



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

Literatuurstudie naar de detectie van Legionella in (drink)water

RIVM-briefrapport 2022-0181
H.H.J.L. van den Berg et al.



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

Literatuurstudie naar de detectie van Legionella in (drink)water

RIVM-briefrapport 2022-0181
H.H.J.L. van den Berg et al.

Colofon

© RIVM 2022

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.

Het RIVM hecht veel waarde aan toegankelijkheid van zijn producten. Op dit moment is het echter nog niet mogelijk om dit document volledig toegankelijk aan te bieden. Als een onderdeel niet toegankelijk is, wordt dit vermeld. Zie ook www.rivm.nl/toegankelijkheid.

DOI 10.21945/RIVM-2022-0181

H.H.J.L. van den Berg (auteur), RIVM
R. Niese (auteur), RIVM
G. Lynch (auteur), RIVM
P. Brandsema (auteur), RIVM
A.A. Bartels (auteur), RIVM
A.M. de Roda Husman (auteur), RIVM

Contact:

Harold van den Berg
Centrum voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie
Harold.van.den.berg@rivm.nl

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat binnen het Programma 27 van directie Waterkwaliteit Ondergrond Marien (WOM) in het kader van project M/270118 Legionella in Drinkwater

Dit is een uitgave van:
**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**
Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
Nederland
www.rivm.nl

Publiekssamenvatting

Literatuurstudie naar de detectie van Legionella in (drink)water

Als mensen Legionellabacteriën inademen, kunnen ze een longontsteking krijgen. Er zijn meer dan 60 legionellasoorten bekend. In Nederland worden de meeste mensen, ongeveer 90 procent van alle legionellose-meldingen, ziek van *Legionella pneumophila*. Mensen kunnen via verschillende bronnen met deze bacteriën besmet raken. Legionellabacteriën kunnen bijvoorbeeld in drinkwater zitten, maar dat is meestal een andere legionellasoort dan *Legionella pneumophila*.

De wetgeving schrijft een methode voor die alle legionellabacteriën in drinkwater kan aantonen. Hoewel bijna nooit mensen ziek worden van de meeste legionellasoorten in drinkwater, moeten ze volgens de wet wel allemaal worden verwijderd. Er is daarom al enkele jaren discussie om voor bepaalde instellingen, zoals hotels en zwembaden, niet alle legionellabacteriën in drinkwater aan te tonen maar alleen *Legionella pneumophila*.

Het RIVM heeft in dit verband uitgezocht welke methoden bestaan om legionellabacteriën, en vooral *Legionella pneumophila*, in drinkwater op te sporen. Veel verschillende methoden in de wetenschappelijke literatuur zijn veelbelovend. Vijf van deze methoden hebben kunnen aantonen dat ze even goed of beter zijn dan methode die de wet nu voorschrijft. Van alle beschreven methoden kan het RIVM er niet één als de beste aanwijzen. Dat komt omdat ze op een andere manier de legionellabacteriën aantonen dan de wet voorschrijft. Ook moet onderzocht worden of de methoden in de praktijk goed en betaalbaar zijn uit te voeren.

Het RIVM adviseert het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat (IenW) dat het onder de bestaande voorwaarden wettelijk mogelijk moet blijven om een andere methode te gebruiken. Verder wordt aanbevolen om te onderzoeken hoe de juridische omschrijving voor de wettelijke norm van legionellabacteriën in drinkwaterinstallaties kan worden aangepast zodat er ook ruimte is voor nieuwe methoden. Zo moet een methode volgens de wet onder andere aantonen of er een kolonie van legionellabacteriën kan ontstaan. Dat kan niet met alle gevonden methoden.

Het RIVM heeft dit onderzoek gedaan in opdracht van het ministerie van IenW. Het heeft de wetenschappelijke literatuur onderzocht en gesproken met de drinkwaterlaboratoria en het Nederlands Normalisatie Instituut.

Kernwoorden: *Legionella pneumophila*, drinkwater, detectiemethode, validatie, verificatie

Synopsis

Literature review on the detection of legionella in drinking water

Inhalation of legionella bacteria can lead to pneumonia (Legionnaires' disease). More than 60 types of legionella bacteria are known. In the Netherlands, most people get Legionnaires' disease from *Legionella pneumophila* (around 90 percent of all reported cases). People can become infected with these bacteria through a variety of sources. Legionella bacteria can occur in drinking water, however these are usually other species than *Legionella pneumophila*.

Dutch legislation prescribes a method that can detect all legionella bacteria in drinking water. Though people rarely fall ill from most species of legionella bacteria found in drinking water, by law all legionella species must be eliminated. For some years now there has been discussion about allowing particular facilities, such as hotels and swimming pools, to test only for *Legionella pneumophila*, rather than all legionella species.

