

Opsporing en telling van somatische colifagen

INHOUD

1	Toepassingsgebied	3
2	Principe	3
3	Opmerkingen	4
4	Reagentia en oplosmiddelen	4
5	Apparatuur en materiaal	4
6	Werkwijze	5
6.1	<i>Gastheercultuur</i>	5
6.1.1	Keuze van de host	5
6.1.2	<i>Escherichia coli</i> glycerol stock- en werkcultuur	5
6.2	<i>Bacteriofaagcultuur</i>	6
6.2.1	Leefbare telling van de aangekochte <i>E. coli</i> faag phiX174 suspensie	6
6.2.2	Kweek van <i>E. coli</i> faag phiX174	6
6.2.3	Monstervoorbereiding	7
6.2.4	Facultatieve concentratiestap	7
6.2.5	Analysemethode	7
6.3	<i>ISO 10705-3 Waterkwaliteit - Detectie en bepaling van het aantal bacteriofagen: validatieprocedure</i>	10
6.4	<i>Bereiding van afvalwatermonsters voor spiking</i>	10
6.5	<i>Validatie van methoden voor de concentratie van bacteriofagen uit water: procedure analyse van watermatrix</i>	11
6.5.1	Voorbereiding van gespikete monsters	11
6.5.2	Berekeningen	12
6.6	<i>Analytische kwaliteitscontrole van het rendement bij concentreren</i>	13
7	Rapportering	13
8	Referenties	14

1 TOEPASSINGSGEBIED

Deze procedure beschrijft een methode voor de opsporing en telling van somatische colifagen in water. De procedure is van toepassing bij het onderzoek van water bestemd voor menselijke consumptie (drinkwater) en ruw water (grondwater, oppervlaktewater).

In de [richtlijn 2020/2184 van het Europees Parlement en de Raad betreffende de kwaliteit van voor menselijke consumptie bestemd water](#) is de microbiologische parameter somatische colifagen¹ ingevoerd in het operationele monitoringprogramma. Deze omvat de monitoring van virussen in het ruwe water om de doeltreffendheid van de zuiveringsprocessen tegen microbiologische risico's te controleren. Indien deze parameter in onbehandeld water wordt aangetroffen in een concentratie > 50 pve /100 ml, dan moet hij na de behandelingsstappen worden geanalyseerd om via de aanwezige barrières een log verwijdering te bepalen. Dit om te beoordelen of het risico op doorbraak van pathogene virussen voldoende wordt beheerst.

De parameter colifagen² is eveneens opgenomen in de [EU Verordening 2020/741 - Minimumeisen voor hergebruik van water](#) (p.52 van NL versie). Voor de kwaliteitseisen van teruggewonnen water voor landbouwirrigatie zijn minimumeisen voor validatiemonitoring geformuleerd. Deze monitoring behelst het meten van de indicatormicro-organismen voor elk van de groepen pathogenen nl. bacteriën, virussen (nl. F-specifieke colifagen, somatische colifagen of colifagen) en protozoa. De validatiemonitoring vindt plaats voor klasse A, de strengste kwaliteitsklasse voor teruggewonnen water, om te beoordelen of er wordt voldaan aan de prestatiestreefwaarden voor colifagen nl. log₁₀-reductie ≥ 6,0.

De methodes opgenomen in deze WAC-procedure zijn conform de werkwijzen beschreven in de normen ISO 10705 Waterkwaliteit - Opsporing en telling van bacteriofagen - Deel 2 'Telling van somatische colifagen' en Deel 3 'Validatie van methoden voor concentratie van bacteriofagen uit water' (voor rendementbepaling).

2 PRINCIPE

ISO 10705-2 Somatische colifagen

Dit deel van ISO 10705 specificeert een methode voor de detectie en telling van somatische colifagen door incubatie van het monster met een geschikte gastheerstam (host).

Een hoeveelheid watermonster wordt gemengd met een klein volume semi-solide agar.

Een cultuur van de gastheer *E. coli* stam (WG5) wordt toegevoegd en uitgespreid over een vaste voedingsbodem. Tijdens de incubatie infecteren de bacteriofagen van het watermonster de gastheer *E. coli* waarna de fagen zich vermeerderen in de *E. coli* cellen en vervolgens lysis veroorzaken. Hierdoor ontstaan er heldere zones in de confluerende bacterielaag (plaques). Na incubatie bij 36°C worden de platen afgelezen op zichtbare plaques. Het resultaat wordt uitgedrukt als het aantal "plaque-vormende eenheden", pve (ook wel "plaque-forming units", pfu genoemd), per eenheid van het monstervolume. Als positieve controle wordt de somatische colifaag φX174 gebruikt.

¹ Somatische colifagen: bacterieel virus dat een geselecteerde gastheer *E. coli* (en verwante stammen) kan infecteren door aanhechting aan de bacteriële celwand als eerste stap van het infectieproces.

² Totaal aantal colifagen wordt geselecteerd als de meest geschikte indicator voor virussen. Indien het echter niet mogelijk is om het totaal aantal colifagen te analyseren, wordt ten minste één ervan (F-specifieke of somatische colifagen) geanalyseerd.

