



Bart Wullings, Kiwa Water Research
 Gerhard Wubbels, Waterlaboratorium Noord
 Harm Veenendaal, Kiwa Water Research
 Dick van der Kooij, Kiwa Water Research

Snelle, kwantitatieve detectie van *Legionella pneumophila* met Q-PCR

Met een nieuw ontwikkelde kwantitatieve real-time PCR-methode (Q-PCR) kan binnen enkele uren de concentratie van *Legionella pneumophila* in een watermonster worden gemeten. De procedure is geoptimaliseerd met een semi-automatische DNA-isolatie en een interne controle voor het vaststellen van het rendement van de opwerking. De reproduceerbaarheid van de Q-PCR-methode is beter dan die van de standaard kweekmethode. In vrijwel alle watermonsters werd met de Q-PCR-methode een hogere concentratie *L. pneumophila* aangetoond dan met de kweekmethode. Oorzaken van dit verschil zijn het hoge rendement van de methode en de aanwezigheid van niet-kweekbare of dode *L. pneumophila*-bacteriën. De herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid van deze methode binnen een laboratorium zijn beter dan of gelijkwaardig aan die van de kweekmethode. De ontwikkelde werkwijze geeft dus snel een betrouwbaar resultaat en kan worden ingezet voor de detectie van *L. pneumophila* in (leiding)water. Chemische desinfectie veroorzaakte meer dan 90 procent reductie van de concentratie van *L. pneumophila*, maar een thermische desinfectie van leidingwater had vrijwel geen effect op het resultaat van de Q-PCR-methode. Een juiste interpretatie van de verkregen resultaten vereist daarom informatie over de herkomst van het watermonsters, zoals een recent uitgevoerde thermische desinfectie.

Eigenaars/beheerders van collectieve leidinginstallaties, die vallen onder het gewijzigde Waterleidingbesluit en het Besluit Hygiëne en veiligheid van zwemgelegenheden dienen tweemaal per jaar een onderzoek naar *Legionella* te laten uitvoeren¹⁾. De waterleidingbedrijven hebben een meetverplichting voor *Legionella* in het drinkwater. Wettelijk is vastgelegd dat de concentratie van legionellabacteriën in leidingwater niet hoger mag zijn dan 100 kolonievormende eenheden per liter. De detectie van *Legionella* wordt uitgevoerd met behulp van de kweekmethode op een vaste voedingsbodem volgens NEN 6265²⁾. Deze methode maakt gebruik van het semi-selectieve Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE)-medium dat de groei van legionellabacteriën mogelijk maakt en de groei van andere bacteriën zoveel mogelijk remt. Storende bijgroei beïnvloedt de kweekmethode echter negatief³⁾. Een belangrijke beperking van de kweekmethode is dat het resultaat van de analyse pas na minimaal

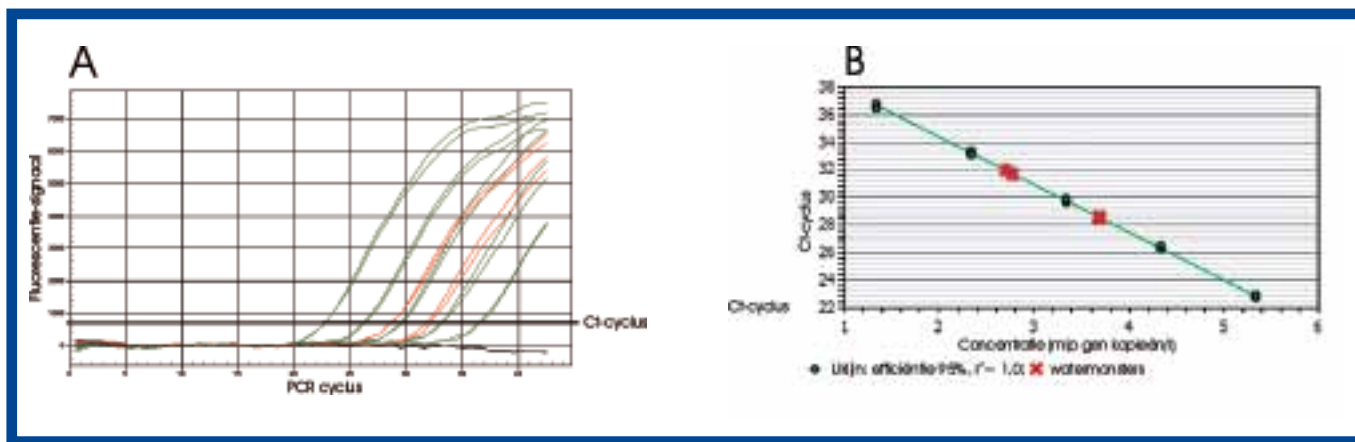
zeven dagen beschikbaar is. In gevallen dat legionellabacteriën worden aangetoond en/of na corrigerende maatregelen is behoefte aan snelle informatie over de concentratie *L. pneumophila*.

