

BTO 2006.012
maart 2006

**Snelle semi-kwantitatieve
bepaling van kweekbare
Legionella's in watermonsters
m.b.v RT-PCR**

verkennend onderzoek

BTO 2006.012
maart 2006

Snelle semi-kwantitatieve bepaling van kweekbare *Legionella*'s in watermonsters m.b.v RT-PCR

verkennend onderzoek

© 2006 Kiwa N.V.
Alle rechten voorbehouden.
Niets uit deze uitgave mag
worden verveelvoudigd,
opgeslagen in een
geautomatiseerd
gegevensbestand, of
openbaar gemaakt, in enige
vorm of op enige wijze,
hetzij elektronisch,
mechanisch, door
fotokopieën, opnamen, of
enig andere manier, zonder
voorafgaande schriftelijke
toestemming van de
uitgever.

Kiwa N.V.
Water Research
Groningenhaven 7
Postbus 1072
3430 BB Nieuwegein

Tel. (030) 606 95 11
Fax (030) 606 11 65
www.kiwa.nl

Colofon

Titel

Een snelle semi-kwantitatieve bepaling van kweekbare *Legionella*'s in watermonsters m.b.v. RT-PCR

Projectnummer

11.1571.100.004

Projectmanager

Wiel Senden

Opdrachtgever

College van Opdrachtgevers (CVO)

Kwaliteitsborger

Dick van der Kooij

Auteurs

Harm Veenendaal en Remko Voogt

Dit rapport is selectief verspreid onder medewerkers van BTO-participanten en is verder niet openbaar.

Samenvatting

In dit rapport is een werkwijze beschreven om op een snellere wijze dan volgens NEN 6265 kweekbare *Legionella*'s aan te tonen. De methode is door het toepassen van de MWA-methode semi-kwantitatief.

Uit de resultaten van het onderzoek blijkt dat op basis van de delingstijd van *Legionella* het mogelijk is om binnen 48 uur voldoende *Legionella*-cellen op te hopen in een vloeibaar medium om na een RT-PCR (4 uur) binnen twee werkdagen te kunnen vaststellen of, en in welke mate, kweekbare *Legionella* in het monster aanwezig is.

Andere micro-organismen die de bepaling verstoren kunnen in de meeste gevallen voldoende geremd worden door een voorbehandeling van het monster bij 50°C gedurende 30 minuten toe te passen en door toevoeging van antibiotica aan het vloeibare medium.

Gezien de kosten is de methode niet als routine-bepaling aan te bevelen, maar kan worden ingezet in specifieke omstandigheden waarbij snel een resultaat over voorkomen van kweekbare *Legionella* gewenst is.

Inhoud

	Samenvatting	5
1	Inleiding	9
2	Materiaal en methoden	11
2.1	Materialen	11
2.2	Methoden	11
3	Bepalen van de groeisnelheid van <i>Legionella</i> in vloeibaar BCYE-medium	13
3.1	Doel	13
3.2	Opzet	13
3.3	Resultaten en discussie	13
3.4	Conclusies	16
4	Leidingwatermonsters	17
5	Watermonsters uit koeltorens	19
5.1	Onderzoek zonder selectieve componenten	19
5.2	Onderzoek met selectieve componenten	20
6	Samenvatting van de resultaten en discussie	23
6.1	Onderzoek zonder selectieve condities	23
6.2	Onderzoek met selectieve condities	23
6.3	Plaats van de MWA/PCR t.o.v. andere snelle methoden	24
7	Conclusies en aanbevelingen	25
7.1	Conclusies	25
7.2	Aanbevelingen	25
8	Literatuur	27

1 Inleiding

Toepassing van NEN 6265 betekent dat pas na tenminste 7 dagen kan worden vastgesteld of *Legionella* aanwezig is in een watermonster. Door gebruik te maken van PCR-methoden kan deze tijd worden teruggebracht tot minder dan 1 dag. De PCR-methode heeft echter als nadeel dat zowel levende als dode *Legionella*'s worden aangetoond. Voor het screenen van watermonsters hoeft dit geen nadeel te zijn: alle "negatieve" monsters bevatten immers geen *Legionella*. Van de positieve monsters kan echter geen uitspraak over levensvatbaarheid gedaan worden. Vooral in gevallen dat snel een resultaat beschikbaar moet zijn (voor evenementen of bij calamiteiten) schieten zowel de PCR als de kweekmethode dus te kort.

Door gebruik te maken van de sterke kanten van de beide bepalingen (kweekbaarheid vs. snelheid) kan mogelijk gekomen worden tot een methode die sneller is dan de huidige methode en die als voordeel heeft dat alleen de kweekbare *Legionella*'s worden aangetoond.

Het onderzoek dat in dit rapport beschreven is moet duidelijk maken of de voorgestelde methode toepasbaar kan zijn voor de praktijk en of nader onderzoek nodig is. Omdat een PCR-bepaling (nog) relatief duur is t.o.v. een kweekmethode op een vast medium, zal een dergelijke methode niet als algemene screeningsmethode gebruikt worden, maar wel in specifieke situaties worden ingezet.

