

RIVM rapport 330000008/2004

**Het rendement van de detectiemethode voor
Cryptosporidium en *Giardia* in water**

F.M. Schets¹⁾, G.J. Medema²⁾, J.F. Schijven

1) corresponderende auteur: RIVM, Microbiologisch Laboratorium voor
Gezondheidsbescherming (MGB), tel. 030-2743929,

e-mail ciska.schets@rivm.nl

2) Kiwa Water Research, Postbus 1072, 3430 BB Nieuwegein

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van de VROM Inspectie, in het kader van project 703719, Monitoring en handhaving drinkwater, ten behoeve van intern project 330000 Watermicrobiologie, deelproject Operationalisering infectierisico (RIVM), en in opdracht van de Nederlandse Waterleidingbedrijven in het BTO in het aandachtsveld 'Microbiologische grondslagen', project 111440.100 (Kiwa).

RIVM, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, telefoon: 030 - 274 91 11; fax: 030 - 274 29 71

Het rapport in het kort

Nederlandse waterleidingbedrijven zijn verplicht om te berekenen of als gevolg van consumptie van drinkwater infectie met *Cryptosporidium* of *Giardia* kan optreden. De kans hierop moet kleiner dan één infectie per 10.000 personen per jaar zijn. De berekening (risicoanalyse) wordt gebaseerd op de aantallen van deze parasieten in het onbehandelde water en de mate waarin de parasieten door zuivering uit het water verwijderd worden. De aantallen parasieten in drinkwater zijn meestal erg laag, waardoor het niet mogelijk is ze direct in het drinkwater aan te tonen. Om overschatting van de kans op infectie te voorkómen, moeten deze aantallen en het rendement van de detectiemethode zo nauwkeurig mogelijk vastgesteld worden. De detectiemethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* in water is ingewikkeld en meestal is het rendement laag en variabel. RIVM en Kiwa hebben een protocol ontwikkeld voor gestandaardiseerde en optimale bepaling van het rendement om de variatie te verkleinen en de opbrengst te verhogen. Beide instituten hebben dit protocol gebruikt bij een serie rendementsmetingen. Het gezamenlijk gemiddeld rendement voor *Giardia* bedroeg 9,5 % . Voor *Cryptosporidium* mochten de gegevens niet samengevoegd worden; het gemiddelde rendement voor RIVM bedroeg 27 % en voor Kiwa 34 %. Factoren die specifiek zijn voor een bepaald watertype kunnen het rendement beïnvloeden, daarom moet van verschillende locaties (en dus watertypen) een set rendementsgegevens opgebouwd worden en kunnen gegevens niet zomaar samengevoegd worden. Hoewel de verbeteringen gering waren, wordt het protocol voor gestandaardiseerde uitvoering van rendementsbepalingen als nuttig en bruikbaar beschouwd.

Abstract

Dutch drinking water legislation requires drinking water companies to perform a quantitative risk assessment for *Cryptosporidium* and *Giardia*. The risk of infection through consumption of drinking water should be below one infection in 10,000 persons per year. Risk assessment is based on the number of *Cryptosporidium* and *Giardia* detected in the raw water and the elimination capacity of the drinking water treatment processes. This is because concentrations in the drinking water are usually below the limit of detection of the method used. To avoid overestimation of the risk of infection it is important to enumerate (oo)cysts and to determine (oo)cyst recovery as precisely as possible. The detection method for *Cryptosporidium* and *Giardia* in water is complex and hampered by a variable, and usually low, recovery. RIVM and Kiwa have developed a protocol for the standardised performance of recovery experiments to reduce variability and to increase recovery. Both institutes performed a series of recovery experiments using this protocol. Data analyses resulted in a pooled average recovery for *Giardia* of 9.5 % . *Cryptosporidium* data could not be pooled due to significant differences between the two laboratories; for RIVM the average recovery was 27 % and for Kiwa it was 34 %. Site specific water quality factors may influence (oo)cyst recovery and therefore site specific recovery databases should be built up. They can only be added to the existing database after proving that no significant differences between sites exist. Although standardised performance of recovery tests only resulted in marginal improvements in (oo)cyst recovery and at the moment means to establish further improvements are lacking, the protocol is considered useful and applicable.

Inhoud

Samenvatting	7
1. Inleiding	9
2. Materiaal en methode	11
2.1 Monsterneming	11
2.2 Spike-suspensies	11
2.3 Spiken van monsters	11
2.4 Concentratie, zuivering en detectie van (oö)cysten	12
2.5 Berekening rendement detectiemethode	12
2.6 Gegevensanalyse	12
3. Resultaten	15
3.1 Spike-suspensies	15
3.2 Spike-suspensies versus monstervaten	16
3.3 Rendement van de detectiemethode	18
3.4 Statistische analyse rendement data	20
4. Discussie	25
5. Conclusies	29
6. Aanbevelingen	31
Dankwoord	31
Literatuur	33
Bijlagen	39
Bijlage 1 Voorschrift voor het tellen van <i>Giardia</i> cysten of <i>Cryptosporidium</i> oöcysten met behulp van membraanfiltratie en immunofluorescentie; SOP MGB/M193, revisie 2, 04-03-2003	39
Bijlage 2 Voorschrift voor concentratie van water m.b.v. Envirochek filters t.b.v. detectie van <i>Cryptosporidium</i> oöcysten en <i>Giardia</i> cysten; SOP MGB/M003, revisie 0, 01-09-2003	43
Bijlage 3 Voorschrift voor zuivering van waterconcentraten m.b.v. immunomagnetische separatie t.b.v. detectie van <i>Cryptosporidium</i> en <i>Giardia</i> ; SOP MGB/M004, revisie 0, 01-09-2003	47
Bijlage 4 Bepaling van het aantal oöcysten van <i>Cryptosporidium</i> en cysten van <i>Giardia</i> in water; Kiwa huisvoorschrift LMB-031, versie 1, 22-01-2002	51

Bijlage 5	Het rendement (R_1) voor <i>Cryptosporidium</i> (A) en <i>Giardia</i> (B) vastgesteld voor de verschillende monstervaten per monsternamedag ten opzichte van de concentratie (oö)cysten in de spike-suspensies, door zowel RIVM als Kiwa	68
Bijlage 6	Het rendement (R_2) voor <i>Cryptosporidium</i> (A) en <i>Giardia</i> (B) vastgesteld voor de verschillende monstervaten per monsternamedag ten opzichte van de gemeten concentratie (oö)cysten in de monstervaten, door zowel RIVM als Kiwa	69
Bijlage 7	De gemeten concentraties (oö)cysten in de verschillende monstervaten door zowel RIVM als Kiwa	70
Bijlage 8	De troebelheid van de monsters oppervlaktewater gemeten in de verschillende monstervaten door zowel RIVM als Kiwa	71

Samenvatting

Cryptosporidium en *Giardia* zijn via water overdraagbare parasitaire veroorzakers van gastro-enteritis bij mensen. Bij de drinkwaterbereiding zijn deze pathogenen lastiger uit het ruwe water te verwijderen dan bacteriële indicatororganismen en daarom worden ze als kritische parameters voor de dimensionering van drinkwaterzuiveringen gezien. In het nieuwe Waterleidingbesluit, dat in 2001 van kracht is geworden, is voor waterleidingbedrijven de verplichting tot het uitvoeren van een kwantitatieve risicoanalyse voor deze protozoa en (entero)virussen opgenomen. Uit deze risicoanalyse moet blijken of deze pathogenen zodanig uit het ruwe water te verwijderen zijn dat bij consumptie van het geproduceerde drinkwater de grenswaarde voor het infectierisico van 10^{-4} per persoon per jaar niet wordt overschreden. De risicoanalyse wordt mede gebaseerd op de aantallen *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten die in de grondstof voor het drinkwater worden gedetecteerd omdat concentraties in het eindproduct onder de detectiegrens van de gebruikte methoden liggen.

De methode voor detectie van *Cryptosporidium* en *Giardia* in water omvat een veelheid aan stappen en bij elk van deze stappen treedt verlies van (oö)cysten op. Door aan monsters water bekende hoeveelheden (oö)cysten toe te voegen (spiken) en na het totale proces te bepalen hoeveel er over zijn, kan het rendement van het proces worden vastgesteld. De algemene tendens is dat de rendementen laag en variabel zijn. In Nederland worden de aantallen *Cryptosporidium* oöcysten en/of *Giardia* cysten gedetecteerd in monsters water gecorrigeerd voor het behaalde rendement van de methode. De uiteindelijk berekende concentraties (oö)cysten worden gebruikt in de risicoanalyse en bepalen grotendeels de vereiste verwijderingscapaciteit van zuiveringsprocessen. Om te voorkómen dat het infectierisico wordt over- of onderschat, is het van belang de aantallen in het ruwe water zo nauwkeurig mogelijk te bepalen en de detectiemethode goed te karakteriseren.

RIVM en Kiwa hebben een protocol opgesteld voor een zo gestandaardiseerd en optimaal mogelijke bepaling van het rendement teneinde de variatie te verkleinen en het rendement te verhogen. Op basis van dit protocol zijn door beide instituten een aantal spike experimenten in oppervlaktewater uitgevoerd. Het is gebleken dat de gevolgde procedure voor het vaststellen van het rendement met name voor *Cryptosporidium* aangepast dient te worden. Gebruik van glazen monstervaten, waaraan minder snel hechting van (oö)cysten optreedt, het in acht nemen van een maximaal tijdsinterval van één uur tussen spiken en filtratie en een verbeterde homogenisatieprocedure zullen worden opgenomen. Tevens wordt het gebruik van goed gekarakteriseerde (eventueel commercieel verkrijgbare) spike-suspensies aangeraden.

De resultaten uit de spike experimenten zijn met behulp van verschillende modellen getoetst. Het Betabinomiale ($\alpha\beta$) model bleek de variatie in het rendement significant beter te beschrijven dan het constante fractie (f) model. Bovendien kunnen rendementen beter bepaald worden ten opzichte van tellingen van het aantal (oö)cysten in de spike-suspensies dan ten opzichte van tellingen van het aantal (oö)cysten in fracties uit de monstervaten. Toetsing van de door RIVM en Kiwa gegenereerde dataset met behulp van het $\alpha\beta$ -model heeft voor het hier gebruikte watertype geresulteerd in een gezamenlijk gemiddeld rendement voor *Giardia* van 9,5 %

(95 % - interval voor variatie: 1,8- 22 %). Op basis van de uitgevoerde rendementsbepalingen kan geen gezamenlijk gemiddeld rendement voor *Cryptosporidium* berekend worden. Er blijken zowel tussen de uitvoerende laboratoria als tussen de gebruikte methoden significante verschillen te bestaan. Uit de dataset is voor beide laboratoria afzonderlijk wel een rendementswaarde voor *Cryptosporidium* af te leiden. Deze bedraagt 27 % (95 % -interval voor variatie: 5,2 - 57 %) voor RIVM en 34 % (95 % -interval voor variatie: 0,7 – 88 %) voor Kiwa.

Gezien de grote variatie in het rendement en de mogelijkheid dat locatiespecifieke factoren het rendement beïnvloeden, is het wenselijk om voor elk individueel monster een rendement te bepalen om zo een locatiespecifieke set van rendementsgegevens op te bouwen. Bij gebruik van oppervlaktewater van verschillende locaties, worden meerdere waterkwaliteitsfactoren beschouwd. Indien na toetsing blijkt dat er geen significante verschillen tussen de locaties bestaan, kan de locatiespecifieke dataset aan de dataset uit deze studie worden toegevoegd. Hierna kan de gehele dataset opnieuw met behulp van het $\alpha\beta$ -model getoetst worden, resulterend in een bijgesteld gemiddeld rendement met variatie. Het $\alpha\beta$ -model geeft naar mate er meer data getoetst worden een steeds beter beeld van de variatie in het rendement van de detectiemethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* in water.

Hoewel de grote variatie in het rendement slechts gedeeltelijk ondervangen kan worden door rendementsbepalingen onder zo gecontroleerd mogelijke omstandigheden uit te voeren en mogelijkheden tot verdere verbetering van het rendement van de huidige detectiemethode op dit moment niet voorhanden lijken, wordt gebruik van een geoptimaliseerd protocol aanbevolen om de bepaling van het rendement te standaardiseren en resultaten onderling vergelijkbaar te maken.

1. Inleiding

Cryptosporidium en *Giardia* zijn via water overdraagbare parasitaire veroorzakers van gastro-enteritis bij mensen (Fayer, 1997). Bij de drinkwaterbereiding zijn deze pathogenen lastiger uit het ruwe water te verwijderen dan bacteriële indicatororganismen en ze worden daarom ook gezien als kritische parameters voor de dimensionering van drinkwaterzuiveringen (Medema *et al.*, 2001). Concentraties in het eindproduct die relevant zijn voor de volksgezondheid, liggen voor deze pathogenen onder de detectiegrens van de gebruikte methoden en kunnen dientengevolge niet direct in het drinkwater gemeten worden. De benodigde verwijderingscapaciteit van drinkwaterzuiveringen wordt daarom gebaseerd op de aantallen die in de grondstof voor het drinkwater worden gedetecteerd, gecombineerd met het gegeven dat de kans op een infectie met deze pathogenen bij consumptie van drinkwater kleiner dient te zijn dan één infectie per 10.000 personen per jaar. In het nieuwe Waterleidingbesluit (Anonymous, 2001), dat in 2001 van kracht is geworden, is voor waterleidingbedrijven de verplichting tot het uitvoeren van een kwantitatieve risicoanalyse voor *Cryptosporidium*, *Giardia* en enterovirussen opgenomen. Uit deze risicoanalyse moet blijken of waterleidingbedrijven in staat zijn om deze pathogenen zodanig uit het ruwe water te verwijderen dat bij consumptie van het geproduceerde drinkwater de grenswaarde voor het infectierisico van 10^{-4} per persoon per jaar niet wordt overschreden. Om te voorkómen dat het infectierisico wordt over- of onderschat is het zaak om de aantallen *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten in het ruwe water zo nauwkeurig mogelijk te bepalen en de detectiemethode goed te karakteriseren. Daarnaast is het van belang om informatie ter verkrijgen over de infectieusiteit van (oö)cysten en om middels typering vast te stellen of het species betreft die pathogeen zijn voor de mens.

De methode voor detectie van *Cryptosporidium* en *Giardia* in water bestaat uit concentratie van grote volumes door middel van filtratie, gevolgd door verdere concentratie door centrifugeren. Naast (oö)cysten wordt ook debris geconcentreerd. Dit heeft een storend effect op de uiteindelijke detectie van de (oö)cysten en daarom is zuivering van concentraten noodzakelijk. Hiervoor zijn zowel flotatie, flow cytometrie als immunomagnetische separatie (IMS) beschikbaar. Na zuivering vindt meestal kleuring van de (oö)cysten met behulp van aan fluoresceïne-isothiocyanaat (FITC) gekoppelde monoklonale antilichamen gericht tegen de (oö)cystenwand plaats, gevolgd door detectie met epifluorescentie microscopie. Het totale proces van ruw monster tot aan microscopisch preparaat omvat een veelheid aan opwerkstappen en bij elk van deze stappen zal door allerlei oorzaken verlies van (oö)cysten optreden (Walker, 2001). Door aan monsters bekende hoeveelheden (oö)cysten toe te voegen (spiken) en na elke stap of na het totale proces te bepalen hoeveel er over zijn, kan het rendement van (delen van) het proces worden vastgesteld (Stanfield *et al.*, 2000).

In de loop der jaren zijn vele rendementsstudies met even zovele rendementspercentages gerapporteerd. Het onderling vergelijken van de uitkomsten van verschillende rendementsstudies is lastig, omdat veelal niet wordt aangegeven hoe het spiken van monsters precies is uitgevoerd en hoe het rendement is berekend. De algemene tendens is dat de rendementen laag en variabel zijn (Medema *et al.*, 2001, 2002). Wanneer spike experimenten worden uitgevoerd in water met een

lage troebelheid (bijv. drinkwater) of wanneer niet de gehele opwerkprocedure wordt doorlopen, worden vaak hogere rendementen behaald omdat in deze gevallen minder verliezen optreden (Fricker, 1995; LeChevallier *et al.*, 2003).

In Nederlandse studies werd het rendement vrijwel altijd bepaald door een bekende hoeveelheid (oö)cysten vóór filtratie aan monsters oppervlaktewater (grondstof voor drinkwaterproductie) of gedeeltelijk gezuiverd oppervlaktewater (drinkwaterhalfproduct) toe te voegen en na de totale opwerkprocedure vast te stellen hoeveel er hiervan teruggevonden werden (Medema *et al.*, 2001, 2002). In een studie waarin 99 rendementsbepalingen in zowel oppervlaktewater als afvalwater werden uitgevoerd, werd voor de methode die concentratie door filtratie door een polypropyleen cartridge filter en zuivering met behulp van Percoll-sucrose omvatte, een gemiddeld rendement van 2,6 % (range 1,0 – 6,0 %) voor *Cryptosporidium* gevonden. Voor *Giardia* bedroeg het gemiddelde rendement 16 % (range 1,0 – 25 %) (Medema *et al.*, 2001). Fricker (1995) rapporteerde met deze methode rendementen van 11-81 % voor *Cryptosporidium*, waarbij lage rendementen werden gevonden in water met hoge troebelheid en de hoge waarden behoorden bij monsters water met lage troebelheid (drinkwater). Dit zelfde laboratorium behaalde bij analyse van Nederlandse monsters afkomstig van Waterwinningbedrijf Brabantse Biesbosch echter slechts rendementen van 0,09 tot 1,7 % (Ketelaars *et al.*, 1995). De troebelheid van het Nederlandse oppervlaktewater is beduidend hoger dan die van drinkwater.

Monsters water worden tegenwoordig meestal geconcentreerd door filtratie met behulp van Envirochek capsules veelal gevolgd door zuivering van het verkregen concentraat met behulp van IMS (Anonymous, 2002). Pezzana *et al.* (2000) rapporteerden met deze methode, na spiken van lage aantallen *Cryptosporidium* oöcysten in vaten met 100 L drinkwater, rendementen van 35 – 69 %, met een gemiddelde van 49 %. Een Amerikaans ringonderzoek leverde met deze methode voor *Cryptosporidium* een gemiddeld rendement van 35 % in gedestilleerd water en 43 % in onbehandeld oppervlaktewater op (Schaefer, 2001). In een Europese studie, die optimalisatie en standaardisatie van de detectie methode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* tot doel had, bleken de Nederlandse laboratoria met de Envirochek – IMS procedure vergelijkbare rendementen te behalen (Stanfield *et al.*, 2000). Bij routinematige analyse van verschillende monsters water verkrijgen de Nederlandse laboratoria echter variabele en meestal lagere rendementen (Medema *et al.*, 2002). Bovendien lijken de variaties in de gemeten rendementen groter dan de variaties in de concentraties (oö)cysten in diverse watertypen (Medema *et al.*, 2003). In Nederland worden de in monsters water gedetecteerde aantallen *Cryptosporidium* en *Giardia* gecorrigeerd voor het behaalde rendement van de methode. De uiteindelijk berekende concentraties (oö)cysten worden gebruikt bij het schatten van het infectierisico. Uit eerder gevolgde procedures voor het bepalen van het rendement van de detectiemethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* in water is gebleken dat de veelheid en complexiteit van de uit te voeren handelingen invloed hebben op de uitkomst. RIVM en Kiwa hebben een protocol opgesteld voor een zo gestandaardiseerd en optimaal mogelijke bepaling van het rendement teneinde tot een kleinere variatie en een hoger rendement te komen. Op basis van dit protocol zijn door beide instituten een aantal spike experimenten uitgevoerd. De verkregen data, evenals een uitgebreide analyse hiervan, worden hier gerapporteerd. Tevens wordt de bruikbaarheid van het protocol geëvalueerd en wordt aangegeven hoe in het vervolg met rendementsbepalingen en de uitkomsten daarvan zou kunnen worden omgegaan.

2. Materiaal en methode

2.1 Monsterneming

Monsters water werden genomen uit het Lekkanaal ter hoogte van het innamepunt WRK. Per monsterneming werden direct op elkaar volgend zes polypropyleen vaten gevuld met 20-25 L oppervlaktewater. De monsterneming werd uitgevoerd conform NEN 6559 (Anonymous, 1992). De vaten werden ongekoeld bij omgevingstemperatuur binnen 30 tot 60 minuten naar de laboratoria vervoerd. Daar werd de troebelheid in elk vat gemeten (RIVM: Hanna turbidity meter, HI93703; Kiwa: troebelheidsmeter LTP4, LPV 159, IWA Instrument) en werden de monsters vervolgens direct gespiket.

2.2 Spike-suspensies

Spike-suspensies werden bereid uit verschillende stock-suspensies. Voor de experimenten uitgevoerd in januari tot en met maart 2002 werd gebruik gemaakt van een *Cryptosporidium parvum* oöcysten-suspensie van Moredun (Moredun Animal Health, Penicuik, Schotland, batch C3/01; crypt 898/01) en een *Giardia lamblia* cysten-suspensie van PRL (Parasitology Research Labs, Neosho, VS, batch 7-2-2001; crypt 822/01). Voor de experimenten uitgevoerd in juni 2002 werd gebruik gemaakt van *Cryptosporidium parvum* oöcysten van Moredun (batch C1/02; crypt 929/02) en *Giardia lamblia* cysten van Waterborne Inc. (New Orleans, LA, USA, batch 020205; crypt 925/02).