ISO 10705-3 Validatie van methoden voor de concentratie van bacteriofagen uit water

Bij lage aantallen colifagen in het monster is een voorafgaande concentratiestap nodig. Het watermonster wordt behandeld volgens een methode naar keuze, waarbij de bacteriofagen worden geconcentreerd van een relatief groot volume monster (100 ml tot enkele liters) tot een kleiner volume (meestal van enkele tot maximaal 20 ml). Het geconcentreerde monster wordt vervolgens geanalyseerd op de detectie en telling van somatische colifagen volgens ISO 10705-2. De validatieprocedure bestaat uit het bepalen van de recovery van bacteriofagen uit een reeks monsters, gevoed met natuurlijk verontreinigd water (ruw of gezuiverd afvalwater). De recovery wordt bestudeerd in een reeks van volumes met een rendementsbepaling, met bijzondere aandacht voor de reproduceerbaarheid.

3 OPMERKINGEN

Voor de conservering en behandeling van watermonsters wordt verwezen naar WAC/I/A/010.

De kwaliteitscontrole wordt in § 6.6 toegelicht.

Voor toepassen van alle eisen voor bioveiligheid wordt verwezen naar de [Belgian Biosafety Server](#).

4 REAGENTIA EN OPLOSMIDDELEN

- 4.1.1 Escherichia bacteriofaag phiX174 (ATCC 13706-B1)
- 4.1.2 Geselecteerde host: Escherichia coli (zie 6.1)
- 4.1.3 Steriel glycerol
- 4.1.4 Modified Scholtens' Agar (MSA)
- 4.1.5 Semi-solid Modified Scholtens' Agar (ssMSA)
- 4.1.6 Steriele calcium chloride oplossing (1 mol/l)
- 4.1.7 Modified Scholtens' Broth (MSB)
- 4.1.8 Selectieve groeimedium voor E. coli naar keuze (vb. McConkey agar)
- 4.1.9 Nalidixinezuur oplossing (in 1 mol/l NaOH)
- 4.1.10 Biocide-oplossing (vb. 2,5% Umonium)
- 4.1.11 Diluens (zie ISO 6887 vb. steriele pepton zout oplossing)
- 4.1.12 Optioneel: benodigde reagentia van de gevalideerde concentratiemethode

5 APPARATUUR EN MATERIAAL

- 5.1.1 Schudtoestel
- 5.1.2 Vortex
- 5.1.3 Papierfilter of polypropylene prefilter
- 5.1.4 Concentratieunit voor virale partikels (Concentrating Pipette Select Innovaprep® of ultrafiltratie Centricon® filters Millipore)
- 5.1.5 Single-use Concentrating Pipette Tips (CPTs) Innovaprep®
- 5.1.6 Elutiebuffer Wet Foam Elution Innovaprep®
- 5.1.7 Incubator op (36 ± 2)°C
- 5.1.8 Waterschudbad of schudincubator op (36 ± 2)°C
- 5.1.9 Waterbad of equivalent op (45 ± 1)°C
- 5.1.10 Waterbad of equivalent om agar media te smelten
- 5.1.11 Microbiologische veiligheidswerkkast MVK

- 5.1.12 Autoclaaf (121 ± 3)°C
- 5.1.13 Kolonieteller
- 5.1.14 Diepvriezer bij (-20 ± 5)°C
- 5.1.15 Diepvriezer bij (-70 ± 10)°C of opslagvat met vloeibare stikstof
- 5.1.16 Koelkast op (5 ± 3)°C
- 5.1.17 Glazen flessen
- 5.1.18 Glazen trechter
- 5.1.19 Schudkolf of culture flask
- 5.1.20 Kweekbuisjes met dop
- 5.1.21 Plastic vials 1,5 - 3 ml
- 5.1.22 Automatische pipetten en wegwerptips
- 5.1.23 Pipettus accu
- 5.1.24 Wegwerppipetten
- 5.1.25 0,45 µm steriele wegwerpfiler
- 5.1.26 Steriele petriplaten van 90 mm
- 5.1.27 Entnaald met öse
- 5.1.28 Steekentnaald
- 5.1.29 Spectrofotometer

6 WERKWIJZE

6.1 GASTHEERCULTUUR

6.1.1 KEUZE VAN DE HOST

Gebruik voor monsters met een laag bacteriegehalte (drinkwater, niet-verontreinigd natuurlijk water) de *Escherichia coli* DSM 13127. In de ISO 10705-2 wordt *Escherichia coli* stam C, ATCC 13706 aangegeven, maar de stam C bezit geen restrictie/modificatiesysteem. Hierdoor wordt de stam niet langer aanbevolen als gastheer voor faag PhiX174. Gebruik dus in plaats daarvan DSM 13127.

Monsters met grote aantallen bacteriën (verontreinigd natuurlijk water, afvalwater) moeten worden onderzocht met de nalidixinezuur-resistente mutant *E. coli* stam CN (ATCC 700078), ook bekend als WG5. Deze laatste *E. coli* stam kan ook voor alle types water worden gebruikt.