Het onderzoek is opgesplitst in drie fasen. In de eerste fase, waarin de groeisnelheid van *Legionella* is bepaald, is gebruik gemaakt van een natuurlijk opgekweekt watermonster waarvan de concentratie (met kweek volgens NEN 6265) bekend was.

In de tweede fase van het onderzoek is gebruik gemaakt van natuurlijke leidingwatermonsters en in de laatste fase zijn watermonsters met mogelijk veel bijgroei (koelwatermonsters) onderzocht. Deze laatste monsters zijn tevens voorbehandeld bij 50°C en gekweekt in vloeibare media met antibiotica.

Tijdens het afronden van de rapportage is bij het 6th International Conference on *Legionella* in Chacago (Illinois, USA van 16-20 oktober 2005) een poster gepresenteerd over een vergelijkbare methode als in dit rapport beschreven is (Giglio et al, 2005). Het belangrijkste verschil tussen beide methodes lijkt te zijn dat de methode zoals in dit rapport is weergegeven een semi-kwantitatieve methode is (t.o.v. een aan/afwezigheidstest).

2 Materiaal en methoden

2.1 Materialen

Watermonsters zijn ingezet volgens een vijfvoudige MWA (meest waarschijnlijk aantal) verdunningsreeks. Als vloeibaar ophopingsmedium is gekozen voor het BCYE-medium volgens NEN 6265, zonder selectieve componenten en zonder toevoeging van agar. Per buis is 10 ml van het medium uitgevuld.

Voor de standaard-kweek zijn de voedingsbodems gebruikt zoals beschreven in NEN 6265.

Voor vaststelling van aanwezigheid van *Legionella* in de ophopingsbuizen is gebruik gemaakt van de RealTime PCR-methode (RT-PCR) en van eerder beschreven primers (Wullings e.a., 2005). Hiervoor werd DNA geïsoleerd uit 100 µl van het ophopingsmedium waarbij 200 µl Instagene (Biorad) werd toegevoegd. Isolatie van het DNA werd uitgevoerd zoals voorgeschreven door de leverancier van het Instagene. Na isolatie blijft 200 µl over waarvan 10 µl gebruikt is voor het uitvoeren van de PCR.

2.2 Methoden

Van het te onderzoeken watermonster is steeds 2000, 200 en 20 µl in vijfvoud aan het vloeibare medium toegevoegd en vervolgens geïncubeerd bij $37 \pm 1^\circ\text{C}$. De volumina zijn zodanig gekozen dat de bepalingsgrens op ca 100 kopieën per liter zou uitkomen.

Direct na het toevoegen van het watermonster en na 1, 2, 3 en 7 dagen incubatie is 100 µl uit elke buis genomen en ingevroren bij -20°C .

Na afloop van de incubatie zijn alle ophopingsbuizen van dag 7 onderzocht m.b.v. RT-PCR (primers voor *L. pneumophila*). Van ophopingsbuizen die op dag 7 positief waren zijn daarna ook de ingevroren suspensies van dag 0, 2 en 3 onderzocht.

Van alle watermonsters is een kweek ingezet op de wijze zoals is beschreven in NEN 6265. Monsters waarin met de kweek *Legionella* werd aangetoond maar die in de PCR negatief bleken te zijn, zijn nader geserotypeerd (antisera van Oxoid, DR800) om vast te stellen of er sprake was van *L. pneumophila* of van een andere *Legionella*-soort.

Van watermonsters waaruit een *Legionella* geïsoleerd werd die niet behoorde tot de bekende serotypen van *L. pneumophila*, zijn de MWA-buizen ook onderzocht m.b.v. de PCR waarbij primers gebruikt werden die het hele geslacht *Legionella* aantonen.

3 Bepalen van de groeisnelheid van *Legionella* in vloeibaar BCYE-medium

3.1 Doel

Doel van fase 1 was om vast te stellen of er groei optreedt in vloeibaar BCYE-medium en zo ja, hoe snel die groei dan is. Deze gegevens zijn nodig om te kunnen beoordelen binnen welke tijd het theoretisch mogelijk is één *Legionella*-cel na incubatie te kunnen aantonen m.b.v. RT-PCR. De concentratie moet immers dusdanig zijn toegenomen dat er tenminste één cel in het volume van de RT-PCR aanwezig is. De lag-fase en de groeisnelheid van *Legionella* in het gekozen vloeibare medium bepalen sterk de mogelijkheid van het aantonen van *Legionella* na twee dagen incubatie. Daarnaast is het belangrijk om vast te stellen of de test een vergelijkbare gevoeligheid heeft als de kweek volgens NEN 6265 en of het aantal aangetoonde *Legionella*'s overeenkomt met die van de kweekmethode.