Uitgaande van de concentraties (oö)cysten in de stock-suspensies en het benodigde eindvolume werden door het RIVM spike-suspensies gemaakt in Hanks' Balanced Salt Solution (HBSS, Gibco no. 24020-091, Invitrogen Corporation, Paisley, Schotland) met een concentratie van ongeveer 500 *Cryptosporidium* oöcysten en ongeveer 500 *Giardia* cysten per ml. Voor de experimenten van januari t/m maart maakte Kiwa uitgaande van dezelfde stock-suspensies en op dezelfde wijze als het RIVM spike-suspensies in PBS (Phosphate Buffered Saline, 150 mM, pH 7,2). Voor latere experimenten werden de spike-suspensies bij het RIVM in HBSS bereid, goed gemengd (20 maal rustig zwenken) en in twee gelijke porties verdeeld. Eén portie werd gekoeld naar Kiwa getransporteerd. De spike-suspensies werden in alle gevallen bij 2-8 °C bewaard, gedurende een aantal spike experimenten gebruikt en telkens voor gebruik gemengd door 20 keer zwenken en vervolgens geteld.

2.3 Spiken van monsters

Spike-suspensies werden 20 maal rustig gezwenkt alvorens er in duplo 1 ml uit werd genomen voor een immunofluorescentie (IF) telling. Aan de vaten met oppervlaktewater werd direct na zwenken van de spike-suspensie 1 ml spike-suspensie per liter oppervlaktewater toegevoegd om

een concentratie van ongeveer 500 (oö)cysten per liter te bewerkstelligen. Er werd gemengd door de vaten 20 maal heen en weer te kantelen. Uit de gemengde vaten werd een monster van 100 ml genomen, waarvan in duplo (twee maal 50 ml) een IF telling werd uitgevoerd. De gevolgde procedure bij het uitvoeren van IF tellingen op membraanfilters is opgenomen in bijlage 2.

2.4 Concentratie, zuivering en detectie van (oö)cysten

De gespikete monsters oppervlaktewater werden geconcentreerd door middel van filtratie door een Envirochek HV filter (Pall Gelman, Ann Arbor, MI, USA). De gevolgde procedure is opgenomen in bijlage 3. De vaten werden volledig leeggepompt, het exacte volume wat gefiltreerd werd, werd gemeten met behulp van een watermeter. De vaten werden nagespoeld met 2 L leidingwater, wat eveneens door hetzelfde filter werd gefiltreerd. De gefiltreerde gespikete monsters werden van de Envirochek filters geëluëerd en verder geconcentreerd door centrifugeren. De verkregen concentraten werden gezuiverd met behulp van IMS. De gevolgde procedures staan beschreven in bijlage 4 (RIVM) en 5 (Kiwa). De gezuiverde (oö)cysten werden gekleurd met aan FITC gekoppelde monoklonale antilichamen gericht tegen de celwanden van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten (Cellabs *Cryptosporidium/Giardia* staining reagent, Brookvale, Australië). Detectie van (oö)cysten vond plaats door middel van epifluorescentie microscopie (RIVM, bijlage 2) of met behulp van Chemsan (Kiwa, bijlage 5).

2.5 Berekening rendement detectiemethode

Bij berekening van het rendement van de detectiemethode wordt het aantal teruggevonden (oö)cysten uit gespikete monsters beoordeeld ten opzichte van het aantal (oö)cysten wat aan de monsters is toegevoegd. Het aantal (oö)cysten wat aan de monsters is toegevoegd is enerzijds berekend uit de telling van het aantal (oö)cysten in de spike-suspensies en het aan de monstervaten toegevoegde volume van deze spike-suspensies (N_1). Anderzijds is het aantal (oö)cysten in het gespikete monster vóór concentratie en opwerken vastgesteld door een telling van het aantal (oö)cysten in een fractie van dit monster in het monstervat. Hieruit is de concentratie (oö)cysten in het gespikete monster in het monstervat berekend (N_2). De gehele inhoud van de monstervaten werd geanalyseerd, resulterend in tellingen van de totale aantallen (oö)cysten in de monstervaten (k). Het rendement van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten uit de gespikete monsters oppervlaktewater werd berekend uitgaande van beide ingangconcentraties. De volgende rendementen werden gedefinieerd: R_1 : het rendement berekend op basis van telling van spike-suspensies en R_2 : het rendement berekend op basis van telling van een fractie van het gespikete monster uit het monstervat.

$$R_1 = \frac{k}{N_1} \quad \text{en} \quad R_2 = \frac{k}{N_2} \quad (1)$$

2.6 Gegevensanalyse

Bij onderzoek van een al dan niet gespiket monster water kan worden verondersteld dat elke (oö)cyste een bepaalde kans heeft om gedetecteerd te worden. Indien wordt verondersteld dat deze kans constant is, zou dat resulteren in een constant rendement. Het is waarschijnlijk realistischer om aan te nemen dat deze kans variabel en Beta verdeeld is omdat verschillende factoren de kans op detectie in verschillende, niet constante, mate beïnvloeden. Het aantal gedetecteerde (oö)cysten volgt dan een Betabinomiale verdeling, resulterend in een kansverdeling voor het rendement waarmee een (oö)cyste wordt (terug)gevonden (Teunis *et al.*, 1997)

In deze studie werden de rendementen zowel geschat onder de aanname dat deze constant zijn (*f*-model), als dat ze Betabinomiaal verdeeld zijn ($\alpha\beta$ -model) (Teunis *et al.*, 1999). Op grond van deze modellen werden de volgende loglikelihood-functies toegepast om te toetsen of er significante verschillen tussen de datasets (RIVM vs. Kiwa, R_1 vs. R_2) of tussen het *f*- en $\alpha\beta$ -model bestonden (Cox and Hinkley, 1974; Hogg and Craig, 1995).

De loglikelihood-functie voor het *f*-model is:

$$L(\pi | n_1 \dots n_m, k_1 \dots k_m) = \sum_{i=1}^m \log \left[\binom{n_i}{k_i} \pi^{k_i} (1 - \pi)^{n_i - k_i} \right] \quad (2)$$

Hierin is $\pi = R_1$ of R_2 en $n = N_1$ of N_2 .

De loglikelihood-functie voor het $\alpha\beta$ -model is:

$$L(\pi | n_1 \dots n_m, k_1 \dots k_m) = \sum_{i=1}^m \log \left[\binom{n_i}{k_i} \frac{B(k_i + \alpha, n_i - k_i + \beta)}{B(\alpha, \beta)} \right] \quad (3)$$

Hierin is B de Beta-functie, α en β zijn parameters.

Rendementen R_1 en R_2 , alsmede de variantie werden als volgt berekend:

$$R_{1,2} = \frac{\alpha_{1,2}}{\alpha_{1,2} + \beta_{1,2}} \text{ en } Var(R_{1,2}) = \frac{\alpha_{1,2}\beta_{1,2}}{(\alpha_{1,2} + \beta_{1,2})^2 (1 + \alpha_{1,2} + \beta_{1,2})} \quad (4)$$

Parameterwaarden voor de verschillende datasets en combinaties daarvan werden verkregen door maximalisatie van deze loglikelihood-functies (equivalent met de kleinste kwadraten methode) met behulp van numerieke optimalisatie in Mathematica 5.0.0.0 (Wolfram Research, 2003).

Vergelijkingen (2) en (3) werden toegepast voor twee aparte datasets en voor de combinatie van deze twee datasets. De som van de loglikelihoods van de aparte datasets werd vergeleken met die van de gecombineerde dataset. Het verschil werd geïnterpreteerd als een χ^2 -deviatie met df vrijheidsgraden, gelijk aan het verschil in aantallen parameters in de gecombineerde dataset en het totaal aantal parameters van beide aparte datasets (Teunis *et al.*, 1996). Als de loglikelihood van de gecombineerde dataset significant hoger is dan die van de som van de aparte datasets, dan bestaan er significante verschillen tussen deze datasets. Naar verwachting zal de likelihood van het $\alpha\beta$ -model significant kleiner zijn dan die van het f -model omdat hier twee parameters in plaats van één getoetst worden. Het $\alpha\beta$ -model werd ook vergeleken met het Supremum-model. In dat geval werd een loglikelihood berekend door de binomiale kans van elk paar waarnemingen gelijk te stellen aan de fractie (rendement):

$$L_{\text{sup}} = \sum_{i=1}^m \log \left[\binom{n_i}{k_i} \left(\frac{k_i}{n_i} \right)^{k_i} \left(1 - \frac{k_i}{n_i} \right)^{n_i - k_i} \right] \quad (5)$$

Dit geeft een indruk van hoe goed het $\alpha\beta$ -model de waarnemingen beschrijft.

3. Resultaten

3.1 Spike-suspensies

De aantallen *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten in de spike-suspensies zijn weergegeven in tabel 1. Voor de spike experimenten uitgevoerd in januari tot en met maart 2002 zijn per laboratorium telkens dezelfde spike-suspensies gebruikt; deze spike-suspensies zijn door elk laboratorium afzonderlijk bereid. Met name bij Kiwa trad grote variatie in de telresultaten op (variatiecoëfficiënt *Cryptosporidium* 50 %, *Giardia* 70 %) en de verschillen tussen de tellingen van beide laboratoria waren eveneens groot. Ter vergelijking: de variatiecoëfficiënt voor *Cryptosporidium* was bij RIVM 11 %, voor *Giardia* was deze 4 %. Om een grotere uniformiteit in de tellingen te bereiken, werd een nieuwe spike-suspensie door RIVM bereid, over de twee laboratoria verdeeld en gedurende een week dagelijks door beide laboratoria geteld. Hier werden door beide laboratoria variatiecoëfficiënten van 14 % voor *Cryptosporidium* en 18 % voor *Giardia* behaald. Voor de spike experimenten uitgevoerd in juni 2002 is op dezelfde wijze een nieuwe spike-suspensie bereid. Gebaseerd op een beperkt aantal tellingen bedroeg de variatiecoëfficiënt voor *Cryptosporidium* 8 % en voor *Giardia* 14 %.

Tabel 1 De concentratie *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten in spike-suspensies.

datum	<i>Cryptosporidium</i> (n/ml)		<i>Giardia</i> (n/ml)	
	RIVM	Kiwa	RIVM	Kiwa
280102	492	445	506	180
180202	502	531	470	84
040302	552	239	508	53
110302	614	525	504	318
220402	744	761	647	678
230402	528	742	424	716
240402	602	779	518	654
250402	711	839	639	636
260402	722	801	540	720
030602	764	747	647	625
170602	774	878	628	482

noot: de weergegeven concentraties zijn rekenkundige gemiddelden van duplo tellingen

3.2 Spike-suspensies versus monstervaten

Het aantal (oö)cysten wat aan monsters water is toegevoegd (N_1) is berekend uit de telling van het aantal (oö)cysten in de spike-suspensie en het hiervan aan het monster toegevoegde volume en uit een telling van het aantal (oö)cysten in een fractie van het gespikete monster in het monstervat (N_2). Per spike experiment is er steeds één waarneming van N_1 en zijn er drie waarnemingen van N_2 (Tabel 2). Er werd één spike-suspensie gebruikt om drie vaten te spiken, het gemiddelde van twee tellingen van deze spike-suspensie werd gebruikt als N_1 waarde voor alle drie de vaten. Per vat werd een N_2 waarde berekend uit het gemiddelde van twee tellingen van een fractie uit dit vat.

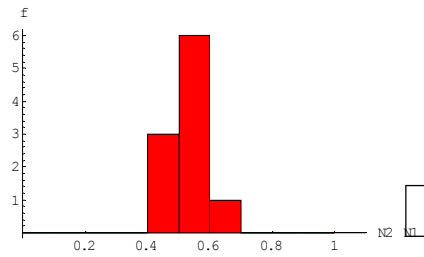
Tabel 2 Aantallen *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten toegevoegd aan monsters oppervlaktewater, vastgesteld aan de hand van tellingen van de spike-suspensies (N_1) en tellingen van een fractie van het gespikete monster (N_2), en teruggevonden na volledige analyse van het monster (k).

<i>Cryptosporidium</i>						<i>Giardia</i>					
RIVM			Kiwa			RIVM			Kiwa		
N_1	N_2	k	N_1	N_2	k	N_1	N_2	k	N_1	N_2	k
9840	5454	1185	8900	5850	250	10120	6868	227	3600	3120	250
9840	4060	1618	8900	2730	1268	10120	9323	343	3600	2740	445
9840	5684	2148	8900	4680	678	10120	8323	918	3600	2340	596
20080	10302	8530	6120	18360	1776	18800	15756	474	3360	5760	250
20080	6825	8172	6120	14820	3383	18800	15210	545	3360	5460	468
20080	4040	8030	6120	6800	3519	18800	13332	367	2100	7200	343
18768	11832	4420	9560	27280	4995	17272	13464	1684	2100	7920	56
18768	6020	4973	9560	35880	9178	17272	10660	1487	2100	5520	138
18768	10608	8690	9560	37400	5920	17272	11832	2098	12700	4840	94
24560	10404	6563	20980	23200	8797	20160	12648	817	12700	12000	998
24560	12300	3326	20980	23760	5061	20160	13940	784	12700	10368	1241
24560	11000	5897	20980	18568	12455	20160	9400	1447	12700	10128	771
15280		946	14940	21336	1377	12880		882	12500	25908	2002
15280		845	14940	22500	1373	12880		1186	12500	22500	1953
15280		1974	14940	23000	1364	12880		1360	12500	15500	2078
15480		6941	17560	12000	2110	12560		2821	9640	13600	882
15480		4906	17560	6900	1362	12560		2101	9640	6900	1445
15480		6446	17560	12760	2284	12560		2177	9340	9680	1272

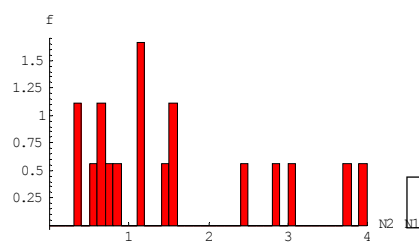
Voor het RIVM is de mediane waarde van N_2/N_1 0,55 voor *Cryptosporidium* en 0,70 voor *Giardia* en in alle gevallen kleiner dan 1. Dat betekent dat er al verlies van (oö)cysten optreedt in de stap van N_1 naar N_2 , van spike-suspensie naar monstervat. Voor het Kiwa geldt dat N_2/N_1 voor zowel *Cryptosporidium* als *Giardia*, zowel kleiner als groter dan 1 is, met een grote spreiding. De mediaan voor *Cryptosporidium* is 1,1 en voor *Giardia* 1,3. Dit zou kunnen betekenen dat bij Kiwa de spike in het monstervat heterogeen verdeeld was of dat de tellingen van N_1 soms te laag waren. De figuren 1a t/m 1d geven in histogrammen de frequentieverdeling van de verhouding N_2/N_1

weer en illustreren het bovenstaande. De figuren 2a tot en met 2d geven de cumulatieve frequentieverdeling van de verhouding N_2/N_1 weer.

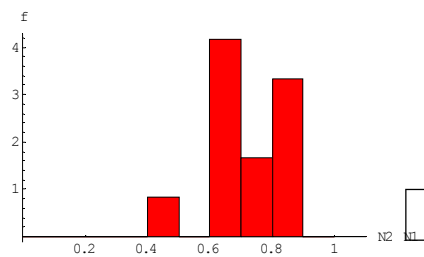
(a) *Cryptosporidium*, RIVM



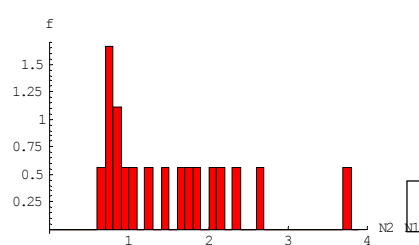
(b) *Cryptosporidium*, Kiwa



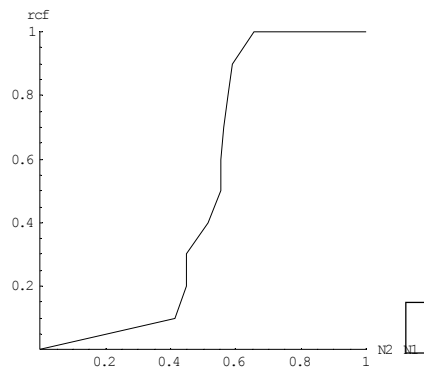
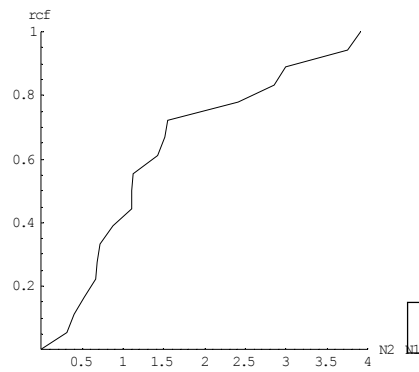
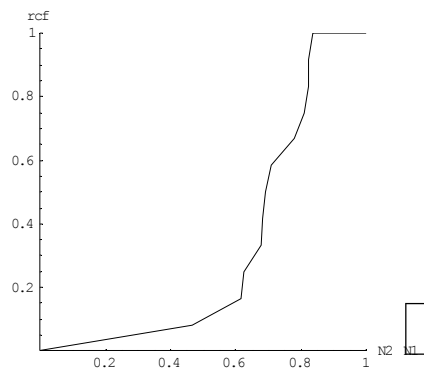
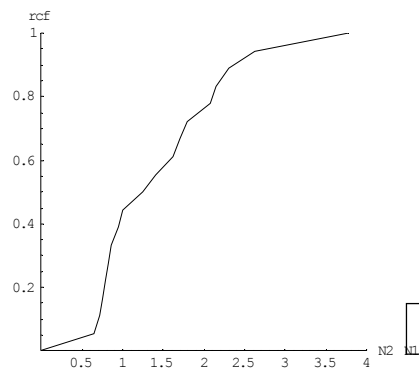
(c) *Giardia*, RIVM



(d) *Giardia*, Kiwa



Figuur 1 Frequentieverdeling (f = frequentie) van de verhouding N_2/N_1 voor *Cryptosporidium* en *Giardia* bij RIVM en Kiwa.

(a) *Cryptosporidium*, RIVM(b) *Cryptosporidium*, Kiwa(c) *Giardia*, RIVM(d) *Giardia*, Kiwa

Figuur 2 Cumulatieve verdeling ($rcf =$ relatieve cumulatieve frequentie) van de verhouding N_2/N_1 voor *Cryptosporidium* en *Giardia* bij RIVM en Kiwa.

3.3 Rendement van de detectiemethode

In tabel 3 zijn de gemiddelde rendementen voor *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten uit de gespikete monsters oppervlaktewater, berekend door gebruik te maken van de bij (1) aangegeven vergelijkingen, als percentages weergegeven. De rendementen per monstervat zijn opgenomen in bijlagen 6 en 7. De getallen in tabel 3 schetsen een beeld van de variatie in de gevonden rendementen binnen een laboratorium, tussen laboratoria en bij gebruik van verschillende uitgangskoncentraties om het rendement te berekenen (R_1 : rendement berekend op basis van telling van spike-suspensies en R_2 : rendement berekend op basis van telling van een fractie van het gespikete monster uit het monstervat) zonder deze hier verder te toetsen. Voornamelijk voor *Cryptosporidium* lijken bij zowel RIVM als Kiwa grote verschillen te bestaan tussen het vaststellen van het rendement ten opzichte van de aantallen oöcysten in de spike-suspensies of ten opzichte van de getelde aantallen in de monstervaten.

Tabel 3 Het rendement waarmee Cryptosporidium oöcysten en Giardia cysten werden aangetoond in gespikete monsters oppervlaktewater. R_1 : rendement berekend op basis van telling van spike-suspensie (N_1), R_2 : rendement berekend op basis van telling fractie gespikete monster (N_2).

datum	rendement <i>Cryptosporidium</i> (%)				rendement <i>Giardia</i> (%)			
	RIVM		Kiwa		RIVM		Kiwa	
	R_1	R_2	R_1	R_2	R_1	R_2	R_1	R_2
280102	17	33	8,2	22	4,9	6,1	12	17
180202	41	134	47	28	2,5	3,1	10	5,9
040302	32	58	70	20	10	15	4,6	1,7
110302	21	48	42	42	5,1	9,2	7,9	9,3
030602	8,2	-	9,2	6,2	8,9	-	16	9,9
170602	39	-	0,9	18	19	-	12	14
gemiddeld	26	68	30	23	8	8	10	10

noot: de weergegeven rendementen zijn rekenkundige gemiddelden van drie waarnemingen in afzonderlijke monstervaten; -: niet gedaan

3.4 Statistische analyse rendement data

De in tabel 2 weergegeven aantallen (oö)cysten zijn gebruikt in de nu volgende berekeningen. Voor het RIVM geldt dat alleen de waarden van N_2 en k waarbij N_2 groter of gelijk is aan de bijbehorende k zijn gebruikt in de berekeningen, voor Kiwa kwam dit niet voor. De waarden van N_2 en k waarvoor dit niet geldt zijn wel in de tabel opgenomen. Er staat steeds één waarneming van N_1 tegenover drie waarnemingen van N_2 en drie waarnemingen van k .