6.1.2 *ESCHERICHIA COLI* GLYCEROL STOCK- EN WERKCULTUUR

De *E. coli* stock kan bereid worden uit een gevriesdroogde cultuur of kant-en-klaar aangekocht worden. Rehydrateer de inhoud van een gevriesdroogde ampule van de *E. coli* in 3-5 ml MSB a.d.h.v. een steriele wegwerppipet en pipettus. Breng de suspensie over in een steriele schudkolf / culture flask met (50 ± 5) ml MSB. Incubeer gedurende (20 ± 4) uur in een schudincubator of waterschudbad bij (36 ± 2)°C. Voeg een steriele glyceroloplossing toe tot een eindconcentratie van 15 % tot 20 % (volumefractie) en meng goed. Verdeel in geschikte plastic vials per 0,5 ml en bewaar bij (-70 ± 10)°C of in vloeibare stikstof.

Voor de aanmaak van een werkcultuur, start uit een geïsoleerde *E. coli* kolonie vanuit een stockvial dat werd gestreken op een selectief groeimedium voor *E. coli*.

De aanmaak van de werkcultuur heeft een vergelijkbare aanmaak als de stock, maar verschilt in groeitijd: deze is (5 ± 1) uur voor de werkcultuur. Vervolgens wordt wel weer glycerol toegevoegd en ingevroren (per 1,2 ml). De houdbaarheid van de werkculturen is maximaal 2 jaar bij -20 °C / -70 °C.

referentiestam <i>E. coli</i> stam CN (ATCC 700078)	overnachtcultuur in MSB; steriele glyceroloplossing toevoegen tot eindconcentratie van 15 % tot 20 % (volumefractie)	stockcultuur 0,5 ml aliquots bewaar bij (-70 ± 10)°C of in vloeibare stikstof	log-fase cultuur in MSB van lactose-positieve kolonies; steriele glyceroloplossing toevoegen tot eindconcentratie van 15 % tot 20 % (volumefractie)	werkkultuur 0,1, 2 ml aliquots houdbaarheid werkculturen maximaal 2 jaar bij (-70 ± 10)°C	log-fase cultuur in MSB	gebruik de inoculumcultuur binnen dezelfde werkdag
---	--	---	---	---	-------------------------	--

6.2 BACTERIOFAAGCULTUUR

De fagen stock kan bereid worden uit een aangekochte suspensie of kant-en-klaar aangekocht worden. **Indien fagen niet kant-en-klaar aangekocht zijn, dient de concentratie experimenteel vastgelegd te worden.** Fagen dienen onmiddellijk na ontvangst in een koelkast (5 ± 3) °C bewaard te worden. Het uitvoeren van lysis is mogelijk in een vloeibare bacteriële hostcultuur of op platen door gebruik te maken van de dubbele agarlaagtechniek met boven- en onderagar.

6.2.1 LEEFBARE TELLING VAN DE AANGEKOCHTE *E. COLI* FAAG PHIX174 SUSPENSIE

Smelt een fles met 50 ml ssMSA in een kokend waterbad en plaats ze in een waterbad bij (45 ± 1)°C. Verdeel nadien aliquots van 2,5 ml in kweekbuisjes met dop, geplaatst in een waterbad van (45 ± 1)°C. Maak een verdunningsreeks aan van de faag stocksuspensie in MSB (verdunningen 10⁻² tem 10⁻⁹). Bereid de host inoculumcultuur zoals beschreven in §6.3.2.1.

Voeg 1 ml inoculumcultuur toe aan elke kweekbuisje met ssMSA.

1 ml van elke verdunning van de faag wordt toegevoegd aan een geïdentificeerd tube met ssMSA met host *E. coli*, meng zorgvuldig om de vorming van luchtbellen te vermijden en giet de inhoud uit op een 9 cm MSA petrischaal die voorverwarmd is bij kamertemperatuur. Verdeel gelijkmatig en laat stollen op een horizontaal, koel oppervlak. Droog de platen door ze te incuberen met gedeeltelijk geopende deksels, dek ze vervolgens af en incubeer de platen ondersteboven bij (36 ± 2)°C gedurende (18 ± 2) uur. Stapel niet meer dan 6 platen op elkaar.

Tel het aantal plaques van de platen in een telbare range na overnacht incubatie met indirect schuin licht op elke duplo plaat. Bepaal de concentratie van de faag phiX174 in de stock. Onderzoek elk aliquot ten minste in duplo.

6.2.2 KWEEK VAN *E. COLI* FAAG PHIX174

Er wordt een kweek uitgevoerd van faag phiX174 a.d.h.v. een werkkultuur *E. coli* host. Nadien wordt in duplo een leefbare telling uitgevoerd van de aangerijkte faag.

Breng 25 ml MSB in een schudkolf / culture flask en inoculeer met de *E. coli* host. Incubeer gedurende (20 ± 4) uur in een schudincubator of waterschudbad bij (36 ± 2)°C.

Inoculeer 25 ml MSB (op kamertemperatuur) in een schudkolf / culture flask met 0,25 ml van de hostcultuur.

Incubeer zoals hierboven beschreven gedurende 90 min. Voeg phiX174 toe uit een stockoplossing om een eindconcentratie van ongeveer 10⁷ pve/ml te verkrijgen.