Naast *L. pneumophila* kunnen ook andere legionellasoorten, waaronder *L. anisa*, op het BCYE-medium groeien. *L. pneumophila* is verantwoordelijk voor meer dan 90 procent van de gevallen van legionellose⁴⁾. *L. anisa* daarentegen is in Nederland niet waargenomen als veroorzaker van legionellose en in het buitenland slechts zeer incidenteel⁵⁾. De aanwezigheid van kolonies van non-pneumophilasoorten, waaronder *L. anisa*, kan dus eveneens als een nadeel van de huidige kweekmethode worden gezien⁵⁾. Kwantitatieve real-time PCR (Q-PCR) is een veelbelovende detectietechniek, waarmee het geselecteerde micro-organisme snel en met een lage detectiegrens kan worden aangetoond in water en in andere milieus. De Q-PCR-procedure voor bacteriën in water omvat het isoleren van bacteriën met

behulp van filtratie, het openbreken van deze bacteriën, het isoleren van het DNA en vervolgens de detectie van specifiek DNA.

Q-PCR

De polymerase kettingreactie (PCR) is een enzymatische reactie waarmee onder invloed van nauwkeurig gecontroleerde temperatuurwisselingen (cycli) een DNA-fragment tot hoge aantallen kan worden vermenigvuldigd. Voor de detectie van *L. pneumophila* wordt een karakteristiek fragment van het macrophage infectivity potentiator (*mip*)-gen, dat een rol speelt bij het infectieproces⁶⁾, vermenigvuldigd en vervolgens gedetecteerd. De specificiteit van de PCR-reactie is gebaseerd op de verschillen in basenparenvorgorde van het *mip*-gen van legionellasoorten. Met behulp van korte synthetische DNA-moleculen met een specifieke volgorde kan in de PCR het DNA van het *mip*-gen van *L. pneumophila* selectief worden vermenigvuldigd. Bij real-time PCR wordt tijdens de reactie de vorming van de



Afb. 1: Vermenigvuldiging met PCR van een specifiek *L. pneumophila* DNA-fragment in referentiemonsters en watermonsters gemeten als toename van fluorescentie-sig-naal (A) en de overeenkomende ijklijn op basis van de referentiemonsters (B) waarmee de concentratie van *L. pneumophila* in de onbekende monsters kan worden bepaald.

nieuwe fragmenten on-line gevolgd. Deze fragmenten worden gedetecteerd met een synthetische DNA-sonde, gelabeld met een fluorescente kleurstof (afbeelding 1A). Het aantal cycli waarbij het DNA-sig-naal boven de detectiegrens uitkomt (threshold-cyclus of Ct-waarde) is een maat voor de oorspronkelijke DNA-concentratie. De Ct-waarden van de referentiemonsters worden gebruikt voor berekening van een ijklijn (afbeelding 1B). Het rendement en de efficiëntie van de PCR-reactie worden gecontroleerd door toevoeging van een interne controle aan elk monster. Het hiervoor gebruikte DNA-fragment wordt tegelijk met het *mip*-gen van *L. pneumophila* kwantitatief gedetecteerd in een zogeheten multiplex-reactie. Voor dit doel zijn nieuwe volgordes ontwikkeld en ook een sonde die gelabeld is met een andere fluorescente kleurgroep.

