

Het bevestigen van legionellakolonies met UV-belichting; een duurzaam alternatief

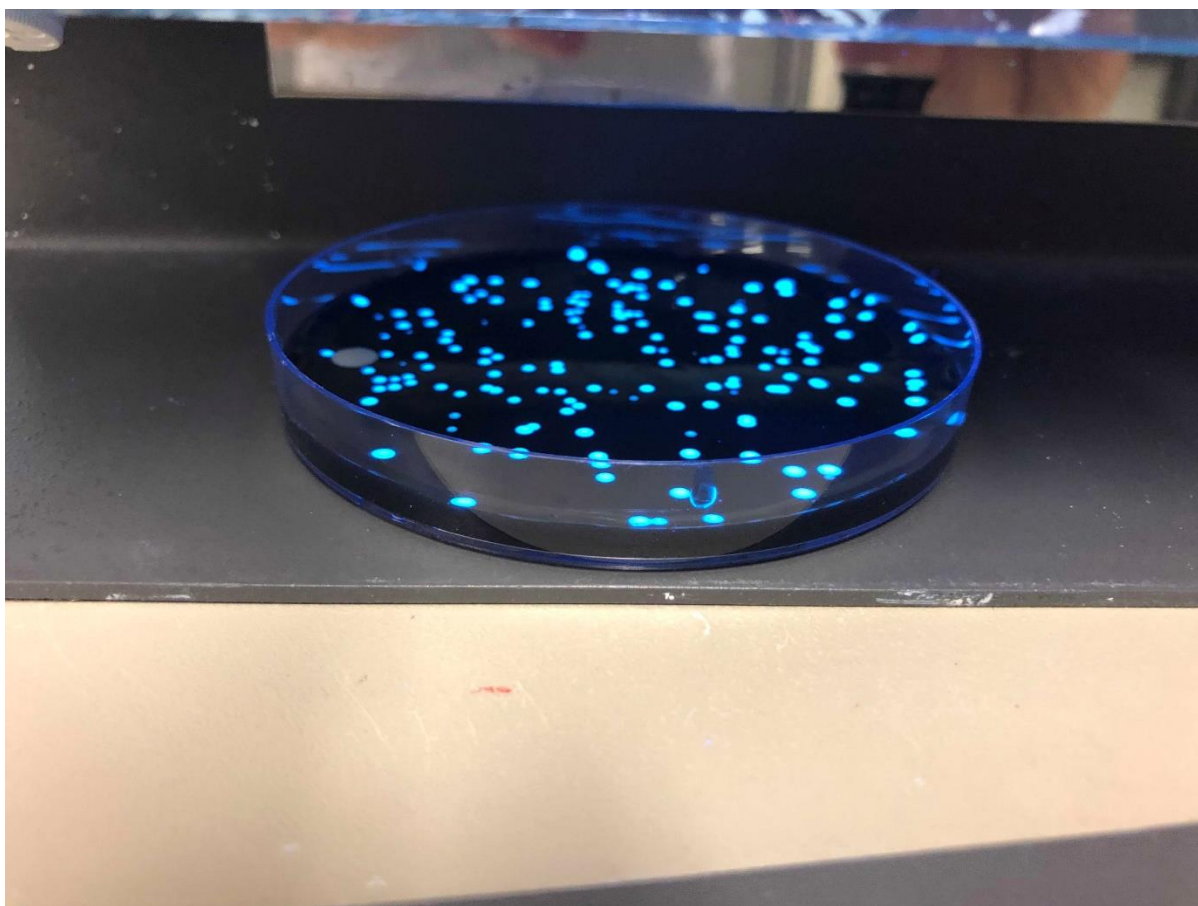
Adrie Atsma, Ananda van der Spek, Sharda van Willigen (Vitens)