Tabel 4 toont de rendementen R_1 en R_2 berekend volgens het f -model (vergelijking (2)) en het $\alpha\beta$ -model (vergelijking (3) en (4)), alsmede de varianties. In tabel 5 is de toetsing van deze modellen met behulp likelihoodratio's weergegeven. In alle gevallen werden significante likelihoodratio's gevonden voor het f -model versus het $\alpha\beta$ -model. Dit betekent dat het $\alpha\beta$ -model een significant betere beschrijving geeft van de waarnemingen. Aan de hand van het $\alpha\beta$ -model werden daarom vervolgens de vergelijkingen tussen R_1 en R_2 en tussen RIVM en Kiwa gemaakt. De likelihoodratio's van het $\alpha\beta$ -model versus het Supremum model zijn ook in alle gevallen significant. Hoewel deze vergelijking erg streng is, geeft hij wel een aanwijzing dat het mogelijk zou moeten zijn om met een nog beter model dan het $\alpha\beta$ -model de gegevens te beschrijven. Figuur 3 toont de cumulatieve frequentieverdelingen van de berekende R_1 (a,c,e,g) en R_2 (b,d,f,h) voor *Cryptosporidium* en *Giardia*, voor zowel RIVM als Kiwa, alsmede de gefitte cumulatieve Betabinomiale verdelingen.

Tabel 4 Rendementen R_1 en R_2 berekend volgens het constante fractiemodel (f -model) en het Betabinomiale model ($\alpha\beta$ -model), alsmede de berekende varianties en 95 %-intervallen voor de verwachte variatie.

	f -model		$\alpha\beta$ -model		
		R_i	R_i	variantie	95% -interval
<i>Cryptosporidium</i>					
RIVM	R_1	0,27	0,27	0,019	0,052 - 0,57
	R_2	0,52	0,51	0,038	0,14 - 0,88
Kiwa	R_1	0,29	0,34	0,064	0,0073 - 0,88
	R_2	0,21	0,23	0,024	0,020 - 0,60
<i>Giardia</i>					
RIVM	R_1	0,079	0,084	0,0031	0,011 - 0,22
	R_2	0,080	0,083	0,0027	0,013 - 0,21
Kiwa	R_1	0,12	0,11	0,0021	0,034 - 0,21
	R_2	0,089	0,095	0,0043	0,011 - 0,26

Tabel 5 Toetsing van het f -model, $\alpha\beta$ -model en Supremum-model met likelihoodratio's.

		loglikelihood			likelihoodratio				
		f -model	$\alpha\beta$ -model	Supremum	f -model vs. $\alpha\beta$ -model	$\alpha\beta$ -model vs. Supremum	df	χ^2 (95%;df)	
<i>Cryptosporidium</i>									
RIVM	R_1	28712	327	175	28385	152	16	26	
	R_2	16109	176	93	15933	83	8	16	
Kiwa	R_1	69567	332	164	69235	167	16	26	
	R_2	41922	324	168	41598	155	16	26	
<i>Giardia</i>									
RIVM	R_1	10689	287	155	10402	132	16	26	
	R_2	5136	184	100	4952	83	10	18	
Kiwa	R_1	2361	251	145	2110	106	16	26	
	R_2	4822	270	145	4553	125	16	26	

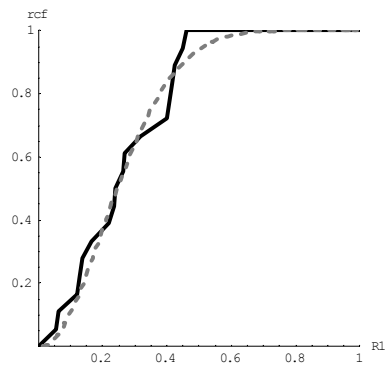
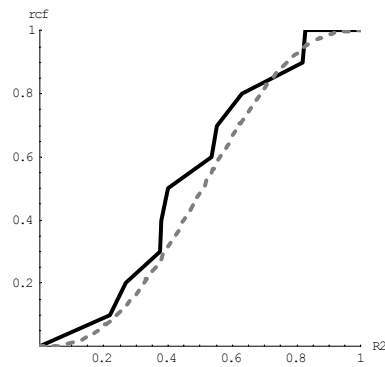
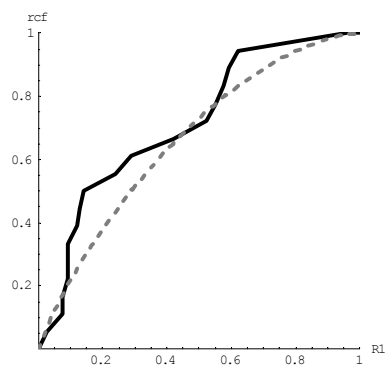
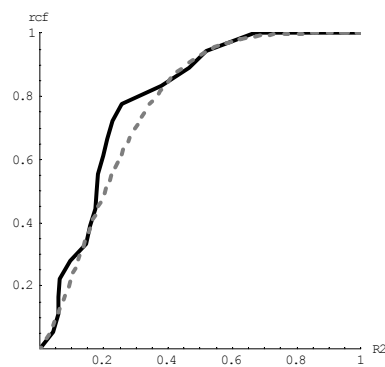
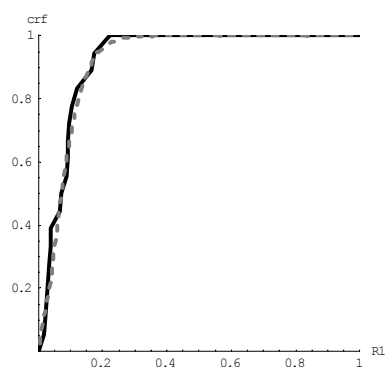
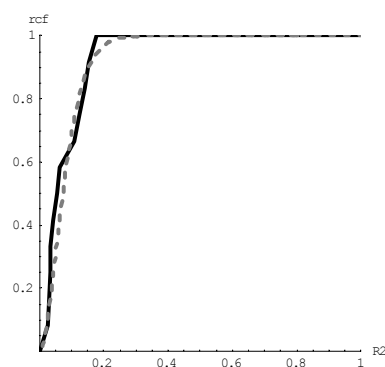
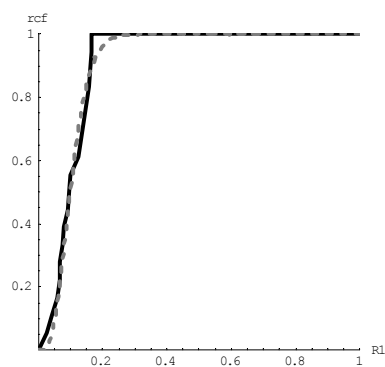
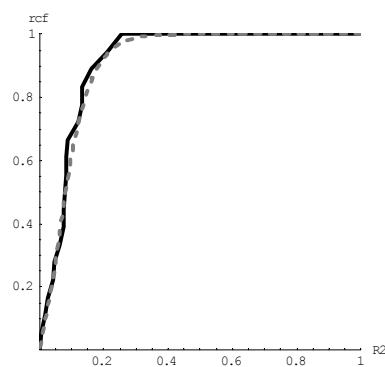
noot: De likelihoodratio f -model vs. $\alpha\beta$ -model is significant als deze groter is dan 3,84; de likelihoodratio $\alpha\beta$ -model vs. Supremum-model is significant als deze groter is dan $\chi^2(95\%;df)$ in de laatste kolom

In tabel 6 is de vergelijking van R_1 met R_2 voor zowel RIVM als Kiwa en de vergelijking tussen RIVM en Kiwa voor R_1 en R_2 , berekend met het $\alpha\beta$ -model (vergelijking (3) en (4)), door middel van likelihoodratio's weergegeven. De likelihoodratio is de som van de afzonderlijke loglikelihoods (Tabel 5) minus de loglikelihood van de gecombineerde data. Duidelijk is de grotere spreiding in R_1 en R_2 voor *Cryptosporidium*, vooral bij Kiwa. Voor *Cryptosporidium* is R_1 bij het RIVM significant kleiner dan R_2 . Voor *Cryptosporidium* werd bij Kiwa geen significant verschil gevonden tussen R_1 en R_2 ; de spreidingen zijn hier echter zodanig groot, dat met dit aantal waarnemingen geen onderscheid kan worden gemaakt. In het geval van *Giardia* zijn geen van de likelihoodratio's significant. Dit betekent dat het, op basis van deze toetstingen, niet uit maakt of de berekening van R voor *Giardia* gebaseerd is op N_1 of N_2 en dat er ook geen laboratorium verschillen zijn.

Tabel 6 Toetsing van R_1 vs. R_2 en RIVM vs. Kiwa met likelihoodratio's.

		recovery	variantie	95%-interval	loglikelihood	likelihoodratio
<i>Cryptosporidium</i>						
R_1 vs. R_2	RIVM				515	12
R_1 vs. R_2	Kiwa				661	5,1
R_1	RIVM vs. Kiwa				667	8,5
R_2	RIVM vs. Kiwa				512	12
<i>Giardia</i>						
R_1 vs. R_2	RIVM				471	0,062
R_1 vs. R_2	Kiwa				525	4,4
R_1	RIVM vs. Kiwa	0,095	0,0029	0,018 - 0,22	543	4,6
R_2	RIVM vs. Kiwa	0,090	0,0036	0,011 - 0,24	454	0,53

noot: De likelihoodratio is significant als deze groter is dan 6,0 ($\chi^2(95\%;df=2)$). De significante likelihoodratio's zijn grijs gearceerd.

(a) *Cryptosporidium*, RIVM(b) *Cryptosporidium*, RIVM(c) *Cryptosporidium*, Kiwa(d) *Cryptosporidium*, Kiwa(e) *Giardia*, RIVM(f) *Giardia*, RIVM(g) *Giardia*, Kiwa(h) *Giardia*, Kiwa

Figuur 3 Cumulatieve verdelingen (rcf = relatieve cumulatieve frequentie) van de rendementen R_1 en R_2 van *Cryptosporidium* en *Giardia* voor RIVM en Kiwa (zwarte doorgetrokken lijnen) en de gefitte cumulatieve Betabinomiale-verdelingen (grijze stippellijnen).

4. Discussie

Uit de toetsing van de door RIVM en Kiwa uit spike experimenten verkregen data is gebleken dat het Betabinomiale ($\alpha\beta$) model de datasets significant beter beschrijft dan het constante fractie (f) model. Dit is in lijn met de eerdere aanname dat elke (oö)cyste een variabele kans heeft om gedetecteerd te worden (Teunis *et al.*, 1997). Uit de berekeningen blijkt dat er voor *Giardia* geen significante verschillen tussen RIVM en Kiwa en tussen R_1 (rendement berekend op basis van telling van spike-suspensies) en R_2 (rendement berekend op basis van telling van een fractie van het gespikete monster uit het monstervat) bestaan. Onderstaande argumenten pleiten tegen het gebruik van methode R_2 en voor het gebruik van methode R_1 om het rendement voor *Giardia* te bepalen.

De tellingen van fracties uit de monstervaten (R_2) zijn bij Kiwa zowel heel hoog als heel laag, terwijl het RIVM in deze fracties structureel lage aantallen telt (Bijlage 8). De telresultaten van het RIVM zouden kunnen duiden op verliezen van (oö)cysten in de monstervaten. Dit lijkt echter onwaarschijnlijk omdat de vaten direct na spiken en mengen bemonsterd zijn en voor beide laboratoria gelijk waren. Hechting van (oö)cysten aan de wanden van de vaten zal in deze korte tijd geen grote rol gespeeld hebben, maar er dient wel rekening mee gehouden te worden dat (ir)reversibele hechting van (oö)cysten een grotere rol kan spelen naarmate de (oö)cysten langer in het monstervat aanwezig zijn. Er kan daarom bij volgende rendementstudies gekozen worden voor glazen containers, waaraan (oö)cysten minder snel hechten dan aan het hier gebruikte polypropyleen. In het protocol kan een maximaal tijdsinterval van één uur tussen spiken en filtratie van het totale monster worden opgenomen. De variabele tellingen lijken echter eerder veroorzaakt te worden door problemen met het homogeniseren van de (oö)cystensuspensies in de monstervaten, waardoor geen homogene monsters genomen konden worden, dan door het materiaal van de vaten of de verblijftijd. De resultaten van Kiwa wijzen ook in deze richting. De aantallen (oö)cysten die in de preparaten van de fracties uit de monstervaten worden geteld zijn bovendien bij beide laboratoria laag: er werd gestreefd naar aantallen van ongeveer 500 (oö)cysten per liter monster. Dit zou bij onderzoek van 50 ml uit het monstervat resulteren in maximaal 25 (oö)cysten per preparaat. Microscopische telmethoden zijn echter bij lage aantallen minder betrouwbaar (Bennet *et al.*, 1999) en omdat spiken met veel hogere aantallen (oö)cysten vanwege onder andere aggregaatforming ongewenst is, wordt ook hierin een argument gevonden om te kiezen voor R_1 , waarbij het rendement wordt berekend op basis van tellingen van spike-suspensies. Hierbij gaat het om microscopische tellingen van grotere aantallen in preparaten die bovendien eenvoudiger te maken zijn. De keuze om rendementen in het vervolg te berekenen ten opzichte van de concentraties (oö)cysten in spike-suspensies reduceert de noodzaak om problemen met het homogeniseren in het monstervat op te lossen. Een standaard homogenisatieprocedure wordt in het protocol opgenomen en zal door een evaluatie gevolgd moeten worden.

Wanneer het rendement van de detectiemethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* wordt bepaald ten opzichte van de getelde aantallen (oö)cysten in de spike-suspensie, is het van belang om een stabiele spike-suspensie te gebruiken. Echter, bij gebruik van IF methoden spelen inefficiëntie van

de methode, waarbij verlies van (oö)cysten optreedt of (oö)cysten niet met de monoklonale antilichamen kleuren, en de inhomogene verdeling van de (oö)cysten, die in suspensie neiging tot klonteren vertonen, een belangrijke rol (Reynolds *et al.*, 1999). Een betrouwbaardere schatting van de aantallen (oö)cysten in een spike-suspensie kan verkregen worden door tellingen in veelvoud uit te voeren. Een telling in tienvoud met een variatiecoëfficiënt die kleiner dan 10 % is, geeft een betrouwbare schatting van de aantallen aanwezige (oö)cysten (Reynolds *et al.*, 1999). Met behulp van IF is een zodanige variatiecoëfficiënt echter niet altijd te realiseren (Bennet *et al.*, 1999), maar er kan gestreefd worden naar een zo klein mogelijke variatie. De resultaten uit de hier gerapporteerde studie laten zien dat het mogelijk is om een homogene spike-suspensie in HBSS te bereiden. Twintig tellingen van een spike-suspensie (tien door RIVM, tien door Kiwa) resulteerden in variatiecoëfficiënten van 14 % voor *Cryptosporidium* en 18 % voor *Giardia*. In ISO/CD 15553 (Anonymous, 2002) wordt voor spike-suspensies die binnen het eigen laboratorium worden gemaakt en die worden gebruikt voor rendementmetingen, een variatiecoëfficiënt van minder dan 20 % aanbevolen, bij 10 tellingen van de suspensie. Nauwkeurige en betrouwbare tellingen van (oö)cystensuspensies kunnen verkregen worden met behulp van flow cytometrie (Reynolds *et al.*, 1999). Deze methode kan ook gebruikt worden voor het bereiden van spike-suspensies uit stock-suspensies (Reynolds *et al.*, 1999, Padayachee *et al.*, 2002). In een aantal gevallen zijn op deze manier geproduceerde spike-suspensies commercieel verkrijgbaar en worden ze geleverd met een gegarandeerd aantal (oö)cysten met een variatiecoëfficiënt die kleiner is dan 2,5 % (bijv. ColorSeed, Biotechnology Frontiers, North Ryde, Australië). Gebruik van deze gestandaardiseerde (oö)cystensuspensies ondervangt het probleem van variabele spike-suspensies, waarvan de telresultaten effect hebben op de rendementberekeningen. Homogeen verdeelde en nauwkeurig getelde spike-suspensies dragen bij aan een betrouwbaardere schatting van het rendement van een methode, evenals regelmatig uitvoeren van de rendementmetingen. Het wordt aanbevolen om, na evaluatie, bij toekomstige rendementstudies gebruik te maken van deze suspensies. Het binnen het eigen laboratorium uitvoeren van tellingen van deze suspensies blijft echter gewenst.

Berekeningen met het Beta-binomiale model laten zien dat het voor *Cryptosporidium* niet mogelijk is om op basis van de verkregen dataset een gemeenschappelijk gemiddeld rendement voor RIVM en Kiwa vast te stellen. Doordat er bij het RIVM significante verschillen bestaan tussen de twee manieren waarop het rendement werd bepaald en er bij Kiwa een zeer grote spreiding tussen de op dezelfde twee manieren bepaalde rendementen werd gevonden kunnen beide datasets niet samengevoegd worden. Er wordt op basis van deze studie ook geen eenduidig antwoord verkregen op de vraag of het rendement voor *Cryptosporidium* het meest betrouwbaar ten opzichte van de concentratie oöcysten in de spike-suspensie (R_1) of ten opzichte van de telling van een fractie van het monster in het monstervat (R_2) kan worden berekend. Desondanks pleiten de argumenten die voor *Giardia* resulteren in de keus om het rendement te bepalen ten opzichte van de gemeten concentratie in de spike-suspensie er voor om dit voor *Cryptosporidium* ook te doen.

De in deze studie door RIVM en Kiwa gegenereerde dataset resulteert voor het hier gebruikte watertype in een gemiddeld rendement (R_1) voor *Giardia* van 9,5 % (95 % -interval: 1,8-22 %). Voor *Cryptosporidium* mogen de data van RIVM en Kiwa niet samengevoegd worden en zullen beide laboratoria ieder afzonderlijk een rendementswaarde moeten hanteren. Deze

bedraagt 27 % (95 % -interval: 5,2 – 57 %) voor het RIVM en 34 % (95 % -interval: 0,7 – 88 %) voor Kiwa. De breedte van de 95% -intervallen geeft aan dat de variatie in de gevonden rendementen ondanks het gebruik van een standaardprotocol nog steeds groot is. Deze studie is uitgevoerd met oppervlaktewater van telkens dezelfde locatie. Echter, locatiespecifieke waterkwaliteitsfactoren kunnen het rendement van de detectiemethode beïnvloeden. Gezien de grote variatie in het rendement en het ontbreken van onderzoeksresultaten die aantonen dat locatiespecifieke factoren een significante rol spelen, geniet het de voorkeur om voor elk individueel monster een rendement te bepalen. Zo kan voor verschillende locaties een specifieke dataset met rendementsgegevens worden opgebouwd. Deze datasets kunnen met de systematiek die in deze studie ontwikkeld is getoetst worden om vast te stellen of er verschillen tussen de datasets (en dus de watertypen) bestaan. Alleen wanneer geen significante verschillen worden gevonden kunnen datasets worden samengevoegd, waarna opnieuw met behulp van het $\alpha\beta$ -model getoetst kan worden, resulterend in een bijgesteld gemiddeld rendement met variatie. Dit gemiddelde rendement kan in het vervolg voor deze locaties gebruikt worden. Het $\alpha\beta$ -model geeft naar mate er meer data getoetst worden een steeds beter beeld van de variatie in het rendement van de detectiemethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* in water. Indien wel significante verschillen bestaan mogen de datasets niet worden samengevoegd, maar kunnen de rendementsgegevens van één locatie onderling worden getoetst. Wanneer er geen significante verschillen bestaan kan voor een locatie een locatiespecifiek gemiddeld rendement worden berekend en gehanteerd. Bij significante verschillen tussen de rendementsgegevens dient voor de betreffende locatie per individueel monster het rendement te worden bepaald. Om vast te stellen welke waterkwaliteitsfactor(en) het rendement beïnvloed(t)(en) kan nader onderzoek worden uitgevoerd.

