



Frank Oesterholt, KWR Watercycle Research Institute
Lambèr Paping, Dow Benelux, thans TU Delft
Harm Veenendaal, KWR Watercycle Research Institute
Dick van der Kooij, KWR Watercycle Research Institute

Combinatie Q-PCR en specifieke kweekmethode efficiënt voor screening proceswatermonsters op *Legionella*

Om industriële koelwater- en proceswatersystemen optimaal te beheren en te controleren is een snelle en betrouwbare analysemethode nodig voor het bepalen van de concentratie *Legionella*. In zes weken zijn monsters uit 15 koelwater- en vier proceswatersystemen onderzocht op aanwezigheid van *Legionella* en/of *Legionella pneumophila*. Daarbij zijn tien analysetechnieken gebruikt. Uit dit onderzoek blijkt dat een efficiënt analyseschema voor koel- en proceswater bestaat uit Q-PCR-analyse voor *Legionella pneumophila* (conform ontwerp NEN 6254), desgewenst - bij positief resultaat - gevolgd door een specifieke kweekmethode (bijvoorbeeld de methode volgens NEN 6265 met MWY-medium¹⁾).

Monitoring van *Legionella* maakt bij veel industrieën een integraal onderdeel uit van het veiligheidsbeleid. Bedrijven als DOW en Corus hebben ervaren dat de toepassing van NEN 6265²⁾ voor de detectie van *Legionella* in koel- en proceswater lastig is als gevolg van de complexe monstrematrix³⁾. Om die reden heeft de industrie behoefte aan een snelle en betrouwbare analysemethode voor de detectie van *Legionella* in hun koel- en proceswater. Op grond van de in het Arbo-informatieblad (AI-32)⁴⁾ voorgestelde grenswaarden in koelwater is een analysemethode nodig met een detectiegrens van 1.000 legionellabacteriën per liter of lager.

Op basis van recente ontwikkelingen op analytisch gebied bij KWR, waarover eerder is gerapporteerd in dit tijdschrift^{1),5)}, is een alternatief analyseschema opgezet voor de bepaling van *Legionella* in koel- en proceswater (zie afbeelding 1). In dit schema staat een snelle screening van monster-series op *Legionella pneumophila* centraal, uitgaande van een kwantitatieve 'real time' PCR-methode (Q-PCR)⁵⁾. Als de Q-PCR een positief resultaat geeft, kan vervolgens alsnog worden besloten een specifieke

kweekmethode voor *Legionella pneumophila* in te zetten voor het aantonen van de kweekbaarheid (levensvatbaarheid) van de bacteriën en/of voor nadere typering¹⁾.

Centraal stellen van de Q-PCR-methode volgens ontwerp NEN 6254⁶⁾ zorgt dat de analyse volgens het schema in afbeelding 1 expliciet focust op de bepaling van *Legionella pneumophila*. Dat lijkt wellicht een beperking, maar *Legionella pneumophila* is wereldwijd de belangrijkste veroorzaker van legionellose⁷⁾. Een selectieve, betrouwbare en snelle methode voor dit organisme is te prefereren boven een slecht presterende kweekmethode waarmee meerdere legionel-lasoorten zijn aan te tonen.

Opzet en uitvoering

Het onderzoek is uitgevoerd binnen het Onderzoeksprogramma Industrie en Water, waarbij de zes industriële deelnemers monsters hebben aangeleverd uit eigen koel- en proceswatersystemen. Om een representatieve en zo uniform mogelijke bemonstering te realiseren, is hiervoor eerst een algemeen bemonsteringsprotocol opgesteld. Dit stelt voorwaarden aan de uitvoering van de monsterneming, zoals het

meest geschikte moment en de beste positie (zie kader).