3.2 Opzet

Van een in het laboratorium in drinkwater opgekweekte *Legionella* (*L. pneumophila* serogroep 1) zijn, gebaseerd op kweekgegevens, verdunningen gemaakt zodanig dat er een reeks ontstond met naar verwachting 1000, 500, 100, 50 en 25 kve/L. Tevens is een blanco monster meegenomen. De vijfvoudige MWA-reeks is beënt met drie verschillende hoeveelheden van deze monsters: 2000, 200 en 20 µl. Tevens is van elke concentratie direct een kweek ingezet op een BCYE-medium door in drievoud 0,1 ml op de voedingsbodem uit te spatelen. Meteen na beënten en op dag 1, 2, 3 en dag 7 is in alle buizen de concentratie van *L. pneumophila*-DNA bepaald m.b.v. de kwantitatieve RT-PCR-methode. Aan de hand van beschikbare MWA-tabellen (Hurley, 1983) is de *Legionella*-concentratie in de monsters bepaald. Tevens is van elke buis een kweek ingezet (0,1 ml uitspatelen op 3 platen BCYE). Het experiment is eenmaal herhaald waarbij niet opnieuw de delingstijden zijn bepaald.

3.3 Resultaten en discussie

In geen van de buizen met het vloeibare medium is direct na beënting met *Legionella*, met de kweek *Legionella* aangetoond (<3/ml vloeibaar medium). In tabel 1 zijn de resultaten weergegeven van de concentraties *Legionella* in de verschillende MWA-buizen op de verschillende tijdstippen, bepaald m.b.v. de kweekmethode.

Uit deze gegevens valt op te maken dat na 1 dag incubatie geen *Legionella* kan worden aangetoond maar dat dit in een aantal buizen wel op dag 2 het geval is (tabel 1). Zowel de concentraties van *Legionella* in de buizen als in mindere mate het aantal "positieve" buizen neemt na langere incubatie toe.

Tabel 1: De concentratie *Legionella*-cellen (kve/ml) in de verschillende MWA-buizen, bepaald m.b.v. de kweekmethode. (inf= geïnfecteerd)

beoogde concentratie (kve/l)	vol (µl)	dag 1					dag 2					dag 3					dag 7				
		200	<3	<3	<3	<3	<3	8	7	136	inf	5	150	226	300	inf	220	>500	>500	>500	inf
1000	20	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	17	<3	<3	186	<3	500	<3	inf	>500	inf	>500	<3
	2	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	inf	
500	200	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	15	169	<3	175	1	>500	>500	<3	>500	>500	
	20	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	inf	<3	<3	<3	<3	inf	<3	<3	
	2	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	
100	200	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	11	<3	<3	<3	4	225	<3	<3	<3	<3	inf	
	20	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	142	<3	<3	<3	<3	
	2	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	2	<3	<3	<3	<3	
50	200	<3	<3	<3	<3	<3	4	<3	<3	<3	<3	500	<3	<3	<3	inf	>500	inf	inf	<3	
	20	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	inf	<3	<3	<3	<3	
	2	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	
25	200	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	
	20	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	
	2	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	
blanco	200	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	
	20	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	
	2	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	<3	

Uit deze resultaten kan de *Legionella*-concentratie in het vloeibare medium en de deelsnelheid onder de gekozen omstandigheden berekend worden.

Met RT-PCR is in geen van de buizen met vloeibaar medium direct na beënting *Legionella*-DNA aangetoond. In de buizen waarin *Legionella* met de kweekmethode kon worden aangetoond, kon dit ook met de RT-PCR. Aan de hand van MWA-tabellen is de concentratie van de monsters berekend (tabel 2). Deze berekeningen zijn uitgevoerd voor de resultaten van dag 2 en dag 7.

Tabel 2: De concentraties *Legionella* bepaald op dag 2 en op dag 7 met de MWA-methode en bepaald met de kweek-methode volgens NEN 6265. Tevens is aangegeven welke concentraties verwacht werden. Tussen haakjes is het 95% betrouwbaarheidsinterval aangegeven.

beoogd	kweek volgens NEN 6265 (kve/l)	concentratie <i>Legionella</i> (MWA) m.b.v. RT-PCR (n/l)	
	gemeten	dag 2	dag 7
1000	1900 ± 872	2500 (800-7600)	4000 (1300-12000)
500	867 ± 58	640 (230-1700)	640 (230-1700)
100	133 ± 58	99 (14-700)	200 (48-850)
50	33 ± 58	99 (14-700)	220 (56-890)
25	<33	<90	91 (12-700)
blanco	<33	<90	<90

Tabel 3: Resultaten van de herhaling van het eerste experiment

kweek volgens NEN 6265 (kve/l)		concentratie <i>Legionella</i> (MWA) m.b.v. RT-PCR (n/l)	
beoogd	gemeten	dag 2	dag 7
1000	500 ± 173	4000 (1300-12000)	4000 (1300-12000)
500	233 ± 208	1600 (590-4600)	1600 (590-4600)
100	67 ± 58	640 (230-1700)	1200 (440-3000)
50	33 ± 58	99 (14-700)	860 (330-2300)
25	<33	<90	90 (12-690)
0	<33	<90	<90

