

Kwantitatieve bepaling van Legionella in water: na 21 jaar nog in kinderschoenen!

DICK VAN DER KOOIJ, KIWA WATER RESEARCH

HARM VEENENDAAL, KIWA WATER RESEARCH

BART WULLINGS, KIWA WATER RESEARCH

De kwantitatieve detectie van *Legionella* in (leiding)water wordt uitgevoerd met behulp van een semi-selectieve voedingsbodem. De vereiste selectiviteit van deze werkwijze gaat echter ten koste van de opbrengst, terwijl toepassing op standaardmonsters een grote spreiding in de resultaten te zien geeft. Een verdergaande standaardisatie van de kweekmethode is gewenst. Inmiddels komen PCR-technieken beschikbaar die binnen enkele uren een specifiek en kwantitatief resultaat kunnen leveren. Aanbevolen wordt om de bepaling van *Legionella*-bacteriën in leidingwater te richten op *L. pneumophila*, waarbij een PCR-methode voor snelle screening wordt toegepast, en positieve monsters nader worden onderzocht met de kweekmethode.

Al enkele decennia is bekend dat de aanwezigheid van *Legionella*-bacteriën in warm leidingwater bij aerosolvorming een potentieel risico vormt voor de gezondheid van de gebruiker. Onderzoek naar de aanwezigheid van *Legionella*-bacteriën in leidingwaterinstallaties kreeg een sterke impuls door de uitbraak van legionellose te Bovenkarspel en de daaropvolgende regelgeving. De betekenis van aantallen die worden waargenomen met de kweekmethode is echter een onderwerp van voortdurende discussie, mede door het opnemen van criteria in wettelijke regelingen en voorschriften. Een belangrijke vraag hierbij is of de gehanteerde kweekmethode wel een juist beeld geeft van de concentratie *Legionella*-bacteriën in een monster.

Hieronder worden de ontwikkeling, de mogelijkheden en de beperkingen van de kweekmethode en van moleculaire technieken voor detectie van *Legionella* in water beschreven. Tevens wordt een aanpak voorgesteld waarmee snel duidelijke informatie over aantallen en aard van de *Legionella*-bacteriën in water kan worden verkregen.

Ontwikkeling voedingsbodem

Eind 1976 ontdekte McDade van het Centers for Disease Control (CDC) in Atlanta (V.S.) de bacterie die in juli van dat jaar in Philadelphia een tot dan toe onverklaarde uitbraak van long-

ontsteking had veroorzaakt onder deelnemers aan een congres voor oorlogsveteranen. Het organisme werd waargenomen in de milt van cavia's die waren geïnfecteerd met longweefsel van enkele slachtoffers. Begin 1977 bleek groei ook mogelijk op een complexe voedingsbodem verrijkt met haemoglobine en een mengsel van aminozuren en vitamines¹. Analyse van de toegevoegde componenten wees uit dat het zwavelhoudende aminozuur L-cysteïne en een oplosbare ijzerverbinding (ijzerpyrofosfaat) onmisbaar waren voor de groei die optimaal was bij pH-waarden tussen 6,9 en 7,1. Op basis van deze kennis kwam een voedingsbodem beschikbaar voor detectie van *Legionella* in klinisch materiaal. Al snel volgde verdere optimalisatie door toepassing van gistextract in plaats van gehydrolyseerde caseïne, toevoeging van actieve kool om toxische stoffen op te nemen en gebruik van een organische buffer (ACES) om de gewenste pH-waarde te handhaven².

In 1979 bleek dat legionellose kon worden veroorzaakt door *Legionella pneumophila* in warm leidingwater³. De *Legionella*-bacteriën waren geïsoleerd met behulp van cavia's na injectie met geconcentreerd bacteriemateriaal uit water. Deze werkwijze heeft echter grote nadelen (gebruik van proefdieren, omslachtig en ongevoelig). Het aantreffen van *Legionella* in leidingwater versterkte dan ook de vraag naar een betere detectiemethode. Bij toepassing

van de beschikbare voedingsbodem bleek dat groei van *Legionella*-bacteriën sterk werd gehinderd door andere in het water aanwezige snel groeiende bacteriën. De voedingsbodem werd aangepast door toevoegingen van antibiotica (polymyxine B, anisomycine en cefamandol) en α -ketoglutaarzuur. Dit Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) medium gaf bij een onderzoek van water en sputum het hoogste percentage monsters met *Legionella pneumophila*⁴. Nog hogere percentages *Legionella*-positieve monsters werden verkregen door zuurbehandeling (pH 2,2) of hittebehandeling (30 minuten bij 50°C) van het te onderzoeken monster^{5,6}. Concentreren van *Legionella* met behulp van membraanfiltratie maakte het mogelijk om ook relatief lage aantallen *Legionella* te detecteren. Membraanfilters van polycarbonaat en een poriegrootte van 0,2 μ m zijn hiervoor het meest geschikt⁷. Na filtratie van het watermonster worden de bacteriën met ultrasone trillingen in een klein volume water losgemaakt van het membraanfilter. Het BCYE-medium, in combinatie met hittebehandeling en membraanfiltratie, is opgenomen in de in 1991 genormaliseerde werkwijze (NEN 6265) voor de bepaling van *Legionella* in water.