De bruikbaarheid van het schema is getest en geëvalueerd bij het onderzoek van 52 monsters uit 15 koelwatersystemen en vier proceswatersystemen. De door de bedrijven geselecteerde watersystemen

Bij de bemonstering van een koelwater-systeem is de volgende voorkeursvolgorde gehanteerd voor de positie van de monsterneming:

- bemonstering van het vallende water in de vrije ruimte boven het koelwaterbassin,
- bemonstering van het water in het koelwaterbassin op een positie zo dicht mogelijk bij de aanzuigleiding van de recirculatiepomp,
- bemonstering vanuit een monsterkraan in de persleiding van de recirculatiepomp zo dicht mogelijk bij de koeltoren. Dit water is goed gemengd en wordt getransporteerd naar de sproeiverdelers waar aërosolvorming plaatsvindt.

hebben in bijna alle gevallen een 'legionellahistorie'. Van de koelwatersystemen worden zeven systemen discontinu en drie systemen continu met natriumhypochloriet gedesinfecteerd. Verder wordt in twee systemen continu met waterstofperoxide, in één systeem met ozon en in één systeem met een ultrasoonmethode gedesinfecteerd. In de andere systemen wordt geen desinfectie toegepast. Alle watermonsters zijn onderzocht met de in de tabel genoemde detectiemethoden, waaronder drie verschillende Q-PCR-technieken en twee specifieke kweekmethoden voor *Legionella pneumophila* (met BCYE- en MWY-medium). Daarnaast zijn ter vergelijking de 'klassieke' methoden toegepast (NEN 6265, ISO 11731 en de NEN 6265 met MWY-medium). Ten slotte is een kwalitatieve veldtest (Fastpath) toegepast, gebaseerd op een chromatografische test op basis van een immuno-assay dat zich richt op antigenen van *Legionella pneumophila* serogroep 1.

Resultaten screeningmethode

De beide detectiemethoden waarbij de Q-PCR volgens ontwerp-NEN 6254 en de specifieke kweek van *Legionella pneumophila* gebaseerd op NEN 6265 (met MWY-medium)¹⁾ zijn toegepast (volgens het schema in afbeelding 1), lieten de volgende resultaten zien:

- 33 van de 52 monsters (63,5 procent) gaven een positief resultaat na toepassing van de Q-PCR;
 - Bij 16 monsters was ook bij de specifieke kweekmethode sprake van een positief resultaat;
 - Bij 9 monsters werd met de specifieke kweekmethode geen resultaat verkregen door teveel bijgroei op de agarplaat;
 - Bij 8 monsters werden geen levensvatbare legionellabacteriën gedetecteerd met de specifieke kweekmethode (< detectiegrens);
- Bij 11 monsters (21 procent) lag zowel het resultaat van de Q-PCR als het resultaat van de kweekmethode onder de detectiegrens;
- Bij 5 monsters (9,6 procent) kon voor de Q-PCR geen resultaat worden gegeven, omdat het rendement van de interne controle beneden de grenswaarde lag voor een betrouwbare analyse. Drie van deze monsters zijn afkomstig uit proceswatersystemen in de papierindustrie. De bijzonder complexe matrix van dit type water veroorzaakte kennelijk remming van de Q-PCR;
- Bij 3 monsters (5,8 procent) lag het resultaat van de Q-PCR onder de detectiegrens, terwijl met de kweekmethode geen resultaat kon worden verkregen door teveel bijgroei op de voedingsbodem;
- Er zijn geen vals-negatieve resultaten behaald met de Q-PCR-methode: in geen enkel geval zijn geen DNA-kopieën aangetroffen bij de Q-PCR, terwijl wel kolonies werden aangetroffen op de voedingsbodem bij de kweekmethode.

Dat in acht van de 33 monsters de resultaten van de Q-PCR positief waren, terwijl de kweekmethode een negatieve

uitslag gaf, geeft aan dat op het moment van monsterneming weliswaar geen kweekbare *Legionella pneumophila* in het monster aanwezig was, maar dat er nog wel onvolledig gelyeerde legionellabacteriën gedetecteerd konden worden. Dit is een typisch resultaat. Na toepassing van het schema uit afbeelding 1 als in het bemonsterde systeem een thermische of chemische desinfectie is uitgevoerd. Het geeft aan dat er een effectieve desinfectie is geweest, maar het is ook een indicatie dat tenminste gedurende bepaalde periodes (bijvoorbeeld tussen twee desinfecties) of in bepaalde delen van het systeem nog legionellabacteriën aanwezig zijn.