Uit de resultaten valt op te maken dat in alle monsters die een positieve kweek laten zien m.b.v. NEN 6265, ook op dag 2 na ophoping in vloeibaar BCYE-medium en bepaald met RT-PCR *Legionella* in aan te tonen is. Bij de concentratie die lager is dan de bepalingsgrens m.b.v. de kweek (33 kve/l), is na ophoping gedurende 7 dagen in het vloeibare medium wel *Legionella* aantoonbaar (in een concentratie die volgens de MWA-tabel 90 kve/l bedraagt). De concentraties die gevonden worden m.b.v. de MWA-tabel zijn hoger dan het aantal kolonievormende eenheden m.b.v. de kweekmethode.

De delingstijd van *Legionella* onder de gekozen omstandigheden is berekend op basis van de toename van *Legionella* die gevonden is tussen dag 2 en dag 3 uit het eerste experiment (tabel 4). Voor deze berekeningen zijn die buizen gebruikt waarvan tussen dag 2 en dag 3 een toename van een aantoonbare concentratie cellen tot een aantal cellen dat beneden de bovenste bepalingsgrens ligt. De delingstijden zijn berekend met de volgende formule:

$$Td = \frac{\Delta t \cdot \text{Log} 2}{\text{Log} N_t - \text{Log} N_0}$$

waarin:

Td: de delingstijd

Δt: verschil tussen tijdstip t en tijdstip 0 (in uren)

Nt: het aantal *Legionella*'s op tijdstip t

N0: het aantal *Legionella*'s op tijdstip 0

Tabel 4: Delingstijd van *Legionella* (in uren) in de verschillende buizen onder de beschreven omstandigheden. Gegevens uit experiment 1, tabel 1.

monster	volume	delingstijd in uren				
		buis				
		1	2	3	4	5
1	2000	5,7	4,8	21		4,4
	200				4,9	
3	2000					5,5
4	2000		3,4			

Uit de reciproque waarden van de delingstijden uit tabel 4 (de extreem hoge delingstijd van 21 uur is hierbij niet meegenomen) kan de gemiddelde

delingstijd berekend worden. Uit deze berekende delingstijden blijkt dat de gemiddelde delingstijd voor de gebruikte *Legionella*-stam onder deze omstandigheden ca. 4,6 uur bedraagt.

De lag-fase kan met de volgende formules berekend worden:

$$n = \frac{\text{Log}\left(\frac{10}{0,05} \cdot (v + m)\right)}{\text{Log}2}$$

waarin:

n: aantal delingen die nodig is de bepalingsgrens te halen

v: aantal ml ophopingsmedium (10 ml)

m: monstervolume dat in het ophopingsmedium geënt is (2 ml)

en

$$\text{lagfase} = \Delta t - (n \cdot Td)$$

waarin:

Δt : aantal uren tussen begin en eind van de incubatietijd (48 uur)

n: het aantal delingen gedurende de incubatietijd dat nodig is om de bepalingsgrens te halen (120 cellen in het ophopingsmedium, waarvoor 7 delingen nodig zijn)

Td: de delingstijd

Het aantal benodigde delingen om *Legionella* te kunnen aantonen bedraagt volgens deze berekening 11,2. De delingstijd bedraagt 4,6 uur zodat in feite na 51,5 uur *Legionella* kan worden aangetoond. Het verschil met 48 uur kan verklaard worden doordat de werkelijke incubatietijd mogelijk enkele uren korter geweest is dan 48 uur waardoor een overschatting van de delingstijd is ontstaan. De delingstijd moet, rekening houdend met een lagfase, immers minder bedragen dan 4,6 uur. De lagfase kan op basis van deze berekeningen dus niet worden vastgesteld, maar zal onder deze omstandigheden zeker kort zijn.

3.4 Conclusies

Uit het onderzoek dat is uitgevoerd in fase 1 kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- De concentraties van *Legionella* bepaald met de MWA/PCR-methode komen na 48 uur incubatie zijn wat hoger dan met die van de kweek volgens NEN 6265;
- De delingstijd van *Legionella* onder de gekozen omstandigheden bedraagt maximaal ca 4,6 uur;
- De lag-fase van *Legionella* kan op basis van deze experimenten niet worden vastgesteld;
- Na twee dagen ophopen in een vloeibaar medium was *Legionella* aantoonbaar in het ophopingsmedium m.b.v. RT-PCR. Dit komt overeen met de theoretische berekening op basis van de delingstijd.

