaal vier primers moeten worden ontworpen en dat het ontwerpen van deze primers complex is waarvoor goede software beschikbaar is. De beschikbaarheid van commercieel verkrijgbare mengsels van reagentia waarmee betrouwbare LAMP-reacties of RPA/RAA-reacties kunnen worden uitgevoerd vormt een groot voordeel voor het gebruik van LAMP en RPA/RAA ten opzichte van de RCA-methode. De hoge kosten en de beperkte beschikbaarheid van reagentia waarmee RCA-reacties kunnen worden uitgevoerd vormt momenteel een belangrijk nadeel voor het toepassen van deze technologie. Tot slot heeft de PubMed®-analyse laten zien dat van de drie alternatieve amplificatiemethoden de LAMP-methode het best onderzocht lijkt te zijn en ook het meest wordt toegepast. Op basis van deze argumenten is besloten om verder onderzoek naar de toepassing van de LAMP-methode uit te voeren.

Om inzicht te krijgen in de potentiële toepassingsmogelijkheden van alternatieve isotherme amplificatietechnieken voor het detecteren van specifieke micro-organismen in water is in eerste instantie gezocht naar beschikbare methoden voor detectie van drinkwaterrelevante micro-organismen waarvoor het een voordeel zou kunnen zijn om deze organismen snel op locatie te kunnen aantonen (zoals fecale indicatororganismen en *Legionella pneumophila*).

3.2 Detectie van fecale indicatoren met LAMP

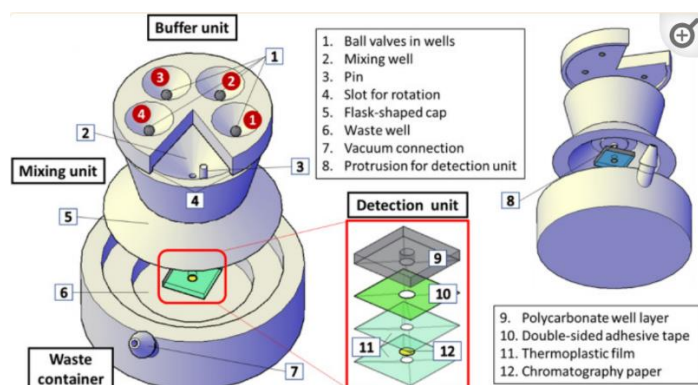
Voor detectie van fecale indicatoren met behulp van LAMP zijn verschillende methoden in de wetenschappelijke literatuur beschreven. Een overzicht van deze methoden wordt hier gegeven.

Detectie van *E. coli* en *Enterococcus faecalis* in water met LAMP: Ahmad *et al.* 2017 [12]

In 2017 is een LAMP-methode beschreven voor de kwantitatieve detectie van *E. coli* en *Enterococcus faecalis* (als belangrijke representant van de groep intestinale enterococci) in water. Voor detectie van *E. coli* wordt gebruik gemaakt van sequenties van het *uidA*-gen, een veel toegepast gen voor detectie van *E. coli* en voor detectie van *E. faecalis* worden sequenties van het *gelE*-gen aangetoond. met een gevoeligheid van <10 CFU per reactie. In deze LAMP-methode wordt ook gebruik gemaakt van propidium monoazide (PMA) om onderscheid te maken tussen membraanintacte en membraangecompromitteerde cellen (als indicatie voor levende en dode cellen). SYTO-82 (een alternatief voor SYBR-green) wordt in de beschreven methode als fluorescente kleurstof gebruikt en metingen worden uitgevoerd op een Chromo4 real-time PCR systeem (BioRad). Bij deze methode wordt kwantificatie mogelijk gemaakt door meerdere reacties uit te voeren op een verdunningsreeks van het geïsoleerde DNA en gebruik te maken van een "Most Probable Number" (MPN) aanpak voor het bepalen van de concentratie.

Detectie van *E. coli* in water met LAMP: Manzanos *et al.* 2023 [13]

In een, zeer recent (2023) verschenen, publicatie wordt een methode beschreven waarbij LAMP wordt toegepast voor detectie van een deel van de *malB* regio van het genoom van *E. coli*. Er wordt een eenvoudige, op locatie uitvoerbare, workflow in een speciaal daarvoor gemaakte unit uitgevoerd (Figuur 10) en de resultaten van de LAMP reacties worden colorimetrisch zichtbaar gemaakt door kleuring van het reactieproduct met SYBR-green.



Figuur 10. Schematische weergave van de workflow voor detectie van *E. coli* in water zoals toegepast door Manzanos et al. (2023)

***E. coli* en *Enterococcus faecalis* met LAMP: [14]**

In dit artikel is een LAMP-methode beschreven voor de kwantitatieve detectie van de fecale indicator bacteriën *E. coli* en *Enterococcus*. Bij deze methode is ook een snelle aanpak gepresenteerd voor het isoleren van DNA, waarbij gebruik gemaakt wordt van een eenvoudige spuit met membraanfilter voor het concentreren van micro-organismen en vervolgens een methode met magnetische beads voor het isoleren van DNA. Detectie van het amplificatieproduct vindt plaats door een zichtbare kleuromslag. Detectie is mogelijk in minder dan 30 minuten met een hogere gevoeligheid en minder problemen met remming dan bij het gebruik van qPCR. Voor detectie van *E. coli* worden de hierboven beschreven primers van Ahmad et al. (2017) gebruikt. Voor detectie van *E. faecalis* zijn andere primers ontwikkeld dan die hierboven zijn ontwikkeld en vormt het 23S rRNA gen het doelgen. Deze LAMP-methode is ook gebruikt voor de analyse van zeewater in een recent artikel [15] en voor kwantificatie van deze bacteriesoorten in water waarbij gebruik werd gemaakt van MPN-verdunningen om kwantificatie mogelijk te maken [16].

Detectie van coliformen en *E. coli* in oppervlaktewater met LAMP: [17]

In deze publicatie wordt een methode beschreven waarmee met behulp van een LAMP-methode gelijktijdige detectie van *E. coli* en coliformen in oppervlaktewater mogelijk is. Voor detectie van *E. coli* wordt gebruik gemaakt van het *uidA*-gen en voor detectie van coliformen van het *lacZ*-gen. Een vergelijking tussen LAMP en qPCR laat een vergelijkbare gevoeligheid zien. Opvallend is dat deze publicatie niet is geciteerd door andere onderzoekers en dat geen vervolgonderzoek is gepubliceerd door dezelfde onderzoeksgroep, wat mogelijk kan betekenen dat de ervaringen in andere of vervolgonderzoeken niet positief waren.