Dit artikel beschrijft de uitkomst van een studie naar de mogelijkheid om 'legionellaverdachte' bacteriekolonies te bevestigen met UV-belichting, met als doel om het verbruik van chemicaliën en plastics te reduceren. Deze studie bevestigt dat legionellaverdachte kolonies die gekweekt zijn op legionellakweekmedium en onder UV helderblauw oplichten, Legionella non-pneumophila-species zijn. De vraag is of een aanvullende bevestiging van dit type kolonie nog noodzakelijk is. UV-bevestiging is namelijk in potentie goedkoper, sneller en bovenal duurzamer dan klassieke bevestigingsmethodes. Het gebruik van chemicaliën en plastics kan enorm worden gereduceerd door een extra bevestiging van legionella niet uit te voeren.

In Nederland gebruiken geaccrediteerde drinkwaterlaboratoria de richtlijn NEN-EN-ISO11731 voor het controleren op aanwezigheid van legionellabacteriën in (drink)watersystemen [1], [2]. Na het plaatsen van watermonsters op deze richtlijn, worden de legionellaweekplaten gecontroleerd op aanwezigheid van legionellakolonies. Omdat op het kweekmedium naast legionellabacteriën ook andere, niet-legionellabacteriën kunnen groeien, worden kolonies die lijken op legionella opnieuw getest om ze te bevestigen. Zo wordt vastgesteld of de kolonies daadwerkelijk legionellaspecies zijn of niet.

NEN-EN-ISO11731 schrijft een bevestigingsmethode voor die gebaseerd is op selectieve kweek. Als alternatief op kweekbevestiging gebruiken verschillende laboratoria een biochemische methode voor het bevestigen van legionella [3], [4], zoals de Polymerase Chain Reaction (PCR)-methode.

Het Vitens-laboratorium in Leeuwarden is voortdurend op zoek naar verbeteringen in de bedrijfsvoering. Het doel van deze verbeteringen is, naast kostenbesparing, het verduurzamen van de analyseprocessen. Ook het bevestigen van legionella heeft de aandacht van Vitens. Bij het bevestigen van 'legionellaverdachte' kolonies worden chemicaliën (kweekmedia of PCR-chemicaliën) en plastics (petrischalen of pipetpuntjes en PCR-plastics) gebruikt. Deze chemicaliën en plastics worden eenmaal gebruikt en daarna weggegooid. Om deze afvalstroom in te perken is gekeken naar een alternatieve, duurzame methode voor het bevestigen van legionella.



Afbeelding 1. Oplichtende legionellakolonies onder UV-licht

Een kansrijke methode waarbij geen extra chemicaliën of plastics worden gebruikt, is het bevestigen van legionella met ultraviolet licht (UV). UV dient momenteel als hulpmiddel bij het tellen van legionellakolonies. Legionellaverdachte kolonies lichten helderblauw op onder UV-licht en zijn zo voor een analist duidelijker waarneembaar en gemakkelijker te tellen. De vraag is of de verdachte kolonies die onder UV helderblauw oplichten, ook echt legionellaspecies zijn. Hiervoor heeft Vitens een validatie van de UV-bevestiging uitgevoerd. Het beoogde doel van deze validatie is om vast te stellen of de UV-bevestiging als alternatieve methode kan worden toegepast voor het bevestigen van Legionella. Dat moet indirect resulteren in een reductie in het gebruik van chemicaliën en plastics op het laboratorium; bij Vitens maar ook elders.

Validatie en gelijkwaardigheidsonderzoek UV-bevestiging

Voor de validatie van deze methode wordt de UV-bevestiging als een alternatieve bevestigingsmethode beschouwd. In dit onderzoek worden kolonies die helderblauw oplichten onder UV beschouwd als 'UV-positief'. Alle kolonies die onder UV *niet* oplichten worden beschouwd als 'UV-negatief'. Om de prestatiekenmerken van de methode vast te stellen, is een referentiemethode nodig. In deze studie is die referentiemethode de bevestigingsmethode die wordt beschreven in de NEN-EN-ISO11731 richtlijn, namelijk de legionellakweekbevestiging.