To this end, RIVM has investigated existing methods to detect legionella bacteria, and particularly *Legionella pneumophila*, in drinking water. Many different methods described in the scientific literature appear promising. Five of these methods are proven to be as good as or better than the method currently prescribed by the law. RIVM is not able to single out one best method. This is because the described methods detect legionella bacteria in a way that is different to what the legislation prescribes. Furthermore, the practicability and affordability of these methods must also be analysed.

RIVM recommends the Ministry of Infrastructure and Water Management to allow the use of other methods under the existing conditions. Another recommendation is to identify how the legislative description of the legal standard for legionella bacteria in drinking water installations can be amended to include new methods. For instance, the legislation currently states that a method can detect colony forming units. Not all of the methods identified can do this.

RIVM carried out this study on behalf of the Ministry of Infrastructure and Water Management. It examined the scientific literature and spoke with drinking water laboratories and the Royal Netherlands Standardization Institute.

Keywords: *Legionella pneumophila*, drinking water, detection method, validation, verification

Inhoudsopgave

Samenvatting — 9

1 Inleiding — 11

1.1 Leeswijzer — 11

1.2 Aanleiding — 11

2 Achtergrond — 13

2.1 Legionella en water — 13

2.2 Normen voor de detectie van Legionella in water — 14

2.3 Validatie en verificatie — 16

2.3.1 Validatie — 17

2.3.2 Verificatie — 18

3 Methode — 21

3.1 Literatuurstudie — 21

3.2 Afstemming met relevante partijen — 23

3.3 Verwerken van de gegevens — 23

4 Resultaten — 25

4.1 Literatuurstudie — 25

4.2 Voor- en nadelen van de diverse detectiemethoden voor *Legionella spp.* en *Legionella pneumophila* in water — 26

4.2.1 Kweekmethoden — 26

4.2.2 Moleculaire detectie — 35

4.2.3 Immunologische detectie — 43

4.3 Samenvatting van de resultaten — 48

5 Discussie — 53

6 Conclusie en aanbevelingen — 59

Dankwoord — 61

Literatuur — 63

Bijlage 1 Normcommissie 'Microbiologische parameters' en ontwikkeling van normen — 73

Bijlage 2 Verschillen tussen nationale en internationale normen voor Legionella — 77

Bijlage 3 Mogelijke herzieningen van en verbeterpunten voor normen — 80

Bijlage 4 Generieke normen gerelateerd aan NEN-EN-ISO 11731 — 81

Bijlage 5 Zoektermen voor literatuuronderzoek — 82

Samenvatting

Achtergrond

De bacteriesoort *Legionella pneumophila* veroorzaakt in Nederland ongeveer 90% van de gediagnosticeerde legionellapneumonie-infecties. Naast deze soort zijn er inmiddels meer dan 60 andere legionellasoorten ontdekt. Vanwege de kleine kans op ziekte worden de overige soorten vaak collectief '*Legionella non-pneumophila*' genoemd. In Nederland worden in watermonsters afkomstig van onder andere leidingwaterinstallaties vooral *L. non-pneumophila*-soorten aangetroffen en in veel mindere mate *L. pneumophila*. De huidige methode voor de detectie van legionellabacteriën in drinkwater, die is vastgelegd in de Regeling Legionellapreventie in drinkwater en warm tapwater, is NEN-EN-ISO 11731. Deze methode toont *Legionella spp.* aan, waarbij onderscheid gemaakt kan worden tussen *L. pneumophila* en *L. non-pneumophila*. Omdat de meeste legionellabacteriën in drinkwater zelden ziekte veroorzaken maar wel verwijderd moeten worden, bestaat er al geruime tijd discussie of het wenselijk is om legionelladetectie in het kader van legionellapreventie enkel te richten op *L. pneumophila*. In een evaluatierapport van de regelgeving over legionellapreventie in leidingwaterinstallaties adviseren de auteurs van Berenschot en KWR om de Regeling Legionellapreventie in drinkwater en warm tapwater voor een aantal prioritaire instellingen te richten op *L. pneumophila*. Dit was aanleiding om te onderzoeken welke gevalideerde methoden beschikbaar zijn voor de detectie van *Legionella spp.* en in het bijzonder specifiek voor *L. pneumophila*, in (drink)water die als alternatief kunnen dienen voor de huidige methode.