Validatie

De prestatiekenmerken selectiviteit, specificiteit, detectiegrens, juistheid, herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid binnen een laboratorium en reproduceerbaarheid tussen laboratoria van de ontwikkelde Q-PCR-methode zijn bepaald volgens de richtlijn 'In gebruikneming van een alternatieve (snelle) methode' (RvA-T2)⁷⁾ (zie kader Presentatiekenmerken). De Q-PCR-methode is voor wat betreft herhaalbaarheid en reproduceerbaarheid binnen een laboratorium beter dan of gelijkwaardig aan de kweekmethode (zie tabel 1). Er waren geen significante verschillen tussen de analyse-resultaten van watermonsters bij twee verschillende laboratoria (gepaarde t-test, 95%). Onderzoek van 38 verschillende legionella-soorten en de analyse van vele watermonsters wijzen uit dat de Q-PCR-methode alleen *L. pneumophila* detecteert. De specificiteit is hoog ten opzichte van de kweekmethode; in 26 van de 28 kweekpositieve watermonsters werd *L. pneumophila* ook met de Q-PCR aangetoond. In de twee overige monsters (koelwater) was de concentratie vrijwel gelijk aan de detectiegrens van de PCR-methode. Deze detectiegrens is 5 *mip* kopieën/PCR met een betrouwbaarheid van 95 procent. De detectiegrens van de gehele Q-PCR-procedure is afhankelijk van het gefiltreerde monstervolume en is 100 *mip* kopieën/l bij onderzoek van 0,5 liter water.

Vergelijking met de standaard kweekmethode

De Q-PCR-methode is in een aantal watermonsters vergeleken met de standaard kweekmethode (NEN6265). De kwantitatieve uitslag van de Q-PCR-methode is met het rendement van de interne controle gecorrigeerd voor eventuele verliezen tijdens de DNA-isolatie en mogelijke remming van de DNA-vermenigvuldiging. Het resultaat van de Q-PCR-methode komt over een range van 6 logeenheden zeer goed overeen met het resultaat van de kweekmethode, bij direct uitspatelen van monsters uit een experiment waarbij *L. pneumophila* groeit in aanwezigheid van kunststoffen. De resultaten van de Q-PCR-methode in praktijkmonsters zijn meestal hoger dan het resultaat van de kweekmethode (zie afbeelding 2).

Hiervoor zijn meerdere verklaringen:

- Het rendement van de DNA-isolatie bij de Q-PCR-methode is hoger dan het rendement van de isolatie van legionella-bacteriën met de kweekmethode;
- De PCR-methode toont zowel dode als levende bacteriën aan. Het is mogelijk dat

een deel van de *L. pneumophila*-bacteriën in een monster niet meer kweekbaar of dood is;

- De groei van *L. pneumophila* op het kweekmedium kan bij bepaalde watertypen worden geremd door andere bacteriën, bijvoorbeeld bij koelwatermonsters met een hoge biologische activiteit.

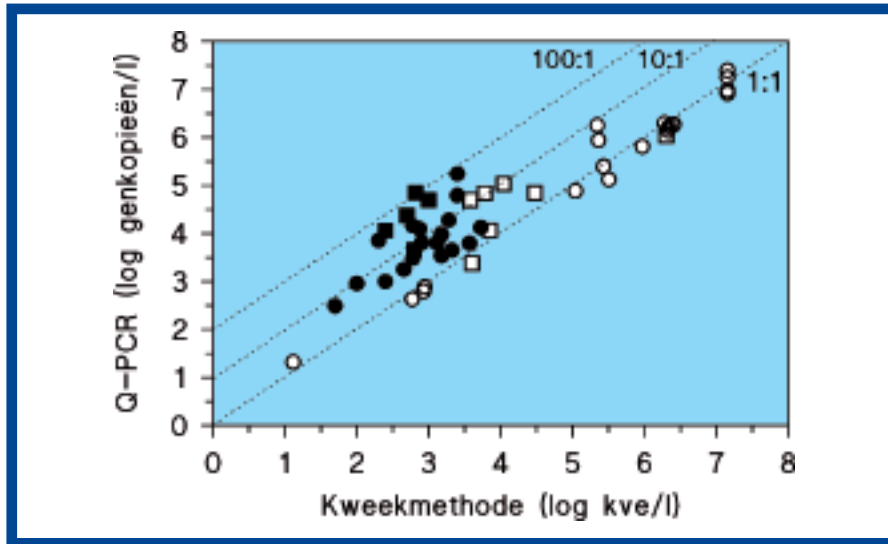
Betekenis van het resultaat van de PCR-methode

