



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Detectie van legionella met een amoebekweekmethode

RIVM briefrapport 703719083/2011
J.A.C. Schalk et al.



Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu
*Ministerie van Volksgezondheid,
Welzijn en Sport*

Detectie van legionella met een amoebekweekmethode

RIVM Briefrapport 703719083/2011
J.A.C. Schalk et al.

Colofon

© RIVM 2011

Delen uit deze publicatie mogen worden overgenomen op voorwaarde van bronvermelding: 'Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), de titel van de publicatie en het jaar van uitgave'.

J.A.C. Schalk, RIVM
A.E. Docters van Leeuwen, RIVM
W.J. Lodder, RIVM
S.M. Euser, Streeklaboratorium Haarlem
J.W. den Boer, Streeklaboratorium Haarlem
A.M. de Roda Husman, RIVM

Contact:

J.A.C. Schalk
Laboratorium voor zoonosen en omgevingsmicrobiologie
marjolijn.schalk@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van VROM-Inspectie, Programma
Schoon en veilig water, in het kader van project M/703719

Rapport in het kort

Detectie van legionella met een amoebekweekmethode

Het RIVM heeft in opdracht van de Inspectie Leefomgeving en Transport een methode ontwikkeld om levensvatbare legionellabacteriën in water beter te kunnen aantonen, de zogeheten amoebekweekmethode. Het is een aanvulling op de bestaande kweekmethode op agarplaten, die vermoedelijk niet alle ziekmakende legionellabacteriën in watermonsters opspoot. De nieuwe kweekmethode is vooral veel geschikter voor monsters die veel andersoortige bacteriën bevatten, zoals monsters van rioolwaterzuiveringsinstallaties.

Bij de bestaande kweek wordt het watermonster op platen met agar gebracht, dat voedingsmiddelen bevat waarop legionellabacteriën zich optimaal in koloniën kunnen ontwikkelen. Deze methode heeft als nadeel dat andere, niet-legionellabacteriën er ook op groeien. Deze andere bacteriën kunnen de groei van de legionellabacteriën op de agarplaten belemmeren, zodat deze moeilijker op te sporen zijn. Bovendien zijn hiermee legionellabacteriën in een bepaald stadium ('levend, maar niet kweekbaar') niet aan te tonen.

Bij de amoebekweekmethode worden watermonsters eerst aangebracht op amoeben. Deze eencelligen zijn de natuurlijke gastheer van legionellabacteriën, waarin legionella zich kan vermenigvuldigen. Dit heeft als voordeel dat vooral de groei van de legionellabacterie wordt gestimuleerd en niet die van andere bacteriën. Door deze verrijkingstap zijn de legionellabacteriën vervolgens wel aan te tonen op agarplaten.

In Nederland wordt bij drinkwaterinstallaties en koeltorens regelmatig gecontroleerd of er legionella aanwezig is. Dit wordt gedaan om voorkomen dat mensen worden blootgesteld aan deze bacterie. Legionellabesmetting kan leiden tot een ernstige vorm van longontsteking. Daarnaast wordt bij een besmetting de bron gezocht in de omgeving van degenen die er ziek van zijn geworden, om verdere blootstelling te voorkomen. Legionella wordt dan aangetoond met de kweekmethode op agarplaten. De amoebekweek kan hierop een aanvulling zijn. Dit geldt vooral voor monsters die met de kweekmethode op agarplaten moeilijk zijn te onderzoeken, omdat ze veel andersoortige bacteriën bevatten.

Trefwoorden:

Legionella, amoeben, amoebekweek, *Legionella pneumophila*

Abstract

Detection of legionella with an amoebal co-culture method

On the authority of the Netherlands VROM-Inspectorate, the RIVM has developed a new method for detecting live *Legionella* bacteria in water. The method known as the amoebal co-culture method can be used in addition to the regular culture method using agar plates, which probably does not detect all harmful *Legionella* bacteria in water samples. The co-culture method is particularly suitable for samples that contain a lot of other bacteria, like samples from sewage treatment plants.

With the regular culture methods, water samples are applied to agar plates that contain specific nutrients on which *Legionella* can grow and be seen as colonies. Other, non-*Legionella*, bacteria can also grow on the agar plates and inhibit the growth of *Legionella* so that they are hard to detect. Moreover, *Legionella* bacteria at a certain stage (viable-but-not-culturable) cannot grow on agar plates.

With the amoebal co-culture method, water samples are placed on amoebae. These single-celled organisms are the natural host for *Legionella*, in which the bacteria can multiply. This has the advantage of stimulating the growth of *Legionella* and not other bacteria. This process of enrichment allows *Legionella* bacteria to subsequently be detected by plating on agar plates.

In the Netherlands, in-premise plumbing and cooling towers are checked regularly for *Legionella* in order to prevent human exposure to *Legionella*. A *Legionella* infection can lead to a severe form of pneumonia. When people have incurred a *Legionella* infection, it is important to track down and eradicate the source of the bacteria to prevent further exposure. *Legionella* is detected with the regular culture method on agar plates. The amoebal co-culture method can now also be used for detecting the bacteria, especially for samples where the bacteria is difficult to detect.

Keywords:

Legionella, Amoebae, Amoebal co-culture, *L. pneumophila*.