Onderzoek

Om een beter beeld te krijgen van beschikbare detectiemethoden van *Legionella spp.* en *Legionella pneumophila* in water is een literatuuronderzoek uitgevoerd. Ook is er informatie opgehaald bij de Nederlandse drinkwaterlaboratoria over ervaringen met de detectie van Legionella in water en bij NEN over de normen voor Legionella detectie in water en de eisen voor validatie en verificatie. Van de ruim 3000 gevonden artikelen werden er uiteindelijk 98 in de studie geïnccludeerd. Van deze 98 artikelen toonden 66 artikelen een vergelijking tussen twee of meer detectiemethoden voor Legionella in water. Uit de literatuurstudie bleek dat naast de NEN-EN-ISO 11731 nog vijf andere methoden gevalideerd waren en de detectie van *Legionella spp.* of *Legionella pneumophila* in water gelijkwaardig of beter was dan de huidige methode (NEN-EN-ISO 11731). Dit waren: Legipid® Bioalarm Legionella Assay, Scan-VIT-Legionella, L.p. SG1 DETECT kit, New Legionella spp. quantitative kit en Legiolert©. De andere detectiemethoden zijn niet gevalideerd, waardoor voor de meeste methoden niet alle kenmerken inzichtelijk zijn. Op basis van de gegevens uit de literatuur zijn de voor- en nadelen van alle detectiemethoden omschreven, en, indien mogelijk, ook gekoppeld aan de praktijkervaringen van de drinkwaterlaboratoria.

Conclusie

Er zijn veelbelovende detectiemethoden voor *Legionella spp.* en specifiek *L. pneumophila* beschreven, die mogelijk kunnen bijdragen aan de selectie van potentiële detectiemethoden of voor de voorwaarden die gesteld moeten worden voor het toepassen van deze methoden. Op basis van deze literatuurstudie is het niet mogelijk om één detectiemethode aan te wijzen die het meest geschikt is voor de detectie van enkel *L.pneumophila* of *L. spp.* inclusief *L.pneumophila*. Het is aan te bevelen dat in de regelgeving de mogelijkheid blijft bestaan om een alternatieve methode te gebruiken die gelijkwaardig of beter is dan de NEN-EN-ISO 11731, mits deze gevalideerd is. Ook wordt aanbevolen om te onderzoeken hoe de juridische omschrijving in de wetgeving kan worden aangepast zodat er ook ruimte is voor nieuwe methoden waarbij geen kolonievormende eenheden worden aangetoond.

1 Inleiding

1.1 Leeswijzer

In het eerste hoofdstuk wordt de aanleiding voor het onderzoek beschreven en de doelstelling geformuleerd. Het tweede hoofdstuk geeft achtergrondinformatie die relevant is voor het verdere rapport zoals informatie over (inter)nationale normen voor Legionella detectie in water en validatie en verificatie.

In het derde hoofdstuk wordt de aanpak van het onderzoek beschreven. De resultaten van het onderzoek zijn weergegeven in hoofdstuk 4. De beperkingen van het onderzoek en kennishiaten komen aan bod in de discussie in hoofdstuk 5. Tot slot staan in hoofdstuk 6 de conclusie en aanbevelingen.

1.2 Aanleiding

In een evaluatierapport van de regelgeving over legionellapreventie in leidingwaterinstallaties adviseren de auteurs van Berenschot en KWR om de regelgeving voor een aantal prioritaire instellingen, zoals hotels en zwembaden te richten op *L. pneumophila*. Anderzijds is het advies in dit rapport om het beheersplan en de monitoring wel te blijven richten op alle *L. spp.* voor locaties waar veel mensen met een ernstig verzwakt immuunsysteem voorkomen, zoals ziekenhuizen (van Der Wielen et al., 2021). Om te controleren of de beheersmaatregelen bij een leidinginstallatie effectief zijn in het voorkomen van Legionellagroei moeten er bij prioritaire locaties periodiek watermonsters worden genomen (monitoring). Wanneer de regelgeving wordt aangepast naar preventie van *L. pneumophila*, moet ook de monitoring zich specifiek richten op aanwezigheid van *L. pneumophila*. Daarvoor is het nodig om een specifieke detectiemethode voor *L. pneumophila* te gebruiken (van Der Wielen et al., 2021). Met de huidige detectiemethode door middel van kweek (NEN-EN-ISO 11731) wordt niet direct een onderscheid gemaakt tussen *L. pneumophila* en *L. non-pneumophila*. Alhoewel dit onderscheid kan worden gemaakt in een vervolgstap, is het wenselijk om een detectiemethode te gebruiken die direct *L. pneumophila* kan aantonen.