Voor een snelle screening van het water op de aanwezigheid van *L. pneumophila* is de Q-PCR-methode zeer geschikt. Mits de controles goed zijn, is een negatieve uitslag betrouwbaar. Is de uitslag positief, dan is DNA van *L. pneumophila* aanwezig. Eventueel aanwezig vrij DNA werd na filtratie van het water vrijwel niet meer gedetecteerd. Thermische of chemische desinfectie reduceren de concentratie van de kweekbare legionellabacteriën. In het laboratorium is in batchtesten het effect van verschillende in de praktijk toegepaste desinfectiemethoden geanalyseerd met de kweekmethode en met Q-PCR. De kweekmethode leverde voor de monsters na behandeling steeds een laag

Tabel 1. Prestatiekenmerken van de Q-PCR-methode.

prestatiekenmerk*	concentratie in test (cellen/ml)	Q-PCR		kweekmethode*
		interne controle	<i>L.pneumophila</i>	
juistheid (relatieve concentratie, %)	$4,5 \times 10^2$	57 ± 15	72 ± 25	n.b.
	$4,5 \times 10^4$	71 ± 15	57 ± 16	n.b.
herhaalbaarheid (relatieve standaardafwijking, %)	$4,5 \times 10^2$	19	46	n.b.
	$4,5 \times 10^4$	19	21	59***
reproduceerbaarheid binnen laboratorium (relatieve standaardafwijking, %)	$4,5 \times 10^2$	53	47	n.b.
	$4,5 \times 10^4$	61	41	46****
reproduceerbaarheid tussen laboratoria	praktijkmonsters	moet worden bepaald		n.b.
detectiegrens	n.v.t.		100 <i>mip</i> -kopieën/l**	50 kve/l

* = gegevens Kiwa Water Research, ** = bij onderzoek van 0,5 l water, *** = niveau $9,5 \times 10^3$ kve/l, **** = niveau $1,0 \times 10^4$ kve/l.



Afb. 2: *L. pneumophila* in drinkwater en in koelwater bepaald met de Q-PCR-methode en correctie met het rendement van interne controle en de kweekmethode.

● = leidingwater (kweekmethode inclusief filtratie), ■ = koelwater (kweekmethode inclusief filtratie), □ = koelwater (water direct uitgespateld op kweekmedium) en ○ = laboratoriumculturen gegroeid in water met zacht PVC (water direct uitgespateld op kweekmedium). De gestippelde lijnen geven de verhouding aan tussen de aantallen gedetecteerd met de Q-PCR-methode en die van de kweekmethode.

aantal of negatief resultaat (zie tabel 2). Na een thermische behandeling was met de Q-PCR zelfs na een week nog geen afname waarneembaar van de concentratie *L. pneumophila*. In de praktijk zal een dergelijke situatie niet optreden, omdat de dode bacteriën uitspoelen. Chemische

desinfectie veroorzaakte wel een sterke afname van de concentratie van *L. pneumophila* die werd waargenomen met de Q-PCR-methode. Na behandeling met 5 mg/l vrij chloor of direct na toepassing van waterstofperoxide werden echter nog wel (dode) *L. pneumophila* waargenomen.

Na thermische desinfectie kan de Q-PCR-methode voor de detectie van *L. pneumophila* dus alleen als screenende methode (aan-/afwezigheid) worden ingezet. Na chemische desinfectie is de methode ook kwantitatief inzetbaar, maar voor een goede interpretatie van de resultaten is informatie over de uitgevoerde maatregelen en de aard van het watersysteem nodig.