4 Leidingwatermonsters

In de eerste fase zijn 12 leidingwatermonsters onderzocht m.b.v. de kweek volgens NEN 6265 en met de MWA/PCR-methode. Bij de kweek op BCYE-agar bleek dat op de voedingsbodems waaraan geen selectieve componenten waren toegevoegd, vaak veel (storende) bijgroei optrad (tabel 5).

Tabel 5: resultaten van de kweek volgens NEN 6265 en de MWA/PCR-methode leidingwater monsters. Tussen haakjes is het 95% betrouwbaarheidsinterval aangegeven.

monster	kweek NEN 6265		MWA/PCR <i>L. pneumophila</i>			MWA/PCR <i>Legionella</i> spp.
	kve/1	storende bijgroei?	dag 2	dag 3	dag 7	dag 7
douche 1	800 ± 140	nee	-	<90	<90	<90
douche 2	50 ± 71	nee	-	<90	<90	<90
zwembad 1	150 ± 70	nee	-	<90	<90	<90
zwembad 2	<50	ja	-	-	<90	<90
leidingwater 1	57500 ± 0	ja	650 (240-1800)	550 (200-1600)	1800 (620-5000)	-
leidingwater 2	57500 ± 10700	ja	1400 (520-3800)	1600 (570-4400)	4000 (1300-12000)	-
leidingwater 3	80000 ± 0	nee	2000 (680-5900)	3100 (980-9700)	21000 (6900-66000)	-
leidingwater 4	5500 ± 570	ja	90 (12-690)	200 (47-850)	200 (47-850)	-
leidingwater 5	5900 ± 0	ja	<90	<90	340 (100-1100)	-
leidingwater 6	650 ± 210	nee	<90	90 (12-700)	310 (90-1000)	-
leidingwater 7	<50	ja	-	-	<90	<90
brandhaspel	850 ± 70	ja	-	<90	<90	<90

In vier van de 12 monsters kon (ook na 7 dagen ophoping in een vloeibaar medium) met de PCR/MWA-methode geen *Legionella* worden aangetoond terwijl dit met de directe kweek op BCYE-agar wel mogelijk was. In een monster kon dit na 3 dagen ophoping en in een ander monster pas na 7 dagen ophoping. Bij een van deze monsters is dit verschil te verklaren doordat met de kweek de concentratie van *Legionella* onder de bepalingsgrens van de MWA/PCR-methode ligt. In vijf monsters kon zowel met de kweek als met de MWA/PCR *Legionella* worden aangetoond. In twee monsters kon noch met de kweek, noch met de MWA/PCR voor *L. pneumophila* of *Legionella* spp. worden aangetoond.

Opvallend is dat de concentraties, bepaald met de MWA/PCR-methode, nu veel lager liggen dan de concentraties die met de kweek op het vaste BCYE-medium worden gevonden. Dit is waarschijnlijk het gevolg van bijgroei die in een vloeibaar medium de groei van *Legionella* belemmert. Zuurstofgebrek of een pH-verandering van het vloeibare medium kan mogelijk hiervoor een oorzaak zijn.

5 Watermonsters uit koeltorens

5.1 Onderzoek zonder selectieve componenten

In deze fase zijn 16 koelwater monsters onderzocht m.b.v. de kweek volgens NEN 6265 en met de MWA/PCR-methode. Bij de kweek van dit type monsters blijkt meestal dat er toch nog storende bijgroei in kan optreden, ondanks dat het watermonster is voorbehandeld bij 50°C en op selectieve voedingsbodems geënt. Daarom zijn deze watermonsters niet gefiltreerd, maar, in tienvoud, direct op de voedingsbodem uitgestreken (0,1 ml) waardoor de bepalingsgrens dan 1000 kve/l bedraagt. De PCR voor *L. pneumophila* van monster 4 en 5 is herhaald omdat de PCR geen positief signaal liet zien, hoewel de kweek duidelijk *Legionella* aantoonde. Tevens is van monster 4 en 5 de PCR bepaald met primers voor *Legionella* species. De resultaten zijn weergegeven in tabel 6.

Tabel 6: resultaten van de kweek en de MWA/PCR-methode voor koelwatermonsters. Tussen haakjes is het 95% betrouwbaarheidsinterval aangegeven.

monster	Kweek NEN 6265 kve/l	MWA/PCR <i>L. pneumophila</i>			MWA/PCR <i>Legionella</i> spp.
		dag 2	dag 3	dag 7	dag 7
1	<1000	90 (12-690)	90 (12-690)	90 (12-690)	
2	<1000			<90	
3	<1000			<90	
4	4000 ± 5200 ¹⁾	<90		<90	91 (12-700)
herhaling		<99	<99	99 (14-700)	8600 (3300-23000)
5	1000 ± 3200 ²⁾	<90		<90	<90
herhaling				<90	360 (110-1200)
6	<1000			<90	
7	<1000			<90	
8	<1000			<90	
9	1000 ± 3100	340 (100-1100)	460 (160-1400)	460 (160-1400)	
10	4000 ± 7000	90 (12-690)	90 (12-690)	90 (12-690)	
11	24000 ± 7000	90 (12-690)	90 (12-690)	90 (12-690)	
12	<1000			<90	
13	<1000	300 (88-1000)	300 (88-1000)	300 (88-1000)	
14	20000 ± 15000 ²⁾			<90	99 (14-700)
15	11000 ± 7400 ²⁾			<90	300 (87-1000)
16	1800000 ³⁾	360 (110-1200)	270 (75-980)	360 (110-1200)	1500 (560-4200)

