

Microbiologische wateranalyses binnen 1,5 uur

Annelise Herman, Aleida de Vos van Steenwijk (Orvion), Tesse Bijleveld (WE Consult)

Mozambique is begin maart zeer zwaar getroffen door de cycloon Idai en de daaropvolgende overstromingen. De situatie in Mozambique is nog steeds zeer ernstig en zal grote langetermijngevolgen hebben. Drinkwater van goede kwaliteit is schaars en het risico op epidemieën is groot. De auteurs leven mee met de slachtoffers en hopen dat er spoedige en duurzame maatregelen getroffen worden, zodat dit nooit meer gebeurt. Dit onderzoeksproject vond plaats in de periode van oktober 2017-oktober 2018, voor deze natuurramp.

Met mobiele DNA-technieken is het mogelijk om snel (binnen 1,5 uur) en lokaal nauwkeurig te analyseren of water besmet is met ziekteverwekkers. Orvion en WE Consult hebben methoden ontwikkeld en getest voor waterkwaliteitsmonitoring in Mozambique. De resultaten en opgedane ervaringen tonen dat DNA-technieken een grote impact kunnen hebben op het genereren van data over microbiologische waterkwaliteit in ontwikkelingslanden (en daarbuiten), en een belangrijke bijdrage kunnen leveren aan een tijdige en adequate reactie in geval van contaminatie.

Net als veel andere landen kent Mozambique een slechte waterkwaliteit, vooral door vervuiling van drinkwaterbronnen met ontlasting (fecale verontreiniging). Huidige methoden voor het meten en monitoren van de microbiologische waterkwaliteit zijn niet eenvoudig en niet accuraat en bovendien niet snel genoeg om accurate data over de microbiologische waterkwaliteit te genereren. Bovendien is het in de meeste gevallen alleen mogelijk om te testen op fecale indicatororganismen, zoals de alom bekende 'poepbacterie' *Escherichia coli* (*E. coli*). Voor vele ziekteverwerkers zijn dit echter geen goede indicatoren.

En dat terwijl nauwkeurige data over waterkwaliteit onmisbaar zijn om verbetering te bewerkstelligen. Bijvoorbeeld voor overheden of niet-gouvernementele organisaties (NGO's) om tijdig preventieve maatregelen te nemen en om beperkte middelen effectief in te zetten. Data over microbiologische waterkwaliteit helpen ook om gedragsverandering bij gemeenschappen teweeg te brengen, bijvoorbeeld ten aanzien van hygiëne. Hiervoor is het – bijvoorbeeld volgens Unicef - noodzakelijk dat de resultaten binnen drie uur beschikbaar zijn en worden gevisualiseerd voor de lokale bevolking, zodat nut en noodzaak van gedragsverandering direct duidelijk worden [1].

De bovengenoemde uitdagingen benadrukken het belang van eenvoudige, accurate en snelle monitoring van de microbiologische waterkwaliteit. De kweekmethoden die volgens de huidige standaarden worden toegepast kunnen hier niet aan voldoen. Ze moeten alleen al 24 uur (of langer) worden ingezet bij specifieke temperaturen, waardoor een snel resultaat nooit haalbaar is. Er is behoefte aan nieuwe methoden om microbiologische waterkwaliteit te monitoren die passen binnen de huidige eisen van snelheid, nauwkeurigheid en eenvoud. Deze noodzaak wordt onderkend door Unicef en de Wereldgezondheidsorganisatie (WHO) die een *target product profile* (TPP) hebben uitgezet voor de ontwikkeling van een nieuwe methode om *E. coli* in het veld te monitoren [1].

Analyse van microbiologische waterkwaliteit binnen 1,5 uur

Binnen dit project zijn methodes ontwikkeld en testen uitgevoerd met een mobiel analyseapparaat waarmee bacteriën op basis van het DNA worden gemeten door middel van *quantitative Polymerase Chain Reaction* (qPCR, zie afbeelding 1). De qPCR-technologie is de afgelopen jaren sterk doorontwikkeld om deze toegankelijk te maken voor niet-specialisten (ze wordt steeds eenvoudiger en goedkoper). Milieuadviesbureau Orvion heeft de qPCR-analyses voor vijf bacteriesoorten ontwikkeld, gevalideerd en op het mobiele apparaat Biomeme two3™ geïmplementeerd. Vervolgens zijn testen buiten het lab in Mozambique uitgevoerd.