Inhoud

Samenvatting—6

1 Inleiding—7

2 Materiaal en methoden—9

2.1 Detectie van legionella met behulp van de amoebekweek—9

2.2 Bepalen van het vermogen van legionellastammen om zich te vermeerderen in *A. castelanii*—9

2.3 Monstername en voorbehandeling van de drinkwatermonsters—11

2.4 Monstername en voorbehandeling van de RWZI-monsters—11

2.5 Detectie van legionella volgens NEN 6265—11

2.6 Sequentie-analyse van een deel van het *mip*-gen van legionellastammen—11

3 Resultaten—13

3.1 Vaststellen van het vermogen van verschillende legionellastammen om zich te vermenigvuldigen in *A. castelanii*—13

3.2 Vergelijken van de amoebekweek met de BCYE-kweek voor drinkwatermonsters—15

3.3 Vergelijken van de amoebekweek met de BCYE-kweek voor RWZI-monsters—16

4 Discussie—17

Literatuur—19

Samenvatting

Detectie van legionella in water kan plaatsvinden in het kader van legionellapreventie of in het kader van bronopsporing. Legionellapreventie is erop gericht de groei van legionella in drinkwaterinstallaties te voorkomen. Bepaalde risicovolle installaties dienen daartoe periodiek gecontroleerd te worden op de aanwezigheid van legionella. Ook koeltorens dienen periodiek gecontroleerd te worden op de aanwezigheid van legionella. Detectie van legionella in water kan ook plaatsvinden in het kader van bronopsporing. Indien mensen ziek zijn geworden van de legionella bacterie worden mogelijke bronnen waar patiënten aan zijn blootgesteld bemonsterd en geanalyseerd, met als doel zo snel mogelijk de bron van de legionella-infectie te achterhalen en uit te schakelen. Het lukt echter zelden om in de omgeving van de patiënten de bron van de infectie te vinden. Dit komt mogelijk doordat bestaande methoden niet in staat zijn om de ziekmakende legionellabacteriën in watermonsters op te sporen of omdat niet de juiste bronnen worden bemonsterd.

Detectie van legionella in water wordt standaard uitgevoerd door middel van een kweekmethode op Buffered-Charcoal Yeast-Extract (BCYE)-platen. Deze methode kent echter een aantal beperkingen. Zo kunnen legionellabacteriën gemist worden doordat andere bacteriën de groei van legionella onderdrukken of doordat legionellabacteriën in een zogenaamd niet kweekbaar stadium (Viable-But-Not-Culturable, VBNC) voorkomen. Het RIVM heeft een nieuwe methode ontwikkeld waarmee legionellabacteriën in water kunnen worden aangetoond. Eerst worden legionellabacteriën gekweekt op amoeben, dit zijn eencellige organismen waarin de bacteriën zich kunnen vermenigvuldigen. De vermeerderde bacteriën worden vervolgens aangetoond met kweek op BCYE-platen.

In de studie die is beschreven in dit rapport is voor een aantal legionellasoorten uitgetest of ze kunnen worden aangetoond met deze amoebekweek methode. Daarnaast zijn drinkwatermonsters en monsters afkomstig van rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZI) getest met zowel de amoebekweek methode als de klassieke kweekmethode op BCYE-platen. Uit deze studie blijkt dat de amoebekweekmethode voordeel biedt bij de isolatie van legionella uit monsters die veel andere bacteriën bevatten. Deze monsters zijn moeilijk te analyseren met de klassieke kweekmethode op BCYE-platen omdat door de aanwezigheid van andere bacteriën de groei van legionella op de platen wordt onderdrukt. Met de amoebekweek methode zijn levende legionellabacteriën aangetoond in zowel drinkwatermonsters als RWZI-monsters.

1 Inleiding

Mensen kunnen geïnfecteerd raken met legionella en een longontsteking (legionellapneumonie) oplopen als zij kleine waterdruppeltjes (aerosolen) inademen die besmet zijn met de legionellabacterie. Deze aerosolen kunnen bijvoorbeeld afkomstig zijn van bubbelbaden, koeltorens en douches. In Nederland worden jaarlijks enkele honderden patiënten gemeld met een legionellapneumonie (Brandsema et al., 2011). Dit is een longontsteking veroorzaakt door de legionellabacterie. Ongeveer de helft daarvan heeft de infectie waarschijnlijk in Nederland opgelopen. Een infectie met legionella vindt plaats door het inademen van kleine waterdruppeltjes (aerosolen) die besmet zijn met de legionellabacterie. Om infectie met legionella te voorkomen is in het Drinkwaterbesluit vastgelegd dat prioritair collectieve drinkwaterinstallaties legionellapreventie dienen uit te voeren. In het kader hiervan dienen installaties twee maal per jaar gecontroleerd te worden op de aanwezigheid van legionella. Daarnaast is in het Activiteitenbesluit vastgelegd dat koeltorens periodiek geanalyseerd dienen te worden. Indien legionella wordt aangetroffen in de koeltoren of in de drinkwaterinstallatie dienen maatregelen te worden genomen om de bacterie te bestrijden en groei van legionella in de toekomst te voorkomen.

In het kader van bronopsporing is de Bronopsporings eenheid Legionella-pneumonie (BEL) in 2002 van start gegaan (www.legionellaplatform.nl). De BEL is onderdeel van het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid Kennemerland in Haarlem. Indien bij een GGD patiënten worden gemeld met een legionellapneumonie voert BEL, onder bepaalde criteria, bemonstering van de mogelijke bronnen uit. Het lukt echter zelden om de bron van een legionellabesmetting op te sporen (den Boer et al., 2007). Mogelijk dat niet de juiste bronnen worden bemonsterd of dat de bestaande detectiemethoden voor legionella niet voldoen.

Detectie van legionella in water wordt standaard uitgevoerd door middel van een kweekmethode op Buffered-Charcoal Yeast-Extract (BCYE)-platen. De kweekmethode op BCYE-platen is vastgelegd in een Nederlandse norm (NEN 6265:2007). De kweekmethode op BCYE-platen kent een aantal nadelen (Schalk et al., 2010^a). Zo kan de groei van legionella op plaat worden geremd door de aanwezigheid van andere bacteriën, die ook op de BCYE-platen kunnen groeien. Verder kunnen legionellabacteriën in een voedselarme omgeving een levensvatbaar, maar niet kweekbaar stadium ingaan (viable-but-not-culturable, VBNC). In verschillende studies is aangetoond dat de kweekmethode op BCYE-platen een onderschatting van het aantal levende legionellabacteriën kan geven (Hussong et al., 1987; Amann et al., 1995; Byrd et al., 1991; Delgado-Viscogliosi et al., 2005; Dusserre et al., 2008; Gião et al., 2009).