1): geen *L. pneumophila*, 2): *L. pneumophila* serogroep 1 en 3): *L. pneumophila* sg 2-14

Uit deze resultaten blijkt dat bij 5 van de 16 monsters na 2 dagen geen *Legionella* kon worden aangetoond met de MWA/PCR-methode voor *L. pneumophila* terwijl de kweek wel *Legionella* liet zien. Serotypering toonde aan dat in 1 van deze 5 monsters geen *L. pneumophila*, maar een non-pneumophila aanwezig was. Bij 8 van de 16 monsters werden met beide methodes *Legionella* aangetoond en bij 6 van de monsters toonde geen van beide methodes *Legionella* aan. In 2 van de 16 monsters werd met de kweek op BCYE-agar geen *Legionella* aangetoond en wel met de MWA/PCR (*L. pneumophila*).

Een verklaring voor het grote verschil tussen de kweek op BCYE-agar (positief) en de MWA/PCR-methode (ook in aantallen *Legionella*) kan zijn dat de bijgroei in het vloeibare ophopingsmedium de groei van *Legionella* (ver)hindert.

5.2 Onderzoek met selectieve componenten

In deze fase van het onderzoek zijn 10 koelwatermonsters onderzocht waarin veel storende bijgroei verwacht werd. Resultaten van de kweek op BCYE-agar lieten zien dat de *Legionella*-kolonies alleen konden worden aangetroffen na een voorbehandeling van 50°C en op BCYE-media met antibiotica. Serotypering van de gekweekte kolonies wees uit dat het in alle gevallen om *L. pneumophila* serogroep 2-14 ging.

Naast het eerder gebruikte vloeibare BCYE-medium is ook het medium gebruikt volgens NEN 6265 waaraan selectieve componenten zijn toegevoegd (antibiotica volgens NEN 6265). Bovendien is een deel van het monster gedurende 30 minuten bij 50°C voorbehandeld (NEN 6265). Van elk deelmonster is een vijf-voudige MPN ingezet.

Uit de resultaten (tabel 7) kan geconcludeerd worden dat de monsters waarin met de kweek op BCYE-agar *Legionella* werd aangetoond, ook in tenminste één van de voorkweekcondities *Legionella* kon worden aangetoond met PCR. Tevens bleek dat niet alle voorkweekcondities (al dan niet gepasteuriseerd of in media met of zonder antibiotica) steeds *Legionella* aantoonbaar te bevatten, maar wel altijd de conditie na voorbehandeling bij 50°C en in media met antibiotica. Deze media remmen kennelijk de storende bijgroei dermate, dat *Legionella* zich tot aantoonbare aantallen kan vermeerderen (tabel 7). In twee gevallen is op dag 0 (PCR-monster direct genomen na beënting van de vloeibare media) ook al met PCR *Legionella* aantoonbaar (monster 2 en monster 5). Groei kan dan nog niet zijn opgetreden: de aangetoonde cellen zijn afkomstig van de ent. Dit maakt het resultaat van monster 5 op dag 2 ook discutabel: ook hier is geen groei opgetreden en het resultaat zal dus afkomstig zijn van cellen uit de ent.

De aantallen *Legionella* dat met de RT-PCR op dag 2 zijn gevonden komen niet altijd overeen met de aantallen van de kweek op BCYE-agar. In geval dat het resultaat van de RT-PCR lager ligt dan dat van de kweek BCYE-agar, kan dit veroorzaakt zijn door remmende groei van andere micro-organismen in het vloeibare medium. In geval dat de RT-PCR hogere aantallen *Legionella* aantoonbaar maakt dan de kweek op BCYE-agar, dan wordt dit mogelijk veroorzaakt

doordat subletaal beschadigde bacteriën een langere lag-fase zullen hebben op een vast medium dan in een vloeibaar medium.

In de meeste monsters is het aantal dat met de MWA/PCR gevonden wordt, lager dan de resultaten van de kweekmethode volgens NEN 6265.