Voorwaarde voor een daadwerkelijke invoering van het richten op *L. pneumophila* is dat er betrouwbare en gevalideerde analysemethode(n) voor *L. pneumophila* op de Nederlandse markt beschikbaar komt/komen. Deze methode dient tenminste even effectief *L. pneumophila* te kunnen aantonen als de huidige NEN-EN-ISO 11731 (in de vervolgstap). Bovendien moet deze methode ook gevalideerd zijn (zie hoofdstuk 2.3). In het rapport van Berenschot en KWR wordt verwezen naar twee veelbelovende alternatieve kweekmethoden voor de specifieke detectie van *L. pneumophila* in drinkwatermonsters uit leidinginstallaties (van Der Wielen et al., 2021). Het toepassen van die kweekmethoden maakt het mogelijk om de detectie uitsluitend te kunnen richten op *L. pneumophila*, zonder dat de detectie verstoord wordt door de aanwezige *L. non-pneumophila*. Echter, de methoden die zich enkel op de detectie van *L. pneumophila* richten volstaan niet voor locaties waarvoor wel wordt geadviseerd om op *Legionella spp.* te

richten. Hiervoor moet een methode gebruikt worden die *Legionella spp.* aantoonst zoals de huidige NEN-EN-ISO 11731 of een gelijkwaardige methode.

In opdracht van het ministerie van Infrastructuur en Waterstaat is een literatuurstudie uitgevoerd om te onderzoeken welke gevalideerde methoden beschikbaar zijn voor de detectie van *L. pneumophila* en *Legionella spp.* in drinkwater. Van de beschikbare methoden wordt bekeken wat de voor- en nadelen zijn, en hoe betrouwbaar deze methoden zijn. Ook worden aanbevelingen voor beleid, praktijk en onderzoek gedaan.

2 Achtergrond

2.1 Legionella en water

Legionella pneumophila veroorzaakt in Nederland ongeveer 90% van de gediagnosticeerde legionellapneumonie-infecties (Reukers et al., 2018). Naast deze soort zijn er inmiddels meer dan 60 andere legionellasoorten ontdekt, waarvan er 27 *Legionella* species bekend zijn die, naast *L. pneumophila*, ook infecties kunnen veroorzaken zoals: *L. longbaechae*, *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. dumoffii*, *L. feeleii*, *L. wadsworthii* en *L. anisa* (Tingley et al., in progress). Vanwege de kleine kans op ziekte worden de overige soorten vaak collectief '*Legionella non-pneumophila*' genoemd. Met de term *Legionella* species (*Legionella spp.*) worden alle verschillende Legionellasoorten aangeduid, zowel *L. pneumophila* als *non-pneumophila*.

In de Regeling Legionellapreventie in drinkwater en warm tapwater is vastgelegd dat het nemen en analyseren van monsters in het kader van legionellapreventie dient te gebeuren volgens een gestandaardiseerde methode, namelijk de NEN-EN-ISO 11731, met inbegrip van het bijbehorende Nederlandse voorwoord, of een gelijkwaardige methode (IenW, 2019). De NEN-EN-ISO 11731 beschrijft een gevalideerde methode op basis van een kweekmethode op specifieke kweekplaten die informatie oplevert over de aantallen kweekbare legionellabacteriën. Deze methode toont *Legionella spp.* aan, waarbij in een vervolgstap onderscheid gemaakt kan worden tussen *L. pneumophila* en *L. non-pneumophila*. Meer informatie over normen voor de detectie van *Legionella* in water is weergegeven in paragraaf 2.2. In de drinkwaterregeling is opgenomen dat het nemen en analyseren van monsters ter uitvoering van het drinkwaterbesluit geschiedt door laboratoria die een kwaliteitsborgingssysteem hanteren gebaseerd op NEN-EN-ISO/IEC 17025 en die daarvoor geaccrediteerd zijn (drinkwaterregeling). Analysemethoden die worden aangeboden voor accreditatie bij de Raad voor Accreditatie (RvA) dienen gevalideerd of geverifieerd te zijn (RvA, 2020). Meer informatie over validatie en verificatie is weergegeven in paragraaf 2.3.

In Nederland worden in watermonsters afkomstig van onder andere leidingwaterinstallaties vooral *L. non-pneumophila*-soorten aangetroffen. In een onderzoek waarin 11.541 watermonsters werden onderzocht werd in 18,5% van de monsters *Legionella spp.* aangetoond (van der Kooij et al., 2007). In 83% van deze positieve monsters werd *L. non-pneumophila* aangetroffen. In 72% van de positieve monsters betrof het de soort *L. anisa*. In Nederland bestaat al geruime tijd de discussie of het wenselijk is om legionelladetectie in het kader van legionellapreventie met betrekking tot Hoofdstuk 4 van het drinkwaterbesluit enkel te richten op *L. pneumophila* (van Der Wielen et al., 2021). Dit omdat de maatregelen om groei van *Legionella* in een drinkwaterinstallatie te beheersen kostbaar zijn terwijl *L. pneumophila*, de soort welke geassocieerd is met het overgrote deel van de

ziektegevallen, slechts in een klein deel van de watermonsters wordt aangetroffen.