Afbeelding 1. Schematische weergave van de stappen voor het analyseren van watermonsters in het veld met behulp van qPCR. De drie stappen worden doorlopen binnen 1,5 uur

De ontwikkelde methode is gebruikt om workshops en demonstraties te geven aan verschillende geïnteresseerde partijen in Maputo, Mozambique (zie afbeelding 2). Hiervoor is gesproken met NGO's, overheidsinstanties (waterschappen, netbeheerder, controlerende instantie, etc.), private bedrijven en laboratoria in Mozambique. Tijdens de demonstraties werd getest welke van twee op het oog identieke waterflessen besmet was met *E. coli*. Daarbij werd één monster onder begeleiding geanalyseerd door mensen zonder enige ervaring met DNA-technieken. Het unieke was dat de testen ter plekke in de vergaderzalen werden uitgevoerd. Ook zijn analyses uitgevoerd in een café, in hotelkamers en in het veld.



Afbeelding 2. Een demonstratie van de techniek bij Águas de Região de Maputo, de drinkwaterleverancier in Maputo (linksboven); E. coli wordt geanalyseerd (rood omcirkeld) tijdens het nuttigen van een kop koffie in een hotel in Maputo (rechtsboven); Een E. coli-analyse in het veld in Bilene (linksonder); een demonstratie aan de deelnemers van een DUPC VIA Water event, gehouden in de Universidade Eduardo Mondlane in Maputo (rechtsonder)

De deelnemers aan de workshops en demonstraties ervaren een aantal voordelen van deze methodiek:

- (i) Resultaten worden binnen 1,5 uur verkregen, in plaats van minimaal 24 uur met huidige kweekmethoden.
- (ii) De gegenereerde resultaten zijn kwantitatief, in tegenstelling tot andere methoden die (semi-) kwalitatieve resultaten genereren.
- (iii) Verschillende organismen worden met hetzelfde apparaat en protocol geanalyseerd. Er kan zo ook direct worden gemeten op bacteriën die daadwerkelijk ziektes veroorzaken zoals cholera, tuberculose (tbc) en tyfus. Dit betekent dat het kan worden gebruikt in allerlei situaties, zoals routinelabwerk, veldwerk, monitoring, gedragsverandering, noodsituaties en kwaliteitscontrole.
- (iv) Er is geen koeling (*cold chain*) of incubatie en dus geen specifieke temperaturen nodig om de analyses uit te voeren. De reagentia zijn stabiel bij kamertemperatuur.
- (v) De gegenereerde resultaten zijn digitaal (incl. GPS-gegevens) en kunnen daarom makkelijk worden gerapporteerd, gedeeld en geüpload naar centrale databases of derden

(opdrachtgever, projectleider, kwaliteitsbeheerder, etc.). De resultaten hoeven niet door de veldwerker te worden geïnterpreteerd of gerapporteerd.

- (vi) Er is geen transport nodig naar een centraal laboratorium. Dit transport is een aanzienlijke kostenpost bij veldstudies. In sommige gevallen is het niet mogelijk om de monsters binnen 24 uur gekoeld bij een laboratorium te krijgen vanwege hoge temperaturen en grote afstanden.

Daarnaast werd tijdens de demonstraties duidelijk dat het niet altijd nodig is om over een veldapparaat te beschikken, maar dat een iets groter apparaat (waarmee meer monsters en meer bacteriesoorten tegelijk worden geanalyseerd) op een centrale locatie of een mobiel laboratorium in sommige gevallen nuttiger is. Met deze set-up is nog steeds geen koeling nodig, aangezien de monsters direct bij monsternamen worden geconserveerd en daardoor niet hoeven te worden gekoeld tijdens transport.