Er zijn amoebekweekmethoden in de literatuur beschreven waarmee wel de VBNC-bacteriën kunnen worden aangetoond (Garcia et al., 2007; Steinert et al., 1997). Bij deze amoebekweekmethoden wordt een monster aangebracht op amoeben, en de legionellabacteriën die in het monster aanwezig zijn kunnen zich vervolgens in de amoeben vermeerderen. Amoeben zijn immers de natuurlijke gastheer van legionella (Rowbotham, 1980). Deze vermeerderde legionellabacteriën worden vervolgens aangetoond via kweek op BCYE-platen, via PCR of via microscopie. Bij het RIVM zijn de amoebekweek methoden beschreven door La Scola et al. (2001) en Rowbotham et al. (1983) aangepast en geoptimaliseerd (Schalk et al., 2010^b). In het hier beschreven onderzoek is voor verschillende legionellastammen uitgetest of ze kunnen groeien in de

gebruikte amoeben en is de methode uitgetest voor zowel drinkwatermonsters als monsters afkomstig van RWZIs en vergeleken met de standaard kweekmethode op BCYE-platen.

2 Materiaal en methoden

2.1 Detectie van legionella met behulp van de amoebekweek

De amoeben, *Acanthamoeba castelanii* (ATCC# 30234), werden gekweekt in 75 cm² flessen met 20 ml PYG medium (2% proteose peptone, 0,1% yeast extract, 0,1M D-glucose, 4mM MgSO₄, 0,4M CaCl₂, 0,1% sodium citrate dehydrate, 0,05mM Fe(NH₄)₂(SO₄)₂·6H₂O, 2,5 mM NaH₂PO₃, 2,5 mM K₂HPO₃) (fabrikant van alle ingrediënten ?) bij 25 °C. De amoeben werden een maal per week in een verdunning van ongeveer 1:10 doorgezet in een nieuwe kweek, waarbij de amoeben werden geresuspendeerd door flink tegen de kweekfles aan te tikken. De amoeben werden op de dag van infectie drie maal gewassen met Page's amoebal saline (PAS, Rowbotham, 1983) om het kweekmedium volledig te verwijderen. Hiertoe werden de amoeben overgebracht in een 50 ml Greiner buis en gedurende 10 minuten afgedraaid bij 2000 rpm. Vervolgens werd het pellet geresuspendeerd in 15 ml PAS en werd weer gedurende 10 minuten afgedraaid bij 2000 rpm. Na de derde keer wassen en afdraaien werd het pellet geresuspendeerd in 15 ml PAS en werd de concentratie van de amoeben bepaald door de cellen te tellen in een Bürker-Türk telkamer. Cellen werden op een concentratie van 5×10⁵ cellen/ml PAS gebracht en gezaaid in een 12-wells plaat met 1 ml celsuspensie per well. Aan iedere well werd vervolgens 100µl monster (zie 2.3) toegevoegd en werd de plaat gedurende 3 dagen bij 32°C geïncubeerd. Bij ieder experiment werd ook één negatieve controle (amoeben zonder legionella) meegenomen. Na 3 dagen incubatie werd de inhoud van elke well geresuspendeerd door met een pipet de inhoud van de well op en neer te pipeteren. Van deze suspensie werd 100 µl doorgezet op een nieuwe amoebeplaat en deze werd weer gedurende 3 dagen bij 32°C geïncubeerd. De inhoud van de wells werd opnieuw geresuspendeerd met behulp van een pipet en tien-voudig verdund in PAS-buffer. Van de 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ en 10⁻⁷ verdunningen werd 100 µl uitgeplaat op BCYE-platen (Oxoid Ltd., Hampshire, UK) en 100 µl van de 10⁻⁵ verdunning werd tevens uitgeplaat op een BCYE-plaat zonder cysteïne (Oxoid). Na 3-7 dagen incubatie bij 37°C werden de verdachte legionellakolonies geteld. Een aantal verdachte legionellakolonies werden ter bevestiging doorgestreekt op BCYE-platen met en zonder cysteïne. Voor een deel van de bevestigde kolonies werd identificatie van de legionella-soort uitgevoerd met behulp van sequentie-analyse van het *mip*-gen zoals hieronder beschreven (zie paragraaf 2.6).

2.2 Bepalen van het vermogen van legionellastammen om zich te vermeerderen in *A. castelanii*

Bij het Streeklaboratorium Haarlem zijn in de loop van de tijd, via BEL, veel legionella-isolaten verzameld vanuit zowel de verschillende bemonsterde potentiële bronnen als vanuit patiëntmateriaal. Dit betreft zowel *L. pneumophila* stammen als non-*pneumophila* stammen (legionellastammen die niet tot de soort *L. pneumophila* behoren). De *L. pneumophila* stammen zijn getypeerd via monoclonaal subtypering (Lück et al., 1992) en zijn onder te verdelen in Mab 3/1 positieve en Mab 3/1 negatieve stammen. Mab 3/1 positieve stammen worden herkend door een monoclonaal antilichaam (Mab 3/1) en de negatieve stammen niet. Omdat met name de patiëntgerelateerde stammen worden herkend door het Mab 3/1 monoclonaal wordt aangenomen dat Mab 3/1 positieve stammen ziekmakende legionellastammen zijn (Lück et al., 1992, Helbig et al., 1995).