2.2 Normen voor de detectie van Legionella in water

Gestandaardiseerde microbiologische analysemethoden zijn een onderdeel van wet- en regelgeving voor monitoring van water. Zo wordt er bijvoorbeeld in de Regeling legionellapreventie in drinkwater en warm tapwater verwezen naar NEN-EN-ISO 11731:2017 'Water quality – Enumeration of Legionella' voor de eisen aan de wijze van monsterneming en analyse (IenW, 2019). ISO 11731:2017 is opgesteld onder Nederlands leiderschap binnen de internationale werkgroep 'Legionella' (WG 10) van ISO/TC 147/SC 4 'Water quality – Microbiological methods'. Daarnaast is er een Nederlandse praktijkrichtlijn (NPR) ontwikkeld door de normsubcommissie 'Microbiologische parameters': NPR 6278:2019 'Water – Toelichting bij de telling van Legionella volgens NEN-EN-ISO 11731'. De totstandkoming van (inter)nationale normen is een zorgvuldig proces dat meerdere jaren kan duren. Nederland is zeer actief in het opstellen van nationale, maar ook internationale normen voor de detectie van *Legionella spp.* in water. Meer informatie over het tot stand komen van normen en de rol hierin van NEN (het Koninklijk Nederlands Normalisatie Instituut) en de normsubcommissie 'Microbiologische parameters' is te vinden in bijlage 1.

ISO 11731 is naast een mondiale norm, ook een Europese en nationale norm: NEN-EN-ISO 11731:2017. NEN-EN-ISO 11731:2017 'Water quality – Enumeration of Legionella' specificeert kweekmethoden voor de detectie en enumeratie van Legionella in watermonsters (NEN-EN-ISO, 2017a). Deze methode is toepasbaar op alle soorten watermonsters, waaronder drinkwater, industrieel- en afvalwater en natuurlijk water. De methode beschrijft welke combinaties van voorbehandelingen en voedingsbodems nodig zijn voor welk type watermonster. Deze norm wordt wereldwijd gezien als de "gouden standaard" voor het aantonen van Legionella in water. Het voordeel is dat door de invoering van NEN-EN-ISO 11731:2017 onderzoeksresultaten met elkaar vergeleken kunnen worden tussen laboratoria in verschillende landen en dan op mondiaal niveau.

ISO 11731 is voor het eerst beschreven voor drinkwatermonsters in 1998 en is sindsdien herzien, waarna de oudere versies werden ingetrokken:

- ISO 11731:1998 'Water – Detectie en telling van Legionella' (Nederland was destijds op internationaal niveau projectleider van de ontwikkeling van deze norm) (ISO, 1998);
- ISO 11731-2:2004 'Water quality – Detection and enumeration of Legionella – Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts' (ISO, 2004);
- NEN-EN-ISO 11731-2:2008 'Water – Detectie en telling van Legionella - Deel 2: Directe membraanfiltratiemethode voor water met een laag bacteriegehalte' (NEN-EN-ISO, 2008). Deze norm was in 2004 al gepubliceerd door ISO en is daarna met dezelfde tekst in 2008 overgenomen als Europese en nationale norm, maar met een A-deviatie voor Nederland zodat NEN

6265:2007 'Water – Detectie en telling van Legionella' niet ingetrokken hoefde te worden.

Nederland was nauw betrokken bij de totstandkoming van de NEN-EN-ISO 11731:2017 en had van 2012 tot en met 2017 het leiderschap van de internationale werkgroep ISO/TC 147/SC 4/WG 10 'Legionella' voor het herzien van ISO 11731. Tijdens de herziening is de detectiemethode zoals beschreven in NEN-EN-ISO 11731:2017 gevalideerd op basis van de eisen die in ISO 13843 'Water quality – Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods' staan. Bijlage H van ISO 11731:2017 toont de prestatiekenmerken voor de verschillende methoden en matrices (NEN-EN-ISO, 2017a).

Na de publicatie van ISO 11731:2017 werd de verantwoordelijke ISO-werkgroep opgeheven. Pas als in ISO/TC 147/SC 4 wordt besloten dat ISO 11731:2017 herzien moet worden, kan de werkgroep weer gereactiveerd worden. Dit besluitvormingsproces kan Nederland, via de normsubcommissie, beïnvloeden door te stemmen op de periodieke evaluatie van ISO 11731:2017 die elke vijf jaar plaatsvindt of door tussentijds een voorstel voor herziening in te dienen bij ISO/TC 147/SC 4, zie bijlage 3 voor de toelichting over herziening van normen.