Vergelijking detectiemethoden

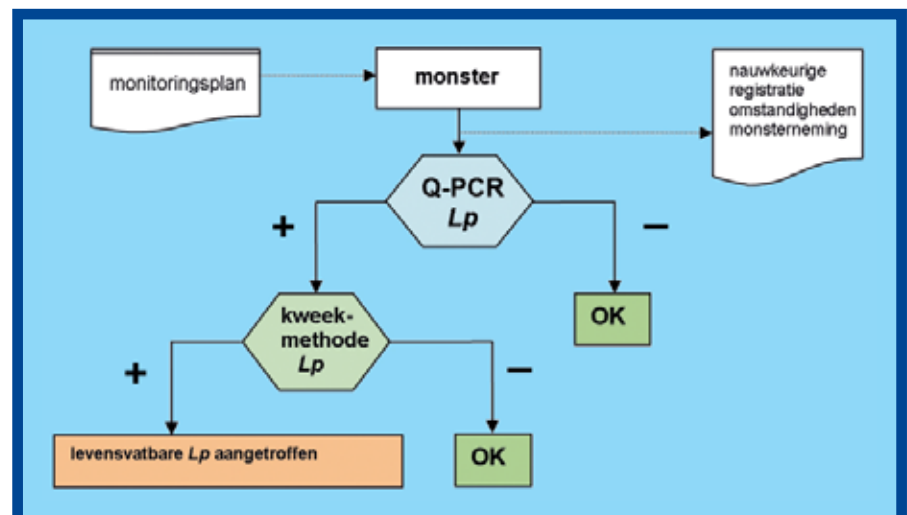
De drie Q-PCR-technieken ondervonden in dit onderzoek relatief weinig remming door de monstermatrix. Variantie-analyse heeft aangetoond dat tussen de verschillende Q-PCR-technieken onderling geen statistisch significante verschillen bestaan. De resultaten van de Q-PCR-methoden vertonen ook een hoge mate van overeenkomst met de resultaten van de kweekmethode volgens ISO 11731, die in dit onderzoek goed presteerde. Die goede prestatie is waarschijnlijk het gevolg van de monstervoorbehandeling met zuur, conform het normvoorschrift. Daarnaast heeft het laboratorium voor dit onderzoek tijdens de

Overzicht van in dit onderzoek toegepaste detectiemethoden.

analysetechniek	normering
kweekmethode voor <i>Legionella</i> met BCYE medium	conform NEN 6265 ²⁾
kweekmethode voor <i>Legionella</i> met GVPC-medium ^{***}	conform ISO 11731 ⁸⁾
kweekmethode voor <i>Legionella</i> met MWY-medium** (A)	conform NEN 6265:2007 ⁹⁾ (lab 1)
kweekmethode voor <i>Legionella</i> met MWY-medium** (B)	gebaseerd op NEN 6265:2007 met frequente aflezing (lab 2)
kweekmethode voor <i>Legionella pneumophila</i> met BCYE-medium*	op basis van literatuurbeschrijving ¹⁾
kweekmethode voor <i>Legionella pneumophila</i> met MWY-medium**	gebaseerd op NEN 6265:2007 en op basis van literatuurbeschrijving ¹⁾
Q-PCR voor <i>Legionella pneumophila</i>	conform ontwerp NEN 6254 ⁶⁾ ; vermeerdering van een fragment van het mip-gen (DNA) met PCR en specifieke primers.
Q-PCR voor <i>Legionella pneumophila</i>	Applied Biosystems. Detection and Quantification of <i>Legionella spp.</i> and <i>Legionella pneumophila</i> . Conform protocol v.2.0
Q-PCR voor <i>Legionella pneumophila</i>	Pall Genesystems. Kwantitatieve PCR voor <i>Legionella pneumophila</i> . Gevalideerd door AFNOR conform standaard XPT90-471. Additionele interpretatie van het PCR resultaat conform ontwerp NEN 6254.
Fastpath	Nalco

* BCYE = Buffered Charcoal Yeast Extract agar
 ** MWY = Modified Wadowsky Yee agar
 *** GVPC = Glycine Vancomycin Polymixine Cycloheximide agar

Afb. 1: Voorgesteld schema voor de screening van *Legionella pneumophila* in koelwater- en proceswatermonsters.