Als testmateriaal voor deze validatie zijn ruim 200 legionellastammen en 54 niet-legionellastammen getest.

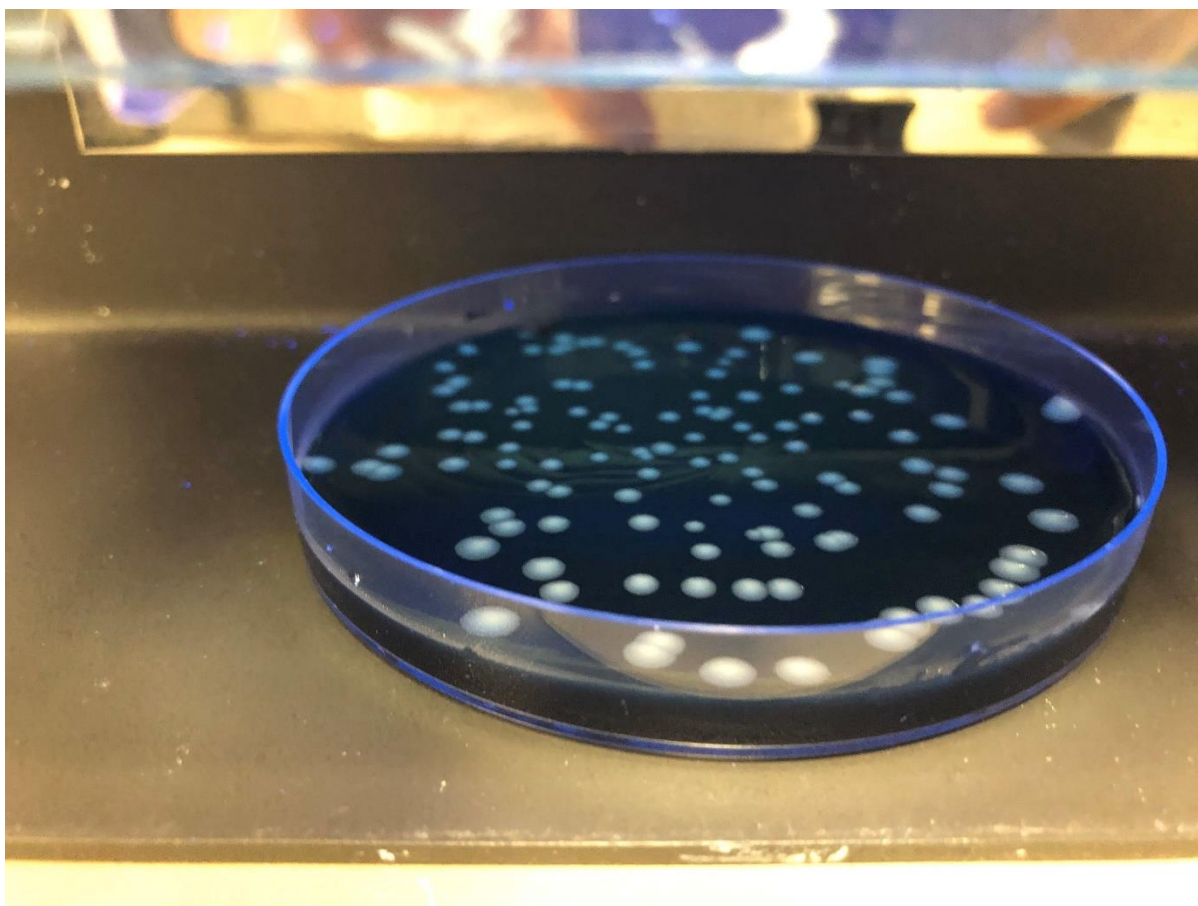
Naast deze stammen heeft Vitens ook legionellaverdachte kolonies, die uit watermonsters zijn geïsoleerd door middel van de NEN-EN-ISO11731-methode, getest met UV en bevestigd met de PCR-methode. Dit onderzoek is in 2015 en in 2019 uitgevoerd. In 2015 is alleen onderzocht of UV-positieve kolonies legionellaspecies zijn. In 2019 zijn naast UV-positieve kolonies ook kolonies getest die de uiterlijke kenmerken hebben van legionella maar UV-negatief zijn. De verdachte kolonies zijn afkomstig uit watermonsters met weinig stoorflora (matrix A, zoals drinkwater) en uit watermonsters met veel stoorflora (matrix B, zoals proceswaters). Met stoorflora wordt bedoeld: 'niet'-legionellabacteriën die in een watermonster aanwezig zijn en eveneens kolonies vormen op het kweekmedium en groei van legionella kunnen remmen. De watermonsters zijn afkomstig uit heel Nederland.

