



Ciska Schets, Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu

Dick Bosboom, Stichting Waterlaboratorium Zuid

Edwin ten Brink, Hydron Advies en Diensten

Cor van der List, Aqualab

# Snelle bevestiging van verdacht *E. coli* in leidingwater met Bactident

**De Kontaktgroep Kwaliteitsborging Microbiologisch Onderzoek (KKBO), waarin enkele waterlaboratoria zijn vertegenwoordigd, onderzocht onlangs een test voor een snelle bevestiging binnen twee uur van de aanwezigheid van *E. coli* in drinkwater. Deze test (met de naam Bactident) werd genoemd in de VROM-Inspectierichtlijn voor de melding van normoverschrijdingen van de drinkwaterkwaliteit. Het resultaat blijkt niet veel af te wijken van de huidige beveiligingstest die echter pas na 18 tot 24 uur uitslag geeft.**

**E***Scherichia coli* is een indicator voor fecale verontreiniging van dierlijke of humane herkomst en daarmee ook voor mogelijke aanwezigheid van pathogene micro-organismen in water. *E. coli* behoort tot de bacteriën van de coligroep. Hun aanwezigheid is niet direct gerelateerd aan fecale verontreiniging en de aanwezigheid van pathogenen. Bacteriën van de coligroep kunnen bijvoorbeeld ook uit de bodem afkomstig zijn en zijn bovendien zelfs onder bepaalde omstandigheden in staat zich in water te vermenigvuldigen. Wanneer bacteriën van de coligroep in drinkwater worden aangetroffen, is het van belang om zo spoedig mogelijk vast te stellen of *E. coli* aanwezig is. In geval van een positieve uitslag moeten zo snel mogelijk maatregelen genomen worden om de volksgezondheid te beschermen tegen mogelijk negatieve gezondheidseffecten als gevolg van de aanwezigheid van pathogene micro-organismen in het drinkwater.

## Inspectierichtlijn

In de 'Inspectierichtlijn voor de melding van normoverschrijdingen drinkwaterkwaliteit' van het Ministerie van VROM<sup>1)</sup> is ten aanzien van de microbiologische parameters bacteriën van de coligroep en *E. coli* onder andere het volgende opgenomen: 'Periodieke monsters van het distributienet worden in de regel onderzocht op aanwezigheid van bacteriën van de coligroep (coli37) en *E. coli* via NEN-EN-ISO 9308-1 (kweek op laurylsulfaatagar bij 36±2°C). Wanneer bij

het aflezen typische (gele) kolonies worden aangetroffen, dienen deze kolonies direct aansluitend te worden onderzocht op aanwezigheid van *E. coli*, met snelle methoden die binnen circa twee uur uitsluitel kunnen geven. Hiermee kan binnen circa 21 uur vanaf het moment van inzetten van het monster uitsluitel worden verkregen over het al dan niet aanwezig zijn van *E. coli* in het onderzochte monster. Parallel aan dit onderzoek worden de bevestigingstesten volgens NEN-EN-ISO 9308-1 uitgevoerd. In een voetnoot is aangegeven dat de beschikbare snelle methoden bijvoorbeeld Bactident *E. coli* van Merck of PCR-technieken zijn.

## Bevestiging

In het hier beschreven onderzoek is door drie waterleidinglaboratoria (Waterlaboratorium Zuid, Hydron Advies en Diensten en Aqualab) de bepaling van het aantal bacteriën van de coligroep uitgevoerd volgens NEN-EN-ISO 9308-1<sup>3)</sup>, waarbij laurylsulfaatagar (LSA) als isolatiemedium werd gebruikt. Bevestiging van typische kolonies vond plaats volgens NEN-EN-ISO 9308-1, waarbij een oxidase- en indol-test werden uitgevoerd, én met behulp van Bactident. Deze laatste werd in de studie afgelezen na twee, drie en vier uur incubatie. Het onderzoek is uitgevoerd om vast te stellen of beide bevestigingsmethoden dezelfde uitslag geven omtrent de aanwezigheid van *E. coli*. Indien typische kolonies op basis van de twee bevestigingsmethoden verschillend werden beoordeeld, werden de betreffende isolaten door twee laboratoria

geïdentificeerd met behulp van het API 20E identificatiesysteem van BioMerieux, terwijl één laboratorium hiervoor PCR (*uidA* gen) toepaste.