Een ander relevant gepubliceerd internationaal document ("Technical Specification") voor Legionella is ISO/TS 12869:2019 'Water quality – Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)' (ISO/TS, 2019). Voor de detectie van Legionella met qPCR is binnen ISO/TC 147/SC 4 dit document in ontwikkeling: ISO/AWI TS 12869-2 'Water quality - Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR) - Part 2: On-site methods'. Dit onderwerp moet nog meerdere commentaarrondes en een stemming doorlopen, voordat deze gepubliceerd kan worden. De verwachting is dat de publicatie in 2024 zal plaatsvinden.

Ook op nationaal gebied zijn er diverse documenten gepubliceerd voor de detectie van Legionella in water:

- NEN 6265:2007 'Water – Detectie en telling van Legionella' (eerste versie uit 1991) (NEN, 2007);
- NPR 6266:2014 'Water – Toelichting bij de detectie van Legionella volgens NEN 6265' (eerste versie uit 1991) (NEN, 2014).
- Door de publicatie van NEN-EN-ISO 11731:2017 is de nationale norm NEN 6265:2007 en de praktijkrichtlijn NPR 6266:2014 ingetrokken. De belangrijkste verschillen tussen NEN 6265:2007 en NEN-EN-ISO 11731:2017 worden toegelicht in bijlage 2 .

De volgende Nederlandse normdocumenten zijn nog in gebruik:

- NPR 6278:2019 'Water – Toelichting bij de telling van Legionella volgens NEN-EN-ISO 11731' (NEN, 2019);
- NEN 6254+C1:2013 'Water – Detectie en kwantificering van Legionella pneumophila - Methode met kwantitatieve polymerase chain reaction (qPCR)' (NEN, 2013). De verschillen tussen de

ationale norm NEN 6254+C1:2013 en het internationale document ISO/TS 12869:2019 worden toegelicht in bijlage 2 .

In de periode 2007-2010 is binnen de normsubcommissie 'Microbiologische parameters' gewerkt aan de voorbereiding van het volgende normontwerp: "Water – Detectie en telling van *Legionella pneumophila* – Methode met selectieve kweekmedia" (Concept Ontwerp NEN 6253). Voor dit onderwerp is echter geen publieke commentaarronde gehouden en de norm is uiteindelijk niet gepubliceerd. In 2013 heeft de normsubcommissie besloten om het normontwikkelingstraject te annuleren, omdat er niet voldoende resultaten waren voor een statistische onderbouwing en er verschillen leken te zijn tussen verschillende analysemethoden. In dit besluit speelde tevens mee dat de overheid zich ging richten op *Legionella spp.* en niet specifiek op *Legionella pneumophila*. De werkwijze en met name het type medium dat is beschreven in NEN 6253 wordt niet beschreven in NEN-EN-ISO 11731:2017, die momenteel als richtlijn geldt voor detectie van *Legionella spp.* met de kweekmethode.

Voor de toepassing van normen voor specifieke micro-organismen als *Legionella* zijn normen nodig waarin eisen voor meer generieke werkwijzen worden beschreven. Deze normen worden weergegeven in bijlage 4.

2.3 Validatie en verificatie

Binnen watermicrobiologie worden verschillende analysetechnieken toegepast. De kweekmethoden, die van oudsher vaak worden toegepast, worden meestal beschreven in gestandaardiseerde referentiemethoden zoals ISO-, CEN- of NEN-normen. Naast de referentiemethoden bestaan er ook alternatieve methoden voor de detectie van micro-organismen. Voor de validatie van dergelijke alternatieve methoden en het vaststellen van de gelijkwaardigheid aan de referentiemethode is NEN-EN-ISO 16140-2:2016 'Microbiology of the food chain — Method validation — Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method' ontwikkeld (NEN-EN-ISO, 2016). Alhoewel deze norm het toepassingsgebied "microbiologie van de voedselketen" heeft, kan deze ook gebruikt worden voor watermicrobiologie (zie EU-richtlijn 2015/1787).