Voor dit onderzoek zijn 8 *L. anisa* stammen geselecteerd, 10 Mab 3/1 positieve *L. pneumophila* stammen en 10 Mab 3/1 negatieve *L. pneumophila* stammen (zie tabel 1). Behalve de resultaten voor monoclonale subtypering voor de *L. pneumophila* stammen staat in tabel 1 tevens resultaten voor sequence-based typing (SBT, Gaia et al., 2005; Ratzow et al., 2005), en serotypering (den Boer et al., 2007) weergegeven. De geselecteerde stammen werden overnacht opgekweekt vanaf een BCYE-plaat in Yeast extract medium (1% w/v) met BCYE-supplement (Oxoid). De opgekweekte cultures werden vervolgens 1:10 doorverdund in PAS buffer. Van de 10^{-5} en 10^{-7} verdunning werd vervolgens 100ul getest in de amoebekweekprocedure zoals hierboven beschreven. Deze verdunningen werden tevens in duplo uitgeplaat op BCYE-platen om te kunnen bepalen hoeveel kolonievormende eenheden (kve) legionella werden toegevoegd per well. Na replicatie van legionella in de amoeben, gedurende twee maal drie dagen, zijn verschillende verdunningen van de amoebekweek uitgeplaat op BCYE-platen en werd het aantal kve legionella per well bepaald. Door het aantal kve in de wells na de replicatie te vergelijken met het aantal kve dat werd toegevoegd aan de wells kon de mate van replicatie van legionella in de amoeben worden vastgesteld.

Tabel 1 Typeringen van legionella-isolaten afkomstig van patiënten en het milieu

Strain no.	Legionella species	Source	Mab 3/1	Monoclonal subtype	ST-type	SG
1	<i>L. anisa</i>	M				
2	<i>L. anisa</i>	M				
3	<i>L. anisa</i>	M				
7	<i>L. anisa</i>	M				
8	<i>L. anisa</i>	M				
10	<i>L. anisa</i>	M				
12	<i>L. pneumophila</i>	M	neg	Bellingham	392	1
14	<i>L. pneumophila</i>	M	neg	Oxford	474	1
15	<i>L. pneumophila</i>	M	neg	Camperdown	1	1
17	<i>L. pneumophila</i>	M	neg	OLDA	1	1
20	<i>L. pneumophila</i>	M	neg	Oxford	1	1
21	<i>L. pneumophila</i>	M	neg	Oxford	1	1
24	<i>L. pneumophila</i>	M	neg	OLDA	1	1
26	<i>L. pneumophila</i>	M	neg	Bellingham	492	1
30	<i>L. pneumophila</i>	M	neg	Camperdown	534	1
32	<i>L. pneumophila</i>	M	neg		48	2
34	<i>L. pneumophila</i>	M	neg		93	3
6	<i>L. pneumophila</i>	M	pos	Knoxville	9	1
9	<i>L. pneumophila</i>	M	pos	Benidorm	110	1
11	<i>L. pneumophila</i>	M	pos	Philadelphia	37	1
16	<i>L. pneumophila</i>	M	pos	Benidorm	46	1
19	<i>L. pneumophila</i>	M	pos	Allent./France	42	1
22	<i>L. pneumophila</i>	M	pos	Allent./France	478	1
23	<i>L. pneumophila</i>	M	pos	Olda	486	1
27	<i>L. pneumophila</i>	M	pos	Allent./France	42	1
28	<i>L. pneumophila</i>	M	pos	Benidorm	42	1
29	<i>L. pneumophila</i>	M	pos	Benidorm	42	1
31	<i>L. pneumophila</i>	P	pos	Allent./France	23	1
33	<i>L. pneumophila</i>	P	pos	Bellingham	59	1

M=milieu, P=patient, Mab 3/1 pos = wordt herkend door Dresden Mab 3/1,

2.3 **Monsternamen en voorbehandeling van de drinkwatermonsters**

In het kader van een ander onderzoek (Schalk et al., 2011) zijn drinkwatermonsters genomen op 10 achtereenvolgende data op 4 locaties. Monsters zijn genomen van de koude kraan zoals beschreven in de NEN6265. Hierbij werd eerst 1L van het kraanwater afgetapt en weggegooid, waarna vervolgens één monster van 0,5L genomen werd voor de detectie van legionella. Filtratie en analyse van de drinkwatermonsters werd uitgevoerd volgens de NEN 6265: 2007 (Water-Detectie en telling van Legionella). Hierbij werd 0,5L van het monster gefiltreerd over een 0,2µm polycarbonaat filter (Millipore, Billerica, MA, USA). Het filter werd vervolgens 2 minuten gesoniceerd in 5 ml van het oorspronkelijke water met glaspereels. Het monster werd getest in een amoebekweek door in viervoud 100µl van het monster aan amoeben toe te voegen (zie paragraaf 2.1). Het monster werd ook getest volgens de klassieke kweekmethode op BCYE-platen, zoals beschreven in paragraaf 2.5.

2.4 **Monsternamen en voorbehandeling van de RWZI-monsters**

In het kader van een ander onderzoek (Schets et al., 2011) zijn watermonsters genomen, bij 4 rioolwaterzuiveringsinstallaties (RWZIs), van zowel het influent als uit de beluchtingstank. Watermonsters van de RWZIs werden niet gefiltreerd, maar direct onderzocht op de aanwezigheid van legionella. De helft van ieder monster werd verhit (gepasteuriseerd) gedurende 30 minuten bij 50°C. Zowel het gepasteuriseerde deel van het monster als het niet-gepasteuriseerde deel werd getest met behulp van de amoebekweek (zie paragraaf 2.1) en met behulp van de klassieke kweek op BCYE-platen (zie paragraaf 2.5).