Beperkingen kweekmethode

Het door Edelman en collega's ontwikkelde medium was primair bedoeld om de aanwezigheid van *L. pneumophila* in klinisch materiaal en in water aan te tonen. Op deze wijze kan een diagnose worden gesteld, kan het organisme worden geïsoleerd voor nader onderzoek en kan de bron van infectie worden opgespoord. Het aantal bacteriekolonies op het oppervlak van de voedingsbodem (zie foto) geeft informatie over het aantal kweekbare *Legionella*-bacteriën per volume-eenheid onderzocht water. De opbrengst (aantal kolonievormende eenheden) van *Legionella*, waarvan thans 46 soorten zijn beschreven, wordt echter beïnvloed door meerdere factoren, met name de volgende:

- Zuurbehandeling en ook hittebehandeling van het monster leidt niet alleen tot

Kolonies van *Legionella pneumophila* op BCYE-medium. Bolle gladde kolonie: serogroep 1; platte ruwe kolonie: serogroep 6.



inactivatie van micro-organismen die de bepaling verstoren, maar heeft ook effect op *Legionella*⁹⁾. Dit effect hangt af van de aard en de conditie van de aanwezige *Legionella*-bacteriën en verschilt dus per type water/monster;

- Antibiotica remmen ook de groei van *L. pneumophila* en van andere *Legionella*-soorten¹⁰⁾. Ook hierbij verschilt het effect per type water/monster;
- Een aantal van de beschreven *Legionella*-soorten, waaronder ziekteverwekkende soorten zoals *L. longbeachae*, *L. bozemanii* en *L. micdadei*, kan zich niet (goed) vermeerderen op de voedingsbodem;
- *Legionella*-soorten, die groeien zonder cysteine (bijvoorbeeld *L. oakridgensis*) worden door de huidige bevestigingsprocedure niet als *Legionella* gekarakteriseerd;
- De opbrengst van concentreren van *Legionella* met behulp van membraanfiltratie is onvolledig en variabel^{7,8,9)}. De membraanfilters van polycarbonaat zijn moeilijk hanteerbaar.

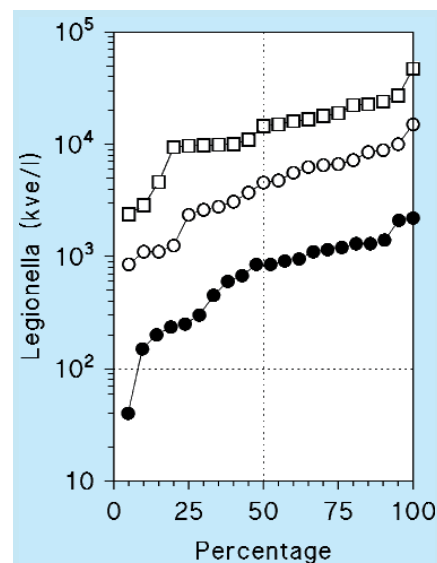
Onderdrukken van de groei van storende bacteriën gaat onvermijdelijk gepaard met inactivatie van een (onbekend) deel van de *Legionella*-bacteriën, dat wil zeggen verbetering van de selectiviteit gaat ten koste van de opbrengst. In bepaalde watertypen met hoge aantallen storende bacteriën (koeltoren, oppervlaktewater, afvalwater) lukt het ook met de beschreven werkwijze (vaak) niet om *Legionella* aan te tonen. De effecten van bovengenoemde factoren op de opbrengst zijn onder meer afhankelijk van de conditie en de aard van de aanwezige *Legionella*-bacteriën, storende bacteriën en deeltjes. Onderlinge vergelijking van aantallen waargenomen in verschillende watertypen wordt hierdoor belemmerd. Dit probleem wordt nog vergroot door de uiteenlopende aantallen die door verschillende laboratoria worden verkregen bij onderzoek van één type monster met de genormaliseerde bepaling. Uit ringonderzoeken van homogene watermonsters met *L. pneumophila* vermeerderd in water, blijkt dat de aantallen die door 20 geaccrediteerde laboratoria werden gemeld onderling meer dan een factor 10 kunnen verschillen (afbeelding 1). Voor de hoogst scorende 50 procent van de laboratoria is dit een factor 3. De oorzaken van deze verschillen moeten waarschijnlijk worden gezocht in verschillen in toepassing van de hittebehandeling, het type membranen en de samenstelling van de voedingsbodem. Onderdelen van de werkwijze zijn kennelijk nog onvoldoende gestandaardiseerd. Dit blijkt ook uit de invloed van de wijze waarop de pH van de voedingsbodem wordt gecorrigeerd (zie H₂O nr. 9 van 3 mei 2002, pag. 15)¹¹⁾.