Waterkwaliteit in Mozambique

Naast het testen van de mobiele DNA-methode zijn ook 134 watermonsters genomen op verschillende locaties in Mozambique: Maputo, Bilene, Xai Xai, Manjacaze, Beira, Tete en Songo (zie afbeelding 3). Het doel van deze analyses was om te demonstreren welke informatie kan worden verkregen door toepassingen van DNA-technologie.



Afbeelding 3. Kaart van Mozambique met de verschillende locaties waar bemonsterd is (Google Maps, 2018)

De locaties zijn geselecteerd in samenwerking met Mozambikaanse partijen die – vanuit verschillende perspectieven – waren geïnteresseerd in waterkwaliteit en de ontwikkelingen van nieuwe technologieën om deze te kunnen meten. Verschillende casussen zijn in het project meegenomen:

- Het doormeten van drinkwaterdistributienetwerken om te bepalen (i) of de bron schoon is (ii) of de waterzuivering effectief is (iii) of nagroei in het leidingwerk optreedt (iv) in hoeverre slechte hygiëne/opslag van kraanwater bijdraagt aan de verslechtering van de drinkwaterkwaliteit.

- Of tankwagens een risico vormen voor de drinkwaterkwaliteit. Dergelijke trucks (zie afbeelding 4) worden steeds vaker gebruikt om bronwater naar steden te transporteren en het water daar te verkopen. Dit gebeurt vooral omdat de reguliere waterbronnen droogvallen en het water dus van verder af moet worden aangevoerd. Veelal worden de trucks ook gebruikt voor andere doeleinden. De kans bestaat daarom dat het bronwater gedurende transport en opslag vervuild raakt. Ook bestaat de zorg dat tankwagens het water uit onbeschermden bronnen halen, zoals bijvoorbeeld rivierwater.
- Er zijn verschillende monsters geanalyseerd om te beoordelen of er risico's zijn dat het grondwater fecaal verontreinigd is geraakt of kan worden.

Afbeelding 4 geeft enkele voorbeelden weer van de verschillende drinkwaterbronnen die zijn bemonsterd.



Afbeelding 4. Een selectie van bemonsterde drinkwaterbronnen. Een openbare kraan met bidons in Beira (linksboven). Onbeschermd gegraven put in Mandjacaze (rechtsboven). Onbeschermd gegraven put in Mandjacaze (linksonder). Een typische tankwagen die wordt gebruikt om drinkwater te transporteren (rechtsonder)