3.3 Detectie van *Legionella pneumophila* met LAMP

Voor detectie van *Legionella* species en specifieke detectie van *Legionella pneumophila* is een beperkt aantal publicaties verschenen. De eerste publicatie is in 2011 verschenen [18] en vervolgens zijn er publicaties verschenen waarbij gebruik gemaakt wordt van de door Lu et al. beschreven basis (sequenties van de primers) en zijn er binnen deze studies ook alternatieve primers ontwikkeld [19, 20].

Methode beschreven door Lu et al. [18]

In deze publicatie worden methoden voor specifieke detectie van de soort *Legionella pneumophila* en het genus *Legionella* spp met LAMP beschreven. Voor beide methoden zijn primers ontwikkeld waarmee detectie van een fragment van het 16S rRNA-gen plaatsvindt. De methode wordt in deze publicatie toegepast voor het identificeren van gekweekte kolonies door reacties uit te voeren op DNA uit koloniemateriaal. De vorming van amplificatieproduct wordt zichtbaar gemaakt het gebruik van een troebelheidsmeter die troebelheid t.g.v. de vorming van magnesiumpyrofosfaat tijdens de reactie monitort (Figuur 5). De methode maakt goed onderscheid tussen *L. pneumophila* en andere *Legionella* soorten. Bij het uitvoeren van LAMP-reacties op verdunningen van geïsoleerd DNA ligt de gevoeligheid van de methode tussen de 52 en 5.2 DNA-kopieën per reactie. Er worden in dit artikel geen resultaten van analyses beschreven waarbij de methode is gebruikt voor het aantonen van *Legionella* in watermonsters.

Methode beschreven door Samhan et al. [20]

In 2017 is het gebruik van de LAMP-methode beschreven voor detectie van *Legionella* spp en *L. pneumophila* in water met een gevoeligheid van ca. 10 kve/l [20]. Bij deze methode worden eerder beschreven 16S rRNA-gen specifieke primers gebruikt voor detectie van *Legionella* spp. [18] en zijn er nieuwe primers ontwikkeld voor het detecteren van het *cadA*-gen van *L. pneumophila*. De methode maakt gebruik van propidium monoazide (PMA) om, op basis van de integriteit van de celmembraan, onderscheid te maken tussen dode en levensvatbare legionellabacteriën. Volgens de auteurs benadert de gevoeligheid van de *Legionella* spp. methode de 1 CFU/100ml. Bij het uitvoeren van analyses op verdunningen van geïsoleerd DNA blijkt de *cadA*-gen specifieke methode minder gevoelig dan de 16S rRNA-gen specifieke methode. De methode blijkt toepasbaar op, geëxtraheerd DNA maar ook direct op celmateriaal.

Methode beschreven door Reuter et al. [19].

Bij deze methode wordt gebruik gemaakt van de primers beschreven door Lu et al. [18] voor specifieke detectie van *L. pneumophila*. Een kleurreactie wordt gebruikt voor visuele detectie van de gevormde amplificatieproducten. In het artikel worden ook opties beschreven voor het miniaturiseren van de reacties door deze uit te voeren op een DNA-Chip en zijn er succesvol stappen gezet voor digital-LAMP door de reacties uit te voeren in micro-druppels (zoals ddPCR). Digital-LAMP zou een optie kunnen zijn voor verbeterde kwantificatie (als alternatief voor MPN met een beperkt aantal verdunningen en analyses per verdunningsstap).

4 Experimentele toepassing van LAMP voor detectie van *E. coli* en *L. pneumophila*

4.1 Achtergrond

Om een eerste indruk te krijgen over de toepassingsmogelijkheden van isotherme amplificatiemethoden voor detectie van micro-organismen in water is, naast de bureaustudie, ook een experimentele verkenning uitgevoerd. Binnen het VO-project was er geen ruimte voor ontwikkeling of optimalisatie van LAMP-methoden. Daarom is gekozen om in eerste instantie een beperkt aantal eenvoudige experimenten uit te voeren met eerder, in de literatuur beschreven, primersets voor detectie van *E. coli* [12, 13] en *L. pneumophila* [20] in water en een nieuwe primerset te ontwikkelen voor detectie van *L. pneumophila*. Voor detectie van deze organismen zijn methoden die snel, en bij voorkeur op locatie, kunnen worden uitgevoerd van grote meerwaarde. Op locatie aantonen van fecale indicatoren (*E. coli* en enterococci) geeft de mogelijkheid om zeer snel duidelijkheid te krijgen over de hygiënische betrouwbaarheid van gedistribueerd drinkwater na ingrepen (reparaties of vervanging) in het leidingnet en snelle detectie van *L. pneumophila* op locaties maakt het mogelijk om risico's door de aanwezigheid van hoge concentraties van dit organisme in watersystemen te kunnen monitoren en, als daar aanleiding voor is, direct maatregelen te nemen om risico op infectie te minimaliseren.

4.2 Materiaal en Methoden

4.2.1 DNA-monsters

Voor het testen van de LAMP-reacties is DNA geïsoleerd uit de volgende controlestammen van het microbiologisch laboratorium van KWR (LMB).

- *E. coli* (WR1)
- *Enterococcus faecium* (WR63)
- *L. pneumophila* (controlestam van LMB)
- *Legionella anisa* (controlestam van LMB)

Voor het isoleren van DNA uit deze stammen is celmateriaal van een losliggende kolonie geresuspendeerd in 150 µl gedestilleerd ("PCR grade") water en is de LMB-standaardprocedure voor het isoleren van DNA uit watermonsters (Power Biofilm Kit van Qiagen) gebruikt voor het lyseren van de bacteriecellen en aansluitend het zuiveren van het DNA. Voor het kwantificeren van het geïsoleerde DNA zijn de volgende qPCR analyses gebruikt (standaard LMB methoden):

- *E. coli*: *uidA*-gen specifieke qPCR
- Enterococci: 23S rRNA-gen specifieke qPCR (EPA)
- *L. pneumophila*: *Mip*-gen specifieke qPCR
- *L. anisa*: 16S rRNA-gen specifieke qPCR

4.2.2 LAMP-reacties

Reagentia (algemeen)

Voor het uitvoeren van de LAMP-reacties heeft het de voorkeur om "kant en klare" commercieel verkrijgbare reactiemengsels (Kits) van reagentia te gebruiken. Voor zover bekend zijn er twee leveranciers beschikbaar die dergelijke Kits verkopen: New England Biolabs (Ipswich Massachusetts, USA) en Eiken Chemical (Tokyo, Japan). Vanwege de aanwezigheid van een vertegenwoordiging in Nederland (BIOKÉ, Leiden) en daardoor eenvoudiger beschikbaarheid van Kits is ervoor gekozen om gebruik te maken van de Kits van New England Biolabs. Deze kits bevatten het *Bst 2.0* DNA-polymerase, een polymerase dat pas bij hogere temperaturen actief is en "strand

displacement” activiteit bezit (toelichting zie: 2.1.2.1). Om te voorkomen dat gevormde LAMP-amplificatieproducten besmetting van nieuwe LAMP-reacties kunnen veroorzaken wordt bij deze kits gebruik gemaakt van het UDG (Uracil-DNA glucosylase) systeem waarbij amplificatieproducten worden gevormd met Uracil i.p.v. Thymine en UDG zorgt voor enzymatische afbraak van Uracil bevattende amplificatieproducten.