2.5 **Detectie van legionella volgens NEN 6265**

Monsters werden getest via de klassieke kweek op BCYE-platen volgens de methode zoals is vastgelegd in de NEN6265:2007. Het concentraat van de drinkwatermonsters werd uitgeplaat op 10 BCYE-platen (Oxoid), 2 BCYE-platen met antibiotica (AB) (Oxoid) en 2 BCYE-platen zonder cysteïne (Oxoid), waarbij 100µl per plaat werd uitgespateld. De RWZI-monsters werden (al dan niet na pasteurisatie) uitgeplaat op 2 BCYE-platen (Oxoid), 2 BCYE-platen met AB (Oxoid), 2 MWY platen (Oxoid) en 2 BCYE-platen zonder cysteïne (Oxoid). Platen werden gedurende 7 dagen geïncubeerd bij 37°C en geïnspecteerd op de aanwezigheid van legionellakolonies. Verdachte legionellakolonies werden doorgestreken op BCYE-platen met en zonder cysteïne. Indien geen groei optrad op de platen zonder cysteïne en wel op de platen met cysteïne was dit een bevestiging dat het een legionellabacterie betrof. Van bevestigde legionellastammen werd een identificatie van de legionellasoort uitgevoerd door middel van sequentie-analyse van een deel van het *mip*-gen zoals beschreven in paragraaf 2.6.

2.6 **Sequentie-analyse van een deel van het *mip*-gen van legionellastammen**

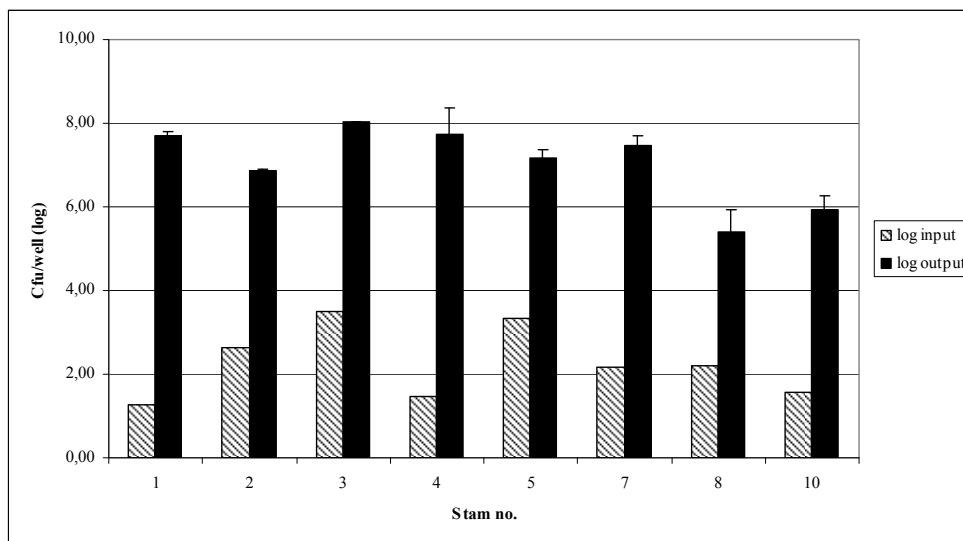
Materiaal van de eerder ingevroren stammen werd 1:10 verdund in demiwater en gedurende 5 minuten verhit bij 95 °C. Een PCR-reactie werd uitgevoerd op 5µl van dit lysaat met de gedegenereerde primers Mip-FP1 (5'-GAASARCAAATGAAAGAYGTTC-3') en Mip-RP8 (5'-CCAGGRATAACTTGYGAWAC-3'). De PCR werd uitgevoerd in een totaal volume van 50µl PCR-mix met daarin 1×PCR-buffer II (Roche, Almere, Nederland), 2,5 mM MgCl₂ (Roche), 0,2 mM dNTPs (Roche), 0,8 µM van elke primer en 1,5 U Taq polymerase. Het PCR-programma bestond uit : 5' 95°C, 35 cycli van 30" 95°C, 30" 50°C, 30" 72°C, gevolgd door 10' 72°C. De grootte van het PCR-product (320 bp) werd gecontroleerd door deze met behulp van gelelectroforese op een 2% (w/v)

agarose gel te scheiden. De PCR-producten werden vervolgens behandeld met ExoSAP (GE Healthcare, Diegem, België) om de dNTPs en primers te hydrolyseren. De behandelde PCR-producten werden gesequenced met de BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit (Perkin-Elmer, Applied Biosystems, Foster City, California) met de Mip-FP1 en Mip-RP8 primers als forward en reverse sequencing primers. Sequenties werden geanalyseerd met Bionumerics software versie 6.6 (Applied Maths, Kortrijk, Belgium) en vergeleken met legionellasequenties uit de NCBI database.