## Overeenkomst bevestigingstesten

Van de 626 met beide methoden bevestigde karakteristieke kolonies van LSA waren 18 afkomstig uit watermonsters uit gechlorreerde zwembaden; de overige isolaten werden geïsoleerd uit drinkwater, drinkwaterhalfproducten en oppervlaktewater. Van deze isolaten werd 56 procent (n = 350) met de bevestigingstesten volgens NEN-EN-ISO 9308-1 als *E. coli* gekenmerkt. Indien met behulp van Bactident werd bevestigd, werd na de voorgeschreven incubatie van twee uur 42 procent (n = 264) van de karakteristieke kolonies als *E. coli* gekenmerkt; dit percentage liep op naar 47 procent (n = 296) na drie uur en 48 procent (n = 299) na vier uur incubatie.

Wanneer het totaal aantal bevestigingsresultaten in beschouwing werd genomen, bleek dat de bevestigingstesten volgens NEN-EN-ISO 9308-1 en Bactident, afgelezen na twee uur incubatie, voor 85 procent van de isolaten een gelijke beoordeling gaven (zie tabel 1). De uitslag van de bevestiging kon '*E. coli*' of 'geen *E. coli*' zijn, maar was voor de betreffende isolaten met beide methoden dezelfde. Bij aflezen van Bactident na drie en vier uur werd voor 90 procent van de isolaten een gelijke beoordeling verkregen. Vergelijking van de bevestiging volgens NEN-

LAB. NUMMER	AANTAL ISOLATEN	AANTAL ISOLATEN MET OVEREENKOMSTIGE BEOORDELING		
		BACTIDENT NA TWEE UUR	BACTIDENT NA DRIE UUR	BACTIDENT NA VIER UUR
1	287	226	239	241
2	57	53	53	53
3	264	246	256	257
3 zwemwater	18	5	14	14
totaal (% overeenkomst)	626	530 (85)	562 (90)	565 (90)

**Tabel 1. Isolaten met een gelijke bevestiging door de testen uit NEN-EN-ISO 9308-1 en Bactident, afgelezen na twee, drie en vier uur.**

IDENTIFI- CATIE METHODE	AANTAL ISOLATEN	BACTIDENT NA TWEE UUR		NEN-EN-ISO 9308-1	
		VALS- POSITIEF	VALS- NEGATIEF	VALS- POSITIEF	VALS- NEGATIEF
API 20E	4	-	3	-	1
	2	1	1	1	1
	4*	-	4	-	-
	15	-	1	-	3
PCR	13	1	12	-	1
totaal	38	2	35	1	6

\* = zwemwater

**Tabel 2. Identificatie van isolaten waarvoor bevestiging volgens NEN-EN-ISO 9308-1 en met Bactident geen overeenkomstige resultaten opleverde.**

EN-ISO 9308-1 met bevestiging met behulp van real-time PCR in een eerder door Kiwa en Waterlaboratorium Noord uitgevoerde studie, resulteerde voor 91 procent van de onderzochte isolaten in een overeenkomstige uitslag<sup>2)</sup>.

De overeenkomst tussen bevestiging volgens NEN-EN-ISO 9308-1 en met Bactident nam toe met het verlengen van de incubatietijd van Bactident van twee naar drie uur. Bij verlengde incubatie bleek met name de  $\beta$ -glucuronidase-reactie vaker positief te zijn. Er is geen relatie gevonden tussen de herkomst van het overgrote deel van de isolaten en een mogelijke vertraagde  $\beta$ -glucuronidase-reactie. Voor de isolaten afkomstig uit gechlorideerde zwembaden was dit wel duidelijk: de overeenkomst tussen bevestiging volgens NEN-EN-ISO 9308-1 en Bactident na twee uur was zeer gering; voor de meerderheid van de isolaten was de  $\beta$ -glucuronidase-reactie vertraagd.

Hoewel voor een groter aantal isolaten een afwijking tussen de verschillende bevestigingstesten bestond, is voor 25 isolaten een API 20E-identificatie en voor 13 isolaten een identificatie met behulp van PCR uitgevoerd. Uit de resultaten hiervan werden aanwijzingen verkregen dat bevestiging met Bactident vaker vals-negatieve resultaten oplevert dan de bevestiging volgens NEN-EN-ISO 9308-1 (zie tabel 2).