Tabel 7: resultaten van de kweek en de MWA/PCR-methode onder verschillende kweekcondities voor monsters met veel bijgroei Tussen haakjes is het 95% betrouwbaarheidsinterval aangegeven.

monster	kweek		MWA/PCR <i>L. pneumophila</i>		
	NEN 6265	conditie	dag 0	dag 2	dag 7
1	42500 ± 4700	-ab	nd	-	<90
		+ab	<90	2700 (860-8400)	14000 (5100-38000)
		50°, +ab	<90	80000 (27000-240000)	80000 (27000-240000)
2	36800 ± 2300	-ab	90 (14-700)	90 (12-690)	410 (130-1300)
		+ab	<90	3200 (1000-9900)	7000 (2600-240000)
		50°, +ab	<90	46000 (14000-150000)	80000 (27000-240000)
3	55500 ± 9400	-ab	<90	<90	200 (47-850)
		+ab	<90	<90	200 (47-850)
		50°, +ab	<90	530 (190-1500)	1600 (590-4500)
4	<50	-ab	nd	nd	<90
		+ab	nd	nd	<90
		50°, +ab	nd	nd	<90
5	650 ± 70	-ab	nd	90 (14-700)	<90
		+ab	nd	<90	<90
		50°, +ab	90 (14-700)	<90	<90
6	3400 ± 300	-ab	nd	nd	<90
		+ab	<90	<90	99 (14-700)
		50°, +ab	<90	340 (100-1100)	1100 (410-2800)
7	300 ± 200	-ab	nb	<90	<90
		+ab	<90	220 (56-890)	840 (320-2200)
		50°, +ab	<90	220 (56-890)	530 (190-1500)
8	1600 ± 1800	-ab	<90	3500 (1100-11000)	3500 (1100-11000)
		+ab	<90	17000 (6000-50000)	46000 (14000-150000)
		50°, +ab	<90	2500 (800-7600)	17000 (6000-50000)
9	67 ± 120	-ab	nb	<90	<90
		+ab	<90	<90	99 (14-700)
		50°, +ab	<90	<90	99 (14-700)
10	2700 ± 900	-ab	<90	<90	300 (88-1000)
		+ab	<90	12000 (4500-32000)	46000 (14000-150000)
		50°, +ab	<90	6500 (2400-18000)	11000 (4100-29000)

-ab: BCYE medium zonder antibiotica; +ab: BCYE met antibiotica volgens NEN 6265; 50°: monster voorbehandeld bij 50°C; nd: niet uitgevoerd.

6 Samenvatting van de resultaten en discussie

6.1 Onderzoek zonder selectieve condities

De resultaten van de beschreven experimenten zijn in de tabel 8 samengevat.

Tabel 8: Aan/afwezigheid van *Legionella* in 40 watermonsters. Tussen haakjes de gecorrigeerde aantallen.

	n =40		%	
PCR _{2 dagen} =kweek _{7 dagen} (positieve monsters)	16	(17)	40,0	(42,5)
PCR _{2 dagen} =kweek _{7 dagen} (negatieve monsters)	12	(13)	30,0	(32,5)
Kweek _{7 dagen} beter dan PCR _{2 dagen}	10	^{1,2,3} (8)	25,0	(20,0)
PCR _{2 dagen} beter dan kweek _{7 dagen}	2		5,0	

- 1) het resultaat van de kweek ligt bij een monster beneden de bepalingsgrens van de MWA/PCR. Hiervoor mag gecorrigeerd worden.
- 2) het resultaat van de MWA/PCR is voor twee monsters na meer dan twee dagen incubatie beide identiek (positief).
- 3) in één geval gaat het om non-*pneumophila*. Hiervoor mag gecorrigeerd worden.

Uit het onderzoek kunnen de volgende conclusies getrokken worden:

- De delingstijd van *Legionella pneumophila* in vloeibaar medium bedraagt onder deze omstandigheden maximaal ca 4,6 uur na een korte lag-fase.
- De aantallen *Legionella* die gevonden worden met de RT-PCR methode komen niet geheel overeen met de resultaten van de kweekmethode volgens NEN 6265. De resultaten kunnen zowel lager als hoger uitvallen.
- Op basis van aan/afwezigheid presteert de MWA/PCR 22,5% minder dan de kweekmethode. In 77,5% van de onderzochte monsters is de MWA/PCR-methode gelijk of beter dan de kweekmethode.
- De resultaten van drinkwatermonsters laten zien dat in 19% van de monsters de MWA/PCR minder presteert dan de kweekmethode (4 van de 21 monsters) op basis van aan/afwezigheid en komen de overige monsters (81%) overeen.
- Veel andere micro-organismen dan *Legionella* kunnen de MWA/PCR verstoren zodat *Legionella* niet of slechts in lagere concentraties aantoonbaar is.

6.2 Onderzoek met selectieve condities

De experimenten met de selectieve condities voor het aantonen van levensvatbare *Legionella* m.b.v. PCR, zijn samengevat in tabel 9.

Tabel 9: Aan/afwezigheid van *Legionella* in 10 watermonsters bij kweken onder selectieve condities (na voorbehandeling bij 50 °C en in media met antibiotica).

	n =10	%
PCR _{2 dagen} =kweek _{7 dagen} (positieve monsters)	7	70
PCR _{2 dagen} ≠kweek _{7 dagen} (negatieve monsters)	2	20*
Kweek _{7 dagen} beter dan PCR _{2 dagen}	1	10**
PCR _{2 dagen} beter dan kweek _{7 dagen}	0	0

* Na 7 dagen was de kweek bij één monster positief, maar kleiner dan de bepalingsgrens van de PCR. De PCR was na 7 dagen ook positief.