Incubeer zoals hierboven beschreven gedurende 4 tot 5 uur. Voeg 2,5 ml chloroform (CHCl₃) toe, meng goed en plaats overnacht bij (5 ± 3) °C.

Decanteer de waterige fase in centrifugebuizen en centrifugeer bij minimaal 3000 g gedurende 20 min. Pipetteer het supernatans met bacteriofagen voorzichtig en bewaar het bij (5 ± 3) °C.

OPMERKING 1 De titer van de faagsuspensie moet hoger zijn dan 10⁹ /ml. In sommige gevallen kan het nodig zijn de cyclus te herhalen om voldoende hoge titers te verkrijgen; in dat geval kunnen hogere faaginputs worden gebruikt.

OPMERKING 2 De titer van de faagstocksuspensie zal langzaam afnemen met de tijd.

6.3 MONSTERVOORBEREIDING

Aan 1000 ml watermonster wordt 10 ml 0,8% Tween 80 toegevoegd en het wordt gehomogeniseerd door de fles grondig te schudden, ofwel door de fles op een schudtoestel te brengen en gedurende de voorbereidingen van de analyses te schudden.

Om het eventueel sediment te verwijderen wordt het watermonster gecentrifugeerd bij 1000 g gedurende 20 minuten, of gefiltreerd door een 8 µm tot 25 µm membraanfilter of plooi-filter met een steriel gemaakte glazen trechter om viruscontaminatie te vermijden.

Het watermonster wordt op kamertemperatuur gebracht alvorens de analyse te starten.

6.3.1 FACULTATIEVE CONCENTRATIESTAP

Bij lage aantallen colifagen in het monster is een voorafgaande concentratiestap nodig. Het watermonster wordt behandeld volgens een methode naar keuze, waarbij de bacteriofagen worden geconcentreerd van een relatief groot volume monster (100 ml tot enkele liters) tot een kleiner volume (meestal van enkele tot maximaal 20 ml).

6.3.2 ANALYSEMETHODE

6.3.2.1 Bereiding van inoculumculturen

Haal een vial gastheer werkcultuur (§ 6.1) uit de diepvries en laat chamberen tot kamertemperatuur (15-30 °C). Voeg (50 ± 5) ml MSB toe aan een erlenmeyer en laat het voorverwarmen tot ten minste kamertemperatuur (snellere groei treedt op als de bouillon wordt voorverwarmd tot (36 ± 2)°C). Verifieer of de gastheercultuur voldoende is gegroeid door middel van een absorbantiemeting (bij 600 nm).

Inoculeer 0,5 ml gastheer werkcultuur in MSB. Incubeer bij (36 ± 2)°C onder zacht schudden in een incubator of waterbad. Meet elke 30 minuten de absorptie. Neem bij een absorptie die overeenkomt met een celdichtheid van ongeveer 10⁸ kve/ml, de inoculumcultuur uit de incubator. Gebruik de inoculumcultuur binnen dezelfde werkdag.

Indien de WG5 stam wordt gebruikt voor de gastheercultuur, voeg nalidixinezuur toe aan de cultuur voor enten van de watermonsters.

OPMERKING 3 Als een groot aantal tests wordt verwacht, kunnen verschillende erlenmeyers parallel worden geënt. In dat geval moet de inhoud van de verschillende schudkolven vóór de analyse worden gemengd en gehomogeniseerd of, als alternatief, moet voor elke schudkolf of inoculumcultuur een referentiecontrole van phiX174 worden uitgevoerd.

6.3.2.2 Enten van het watermonster

Smelt fles(sen) met 50 ml ssMSA in een kokend waterbad en plaats ze in een waterbad bij (45 ± 1)°C. Voeg aseptisch 300 µl van een op kamertemperatuur voorverwarmde calciumchlorideoplossing toe. Meng en verdeel nadien aliquots van 2,5 ml in kweekbuisjes met dop, geplaatst in een waterbad van (45 ± 1)°C.

Voeg aan elke kweekbuis 1 ml van het oorspronkelijke monster (of verdund of geconcentreerd monster) toe, voorverwarmd bij kamertemperatuur. Onderzoek elk aliquot ten minste in duplo.

Voeg 1 ml inoculumcultuur toe aan elke kweekbuisje met het monster en ssMSA, meng zorgvuldig om de vorming van luchtbelllen te vermijden en giet de inhoud uit op een 9 cm MSA petrischaal die voorverwarmd is bij kamertemperatuur. Verdeel gelijkmatig en laat stollen op een horizontaal, koel oppervlak. Droog de platen door ze te incuberen met gedeeltelijk geopende deksels, dek ze vervolgens af en incubeer de platen ondersteboven bij $(36 \pm 2)^\circ\text{C}$ gedurende (18 ± 2) uur. Stapel niet meer dan 6 platen op elkaar.

Tel het aantal plaques op elke plaat binnen 4 uur na het beëindigen van de incubatie met indirect schuin licht.

OPMERKING 4 Indien nodig kunnen de platen na 6 uur incubatie worden afgelezen. Dit kan nuttig zijn als een voorlopige telling nodig is en ook als een hoge achtergrondflora wordt verwacht. Als er na 6 uur wordt afgelezen, moet dit worden genoteerd bij het weergave van de resultaten (§ 6.2.5.7).