Bevestiging volgens NEN-EN-ISO 9308-1

is gebaseerd op het vermogen van *E. coli* om tryptofaan om te zetten in indol bij een incubatietemperatuur van 44°C; 96 tot 98 procent van de *E. coli*-stammen is hiertoe in staat<sup>2),3)</sup>. Bevestiging met behulp van Bactident is gebaseerd op de indol-test én de  $\beta$ -glucuronidase-activiteit van *E. coli*. Eerder onderzoek in Nederland heeft aangetoond dat het aantal *E. coli*, geïsoleerd uit water, dat geen  $\beta$ -glucuronidase-activiteit vertoont kan oplopen tot 14 procent<sup>4)</sup>. Ook in de hier gerapporteerde studie bleek dat het merendeel van de vals-negatieve Bactident-uitslagen werd veroorzaakt door een negatieve  $\beta$ -glucuronidase-reactie. Het aantal vals-positieve bevestigingen is zowel met Bactident als volgens NEN-EN-ISO 9308-1 gering (zie tabel 2).

Uit eerdere studies bleek ook dat een vals-positieve  $\beta$ -glucuronidase-reactie weinig voorkomt<sup>4),5)</sup>, hoewel sommige *Shigella* en *Salmonella* spp.  $\beta$ -glucuronidase-activiteit bezitten<sup>5)</sup>. Andere bacteriesoorten dan *E. coli*, die met de toegepaste methoden uit water geïsoleerd kunnen worden, zoals *Klebsiella* spp. en *Escherichia* spp., vertonen ook bij 44°C een positieve indol-reactie en kunnen vals-positieve uitslagen veroorzaken<sup>4),5)</sup>.

### Conclusies

- Bevestiging van karakteristieke kolonies op LSA volgens NEN-EN-ISO 9308-1 of met Bactident volgens de gebruiksaanwijzing (i.e. aflezen na twee uur incubatie) levert in 85 procent van de gevallen een gelijk resultaat

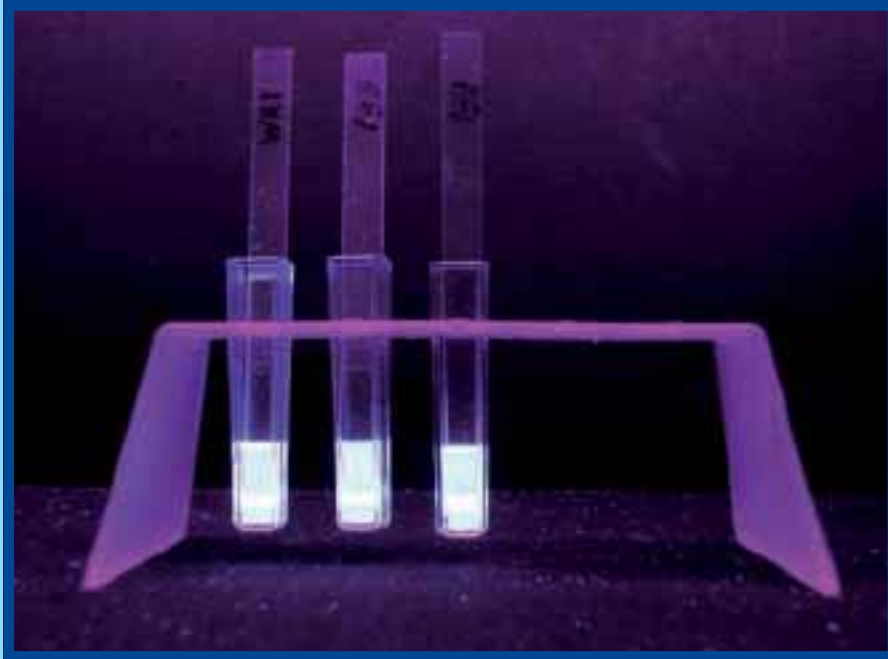
op. Verlenging van de incubatietijd voor Bactident van twee naar drie uur doet de overeenkomst stijgen tot 90 procent;

- Karakteristieke kolonies op LSA worden met de bevestigingstesten volgens NEN-EN-ISO 9308-1 vaker als *E. coli* bevestigd dan met Bactident;
- Bactident geeft meer vals-negatieve resultaten dan de bevestigingstesten volgens NEN-EN-ISO 9308-1 als gevolg van het feit dat er meer *E. coli*-stammen  $\beta$ -glucuronidase-negatief zijn dan indol-negatief.

### Volledige zekerheid bestaat niet

Snelle bevestiging van karakteristieke kolonies op LSA met behulp van PCR of Bactident geeft na twee uur voor respectievelijk 91 en 85 procent van de isolaten eenzelfde uitslag als bevestiging van deze karakteristieke kolonies volgens NEN-EN-ISO 9308-1.

Er is geen bevestigingstest die een absolute uitslag geeft; elke test geeft vals-negatieve en vals-positieve uitslagen. Een test met een zo laag mogelijk percentage vals-negatieve en vals-positieve uitslagen geeft het meest betrouwbare bevestigingsresultaat. De indol-test geeft bij 96 tot 98 procent van de *E. coli*-stammen een positief resultaat. Daarentegen zijn vier tot tien procent andere uit water te isoleren soorten indol-positief<sup>4),5)</sup>. Het *uidA*-gen is in 98 procent van de *E. coli*-stammen aanwezig, maar komt slechts bij 92 procent van de stammen tot expressie in een positieve  $\beta$ -glucuronidase-reactie<sup>7)</sup>. Het *uidA*-gen is ook aanwezig in sommige *Shigella*-en



*Salmonella*-soorten, die ook in water kunnen voorkomen en van fecale herkomst kunnen zijn<sup>8)</sup>. Bij directe bepaling van de  $\beta$ -glucuronidase-activiteit van *E. coli* is 86 tot 89 procent positief<sup>4),5)</sup>. Naast sommige *Shigella*-en *Salmonella*-soorten zijn ook enkele Gram-positieve bacteriën, zoals soorten uit het geslacht *Staphylococcus* en *Clostridium* en streptococci uit de groepen B en D  $\beta$ -glucuronidase positief<sup>6)</sup>. Het percentage vals-positieven ligt zowel voor de  $\beta$ -glucuronidase-reactie (deze studie) als voor het *uidA*-gen<sup>8)</sup> rond vijf procent. Een combinatie van een indol-test en toetsing op de aanwezigheid van het *uidA*-gen met behulp van PCR lijkt het meest betrouwbare bevestigingsresultaat voor *E. coli* op te leveren. Voor snelle bevestiging van karakteristieke kolonies op LSA lijkt een PCR die het *uidA*-gen aantoonst het meest geschikt.

#### Literatuur

- 1) VROM-Inspectie (2005). Inspectierichtlijn voor de melding van normoverschrijdingen drinkwaterkwaliteit.
- 2) Heijnen L., G. Wubbels, H. Veenendaal en G.-J. Medema (2005). Real-time PCR bevestigt snel en betrouwbaar *E. coli*-kolonies. *H<sub>2</sub>O* nr. 7, pag. 69-71.
- 3) Anonymous (2000). NEN-EN-ISO 9308-1. Detectie en enumeratie van *Escherichia coli* en bacteriën van de coligroep - Deel 1: Methode met membraanfiltratie.
- 4) Schets F. en A. Havelaar (1991). Comparison of indole production and  $\beta$ -glucuronidase activity for the detection of *Escherichia coli* in a membrane filtration method. *Letters in Applied Microbiology* nr. 13, pag. 272-274.
- 5) Schets F., G. Medema en A. Havelaar (1993).

Comparison of Colilert with Dutch standard enumeration methods for *Escherichia coli* and total coliforms in water. *Letters in Applied Microbiology* nr. 17, pag. 17-19.

- 6) Manafi M., W. Kneifel en S. Bascomb (1991). Fluorogenic and chromogenic substrates used in bacterial diagnostics. *Microbiological reviews* nr. 55, pag. 335-348.
- 7) Martins M., I. Rivera, D. Clark, M. Stewart, R. Wolfe en B. Olson (1993). Distribution of *uidA* gene sequences in *Escherichia coli* isolates in water sources and comparison with the expression of  $\beta$ -glucuronidase activity in 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide media. *Applied and Environmental Microbiology* nr. 59, pag. 2271-2276.
- 8) Trepeta R. en S. Edberg (1984). Methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide-based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* nr. 19, pag. 172-174.