5. Conclusies

- Door gebruik te maken van een protocol waarin alle handelingen die bij een rendementsbepaling uitgevoerd dienen te worden vastgelegd zijn, werd beoogd het rendement van de detectiemethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* in water te verhogen en de variatie te verkleinen. De in deze studie onder gecontroleerde condities uitgevoerde rendementsbepalingen hadden echter slechts geringe verbeteringen tot gevolg. Mogelijkheden om verdere verbetering van het rendement van de huidige detectiemethode te bewerkstelligen lijken op dit moment niet voorhanden, maar de ontwikkelingen zullen op de voet gevolgd worden.
- De in deze studie gevolgde procedure voor het vaststellen van het rendement van de detectiemethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* in water voldoet in zijn huidige vorm voor bepaling van het rendement van *Giardia*. Voor bepaling van het rendement van *Cryptosporidium* dient de procedure aangepast te worden.
- Het Betabinomiale ($\alpha\beta$) model beschrijft de variatie in het rendement van de detectiemethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* in water significant beter dan het constante fractie (f) model.
- De door RIVM en Kiwa uitgevoerde spike experimenten hebben geresulteerd in een gezamenlijk gemiddeld rendement (R_I) voor *Giardia* van 9,5 % (95 % -interval voor variatie: 1,8 – 22 %). De rendementen R_I zijn bepaald ten opzichte van de concentratie cysten in de spike-suspensie.
- Op basis van de uitgevoerde rendementsbepalingen kunnen geen conclusies getrokken worden over de grootte van een gezamenlijk gemiddeld rendement voor *Cryptosporidium*. Er blijken zowel tussen de uitvoerende laboratoria als tussen de gebruikte methoden om het rendement vast te stellen significante verschillen te bestaan. Uit deze dataset is voor beide laboratoria afzonderlijk wel een rendementswaarde R_I voor *Cryptosporidium* af te leiden. Deze bedraagt 27 % (95 % -interval voor variatie: 5,2 - 57 %) voor RIVM en 34 % (95 % - interval voor variatie: 0,7 – 88 %) voor Kiwa.

6. Aanbevelingen

- Het rendement van de detectiemethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* in water is veel lager dan 100% en bovendien variabel. De waargenomen concentraties (oö)cysten in monsters water dienen gecorrigeerd te worden voor het rendement van de detectiemethode om het infectierisico ten gevolge van drinkwaterconsumptie zo nauwkeurig mogelijk te berekenen.
- Gezien de grote variatie in het rendement en het ontbreken van onderzoeksresultaten die aantonen welke locatiespecifieke factoren het rendement beïnvloeden, geniet het de voorkeur om voor elk individueel monster een rendement te bepalen teneinde een locatiespecifieke dataset met rendementsgegevens op te bouwen.
- Wanneer na toetsing blijkt dat er geen significante verschillen tussen datasets (en dus watertypen) bestaan kunnen datasets worden samengevoegd, waarna een bijgesteld gemiddeld rendement met variatie, toepasbaar voor de onderzochte locaties, berekend kan worden.
- Wanneer rendementsgegevens van een locatie significant afwijken van die van (een) andere locatie(s) kan een locatiespecifiek gemiddeld rendement worden berekend en gehanteerd. Echter wanneer de rendementsgegevens van deze locatie onderling verschillen, dient per individueel monster het rendement te worden bepaald. Om vast te stellen welke waterkwaliteitsfactor(en) het rendement beïnvloed(t)(en) kan nader onderzoek worden uitgevoerd.
- Het gebruik van commerciële preparaten zoals ColorSeed, die (oö)cysten bevatten die met behulp van fluorescentie microscopie te onderscheiden zijn van natuurlijke in water voorkomende (oö)cysten, maakt het mogelijk om voor elk individueel monster een rendement te bepalen zonder dat daarvoor de analyse van een tweede gespiket monster nodig is. Voorlopige resultaten (niet in dit rapport opgenomen) met deze preparaten tonen echter dat onderscheid tussen natuurlijke en ColorSeed oöcysten in bijvoorbeeld oppervlaktewater monsters moeilijk is, in het bijzonder wanneer kleuring met propidium jodide wordt toegepast. Het gebruik van dit type preparaten is nog onvoldoende geëvalueerd en vraagt aanvullend onderzoek.
- Het door RIVM en Kiwa opgestelde en geëvalueerde protocol voor bepaling van het rendement van de detectiemethode voor *Cryptosporidium* en *Giardia* in water is goed bruikbaar, maar heeft enige aanpassing. Het gebruik van glazen monster containers en goed gekarakteriseerde spike-suspensies, het in acht nemen van een maximaal tijdsinterval tussen spiken en filtratie, evenals een gestandaardiseerde homogenisatie- procedure zullen in het

protocol moeten worden opgenomen. De aanpassingen zullen gevolgd moeten worden door een nieuwe evaluatie.

- Gebruik van een aangepast protocol wordt voor alle laboratoria die rendementsmetingen voor *Cryptosporidium* en *Giardia* uitvoeren aanbevolen teneinde de bepaling van het rendement van de detectiemethode voor deze protozoa te standaardiseren en resultaten onderling vergelijkbaar te maken.

Dankwoord

De auteurs danken Meindert de Graaf (Kiwa) voor het nemen van de monsters water, George Engels (RIVM-MGB), Marcel During (RIVM-MGB) en Carola Blokker (Kiwa) voor het uitvoeren van de spike experimenten en het analyseren van de monsters, Harm Veenendaal (Kiwa) voor zijn bijdrage aan het tot stand komen van het protocol, Peter Teunis (RIVM-IMA) voor zijn adviezen bij het analyseren van de data en Ana Maria de Roda Husman (RIVM-MGB) voor het becommentariëren van het concept en inhoudelijke suggesties.

Literatuur

Anonymous

Bacteriologisch onderzoek van water – Monsterneming en conservering (NEN 6559)
Nederlands Normalisatie Instituut, Delft, 1992

Anonymous

Besluit tot wijziging van het Waterleidingbesluit
Staatsblad van het Koninkrijk der Nederlanden 31, 2001

Anonymous

Water quality – Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts
from water (ISO/CD 15553)
International Organisation for Standardisation, Geneve, 2002

Bennet JW, Gauci MR, Le Moënic S, Schaefer III FW, Lindquist HDA

A comparison of enumeration techniques for *Cryptosporidium parvum* oocysts
J Parasitol 1999; 85 (6): 1165-1168

Cox DC, Hinkley DV

Theoretical statistics, p.313
Chapman and Hall, London, 1974

Fayer R (ed.)

Cryptosporidium and *Cryptosporidiosis*
CRC Press, Boca Raton, Florida, 1997

Fricker CR

Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water
In: Protozoan parasites and water, p.91-96
Ed. Betts WB, Casemore D, Fricker C, Smith H, Watkins J
The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 1995

Hogg CV, Craig AT

Introduction to mathematical statistics
Englewood Cliffs, N. J., Prentice Hall, 1995

Ketelaars HAM, Medema G, van Breemen LWCA, van der Kooij D, Nobel PJ, Nuhn P

Occurrence of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts in the river Meuse and removal in
the Biesbosch reservoirs
J Water SRT – Aqua 1995; 44 (suppl 1): 108-111

- LeChevallier MW, Di Giovanni GD, Clancy JL, Bukhari Z, Bukhari S, Rosen JS, Sobrinho J, Frey MM
Comparison of method 1623 and cell culture-PCR for detection of *Cryptosporidium* spp. in source waters
Appl Environ Microbiol 2003; 69 (2): 971-979
- Medema GJ, Ketelaars HAM, Hoogenboezem W
Cryptosporidium en *Giardia*: voorkomen in rioolwater, mest en oppervlaktewater met zwem- en drinkwaterfunctie (ISBN 90 36953324)
RIWA, Amsterdam, 2001
- Medema GJ, Heijnen L, Schets FM, Wullings B, Hoogenboezem W, Ketelaars HAM
Viable and pathogenic *Cryptosporidium* and *Giardia* in source water – Application of vital dye staining, cell culture and (RT)-PCR with sequence analysis (ISBN 90 6683 099 9)
RIWA, Nieuwegein, 2002
- Medema GJ, Heijnen L, de Savornin Lohman A, van der List C, Ketelaars H
Levensvatbaarheid en genotypering van *Cryptosporidium* en *Giardia* in het afgeleverde water van WBB in 2000
Kiwa rapport KWR03.033, 2003
- Padayachee M, De Wet AG, Grundlingh M, De Wet CME, Pienaar I
Production of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts seed samples by use of flow cytometry
Poster presentation at Health Related Water Microbiology Symposium, IWA Melbourne, 2002
- Pezzana A, Vilaginès Ph, Bordet F, Coquard D, Sarrette B, Vilaginès R
Optimization of the Envirochek capsule method and immunomagnetic separation procedure for the detection of low levels of *Cryptosporidium* in large drinking water samples
Wat Sci Tech 2000; 41 (7): 111-117
- Reynolds DT, Slade RB, Sykes NJ, Jonas A, Fricker CR
Detection of *Cryptosporidium* oocysts in water: techniques for generating precise recovery data
J Appl Microbiol 1999; 87: 804-813
- Schaefer III FW
Can we believe our results?
In: *Cryptosporidium*, the analytical challenge, p. 155-161
Ed. Smith H, Thompson KC, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001

- Stanfield G, Carrington E, Albinet F, Compagnon B, Dumoutier N, Hambsch B, Lorthioy A, Medema G, Pezoldt H, de Roubin MR, de Lohman A, Whitmore T
An optimised and standardised test to determine the presence of the protozoa *Cryptosporidium* and *Giardia* in water
Wat Sci Tech 2000; 41 (7): 103-110
- Teunis PFM, van der Heijden OG, van der Giessen JWB, Havelaar AH
The dose-response relation in human volunteers for gastro-intestinal pathogens
RIVM report 284550002, Bilthoven, 1996
- Teunis PFM, Medema GJ, Kruidenier L, Havelaar AH
Assessment of the risk of infection by *Cryptosporidium* or *Giardia* in drinking water from a surface water source
Wat Res 1997; 31 (6): 1333-1346
- Teunis PFM, Evers EG, Slob W
Analysis of variable fractions resulting from microbial counts
Quant Microbiol 1999; 1: 63-88
- Walker AP
Some observations on factors which affect recovery efficiency in *Cryptosporidium* analysis
In: *Cryptosporidium*, the analytical challenge, p. 101-109
Ed. Smith H, Thompson KC, The Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2001
- Wolfram Research
Mathematica 5.0.0.0, 2003

Bijlage 1 Voorschrift voor het tellen van *Giardia* cysten of *Cryptosporidium* oöcysten met behulp van membraanfiltratie en immunofluorescentie; SOP MGB/M193, revisie 2, 04-03-2003

INLEIDING

1.1 Doel

Het kwantificeren van het aantal oöcysten van *Cryptosporidium* en/of cysten van *Giardia* in gezuiverde waterconcentraten, fecessuspensies of andere vloeibare suspensies.

1.2 Principe van de bepaling

Een suspensie met (oö)cysten (diameter 3-18 µm) wordt gefiltreerd door een membraanfilter met een poriegrootte van 1,2 µm of kleiner. De (oö)cysten blijven op het filteroppervlak achter. Het filter wordt overdekt met monoklonale antilichamen, specifiek voor epitopen op de wand van de cyste of oöcyste, met daaraan gekoppeld een fluorochroom (bijv. FITC). Het totale filteroppervlak wordt met behulp van epifluorescentie microscopie onderzocht op de aanwezigheid van (oö)cysten, die herkenbaar zijn aan hun grootte, morfologie en specifieke fluorescentie.

1.3 Doelgroep

Laboratoriummedewerkers MGB

1.4 Veiligheid

Volg de aanwijzingen op de verpakking van de geconjugeerde antilichamen. Als tegenkleuring kan Evans blue aanwezig zijn: deze stof is carcinogeen. Als fixatief kan natriumazide aanwezig zijn: deze stof is toxisch.

Propodium jodide is zeer carcinogeen.

1.5 Definities

SVM nr.: nummer waaronder de aangegeven oplossing bij SVM kan worden besteld.

2. REAGENTIA, MEDIA EN HULPSTOFFEN

- PBS (SVM nr: Z3000)
- HBSS (Gibco 24020-091)
- monoklonaal -FITC conjugaat: Cellabs Cryptosporidium/Giardia staining reagent
- mounting fluid: Dabco/glycerol: 2 g Dabco oplossen in 40 ml PBS, 60 ml glycerol toevoegen. **Stel de pH op 7,0-7,2 met 1 M NaOH of 1 M HCl !!!** Oplossing in donker bij kamertemperatuur max. 6 maanden bewaren.
- *propidium jodide (PI): 1 mg oplossen in 1 ml PBS. Oplossing in koelkast max. 2 jaar bewaren.*
- kleurloze nagellak, niet-fluorescerend
- immersie olie
- aluminium-folie

3. BIOLOGISCH MATERIAAL

Suspensie van ca. 1000- ca. 10.000 oöcysten van *Cryptosporidium* per ml HBSS

Suspensie van ca. 1000- ca. 10.000 cysten van *Giardia* per ml HBSS

Gebruik als stock suspensie commercieel verkrijgbare (oö)cysten suspensies of (oö)cysten suspensies van bekende origine.

4. APPARATUUR EN GLASWERK

- polycarbonaat membraanfilters, *poriegrootte* 1,2 µm, wit *diameter* 25 of 13 mm (Poretics, Millipore of vergelijkbaar)
- cellulose nitraat steunfilters, *poriegrootte* 5 µm (Sartorius, Millipore of vergelijkbaar), *diameter* 25 mm
- *Hoefer filtereeropstelling met RVS filterhouders voor 25 mm diameter membraanfilters aangesloten op Drägerunit met manometer*
- *SortStage filtereeropstelling voor 13 mm diameter membraanfilters aangesloten op Drägerunit met manometer*
- fluorescentie-microscoop
- handtelltje
- pincet met platte uiteinden (steriel)
- objectglaasjes
- dekglasjes 24 x 50 mm, 20 x 20 mm

5. WERKWIJZE

5.1 Filtreren en kleuren

1. *Sluit de Hoefer filterunit of de SortStage filterunit aan op de Drägerunit.*
2. Regel de druk met de bleederknop van de Drägerunit op -0,2 bar.
3. Leg met een filterpincet voorzichtig een steunfilter midden op het gridje (geen vouwen of luchtbellens) van de *Hoefer filterunit*. Maak het filter nat door er wat *PBS* op te druppelen, zuig het overschot af met het vacuüm. Maak het filter evt. van tevoren nat in een petrischaal met *PBS* om het makkelijker neer te kunnen leggen.
4. Leg het polycarbonaat filter met een filterpincet voorzichtig precies op het steunfilter (geen vouwen of luchtbellens). Zorg dat beiden netjes in het midden liggen. Controleer of het polycarbonaat filter de vloeistof uit het steunfilter egaal opneemt.
5. *Leg met een filterpincet voorzichtig een polycarbonaat filter op het gridje van de SortStage en maak dit nat zoals onder 3 beschreven.*
6. Meng het waterconcentraat (zwenken met de hand of kort (!) vortexen) en breng met een pipet het te onderzoeken volume op het filter, open het kraantje totdat de vloeistof van het filter weggezogen is, sluit dan het kraantje.
7. Spoel na met ca 1 ml *PBS*.
8. Breng 250 µl monoklonaal – FITC conjugaat op een filter met een diameter van 25 mm en 75 µl op een filter met een diameter van 13 mm. Gebruik een verdunning van het conjugaat volgens opgave van de fabrikant of zoals bepaald in een titratie in *PBS*.
10. *Dek de filterunit af met aluminiumfolie.*
11. Zet de filterunit gedurende 30-45 min bij 37 °C in het donker.
12. Zuig het monoklonaal - FITC conjugaat door.
13. Spoel na met 1 ml *PBS*.
14. *Breng evt. 10 µl propidium jodide oplossing op het membraanfilter, incubeer gedurende 2 min. in het donker bij kamertemperatuur.*
15. *Zuig de propidium jodide oplossing door en spoel na met 1 ml PBS.*

5.2 Mounting van het filter

1. Label het objectglas (datum, parasiet, monstercode, filternummer).
2. Breng een druppeltje Dabco/glycerol op het objectglas
3. Haal met een filterpincet het polycarbonaat filter voorzichtig van het steunfilter (*Hoefer*) of het gridje (*SortStage*) en leg het op de druppel Dabco/glycerol, met de kant waarop het monster is aangebracht boven.

4. Als het filter vlak ligt, breng dan *ca. 25 µl Dabco/glycerol midden op een 25 mm diameter filter of ca. 10 µl Dabco/glycerol op een 13 mm diameter filter*, leg er een dekglasmaasje op en druk dit RUSTIG EN VOORZICHTIG aan met een pen o.i.d.
5. Verwijder overtollige Dabco/glycerol met een tissue.
6. Lak de randen van het dekglas met nagellak af.
8. Leg het preparaat zo snel mogelijk in een preparaatmap.
9. Het preparaat is *minimaal* 1 maand in het donker (preparaatmap) in de koelkast te bewaren.

5.3 Tellen van het filter

1. Tel de (oö)cysten met behulp van een fluorescentiemicroscoop. Zorg dat de FITC filtercombinatie voorstaat (09) en de lichtweg vrij is (DIC filter eruit)
2. Doorzoek het hele membraan bij 250x vergroting (olie); begin bij één van de randen en verschuif het preparaat systematisch zodat het hele membraan wordt bekeken.
 - *Cryptosporidium* oöcysten moeten aan de volgende criteria voldoen:
ronde tot ovaalronde objecten van 3-7 µm in doorsnede met een appelgroen fluorescerende rand. Deze fluorescerende rand kan oppervlaktevouwten vertonen. Als bij 250x een object wordt gezien dat hieraan voldoet, schakel dan over naar 1000x, beoordeel het object nogmaals en meet *eventueel* lengte en breedte met een objectmicrometer. Beoordeel eventueel onder UV en groene fluorescentie (resp. filterset 02 en 15) of geen autofluorescentie optreedt. Noteer op het formulier (bijlage 1) vorm, afmetingen, autofluorescentie en eventuele bijzonderheden. Objecten van de goede vorm, afmetingen en fluorescentie zijn verdachte *Cryptosporidium* oöcysten.
 - *Giardia* cysten moeten aan de volgende criteria voldoen:
ronde tot ovaalronde objecten van 8-18 µm lang en 5-15 µm breed met een appelgroen fluorescerende rand. Als bij 250x een object wordt gezien dat hieraan voldoet, schakel dan over naar 1000x, beoordeel het object nogmaals en meet *eventueel* lengte en breedte met een objectmicrometer. Beoordeel onder UV en groene fluorescentie (resp. filterset 02 en 15) of autofluorescentie optreedt. Noteer op het formulier (bijlage 1) vorm en afmetingen, autofluorescentie en eventuele bijzonderheden. Objecten van de goede vorm, afmetingen en fluorescentie zijn verdachte *Giardia* cysten.

5.4 Schoonmaken filterunit

1. Spoel de gridjes van de SortStage na met een ruime hoeveelheid PBS door deze door de gridjes te zuigen. Zet de SortStage weg met alcohol op de gridjes.
2. Haal de RVS filterhouders van de Hoefer filterunit en maak ze goed schoon met heet water en reageerbuisborstel.
3. Reinig de gridjes zoals onder 1 aangegeven.

6. KWALITEITSCONTROLE

De frequentie waarin deze controles moeten worden uitgevoerd is afhankelijk van het lopende onderzoek en moet worden vastgelegd in de lopende proefopzetten. Adviesfrequentie: blanco eens per 50 filters; positieve controle: bij elke nieuwe batch MAb-konjugaat/eens per 50 filters/na 10 opeenvolgende negatieve filters.

6.1 Procedure blanco

Filtreer in plaats van een monster 1 ml PBS. De verdere procedure is identiek aan die voor een monster. Doorzoek het hele membraan op de aanwezigheid van (oö)cysten. De achtergrond moet donker zijn en er mogen geen (oö)cysten te zien zijn. Ook andere verontreinigingen mogen slechts in zeer beperkte mate aanwezig zijn. Als dit niet het geval is, maak de apparatuur dan schoon, controleer de reagentia individueel en herhaal de blanco. Neem contact op met de projectleider

6.2 Positieve controle

Filtreer 1 ml van de oöcysten suspensie en/of 1 ml van de cysten suspensie in plaats van een monster. De verdere procedure is identiek aan die voor een monster. Doorzoek de positieve controle bij 250x vergroting (olie). De achtergrondfluorescentie moet laag zijn en er moeten helder appelgroen fluorescerende cysten of oöcysten aanwezig zijn. Zo niet, dan heeft de kleuring niet gewerkt of *is er iets niet in orde met de (oö)cysten suspensie*. Er moet worden uitgezocht wat er mis is. Neem contact op met de projectleider

6.3 Negatieve controle

Niet van toepassing

7. SAMENHANGENDE DOCUMENTEN

SOP MGB/M003 Voorschrift voor concentratie van monsters water m.b.v. Envirochek filters t.b.v. detectie van Cryptosporidium oöcysten en Giardia cysten

8. REFERENTIES

- Method 1623: Cryptosporidium and Giardia in water by filtration/IMS/FA, EPA-821-R-99-006, US EPA, Washington, 1999
- Water quality – Isolation and identification of Cryptosporidium oocysts and Giardia cysts from water, ISO/CD 15553, versie 2002-07-22

Bijlage 2 Voorschrift voor concentratie van water m.b.v. Envirochek filters t.b.v. detectie van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten; SOP MGB/M003, revisie 0, 2003

INLEIDING

1.1 Doel

Het concentreren van monsters water voor de detectie van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten.