OPMERKING 5 Vers bereide trifenyltetrazoliumchlorideoplossing kan aan ssMSA worden toegevoegd om het contrast voor het tellen van plaques te vergroten.

OPMERKING 6 De toevoeging van monster en ijskoude gastheercultuur aan de halfvaste agar kan leiden tot een scherpe temperatuurdaling en stolling van het medium. Zorg voor voldoende tijd tussen deze twee stappen om opnieuw opwarmen mogelijk te maken. Zorg er echter voor dat geënte buisjes niet langer dan 10 minuten in het waterbad $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$ blijven.

OPMERKING 7 Kwaliteitsborging duplo's zie criterium T1 Cochran spreidingstest (§ 6.2.5.6).

6.3.2.3 Methode voor monsters met een hoge bacteriële achtergrondflora (OW, AW)

Idem te werk gaan als hierboven.

Voeg nalidixinezuur toe aan ssMSA tot een eindconcentratie van $250 \mu\text{g/ml}$.

Gebruik *E. coli* WG5 als inoculumcultuur.

OPMERKING 8 Nalidixinezuur is hittestabiel. Het kan toegevoegd worden uit een gesteriliseerde oplossing na het smelten van soft agar, of het kan toegevoegd worden voor het autoclaveren.

6.3.2.4 Methode voor monsters met lage aantallen colifagen

Ga te werk zoals hierboven beschreven, maar gebruik de volgende modificaties:

10 ml ssMSA, $60 \mu\text{l}$ calciumchlorideoplossing, 1 ml gastheercultuur en 5 ml monster in duplo .

Gebruik twee petrischalen die elk 20 ml MSA bevatten (of één 14 - 15 cm diameter petriplaat met 50 ml MSA).

OPMERKING 9 Met deze procedure kan één pve in 50 ml of 100 ml worden gedetecteerd als 10 of 20 platen parallel worden geënt. Vanwege het hoge verbruik van kweekmedia kan het raadzaam zijn om concentratiemethoden te gebruiken (§6.3.1 en §6.3.2.5), die ook nodig zullen zijn voor nog lagere tellingen.

6.3.2.5 Methode voor monsters die een concentratiestap vereisen (ISO 10705-03)

Voor monsters met hele lage aantallen fagen, voer voor een DW- en GW-monster een rechtstreekse filtratie uit via een geschikte concentratieunit.

Als de turbiditeit voor een OW-monster hoog is (te beoordelen aan de hand van het blokkeren van het filter voordat het gewenste volume is gefilterd), voer voorafgaand een prefiltratie op ploofilter uit (bijvoorbeeld belangrijk in seizoenen van algenbloei) (§6.2.3). Gebruik hiervoor een ploofilter in een glazen trechter dat behandeld is met een biocide en nagespoeld werd met steriel water.

Voor het concentreren van de virale partikels: filtreer 500 ml watermonster met bv. een Innovaprep unit aan de hand van 'concentrating pipets 0,05 µm filter'. Als alternatief kunnen [centricons](#)³ filterunits aangewend worden.

Om het gefiltreerde volume op te volgen, vang het filtraat op een maatcilinder om het correcte volume van 500 ml te bepalen.

Maak van het bekomen concentraat – indien uit voorkennis – de geschikte verdunning(en) telkens in duplo (1:5 of 1:10 verdunning).

6.3.2.6 Kwaliteitsborging

Onderzoek bij elke serie monsters een procedureblanco met steriele diluens⁴ als monster en een referentiecontrole van phiX174, als volgt bereid.

Bereid uit een faagkweek met een hoge titer (§6.2.2) een decimale verdunningsreeks en plaat deze uit. Bewaar de verdunningsreeks een nacht in de koelkast. Tel het aantal plaques uit de verdunningsreeks en bereid 100 ml tot 1000 ml van een suspensie met een verwachte pve-concentratie van phiX174 van ongeveer 100 ml⁻¹. Voeg 5% (volumefractie) glycerol toe. Verdeel in geschikte plastic vials in aliquots van 2,4 ml en bewaar bij (-70 ± 10) °C. Ontdooi flacons met de referentiecontrole van phiX174 voor gebruik en zet de platen uit volgens de gebruikte procedure (DW, GW, OW of AW). Zet de resultaten uit op een controlekaart. Gooi de referentiecontrolemonsters weg als het gemiddelde aantal pve/ml afneemt.

Gebruik eventueel daarnaast een natuurlijk verontreinigd referentiecontrolemonster van afval- of oppervlaktewater, verdund tot een pve-concentratie van ongeveer 100 ml⁻¹ in pepton-zout oplossing en 5 % (volumefractie) glycerol en bewaar bij (-70 ± 10)°C. Gooi de referentiecontrole-monsters weg als de concentratie somatische colifagen afneemt en na een hertest nog steeds afneemt.