Toepassing in de praktijk

De Q-PCR-methode kan worden ingezet als snelle detectiemethode in gevallen waarbij *Legionella* is aangetroffen en behoefte is aan snelle informatie over de concentratie bacteriën en/of het effect van corrigerende maatregelen. Het is ook mogelijk de Q-PCR-methode in te zetten in plaats van de kweekmethode: de kostprijs van de Q-PCR-methode bij meer dan 25 monsters per dag bedraagt 40 tot 60 euro per monster en is daarmee vergelijkbaar met de kosten van de kweekmethode. De uitslag is bovendien binnen een dag bekend. Dit geldt ook voor monsters waarbij met de kweekmethode non-pneumophilasoorten worden aangetoond. Bij een positief Q-PCR-resultaat kan op basis van de herkomst van het monster dezelfde dag worden besloten om het betreffende monster of een herhalingsmonster ook met de kweekmethode te analyseren. De extra kosten die gemaakt worden voor de Q-PCR-positieve monsters, wegen op tegen de snelle uitslag van de monsters waarin geen *L. pneumophila* wordt aangetoond. Voor een uniforme toepassing van de ontwikkelde Q-PCR-methode dient de werkwijze in een normvoorschrift te worden vastgelegd.

Het onderzoek naar de ontwikkeling en validatie van een snelle en kwantitatieve detectiemethode van *L. pneumophila* met Q-PCR is uitgevoerd in opdracht van VROM Inspectie en maakt deel uit van het onderzoek dat Kiwa Water Research uitvoert in opdracht van de waterleidingbedrijven.

Presentatiekenmerken

- selectiviteit: de mogelijkheid om met de methode alleen het gewenste micro-organisme te meten (vals-positief)
- specificiteit: de gevoeligheid van de methode voor (andere) componenten in het monster (vals-negatief)
- detectiegrens: de laagste concentratie in een analysemonster die significant verschilt van de meting in de blanco
- juistheid: de mate van overeenkomst tussen het meetresultaat van de methode en de ware waarde (bijvoorbeeld microscopische celtelling)
- herhaalbaarheid: een maat voor de spreiding tussen meetwaarden van identieke monsters getest op één dag onder dezelfde omstandigheden
- reproduceerbaarheid binnen een laboratorium: een maat voor de spreiding tussen de resultaten van identieke monsters die zijn geanalyseerd onder verschillende omstandigheden (controlekaart van de controlemonsters)
- reproduceerbaarheid tussen laboratoria: een maat voor de spreiding tussen de resultaten van identieke monsters die zijn geanalyseerd door verschillende laboratoria

LITERATUUR

- 1) www.rivm.nl. Meldingsplichtige ziekten.
- 2) Anonymous (1991). NEN6265. Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek naar de aanwezigheid en aantal kolonievormende eenheden (KVE) van legionellabacteriën. NNI.
- 3) Van der Kooij D., H. Veenendaal en B. Wullings (2003). Kwantitatieve bepaling van *Legionella* in water: na 21 jaar nog in de kinderschoenen! H₂O nr. 4, pag. 21-23.
- 4) Fields B., R. Benson en R. Besser (2002). Legionella and legionnaires disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev. nr. 15, pag. 506-526.
- 5) Van der Kooij D., G. Wubbels en G. Veenendaal (2007). Legionellabacteriën in leidingwaterinstallaties behoren meestal tot de ongevaarlijke soort *Legionella anisa*. H₂O nr. 5, pag. 33-35.
- 6) Engleberg N., C. Carter, D. Weber, N. Cianciotto en B. Eisenstein (1989). DNA sequence of mip, a Legionella pneumophila gene associated with macrophage infectivity. Infect. Immun. nr. 57, pag. 1263-1270.
- 7) Anonymous (2004). RvA-T2. Toelichtend document microbiologie.

Tabel 2. Detectie van *L. pneumophila* in drinkwater voor en na desinfectie in een laboratoriumtest.

desinfectie	testcondities	<i>L. pneumophila</i> na behandeling					
		kweek (KVE/ml)	Q-PCR (% t.o.v. controle)*				
			t = 0 uur	t = 4 uur	t = 1 dag	t = 2 dagen	t = 7 dagen
controle	-	9,5 x 10 ³	100	100	100	100	100
thermisch	60°C, 20'	6,5 x 10	geen afname				
thermisch	70°C, 5'	<3	geen afname				
chloor	5 mg/l, 30'	<3	10,0	9,4	18,9	9,4	40,0
chloor	20 mg/l, 30'	<3	0,4	0,4	0,6	0,1	0,3
Herlisil (H ₂ O ₂)	200 ppm, 16h	3,0 x 10	320		121		0,5

* = niet aangetoond