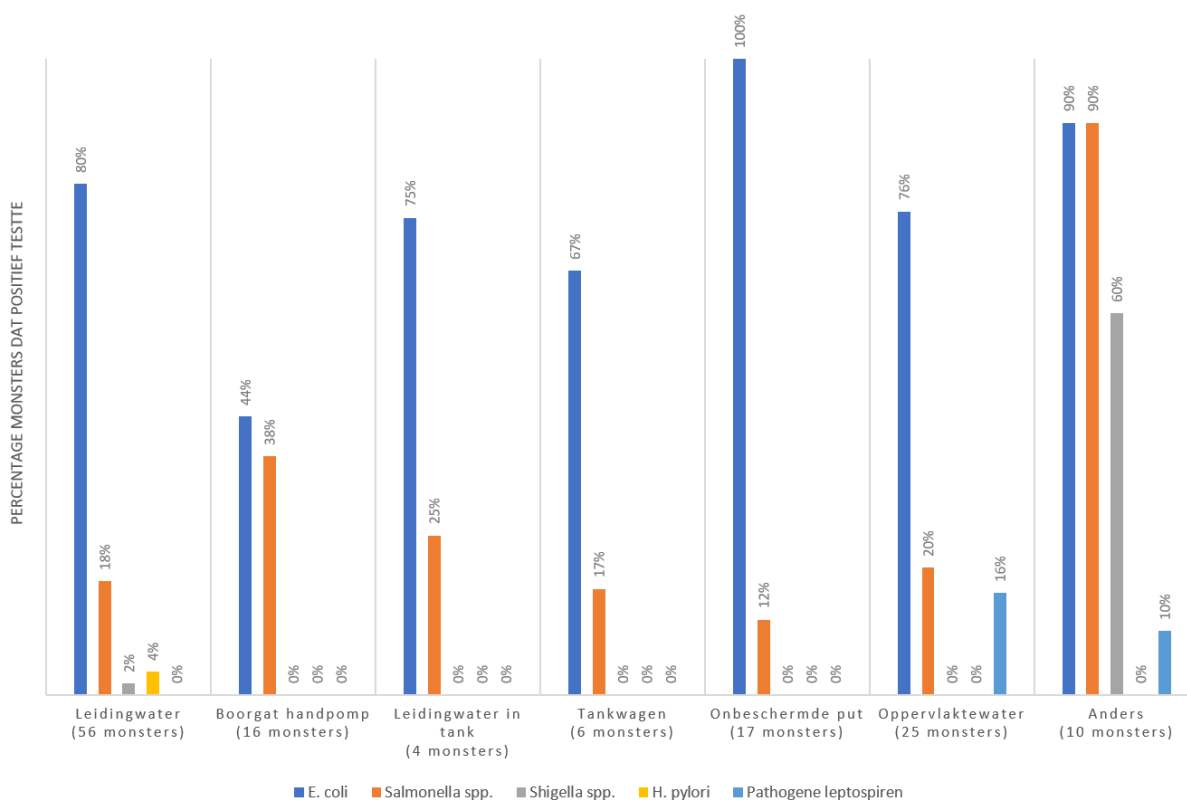
De in totaal 134 watermonsters zijn door Orvion in Nederland geanalyseerd op de volgende zes bacteriën (of bacteriegroepen), resulterend in bijna 800 kwantitatieve datapunten:

- Totaal bacteriën: een brede telling van alle bacteriën in een monster.
- *E. coli*: een fecaal indicatororganisme. Deze poepbacterie wordt al decennia gebruikt om te beoordelen of een watermonster fecaal besmet is. *E. coli*-analyses zijn ook meegenomen om de resultaten van de DNA-methode met de kweekmethode te kunnen vergelijken.
- *Shigella* spp. en *Salmonella* spp.: beide soorten zijn relevant voor de volksgezondheid in Mozambique en hebben respectievelijk een prevalentie van 45 en 20 procent in de feces van kinderen met darminfecties. *E. coli* zou voor de aanwezigheid van deze twee soorten een goede indicator moeten zijn.
- Pathogene leptospiren: dit zijn zogenoemde ‘emerging waterborne pathogens’, wat wil zeggen dat er nog weinig informatie is over de verspreiding en van deze pathogenen, maar dat de WHO oordeelt dat deze een significant risico voor de volksgezondheid vormen [2]. Dit gebrek aan informatie heeft vooral te maken met het feit dat leptospiren moeilijk zijn te kweken. Met de DNA-technieken zijn leptospiren net zo eenvoudig te meten als *E. coli*. Daarom is besloten om deze in het onderzoek mee te nemen.
- *Helicobacter pylori*: deze bacterie wordt eveneens beschouwd als een ‘emerging waterborne pathogen’. *H. pylori* is ook moeilijk te kweken en daarom is nog weinig bekend over de overdrachtsroute naar de mens. Overdracht via verontreinigd water is een mogelijkheid maar de wetenschap heeft dit nog niet hard gemaakt. Door het gebrek aan informatie over deze ziekteverwekker is er voor gekozen om deze in de studie op te nemen en hierover data te genereren.