6.3.2.7 Weergave van resultaten (ISO 8199; ISO 10705-02)

Procedures voor het tellen van plaques (DW, GW of OW AW)

Selecteer platen met goed gescheiden, en bij voorkeur meer dan 30 plaques wanneer deze aanwezig zijn. Als er alleen aantallen van minder dan 30 per plaat worden gevonden, selecteer dan platen die met het grootste volume monster zijn geënt. Bereken uit het aantal getelde plaques het aantal X pve van somatische colifagen in 1 ml van het monster als volgt:

Formule:

$$X = \frac{N}{(n_1 V_1 F_1) + (n_2 V_2 F_2)}$$

waarbij

- X het aantal plaquevormende deeltjes somatische colifagen per milliliter (pve/ml);
- N het totale aantal plaques geteld op platen (DW, GW of OW AW);
- n₁, n₂ het aantal getelde herhalingen voor verdunning F₁, F₂;
- V₁, V₂ het testvolume in milliliters gebruikt bij verdunning F₁, F₂;

³ Virale deeltjes werden geconcentreerd uit 50 ml supernatans door ultrafiltratie door Centricon® Plus-70 centrifugale ultrafilters met een cut-off van 30 of 100 kDa (Millipore)

⁴ De procedureblanco kan ook uitgevoerd worden met steriel kraanwater indien de kwaliteitscontrole van het diluens conform ISO11133 wordt uitgevoerd.

F_1 , F_2 de verdunnings- of concentratiefactor voor de testportie V_1 , V_2 ($F = 1$ voor een onverdund monster, $F = 0,1$ voor een tienvoudige verdunning, $F = 10$ voor een tienvoudig concentraat enz.)
Als er maar één verdunning/concentraat wordt geteld, vereenvoudig de formule dan tot:

$$X = \frac{N}{nVF}$$

Indien geen plaquevormende deeltjes aanwezig zijn op platen met een onverdund monster, vermeld het resultaat als <1 pve of als 0 pve / **ingezet volume**.

6.4 ISO 10705-3 WATERKWALITEIT - DETECTIE EN BEPALING VAN HET AANTAL BACTERIOFAGEN: VALIDATIEPROCEDURE

De te evalueren concentratiemethode moet zorgvuldig worden beschreven. De beschrijving omvat de detectiemethode(n) van de bacteriofagen, de te analyseren soorten water en volumes, alsook uitzonderingen op het toepassingsgebied, bijvoorbeeld wegens troebelheid.

De validatieprocedure van de methode bestaat uit het bepalen van de terugvinding van bacteriofagen uit een reeks monsters, geënt met natuurlijk verontreinigd water (ruw of behandeld afvalwater). De terugvinding en reproduceerbaarheid worden bepaald.

6.5 BEREIDING VAN AFVALWATERMONSTERS VOOR SPIKING

Neem een monster van afvalwater en centrifugeer bij 1000 g gedurende 20 minuten of filtreer door een 8 µm tot 12 µm membraanfilter (of plooi-filter).

Bewaar het supernatans of het filtraat op smeltend ijs.

Tel de colifagen in volumes van 1 ml volgens de gekozen methode.

Verdund het monster zo nodig tot een concentratie van 60 tot 200 pve/ml.

Voeg glycerol toe om een uiteindelijke volumefractie van 5% te verkrijgen; goed mengen.

Verdeel in aliquots van 10 ml in geschikte plastic vials en vries in bij $(-20 \pm 5)^\circ\text{C}$ of bij voorkeur $(-70 \pm 10)^\circ\text{C}$.

Ondooi twee vials bij kamertemperatuur.

Onderzoek uit elk vial twee aliquots van 0,5 ml op de colifagen. De gemiddelde telling moet binnen de hierboven gespecificeerde grenzen liggen (d.w.z. 30 tot 100 pve per plaat). Analyseer de tellingen op homogeniteit binnen en tussen de vials.

$$T_1 = \sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^J \left[\left(z_{ij} - \frac{z_{i+}}{J} \right)^2 / \left(\frac{z_{i+}}{J} \right) \right]$$

waarbij

T_1	de Cochran spreidingstest om de variatie in pve binnen één vial referentiemateriaal te bepalen
z_{i+}	het totale aantal pve van de duplo's van één vial
I	het aantal vials (in dit geval 2)
J	het aantal duplo's is (in dit geval 2)

Het aantal vrijheidsgraden voor T_1 is gelijk aan $I(J-1)$ en

$$T_2 = \sum_{j=1}^J \left[\left(z_{i+} - \frac{z_{++}}{I} \right)^2 / \left(\frac{z_{++}}{I} \right) \right]$$

waarbij

- T_2 de Cochran spreidingstest om de variatie in pve binnen verschillende vials van één batch referentiemateriaal te bepalen
- z_{++} het totale aantal pve voor alle vials en duplo's

$$z_{++} = \sum_{i=1}^I \left(\sum z_{ij} \right)$$

Het aantal vrijheidsgraden voor T_2 is gelijk aan $I-1$.

Als de fagen willekeurig verdeeld zijn in en tussen de vials, volgen T_1 en T_2 bij benadering een χ^2 verdeling met respectievelijk 2 en 1 vrijheidsgraden.