In dit onderzoek zijn er twee verschillende kits gebruikt:

- Een fluorescentiekit waarmee de vorming van amplificatieproduct fluorescent wordt gemeten (WarmStart Fluorescent LAMP/RT-LAMP Kit with UDG: <https://www.bioke.com/webshop/neb/e1708.html>). Voor het meten van fluorescentie is gebruik gemaakt van een BioRad qPCR systeem (CFX-Opus).
- Een colorimetrische kit waarmee de vorming van amplificatieproduct kan worden waargenomen door een kleuromslag van roze naar geel t.g.v. van een verandering van de pH (WarmStart Colorimetric LAMP/RT-LAMP Kit with UDG: <https://www.bioke.com/webshop/neb/m1804.html>).

Voor het uitvoeren van de reacties zijn de volgende mengsels samengesteld:

12,5 µl Reagens mix (Fluorescent of Colorimetric)

2,5 µl LAMP primer mix met hierin:

- 16 µM primer-FIP
- 16 µM primer-BIP
- 2 µM primer-F3
- 2 µM primer-B3
- 4 µM primer-Loop-F
- 4 µM primer-Loop-B

0,5 µl Fluorescente kleurstof (alleen bij Fluorescente LAMP)

2 µl DNA

7,5 µl H₂O (“PCR grade”)

Reactieomstandigheden

Voor het incuberen van de reacties is gebruik gemaakt van een qPCR systeem voor het incuberen van de reactiemengsels bij een constante temperatuur van 65°C. Bij fluorescentedetectie is na elke minuut het fluorescentiesignaal gemeten door het BioRAD-CFX qPCR systeem. Bij het gebruik van colorimetrische detectie van de gevormde LAMP producten zijn de reacties uitgevoerd in een standaard (niet “Real-time”) PCR systeem en is de vorming van een colorimetrische kleuromslag visueel waargenomen.

Sequenties van de primers

Detectie van E. coli

- Primers zoals beschreven door Ahmad *et al.* (2017) zijn gebruikt voor detectie van een deel van het *uidA*-gen van *E. coli* [12]
 - o FIP: TAACGCGCTTTCCCAACGGCCTGTGGGCATTCAAGTC
 - o BIP: TAACGATCAGTTCGCCGATGCACTGCCAACCTTTCGGTAT
 - o F3: CKGTAGAAACCCCAACCCG
 - o B3: AWACGCAGCACGATACGC
 - o LF: TCCACAGTTTTCGCGATCCA
 - o LB: ACGTCTGGTATCAGCGCGAAGT
- Primers zoals beschreven door door Manzanos *et al.* (2023) voor detectie van een deel van het *malB*-gen [13]
 - o F3_Coli-malB: GCCATCTCCTGATGACGC
 - o B3_Coli-malB: ATTTACCGCAGCCAGACG
 - o FIP_Coli-malB: CTGGGGCGAGGTCGTGGTATTCCGACAAACACCACGAATT
 - o BIP_Coli-malB: CATTTTGCAGCTGTACGCTCGCAGCCCATCATGAATGTTGCT

- LF_Coli-malB CTTTGTAAACCTGTCATCGACA
- LB_Coli-malB ATCAATCTCGATATCCATGAAGGTG

Detectie van *L. pneumophila*

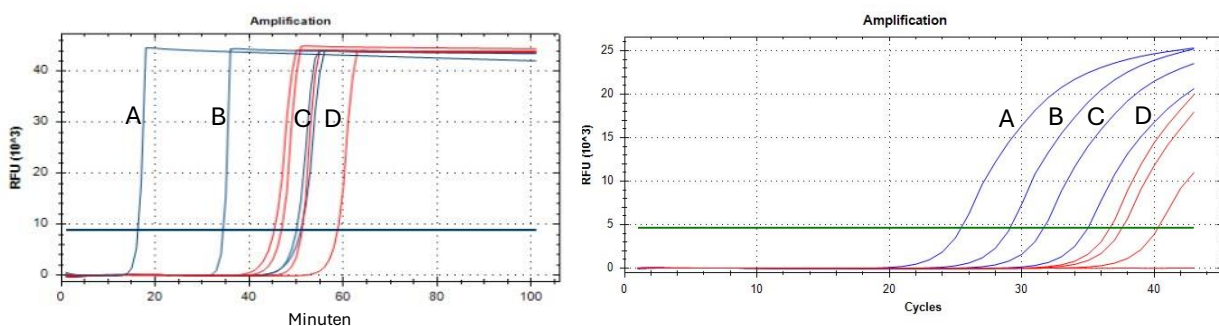
- Primers zoals beschreven door Samhan *et al.* (2017) voor detectie van een deel van het *cadA*-gen [20]
 - FIP: CCAAGGTTTGCCATTGACCATATGCAAATTGCCCTGAG
 - BIP: GAGAGCGTATTCCCCTGGATATTCACCAGTAATCGGCG
 - F3: GTCTTGCGATTCTGAAGCT
 - B3: AAAAAACAAATCACCCACTT
 - LF: CGTCCTGTTTCACTGAAGCC
 - LB: GGCGTGGTTATTTCAGGTCAGA
- Primers ontworpen binnen dit project voor detectie van een deel van het *Mip*-gen:
 - F3_Lpneu-MIP (=Forward primer qPCR): CCGATGCCACATCATTAGC
 - B3_Lpneu-MIP: CAGTACGCTTAGCCATCA
 - FIP_Lpneu-MIP: CCGGATTAACATCTATGCCTTGATTACAAGGATAAGTTGTCTTATAGCA
 - BIP_Lpneu-MIP: CTAAAGGCATGCAAGACGCTAGAACTTGTTAAGAACGTCTTTCA
 - LF_Lpneu-MIP: CTCCCCAAATCGGCACCA
 - LB_Lpneu-MIP: TCAATTGGCTTTAACCGAACAGCA

4.3 Experimentele resultaten

4.3.1 Detectie van *E. coli*

Primers voor detectie uidA-gen zoals beschreven door Ahmad et al. [12]

Voor detectie van *E. coli* is het primermengsels uit de publicatie van Ahmad et al. (2017) getest op een verdunningsreeks van DNA van *E. coli* en DNA van de controlemonsters: *L. pneumophila*, *L. anisa*, *E. faecium* en een blanco monster (isolatie van DNA "PCR grade" H₂O). Op identieke monsters zijn er ook analyses uitgevoerd met qPCR (*uidA*-gen specifiek) en de resultaten zijn met elkaar vergeleken (Figuur 11).