Door het verschil in herkomst en het tijdstip van de analyse is binnen dit onderzoek een breed spectrum aan genetisch verschillende legionellakolonies getest. De kolonies die in 2019 uit de praktijkmonsters zijn geïsoleerd, zijn eveneens geïdentificeerd met *Matrix-assisted laser desorption ionization–Time of flight mass spectrometry*, oftewel MaldiTof. MaldiTof wordt door Nederlandse drinkwaterlaboratoria gebruikt voor het identificeren van gekweekte kolonies. De reden om deze kolonies te identificeren is om vast te stellen welke uit watermonsters geïsoleerde legionellasoorten oplichten en welke niet.

Resultaten

De resultaten van het validatieonderzoek met legionellastammen zijn in tabel 1 weergegeven. De resultaten van het wildstammenonderzoek staan in tabel 2. Samengevat zijn de resultaten van de validatie van de UV-bevestiging als volgt:

- Alle legionellagekweekte kolonies die onder UV oplichten zijn legionellaspecies.
- Het merendeel van deze UV-positieve legionella zijn van de soort *Legionella anisa* (*L. anisa*).
- Er zijn legionellasoorten die niet zo fel oplichten onder UV, zoals *Legionella pneumophila*. Zie het voorbeeld in afbeelding 2.
- Alle geteste niet-legionella species zijn UV-negatief.
- In 2015 is alleen gekeken naar de UV-positieve kolonies. Alle 1604 geteste kolonies waren legionellaspecies.



Afbeelding 2. Sommige legionellasoorten (zoals *L. pneumophila*) lichten minder fel op onder UV-licht

Samengevat is het resultaat van deze studie dat UV-positieve kolonies legionellaspecies zijn, maar dat er ook legionellasoorten zijn die niet oplichten.

Tabel 1. Overzicht van het validatieonderzoek met referentiestammen, waarbij legionellaverdachte kolonies zijn bevestigd met de ISO11731-methode (kweek) en UV. 'UV +' betekent dat de kolonies wel helderblauw oplichten onder UV. 'UV -' betekent dat de legionellakolonies niet helderblauw oplichten. 'Kweekbevestiging +' betekent dat de geteste kolonies legionella-positief zijn. 'Kweekbevestiging -' betekent dat de kolonies legionella-negatief zijn

	aantal	soorten
UV+/kweekbevestiging +	161	<i>L. anisa</i> , <i>L. gormanii</i> , <i>L. dumofii</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. cherii</i>
UV+/kweekbevestiging -	0	geen
UV- /kweekbevestiging +	56	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. israelensis</i> , <i>L. micdadei</i> etc.
UV- /kweekbevestiging-	54	<i>E.coli</i> , <i>Pseudomonas fluorescens</i> , <i>Aeromonas</i> spp etc