incubatieperiode van de agarplaten een aflezing van de voedingsbodems na drie, vijf, zeven én tien dagen toegepast. Dit leidt tot een goed resultaat, maar maakt de methode wel een stuk bewerklijker en dus duurder. Voor de klassieke NEN 6265 met BCYE-medium is vastgesteld dat de voedingsbodem erg gevoelig is voor bijgroei (zie foto). Tegelijkertijd is bevestigd dat het toepassen van het MWY-medium in dat opzicht een aanzienlijke verbetering geeft. Dat bij de bepalingen volgens NEN 6265:2007 met MWY-medium de resultaten van twee laboratoria een goede overeenkomst vertoonden, geeft bovendien aan dat deze methode goed reproduceerbaar is. De resultaten van de bepaling met MWY-medium hebben ook een hoge mate van overeenkomst met de resultaten van ISO 11731 (zie afbeelding 2). Bij statistisch onderzoek met variantie-analyse blijken de resultaten tussen beide methoden niet significant te verschillen. Ten slotte blijkt uit de resultaten dat de monstervoorbehandeling met zuur conform ISO 11731 leidt tot minder monsters met te veel storende bijgroei op de voedingsbodem (zes procent bij ISO 11731 ten opzichte van 29 procent bij de NEN 6265:2007 met MWY-medium): dit bevestigt hoe belangrijk bij koelwatermonsters een voorbehandeling met zuur is.

Bij de Q-PCR gericht op de specifieke detectie van *Legionella pneumophila* past ook een kweekmethode die is gericht op de specifieke detectie van deze legionella-soort. Daarvoor is een methode toegepast die is gebaseerd op NEN 6265 met BCYE-medium¹⁾. Deze methode heeft in dit onderzoek echter slecht gepresteerd. Er was, net als bij de klassieke NEN 6265, te veel ongewenste bijgroei op de agarplaat. Ook hier geeft de toepassing van het MWY-medium een substantiële verbetering. De specifieke kweekmethode voor *Legionella pneumophila* vertoont dan goede overeenkomsten met de NEN 6265:2007 met MWY-medium en bijbehorende serotypering. De opbrengst van de methode is waarschijnlijk verder te verbeteren door - in analogie met de gehanteerde werkwijze voor ISO 11731 - een monstervoorbehandeling met zuur en een frequentere uitlezing van de voedingsbodems toe te passen.

Gezien de hoge mate van kwalitatieve overeenstemming tussen de resultaten van de Fastpath-methode en de resultaten van de Q-PCR en van de ISO 11731 lijkt de Fastpath-methode een nuttige uitbreiding van het instrumentarium van de procesoperator die verantwoordelijk is voor het dagelijkse beheer van koelwatersystemen. Door de specificiteit van Fastpath voor *Legionella pneumophila* serogroep 1 voegt de methode informatie toe aan de in de praktijk reeds toegepaste methoden voor de microbiologische bewaking van koelwatersystemen, zoals ATP- en kolonietalmetingen, die een algemener karakter hebben. Door de snelheid en de eenvoud van de methode is Fastpath in het bijzonder interessant bij (het monitoren van) calamiteiten. Door de specificiteit voor *Legionella pneumophila* serogroep 1 worden de overige serogroepen echter