De belangrijkste bevindingen op basis van de uitgevoerde wateranalyses staan hieronder samengevat:

- 75% van alle watermonsters testte positief voor *E. coli* en de bacteriesoort werd aangetroffen in alle typen water die zijn bemonsterd.
- *Salmonella* spp. werd in 25 procent van alle monsters gedetecteerd en hoofdzakelijk in beschermde bronnen als leidingwater en boorgaten. Dit was tegen de verwachtingen in en is aanleiding om in meer detail te kijken naar het voorkomen van deze bacteriesoort.
- 10 monsters die positief waren voor *Salmonella* spp., waren negatief voor *E. coli*. Dit geeft duidelijk aan dat *E. coli* niet altijd een goed indicatororganisme is voor *Salmonella* spp., ook al wordt het wel als zodanig gezien. Salmonellabacteriën kunnen aanwezig zijn, ook als er geen *E. coli* aanwezig is.
- De andere gemeten bacteriën (*Shigella* spp.; *H. pylori* en pathogene leptospiren) zijn minder frequent aangetoond en meestal werd *E. coli* dan ook gemeten. Er is meer data nodig over de ‘emerging waterborne pathogens’ om te bepalen of ze een significante bedreiging vormen en zo ja, hoe deze het beste te monitoren zijn.
- Een aantal drinkwaterbronnen bleek onveilig voor consumptie (op basis van zowel DNA- als kweekmethoden). De resultaten zijn gedeeld met de verantwoordelijke instanties.
- Drinkwaterbehandeling verwijdert niet alle bacteriën uit het drinkwater en door transport in het distributiesysteem neemt het aantal bacteriën toe in het drinkwater (nagroei). *E. coli* en *Salmonella* spp. blijken niet altijd te worden verwijderd door de behandeling of nemen als gevolg van nagroei of lekkage toe gedurende transport in het leidingnetwerk.

- Totale bacteriële lading blijkt een indicator te zijn voor algemene waterkwaliteit. Zo was het totaal aantal bacteriën gemeten in de 'niet verbeterde' drinkwaterbronnen significant hoger dan in de 'verbeterde' drinkwaterbronnen. Echter, een laag totaal aantal bacteriën betekent niet altijd dat het water veilig is. Zo bevatte een monster met een laag aantal totaal bacteriën wel *Salmonella* spp.
- Slechte gewoonten hebben een effect op de waterkwaliteit. Bijvoorbeeld: leidingwatermonsters direct uit de kraan waren niet verontreinigd met *E. coli*, terwijl hetzelfde water opgeslagen in tanks wel significant was verontreinigd. Een direct uit een waterput genomen monster was vrij van *E. coli*, een watermonster uit de bidon die de lokale bevolking gebruikt om water uit de put te halen bevatte wel *E. coli*. De mobiele DNA-methode zou effectief gebruikt kunnen worden in dergelijke situaties om gedragsverandering te bevorderen (in zogenoemde 'behavioural change studies'), aangezien de resultaten binnen 1,5 uur beschikbaar zijn. Deze resultaten kunnen via visualisatie gecommuniceerd worden naar de lokale bevolking.
- Tankwagens die drinkwater naar de stad transporteren om daar te worden verkocht hebben een negatieve invloed op de microbiologische waterkwaliteit: de totale concentratie aan bacteriën neemt significant toe en in sommige gevallen wordt *E. coli* of *Salmonella* spp. in het water geïntroduceerd.
- Regenplassen bevatten in het algemeen hoge concentraties bacteriën, *E. coli* en soms ook andere ziekteverwekkers. Het is waarschijnlijk dat deze plassen een significant negatief effect hebben op de waterkwaliteit van omliggende waterbronnen. Ze zouden bovendien drinkwaterbronnen en waterputten kunnen besmetten.
- In afbeeldingen 5 en 6 wordt een overzicht gegeven van de behaalde resultaten per watertype dan wel per bacteriesoort.



Afbeelding 5. Het percentage monsters, per watertype, dat positief is voor de middels qPCR geanalyseerde bacteriën. Het aantal monsters per watertype staat ook genoemd (n=...). De categorie 'anders' bestaat uit monsters van fecaal slib, afvalwater, koelwater en een water uit een afvalwaterzuivering