Accepteer de monsters als $0,01 < T_1 < 5,99$ en $T_2 < 3,84$

OPMERKING 10: Somatische colifagen die van nature voorkomen in ruw afvalwater ondervinden geen significante inactivering bij invriezen met een volumefractie van 5 % glycerol en kunnen bevroren worden bewaard bij $(-20 \pm 5) ^\circ\text{C}$ of bij voorkeur bij $(-70 \pm 10)^\circ\text{C}$ zonder significante afname van de aantallen gedurende ten minste één jaar.

6.6 VALIDATIE VAN METHODEN VOOR DE CONCENTRATIE VAN BACTERIOFAGEN UIT WATER: PROCEDURE ANALYSE VAN WATERMATRIX (TOEPASSING VAN ISO 10705-3 ANNEX A)

6.6.1 VOORBEREIDING VAN GESPIKETE MONSTERS

6.6.1.1 Batchmethode

Neem van het te onderzoeken type water monsters op verschillende dagen, bij voorkeur in verschillende seizoenen en klimatologische omstandigheden. Onderzoek minimaal vijf monsters voor elk type water. V_{max} is het maximale volume van het monster dat met een bepaalde concentratieunit moet worden behandeld. Het voor de validatieprocedure te verkrijgen monstervolume moet dan ten minste $3 \times V_{max}$ bedragen. Bereid recipiënten met de volgende monstervolumes voor:

- $0,125 \times V_{max}$;
- $0,250 \times V_{max}$;
- $0,500 \times V_{max}$;
- V_{max} .

Voeg aan elke recipiënt 1 ml bij kamertemperatuur voorverwarmd spike suspensie toe. Bewaar de rest van de spike op smeltend ijs.

6.6.1.2 In-line concentratiemethode

Neem van het te onderzoeken type water monsters op verschillende dagen, bij voorkeur in verschillende seizoenen en klimatologische omstandigheden. Onderzoek minimaal vijf monsters per watertype. V_{max} is het maximale volume van het monster dat moet worden behandeld door de concentratiemethode. Bereid recipiënten met de volgende monstervolumes:

- $0,125 \times V_{max}$;
- $0,250 \times V_{max}$;
- $0,500 \times V_{max}$;
- V_{max} .

Behandel elk volume zoals beschreven in het protocol van de concentratieprocedure. Voeg 1 ml "spike"-materiaal voorverwarmd tot kamertemperatuur toe aan ongeveer 10 ml diluens. Laat de concentratieunit onder stabiele omstandigheden werken. Injecteer vervolgens het totale volume diluent plus de spike in de toevoer naar de concentratieunit (bijvoorbeeld door de naald van een injectiespuit door een slang te steken) in vier gelijke porties, elk na passage van ongeveer een vijfde van het te behandelen watervolume.

6.6.1.3 Evaluatie van de recovery

Behandel de gespikete monsters zoals beschreven in het protocol van de testconcentratie-methode, met inbegrip van alle monstertransport- en conserveringsstappen. Vervoer en bewaar elk monster, waarbij het vervoer van natuurlijke monsters zoveel mogelijk worden nagebootst. Bepaal het totale volume van het eindconcentraat in porties van 1 ml, of fracties indien het eindvolume van het concentraat niet een heel aantal milliliters is. Mogelijks colifagen die op de concentratieoppervlakken achterblijven moeten indien mogelijk worden getest, zoals bijvoorbeeld fagen die in de filters achterblijven.

Analyseer tegelijkertijd twee aliquots van 0,5 ml spikemateriaal. De verkregen waarden worden gebruikt om de concentratie-efficiëntie te berekenen, dit laat toe om het aantal fagen te bepalen in de verschillende te concentreren volumes en laat ook toe om de T_1 en T_2 te berekenen van elk van de vials ten opzichte van andere vials. Indien meer dan 20 % (1 op 5) van de gespikete monsters niet voldoet aan de aanvaardbare waarden van T_1 en/of T_2 , verwijder dan het spikemateriaal. Indien ≤ 20 % van de gespikete monsters niet voldoet aan T_1 en/of T_2 , dienen deze resultaten buiten beschouwing gelaten te worden en voer dan een nieuwe bepaling uit.

Afwijkende of extreme resultaten zijn kenmerkend voor microbiologische metingen. Soms is het aanvaardbaar om een resultaat te verwerpen op basis van een eenvoudige waarneming van de data. Het verdient echter de voorkeur een geschikte statistische test toe te passen. Gebruik de Dixon-test om extreme waarden te verwijderen.

Voer vóór de analyse van de gegevens ten minste vijf experimenten uit met resultaten die niet zijn verworpen.

Indien de methode wordt geëvalueerd aan de hand van natuurlijk water waarvan vermoed wordt dat het fagen bevat voor dezelfde bacteriële host als de testcolifagen, bepaal dan de achtergrondtelling van fagen. Plaats een aliquot of concentreer V_{max} en tel het concentraat. Indien het monster een aantal fagen bevat > 20 % van de fagen die in het monster zijn gespiket, verwarm het water en hou het gedurende 30 minuten op 80 °C en laat het vóór gebruik afkoelen.

Indien het aantal natuurlijk voorkomende colifagen < 20 % van de toegevoegde fagen bedraagt, worden deze geteld en neem ze in aanmerking bij de gegevensanalyse (zie volgend hoofdstuk).