** De kweek was positief. PCR was positief, maar er was niet duidelijke groei aanwezig. Resultaat dus twijfelachtig.

Uit deze resultaten blijkt dat de kweek op BCYE-agar na 7 dagen in één monster betere resultaten gaf (10%) dan de RT-PCR-methode.

6.3 Plaats van de MWA/PCR t.o.v. andere snelle methoden

Onder normale omstandigheden is het niet waarschijnlijk dat het aantal dode cellen in een watermonster een substantieel aandeel van de populatie uitmaakt. In deze omstandigheden zullen de resultaten van een RT-PCR direct op het monster een aanmerkelijk sneller resultaat geven dan de methode zoals in dit rapport beschreven is. Een positief resultaat met de PCR wijst dan op het voorkomen van levende *Legionella*.

Er zijn echter omstandigheden zoals na thermische of chemische desinfectie, dat (vrijwel) alle *Legionella*-cellen dood zijn maar dat het DNA met de RT-PCR nog lange tijd aantoonbaar is. De MWA/PCR methode ondervangt dit nadeel door alleen *Legionella* te meten die zich in het vloeibare medium heeft kunnen vermeerderen.

Levensvatbare *Legionella* kan ook worden aangetoond met behulp van FISH (fluorescent in situ hybridisatie), gericht tegen het r-RNA van *Legionella*-cellen. Uit onderzoek is echter gebleken dat deze test na desinfectiemaatregelen als chlooring of hitte (60°C) na enkele dagen nog een positief resultaat liet zien, terwijl met kweek volgens NEN 6265 geen kweekbare *Legionella* aantoonbaar was. Daarnaast is de bepalingsgrens van de, microscopische, analyse 1000 cellen/l.

Bij moleculaire technieken worden relatief dure chemicaliën gebruikt. Dit maakt de test dan ook aanmerkelijk duurder dan een kweek volgens NEN 6265. Er kan dan ook van worden uitgegaan dat de PCR/MWA-methode niet voor grote hoeveelheden routinemonsters zal worden ingezet. In specifieke omstandigheden waarbij snel een resultaat nodig is (bij calamiteiten of als er geldelijk belang in het geding is) zullen deze extra kosten verantwoord zijn, waarbij monsters vooraf gescreend kunnen worden m.b.v. RT-PCR om vast te stellen in welke monsters *Legionella*-DNA aanwezig is en dus verder onderzocht zouden moeten worden. Daarnaast blijft een kweek als standaardmethode onmisbaar.

7 Conclusies en aanbevelingen

7.1 Conclusies

Uit de resultaten kan geconcludeerd worden dat de MWA/PCR-methode mogelijkheden biedt voor snellere detectie van kweekbare *Legionella's*. Indien onder selectieve condities gewerkt wordt kan de overeenkomst tussen de resultaten van de kweek volgens NEN 6265 en MWA/PCR tenminste 90% bedragen. Dit resultaat wordt verkregen na 48 uur voorincubatie gevolgd door 4 uur RT-PCR zodat in veel gevallen binnen 2 werkdagen het resultaat beschikbaar kan zijn.

7.2 Aanbevelingen

Naar aanleiding van het onderzoek dat in dit rapport beschreven is kunnen de volgende aanbevelingen voor vervolgonderzoek gedaan worden:

- Prestaties nauwkeuriger vaststellen door het verzamelen van meer gegevens;
- Onderzoeken of verder gaande robotisering mogelijk is. Dit zal de kostprijs van de bepaling kunnen verlagen;
- RT-PCR uitvoeren in een groter volume uit het ophopingsmedium. Mogelijk kan dit gerealiseerd worden door centrifugatie van (een deel) van het ophopingsmedium. Doel hiervan is te onderzoeken of de incubatietijd verkort kan worden;
- Vergelijken met de RT-PCR-methode in praktijkmonsters om na te gaan onder welke condities wel/geen levende *Legionella* kan worden verwacht na ingrepen.

8 Literatuur

- Giglio, S, P.T. Monis and C.P. Saint: A novel and rapid detection system – an adjunct to current methodology. Abstracts of 6th International Conference on Legionella in Chacago, Illinois, USA. October 16-20, 2005.
- Wullings, Bart, Gerhard Wübbels, Auke Douma en Remko Voogt: Detectie van *Legionella pneumophila* in water met een kwantitatieve real-time PCR-methode. Kiwa-rapport BTO 2005.033, mei 2005
- Hurley, M.A. and M.E. Roscoe: Automated statistical analysis of microbial enumeration by dilution series. J. Appl. Bacteriol. 55:159-164, 1983