Deze informatie leidt 21 jaar na de ontwikkeling van het BCYE-medium tot de conclusie dat het koloniegetal op deze voedingsbodem een onbekende fractie vormt van de concentratie van bacteriën behorende tot de soort *L. pneumophila*. Voor het totale aantal *Legionella*-bacteriën is de situatie nog onduidelijker. Het koloniegetal geeft dus (nog) geen goede kwantitatieve informatie over de aanwezigheid van *Legionella* in leidingwater. Dit aspect en verschillen in aard (soort/serogroep) van de gedetecteerde *Legionella*-bacteriën maken het koloniegetal bovendien ongeschikt voor de bepaling van de mate van blootstelling (infectierisico) aan ziekteverwekkende *Legionella*-typen. Onduidelijkheid over het representatieve karakter van de monsters en aerosolvorming versterken laatstgenoemd aspect.

Ontwikkeling van moleculaire technieken

Reeds in 1985 werden pogingen ondernomen om *Legionella* op te sporen met behulp van zogeheten DNA-probes, stukjes genetisch materiaal (DNA) met een voor *Legionella* karakteristieke volgorde van de basenparen. De hoge detectiegrens (10⁴-10⁵-eenheden) belemmerde de toepassing van deze werkwijze. De ontwikkeling van de polymerase kettingreactie (PCR) in 1988 maakte het mogelijk om karakteristiek genetisch materiaal kunstmatig sterk (tot 10¹⁰x) vermeerderen. Detectie van (het DNA van) één enkele bacterie is hierdoor in theorie haalbaar.

Binnen enkele jaren bleek dat op PCR-gebaseerde technieken voor de detectie van *Legionella* inderdaad voldeden aan hoge eisen met behulp van gevoeligheid en specificiteit. Door gebruik te maken van specifieke 'probes', met name gebaseerd op het voor *Legionella* karakteristieke mip (macrophage-infectivity protein)-gen dat in 1989 was geanalyseerd, bleek het mogelijk om *L. pneumophila* aan te tonen¹²⁾. Ook voor de detectie van *L. longbeachae*, die in Australië via compost kan worden overgebracht, is een detectiemethode gebaseerd op het mip-gen ontwikkeld¹³⁾. PCR-methoden gebaseerd op andere 'probes' zijn eveneens beschikbaar. Met een PCR-methode gericht op het 16S rRNA-gen is het bovendien mogelijk om alle *Legionella*-bacteriën (vertegenwoordigers van het geslacht *Legionella*) te detecteren. Voordelen van technieken gebaseerd op de PCR-methode zijn de specificiteit, de lage detectiegrens en de korte tijd waarbinnen resultaat wordt verkregen. PCR in combinatie met gel-electroforese geeft binnen zes tot acht resultaat, Real Time PCR in enkele uren¹⁴⁾. In het kader van onderzoek uitgevoerd binnen het BTO-programma heeft Kiwa Water Research PCR-methoden gecombineerd met gel-electroforese voor de detectie van *Legionella*-bacteriën en van *L. pneumophila* in (leiding)water geoptimaliseerd. Bij toepassing



Afb. 1: Cumulatieve frequentieverdelingen van de aantallen *Legionella*-bacteriën in een drietal monsters bij een ringonderzoek met 20 geaccrediteerde laboratoria.

van deze methoden is gebleken dat *Legionella*-achtige bacteriën algemeen voorkomen, terwijl *L. pneumophila* niet in drinkwater (voor de watermeter) is aangetroffen.

Beperkingen moleculaire technieken

Isolatie van het DNA uit water voor de uitvoering van de PCR-methode is een relatief arbeidsintensieve handeling. De aanwezigheid van bepaalde stoffen, waaronder ijzer, kan de PCR-reactie met het geïsoleerde DNA verstoren waardoor geen resultaat wordt verkregen. De interpretatie van het resultaat wordt bemoeilijkt door het feit dat ook DNA van dode cellen met de PCR-methode wordt waargenomen. Een andere beperking van de PCR-methode is uiteraard dat geen levend materiaal wordt verkregen. Verder is een behoorlijke mate van deskundigheid nodig voor de uitvoering van de techniek en voor de interpretatie van het resultaat.