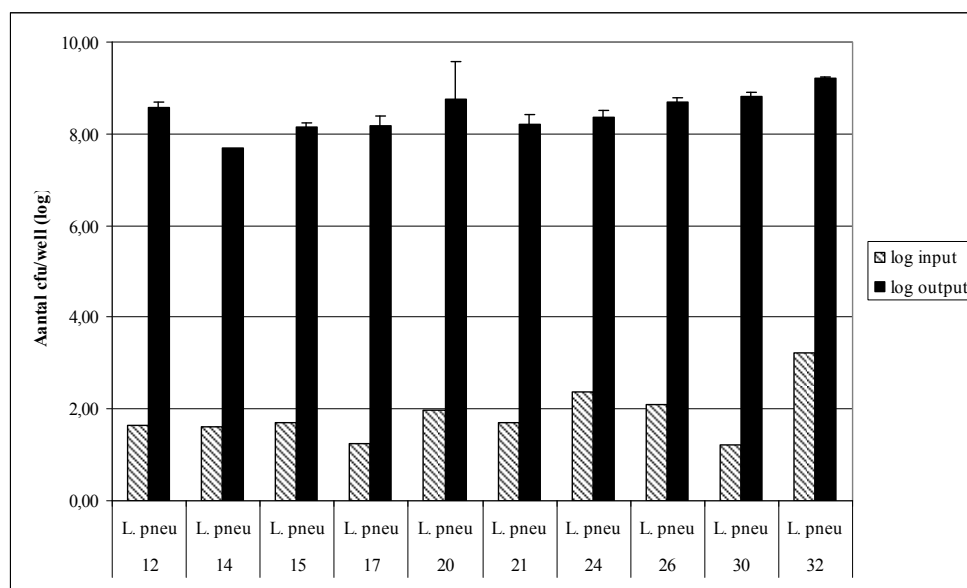
3 Resultaten

3.1 Vaststellen van het vermogen van verschillende legionellastammen om zich te vermenigvuldigen in *A. castelanii*

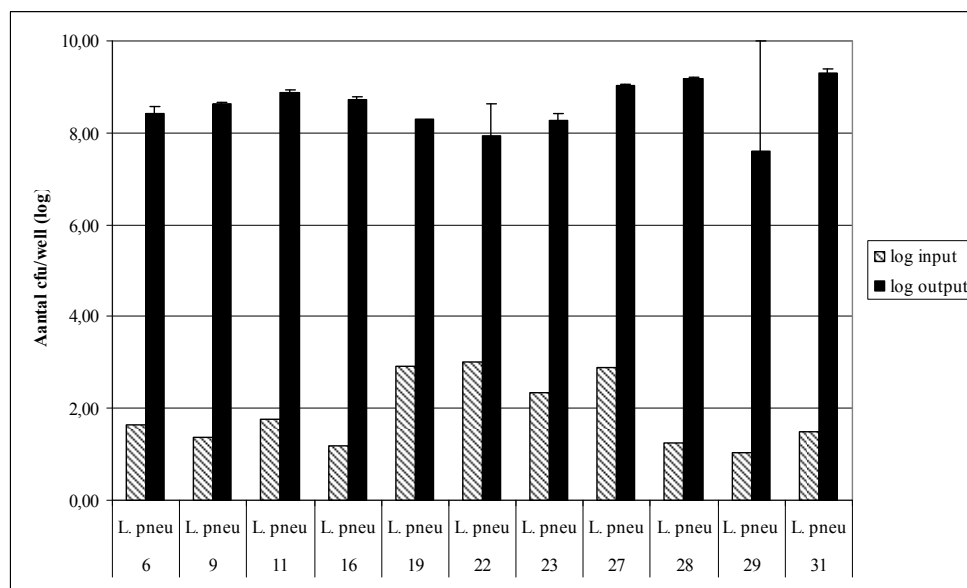
Voor acht *L. anisa* stammen, tien Mab 3/1 negatieve *L. pneumophila* en tien Mab 3/1 positieve *L. pneumophila* stammen (zie tabel 1) is het vermogen getest om te vermenigvuldigen in *A. castelanii*. Dit werd uitgevoerd zoals beschreven in §2.3. In onderstaande figuren is de vermeerdering van de verschillende legionellastammen in amoeben weergegeven. Figuur 1 geeft de toename van de *L. anisa* stammen in *A. castelanii* weer, Figuur 2 de toename van de Mab 3/1 negatieve *L. pneumophila* stammen en Figuur 3 de toename van de Mab 3/1 positieve *L. pneumophila* stammen. De *L. pneumophila* stammen behoorden allen tot serogroep 1, behalve stam 32 (serogroep 2). Uit de figuren blijkt dat er geen verschil is tussen het vermogen van Mab 3/1 negatieve en Mab 3/1 positieve *L. pneumophila* stammen om zich te vermenigvuldigen in *A. castelanii*. Verder blijken alle acht geteste *L. anisa* stammen in staat om zich te vermenigvuldigen in *A. castelanii*.



Figuur 1 Replicatie van *L. anisa* stammen in *A. castelanii*



Figuur 2 Replicatie van Mab 3/1-negatieve *L. pneumophila* stammen in *A. castellanii*



Figuur 3 Replicatie van Mab 3/1-positieve *L. pneumophila* stammen in *A. castellanii*

3.2 Vergelijken van de amoebekweek met de BCYE-kweek voor drinkwatermonsters

De amoebekweek is vergeleken met de BCYE-kweek volgens de NEN6265 methode door achttien drinkwatermonsters te testen met beide methoden. De drinkwatermonsters zijn afkomstig van vier locaties die in de tijd meerdere malen zijn bemonsterd in het kader van een ander onderzoek (Schalk et al., 2011). De resultaten zijn weergegeven in tabel 1.

Tabel 1 Vergelijking van legionella detectie met de NEN6265 en de amoebekweek

Locatie	Datum monstername	NEN 6265 (Kve/L)	Amoebekweek (# positieve wells/ # geteste wells)
1	6-4-11	< 10	0/4
	11-4-11	< 10	0/4
	13-4-11	< 10	0/4
	18-4-11	50	0/4
	8-8-11	< 10	0/1
2	6-4-11	50	4/4
	11-4-11	1900	4/4
	13-4-11	1350	4/4
	18-4-11	1550	4/4
	8-8-11	< 10	1/1
3	6-4-11	150	3/4
	11-4-11	20	0/4
	13-4-11	10	1/4
	18-4-11	70	0/4
	8-8-11	< 10	0/1
4	6-4-11	< 10	4/4
	11-4-11	< 10	4/4
	13-4-11	< 10	4/4

Zes van de achttien monsters waren met beide methoden positief en vijf van de achttien monsters waren met beide methoden negatief. Drie van de achttien monsters waren positief met de NEN6265 methode en negatief met de amoebekweek. Dit betrof monsters met een lage legionellaconcentratie, variërend van 20 tot 70 kve/L. Vier van de achttien monsters waren negatief met de NEN6265 methode en positief met de amoebekweek methode, en bij drie van deze vier monsters betrof het locatie 4. Bij alle vier de monsters was er op de platen van de NEN6265 methode veel bijgroei te zien wat mogelijk de groei van de aanwezige legionellabacteriën onderdrukt. Alle geïsoleerde legionellastammen uit de monsters genomen bij locatie 4 op alle drie de monsternamedagen betroffen de soort *L. gormanii*. Alle overige legionellastammen die werden geïsoleerd met zowel de NEN6265 methode als met de amoebekweek methode behoorden tot de soort *L. anisa*.