Tabel 2. Overzicht van het validatieonderzoek met verdachte kolonies uit watermonsters, waarbij legionellaverdachte kolonies zijn bevestigd met PCR voor legionella en UV. 'UV +' betekent dat de kolonies onder UV wel helderblauw oplichten. 'UV -' betekent dat de legionellaverdachte kolonies niet helderblauw oplichten. 'PCR -' betekent dat de geteste kolonies legionella-negatief zijn. 'PCR +' betekent dat de kolonies Legionella-positief zijn

Resultaten wildstammen	validatiestudie	UV+/PCR+	UV+/PCR-	UV-/PCR+	UV-/PCR-
onderzoek 2015 met wildstammen		1604	0	Niet Bepaald	Niet Bepaald
onderzoek 2019 met wildstammen		974	0	157	59

Discussie UV-bevestiging als alternatief

In de literatuur zijn legionellasoorten beschreven waarbij de kolonies de eigenschap hebben dat ze onder UV helderblauw oplichten. Deze legionellasoorten zijn *L. cherrii*, *L. steigerwaltii*, *L. parisiensis*, *L. bozemanii*, *L. dumoffi*, *L. gormanii*, *L. tucsonensis*, *L. gratiana* en *L. anisa* [7], [8], [9]. Deze soorten bezitten het unieke pigment legioliuline. Dit pigment is afwezig in legionellasoorten die onder UV niet oplichten [6]. De validatie bevestigt wat er in deze literatuur wordt beschreven, namelijk dat legionellaverdachte kolonies die helderblauw onder UV oplichten, legionellaspecies zijn.

De kans dat een niet-legionellakolonie met een legionellakarakteristieke morfologie wordt aangetroffen in een praktijkmonster dat op het legionellakweekmonster onder UV helderblauw oplicht, is volgens dit onderzoek bijzonder klein. Vast staat dat er legionellasoorten zijn waarvan de kolonies niet oplichten, waaronder *L. pneumophila*. Deze soorten moeten wel worden bevestigd met een aanvullende bevestigingsmethode. Echter blijft het bevestigen met UV interessant in het kader van kostenbesparing en verduurzaming van de analyse. Uit een inventarisatie door het Vitens-laboratorium blijkt dat ruim 90 procent van de monsters die bij kweek legionella bevatten van het type Legionella non-pneumophila zijn. De grote meerderheid van deze Legionella non-pneumophila is *L. anisa* en zal naar verwachting onder UV oplichten. *L. anisa* is volgens de literatuur in Nederland de soort die het meest met kweek wordt aangetoond [10]. Dit wordt eveneens in dit onderzoek bij de MaldiToF-identificatie bevestigd; alle UV-positieve kolonies die in wildmonsters bij de vergelijkingsstudie zijn aangetoond, zijn *L. anisa*.

De vraag of legionellaverdachte kolonies die oplichten onder UV nog moeten worden bevestigd met PCR of de NEN-EN-ISO11731(EN)-methode is daarmee terecht. Het niet meer hoeven bevestigen van UV-positieve kolonies met een aanvullende bevestigingsmethode heeft een behoorlijke positieve impact op de doorlooptijd van de analyse en de kosten, maar ook op het inperken van de afvalstroom.

De potentiële opbrengsten van de UV-bevestiging ten opzichte van de PCR-bevestiging zijn:

- Minder werk doordat legionellakolonies die UV-positief zijn niet meer hoeven te worden bevestigd
- Sneller resultaat van de legionellabevestiging doordat er geen extra bevestiging hoeft te worden uitgevoerd
- Wanneer er geen extra PCR-bevestiging van de UV-positieve kolonies hoeft te worden uitgevoerd heeft dit ook impact door minder gebruik van chemicaliën en plastics. Jaarlijks scheelt dit Vitens 600 a 700 PCR-platen, 70.000 pipetpuntjes en 1,5 liter aan PCR-chemicaliën.
- Hiermee wordt een verwachte kostenbesparing gerealiseerd van €100.000.