Aanpak voor kwantitatieve detectie van *Legionella*

Kwantitatieve informatie over *Legionella*-bacteriën in leidingwater is van belang voor het opsporen en beoordelen van risicosituaties, het bepalen van effecten van beheersmaatregelen en voor onderzoek naar factoren die van invloed zijn op de vermeerdering van *Legionella* in water. Door gebruik te maken van de sterke kanten van de kweekmethode en van de moleculaire methoden kan een optimale aanpak worden ontwikkeld. Met de PCR-methode kan specifiek het aantal *L. pneumophila* worden bepaald. De detectie van *L. pneumophila* is van groot belang, omdat het overgrote deel (groter dan 90 procent) van de gerapporteerde gevallen van legionellose door dit organisme wordt veroorzaakt. Een PCR-methode met gel-electrofo-

rese is hiervoor beschikbaar. Op korte termijn komen tevens methoden beschikbaar gebaseerd op Real Time PCR. Een eerste stap is validatie en standaardisatie van deze werkwijzen, die vervolgens kunnen worden toegepast als screeningsmethode. Bij een positief resultaat, bijvoorbeeld meer dan 100 of 1000 DNA kopieën per liter (afhankelijk van de herkomst van het monster), kan (binnen een dag) worden besloten om het betreffende monster ook met de kweekmethode te analyseren. Voorwaarde voor de toepassing van de kweekmethode is dat de standaardisatie van deze werkwijze wordt verbeterd. Detectie van *L. pneumophila* staat hierbij centraal. Dit betekent dat ook optimalisatie en standaardisatie van de bevestiging en de typering (*Legionella* soort/serogroep) nodig is. Desgewenst kunnen PCR-methoden worden geoptimaliseerd of ontwikkeld voor de specifieke detectie van bepaalde *Legionella*-soorten, bijvoorbeeld *L. bozemanii* en *L. micdadei*. Tevens kan het totale aantal *Legionella*-bacteriën worden bepaald voor onderzoek naar factoren die de groei van *Legionella* beïnvloeden.

De beschreven aanpak geeft snel kwantitatieve informatie over relevante *Legionella*-bacte-

riën in (leiding)water. Deze informatie bevordert een effectieve(re) beheersing van *Legionella*. 

LITERATUUR

- 1) McDade J., C. Shephard, D. Fraser, T. Tsai, M. Redus en W. Dowdle (1977). Legionnaires' disease. Isolation of a bacterium and demonstration of its role in other respiratory disease. *New. Eng. J. Med.* nr. 22, pag. 1197-1203.
- 2) Feeley J., R. Gibson, G. Gorman, N. Langford, J. Rasheed, D. Macken en W. Baine (1979). Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* nr. 4, pag. 437-441.
- 3) Tobin J., M. Dunnill, M. French, P. Morris, J. Beare, S. Fisher Hoch, R. Mitchell en M. Muers (1980). Legionnaires: disease in a renal transplant unit, isolation of the causative agent from shower baths. *Lancet* july, pag. 118-121.
- 4) Edelstein P. (1981). Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J. Clin. Microbiol.* nr. 3, pag. 298-303.
- 5) Bopp C., J. Summer, G. Morris en J. Wells (1981). Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. *J. Clin. Microbiol.* nr. 4, pag. 714-719.
- 6) Groothuis D. en H. Veenendaal (1983). Heat treatment as an aid for the isolation of *Legionella pneumophila* from clinical and environmental samples. *Zbl. Bakt. Hyg. Orig. A.* nr. 255, pag. 39-43.
- 7) Smith L., K. Carroll en S. Mottice (1993). Comparison of membrane filters for recovery of *Legionellae* from water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* nr. 1, pag. 344-346.
- 8) Boulanger C. en P. Edelstein (1995). Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.* nr. 5, pag. 1805-1809.
- 9) Roberts K., C. August en J. Nelson (1987). Relative sensitivities of environmental *Legionella* to selective isolation procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* nr. 12, pag. 2704-2707.
- 10) Lee T., R. Vickers, V. Yu en M. Wagener (1993). Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study. *J. Clin. Microbiol.* nr. 10, pag. 2764-2768.
- 11) In 't Veld S. en J. de Wagt (2002). Snelle herziening van NEN 6265 *Legionella*-onderzoek aanbevolen. *H₂O* nr. 9, pag. 15-16.
- 12) Bej. A., M. Mahbubani en R. Atlas (1991). Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl. Environ. Microbiol.* nr. 2, pag. 597-600.
- 13) Saint C. en L. Ho (1999). A PCR test for the identification and discrimination of *Legionella longbeachae* serogroups 1 and 2. *J. Microbiol. Meth.* pag. 245-253.
- 14) Ballard A., N. Fry, L. Chan, S. Surman, J. Lee, T. Harrison en K. Towner (2000). Detection of *Legionella pneumophila* using a real-time PCR hybridization assay. *J. Clin. Microbiol.* nr. 11, pag. 4215-4218.α