3.3 Vergelijken van de amoebekweek met de BCYE-kweek voor RWZI-monsters

Bij vier RWZI-installaties zijn monsters genomen van zowel het influent als van de beluchtingstank. De helft van elk monster is gepasteuriseerd om eventuele andere bacteriën af te doden. Zowel het gepasteuriseerde deel als het ongepasteuriseerde deel van ieder monsters werd getest op de aanwezigheid van legionella door dit deel uit te platen op BCYE-platen met en zonder antibiotica en met de amoebekweekmethode. De BCYE-platen waren niet te beoordelen door overgroei met andere bacteriën voor zowel gepasteuriseerd als ongepasteuriseerd monsters. Ook de MWY-platen, die extra antibiotica bevatten ten opzichte van BCYE-platen om groei van andere bacteriën te remmen, waren niet te beoordelen vanwege bijgroei. Met de amoebekweek werden drie monsters positief bevonden voor legionella. Van ieder monster zijn twee geïsoleerde legionellakolonies nader getypeerd met behulp van sequentie-analyse en de resultaten staan weergegeven in tabel 2. Een monster bevatte *L.sainthelensi* en in twee monsters werd *L. pneumophila* aangetroffen.

Tabel 2 Detectie van legionella in RWZI-monsters met de amoebe-kweek

RWZI #	Locatie	Ongepasteuriseerd	Gepasteuriseerd
1	I	-	-
	B	-	<i>L.sainthelensi</i>
2	I	-	-
	B	-	-
3	I	-	<i>L. pneumophila</i>
	B	-	<i>L. pneumophila</i>
4	I	-	-
	B	-	-

Ondanks dat de monsters veel andere bacteriën bevatten waardoor ze met kweek op BCYE-platen niet te analyseren waren, was het met de amoebekweek wel mogelijk om legionella uit de monsters te isoleren.

4 Discussie

We beschrijven hier de toepassing van een amoebekweekmethode voor de isolatie van legionella uit water. In deze studie is aangetoond dat zowel pathogene als niet-pathogene stammen van *L. pneumophila* zich goed kunnen vermeerderen in amoeben van de soort *A. castelanii*. Tevens vermenigvuldigen alle geteste *L. anisa* stammen zich goed in de amoeben. Uit de analyses van de monsters drinkwater, afvalwater en water uit de beluchtingstank blijkt dat in ieder geval de *L. non-pneumophila* stam *L. sainthelensi* zich ook goed vermenigvuldigt in *A. castelanii*. Een *L. pneumophila* Philadelphia stam, die was verkregen via het ATCC, vermeerde niet in *A. castelanii* cellen (data niet weergegeven), hoewel een andere *L. pneumophila* Philadelphia stam, die was verkregen via het Streeklab Haarlem (stam 23, figuur 3) zich wel goed vermenigvuldigde. Mogelijk dat de Philadelphia stam van het ATCC zijn virulentie was verloren door het veelvuldig doorzetten op BCYE-platen. Neumeister et al. (1997) beschrijven dat *L. anisa* zich niet vermenigvuldigt in *A. castelanii* cellen, maar alle acht *L. anisa* stammen die in deze studie zijn getest blijken zich goed te vermeerderen. Ook hier zou een verklaring kunnen zijn dat de *L. anisa* stam die was gebruikt door Neumeister et al. (1997), zijn virulentie was kwijtgeraakt. Het dient als aanbeveling om voor meer *L. non-pneumophila* stammen te testen of ze kunnen worden aangetoond met de amoebekweekmethode.

Uit de vergelijking op drinkwatermonsters, tussen de kweekmethode op BCYE-platen en de amoebekweek, volgt dat met de amoebekweek vaker monsters positief werden bevonden (56% van de monsters) dan met de klassieke kweekmethode (50% van de monsters). De vier monsters die positief waren met de amoebekweek en negatief met de BCYE-kweek waren allemaal monsters met veel bijgroei op de platen bij de BCYE-kweek. In monsters met veel bijgroei biedt de amoebekweek het voordeel dat door de verrijking van de legionellabacteriën in amoeben, de bacteriën vervolgens wel aantoonbaar zijn op BCYE-platen. Uit de experimenten met de legionellastammen bleek dat de toename van legionellabacteriën op de amoeben minstens 5-6 log₁₀ bedroeg na zes dagen incubatie.

Bij drie monsters werd met de amoebekweek *L. gormanii* geïsoleerd, terwijl deze monsters met de BCYE-kweek negatief waren. Met de klassieke kweekmethode werd uit alle positieve monsters *L. anisa* geïsoleerd. Mogelijk dat *L. gormanii* met de klassieke kweekmethode minder goed is aan te tonen en daardoor gemist wordt.

De drie monsters die positief waren met de klassieke kweek en negatief met de amoebekweek waren monsters waarin de legionellaconcentratie heel laag was (20-70 kve/L). De detectielimiet van een methode wordt mede bepaald door het volume aan monster wat wordt onderzocht. In deze studie werd met de klassieke kweek 10×100µl van het concentraat onderzocht, wat overeenkomt met 100 ml van het oorspronkelijke water. Met de amoebekweek werd 4×100µl van het concentraat onderzocht wat overeenkomt met 20 ml van het oorspronkelijke water. Doordat met de klassieke kweek in deze studie een groter volume werd onderzocht is de kans om een legionellabacterie aan te treffen met de klassieke kweek groter dan met de amoebekweek. De detectielimiet van de amoebekweek kan verder verhoogd worden door meer volume te onderzoeken.