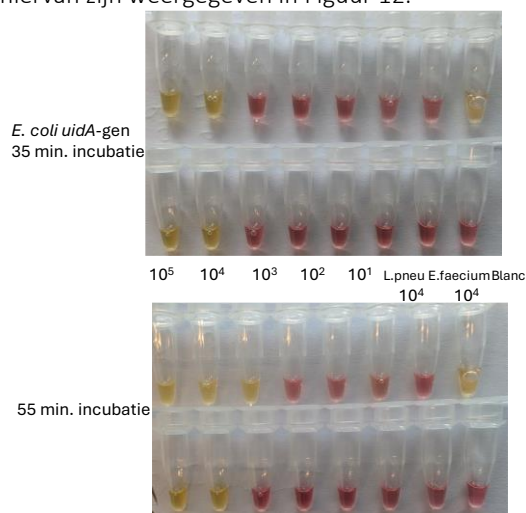


Figuur 11. Resultaten van *E. coli* specifieke LAMP reacties (links) en qPCR (rechts) op een 10-voudige verdunningsreeks van *E. coli*-DNA met 10^4 DNA-kopieën in de hoogste concentratie (A) tot 10^1 DNA-kopieën in de laagste concentratie (D) en controlemonsters met 10^4 DNA-kopieën/reactie. De resultaten van *E. coli* monsters zijn weergegeven in blauw en controlemonsters in rood.

De resultaten laten zien dat met qPCR alle verdunningen detecteerbaar zijn en dat bij alle monsters met *E. coli* het fluorescentiesignaal eerder (na minder cycli) detecteerbaar is dan bij de controlemonsters (Figuur 11, rechts). Er ontstaat echter ook in de controlemonsters een fluorescentiesignaal. Het achtergrondsignaal in controlemonsters is waarschijnlijk het gevolg van besmetting van de reagentia met *E. coli*-DNA, deze lage concentraties zorgen voor willekeurige signalen in controlemonsters met hoge Ct waarden, dit is een bekend verschijnsel bij *E. coli* specifieke qPCR methoden [21].

Bij het gebruik van LAMP voor detectie van *E. coli* wordt een specifiek signaal gevormd maar zijn alleen de twee monsters met de hoogste concentratie *E. coli*-DNA (resp. 10^4 en 10^3 DNA kopieën per reactie) te onderscheiden van de controlemonsters (Figuur 11, links). Deze monsters geven al na respectievelijk 15 (10^4 DNA kopieën per reactie) en 35 minuten (10^3 DNA kopieën per reactie) een specifiek fluorescentiesignaal. De LAMP-reacties op DNA afkomstig van controlemonsters geven na 40 tot 60 minuten een fluorescentiesignaal. Deze resultaten laten zien dat het DNA van *E. coli* specifiek detecteerbaar is met deze LAMP methode. Echter, bij lagere concentraties ($\leq 10^2$ kopieën/reactie) is het fluorescentiesignaal niet te onderscheiden van het signaal van controlemonsters terwijl het signaal in de monsters C en D met qPCR nog wel onderscheiden kan worden van de controlemonsters. Dit suggereert dat de LAMP reagentia verontreinigd zijn met een hogere concentratie *E. coli* DNA dan de qPCR reagentia. Hierdoor lijkt fluorescente detectie van lagere concentraties *E. coli* ($<10^3$ kopieën/reactie) met deze LAMP methode niet mogelijk.

Op verdunningen van *E. coli*-DNA (10^5 - 10^1 kopieën/reactie) zijn ook LAMP-reacties uitgevoerd waarbij detectie van de gevormde producten plaatsvindt m.b.v. een visueel zichtbare kleuromslag van roze naar geel, de resultaten hiervan zijn weergegeven in Figuur 12.

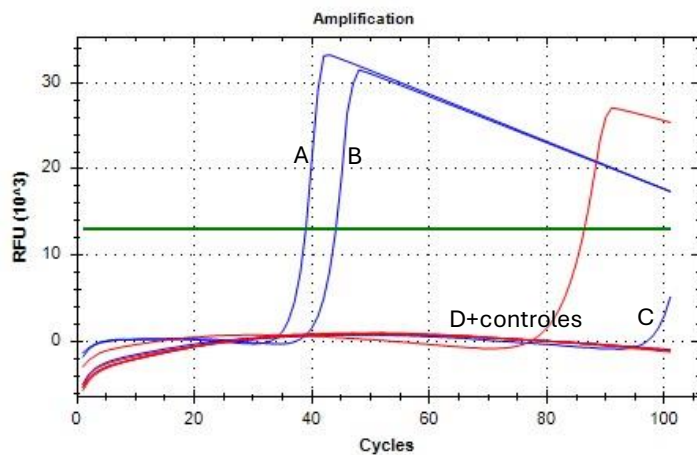


Figuur 12. Resultaten van *E. coli* specifieke LAMP reacties (in duplo) op een 10-voudige verdunningsreeks van *E. coli*-DNA met 10^5 DNA-kopieën in de hoogste concentratie tot 10^1 DNA-kopieën in de laagste concentratie en controlemonsters met 10^4 DNA-kopieën/reactie. De resultaten van de monsters zijn weergegeven na 35 min. en 55 min. incubatie.

Deze visuele detectie laat zien dat een omslagsignaal zichtbaar is na 35 min. incubatie in de monsters met 10^5 en 10^4 kopieën/reactie en in één van de beide blanco monsters. Na 55 min. incubatie was *E. coli* ook detecteerbaar in één van de beide monsters met 10^3 kopieën/reactie. Deze resultaten laten zien dat visuele detectie van LAMP-reacties vergelijkbare resultaten oplevert als fluorescente detectie van de LAMP-reacties en dat met beide methoden concentraties van minimaal ca. 10^3 kopieën/reactie detecteerbaar zijn. Het optreden van positieve reacties in controlemonsters wordt in deze serie waargenomen in één blanco monster. Het lijkt daarmee dat verontreiniging van het reactiemengsel met DNA van *E. coli* hier een minder grote rol speelt dan in het fluorescente reactiemengsel.