Wanneer een laboratorium een analysemethode aanbiedt voor accreditatie dient een referentiemethode of gevalideerde alternatieve methode geverifieerd te zijn en een "eigen methode" gevalideerd te zijn. Voorbeelden van een "eigen methode" zijn: 1) een methode die door het laboratorium zelf is ontwikkeld of 2) een referentiemethode of gevalideerde alternatieve methode die buiten het toepassingsgebied van de methode wordt gebruikt. Voor de watersector is NEN-EN-ISO 13843:2017 'Water quality — Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods' ontwikkeld (NEN-EN-ISO, 2017b). In deze norm staan eisen voor het bepalen van prestatiekenmerken voor kwantitatieve microbiologische watermethoden (met name voor klassieke kweekmethoden) en dan zowel voor het uitvoeren van een validatie als verificatie. Daarnaast is

NEN-EN-ISO 17994:2014 ('Water quality - Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods') ontwikkeld voor het vergelijken van twee kwantitatieve methoden waarvan de prestatiekenmerken zijn vastgesteld volgens NEN-EN-ISO 13843 (NEN-EN-ISO, 2014b). Voor het valideren van immunologische of moleculaire technieken zijn deze normen minder goed toepasbaar en mag gebruik gemaakt worden van de NEN-EN-ISO 16140 serie. Voor de verificatie van kwalitatieve microbiologische methoden in de watersector verwijst de Raad voor Accreditatie (RvA, 2020) naar de normen voor microbiologie van de voedselketen (o.a. de NEN-EN-ISO 16140 serie).

2.3.1 Validatie

Bij validatie wordt aangetoond dat de beschreven analysemethode geschikt is voor de beoogde toepassing ofwel voldoet de methode aan de gestelde eisen met betrekking tot de toepassing.

Bij een volledige validatie volgens NEN-EN-ISO 16140-2:2016, of volgens de combinatie NEN-EN-ISO 13843:2017 en NEN-EN-ISO 17994:2014, dient ook een interlaboratoriumonderzoek (ringonderzoek) georganiseerd te worden (NEN-EN-ISO, 2014b, 2016, 2017b). Bij NEN-EN-ISO 16140-2:2016 is de eis dat het ringonderzoek voor het bepalen van de prestatiekenmerken minimaal acht (bij een kwantitatieve methode) of minimaal tien (bij een kwalitatieve methode) geldige datasets van verschillende laboratoria oplevert. Bij de validatie van een internationale gestandaardiseerde referentiemethode moeten er daarnaast laboratoria uit meer dan één land hebben meegewerkt aan het ringonderzoek (RvA, 2020).

Voor een 'in-huis' validatie (volgens NEN-EN-ISO 16140-4:2020 of NEN-EN-ISO 13843:2017) hoeft geen ringonderzoek georganiseerd te worden (NEN-EN-ISO, 2017b, 2020). Echter de validatieresultaten kunnen bij een 'in-huis' validatie alleen gebruikt worden door het laboratorium dat de studie heeft uitgevoerd.

Voor de validatie van alternatieve methoden volgens NEN-EN-ISO 16140-2:2016 bestaan verschillende onafhankelijke organisaties, zoals:

- de Europese organisatie "MicroVal" (www.microval.org);
- de Franse organisatie AFAQ AFNOR CERTIFICATION (<https://nf-validation.afnor.org/en/water-analysis/>);
- de Scandinavische organisatie NordVal (www.nmkl.org/index.php/nb/nordval).

Een andere organisatie die alternatieve methoden valideert, is AOAC International (www.aoac.org) in de Verenigde Staten. Hierbij worden eigen AOAC-richtlijnen gebruikt (RvA, 2020).

Op de certificaten van deze organisaties staat de geldigheidsduur van de alternatieve methode. Wanneer deze verlopen is, doordat de fabrikant geen verlenging heeft aangevraagd, wordt de methode als een 'eigen methode' opgevat en dient het laboratorium de methode zelf te valideren ("single-laboratory method validation") om zijn voortgezette geschiktheid aan te tonen (RvA, 2020).

2.3.2 Verificatie

Bij verificatie toont een laboratorium aan dat een referentiemethode, of een door een onafhankelijke organisatie gevalideerde alternatieve methode, in de eigen situatie goed kan worden toegepast. Voor verificatie wordt een beperkt aantal prestatiekenmerken bepaald en indien mogelijk getoetst aan de prestatiekenmerken die in de norm (referentiemethode) of in de gevalideerde alternatieve methode staan. Voor een referentiemethode of gevalideerde alternatieve methode geldt dat voor ingebruikname in een laboratorium geen volledige validatie door het laboratorium zelf vereist is, een verificatie is hierbij voldoende.