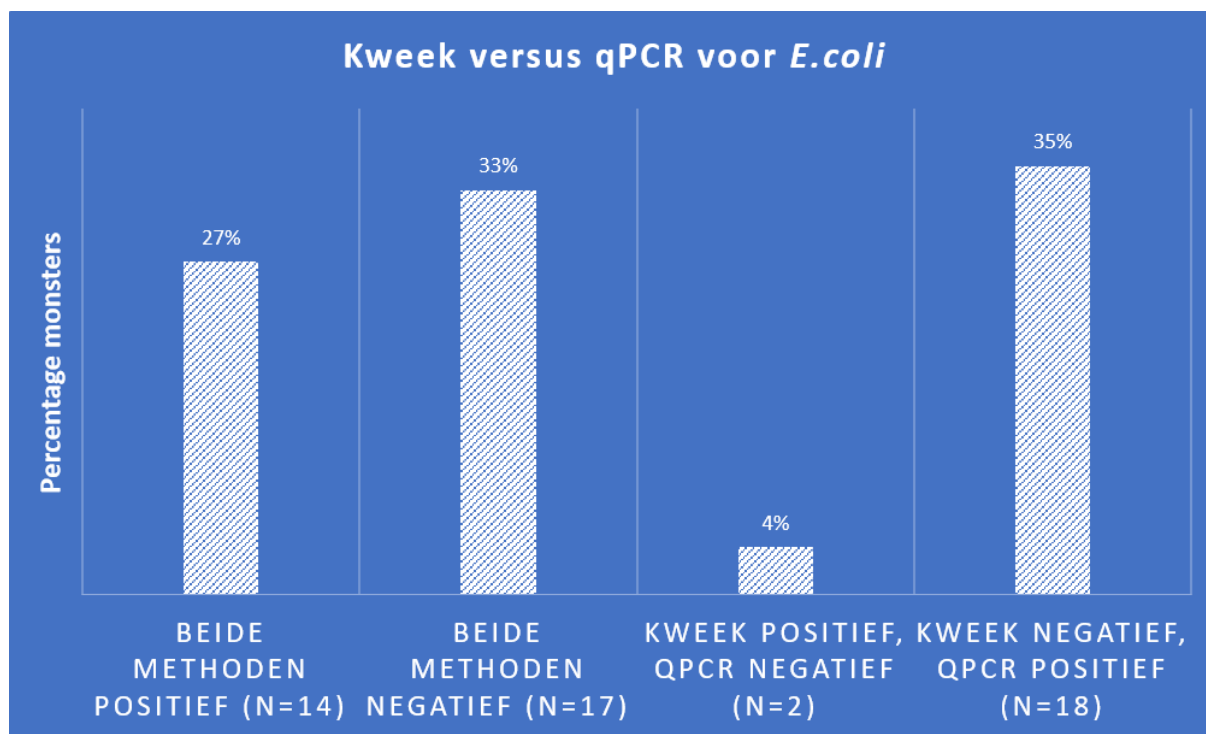
Afbeelding 6. Het aantal en type watermonsters dat positief dan wel negatief testte voor de verschillende bacteriesoorten. De categorie 'anders' bestaat uit monsters van fecaal slib, afvalwater, koelwater en een afvalwaterzuivering

DNA-methode versus kweekmethode

Het ligt voor de hand om te veronderstellen dat DNA-analyses en kweekanalyses van hetzelfde monster voor dezelfde bacteriesoort ook dezelfde resultaten zullen geven. De methoden zijn echter dermate verschillend - groei van bacteriën versus het aantonen van het DNA van die bacteriën - dat dit in de praktijk bijna nooit het geval is. Zo is bekend dat kweekmethoden het werkelijke aantal kunnen onderschatten of vals-negatieve resultaten kunnen genereren [3]. Dit komt doordat levensvatbare, maar niet-kweekbare bacteriën (*viable but non-culturable* - VBNC) niet worden gedetecteerd. Aan de andere kant is ook bekend dat DNA-analyses een overschatting kunnen geven van het aantal organismen, doordat ze ook het DNA meten van organismen die niet meer leven, maar waarvan het DNA nog niet is gedegradeerd.