1.2 Principe

Filtratie van een groot volume water door een filter met een poriëgrootte kleiner dan de diameter van de (oö)cysten, zodat deze op het filter achterblijven. Elutie van de geconcentreerde deeltjes van het filter gevolgd door verdere concentratie d.m.v. centrifugeren, waarna een waterconcentraat wordt verkregen t.b.v. detectie van *Cryptosporidium* en *Giardia*.

1.3 Doelgroep

Laboratoriummedewerkers MGB.

1.4 Veiligheid

Veiligheidsregels MGB.

1.5 Definities

n.v.t.

2. REAGENTIA, MEDIA EN HULPMIDDELEN

Elutie buffer:

- 1 g Laureth-12
- 10 ml 1 M Tris, pH 7,4 (121,1 g tris oplossen in 700 ml aqua dest, pH stellen op 7,4 met 1 N HCl of NaOH; filter steriliseren door 0,2 µm filter)
- 2 ml 0,5 M EDTA-2 Na (186,1 g EDTA disodiumsalt dihydraat oplossen in 800 ml aqua dest, pH stellen op 8,0 met 1 N HCl of NaOH)
- 150 µl antifoam A
- 1 L aqua dest

- bereiden:
1. 1 g Laureth-12 afwegen in bekeerglas
 2. 100 ml aqua dest toevoegen
 3. verwarmen om Laureth-12 te smelten
 4. overbrengen naar 1000 ml maatcilinder
 5. bekeerglas aantal keren naspoelen met aqua dest
 6. 10 ml Tris oplossing toevoegen
 7. 2 ml EDTA oplossing toevoegen
 8. 150 µl antifoam toevoegen
 9. volume tot 1000 ml aanvullen met aqua dest (**let op: eindvolume is 1000 ml**)

3. BIOLOGISCH MATERIAAL

Een spike-suspensie met een bekende concentratie *Cryptosporidium* oöcysten en/of *Giardia* cysten in HBSS.

4. APPARATUUR EN GLASWERK

- Envirochek of Envirochek HV filter, 1 filter per monster
- Slang 12.7 mm diameter
- Klemmen
- Watermeter
- Flow regelaar 2 L/min
- Pomp
- Schudmachine voor Envirochek capsules
- Koelelementen of ijs
- 250 ml konische centrifuge buizen
- 50 ml polypropyleen buizen

Note 1

Er zijn Envirochek en Envirochek HV capsules verkrijgbaar. De te volgen procedure is voor beide filters identiek. Het Envirochek HV filter bevat een ander type membraan dan het 'gewone' Envirochek filter, waardoor het zeer geschikt is voor filtratie van grote volumes gezuiverd water. In proefopzetten wordt aangegeven welke filters worden gebruikt.

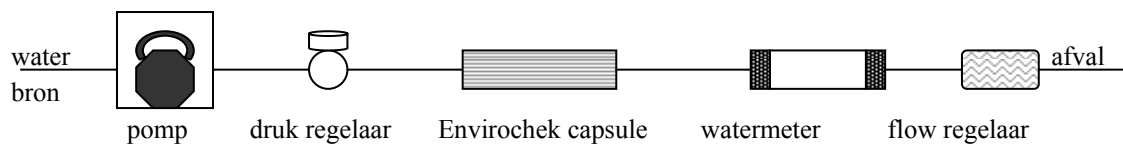
Note 2

Er kan gekozen worden voor een andere slangdiameter zolang deze geschikt is voor de te gebruiken pomp; de diameter van de slang bepaalt de pompsnelheid, houd hier rekening mee en stel zonodig de pompsnelheid bij met de regelknop op de pomp, raadpleeg de gebruiksaanwijzing van de pomp.

5. PROCEDURE

Monstername

1. Gekleurde dopjes van Envirochek capsule verwijderen en bewaren
2. Installatie volgens figuur



3. Vóór aansluiten bemonsteringssysteem water 2-3 min laten doorstromen
4. Bemonsteringssysteem aansluiten zonder Envirochek capsule
5. Pomp aanzetten en flow rate instellen op 2 L/min
6. Systeem spoelen met ca. 75 L water
7. Envirochek capsule tussen koppelen (let op stroomrichting), slang op in- en uitstroomopening vastmaken met klemmen
8. Filterhuis beschrijven met monsterlokatie, naam uitvoerder, datum, troebelheid van het monster, beginstand van de watermeter
9. Start de monstername
10. Laat de lucht uit de capsule ontsnappen door het 'ventilatieknopje' (wit) tegen de klok in een beetje los te draaien, draai weer dicht als het filterhuis gevuld is met water
11. Stop de waterstroom als het monster genomen is, laat de druk langzaam afnemen
12. Noteer de tijd en de eindstand van de watermeter
13. Maak de instroomopening van de Envirochek capsule los, let er hierbij op geen water te morsen, dit water hoort ook bij het monster

14. Sluit de instroomopening af met de gekleurde dop
15. Maak de uitstroomopening van de Envirochek capsule los en laat zoveel mogelijk water weglopen
16. Sluit de uitstroomopening af met de gekleurde dop
17. Bewaar de Envirochek capsule bij 0-8 °C (binnen 48 h na monsternamen moet worden begonnen met opwerken)

Elutie

1. Zet de schudmachine zo neer dat de Envirochek capsules horizontaal in de klemmen geplaatst kunnen worden
2. Bereid voldoende elutie buffer (ca. 250 ml per monster) en voor elk monster een genummerde 250 ml konische centrifugebuis
3. Indien de 'bovenkamer' van de Envirochek capsule water bevat, decanteer dit dan voorzichtig in een genummerde centrifugebuis
4. Houd de capsule rechtop met de instroomopening boven, verwijder het gekleurde dopje
5. Giet elutie buffer (ca. 130 ml) in de instroomopening en laat het niveau stabiliseren; er dient zoveel buffer gebruikt te worden, dat het niveau ca. 1 cm boven de bovenkant van het witte gevouwen filter komt; sluit de instroomopening met het gekleurde dopje
6. Zet de capsule in één van de klemmen van de schudmachine, met het ventilatiedopje naar voren op '12 uur'; schud gedurende 5 min, snelheid 600 rpm
7. Haal de capsule uit de schudmachine, verwijder voorzichtig het gekleurde dopje van de instroomopening en decanteer de inhoud van de capsule in een genummerde 250 ml centrifugebuis
8. Giet opnieuw elutie buffer in de instroomopening en laat het niveau stabiliseren; er dient zoveel buffer gebruikt te worden, dat het niveau ca. 1 cm boven de bovenkant van het witte gevouwen filter komt; sluit de instroomopening met het gekleurde dopje
9. Zet de capsule in een van de klemmen van de schudmachine, met het ventilatiedopje naar voren op '3 of 9 uur', schud gedurende 5 min, snelheid 600 rpm
10. Haal de capsule uit de schudmachine, verwijder voorzichtig het gekleurde dopje van de instroomopening en decanteer de inhoud van de capsule in de onder 7 gebruikte 250 ml centrifugebuis

Concentratie

1. Centrifugeer het monster bij 1000-1100 x g gedurende 10-15 min, gebruik geen rem (**let op: gebruik geen rem !!**)
2. Noteer het pelletvolume, gebruik een pasteur pipet om het supernatant tot net boven het pellet te verwijderen
3. Indien het pelletvolume 0,5 ml of minder is, voeg dan water toe tot een volume van 10 ml, resuspendeer de pellet
4. Indien het pelletvolume 0,5 ml of meer is, bereken dan de benodigde hoeveelheid water als volgt:

$$\text{totaal benodigd volume} = \frac{\text{pellet volume} \times 10 \text{ ml}}{0,5 \text{ ml}}$$

Note

Stappen 3 en 4 zijn nodig indien met IMS verder gewerkt wordt.

6 . BEREKENING

n.v.t.

7 . KWALITEITSKONTROLE

7.1 Positieve controle

Maak een spike-suspensie van *Cryptosporidium* oöcysten en/of *Giardia* cysten met een bekende dichtheid (d.w.z. tellen volgens SOP MGB/M193). Breng m.b.v. een injectiespuit een bekende hoeveelheid van deze suspensie in de slang die vanaf het monsterpunt naar het filterhuis loopt. Spuit de suspensie rustig in de slang, op een punt vlak voordat de slang het filterhuis in gaat.

Of voeg een bekende hoeveelheid van deze spike-suspensie toe aan een vat met monster en homogeniseer door zwenken.

Filtreer van dit gespikete monster eenzelfde volume als van het bijbehorende ongespikete monster. Filtreer bij spiken in een vat de totale inhoud van het vat. Behandel het gespikete monster verder zoals de overige monsters. In proefopzetten wordt de frekwentie en methode van spiken vermeld en wordt tevens opgenomen met welke concentratie (oo)cysten wordt gespiket.

7.2 Negatieve controle

n.v.t.

7.3 Procedure blanco

Filtreer een volume kraanwater gelijk aan het volume van een natuurlijk monster en behandel dit monster verder zoals de overige monsters. In proefopzetten wordt de frekwentie van deze monsternamen vastgelegd.

8 . SAMENHANGENDE DOCUMENTEN

SOP MGB/M193 Voorschrift voor het tellen van *Giardia* cysten of *Cryptosporidium* oocysten met behulp van membraanfiltratie en immunofluorescentie

SOP MGB/004 Voorschrift voor zuivering van waterconcentraten m.b.v. immunomagnetische separatie t.b.v. detectie van *Cryptosporidium* en *Giardia*.

9. REFERENTIES

Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA, EPA-821-R-99-006, US EPA, Washington, 1999

Water quality - Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water, ISO/CD 15553, versie 2002-07-22

Bijlage 3 Voorschrift voor zuivering van waterconcentraten m.b.v. immunomagnetische separatie t.b.v. detectie van *Cryptosporidium* en *Giardia*; SOP MGB/M004, revisie 0, 2003

INLEIDING

1.1 Doel

Het isoleren van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten uit geconcentreerde monsters water ten behoeve van microscopische detectie.

1.2 Principe

Cryptosporidium oöcysten en *Giardia* cysten worden gemengd met magnetische bolletjes die gelabeld zijn met antilichamen die tegen de celwand van de (oö)cysten gericht zijn. Er ontstaan complexen van magnetische bolletjes en (oö)cysten die met behulp van een magneet gescheiden kunnen worden van de rest van de in het concentraat aanwezige deeltjes. De (oö)cysten en de magnetische bolletjes worden weer van elkaar gescheiden door toevoeging van zuur, de (oö)cysten worden zo in gezuiverde vorm verkregen.

1.3 Doelgroep

Laboratoriummedewerkers MGB.

1.4 Veiligheid

Veiligheidsregels MGB.

1.5 Definities

n.v.t.

2. REAGENTIA, MEDIA EN HULPMIDDELEN

-DynaL GC combo kit

-SL-buffer A (10x)

-SL-buffer B (10x)

-Dynabeads anti-*Cryptosporidium*

-Dynabeads anti-*Giardia*

-monocloonaal – FITC conjugaat: Cellabs *Cryptosporidium*/*Giardia* staining reagent

-mounting fluid: Dabco/glycerol: 2 g Dabco oplossen in 40 ml PBS, 60 ml glycerol toevoegen. Stel de pH op 7,0-7,2 met 1 M NaOH of 1 M NaCl. Oplossing in het donker bij kamertemperatuur max. 6 maanden bewaren.

-PBS (SVMnr. Z.3000)

-propidium jodide (PI): 1 mg oplossen in 1 ml PBS. Oplossing in koelkast max. 2 jaar bewaren.

-di-amino-phenylindol (DAPI): 2 mg oplossen in 1 ml methanol. Oplossing in koelkast max. 1 jaar bewaren.

-kleurloze nagellak, niet-fluorescerend

-immersie olie

-methanol (p.a.)

-aqua dest

-SL-buffer A (1x)

Bereiden van reagentia:

1. Voor elk monster, sub-monster of controle zijn de volgende hoeveelheden buffers nodig: 1 ml van 1x SL-buffer A; 1 ml van 10x SL-buffer A; 1 ml van 10x SL-buffer B.
2. Maak een 1x verdunning van SL-buffer A uit de 10x SL-buffer A. Gebruik (oö)cysten-vrij gedemineraliseerd water als verdunningsvloeistof. Neem 100 µl 10xSL-buffer A voor elke 1 ml 1x SL-buffer A die nodig is en verdun tot 1 ml.

3. Bewaar de 1x verdunning van SL-buffer A in een gelabeld buisje, om later in de procedure te gebruiken.

Note

In de 10x SL-buffer A kan na langere opslag bij 0-4 °C neerslag ontstaan. Deze lost op als de buffer op kamertemperatuur is.

3. BIOLOGISCH MATERIAAL

Een spike-suspensie met een bekende concentratie *Cryptosporidium* oöcysten en/of *Giardia* cysten in HBSS.

4. APPARATUUR EN GLASWERK

- Dynal L10 tube
- eppendorf reactievaatjes
- Dynal MPC-M magneet
- Dynal MPC-1 magneet
- Dynal SpotOn slides
- dekglasjes
- Dynal roterende mixer

5. PROCEDURE

Isolatie

1. Breng 1 ml 10x SL-buffer A in een Dynal L10 tube (60 x 10 mm vlak stuk).
2. Breng in dezelfde buis 1 ml 10x SL-buffer B.
3. Bepaal het volume van het waterconcentraat. Per isolatie (1 buis met 1 ml SL-A en 1 ml SL-B) kan slechts 0,5 ml pellet van het waterconcentraat gezuiverd worden. Is het pelletvolume meer dan 0,5 ml dan moeten meerdere buizen per monster gebruikt worden.
4. Breng het monster kwantitatief over in de buis met de SL-buffers en label deze. Spoel de centrifugebuis waarin het monster zat na met (10 ml min het volume van het waterconcentraat) gedemineraliseerd water en breng deze spoelvloeistof ook over in de buis met de SL-buffers.
5. Schud (vortex) het buisje met Dynabeads anti-Cryptosporidium gedurende 10 sec. Controleer of de beads volledig geresuspendeerd zijn door het buisje om te keren en te kijken of er geen rest pellet op de bodem zit.
6. Voeg 100 µl Dynabeads anti-Cryptosporidium aan de buis met het monster en de SL-buffers toe.
7. Schud (vortex) het buisje met de Dynabeads anti-Giardia gedurende 10 sec. Controleer of de beads volledig geresuspendeerd zijn door het buisje om te keren en te kijken of er geen rest pellet op de bodem zit.
8. Voeg 100 µl Dynabeads anti-Giardia aan de buis met het monster, de anti-Cryptosporidium beads en de SL-buffers toe.
9. Maak de Dynal L10 tube vast aan de Dynal mixer en laat gedurende 1 uur bij kamertemperatuur met een snelheid van 25 rpm roteren.
10. Verwijder de buis na minstens 1 uur roteren uit de mixer en plaats hem in de magneet (MPC-1) met de platte kant van de buis naar de magneet.
11. Plaats de magnetische kant van de MPC-1 naar beneden zonder de buis te verwijderen (de buis ligt nu horizontaal, boven de magneet).
12. Zwenk de buis rustig heen en weer in een hoek van ca. 90°, afwisselend de bodem en de dop omhoog brengend. Ga hier gedurende 2 min. mee door met een frequentie van ca. 1 zwenk per seconde.
13. Ga door met de zwenkende beweging om hechting van licht magnetisch of magnetiseerbaar materiaal te voorkomen. Als het monster in magneet MPC-1 langer dan 10 sec. stilstaat, herhaal dan stap 12 voordat verder gegaan wordt met de procedure.
14. Zet de MPC-1 rechtop, met de buis vertikaal, dop boven. Verwijder onmiddellijk de dop en decanteer het gehele supernatant. Schud de buis niet en verwijder hem niet uit de MPC-1 gedurende deze stap.

15. Verwijder de buis uit de MPC-1 en resuspendeer het monster in 1 ml 1x SL-buffer A. Meng zeer voorzichtig om al het materiaal te resuspenderen. **Vortex niet !**
16. Breng alle vloeistof uit de Dynal L10 buis kwantitatief over in een gelabeld 1,5 ml eppendorf vaatje. Controleer of alle vloeistof en Dynabeads zijn overgebracht. Spoel de buis na met 200 µl 1x SL-A buffer.
17. Zet het eppendorf vaatje in de Dynal MPC-M magneet.
18. Zwenk de MPC-M met vaatje(s) rustig onder een hoek van 180°. Ga gedurende 1 min. door met een frequentie van ca. 1 zwenk per seconde. Aan het eind van deze stap moet het Dynabeads-(oö)cysten complex een duidelijk zichtbare bruine vlek op de achterkant van het vaatje vormen.
19. Zuig onmiddellijk het supernatant af, laat het vaatje in de MPC-M zitten. Als meer dan één monster tegelijkertijd wordt opgewerkt, zwenk dan 3 keer voor het verwijderen van het supernatant van het volgende vaatje. Let erop dat het materiaal wat aan de wand van het vaatje bij de magneet zit niet verstoord wordt. Vaatje niet schudden.
20. Als het supernatant troebel is kan nogmaals met 1 ml 1x SL-A buffer gewassen worden.

Dissociatie van het Dynabeads-(oö)cysten complex

1. Verwijder de magnetische strip uit de Dynal MPC-M.
2. Voeg 50 µl 0,1N HCl toe aan het eppendorf vaatje en vortex krachtig gedurende 10 sec.
3. Zet het vaatje in de MPC-M zonder magnetische strip en laat gedurende minimaal 10 min. in verticale positie bij kamertemperatuur staan.
4. Vortex nog 10 sec. krachtig.
5. Controleer of al het materiaal zich in de punt van het vaatje bevindt en zet het in de MPC-M.
6. Schuif de magneetstrip in de MPC-M en laat het vaatje ongestoord gedurende ca. 10 sec. staan.
7. Maak een Dynal Spot-On slide klaar. Label de slide en breng 5 µl 1N NaOH in de well.
8. Breng alle vloeistof uit het microcentrifuge vaatje over in de well met 5 µl NaOH. Let erop dat de beads die tegen de achterwand van het vaatje zitten niet verstoord worden en dat alle vloeistof wordt overgebracht. Haal het vaatje tijdens deze handelingen niet uit de MPC-M magneet.

Kleuring

1. Laat het monster op de slide aan de lucht of onder een matig warme föhn drogen.
2. Voeg 1 druppel methanol aan elke well toe en laat deze bij kamertemperatuur verdampen tot de well droog is.
3. Breng op iedere well 50 µl van een werkverdunding van een FITC-geconjugeerd anti-*Cryptosporidium* en anti-*Giardia* monoclonaal antilichaam. Zorg ervoor dat de hele well bedekt is.
4. Leg de slide in een vochtige kamer of in een preparatenmap en incubeer gedurende 30 - 45 min. in een 37 °C stoof.
5. Voeg per well 5 µl PI en eventueel 50 µl DAPI oplossing (stock 2 mg/ml in methanol, 5000x verdunnen door 10 µl in 50 ml PBS te brengen) toe en incubeer gedurende 2 min. in het donker bij kamertemperatuur.
6. Spoel de overmaat monoclonaal en PI en evt. DAPI voorzichtig weg door enkele druppels PBS langs de slide te laten lopen.
7. Laat de slides in het donker onder een matig warme föhn drogen en breng 10 µl DABCO-glycerol mounting medium op elke well.
8. Breng een dekglasmaakje aan en lak de randen af met nagellak. Bewaar de slides in het donker.
9. Behandel en beoordeel de slides verder zoals beschreven in SOP MGB/M193. (Oö)cysten die rood kleuren met PI zijn dood.

6 . BEREKENING
n.v.t.

7 . KWALITEITSKONTROLE

De frequentie waarin de kwaliteitscontroles worden uitgevoerd wordt opgenomen in proefopzetten.

7.1 Positieve controle

Behandel een gespiket monster (zie SOP MGB/M003) zoals hierboven beschreven. In dit monster moeten bij microscopische beoordeling (oö)cysten aanwezig zijn.

7.2 Negatieve controle

n.v.t.

7.3 Procedure blanco

Behandel een volume kraanwater (zie SOP MGB/M003) zoals hierboven beschreven. In dit monster mogen bij microscopische beoordeling geen (oö)cysten aanwezig zijn.

8 . SAMENHANGENDE DOCUMENTEN

-SOP MGB/M193 Voorschrift voor het tellen van *Giardia* cysten of *Cryptosporidium* oöcysten met behulp van membraanfiltratie en immunofluorescentie

-SOP MGB/M003 Voorschrift voor concentratie van water m.b.v. Envirochek filters t.b.v. detectie van *Cryptosporidium* oöcysten en *Giardia* cysten.

9. REFERENTIES

-Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in water by filtration/IMS/FA, EPA-821-R-99-006, US EPA, Washington, 1999

-Water quality - Isolation and identification of *Cryptosporidium* oocysts and *Giardia* cysts from water, ISO/CD 15553, versie 2002-07-22

Bijlage 4 Bepaling van het aantal oöcysten van *Cryptosporidium* en cysten van *Giardia* in water; Kiwa huisvoorschrift LMB-031, versie 1, 22-01-2002

Onderwerp

Dit voorschrift beschrijft een methode, afgeleid van CEN CT 97-2146 en EPA Method 1623, voor het bepalen van het aantal oöcysten van *Cryptosporidium* en cysten van *Giardia* in water.