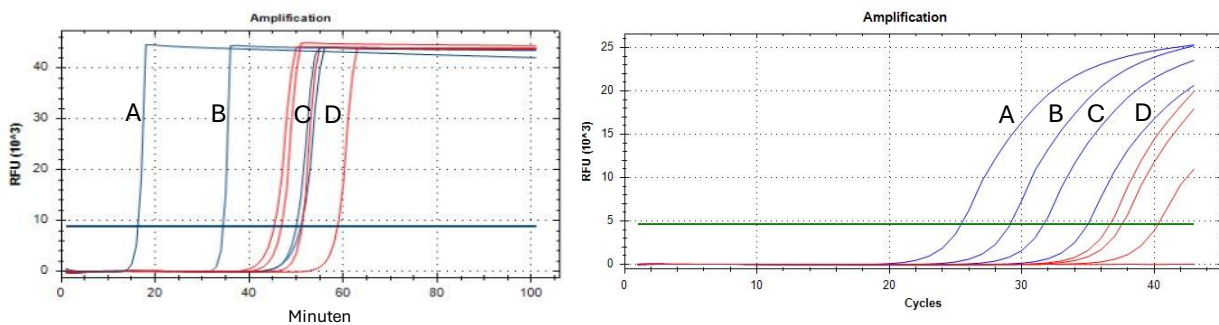
Primers voor detectie van de *malB*-regio zoals beschreven door Manzananas et al. (2023)[13]

Bij het gebruik van het primermengsels uit de publicatie van Manzananas et al. [13] op de verdunningsreeks van DNA van *E. coli* en DNA van controlemonsters en een blanco monster en vergelijking met qPCR worden de resultaten uit

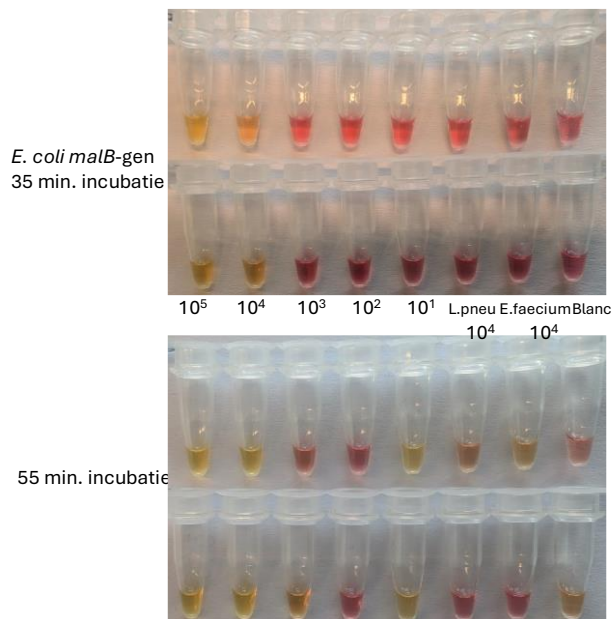


Figuur 13. Resultaten van *E. coli* specifieke LAMP reacties op een 10-voudige verdunningsreeks van *E. coli*-DNA met 10^4 DNA-kopieën in de hoogste concentratie (A) tot 10^1 DNA-kopieën in de laagste concentratie (D) en controlemonsters (*L. pneumophila*, *L. anisa*, *E. faecium* met 10^4 DNA-kopieën/reactie en een blanco monster). De resultaten van *E. coli* monsters zijn weergegeven in blauw en controlemonsters in rood.

Bij deze LAMP reacties wordt alleen een specifiek signaal waargenomen bij LAMP reacties waaraan 10^4 of 10^3 DNA-kopieën zijn toegevoegd en een heel zwak signaal in het monster met 10^1 DNA-kopieën. Daarnaast wordt vergeleken met de methode van Ahmad et al. [12] minder signaal aangetoond bij de controlemonsters. Een vergelijking van deze resultaten met de resultaten met qPCR op dezelfde monsters (Figuur 11) laat zien dat qPCR het DNA van *E. coli* gevoeliger kan detecteren dan de twee LAMP-protocollen.



Figuur 11 Op de verdunningen van *E. coli*-DNA (10^5 - 10^1 kopieën/reactie) zijn ook LAMP-reacties uitgevoerd waarbij detectie van de gevormde producten plaatsvindt m.b.v. een zichtbare kleuromslag van roze naar geel (Figuur 14).



Figuur 14. Resultaten van *E. coli* specifieke LAMP reacties (in duplo) op een 10-voudige verdunningsreeks van *E. coli*-DNA met 10^5 DNA-kopieën in de hoogste concentratie tot 10^1 DNA-kopieën in de laagste concentratie en controlemonsters met 10^4 DNA-kopieën/reactie. De resultaten van de monsters zijn weergegeven na 35 min. en 55 min. incubatie.

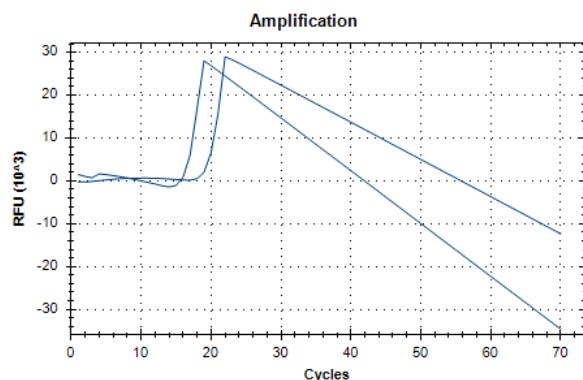
Bij deze LAMP reacties wordt na 35 min. een specifiek signaal waargenomen bij LAMP reacties waaraan 10^5 of 10^4 DNA-kopieën zijn toegevoegd. Na 55 min. incubatie is er ook signaal ontstaan in een aantal controlemonsters.

4.3.2 Detectie van *L. pneumophila*

Voor het detecteren van *L. pneumophila* is één, in de literatuur beschreven, methode getest en is getracht om zelf primers te ontwerpen op basis van het MIP-gen van *L. pneumophila*.