Een één-op-één-vergelijking van beide methoden laat dan ook geen duidelijke correlatie tussen de analysemethoden zien. Dit is weergegeven in afbeelding 7. Van de 134 monsters werden er 51 zowel met kweekmethodes (in lokale laboratoria) als met qPCR geanalyseerd. In 31 monsters (61%) kwamen beide methodes overeen voor aan- of afwezigheid van *E. coli*. In twee monsters (4%) werd *E. coli* via

kweek wel gedetecteerd maar niet via qPCR. In 18 monsters (35%) werd *E. coli* wel met qPCR gedetecteerd maar niet met de kweekmethode.



Afbeelding 7. Een overzicht van het percentage monsters waarin de kweek- en qPCR-methode voor *E. coli* met elkaar overeenkwamen (beiden positief of beiden negatief voor *E. coli*) of juist niet overeenkwamen (één positief, de ander negatief). Het aantal monsters per categorie wordt ook vermeld (n=...)

Het is, in algemene zin, bijna onmogelijk te bepalen welke van twee analysemethoden in alle gevallen het meest accuraat is zonder diepgaand nader onderzoek uit te voeren. En misschien moet dat ook niet worden geambieerd, maar moet er vooral rekening worden gehouden met de onzekerheden en sterke punten van beide methoden binnen de toepassing en het doel waarvoor ze worden gebruikt.

Algemene bevindingen

DNA-analysetechnieken zijn de afgelopen jaren steeds verder doorontwikkeld en naar verwachting zal deze ontwikkeling zich steeds verder doorzetten. Dit leidt ertoe dat de kwaliteit van de analyses verbetert, de kosten en complexiteit verminderen en de technieken steeds breder worden toegepast en geaccepteerd. Voor wie accurate data snel wil genereren over de drinkwaterkwaliteit in ontwikkelingslanden zijn deze methoden onmisbaar. Alleen al in de volgende situaties:

- Wanneer een snel resultaat van belang is;
- Indien specifieke ziekteverwekkers gemeten moeten worden,
- In situaties waarin kweekmethoden niet gebruikt kunnen worden, bijvoorbeeld vanwege de locatie of de bacteriesoort die wordt geanalyseerd (veel bacteriesoorten zijn immers niet, of niet eenvoudig, te kweken).

In een vervolg op dit project gaan Orvion en WE Consult (mede gefinancierd door Partners voor Water [2]) de mobiele qPCR-techniek verder optimaliseren en opschalen. In het project wordt met de mobiele DNA-methode een uitvoerige inventarisatie gemaakt van besmettingsbronnen in de Nhartande-vallei,

een belangrijke drinkwaterbron voor de stad Tete in Mozambique. Ook worden de preventieve maatregelen die de lokale overheid neemt gemonitord, zodat de effectiviteit hiervan toetsbaar wordt en/of kan worden verbeterd. Diezelfde lokale overheden worden getraind zodat ze in staat zijn ook zelf DNA-analyses uit te voeren. De projectresultaten worden eind 2020 verwacht.

Het volledige rapport van dit project, [Generating accurate and quantitative data on waterborne diseases in the field using a mobile DNA-device](#) is op te vragen door een email te sturen naar adevos@orvion.nl

VIA Water (www.viawater.nl) ondersteunt projecten met innovatieve oplossingen voor waterproblemen in steden in zeven Afrikaanse landen. VIA Water is een programma van Aqua for All en wordt gefinancierd door het ministerie van Buitenlandse Zaken.

Partners voor Water (www.partnersvoorwater.nl) is een gedeelde verantwoordelijkheid van de ministeries van Infrastructuur en Waterstaat, Buitenlandse Zaken en Economische Zaken en Klimaat. De Rijksdienst voor Ondernemend Nederland (RVO) en het Netherlands Water Partnership (NWP) voeren dit programma gezamenlijk uit.

Referenties

1. Unicef (2017). *UNICEF Target Product Profile: Rapid E.coli Detection v 2* [online]. https://www.unicef.org/innovation/innovation_92771.html
2. World Health Organization (2017). *Guidelines for drinking-water quality: fourth edition incorporating the first addendum*. Genève, IS
3. Staley, J.T., Konopka, A. (1985). Measurement of in situ activities of non photosynthetic micro organisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annual Review of Microbiology*, 39(1), 321–346. doi:10.1146/annurev.mi.39.100185.001541