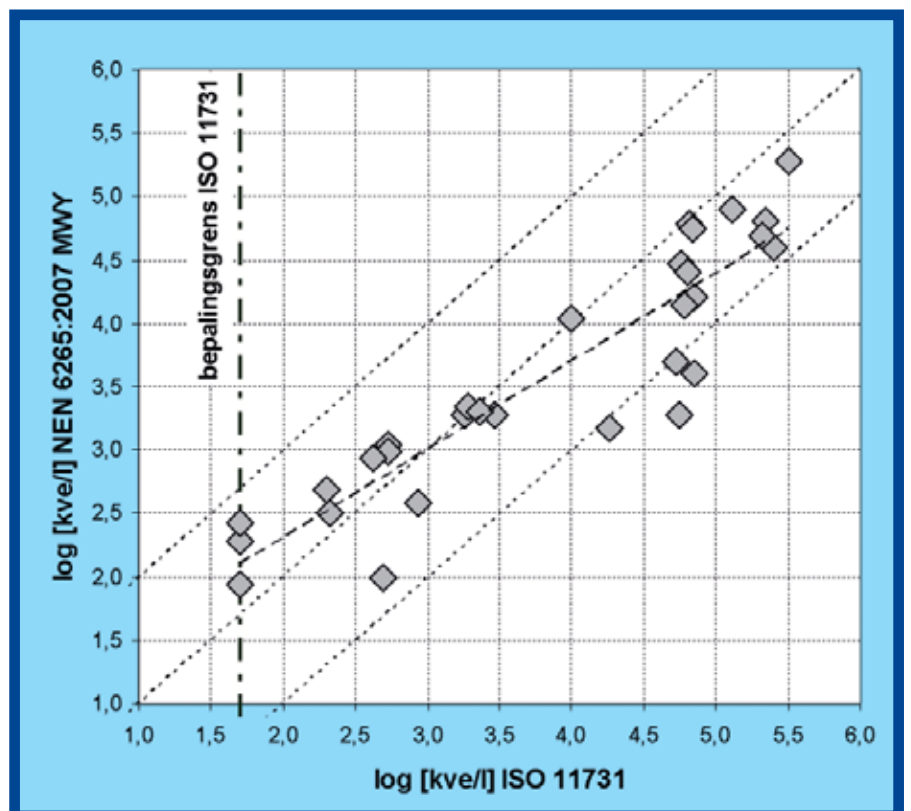
Veel ongewenste bijgroei op de BCYE-agarplaat.

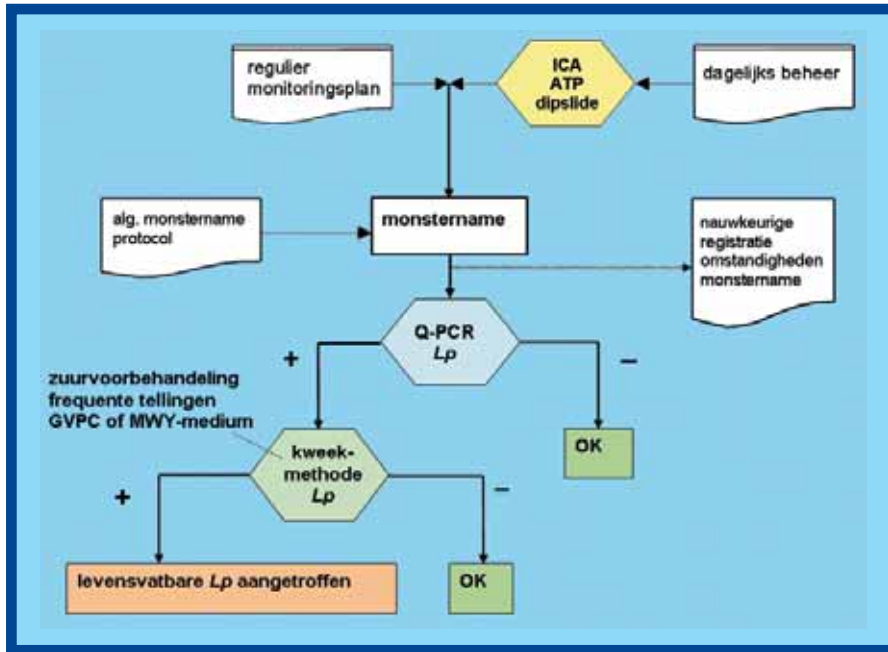
buiten beschouwing gelaten. Bovendien is de informatie kwalitatief van aard, zodat het de reguliere metingen niet kan vervangen.

De selectie van koelwatersystemen met een bekende 'legionellahistorie' verklaart dat in een relatief groot aantal monsters *Legionella* is gedetecteerd. Dat geldt overigens zowel voor de niet-specifieke kweekmethoden (bijvoorbeeld ISO 11731; 81 procent van de monsters positief) als voor de Q-PCR-techniek voor *Legionella pneumophila*

(gemiddeld 75 procent van de koelwatermonsters positief). Dit betekent ook dat *Legionella pneumophila* in de onderzochte koelwatersystemen relatief veel voorkomt. Deze waarneming komt niet overeen met bijvoorbeeld drinkwaterinstallaties, waarbij vaker non-pneumophilasoorten worden aangetroffen⁷⁾. Verder kan dit betekenen dat de toepassing van Q-PCR voor meting van *Legionella pneumophila* in koelwatermonsters niet direct leidt tot minder positieve monsters. Bovendien blijkt dat het aantal