2 Toepasbaarheid

De methode is van toepassing op grondwater, oppervlaktewater, watertypes in verschillende stadia van behandeling, drinkwater, spoelwater e.d. mits de monsters genomen zijn volgens LMB-034. De bepalingsgrens wordt steeds berekend aan de hand van het in bewerking genomen volume.

3 Definities

- 3.1 (oö)cysten: geëncysteerde zygote, overlevingsstadium van *Cryptosporidium*/*Giardia* in het milieu.
- 3.2 *Cryptosporidium*: een parasitair eencellig organisme waarvan de oöcysten rond (soms ovaal) zijn en een grootte van 3 - 7 µm hebben. Er zijn meerdere soorten, waarvan *C. parvum* ziekteverwekkend is voor de mens.
- 3.3 *Giardia*: een parasitair eencellig organisme waarvan de cysten ovaal zijn en een lengte van 8 - 18 µm en een breedte van 5 - 15 µm hebben. *G. lamblia* (= *G. intestinalis*) is ziekteverwekkend voor de mens.
- 3.4 spiken: het tijdens de monstername toevoegen van een spike-suspensie.
- 3.5 spike-suspensie: suspensie met een bekende hoeveelheid (oö)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia*.
- 3.6 spike-monster: een monster dat genomen wordt op hetzelfde te bemonsteren object naast het gewone monster. Het spike-monster heeft hetzelfde volume als het gewone monster. Er wordt tijdens de monstername gespiket zodat later het rendement van de bepaling inclusief monstername kan worden bepaald.

4 Beginsel

Het Envirochek filter wordt geschud met een elutiebuffer. De (oö)cysten in de verkregen elutiebuffer worden na concentratie d.m.v. centrifugatie gezuiverd volgens immunomagnetische separatie (IMS). Hierna wordt het gevormde (oö)cysten-beads complex gescheiden. De overgebleven (oö)cysten worden of op een objectglaasje gebracht en gedroogd of op een filter gebracht en na labeling door de Chemsan gescand. Na het drogen of filtreren worden de (oö)cysten gelabeld met een fluorochroom (FITC) om de (oö)cyste-wanden te kleuren en di-amino-phenylindole (DAPI) om de aanwezige celinhoud te kleuren. Bij gebruik van de Chemsan kan ook met propidiumiodide gekleurd worden om de levensvatbaarheid van een (oö)cyste aan te tonen.

Na incubatie wordt het gehele oppervlak van het objectglaasje m.b.v. epifluorescentie-microscopie onderzocht op (oö)cysten, die herkenbaar zijn aan hun grootte, morfologie, specifieke fluorescentie en karakteristieke kleuring van de celinhoud.

Het filter wordt na incubatie door de Chemsan gescand en de gevonden spots worden met een epifluorescentie-microscopie bevestigd a.h.v. kenmerken.

5 Veiligheid en milieu

-*Cryptosporidium* en *Giardia* zijn pathogene micro-organismen; werk volgens FIN-I-condities. Bij geen van de beschreven handelingen mag met de mond gepipetteerd worden.

-Draag indien aangegeven handschoenen.

-Volg de aanwijzingen op de verpakking van de geconjugeerde monoclonale anti-lichamen op. Als tegenkleuring kan Evans blue (carcinogeen) en als fixatief kan natriumazide (toxisch) aanwezig zijn. Voer dit

- afval en alles wat hiermee in contact komt af in de blauwe tonnen met gele deksel (afval categorie VI: afvalstoffen met buitengewone risico's)
- DABCO is sterk hygroscopisch, geeft brandwonden: voorkom inhalatie. Voer de DABCO-glycerol 2% af in de daarvoor bestemde vaten (afval categorie V).
 - Laureth-12 (Lauryl Alcohol Polyether): Schadelijk bij inslikken en bij contact met de huid en ogen. Was na contact met de huid en ogen direct met ruim water. Drink bij inslikken veel water.
 - EDTA (Ethyleen diamine acetaat dinatrium): Schadelijk bij inademing, contact met de huid en inslikken. Irriterend voor de ogen, huid en ademhalingsstelsel. Spoel na contact met de ogen, huid en mond goed met ruim water.
 - DAPI (Di-amidino-phenylindol): Irriterend voor de ogen, huid en ademhalingsstelsel. Bij aanraking met de ogen direct met ruim water spoelen. Draag geschikte beschermende kleding.
 - PI (Propidium Iodide): Irriterend voor de ogen, huid en ademhalingsstelsel. Kan erfelijke genetische schade veroorzaken. Draag geschikte beschermende kleding, handschoenen en een veiligheidsbril en mondmasker. Bij aanraking met de ogen direct met ruim water spoelen.
 - Voer latex handschoenen, filtermateriaal, plastic afval enz. en afval van het monster tijdens behandeling af via de daarvoor bestemde afvalbakken: 'overig afval'.
 - Mesjes en naalden plus spuiten worden verzameld in de blauwe tonnen met gele deksel. (afval categorie VI: afvalstoffen met buitengewone risico's)

6 Controles

6.1 Stocksuspensies van (oö)cysten en conjugaat van *Cryptosporidium* en *Giardia*

Test de (oö)cysten en het conjugaat van *Cryptosporidium* en *Giardia* voordat ze in gebruik genomen worden. Volg de werkwijze zoals beschreven wordt in 10.7.

6.2 Positieve controle t.b.v. de kleuring van het preparaat

- Neem bij elke serie t.b.v. het maken van preparaten een positieve controle mee. Hiermee wordt gecontroleerd of de kleuring van het preparaat voldoende is (controle van het conjugaat plus uitvoering van de kleuring). Beoordeel altijd eerst dit preparaat voordat de monsters beoordeeld worden. Het preparaat wordt niet geteld! Beoordeel of de fluorescentie intensiteit en de DAPI en PI kleuring voldoende is en noteer eventuele bijzonderheden. Als het preparaat van de positieve controle niet voldoet maar de preparaten van de monsters wel, dan worden de monsters toch beoordeeld.
- Controleer het conjugaat indien de kleuring van de positieve controle en de monsters onvoldoende is. Oorzaak kan bijvoorbeeld gelegen zijn in:
 - Het gebruik van een verkeerde concentratie van het conjugaat tijdens incubatie.
 - De werking van het conjugaat kan langzaam achteruit gaan. Misschien moet de verdunning worden aangepast. Test eventueel nieuwe batches.
 - Controleer de pH van de reagentia.
- Probeer de oorzaak te achterhalen. Pas nadat de oorzaak bekend is kunnen er nieuwe preparaten gemaakt worden vanuit een gedeelte van het monster dat eventueel eerst nog verder opgewerkt moet worden.
- Neem, als de monsterserie een gespiket monster bevat geen positieve controle mee. De spike-suspensie zelf wordt immers ook geteld en beoordeeld. De spike-suspensie dient dan tevens als positieve controle.
- Schrijf de bijzonderheden op het desbetreffende formulier indien de DAPI en PI kleuring onvoldoende is. Er hoeven geen nieuwe preparaten gemaakt te worden, omdat de kleuringen geen bevestigingen zijn. Ze geven extra informatie of celinhoud aanwezig en of de (oo)cyst levensvatbaar is.

7 Reagentia en hulpstoffen

Bij de bereiding van reagentia en oplossingen volgens dit voorschrift dient zoveel mogelijk gebruik te worden gemaakt van speciaal voor dit doel in de handel gebrachte ingrediënten. Gebruik alleen chemicaliën van analysekwaliteit en vers gedemineraliseerd water.

7.1 Oöcysten van *Cryptosporidium*

7.1.1 Stocksuspensie van oöcysten van *Cryptosporidium parvum*

Leveranciers: Moredun Animal Health of Waterborne, Inc.
 Pentlands Science Park 6047 Hurst Street
 Bush Loan, Penicuik New Orleans, LA 70118 USA
 EH26 0PZ, SCOTLAND Artikel: ± 4 ml *Cryptosporidium*
 Artikel: 2ml *Cryptosporidium* parvum purified (P102)
 parvum purified

Of gelijkwaardig.

Bewaar de stocksuspensie oöcysten van *Cryptosporidium parvum* bij 0-4 °C. De suspensie is houdbaar totdat gebleken is dat:

- de concentratie zo sterk achteruit is gelopen dat er geen spike-suspensie meer uit gemaakt kan worden.
- de labeling geen goede resultaten meer geeft.
- de levensvatbaarheid beneden 70% is (alleen bij levende suspensies).

7.2 Cysten van *Giardia*

7.2.1 Stocksuspensie van cysten van *Giardia lamblia* (= *G. intestinalis*)

Leverancier: Waterborne, Inc
 6047 Hurst Street
 New Orleans, LA 70118 USA
 Artikel: ± 4 ml *Giardia lamblia* purified (P101)

Of gelijkwaardig.

Bewaar de stocksuspensie cysten van *Giardia lamblia* bij 0-4 °C. De suspensie is max. 2 maanden houdbaar of eerder als blijkt dat:

- de concentratie zo sterk achteruit is gelopen dat er geen spike-suspensie meer uit gemaakt kan worden.
- de labeling geen goede resultaten meer geeft.

7.3 Spike-suspensie

7.3.1 Samenstelling

Stocksuspensie van oöcysten van *Cryptosporidium parvum* (7.1.1)
 Stocksuspensie van cysten van *Giardia lamblia* (7.2.1)
 Phosphate Buffered Saline (PBS) 150 mM (7.5)

7.3.2 Bereiding

Maak een verdunning vanuit de beide stocksuspensies in 150 mM PBS.

Houd rekening met het volgende (maak indien mogelijk gebruik van eerdere bevindingen):

- het te spiken aantal (levende) protozoa per filter is ± 10⁴ per soort
- het te spiken volume is 10 ml
- het percentage levensvatbare in de stock

Maak deze suspensie telkens vers: gewoonlijk één dag van te voren. Indien er in het weekeinde of op maandag gespiket wordt, mag de spike-suspensie op vrijdag worden gemaakt. Vul het hierbij behorende formulier in (Bijlage 6). Maak een ruime hoeveelheid zodat na monstername m.b.v. het resterende gedeelte de toegevoegde hoeveelheid (oö)cysten tijdens monstername kan worden bepaald.

Bewaar de suspensie tijdens vervoer in een koelbox op smeltend ijs. Daarna bij 0-4°C.

7.3.3 Berekening voor de bereiding van de spike-suspensie

Bereken de hoeveelheid toe te voegen suspensie op de volgende wijze:

$$V_{stocksusp.crypt} = \frac{1,1 \cdot 10^4}{C_{stocksusp.}}$$

$$V_{stocksusp.giardia} = \frac{1,1 \cdot 10^4}{G_{stocksusp.}}$$

waarin:

$V_{stocksusp.}$	te gebruiken volume van de stocksuspensie (in ml)
$C_{stocksusp.}$	bekende concentratie oocysten in stocksuspensie (aantal/ml)
$G_{stocksusp.}$	bekende concentratie cysten in stocksuspensie (aantal/ml)

Voeg beide stocksuspensies bij elkaar en vul aan met 150 mM PBS tot een totaalvolume van 1 l ml.

7.4 Conjugaat voor *Cryptosporidium* en *Giardia*

7.4.1 Monoklonaal antilichaam met een fluorescerend label voor *Cryptosporidium* en *Giardia*

Leverancier: OXOID BV

Postbus 490

2000 AL Haarlem

Tel. (023) 5319173

Artikel: 5ml Crypto/Giardia Reagent (zonder Evans Blue), of gelijkwaardig.

7.4.2.1 Werkoplossing conjugaat

7.4.2.1 Samenstelling

Monoklonaal antilichaam met een fluorescerend label voor *Cryptosporidium* en *Giardia* (7.4.1)

150 mM PBS (7.5)

7.4.2.2 Bereiding

Laat het conjugaat en de PBS op kamertemperatuur komen.

Maak de juiste verdunning van het conjugaat in de PBS aan de hand van de gegevens verkregen uit de resultaten van 10.7.1.

7.5 Phosphate Buffered Saline (PBS) 150 mM

7.5.1 Samenstelling

Natrium chloride (NaCl)	8,5 g
Natrium di-hydroxy fosfaat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	0,39 g
Di-natrium waterstof fosfaat (Na_2HPO_4)	1,07 g
Demiwater	1000 ml

7.5.2 Bereiding

Los de componenten op in het water. Stel de pH op $7,2 \pm 0,2$ m.b.v. HCl of NaOH. Steriliseer de oplossing bij 121°C gedurende 15 minuten. De oplossing is, bewaard bij kamertemperatuur, gedurende 6 maanden houdbaar.

7.6 Laureth-12 Buffer

7.6.1 Samenstelling

Laureth-12 (RvS, Almere; Gellman artnr 4820, 50 g)	1 g
Tris 1M, pH 7,4 (7.7)	10 ml
EDTA 2 Na, 0,5M, pH 8,0 (7.8)	2 ml
Antifoam A (Sigma A-5633; 25 g)	150 μl
Demiwater	988 ml

7.6.2 Bereiding

Weeg de Laureth-12 af in een bekerglas en voeg 100 ml demiwater toe. Verwarm dit in de magnetron om de Laureth-12 te smelten en breng het over in een liter fles. Spoel het bekerglas een aantal keer na met demiwater. Voeg de overige componenten toe en breng het totaal volume op 1 liter met demiwater.

De buffer is niet volledig helder. De oplossing is bij kamertemperatuur gedurende 2 maanden houdbaar.

7.7 Tris 1M, pH 7,4

7.7.1 Samenstelling

Tris (FS Merck 8382)	121,1 g
Demiwater	1000 ml

7.7.2 Bereiding

Los de Tris op in 700 ml demiwater en stel de pH op 7,4 met geconcentreerde HCl (± 70 ml). Vul aan tot 1 liter en stel zonodig de eind pH op 7,4 met 1,0N HCl of NaOH. Filter steriliseer de oplossing door een $0,2 \mu\text{m}$ membraanfilter.

- 7.8 Ethyleen diamineacetaat dinatrium (EDTA 2Na) 0.5M, pH 8.0
- 7.8.1 Samenstelling
- | | |
|--------------------------|---------|
| EDTA 2Na (FS Baker 1073) | 186,1 g |
| Demiwater | 1000 ml |
- 7.8.2 Bereiding
- Los de EDTA op in 800 ml demiwater en stel de pH op 8,0 m.b.v. geconcentreerde NaOH. Vul aan tot 1 liter en stel zonodig de eind pH op 8,0 met 1,0N HCl of NaOH.
- 7.9 Di-amidino-phenylindol (DAPI) werkoplossing
- 7.9.1 Samenstelling
- | | |
|---------------------------|------|
| DAPI (2mg/ml MeOH) (7.10) | 1 µl |
| 150 mM PBS (7.5) | 5 ml |
- 7.9.2 Bereiding
- Maak deze oplossing kort voor gebruik. Breng 5 ml PBS in een steriele puntbuis en voeg 1 µl DAPI toe. Meng goed.
- 7.10 Di-amidino-phenylindol (DAPI)
- 7.10.1 Samenstelling
- | | |
|--|-------|
| DAPI (4,6 diamidino-2-phenylindol, <i>Sigma D-9542</i>) | 20 mg |
| Methanol absoluut (MeOH) | 10 ml |
- 7.10.2 Bereiding
- Los de DAPI op in de methanol. Verdeel het volume in 0,5 ml in epjes en bewaar het bij -20°C.
- 7.11 Propidium Iodide (PI)
- 7.11.1 Samenstelling
- | | |
|--|-------|
| Propidium iodide (<i>Sigma P-4170</i>) | 10 mg |
| 150 mM PBS (7.5) | 10 ml |
- 7.11.2 Bereiding
- Los de PI op in PBS. Verdeel het volume in 0,5 ml in epjes en bewaar bij 0-4°C.
- 7.12 Waterstofchloride (HCl) 0,1N
- 7.13 Natriumhydroxide (NaOH) 1N
- 7.14 Ethanol 96%
- 7.15 Ethanol 70%
- 7.15.1 Samenstelling
- | | |
|--------------------|--------|
| Ethanol 96% (7.14) | 700 ml |
| Demiwater | 300 ml |
- 7.15.2 Bereiding
- Meng de ethanol en demiwater. Verdeel het in spuitflessen.
- 7.16 Methanol absoluut
- 7.17 Mounting medium

8 Toestellen en hulpmiddelen

8.1 Algemeen

- 8.1.1 Magnetron
- 8.1.2.1 Balans
- 8.1.2.2 pH meter
- 8.1.2.3 Vortex mixer
- 8.1.2.4 Stopwatch
- 8.1.2.5 Koelkast (0-4°C)
- 8.1.2.6 Microcentrifuge
- 8.1.8 Farmaceutische afvalbakken
- 8.1.9 Tissues
- 8.1.10 Formulieren
- 8.1.11 Divers laboratorium materiaal

8.2 Verwerking filter en concentratie

- 8.2.1 Schudapparaat voor Envirochek filters
- 8.2.2 Disposable centrifugebuizen (250 ml, conisch)
- 8.2.3 Houder voor disposable centrifugebuizen
- 8.2.4 Bekerglazen 150 ml
- 8.2.5 Centrifuge met diverse rotor-inzetstukken
- 8.2.6 Plastic pipetten 10 ml
- 8.2.7 Waterstraalpompe

8.3 Zuivering volgens ImmunoMagnetische Separatie (IMS)

- 8.3.1.1 Dynabeads® GC-Combo kit (bevat SL-Buffer A(10x) en B(10x), beads voor *Cryptosporidium* en *Giardia*)
- 8.3.1.2 Dynal L10 Leighton buizen, met vlakke kant
- 8.3.1.3 Roterende mixer
- 8.3.1.4 Magneethouder voor Leighton buizen (MPC-1)
- 8.3.1.5 Magneethouder voor microcentrifuge buisjes (MPC-M)
- 8.3.1.6 Microcentrifuge buisjes, 1,5 ml
- 8.3.1.7 Plastic pipetten 5 ml
- 8.3.1.8 Micropipetten 5 ml, 200-1000 µl, 40-200 µl, 5-40 µl, 0,5-10 µl
- 8.3.1.9 Micropipetpunten, diverse soorten

8.4 Scheiding GC-beadscomplex, filtratie, labeling en telling mbv ChemScan

- 8.4.1 Magneethouder voor microcentrifuge buisjes (MPC-M)
- 8.4.2.1 Microcentrifuge buisjes, 1,5 ml
- 8.4.2.2 Micropipetten 200-1000 µl, 40-200 µl, 5-40 µl, 0,5-10 µl
- 8.4.2.3 Micropipetpunten, diverse soorten
- 8.4.2.4 ChemScan kit (bevat ChemSol B14, ChemId 3, DAPI, CHS, Mounting medium, ChemSol B12,
- 8.4.2.5 ChemFilter CB2.0, Support Pad)
- 8.4.2.6 Waterbad 80 ± 5°C
- 8.4.2.7 Filtratieopstelling voor membraanfilters met diameter van 25 mm
- 8.4.2.8 Disposable petrischalen, diameter 6 cm
- 8.4.2.9 Aluminiumfolie
- 8.4.2.10 Broedstoof 37 ± 1°C
- 8.4.2.11 ChemScan RDI
- 8.4.2.12 ChemScan filterhouders
- 8.4.3 ChemScan dagelijkse controle kit (bevat Standard C1, ChemFilter CB2.0, Support Pad; apart ChemSol B16)

- 8.4.3.1 Epifluorescentie microscoop
 - 8.4.3.2 Objectglaasjes
 - 8.4.3.3 Dekglaasjes
 - 8.4.3.4 Nagellak, kleurloos
- 8.5 Scheiding GC-beadscomplex, labeling en telling volgens Dynal
- 8.5.1.1 Magneethouder voor microcentrifuge buisjes (MPC-M)
 - 8.5.1.2 Microcentrifuge buisjes, 1,5 ml
 - 8.5.1.3 Micropipetten 200-1000 μ l, 40-200 μ l, 5-40 μ l, 0,5-10 μ l
 - 8.5.1.4 Micropipetpunten, diverse soorten
 - 8.5.1.5 Broedstoof $37 \pm 1^\circ\text{C}$
 - 8.5.1.6 Dynal® Spot-on objectglaasjes
 - 8.5.1.7 Dekglaasjes
 - 8.5.1.8 Nagellak, kleurloos
 - 8.5.1.9 Fluorescentie microscoop
 - 8.5.1.10 Immersie olie, niet-fluorescerend

9 Te onderzoeken monster

Neem het monster volgens LMB-034. Plaats het Envirochek filter op smeltend ijs. De maximale bewaartijd voordat met het opwerken gestart wordt bedraagt 48 uur.

9.1 Verwerking filter en concentratie

Verwerk het filter binnen 48 uur na monsternamen. Het pellet dat hierbij ontstaat kan bij $0-4^\circ\text{C}$ bewaard blijven tot de eindrapportage is afgerond.