6.6.2 BEREKENINGEN

Bereken de terugvinding, η , uitgedrukt als percentage, als volgt:

$$\eta = N_c/N_s \times 100 \%$$

of in het geval dat het monster verontreinigd is met natuurlijk voorkomende bacteriofagen:

$$\eta = (N_c - N_{no})/N_s \times 100 \%$$

waarbij

- N_c totale aantal teruggewonnen plaques uit een concentraat is;
- N_s het aantal plaques uit 1 ml van het monstermateriaal;
- N_{no} het aantal natuurlijk voorkomende bacteriofagen in het watermonster.

Bereken voor alle geanalyseerde volumes de rekenkundig gemiddelde terugvinding \bar{x} , de standaardafwijking s en het betrouwbaarheidsinterval.

Het empirische bewijsmateriaal wijst erop dat de terugvindingswaarden een normale verdeling volgen of normaal verdeeld zijn. Voor een betere schatting van de betrouwbaarheidsintervallen wordt de volgende wiskundige uitdrukking aanbevolen.

$$\{\bar{x} - ts / \sqrt{n} ; \bar{x} + ts / \sqrt{n}\}$$

waarbij

\bar{x}	het rekenkundig gemiddelde herstel
s	de standaardafwijking
n	het aantal η -waarden

t de waarde van de t-verdeling is (t-waarden voor verschillende combinaties van betrouwbaarheidsintervallen en vrijheidsgraden zijn te vinden in t-distributietabellen). In het geval van $n = 5$ (vrijheidsgraden = 4) en een 95 %-betrouwbaarheidsinterval $t = 2,776$.

Zet η plus de betrouwbaarheidsintervallen uit tegen het volume van het monster en onderzoek op lineariteit. Als de betrouwbaarheidsintervallen van η voor de verschillende volumes overlappen, kan ervan worden uitgegaan dat de respons lineair is en dat er dus geen volume-effecten zijn. Als er wel volume-effecten zijn, bepaal dan het maximale volume dat kan worden geconcentreerd.

Combineer de resultaten van alle volumes waarvoor de methode kan worden aanbevolen en bereken het rekenkundig gemiddelde van η , \bar{x} , de standaardafwijking s , en de relatieve standaardafwijking s/\bar{x} .

Het gemiddelde van η met alle gegevens geeft een betere schatting van de terugvindingsefficiëntie van de methode.

De relatieve standaardafwijking, s/\bar{x} , geeft een indicatie van de betrouwbaarheid van de methode. Beschouw de methode als betrouwbaar als $s/\bar{x} < 0,5$.

Zie ISO 10705-3 bijlage B voor een voorbeeld van het validatieproces en de weergave van de resultaten.

Als de methode regelmatig in een laboratorium wordt gebruikt, wordt aan de gebruikers aanbevolen om de terugvindingsgegevens grafisch op te volgen.

6.7 ANALYTISCHE KWALITEITSCONTROLE VAN HET RENDEMENT BIJ CONCENTREREN

Herhaal de in § 6.5.1.3 uitgewerkte evaluatie van de recovery periodiek indien de methode in routine wordt gebruikt. Het is dan voldoende om de resultaten bij $0,5 \times V_{max}$ te analyseren.

7 RAPPORTERING

Het testrapport bevat de volgende informatie

- een verwijzing naar de ISO 10705-3;
- een verwijzing naar de norm die de colifaag-testmethode beschrijft;
- een verwijzing naar het protocol waarin de concentratiemethode wordt beschreven;
- alle bijzonderheden die nodig zijn voor een volledige identificatie van het monster;
- alle informatie over ongebruikelijke kenmerken van het monster die van invloed kunnen zijn geweest op de recovery: troebelheid, algengroei, oppervlakteverontreiniging, kleur enz.
- alle resultaten;
- alle andere voor de methode relevante informatie;
- de verwijzing naar de betreffende WAC methode.

8 REFERENTIES

- ISO 10705 Waterkwaliteit - Opsporing en telling van bacteriofagen - Deel 1 'Telling van F-specifiek RNA bacteriofagen'
- ISO 10705 Waterkwaliteit - Opsporing en telling van bacteriofagen - Deel 2 'Telling van somatische colifagen'
- ISO 10705 Waterkwaliteit - Opsporing en telling van bacteriofagen - Deel 3 'Validatie van methoden voor concentratie van bacteriofagen uit water'
- ISO 8199 Water quality General requirements and guidance for microbiological examinations by culture
- ISO 6887-1 Microbiology of the food chain Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions
- ISO 11133 Microbiologie van voedingsmiddelen, diervoeders en water - Bereiding, productie, bewaring en bepaling prestatiekenmerken van kweekmedia
- WAC/I/A/010 Conservering en behandeling van watermonsters
- WAC/VI/A/003 Kwaliteitseisen voor de analysemethoden
- Leo Heijnen, Goffe Elsinga, Miranda de Graaf, Richard Molenkamp, Marion P.G. Koopmans, Gertjan Medema: *Droplet digital RT-PCR to detect SARS-CoV-2 signature mutations of variants of concern in wastewater*, Science of The Total Environment, Volume 799, 2021, 149456, ISSN 0048-9697, <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2021.149456>.