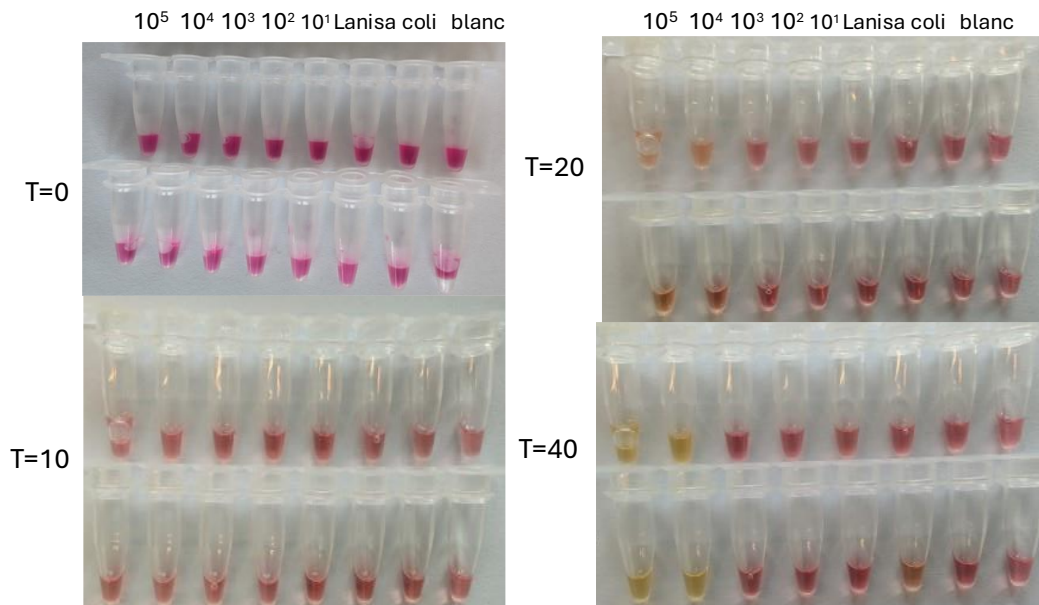
Methode voor detectie van een deel van het *Cad* zoals beschreven door Samhan [20]

Met de primers die specifiek zijn voor het *Cad*-gen van *L. pneumophila* zijn verschillende experimenten uitgevoerd op een verdunningsreeks van *L. pneumophila* DNA en een aantal controles (*L. anisa*, *E. coli* en *E. faecium*) waarbij de vorming van fluorescentielicht tijdens de reactie werd gevolgd. Bij deze experimenten ontstonden vreemde amplificatiecurven, waarbij snel veel fluorescentielicht werd gevormd gevolgd door een afname van het fluorescentiesignaal (zie Figuur 15). Alleen bij de monsters met respectievelijk ca. 10^5 en 10^4 DNA kopieën *L. pneumophila* DNA per reactie, werden deze amplificatiecurven waargenomen. Terwijl met qPCR ook met 10^2 en 10^1 DNA kopieën per reactie een goede amplificatiecurve zichtbaar is (Figuur 12).



Figuur 15. Voorbeeld van amplificatiecurven voor detectie van *L. pneumophila* met de primers van Samhan et al. [20]

Deze primerset is ook getest op een verdunningsreeks van het DNA van *L. pneumophila* waarbij gebruik gemaakt werd van een colorimetrische kleuring om de vorming van de, tijdens de LAMP-reactie, gevormde amplificatieproducten te kunnen monitoren. De kleurreactie is visueel gevolgd na 10, 20 en 40 minuten incubatie.

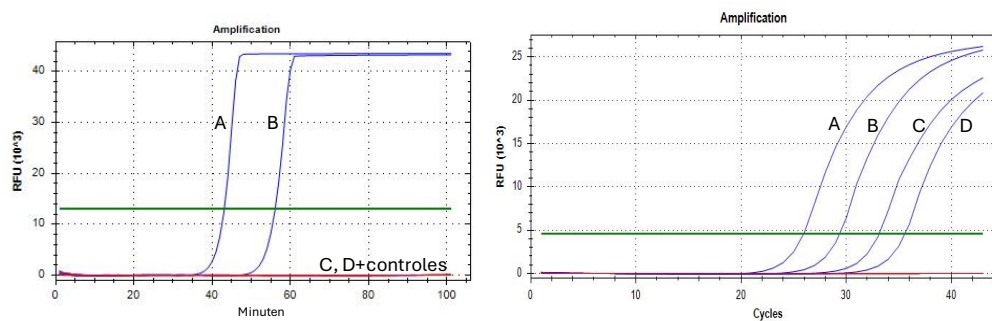


Figuur 16. Resultaten van *L. pneumophila* specifieke LAMP reacties (in duplo) op een 10-voudige verdunningsreeks van *L. pneumophila*-DNA met 10^5 DNA-kopieën in de hoogste concentratie tot 10^1 DNA-kopieën in de laagste concentratie en controlemonsters (*L. anisa*, en *E. coli*) met 10^4 DNA-kopieën/reactie en een blanco monster. De resultaten van de monsters zijn weergegeven na 0, 10, 20 en 40 min. incubatie.

De kleurreacties geven een vergelijkbaar beeld als de fluorescente reacties. Na een incubatietijd van ca. 40 minuten is een kleuromslag zichtbaar in de monsters met 10^5 en 10^4 DNA genkopieën *L. pneumophila* per reactie. De monsters hebben vervolgens nog langere incubatietijden ondergaan maar dit leverde geen kleuromslag op in monsters met lagere concentraties van *L. pneumophila* DNA.

Nieuwe methode met primers voor detectie van het MIP-gen van *L. pneumophila*

Bij de ontwikkeling van de standaard qPCR methode voor specifieke detectie van *L. pneumophila* is gebruik gemaakt van sequenties van het MIP-gen [22]. Binnen dit gen zijn er tussen de verschillende legionellasoorten relatief veel sequentieverschillen waardoor de ontwikkeling van specifieke primers waarmee alleen *L. pneumophila* wordt gedetecteerd goed mogelijk is. Het ligt daarom voor de hand om dit gen ook te gebruiken voor de ontwikkeling van een LAMP-methode. Er is daarom een eenmalige poging gedaan om LAMP primers te ontwikkelen waarmee een deel van het MIP-gen wordt geamplificeerd. Bij het ontwerpen van de primers is de forward primer die bij de gestandaardiseerde (NEN 6254) qPCR methode wordt gebruikt [22] als uitgangspunt genomen, omdat deze primer een grote bijdrage levert aan de specificiteit van de qPCR methode. Vervolgens is het online programma “Primer Explorer (<https://lamp.neb.com/>)” gebruikt voor het ontwerpen van de overige primers. Om een eerste indruk te krijgen over de mogelijkheid van deze nieuw ontwikkelde LAMP-primers voor specifieke detectie van *L. pneumophila* zijn er LAMP-reacties uitgevoerd op een verdunningsreeks van DNA van *L. pneumophila* en van DNA van controlemonsters: *E. coli*, *L. anisa*, *E. faecium* en een blanco monster. Op identieke monsters zijn ook analyses uitgevoerd met qPCR (ook MIP-gen specifiek) en de resultaten zijn met elkaar vergeleken (Figuur 17).



Figuur 17. Resultaten van *L. pneumophila* specifieke LAMP reacties (links) en qPCR (rechts) op een 10-voudige verdunningsreeks van *L. pneumophila*-DNA met 10^4 DNA-kopieën in de hoogste concentratie (A) tot 10^1 DNA-kopieën in de laagste concentratie (D) en controlemonsters (*E. coli*, *L. anisa*, *E. faecium* met 10^4 DNA-kopieën/reactie) en een blanco monster. De resultaten van *L. pneumophila* monsters zijn weergegeven in blauw en controlemonsters in rood.