Vervolg

Wanneer er geen extra kweekbevestiging van de UV-positieve kolonies hoeft te worden uitgevoerd heeft dit ook een grote impact op het verbruik van kweekplaten. Per verdacht monster worden voor het bevestigen vier kweekplaten gebruikt (2 BCYE en 2 BCYE-cys). Deze hoeven dan niet te worden gebruikt, wat indirect resulteert in een aanzienlijke reductie in de afvalstroom van kweekplaten.

Het voorstel is dus om legionellakolonies die UV-positief zijn te bevestigen als legionella species, zonder dat daar een extra aanvullende test (PCR of conform ISO11731) voor nodig is. Verdachte legionellakolonies die UV-negatief zijn, moeten wel worden bevestigd met een aanvullende test.

Vitens (laboratorium) wil dit voorstel met de experts op het gebied van legionelladiagnostiek bespreken en onderzoeken of het mogelijk is om deze bevestigingsmethode in de praktijk toe te passen. De vervolgstap is om de UV-bevestiging voor te leggen aan de beleidsadviseurs van de Inspectie Leefomgeving en Transport (IL&T). In de Regeling Legionellapreventie in drinkwater en warm tapwater wordt beschreven dat de NEN-EN-ISO11731-richtlijn moet worden gebruikt voor screening op legionella. UV-bevestiging wordt niet in deze richtlijn beschreven en daarom is toestemming van IL&T nodig voor het gebruik van deze alternatieve methode. Mede vanwege de grote voordelen van UV-bevestiging voor legionella en de resultaten van het validatie- en vergelijkingsonderzoek is het onderzoeksteam hoopvol voor een succesvolle implementatie van de UV-bevestiging. Het zou in ieder geval een goede stap zijn in de richting van een verdere verduurzaming van de legionella-analyse.

Referenties

1. NEN-EN-ISO11731 (2017); *Water-Telling van Legionella*
2. *Regeling legionellapreventie in drinkwater en warm tapwater* <https://wetten.overheid.nl/BWBR0030166/2019-01-01>. Geraadpleegd november 2019.
3. Schalk, J.A.C., De Roda Husman, A.M. (2010). *Detectiemethoden voor legionella in Water*. Rapport 703719063/2010, Rijksinstituut voor volksgezondheid en milieu.
4. Versteegh, J.F.M. et al (2007). *Evaluatie Legionella preventie waterleidingwet*. RIVM rapport 703719020/2007
5. NEN-EN-ISO16140 deel 6 (2019); *Microbiologie van de voedselketen - Validatie van methoden - Deel 6: Protocol voor de validatie van alternatieve (eigendomsrechtelijke) microbiologische bevestigings- en typeringsmethoden (ISO 16140-6:2019, IDT)*
6. Amemura-Maekawa J. et.al. (2004). 'Legioliulin, a new isocoumarin compound responsible for blue-white autofluorescence in Legionella (Fluoribacter) dumoffii under long-wavelength UV light'. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 323, p. 954–959.
7. Asai, M., Hattori, Y., Makabe, H. (2016). 'Synthesis of legioliulin, a fluorescent isocoumarin compound, isolated from Legionella dumoffii using cyclic acylpalladation and Heck reaction'. *Tetrahedron Letters* 57 p. 3942–3944.
8. Gorman, G.W. et al. (1985). 'Legionella anisa: a new species of Legionella isolated from potable waters and a cooling tower'. *Applied Environmental microbiology* (1985); volume 49(2): p. 305–309.
9. Brenner Don J. et al.(1985). 'Ten new species of Legionella'. *International Journal Of Systematic Bacteriology* (1985). volume 35, p. 50-59.
10. Kooij, D. van der, Wubbels, G., Veenendaal, G. (2007). 'Legionellabacteriën in leidinginstallaties behoren meestal tot ongevaarlijke soort Legionella anisa'. *H2O* 5, p. 33-35.