Het concentraat moet binnen 24 uur verder verwerkt worden.

9.2 Zuivering volgens ImmunoMagnetische Separatie (IMS)

Afhankelijk van de vraag van de klant wordt een deel van of het hele pellet gezuiverd m.b.v.

immunomagnetische separatie. Het dan verkregen gezuiverde GC-beads complex kan maximaal 1 dag bij $0-4^\circ\text{C}$ bewaard worden.

9.3 Scheiding GC-beadscomplex, filtratie, labeling en telling mbv ChemScan

Wanneer het GC-beadscomplex gescheiden wordt, moet direct vervolgd worden met de filtratie en de labeling. Dezelfde dag dient het filter met de ChemScan geteld en door de microscoop bekeken te zijn.

Het filter kan gedurende 1 maand bewaard blijven bij $0-4^\circ\text{C}$ om opnieuw geteld of beoordeeld te worden door er een preparaat van te maken.

(In praktijk worden de preparaten meestal afgevoerd nadat de eindrapportage is afgerond.)

9.4 Scheiding GC-beadscomplex, labeling en telling volgens Dynal

Wanneer het GC-beadscomplex gescheiden wordt, moet direct vervolgd worden met de labeling. Dezelfde dag dient het preparaat afgedekt te worden.

Bewaar het preparaat bij $0-4^\circ\text{C}$. Dit preparaat blijft 1 maand geschikt voor de beoordeling.

(In praktijk worden de preparaten meestal afgevoerd nadat de eindrapportage is afgerond.)

10 Werkwijze

10.1 Vorbereiding

-Laat de benodigde hoeveelheid van de Dynabeads® GC-Combo kit op kamertemperatuur komen.

-Weeg per monster één lege 250 ml centrifugebuis.

-Wegen van het monster gebeurt in grammen en op drie decimalen nauwkeurig. Noteer alle gegevens op het daarvoor bestemde formulier.

10.2 Verwerking filter en concentratie

Gebruik latex handschoenen waar contact met het filter of monstervloeistof kan vóórkomen.

10.2.1 Verwerking filter

- Vang de vloeistof uit het Envirochek filter op in een 250 ml centrifugebuis.
- Meet ongeveer 130 ml Laureth-12 buffer af in een 150 ml bekersglas.
- Giet dit in het Envirochek filter tot het niveau ongeveer 1 cm boven de filter module is.
- Klem het filter in het schudapparaat voor Envirochek filters en schud gedurende 10 minuten op 80% van het maximum (ongeveer 600 rpm).
- Giet de inhoud van het Envirochek filter in de centrifugebuis. Gebruik indien nodig een tweede centrifugebuis.
- Vul het filter opnieuw met ongeveer 130 ml Laureth-12 buffer tot ongeveer 1 cm boven de filter module.
- Klem het Envirochek filter in het schudapparaat zodanig dat het filter 90° gedraaid is t.o.v. de eerste keer schudden.
- Schud 10 minuten bij 80% van het maximum (ongeveer 600 rpm).
- Giet de inhoud van het Envirochek filter in de centrifugebuis(zen).

10.2.2 Concentratie

- Tarreer de centrifugatiebuizen m.b.v. Laureth-12 buffer. Gebruik zonodig een tarreerbuis. Toegestane afwijking in gewicht: tegenover elkaar: 10 gram, naast elkaar: 100 gram
- Centrifugeer de 250 ml centrifugebuizen bij 4°C gedurende 10 minuten bij 1500 g zonder rem (programmanr. 3 Varifuge 3.0 RS).
- Zuig m.b.v. de waterstraalpomp en een plastic pipet van 10 ml **zonder watje** de bovenstaande vloeistof af. Probeer zo min mogelijk vloeistof in de buizen achter te laten zonder dat er pellet wordt meegezogen.
- Resuspendeer de pellets d.m.v. schudden, zonodig met de vortex mixer.
- Bij gebruik van twee centrifugebuizen dienen de pellets in de gewogen centrifugebuis verzameld te worden. Spoel de centrifugebuis na met Laureth-12 buffer.
- Tarreer de centrifugatiebuis m.b.v. Laureth-12 buffer en gebruik indien nodig een tarreerbuis.
- Centrifugeer de 250 ml centrifugebuizen bij 4°C gedurende 10 minuten bij 1500 g zonder rem (programmanr. 3 Varifuge 3.0 RS).
- Zuig m.b.v. de waterstraalpomp en een plastic pipet van 10 ml **zonder watje** de bovenstaande vloeistof af. Probeer zo min mogelijk vloeistof in de buizen achter te laten zonder dat er pellet wordt meegezogen.
- Meet met een referentie centrifugebuis a.h.v. de maatverdeling wat het volume van het packed pellet is. Noteer dit op het daarvoor bestemde formulier.

10.3 Zuivering volgens ImmunoMagnetische Separatie (IMS)

10.3.1 Berekening aantal IMS zuiveringen

Per IMS kan maximaal 0,5 ml pellet gezuiverd worden. Dit wordt in 10 ml volume verder verwerkt.

- Is het **pellet ≤ 0,5 ml** : vul het monster aan tot een totaalvolume van 10 ml met demi water. Doe dit d.m.v. wegen, waarbij 1 g is 1 ml. Noteer het gewicht op het daarvoor bestemde formulier.
- Is het **pellet > 0,5 ml** : gebruik onderstaande formule om het benodigde totaalvolume te berekenen :

$$\text{totaalvolume} = \frac{\text{pelletvolume}}{0,5\text{ml}} \times 10\text{ml}$$

-Vul het monster aan tot het berekende totaalvolume met demi water. Doe dit d.m.v. wegen, waarbij 1 g is 1 ml. Noteer het gewicht op het daarvoor bestemde formulier.

-Resuspendeer het pellet d.m.v. schudden en m.b.v. een spatel, zonodig met de vortex mixer. Totdat er geen klontje meer zichtbaar is.

10.3.2 Bepaling hoeveel monster te zuiveren met IMS

Afhankelijk van de vraag van de klant wordt een deel van of het hele pellet gezuiverd m.b.v. IMS.

- Bij een pellet ≤ 0,5 ml wordt altijd het volledige monster onderzocht. Het totaalvolume van 10 ml (10.3.1) wordt volledig verwerkt.
 - Bij een pellet > 0,5 ml waarvan een deel van het monster onderzocht wordt, wordt 10 ml uit het totaalvolume (10.3.1) verder verwerkt.
- Indien meerdere delen, en niet het volledige monster, onderzocht worden, worden zoveel keer 10 ml (10.3.1) verwerkt.

Weeg na iedere 10 ml de centrifugebuis om te kunnen berekenen hoeveel monster er onderzocht wordt. Noteer het gewicht op het daarvoor bestemde formulier.

-Bij een pellet > 0,5 ml waarvan het volledige monster onderzocht wordt, wordt het totaalvolume tot een veelvoud van 10 aangevuld met demiwater. Doe dit d.m.v. wegen, waarbij 1 g is 1 ml.

Per IMS wordt 10 ml verder onderzocht. Weeg na iedere 10 ml de centrifugebuis om te kunnen berekenen hoeveel monster er onderzocht wordt. Noteer het gewicht op het daarvoor bestemde formulier. (bijlage 1)

10.3.3 IMS zuivering

-Breng in een Dynal L10 buis 1 ml 10x SL-buffer-A en 1 ml 10x SL-buffer-B.

-Breng 10 ml monster (10.3.2) over in de Dynal L10 buis met de SL-buffers.

-Vortex de Dynabeads®Crypto-Combo ongeveer 10 seconden om de beads te resuspenderen. Zorg dat er geen pellet meer op de bodem ligt.

-Voeg 100 µl van deze beads toe aan de Dynal L10 buis met het monster en de buffers.

-Vortex de Dynabeads®Giardia-Combo ongeveer 10 seconden om de beads te resuspenderen. Zorg dat er geen pellet meer op de bodem ligt.

-Voeg 100 µl van deze beads toe aan de Dynal L10 buis met het monster, de buffers en de Crypto-Combo beads.

-Plaats de Dynal L10 buis in een roterende mixer met een snelheid van ± 25 rpm gedurende tenminste 1 uur bij kamertemperatuur.

-Maak een 1x verdunning van de 10x SL-buffer-A. Per IMS is 1 ml 1x SL-buffer-A nodig. Bewaar deze oplossing bij kamertemperatuur.

-Haal na 1 uur de buis uit de mixer en plaats deze in de magneethouder (MPC-1) voor Leighton buizen, met de vlakke zijde van de buis tegen de magneet aan.

-Zonder de Dynal L10 buis te verschuiven, plaats de magneetzijde van de MPC-1 naar beneden, zodanig dat de buis horizontaal ligt en met de vlakke zijde naar beneden wijst.

-Beweeg de houder met buis met de hand over 90°, zo dat de uiteinden van de buis om beurten op en neer bewegen. Doe dit gedurende 2 minuten met ± 1 beweging per seconde.

-Zorg dat er een continue beweging is zodat de beads, en zo min mogelijk andere deeltjes, aan de magneet hechten. Wanneer het geheel meer dan 10 seconden stil staat, dient de voorgaande stap herhaald te worden.

-Zet de MPC-1 rechtop met de buis vertikaal en haal de dop eraf, de buis blijft in de magneethouder. Pipetteer met een 5 ml plastic pipet de vloeistof eruit, zorg dat de pipet niet de vlakke zijde met de beads raakt. De vloeistof wordt verzameld in een flesje, welke na afloop geautoclaveerd wordt.

-Neem de Dynal L10 buis uit de magneethouder. Resuspendeer de beads in 0,5 ml 1x SL-buffer-A. Meng voorzichtig, gebruik geen vortex.

-Breng de beads suspensie over in een 1,5 ml centrifuge buisje.

-Voeg nogmaals 0,5 ml 1x SL-buffer-A toe aan de Dynal L10 buis en meng voorzichtig.

-Breng de resterende deeltjes en beads over in hetzelfde microcentrifuge buisje.

Hier kan het monster gedurende 1 dag bewaard worden bij 0-4°C.

-Plaats het microcentrifuge buisje in een magneethouder (MPC-M) voor microcentrifuge buisjes.

-Draai de MPC-M zonder het buisje te verschuiven horizontaal over 180° om zijn as. Doe dit gedurende 2 minuten met ± 1 beweging per seconde. De beads vormen een bruine vlek aan de achterkant van het buisje.

-Pipetteer onmiddellijk het supernatant uit het buisje, terwijl deze nog in de magneethouder is. Zorg dat de pipetpunt niet de beads raakt. Wanneer meerdere buisjes in de MPC-M staan, draai drie maal de magneethouder 180° voordat het supernatant uit elk buisje gepipetteerd wordt. Het supernatant wordt verzameld in een flesje, welke na afloop geautoclaveerd wordt.

-Indien het supernatant troebel is, kan nogmaals aan het microcentrifuge buisje 1 ml 1x SL-buffer-A toegevoegd worden om te wassen.

Herhaal de handelingen vanaf dat het microcentrifuge buisje in de MPC-M is geplaatst.

Ga met het verkregen GC-beadscomplex gelijk door met 10.4 of 10.5 .

10.4 Scheiding GC-beadscomplex, filtratie, labeling en telling m.b.v. Chemsan

10.4.1 Scheiding GC-beadscomplex

-Haal de magneetstrip uit de MPC-M.

- Voeg 100 µl 0,1 N HCl toe aan het GC-beadscomplex in het microcentrifuge buisje en vortex 10 seconden.
- Plaats het buisje terug in de MPC-M en incubeer gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur.
- Plaats na 10 minuten de magneetstrip terug in de MPC-M.
- Vortex elk buisje 10 seconden. Let er op dat al het materiaal in de punt van het buisje is verzameld.
- Zet het microcentrifuge buisje terug in de MPC-M met magneetstrip en laat gedurende 10 seconden staan.
- Breng het supernatant over in een schoon microcentrifuge buisje.
- Herhaal deze handelingen (10.4.1) 1 maal.
- Verzamel het tweede supernatant in hetzelfde microcentrifuge buisje, totaal 200 µl.
- Voeg 200 µl ChemSol B14 toe aan elk microcentrifuge buisje om de suspensie te neutraliseren. Vortex 5 seconden.

10.4.2 Filtratie

- Plaats in de filtratieopstelling (8.4.7) een filterhouder met een zacht steunfilter en zonder beker.
- Spoel dit steunfilter achtereenvolgens met 70% ethanol en demiwater.
- Plaats een Chemfilter CB2.0 membraanfilter op het steunfilter.
- Pipetteer de suspensie uit 10.4.1 in het midden van het filter (max. doorsnee van het filtratie gebied is 10-15 mm).
- Maak een 1:5 verdunning van ChemSol B12, per monster 1 ml.
- Filtreer 1 ml van de verdunde ChemSol B12 door hetzelfde filter.

10.4.3 Labeling

- Maak een label door de volgende oplossingen in de onderstaande verhoudingen te mengen; per filter is 100 µl label nodig.

Conjugaat <i>Giardia</i> en <i>Cryptosporidium</i> (7.4.1)	50 µl
DAPI (8.4.5)	20 µl
PI (7.11)	10 µl
Demiwater	15 µl
ChemSol B12 (8.4.5)	5 µl

Met dit label wordt de levensvatbaarheid van de (oo)cyst aangetoond. Indien dit niet nodig is, wordt PI vervangen door demiwater.

Vortex 5 seconden om te mengen.

- Breng 100 µl label op een petrischaal (Ø 6 cm) en plaats het filter in de druppel label. Plaats het geheel in een vochtige omgeving. Incubeer gedurende 2 uur bij 37°C.
- Indien niet direct gemeten kan worden, wordt het geheel in de koelkast bewaard gedurende max. 1 uur.

10.4.4 Chemsan voorbereidingen

- Volg de instructies voor het opstarten die beschreven zijn in “Chemsan RDI training manual” hoofdstuk 3.2. (wachtwoorden : chemsan , lmb)
- Het apparaat moet minimaal een half uur opwarmen voordat de dagelijkse controle uitgevoerd mag worden.
- Maak de software gereed voor de metingen :
- Klik ‘File’ aan, vervolgens ‘New session’
- Geef ‘Session ID’ : ddmjj (dd = 2 cijfers van de dag, m = hoofdletter A t/m L corresponderend met de maand, jj = laatste 2 cijfers van het jaar). Vul bij ‘Comments’ bv. de opdrachtgever in. Klik op OK.
- Kies in de linkerkolom voor de applicatie “TVCBIO1.APP”, dit is voor de dagelijkse controle met fluorescerende latex bolletjes. Klik op OK.
- Voer de dagelijkse controle uit volgens “Chemsan RDI training manual” hoofdstuk 7.

10.4.5 Telling monster m.b.v. Chemsan

- Breng het membraanfilter met het monster na incubatie over op de filterhouder met het zachte steunfilter van de filtratieopstelling. Zuig het overtollige label weg.
- Breng 85 µl mounting medium (8.4.5) op de Chemsan filterhouder.
- Plaats hierin een steunfilter (8.4.5) en laat het geheel doordrenken met mounting medium.
- Breng het membraanfilter over op het doordrenkte steunfilter. Zorg dat het filter glad is.
- Plaats de Chemsan filterhouder in de Chemsan en klik op scan (rechtsonder in het beeldscherm).
- Voer achtereenvolgens de volgende handelingen uit :

- Controleer welke application file actief is.
- Pas zonodig de 'application file' aan door op 'load' te klikken en in de linkerkolom de volgende applicatie te kiezen :

voor de dagelijkse controle	: TVC BIO 1.APP
voor Crypto/Giardia monsters	: Cry Giard.APP
- Klik op OK
- Kies 'sample ID' :

Voor de dagelijkse controle	: Standard C Beads
Voor Crypto/Giardia monsters	: Crypto-Giardia
- Kies 'batch ID' en vul bv. de monstercode in.
- Geef bij 'comments' extra informatie zoals de samenstelling van het label, het gefiltreerde volume enz.
- Klik op 'start scan'. Het scannen duurt ± 3 minuten. Het scannen kan ondertussen gestopt worden door op 'abort' te klikken.
- Klik op de betreffende 'scan name'. Onder 'View' en dan onder 'scan histogram' kan de bijbehorende grafiek uitgeprint worden. Ga terug door op 'close' te klikken.
- Plaats de membraanhouder onder de microscoop.
- Gebruik 'microscope setup' en 'load' en 'unload' om de houder onder de microscoop te plaatsen.
- Druk op 'begin validation' en bevestig de spots onder de microscoop. Geef met de druktoetsen aan of het een *Cryptosporidium* oocyst (+), *Giardia* cyst (P) of een ander deeltje (?) is. Zie 10.6 voor de criteria. Controleer ook op DAPI en PI labeling.
- Noteer deze ruwe resultaten op het meetresultaten formulier voor de Chemsan. (bijlage 2)
- Klik op 'save' en weer opnieuw op 'save' en vervolgens op 'yes'.
- Print na het beeldscherm uit en sluit het scherm af door op 'quit' en 'close' te klikken.
- Print aan het einde het overzichtsscherm uit.
- Volg de instructies voor het afsluiten die beschreven zijn in "Chemsan RDI training manual" hoofdstuk 3.3
- Maak een preparaat van het membraanfilter door 10 µl mounting medium (7.16) op een preparaatglaasje te brengen en hierin het filter te leggen. Breng hierop nog 10 µl mounting medium.
- Plaats een dekglasje op de druppel mounting medium en maak de randen dicht met blanke nagellak.
- Noteer de resultaten en de bijzonderheden op het meetresultaten formulier (bijlage 1).

10.4.6 Positief controlemonster

Voor de positieve controle t.b.v. de kleuring van het preparaat wordt de procedure gevolgd vanaf 10.4.2. Van de recentste batch *Cryptosporidium* en *Giardia* wordt van elke stock suspensie 1 µl in 200 µl PBS gepipetteerd. Dit wordt als zijnde een monster gefiltreerd, gelabeld met conjugaat, DAPI en PI en beoordeeld.

10.5 Scheiding GC-beadscomplex, labeling en telling volgens Dynal

10.5.1 Scheiding GC-beadscomplex

- Haal de magneetstrip uit de MPC-M.
- Voeg 50 µl 0,1 N HCl toe aan het GC-beadscomplex in het microcentrifuge buisje en vortex 10 seconden.
- Plaats het buisje terug in de MPC-M en incubeer gedurende 10 minuten bij kamertemperatuur.
- Plaats na 10 minuten de magneetstrip terug in de MPC-M.
- Vortex elk buisje 10 seconden. Let er op dat al het materiaal in de punt van het buisje is verzameld.
- Zet het microcentrifuge buisje terug in de MPC-M met magneetstrip en laat gedurende 10 seconden staan.
- Breng 5 µl 1,0 N NaOH op een Dynal® Spot-on glaasje.
- Pipetteer het supernatant in het welletje met de druppel NaOH.

10.5.2 Labeling

- Plaats het Dynal® Spot-on glaasje bij 37°C om te drogen, ongeveer 30-60 minuten.
- Breng 50 µl absolute methanol in het welletje en laat aan de lucht drogen, ongeveer 3-5 minuten.
- Breng 50 µl werkoplossing conjugaat (7.4.2) in het welletje. Incubeer in een vochtige omgeving bij 37°C gedurende 30 minuten.
- Zuig voorzichtig het resterende conjugaat van het welletje met een micropipet. Zorg dat de pipetpunt niet over het oppervlak krast.
- Breng 65-75 µl 150 mM PBS in het welletje en laat 2 minuten staan.
- Verwijder voorzichtig het resterende PBS mbv een micropipet.
- Breng 50 µl DAPI werkoplossing (7.9) in het welletje en laat 2 minuten staan.

- Verwijder voorzichtig de resterende DAPI werkoplossing mbv een micropipet.
- Brenge 65-75 µl 150 mM PBS in het welletje en laat 2 minuten staan.
- Verwijder voorzichtig het resterende PBS mbv een micropipet.
- Laat het preparaatglaasje drogen bij kamertemperatuur in het donker.
- Brenge 10 µl mounting medium (7.16) in het welletje.
- Plaats een dekglasje op de druppel mounting medium en maak de randen dicht met blanke nagellak. - -
- Bewaar in de koelkast gedurende max. 1 maand tot ze geteld worden.

10.5.3 Telling Dynal glaasje

- Tel het aantal *Cryptosporidium* oocysten en *Giardia* cysten in het preparaat. Zie 10.6 voor de criteria.
- Noteer de resultaten en de bijzonderheden op het meetresultaten formulier (bijlage 1).

10.5.4 Positief controlemonster

Voor de positieve controle t.b.v. de kleuring van het preparaat wordt de procedure gevolgd vanaf 10.5.2. Van de recentste batch *Cryptosporidium* en *Giardia* wordt van elke stock suspensie 1 µl in 50 µl PBS gepipetteerd. Dit wordt op een Dynal® Spot-on glaasje gebracht en verder behandeld met conjugaat en DAPI als zijnde een monster.

10.6 Beoordeling van de preparaten

Beoordeel alle spots van het Chemsan preparaat (10.4.5) of alle beeldvelden van het Dynal® Spot-on glaasje (10.5.3). Noteer het aantal (oö)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia*. Noteer tevens eventuele bijzonderheden, zoals grote aantallen algen ed.

Noteer de gegevens op het hiervoor bestemde formulier (bijlage 1).

10.6.1 Beoordeling van Chemsan preparaat

Bekijk het preparaat bij een 400x vergroting met het UV filter (filter 2) en beoordeel op de volgende kenmerken :

Cryptosporidium oocysten:

- Fluorescentie : appelgroen fluorescerende ring; binnenin donker of zwak fluorescerend groen.
- Vorm : rond, 'packman'
- Grootte : 3-7 µm

Giardia cysten:

- Fluorescentie : appelgroen fluorescerende ring; binnenin donker, geen bollen of korrels aanwezig.
- Vorm : ovaal, soms rond
- Grootte : lengte 8-18 µm, breedte 5-15 µm

10.6.2 Beoordeling van Dynal® Spot-on glaasje

10.6.2.1 Screenen van preparaat

Bekijk het preparaat bij een 250x vergroting met het UV filter (filter 2) en beoordeel op de volgende kenmerken :

Cryptosporidium oocysten:

- Fluorescentie : heldere fluorescentie, moet opvallen in beeld
- Vorm : rond, 'packman'
- Grootte : indicatief

Giardia cysten:

- Fluorescentie : heldere fluorescentie, moet opvallen in beeld
- Vorm : ovaal, soms rond
- Grootte : indicatief

10.6.3 Bevestigen van verdachte objecten

Wanneer a.h.v. de criteria in 10.6.2.1 een verdacht object gezien wordt, wordt deze ook beoordeeld bij de 1000x vergroting.

Cryptosporidium oocysten:

- Fluorescentie : appelgroen fluorescerende ring; binnenin donker of zwak fluorescerend groen.
- Vorm : rond, 'packman'
- Grootte : 3-7 µm

Giardia cysten:

Fluorescentie : appelgroen fluorescerende ring; binnenin donker, geen bollen of korrels aanwezig.
 Vorm : ovaal, soms rond
 Grootte : lengte 8-18 µm, breedte 5-15 µm

10.6.4 Beoordeling met andere filters

Deze beoordeling geeft extra informatie over de aanwezigheid van celinhoud (DAPI) en of de (oo)cyst levensvatbaar is (PI).

-Groen licht filter (filter 1)

Beoordeel in geval van twijfel op auto-fluorescentie met dit filter. Wanneer er nog steeds fluorescentie optreedt is er geen sprake van een (oö)cyste van *Cryptosporidium* of *Giardia*.

Ook kan de PI labeling beoordeeld worden. De (oo)cyste is van binnen rood gekleurd bij PI labeling (PI+) en is niet zichtbaar of donker van binnen wanneer de PI niet in de cel is gedrongen (PI-). PI+ betekent een dode (oo)cyste. De rand is niet zichtbaar of zwak oranje.

-Blauw licht filter (filter 3)

Gebruik filter 3 voor de beoordeling van de DAPI labeling. Een positieve DAPI uitslag heeft de volgende karakteristieke kenmerken:

Cryptosporidium oocyste: 3-4 blauwe kerntjes in de oocyste

Giardia cysten: 2 blauwe kerntjes (oogjes) in de cyste, soms te zien als 2 x 2 paarsgewijze kerntjes

Indien de achtergrond rood is kan met dit filter de labeling van PI beoordeeld worden. Wanneer de (oo)cyste van binnen rood is gekleurd, is het PI +. Dit betekent dat de cel dood is. Wanneer de (oo)cyste van binnen donker en niet rood is (PI niet binnengedrongen in cel), is het PI-. Dit betekent dat de cel nog levensvatbaar is.

10.7 Ingangscontrole van een nieuwe batch (oö)cysten en/of conjugaat

10.7.1 Conjugaat voor *Cryptosporidium* en *Giardia* (7.4)

Prepareer zoveel Dynal® Spot-on glaasjes als dat er verdunningen conjugaat gecontroleerd worden.

Een nieuwe batch conjugaat wordt altijd vergeleken met de op dat moment in gebruik zijnde batch met de juiste verdunning.

-Breng 50 µl 150 mM PBS op een Dynal® Spot-on glaasje.

-Breng hierin 1 µl van de stocksuspensies van *Cryptosporidium* (7.1) en *Giardia* (7.2).

-Plaats het Dynal® Spot-on glaasje bij 37°C om te drogen, ongeveer 30 minuten.

-Breng 50 µl absolute methanol in het welletje en laat aan de lucht drogen, ongeveer 3-5 minuten.

-Breng per Dynal® Spot-on glaasje 50 µl van een (on)verdunde conjugaatoplossing in het welletje. Controleer meerdere verdunningen bijv. onverdund, 1:2, 1:4, 1:5, en 1:10 verdunningen.

-Incubeer in een vochtige omgeving bij 37°C gedurende 30 minuten.

-Zuig voorzichtig het resterende conjugaat van het welletje met een micropipet. Zorg dat de pipetpunt niet over het oppervlak krast.

-Breng 65-75 µl 150 mM PBS in het welletje en laat 2 minuten staan.

-Verwijder voorzichtig het resterende PBS mbv een micropipet.

-Laat het preparaatglaasje drogen bij kamertemperatuur in het donker.

-Breng 10 µl mounting medium (7.16) in het welletje.

-Plaats een dekglasje op de druppel mounting medium en maak de randen dicht met blanke nagellak. Bewaar in de koelkast gedurende max. 1 maand tot het preparaat bekeken wordt.

-Beoordeel de preparaten op fluorescentie-intensiteit en maak hierbij gebruik van de volgende codering om de verschillen te onderscheiden: zeer goed, goed, matig en slecht. Beoordeel het nieuwe conjugaat t.o.v. het oude conjugaat.

10.7.2 (Oö)cysten

De (oö)cysten van de leverancier worden als volgt beoordeeld:

1. De mate van fluorescentie t.o.v. de reeds in gebruik zijnde stocksuspensie. Gelet wordt op de fluorescentie-intensiteit en of de celwanden egaal fluorescerend zijn.

2. Het aantal (oö)cysten per ml wordt bepaald.

3. Indien het om levende (oö)cysten gaat, wordt de levensvatbaarheid bepaald.

- Breng een hoeveelheid van de (oö)cysten suspensies op een Dynal® Spot-on glaasje en vul zonodig aan tot 50 µl met 150 mM PBS. Het eindvolume per glaasje is minimaal 50 µl en maximaal 100 µl. Zorg dat er op het preparaat 150-250 cysten en 150-250 oöcysten zitten. Maak zonodig een verdunning van de (oö)cysten in 150 mM PBS.
- Maak een duplo preparaat.
- Maak tevens een preparaat van de reeds in gebruik zijnde batch (oö)cysten ter vergelijking van de fluorescentie intensiteit.
- Plaats het Dynal® Spot-on glaasje bij 37°C om te drogen, ongeveer 30-60 minuten.
- Breng 50 µl absolute methanol in het welletje en laat aan de lucht drogen, ongeveer 3-5 minuten.
- Breng 50 µl werkoplossing conjugaat (7.4.2) in het welletje. Incubeer in een vochtige omgeving bij 37°C gedurende 30 minuten.
- Zuig voorzichtig het resterende conjugaat van het welletje met een micropipet. Zorg dat de pipetpunt niet over het oppervlak krast.
- Breng 65-75 µl 150 mM PBS in het welletje en laat 2 minuten staan.
- Verwijder voorzichtig het resterende PBS mbv een micropipet.
- Breng 10 µl mounting medium (7.16) in het welletje.
- Laat het preparaatglaasje drogen bij kamertemperatuur in het donker.
- Plaats een dekglasje op de druppel mounting medium en maak de randen dicht met blanke nagellak. Bewaar in de koelkast gedurende max. 1 maand tot het preparaat geteld wordt.
- Beoordeel de fluorescentie-intensiteit. Maak hierbij gebruik van de volgende codering om de verschillen te onderscheiden: zeer goed, goed, matig en slecht.
- Voer een telling uit van de preparaten. Beoordeel volgens de criteria in 10.6.
- Vul het hiervoor bestemde formulier in.

10.7.2.1 Levensvatbaarheidsbepaling

- Breng van beide stocksuspensies van *Cryptosporidium* en *Giardia* 100 µl apart in een microcentrifuge buisje.
- Vul dit aan tot 1 ml met aangezuurde 150 mM PBS (pH 2,75).
- Incubeer 1 uur bij 37°C.
- Draai de buisjes af in een microcentrifuge gedurende 30 seconden bij 13.000rpm.
- Zuig af met een micropipet tot ± 100 µl.
- Vul aan tot 1 ml met 150 mM PBS.
- Draai de buisjes nogmaals af in een microcentrifuge gedurende 30 seconden bij 13.000rpm.
- Zuig af met een micropipet tot ± 100 µl.
- Vul aan tot 1 ml met 150 mM PBS.
- Draai de buisjes voor een derde keer af in een microcentrifuge gedurende 30 seconden bij 13.000rpm.
- Zuig af met een micropipet tot ± 100 µl.
- Voeg 1 µl DAPI (2 mg/ml MeOH) (7.10) en 10 µl PI (7.11) toe en meng.
- Incubeer 2 uur bij 37°C, donker.
- Optioneel: voeg in de laatste 30 minuten 50 µl conjugaat (onverdund) toe.
- Vul na de incubatie aan tot 1 ml met 150 mM PBS.
- Draai de buisjes af in een microcentrifuge gedurende 30 seconden bij 13.000rpm.
- Zuig af met een micropipet tot ± 100 µl.
- Vul aan tot 1 ml met 150 mM PBS.
- Draai de buisjes nogmaals af in een microcentrifuge gedurende 30 seconden bij 13.000rpm.
- Zuig af met een micropipet tot ± 100 µl.
- Maak een 'nat' microscopisch preparaat. Breng hiervoor 10 µl op een objectglasje. Leg daarop een dekglasje, zonder luchtbelletjes.
- Beoordeel de (oö)cysten volgens 10.6.4 op levensvatbaarheid en de aanwezigheid van celkernpjes.
- Tel het aantal dode en levende (oö)cysten en vul het percentage levende cellen in op het hiervoor bestemde formulier.

10.8 Rendement bepaling m.b.v. spiken

Behandel gespikete monsters (LMB-034) op identieke wijze als gewone monsters.

Tel de spike-suspensie zelf ook telkens als er een monster gespiked is. Dit ter bepaling van de input tijdens de monstername. Behandel de spike-suspensie gelijk aan het monster vanaf 10.4.2 voor de Chemsan methode of vanaf 10.5.2 volgens de Dynal methode. Filtreer een zodanig volume of breng een zodanig volume op een Dynal® Spot-on glaasje dat in het preparaat een aantal (oö)cysten geteld wordt dat ligt tussen 150 en 250 per protozoë. Dit volume wordt per keer berekend omdat de concentratie van de spike-oplossing per keer kan verschillen, afhankelijk van de gewenste input tijdens monstername.

11 Identificering en kwantificering

Voor het uitvoeren van de berekeningen is een spreadsheet aanwezig.

11.1 Berekening

11.1.1 Bereken het aantal (oö)cysten per liter monster m.b.v. de volgende formules.

$$X_{Giardia} = \frac{G * Gtp}{Gzp * bV} \quad , \quad X_{Cryptosporidium} = \frac{C * Gtp}{Gzp * bV}$$

waarbij:

X = het aantal (oö)cysten per liter monster

C = het aantal oöcysten van *Cryptosporidium* in het preparaat

G = het aantal cysten van *Giardia* in het preparaat

bV = bemonsterd volume (l)

Gtp = gewicht van totaal pellet (gram)

Gzp = gewicht van het gezuiverde gedeelte van de pellet dat microscopisch beoordeeld werd (gram)

11.1.2 Bereken de input m.b.v. de volgende formule.

formule: $Y = A * sV$

waarbij:

Y = aantal (oö)cysten dat toegevoegd werd aan het spike-monster

A = aantal (oö)cysten per ml spike-oplossing

sV = spike-volume (ml)

11.1.3 Bereken het rendement m.b.v. de volgende formule.

$$R = \frac{(Xs - X) * bVs}{Y} * 100\%$$

waarbij:

R = rendement (%)

X = aantal (oö)cysten per liter in het monster

Xs = aantal (oö)cysten per liter in het spike-monster

Y = input (oö)cysten

bVs = bemonsterd volume van het spike-monster (l)

Opmerking : indien er geen (oö)cysten in het gewone monster gevonden zijn, wordt er gerekend met de bepalingsgrens bij berekening van het rendement van de (oö)cysten.

11.1.4 Bereken de bepalingsgrens m.b.v. de volgende formule.

$$BPG = \frac{I * Gtp}{Gzp * bV}$$

waarbij:

BPG= bepalingsgrens

bV = bemonsterd volume (l)

Gtp = gewicht van totaal pellet (gram)

Gzp = gewicht van het gezuiverde gedeelte van de pellet dat microscopisch beoordeeld werd (gram)

11.2 Afronding

11.2.1 Afronding bij berekeningen

De berekeningen kunnen worden uitgevoerd in een speciaal daarvoor gemaakt spreadsheet. Voer de getallen

als volgt in: bemonsterd volume : een heel getal (l)

spike-volume : een heel getal (ml)

gewichten : een getal met drie decimalen achter de komma (g)

11.2.2 Afronding bij rapportage

- bemonsterd volume : een heel getal (l)

- onderzocht volume : één decimaal achter de komma (l)

- concentratie (oö)cysten in monster : X (aantal/l)

waarbij : gevonden waarde (N) afronden

N < 1 0,01

1 ≤ N < 10 0,1

10 ≤ N < 100 1

100 ≤ N < 1000 10

N ≥ 1000 a * 10^b waarin a = een getal met één decimaal tussen 1,0 en 9,9
b = een heel getal

- rendement : X (%)

waarbij : gevonden waarde (N) afronden

N < 1 0,01

1 ≤ N < 10 0,1

10 ≤ N < 100 1

12 Kengetallen

12.1 Herhaalbaarheid

Er zijn alleen gegevens beschikbaar van de herhaalbaarheid van de tellingen:

Cryptosporidium : beter dan 10% (bij gem. 260)

Giardia : beter dan 25% (bij gem. 45)

12.2 Binnenlabproduceerbaarheid

De variatiecoëfficiënt van de binnenlab reproduceerbaarheid van de tellingen in één monster door vier analisten bepaald:

Cryptosporidium : beter dan 10% (bij gem. 260)

Giardia : beter dan 15% (bij gem. 45)

12.3 Aantoonbaarheidsgrens

Indien er geen (oö)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia* in het monster worden aangetoond wordt de bepalingsgrens opgeven. De bepalingsgrens is afhankelijk van de hoeveelheid onderzocht monster.

13 Verslag

Vermeld:

- De gegevens die noodzakelijk zijn voor het identificeren van het monster (monstercode van Kiwa, codering van de opdrachtgever, datum monstername e.d.)
- De toegepaste methode : Cryp.1.
- Eventuele bijzonderheden die tijdens het uitvoeren van de bepaling zijn waargenomen.
- Alle niet in het voorschrift voorgeschreven handelingen die het resultaat beïnvloed (kunnen) hebben.
- Het bemonsterde volume.
- Het onderzochte volume.
- Het aantal (oö)cysten per liter monster, uitgesplitst in *Cryptosporidium* en *Giardia*.
- Het rendement van de bepaling. Alleen indien hiervoor een extra monstername ter bepaling van het rendement is aangevraagd door de opdrachtgever. De rendementen van de (oö)cysten van *Cryptosporidium* en *Giardia* worden apart opgegeven.

14 Literatuur

- Nederlandse vereniging voor Microbiologie. Veilig werken met Micro-organismen, Parasieten en cellen in laboratorium en andere werkruimten (1999).
- 'Detection of *Cryptosporidium* and *Giardia* in water.' Report of a visit to the Belleville laboratory of the AWWSCO
Ing. J.S. Vrouwenfelder, SWI 96.111

Bijlage 5 **Het rendement (R_1) voor *Cryptosporidium* (A) en *Giardia* (B) vastgesteld voor de verschillende monstervaten per monsternamedag ten opzichte van de concentratie (oö)cysten in de spike-suspensies, door zowel RIVM als Kiwa**

A

datum	rendement <i>Cryptosporidium</i> (%)							
	RIVM				Kiwa			
	vat 1	vat 2	vat 3	gemiddeld	vat 1	vat 2	vat 3	gemiddeld
280102	12,0	16,4	21,8	16,7	2,8	14,2	7,6	8,2
180202	42,5	40,7	40,0	41,1	29,0	55,3	57,5	47,3
040302	23,6	26,5	46,3	32,1	52,2	96,0	61,9	70,0
110302	26,7	13,5	24,0	21,4	41,9	24,1	59,4	41,8
030602	6,2	5,5	12,9	8,2	9,2	9,2	9,1	9,2
170602	44,8	31,7	41,6	39,4	12,0	7,8	13,0	10,9

B

datum	rendement <i>Giardia</i> (%)							
	RIVM				Kiwa			
	vat 1	vat 2	vat 3	gemiddeld	vat 1	vat 2	vat 3	gemiddeld
280102	2,2	3,4	9,1	4,9	6,9	12,4	16,6	12,0
180202	2,5	2,9	2,0	2,5	7,4	13,9	10,2	10,5
040302	9,7	8,6	12,1	10,1	2,7	6,6	4,5	4,6
110302	4,1	3,9	7,2	5,1	7,9	9,8	6,1	7,9
030602	6,8	9,2	10,6	8,9	16,0	15,6	16,6	16,1
170602	22,5	16,7	17,3	18,8	9,1	15,0	13,2	12,4

Bijlage 6 **Het rendement (R_2) voor *Cryptosporidium* (A) en *Giardia* (B) vastgesteld voor de verschillende monstervaten per monsternamedag ten opzichte van de gemeten concentratie (oö)cysten in de monstervaten, door zowel RIVM als Kiwa**

A

datum	rendement <i>Cryptosporidium</i> (%)							
	RIVM				Kiwa			
	vat 1	vat 2	vat 3	gemiddeld	vat 1	vat 2	vat 3	gemiddeld
280102	21,7	39,9	37,8	33,1	4,3	46,4	14,5	21,7
180202	82,8	119,7	198,8	133,8	9,7	22,8	51,8	28,1
040302	37,4	55,1	81,9	58,1	18,3	25,6	15,8	19,9
110302	63,1	27,0	53,6	47,9	37,9	21,3	67,1	42,1
030602	nd	nd	nd		6,5	6,1	5,9	6,2
170602	nd	nd	nd		17,6	19,7	17,9	18,4

B

datum	rendement <i>Giardia</i> (%)							
	RIVM				Kiwa			
	vat 1	vat 2	vat 3	gemiddeld	vat 1	vat 2	vat 3	gemiddeld
280102	3,3	4,1	11,0	6,1	8,0	16,2	25,5	16,6
180202	3,0	3,6	2,8	3,1	4,3	8,6	4,8	5,9
040302	12,5	13,9	17,7	14,7	0,7	2,5	1,9	1,7
110302	6,5	5,6	15,4	9,2	8,3	12,0	7,6	9,3
030602	nd	nd	nd		7,7	8,7	13,4	9,9
170602	nd	nd	nd		6,5	20,9	13,1	13,5

Bijlage 7 De gemeten concentraties (oö)cysten in de verschillende monstervaten door zowel RIVM als Kiwa

datum	<i>Cryptosporidium</i> (n/L)						<i>Giardia</i> (n/L)					
	RIVM			Kiwa			RIVM			Kiwa		
	vat 1	vat 2	vat 3	vat 1	vat 2	vat 3	vat 1	vat 2	vat 3	vat 1	vat 2	vat 3
280202	270	200	280	300	140	240	340	410	410	160	140	120
180202	510	350	200	1020	760	340	780	780	660	320	280	360
040302	580	440	520	1240	1560	1700	660	520	580	360	240	220
110302	510	600	550	1160	1100	880	620	680	470	600	480	480
030602	nd	nd	nd	840	900	920	nd	nd	nd	1020	900	620
170602	nd	nd	nd	600	300	580	nd	nd	nd	680	300	440

Bijlage 8 De troebelheid van de monsters oppervlaktewater gemeten in de verschillende monstervaten door zowel RIVM als Kiwa

datum	troebelheid (NTU, FNE)							
	RIVM				Kiwa			
	vat 1	vat 2	vat 3	gemiddeld	vat 1	vat 2	vat 3	gemiddeld
280102	23,0	22,9	23,5	23,1	nd	nd	nd	-
180202	33,5	35,6	35,3	34,8	18,0	nd	nd	18,0
040302	41,0	41,1	44,0	42,0	36,0	43,0	43,0	40,7
110302	29,4	29,1	28,8	28,8	28,0	30,0	29,0	29,0
030602	35,4	28,9	29,5	29,5	51,0	49,0	55,0	51,7
170602	21,6	18,1	22,6	22,6	22,0	19,0	23,0	21,3