De resultaten laten zien dat alle verdunningen detecteerbaar zijn met qPCR en dat bij het gebruik van LAMP alleen de twee hoogste concentraties (10^4 en 10^3 kopieën/reactie) van de *L. pneumophila* DNA verdunningen detecteerbaar zijn. Met qPCR zijn ook de twee laagste concentraties van de verdunningen detecteerbaar (10^2 en 10^1 kopieën/reactie). Dit geeft aan dat de gebruikte qPCR-methode minimaal een factor 100 gevoeliger is dan deze ontwikkelde LAMP-methode, zoals ook werd waargenomen voor *E. coli*. Afwezigheid van signaal bij de controlemonsters laat wel zien dat de ontwikkelde LAMP methode geen signaal geeft met DNA van de andere geteste bacteriesoorten en ook onderscheid kan maken tussen *L. pneumophila* en *L. anisa* hetgeen suggereert dat de methode specifiek lijkt voor *L. pneumophila* en dat detectie van $\geq 10^3$ kopieën/reactie in ca. 50 min. mogelijk is. De specificiteit van deze primers voor *L. pneumophila* zou nog wel verder getest moeten worden tegen andere legionellasoorten, voordat betrouwbaar kan worden geconcludeerd dat deze LAMP-methode specifiek is voor *L. pneumophila*.

Met deze nieuw ontwikkelde LAMP-reactie voor specifieke detectie van met MIP-gen van *L. pneumophila* zijn nog geen tests uitgevoerd waarbij de vorming van amplificatieproducten met een colorimetrisch kleuring zijn gevolgd.

5 Conclusies en aanbevelingen

In dit onderzoek is een verkenning uitgevoerd naar de mogelijkheden van DNA/RNA-amplificatietechnieken die bij één constante temperatuur (isotherm) kunnen worden uitgevoerd en als een eenvoudig alternatief voor (q)PCR gebruikt kunnen worden om micro-organismen specifiek te detecteren. Dergelijke technieken kunnen snel, eenvoudig en zonder kostbare en verfijnde apparatuur worden uitgevoerd zodat er potentiële mogelijkheden zijn om deze op locatie te gebruiken voor detectie van specifieke micro-organismen in watermonsters.

Omdat er in de afgelopen 10-20 jaar veel nieuwe amplificatietechnieken zijn ontwikkeld is er eerst een bureaustudie uitgevoerd (Hoofdstuk 2). In deze bureaustudie is literatuuronderzoek gebruikt om te inventariseren welke veelbelovende amplificatietechnieken beschikbaar zijn, welke eigenschappen deze technieken hebben en welke toepassingen er beschreven zijn. Uit een vergelijking van de verschillende technieken kwam naar boven dat van de beschreven technieken, de LAMP (Loop Mediated Isothermal Amplification) methode het meest is doorontwikkeld. Voor het gebruik van LAMP zijn er verschillende leveranciers die reagentiakitjes verkopen. Tevens zijn in de literatuur veel toepassingen beschreven, waarvan een aantal ook relevant is voor het gebruik in (drink)water. Voor het uitvoeren van LAMP is een mengsel van zes primers nodig, de reacties vinden plaats bij een constante temperatuur van 65°C en de reactietijd is maximaal ca. 1 uur. Het aantonen van het gevormde geamplificeerde product is mogelijk met een fluorescentiemeter, door gebruik te maken van een fluorescente kleurstof (zoals SYBR-Green) of door het laten plaats vinden van een visueel zichtbare kleuromslag t.g.v. pH-verandering (colorimetrisch). De vergelijking maakte ook duidelijk dat de isotherme amplificatietechnieken bestaan uit eindpuntbepalingen waarbij niet, zoals bij qPCR, kwantificatie mogelijk is door gebruik te maken van het aantal cycli of de benodigde reactietijd voor het verkrijgen van een amplificatiesignaal. Dit maakt deze technieken minder geschikt voor kwantificatie en is (semi-)kwantificatie alleen mogelijk door het uitvoeren van meerdere reacties op verschillende monsterverdunningen waarna een “Meest Waarschijnlijk Aantal” (Most Probable Number, MPN) aanpak inzicht geeft in de concentratie.

Om een eerste indruk te krijgen van de toepassingsmogelijkheden van de LAMP-methode voor het drinkwateronderzoek, zijn methoden getest voor het detecteren van *E. coli* en *L. pneumophila*. Voor detectie van *E. coli* zijn twee gepubliceerde methoden getest. Voor detectie van *L. pneumophila* is één gepubliceerde methode onderzocht en zijn binnen dit onderzoek LAMP-primers ontwikkeld voor detectie van het *MIP*-gen van *L. pneumophila*. Deze methoden zijn getest door LAMP-reacties uit te voeren op verdunningsreeksen van DNA dat geïsoleerd is uit koloniemateriaal. Deze experimenten maken duidelijk dat de LAMP-reacties eenvoudig kunnen worden uitgevoerd en dat de detectie ook eenvoudig mogelijk is met zowel fluorescentiemetingen als ook door het visueel zichtbaar maken van een kleuromslag. De onderzochte LAMP-methoden blijken echter minder gevoelig dan de qPCR-methoden voor detectie van deze beide organismen. Hoewel het aantal uitgevoerde experimenten met LAMP beperkt is en er geen uitgebreide vergelijking van de gevoeligheid is uitgevoerd, geven deze beperkte resultaten de indruk dat de onderzochte LAMP-reacties een factor 100 minder gevoelig zijn dan qPCR. Er lijkt daarbij weinig verschil in gevoeligheid van LAMP tussen het gebruik van fluorescente of colorimetrische detectie.

De conclusies uit deze resultaten is dat LAMP het mogelijk maakt om het DNA van micro-organismen op een eenvoudige manier aan te tonen, maar dat de geteste LAMP-methoden minder gevoelig zijn dan de gebruikte qPCR-methoden voor het aantonen van *E. coli* en *L. pneumophila*. Deze mindere gevoeligheid van LAMP is in tegenspraak met een eerdere studie waarbij LAMP werd toegepast voor het aantonen van micro-organismen in voedingsmiddelen [4], maar komt overeen met een recent ontwikkelde LAMP-methode voor detectie van humane *Bacteroides* in oppervlaktewater [23]. In die oppervlaktewaterstudie was LAMP een factor 100 minder gevoelig dan qPCR, vergelijkbaar met de waarnemingen in onze studie. De verschillende waargenomen gevoeligheden van de diverse LAMP-methoden suggereert dat de gevoeligheid sterk kan variëren tussen de verschillende methoden en

geeft aan dat optimalisatie van de LAMP-methode misschien mogelijk is. Het is daarom te verwachten dat , gevoeliger LAMP methoden te ontwikkelen zijn voor detectie van *E. coli* en *L. pneumophila*. Deze optimalisatie is vooral mogelijk door het ontwerpen van optimale primers. Hoewel voor het ontwerpen van primers software beschikbaar is, wordt geadviseerd om meerdere primermengsels te ontwerpen en om aansluitend te testen welke primers de beste resultaten opleveren. Voor directe kwantificatie is LAMP niet geschikt, kwantificatie is alleen enigszins mogelijk door reacties uit te voeren op meerdere verdunningen van het DNA (of RNA) en een “Meest Waarschijnlijk Aantal” (MPN: Most Probable Number) aanpak te gebruiken om een schatting te krijgen van de concentratie. Een dergelijke aanpak maakt de toepassing van LAMP minder eenvoudig en daardoor minder goed bruikbaar voor het uitvoeren van analyses op locatie als het van belang is om ook de aantallen van een specifiek organisme te weten. Voor het gebruik van LAMP voor de hygiënische betrouwbaarheid van drinkwater is het ontbreken van mogelijkheden voor kwantificatie geen grote belemmering aangezien het criterium van afwezigheid in 100 ml daarvoor wordt gehanteerd. Voor detectie van *E. coli* is een hoge gevoeligheid wel essentieel. Om afwezigheid in 100 ml te kunnen waarborgen is het immers noodzakelijk om aanwezigheid in 100 ml te kunnen aantonen. Om deze gevoeligheid te behalen met LAMP zijn er nog grote stappen te zetten in het verbeteren van de methode en is het te verwachten dat daarvoor zal moeten worden gekozen voor ontwikkeling van een methode waarmee RNA wordt aangetoond waarvan bekend is dat de concentratie van dit RNA in elke individuele cel zeer hoog is (zoals het 16S rRNA). Voor het beoordelen van de veiligheid van een installatie voor *L. pneumophila* is minder dan 100 KVE/L momenteel het criterium. Het is te verwachten dat een LAMP-methode waarmee kan worden voldaan aan dit criterium eenvoudiger haalbaar zal. De beperkte mogelijkheid voor kwantificatie kan voor een dergelijke methode wel een belemmering vormen.

I Gebruikte literatuur

1. Mullis, K., et al., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1986. **51 Pt 1**: p. 263-73.
2. Mahbubani, M.H., et al., *Detection of Legionella with polymerase chain reaction and gene probe methods*. Mol Cell Probes, 1990. **4**(3): p. 175-87.
3. Yan, L., et al., *Isothermal amplified detection of DNA and RNA*. Molecular BioSystems, 2014. **10**(5): p. 970-1003.
4. Ndraha, N., et al., *Rapid detection methods for foodborne pathogens based on nucleic acid amplification: Recent advances, remaining challenges, and possible opportunities*. Food Chemistry: Molecular Sciences, 2023. **7**: p. 100183.
5. Notomi, T., et al., *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. Nucleic Acids Res, 2000. **28**(12): p. E63.
6. Piepenburg, O., et al., *DNA detection using recombination proteins*. PLoS Biol, 2006. **4**(7): p. e204.
7. Lizardi, P.M., et al., *Mutation detection and single-molecule counting using isothermal rolling-circle amplification*. Nat Genet, 1998. **19**(3): p. 225-32.
8. Tan, M., et al., *Recent advances in recombinase polymerase amplification: Principle, advantages, disadvantages and applications*. Front Cell Infect Microbiol, 2022. **12**: p. 1019071.
9. Leonardo, S., A. Toldrà, and M. Campàs, *Biosensors Based on Isothermal DNA Amplification for Bacterial Detection in Food Safety and Environmental Monitoring*. Sensors, 2021. **21**(2): p. 602.
10. Reynolds, J., et al., *Recent Uses of Paper Microfluidics in Isothermal Nucleic Acid Amplification Tests*. Biosensors (Basel), 2023. **13**(9).
11. Martzy, R., et al., *Challenges and perspectives in the application of isothermal DNA amplification methods for food and water analysis*. Anal Bioanal Chem, 2019. **411**(9): p. 1695-1702.
12. Ahmad, F., et al., *Most probable number - loop mediated isothermal amplification (MPN-LAMP) for quantifying waterborne pathogens in <25min*. Journal of Microbiological Methods, 2017. **132**: p. 27-33.
13. Manzanas, C., et al., *Molecular testing devices for on-site detection of E. coli in water samples*. Sci Rep, 2023. **13**(1): p. 4245.
14. Lee, S., et al., *Rapid and in-situ detection of fecal indicator bacteria in water using simple DNA extraction and portable loop-mediated isothermal amplification (LAMP) PCR methods*. Water Res, 2019. **160**: p. 371-379.
15. Kotsiri, Z. and A. Vantarakis, *Evaluation of seawater monitoring for the detection of Escherichia coli and Enterococcus faecalis on an integrated biosensor system*. Sensor Review, 2023. **43**(2): p. 92-98.
16. Fu, J., et al., *Rapid quantification of fecal indicator bacteria in water using the most probable number - loop-mediated isothermal amplification (MPN-LAMP) approach on a polymethyl methacrylate (PMMA) microchip*. Water Res, 2021. **199**: p. 117172.
17. Oliveira, B.B., et al., *Water safety screening via multiplex LAMP-Au-nanoprobe integrated approach*. Sci Total Environ, 2020. **741**: p. 140447.
18. Lu, X., et al., *LAMP-based method for a rapid identification of Legionella spp. and Legionella pneumophila*. Appl Microbiol Biotechnol, 2011. **92**(1): p. 179-87.
19. Reuter, C., et al., *Loop-mediated amplification as promising on-site detection approach for Legionella pneumophila and Legionella spp.* Appl Microbiol Biotechnol, 2020. **104**(1): p. 405-415.
20. Samhan, F.A., et al., *On-filter direct amplification of Legionella pneumophila for rapid assessment of its abundance and viability*. Water Res, 2017. **121**: p. 162-170.
21. Heijnen, L., *Validation of a rapid RT-PCR method for intestinal enterococci (10 species) in distributed drinking water (Version 2024)*. 2024.
22. Wullings, B.A., G. Bakker, and D. van der Kooij, *Concentration and diversity of uncultured Legionella spp. in two unchlorinated drinking water supplies with different concentrations of natural organic matter*. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(2): p. 634-41.
23. do Nascimento, M.C.A., et al., *Development and evaluation of a colorimetric LAMP based-assay targeting the Bacteroides HF183 marker for tracking sewage pollution in environmental waters*. Water Research, 2024. **264**: p. 122202.

