

SPECIFIEKE DETECTIE VAN MENSPATHOGENE (OÖ)CYSTEN IN WATER

Nieuwe methoden voor opsporen *Cryptosporidium* en *Giardia*

Moleculaire technieken ontwikkelen zich snel en kunnen steeds beter voor microbiologisch onderzoek van water worden toegepast. Kiwa heeft deze ontwikkeling omarmt en beschikt nu over moleculaire methoden waarmee onderscheid gemaakt kan worden tussen wel en niet menspathogene *Cryptosporidium* en *Giardia*-soorten in water.

De huidige methode voor de detectie van *Cryptosporidium* en *Giardia* in water is in de VS ontwikkeld. Deze methode maakt gebruik van antilichamen die zijn gelabeld met een fluorescerende stof die aan de wand van de (oö)cyste hecht. Daarmee worden ze zichtbaar onder de fluorescentiemicroscop. Deze methode wordt wereldwijd gebruikt voor onderzoek van water en is door de US Environmental Protection Agency en door het Drinking Water Inspectorate in Groot-Brittannië voorgeschreven.

De specificiteit berust op de antilichaam-antigeen reactie. De afgelopen jaren is herhaaldelijk gebleken dat andere aquatische organismen ook kunnen reageren met deze antilichamen. De meeste zijn morfologisch goed te onderscheiden van (oö)cysten, maar een deel komt sterk overeen. Er zijn verfijningen van de methode ontwikkeld om misidentificatie zo goed mogelijk te voorkomen, zoals hulpkleuring met DAPI of onderzoek van de inhoud van (oö)cysten met contrastmicroscopie (DIC). De methode is niet specifiek voor menspathogene *Cryptosporidium* en *Giardia*. Hij detecteert ook soor-

ten die alleen bij bepaalde diergroepen (vogels, reptielen, vissen) voorkomen en niet pathogeen zijn voor de mens. Verder maakt de methode geen onderscheid tussen levende en dode (oö)cysten.

EU-EWRI-BTO onderzoek

In een onderzoek dat Kiwa samen met haar European Water Research Institutes (EWRI)- partners heeft uitgevoerd, is de opbrengst en betrouwbaarheid van de opwerkmethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* verbeterd. Water wordt nu eerst gefiltreerd over een Envirochek filter met een hogere opbrengst. Na elutie van het materiaal (met de (oö)cysten) dat op het filter is achtergebleven, wordt het concentraat gezuiverd door immunomagnetische separatie (IMS). Het waterconcentraat wordt gemengd met een suspensie van magnetische bolletjes met daaraan antilichamen tegen *Cryptosporidium* en *Giardia*. De (oö)cysten hechten aan de bolletjes en door een magneet naast het reageerbuisje te houden worden de bolletjes vastgehouden terwijl de overige deeltjes (algen, zand, klei

etc.) weggespoeld worden (afbeelding 1). Vervolgens worden de (oö)cysten weer van de bolletjes afgeweekt, gefiltreerd over een 25 mm membraanfiltertje en aangekleurd met gelabelde antilichamen. Het filter gaat de Chemsan laser-scanner in die het preparaat in drie minuten screent op het voorkomen van fluorescerende deeltjes met de karakteristieken van (oö)cysten. Dit wordt bevestigd onder de fluorescentiemicroscop, waarbij gebruik gemaakt wordt van DAPI om de interne structuren te kunnen determineren.

Moleculaire methoden

De ontwikkelingen in de moleculaire technieken gaan snel. Deze methoden gebruiken de unieke eigenschappen van het erfelijk materiaal (DNA en RNA). Deze technieken vinden overal toepassingen, met forensisch onderzoek als bekend voorbeeld. Toepassing voor microbiologisch onderzoek van water wordt al een aantal jaren in steeds meer research-laboratoria onderzocht. De methoden zijn in veel gevallen specifiek en sneller dan de bestaande methoden. Voor sommige virussen die van belang zijn voor drink- en zwemwater, zoals de calicivirusen, zijn moleculaire methoden de enige methoden die detectie mogelijk maken. Sinds 1998 worden moleculaire methoden ook bij Kiwa geïmplementeerd. In die relatief korte tijd zijn moleculaire methoden al een belangrijke uitbreiding van het arsenaal gebleken, bijvoorbeeld voor snelle en specifieke detectie van *Legionella* en *Cryptosporidium* en *Giardia*, maar ook typering van *E. coli* stammen tijdens de besmetting van distributienetten.

Cryptosporidium en *Giardia*

Sinds 1998 is gewerkt aan de implementatie van moleculaire methoden voor de detectie van *Cryptosporidium* en *Giardia*, in het kader van het Bedrijfstakonderzoek en met een extra impuls van Waterbedrijf Europoort. In de internationale literatuur zijn de eerste toepassingen al in 1991 beschreven, maar hebben de methoden pas de laatste jaren een echte impuls gekregen. Hoe meer bekend wordt over de genetische opbouw van deze parasieten, hoe beter de methoden toe te passen zijn. In 1997 en 1998 publiceerden onderzoekers van het Metropolitan Water District of Southern California en Australian Water Technologies min of meer gelijktijdig het gebruik van het genetisch materiaal dat codeert voor heat shock proteïns voor de specifieke detectie van *Cryptosporidium parvum*, toen nog de enige

Afb. 1. Zuivering van (oö)cysten uit een waterconcentraat met immunomagnetische bolletjes.