Afb. 2: Onderlinge vergelijking van de resultaten, verkregen met GVPC-medium (ISO 11731; met zuurbehandeling en aflezing na drie, vijf, zeven en tien dagen) en MWY-medium (NEN 6265:2007; zonder zuurbehandeling maar met dezelfde frequente aflezing). De drie gestippelde diagonalen geven de verhouding aan tussen de aantallen gedetecteerd met de twee methoden (factor 10 hoger, gelijke aantallen en een factor 10 lager).





Afb. 3: Aangepast schema voor de screening van *Legionella pneumophila* in koel- en proceswater op basis van de resultaten van dit onderzoek (ICA = immunochromatografisch assay).

kopieën DNA per liter over het algemeen hoger ligt dan het aantal kolonievormende eenheden per liter. Beide aspecten maken de routinematige toepassing van Q-PCR op koelwatermonsters in de praktijk minder aantrekkelijk. De methode is echter wel aantrekkelijk in situaties waarbij de snelheid van analyse een rol speelt, zoals bij het vaststellen van de effectiviteit van maatregelen bij calamiteiten.

Conclusies en aanbevelingen

NEN 6265 met BCYE-medium voor de detectie van legionellabacteriën in watermonsters was in Nederland voor koelwater- en proceswatermonster de meest toegepaste methode. Inmiddels schrijft NEN 6265 het gebruik van het MWY-medium voor bij dit type monsters⁹⁾. Het hier beschreven onderzoek heeft aangetoond dat bij deze matrices inderdaad betere resultaten

kunnen worden gehaald door de methode uit te voeren met een MWY-medium. De beste resultaten zijn echter behaald met de kweekmethode volgens de ISO-norm met GVPC-medium, waarbij een monstervoorbereiding met zuur en een frequente uitlezing van de agarplaten is toegepast (wat leidt tot hogere analysekosten). Het is aan te bevelen te onderzoeken in hoeverre de methode volgens ISO 11731 geschikt kan worden gemaakt voor de specifieke detectie van *Legionella pneumophila*.

In dit onderzoek is de bruikbaarheid aangetoond van een snelle screening van koelwatermonsters met Q-PCR-technologie, desgewenst gevolgd door een specifieke kweek van *Legionella pneumophila*. Het oorspronkelijke schema is aangepast op grond van de resultaten van dit onderzoek (zie afbeelding 3).

LITERATUUR

- 1) Veendelaal H. en D. van der Kooij (2007) Een specifieke kweekmethode voor *Legionella pneumophila*. H₂O nr. 5, pag. 36-38.
- 2) NEN 6265 (1991). Onderzoek naar de aanwezigheid en aantal kolonievormende eenheden van legionellabacteriën.
- 3) Oosterholt F., J. Savelkoul, A. van Hoorn, L. Paping en J. van Mourik (2006). Dutch approach for Legionella-control in cooling water systems: History and perspectives. Powerplant Chemistry jaargang 8, nr. 11, pag. 666-673.
- 4) Arbo-informatieblad Al-32 *Legionella* (2009). SDU Uitgevers. Tweede herziene druk.
- 5) Wullings B., G. Wubbels, H. Veendelaal en D. van der Kooij (2007). Snelle, kwantitatieve detectie van *Legionella pneumophila* met Q-PCR. H₂O nr. 5, pag. 39-41.
- 6) Ontwerp NEN 6254 (2009). Water - detectie en kwantificering van *Legionella pneumophila* - Methode met kwantitatieve polymerase chain reaction (QPCR).
- 7) Van der Kooij D., G. Wubbels en G. Veendelaal (2007). Legionellabacteriën in leidingwaterinstallaties behoren meestal tot de ongevaarlijke soort *Legionella anisa*. H₂O nr. 5, pag. 33-35.
- 8) ISO 11731:1998(E) (1998). Water quality - detection and enumeration of *Legionella*.
- 9) NEN 6265 (2007). Water - detectie en telling van *Legionella*.