In de vergelijking tussen de amoebekweek en de BCYE-kweek voor RWZI monsters was de amoebekweek in drie van de acht geteste monsters positief, terwijl de platen van de BCYE-methode niet te beoordelen waren door overgroei met andere bacteriën. De amoebekweekmethode blijkt dus met name een

voordeel te hebben voor monsters met veel bijgroei. Het nadeel van de amoebekweekmethode is echter dat het een arbeidsintensieve methode is die een lange doorlooptijd kent. De methode kan een aanvulling zijn voor monsters die met de klassieke methode niet of moeilijk te analyseren zijn door te veel bijgroei, zoals monsters genomen van koeltorens of drinkwatermonsters met veel bijgroei. Oorspronkelijk werd de amoebekweek beschreven voor analyse van een sputum monster van een patiënt met een positief resultaat waar met klassieke methoden geen legionella in kon worden aangetroffen (La Scola et al. 2001). Dit bood de mogelijkheid tot typering. Mogelijk dat de amoebekweek methode een bijdrage kan leveren bij de bronopsporing bij legionella-uitbraken, waarbij met standaard kweekmethoden op BCYE-platen de ziekmakende bacteriën vaak niet worden gevonden. Daarnaast kan de amoebekweek bijdragen aan het analyseren van mogelijke alternatieve bronnen van legionella. In een andere studie zijn met de amoebekweekmethode pathogene *L. pneumophila* bacteriën geïsoleerd uit regenwater (Schalk et al., 2012).

Literatuur

Amann, R.I., W. Ludwig, K.H. Schleifer (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*. 59, 143-169

Den Boer JW, Verhoef L, Bencini MA, Bruin JP, Jansen R, Yzerman EP. (2007) Outbreak detection and secondary prevention of Legionnaires' disease: a national approach. *Int J Hyg Environ Health*. 210:1-7.

Brandsema P.S., Dijkstra F., van Gageldonk-Lafeber A.B., Snijders B.E.P., Meijer A., van der Hoek W. (2011) Jaarrapportage surveillance respiratoire infectieziekten 2010. RIVM Briefrapport 210231008.

Byrd, J.J., H.S. Xu, R.R. Colwell (1991) Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 875-878.

Delgado-Viscogliosi, P., T. Simonart, V. Parent, G. Marchand, M. Dobbelaere, E. Pierlot, V. Pierzo, F. Menard-Szczebara, E. Gaudard-Ferveur, K. Delabra en J.M. Delattre (2005) Rapid method for enumeration of viable *Legionella pneumophila* and other *Legionella* spp. in water. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 4086-4096.

Dusserre E, C. Ginevra, S. Hallier-Soulier, F. Vandenesch, G. Festoc, J. Etienne, S. Jarraud, M. Molmeret (2008) A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable *Legionellae* that can recover their cultivability. *Appl. Env. Microbiol.* 74: 4817-4824.

Gaia, V., Fry, N.K., Afshar, B., Luck, P.C., Meugnier, H., Etienne, J., Peduzzi, R., Harrison, T.G. (2005). Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 2047-2052.

Garcia, M.T., S. Jones, C. Pelaz, R.D. Millar, Y. Abu Kwaik (2007) *Acanthamoeba polyphaga* resuscitates viable non-culturable *Legionella pneumophila* after disinfection. *Environmental Microbiology* 9: 1267-1277.

Gião, M.S., S.A. Wilks, N.F. Azevedo, M.J. Vieira, C.W. Keevil (2009) Validation of SYTO 9/Propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable *Legionella pneumophila*. *Environmental Microbiology* 58: 56-62.

Helbig J.H., Lück P.C., Knirel Y.A., Witzleb W., Zähringer U. 1995. Molecular characterization of a virulence-associated epitope on the lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* serogroup 1. *Epidemiol. Infect.* 115: 71-78.

Hussong, D., R.R. Colwell, M. O'Brien, E. Weiss, A.D. Pearson, R.M. Weiner, W.D. Burge (1987) Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media, *Biotechnology* 5, 947-950.

La Scola, B., Mezi, L., Weiller, P.J., Raoult, D. (2001). Isolation of *Legionella anisa* using an amoebic coculture procedure. *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 365-366.

Lück P.C., Helbig J.H., Ehret W., Marre R., Witzleb W. 1992. Subtyping of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains isolated in Germany using monoclonal antibodies. *Zentralbl Bakteriol.* 277: 179-187.

Neumeister, B., S. Schoniger, M. Faigle, M. Eichner, K. Dietz (1997) Multiplication of different *Legionella* species in Mono Mac 6 cells and in *Acanthamoeba castellanii*. 63: 1219-1224.

Ratzow, S., Gaia, V., Helbig, J.H., Fry, N.K., Lück, P.C. (2007). Addition of neuA, the gene encoding N-acylneuraminate cytidyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. Journal of Clinical Microbiology. 45, 1965-1968.

Rowbotham, T.J. (1980) Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. Journal of Clinical Pathology 33: 1179-1183.

Rowbotham T.J. 1983. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoeba and the interaction of those and other isolates with amoeba. J. Clin. Pathol. 36: 978-986.

Schalk J.A.C., de Roda Husman A.M. (2010^a) Detectiemethoden voor legionella in water. RIVM rapport no. 703719063.

Schalk, J.A.C., W.J. Lodder, S.A. Rutjes, F.M. Schets, A.M. de Roda Husman (2010^b) Legionella in water. RIVM Rapport 703719039.

Schalk J.A.C., Redeker, Docters van Leeuwen A.E., Lodder W.J. de Roda Husman A.M. (2011) Longitudinale studie naar de aanwezigheid van legionella en amoeben in drinkwaterinstallaties. RIVM rapportnummer 703719082

Schalk J.A.C., Docters van Leeuwen A.E., Lodder W.J., de Man H., Euser S., den Boer J.W., de Roda Husman A.M. 2012. *Legionella pneumophila* isolated from pluvial floods by amoebal co-culture. Appl. Environ. Microbiol., doi:10.1128/AEM.00131-12

Schets FM., de Heer DN., van den Berg H.H.L., de Bruin A. (2011). Q-koorts-bacterie (*Coxiella burnetii*) in afvalwater op rioolwaterzuiveringsinstallaties

Steinert, M., Emödy, L., Amann, R. en Hacker, J. (1997). Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. Applied and Environmental Microbiology. 63, 2047-2053.

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl