



Ron van der Oost, Waternet

Charles Kientz, TNO Defensie en Veiligheid

Marco Dignum, Waternet

Jack Vogels, TNO Kwaliteit van Leven

Opsporen van ziekteverwekkende micro-organismen in de watercyclus met BiosparQ

BiosparQ (Bioaerosol Single Particle Recognition eEquipment) is een systeem dat TNO in opdracht van het ministerie van Defensie ontwikkelt om militairen te kunnen waarschuwen bij aanvallen met biologische wapens. Het systeem is in staat zeer snel ziekteverwekkende (pathogene) micro-organismen in de lucht te detecteren op grond van specifieke eiwitpatronen. In 2008 begon TNO samen met Waternet een onderzoek naar mogelijke toepassingen van deze technologie voor het waterbeheer. De belangrijkste vragen daarbij zijn: 'Welke pathogenen zitten er in het water?', 'Wat zijn de risico's hiervan?' en 'Hoe kunnen we daar zo snel mogelijk achter komen?'. De huidige normstelling voor microbiologische kwaliteit is gebaseerd op indicatororganismen en niet op de rechtstreekse analyse van pathogenen. In de eerste fase van dit onderzoek is bestudeerd of het BiosparQ-systeem de meest relevante pathogene bacteriën in aerosolen van rioolwater kan aantonen. Een andere belangrijke vraag bij dit onderzoek is of BiosparQ in staat is ziekteverwekkende bacteriën te onderscheiden van onschuldige verwanten.

Micro-organismen worden nu meestal met traditionele kweekmethoden aangetoond. Deze zijn arbeidsintensief en duren een aantal dagen. Die tijd is meestal te lang om bij een situatie met verhoogd risico snel maatregelen te kunnen nemen. Bovendien zijn niet alle micro-organismen te kweken. De huidige normstelling voor de biologische waterkwaliteit is gebaseerd op de gehalten van indicatororganismen. Als hoge gehalten van deze indicatorbacteriën (die voorkomen in de darmen van de mens) worden aangetoond, zitten er mogelijk ook pathogene bacteriën in het water. Met een rechtstreekse analyse van pathogenen in het water zou een betrouwbaarder detectie van besmettingen mogelijk zijn. Daarnaast is het belangrijk dat de analysetijd wordt verkort om snel maatregelen te kunnen nemen bij calamiteiten. Bij veel van de nieuwe ontwikkelingen, zoals moleculair biologische analyse van dna-samenstelling of eiwitpatronen, of detectie via antilichamen of ziekteverwekkende eigenschappen is ook een soort voorbereiding van de monsters nodig. Daarnaast zijn de testen meestal specifiek, je moet weten waarnaar je zoekt en daarvoor specifieke probes of anti-lichamen

maken. Voor een snelle risicoanalyse is het nodig om de micro-organismen direct en gevoelig aan te tonen in een mengsel.

Met de MALDI-TOF MS-techniek (Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation - Time Of Flight Mass Spectrometry) is het mogelijk betrouwbare eiwitvingerafdrukken van bacteriën te verkrijgen, maar hiervoor is een reïncultuur van de bacterie (en dus een kweekstap) noodzakelijk. Met de BiosparQ-technologie is het mogelijk eiwitvingerafdrukken van enkelvoudige bacteriën te maken. Het systeem is in staat binnen een minuut de aanwezigheid van pathogene micro-organismen in de lucht aan te tonen door herkenning van eiwitpatronen van bacteriën. Deze analyse is gebaseerd op de MALDI-techniek, waarbij een monster wordt beschoten met een laserstraal die de moleculen losmaakt van de matrix en ioniseert.

Om vernietiging van de biomoleculen te voorkomen, worden ze 'ingepakt in een beschermend laagje' (matrix). Bij de BiosparQ-technologie van TNO is het mogelijk enkelvoudige deeltjes (micro-organismen) met een beschermende matrix te omhullen en hiervan meteen het MALDI-

massaspectrum op te nemen¹⁾. Het grote voordeel hiervan is dat individuele deeltjes van een complex mengsel zijn te analyseren met een enkel schot van de laser.

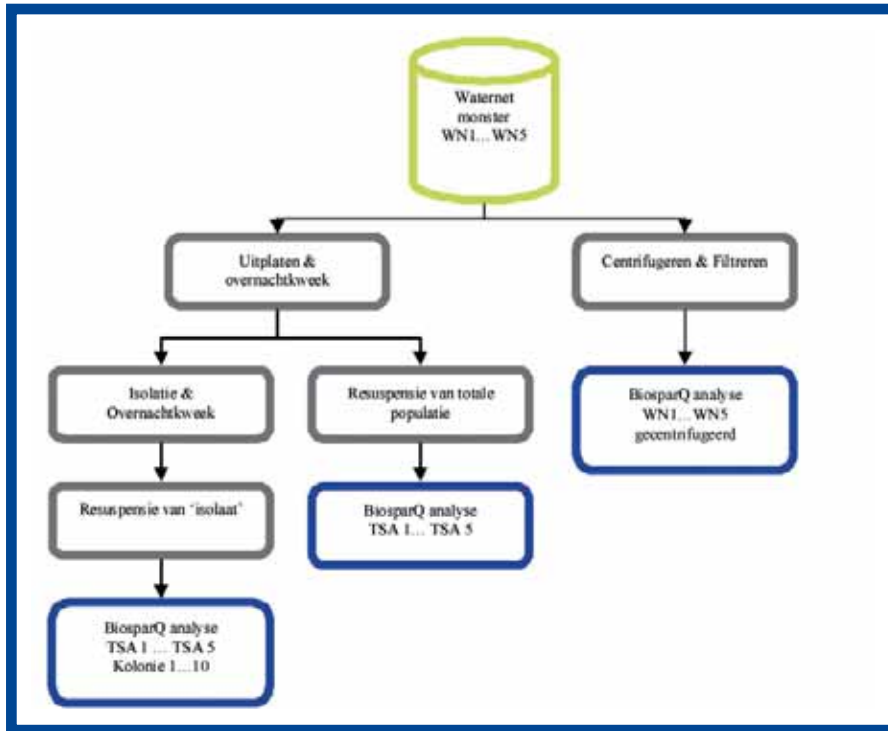
Onderzoek in rioolwater en rwzi

In dit onderzoek zijn ziekteverwekkers in lucht onderzocht die vrijkomen bij riool-schoonmaakwerkzaamheden en rond riool-waterzuiveringsinstallaties²⁾. Nadat Waternet had aangegeven welke micro-organismen het meest relevant zijn in rioolwater (zie tabel op pagina 48), is TNO deze gaan onderzoeken met behulp van de BiosparQ-technologie. De belangrijkste vragen bij dit onderzoek waren:

- Zijn met BiosparQ eiwitvingerafdrukken te maken van rwzi-relevante micro-organismen?
- Is het mogelijk de opgenomen spectra geautomatiseerd te onderscheiden en te interpreteren?
- Is het detectieprincipe van BiosparQ toepasbaar in de zeer complexe rioolwateromgeving?

Laboratoriumstudies met reïnculturen

Om de eerste vraag te beantwoorden, is een laboratoriumonderzoek uitgevoerd

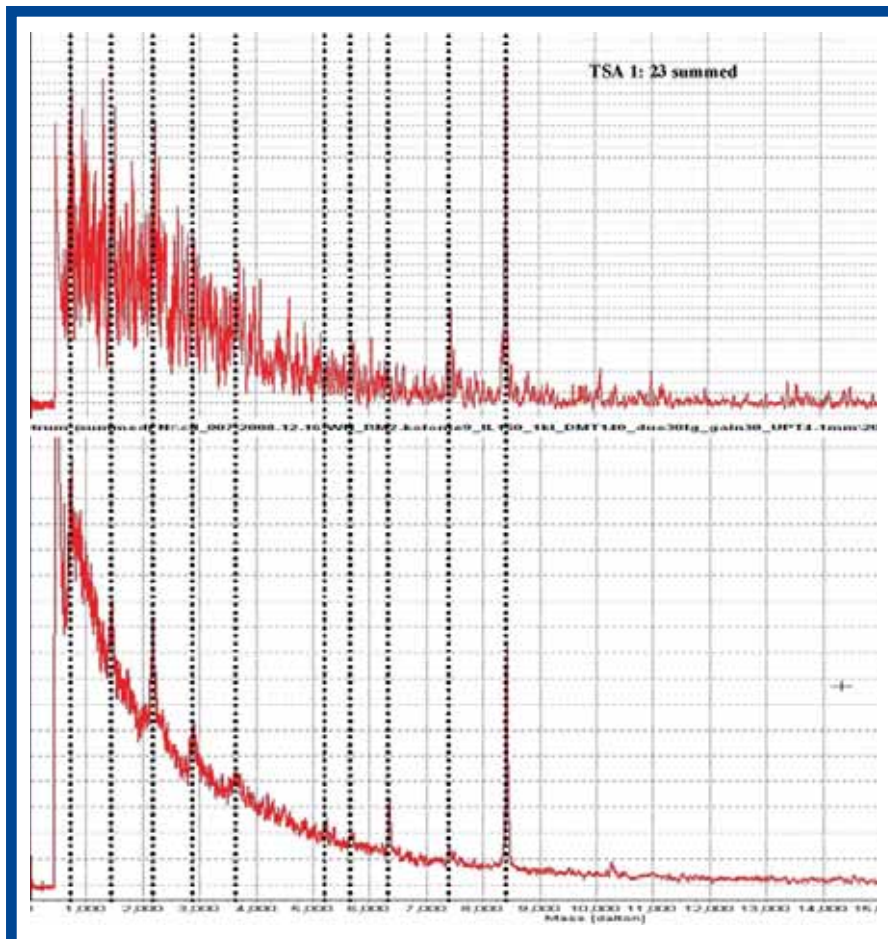


Afb. 1: schematische weergave van de kweek en analysestappen van de rioolwatermonsters

waarbij traditionele MALDI-spectra werden opgenomen van reïnculturen van de in de tabel vermelde pathogene bacteriën en hun niet-pathogene varianten. Bij deze analyses werd een vergelijkbare monstervoorbereiding voor de bacteriën gebruikt als bij

de BiosparQ-analyse. Alle bacteriën bleken voldoende specifieke signalen te geven om ze te kunnen detecteren. De eiwitpatronen van de ziekteverwekkende bacteriën waren duidelijk te onderscheiden van de niet-ziekteverwekkende varianten. Als de spectra

Afb. 2: Vergelijking van uit monster 1 geselecteerde spectra (boven, spectra geselecteerd op aanwezigheid piek rond 8400 Da) met het spectrum van een kolonie 2 afkomstig van monster 2 (onder)

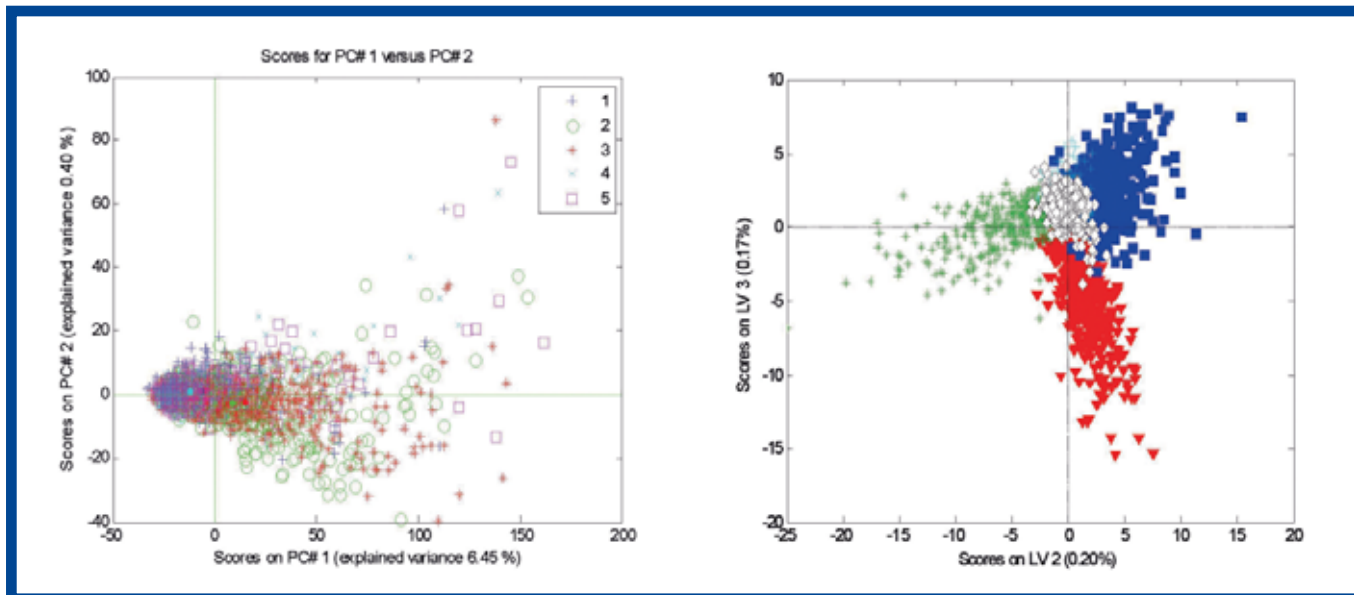


van dezelfde bacteriën met het BiosparQ-systeem worden opgenomen, blijkt dat een belangrijk deel van de pieken overeenkomt. Verschillende milieucondities (bijvoorbeeld andere kweekmedia) kunnen de samenstelling van de eiwitpatronen veranderen, maar dit bleek weinig effect te hebben op de selectiviteit van de classificatie. De BiosparQ-spectra hebben dus een vergelijkbare selectiviteit als de traditionele MALDI-spectra.

Laboratoriumonderzoek met rioolwater

De grootste uitdaging van deze fase van het onderzoek was om de pathogenen te karakteriseren in de zeer complexe rioolwatermatrix, met een natuurlijke achtergrond van vele onschuldige bacteriën, organische resten, schimmels, eencelligen, etc. In eerste aanleg werden hiervoor drie rioolwatermonsters (in een ziekenhuis, een woonwijk en een industriegebied) en twee rwzi-monsters (in een beluchtingbak en een bezinktank met influent) op het laboratorium onderzocht. De monsters werden op drie manieren voorbehandeld (zie afbeelding 1). De eerste voorbehandeling was alleen filtratie en centrifugatie. Als tweede voorbehandeling is het aandeel van de levensvatbare fractie versterkt door gedurende de hele nacht te kweken op een universeel medium bij 35°C. Als derde stap zijn enkele van de op de kweken aangetroffen kolonies geïsoleerd en via een 'overnachtkweek' verder vermenigvuldigd. Deze geïsoleerde stammen (isolaten) werden vervolgens gesuspenseerd. De voorbehandelde monsters werden met BiosparQ onderzocht door circa 100 µl watersuspensies te vernevelen tot een aerosol.

Met de BiosparQ-spectra van de isolaten werden spectra van karakteristieke eiwitpatronen gevonden, die echter niet overeenkwamen met de spectra van de onderzochte pathogene bacteriën (zie tabel). Classificatie zou mogelijk zijn als de spectra konden worden vergeleken met een voldoende grote referentiebibliotheek, die nu nog niet is samengesteld voor de BiosparQ. Om de individuele soorten te kunnen classificeren in alle spectra die werden opgenomen van een mengsel, zullen de spectra gesorteerd moeten worden. Bij vergelijking van een selectie van alle spectra met spectra van een reïnkweek uit een ander monster werden overeenkomstige karakteristieke piekpatronen gevonden (zie afbeelding 2). Hoewel BiosparQ in staat is om spectra op te nemen van enkele 'schoten', is het signaal van individuele bacteriën uit het gefiltreerde rioolwater nog niet geschikt voor een eenduidige interpretatie. Door verschillen in levensfase van de bacteriën, ionisatie-effectiviteit, variatie in deeltjessamenstelling, etc. is de eiwitssamenstelling te beïnvloeden en zal er altijd een variatie in het spectrum en een ruis in het signaal zijn. Bij sommatie van meerdere spectra van dezelfde deeltjes zullen de variatie en de ruis worden 'uitgemiddeld' en zal een eenduidiger signaal ontstaan. Omdat handmatig sorteren van duizenden *single shot* spectra ondoenlijk is, zal hiervoor een geautomatiseerde classificatie van de spectra moeten worden ontwikkeld.



Afb. 3: Twee statistische data-analyses, PCA (links) en robust PCA-PLS-DA (rechts) voor de sortering van single shot spectra van vijf pathogene bacteriën.

Geautomatiseerde data-analyse

De informatie-inhoud van het spectrum aan enkelvoudige bacteriën is door het individuele deeltjesconcept veel lager dan de informatie-inhoud van traditionele MALDI-TOF-spectra. Om een micro-organisme voldoende betrouwbaar aan te tonen, moeten meerdere enkelvoudige spectra worden gesommeerd om de informatie-inhoud te verhogen. Als de spectra afkomstig zijn uit een mengsel, moeten deze dus gesorteerd worden.

Om de tweede vraag van dit project (automatisering van onderscheid en interpretatie) te beantwoorden, zijn tien bekende statistische technieken geëvalueerd om spectra te sorteren. De meest gebruikte statistische toets op dit gebied, de Principale Component Analyse (PCA), bleek niet in staat de spectra goed te onderscheiden (zie afbeelding 3a). Om het onderscheidend vermogen te verbeteren, werd een aantal voorbehandelingen uitgevoerd op de dataset (onder andere het verwijderen van uitbijters): de zogeheten Robust PCA. Met een discriminantanalyse op deze dataset waren vervolgens vier van de vijf soorten bacteriën met ongeveer 80 procent zekerheid te identificeren (zie afbeelding 3b). De vijfde bacterie bleek lastiger te voorspellen (63 procent zekerheid). Na het sommeren van enkele tientallen positief geclassificeerde 'schoten' moet het mogelijk zijn de aanwezigheid van een pathogeen met een zeer hoge betrouwbaarheid (meer dan 95 procent kans op detectie, minder dan vijf procent kans op misclassificatie) aan te tonen.

Veldonderzoek met luchtbemonstering

Het prototype van de BiosparQ was tijdens het onderzoek niet beschikbaar voor veldmetingen. Daarom is de lucht op de monsterlocaties tijdens rioolwerkzaamheden en de rwzi op verschillende manieren bemonsterd. Er is gebruik gemaakt van een Slit-to-Agar-sampler (SA), een Air sampler (AS) en een Air-to-Liquid-sampler (AL), waarmee de opgezogen lucht (met aerosolen) respec-

tievelijk op kweekplaten, filters en in vloeistof werd geconcentreerd. Ook werd een aantal kweekplaten rechtstreeks boven de rioolput gehouden voor en tijdens het schoonspuiten van de riolen. De laatste methode liet zeer duidelijke verschillen zien tussen de bacteriegehalten voor en tijdens het spoelen van de riolen. Door de ongunstige weersomstandigheden (regen en wind) werden geen eenduidige resultaten gevonden. Doordat de bemonsteringsapparatuur naast de opening van de put stond, werd niet altijd een betrouwbaar beeld van het biologisch materiaal in de aerosolen verkregen. Met microscopisch onderzoek kon in de luchtmonsters een groot aantal soorten bacteriën worden aangetoond (onder andere *stafylococcen*, *pseudomonaden* en *enterobacteriaceae*), maar niet de pathogenen uit de tabel.

Detectielimiet

Met de huidige BiosparQ-apparatuur kunnen ongeveer 20 tot 30 schoten per seconde worden geanalyseerd. Voor een 95 procent positieve classificatie van een bacterie moeten minimaal 30 enkele schoten worden

gesommeerd. Met deze twee gegevens kan een schatting worden gemaakt van de detectielimieten van de BiosparQ. Om een concentratie van een pathogene bacterie op honderdduizend andere deeltjes (met vergelijkbare afmetingen) aan te tonen, zullen drie miljoen schoten moeten worden geanalyseerd voor een positieve classificatie. Deze analyse zou ongeveer 33 uur in beslag nemen bij een gemiddelde snelheid van 25 schoten per seconde.

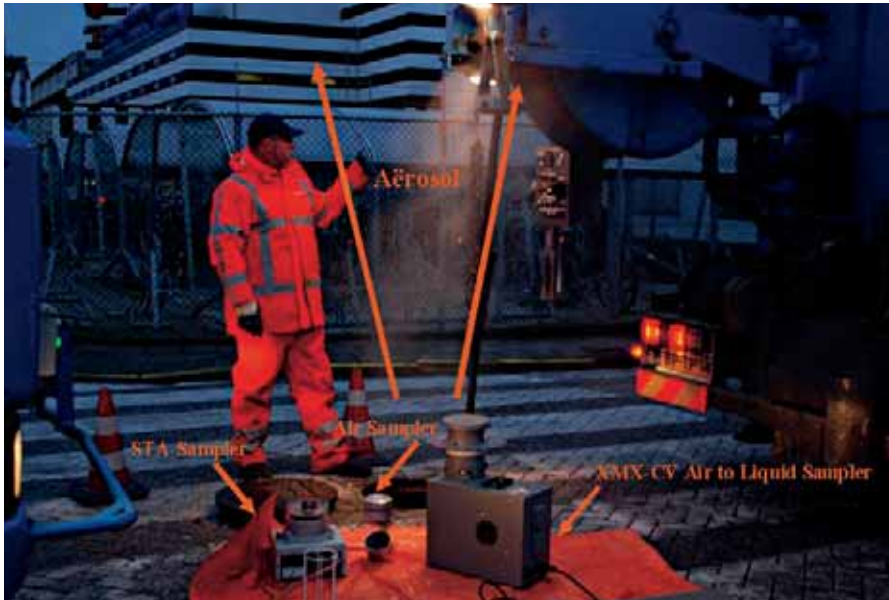
De huidige technologie van BiosparQ is gericht op analyse van grote hoeveelheden lucht en nog niet geoptimaliseerd voor een watertoepassing. Een gevolg hiervan is dat de analysesnelheid van het BiosparQ-systeem (nog) niet geschikt is voor het snel opsporen van pathogenen in de zeer complexe rioolwatermatrix, tenzij sprake is van een calamiteit (extreem hoog pathogeenengehalte).

Er zijn echter ontwikkelingen die de BiosparQ in staat zullen stellen de gewenste detectielimiet dicht te benaderen:

- het verhogen van de snelheid waarmee spectra kunnen worden opgeslagen;

Onderzochte pathogene bacteriën en niet-pathogene varianten voor het BiosparQ-project.

bacterie	ziektebeeld
<i>Campylobacter</i> spp. <i>Jejuni</i>	hoofdpijn, koorts, diarree, reactieve artritis, Syndroom van Guillain-Barré
<i>Campylobacter</i> spp. <i>Coli</i>	-
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	diarree, nierklachten
<i>Escherichia coli</i> O125	-
<i>Legionella pneumophila</i>	veteranenziekte
<i>Legionella anisa</i>	-
<i>Shigella dysenteriae</i> 60R	koorts, darmkrampen, diarree, reactieve artritis
<i>Shigella dysenteriae</i> Parijs	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	diarree, afwijkende ontlasting, reactieve artritis
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Endocarditis, longontsteking, oorontsteking
<i>Listeria monocytogenes</i> L028	hersenvlies-, longontsteking, uitslag
<i>Listeria monocytogenes</i> EGDe	-
<i>Listeria monocytogenes</i> Scott A	-



Plaatsing van de apparatuur voor de luchtbemonstering ten opzichte van de zichtbare aërosolen bij rioolreinigingswerkzaamheden.

- een nieuwe matrixcoater met verbeterde prestaties (hoger percentage positieve schoten);
- voor het analyseren al selecteren op deeltjesgrootte en/of microbiologische oorsprong.

Conclusies

De resultaten van dit onderzoek geven aanwijzingen over een aantal belangrijke zaken:

- Het BiosparQ-spectrum van eiwitpatronen is karakteristiek en lijkt voldoende onder-

scheidend om een bepaalde soort bacterie te kunnen detecteren;

- De BiosparQ-techniek lijkt geschikt om naar specifieke (pathogene) bacteriën te zoeken in een complex mengsel van levend microbiologisch materiaal en is in staat de pathogene bacteriën te onderscheiden van niet-pathogene verwanten;
- De spectra van individuele schoten bevatten voldoende informatie om deze geautomatiseerd te sorteren en te classificeren;
- In het zeer complexe rioolwater konden met de BiosparQ-techniek geen van de

vijf meest relevante pathogene bacteriën (*Campylobacter* spp., *Jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Legionella pneumophila*, *Shigella dysenteriae* 60R en *Salmonella enteritidis*) worden aangetoond;

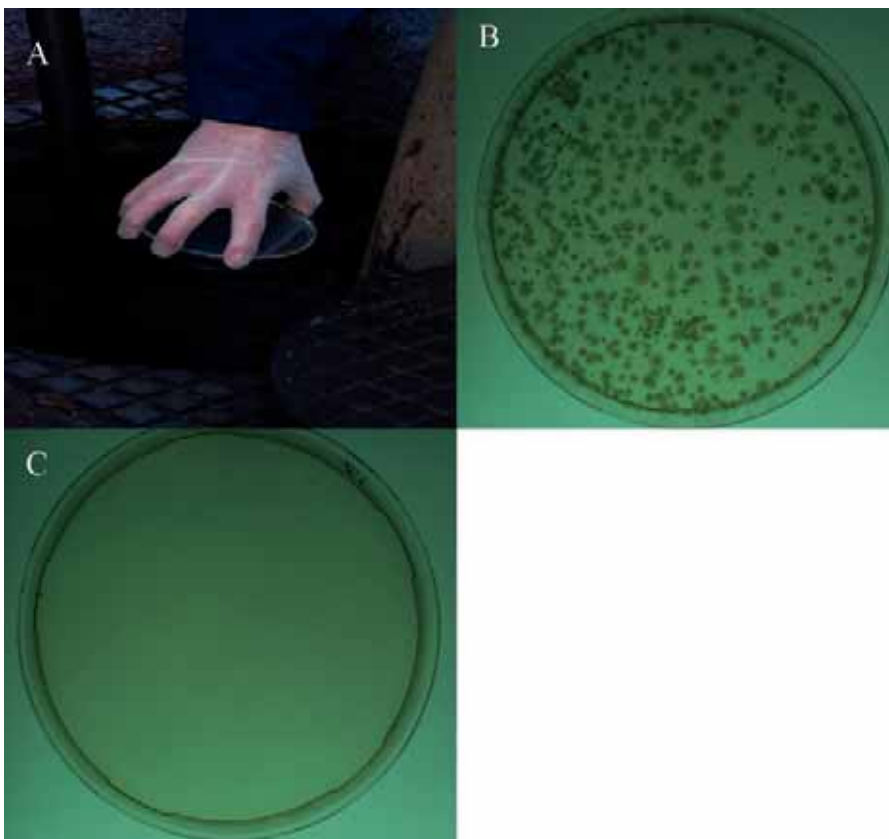
- Met de huidige technologie kan BiosparQ één bacterie detecteren tussen duizend andere deeltjes in circa 20 minuten.

Bij een eventueel vervolg zal eerst een aantal van de voorlopige conclusies van het huidige onderzoek moeten worden geverifieerd en moet het onderzoek worden uitgebreid tot de gehele watercyclus:

- BiosparQ-analyses van rioolwater waaraan verschillende concentraties pathogenen zijn toegevoegd om de verbeteringen van de detectielimiet te toetsen;
- de geautomatiseerde data-analyse toetsen met de relevante pathogenen uit de tabel;
- uitbreiding van de BiosparQ-bibliotheek met MALDI-spectra van meer pathogene organismen;
- het concentreren van watermonsters, zodat ook de overige onderdelen van de watercyclus (drink- en oppervlaktewater) kunnen worden onderzocht;
- voor drinkwater onderzoek naar pathogenen in bronnen, calamiteiten met drinkwater en de aanwezigheid van *Legionella* in het distributienet;
- voor het watersysteem in zijn geheel onderzoek naar pathogenen of giftige blauwalgen in zwemwater en rioolwater-overstorten.

Het uiteindelijke doel van het onderzoek is werknemers, recreanten en consumenten beter te beschermen tegen de risico's van ziekteverwekkende micro-organismen. Voor een mogelijk vervolgonderzoek zal eerst het draagvlak bij de overige waterbeheerders worden getoetst.

Directe luchtbemonstering op agar platen (A). Resultaten na 24 uur kweken van monsters tijdens het spoelen van de riolen (B) en de controle vooraf (C).



LITERATUUR

- 1) Van Wuijckhuijse A., C. Kientz en C. Degenhardt-Langelaan (2009). Matrix for mass spectrometry and MALDI MS method. EU patent nummer PT 1342256. Publication nr. WO02/052246 A2. TNO Defensie en Veiligheid.
- 2) Kientz C., I. Voskamp, R. Parchen en J. Vogels (2009). Verkenning van de mogelijkheden van real-time pathogenendetectie in rioolwater met BiosparQ. TNO. Rapport TNO-DV-2009-C374.