2.3.2.1 Prestatiekenmerken analysemethode

Voor het uitvoeren van validatie of verificatie worden prestatiekenmerken voor kwantitatieve microbiologische watermethoden (met name voor kweekmethoden) bepaald. Hieronder worden deze prestatiekenmerken uitgelegd op basis van NEN-EN-ISO 13843:2017 en NEN-EN-ISO 17994:2014 (NEN-EN-ISO, 2014b, 2017b):

- **Gevoeligheid en specificiteit**
Met een methode kunnen zowel gewenste specifieke als niet-gewenste bacteriekolonies worden gevonden, en op basis van de methode worden gevonden kolonies respectievelijk als positief of negatief toegewezen.
Gevoeligheid is de fractie van het totale aantal positieve kolonies dat correct is toegewezen als positief met de gebruikte methode.
Specificiteit is de fractie van het totale aantal negatieve kolonies dat correct is toegewezen als negatief met de gebruikte methode.
- **Selectiviteit en efficiëntie**
In een monster kunnen zowel gewenste als ongewenste micro-organismen aanwezig zijn, welke wel of niet correct kunnen worden gedetecteerd met de meetmethode.
Selectiviteit is de fractie van het aantal gewenste, specifieke kolonies tot het totale aantal kolonies.
Efficiëntie is de fractie van het totale aantal kolonies correct toegewezen in de vermoedelijke telling.
- **Vals positief en vals negatief ratio**
Het kan voorkomen dat een methode ten onrechte aangeeft dat een onderzocht monster positief of negatief is voor het gewenste specifieke bacteriën.
Vals positief: resultaat dat het onderzochte monster volgens de methode positief is waarvan later aangetoond wordt dat het gewenste bacteriën afwezig is. Vals positief wordt vaak in percentages weergegeven (vals positief ratio).
Vals negatief: resultaat dat het onderzochte monster volgens de methode negatief is waarvan later aangetoond wordt dat het gewenste bacteriën wel in het onderzochte monster aanwezig was. Vals negatief wordt vaak in percentages weergegeven (vals negatief ratio).
- **Herhaalbaarheid:** mate van overeenstemming tussen meetresultaten verkregen door opeenvolgende metingen van hetzelfde object of gelijkende objecten in herhaalbaarheidsomstandigheden.

- **Telonzekerheid:** relatieve standaardafwijking van de resultaten van herhaald tellen van de kolonies van dezelfde agarplaat(en) onder bepaalde voorwaarden.
- **Meetonzekerheid:** onzekerheid van het resultaat van een meting, uitgedrukt als standaarddeviatie.

Naast bovengenoemde prestatiekenmerken zijn er ook nog andere kenmerken die informatie kunnen geven over hoe de prestaties van een analysemethode, zoals:

- **Recovery (terugvinding):** hiermee wordt bedoeld hoeveel micro-organismen, in dit geval legionellabacteriën, worden teruggevonden met de gebruikte methode in vergelijking met de (bekende) concentratie in het onderzochte monster. Met **relatieve recovery** wordt de verhouding (%) van het aantal kolonies verkregen met twee methoden die zijn getest op gelijke hoeveelheden van dezelfde monsters bedoeld.
- **Onderzoek naar inclusiviteit en exclusiviteit**
In specifiek onderzoek kan met bekende positieve en negatieve stammen worden onderzocht of deze door de meetmethode correct worden gedetecteerd.
Inclusiviteit: fractie van specifieke positieve stammen die met de meetmethode worden gedetecteerd.
Exclusiviteit: fractie van specifieke negatieve (niet-positieve) stammen, die mogelijk kruisreactie kunnen veroorzaken, maar naar verwachting niet zullen worden gedetecteerd met de meetmethode.
- **Detectielimiet** is de ondergrens van de detectiemethode, hoeveel micro-organismen nog kunnen worden aangetoond in een bepaald monstervolume. Dit is sterk afhankelijk van het geanalyseerde monstervolume. De detectielimiet van de methode beschreven in ISO 11731:2017 kan erg uiteenlopen. Op basis van een selectie van de methode met voorbehandeling en verdunningen kan de detectielimiet variëren van 100 kolonievormende eenheden per liter (kve/L) tot zelfs 1.000.000 kve/L voor respectievelijk drinkwater en afvalwater. Wanneer het aantal micro-organismen door de recovery van een methode beneden de detectielimiet komt zal deze niet worden aangetoond (NEN-EN-ISO, 2017a).

3 Methode

3.1 Literatuurstudie

De zoekstrategie was gericht op studies voor de detectie van *Legionella spp.* en *Legionella pneumophila* in water. Er was gezocht in de volgende wetenschappelijk databases:

- Scopus (Elsevier B.V., Amsterdam, The Netherlands)
- Embase (Elsevier B.V., Amsterdam, The Netherlands)

Een breed scala aan relevante zoektermen is gebruikt. De gedetailleerde zoekopdracht met zoektermen per database is weergegeven in tekstbox 1. De zoekopdrachten werden getoetst op de inclusie van 29 relevante artikelen aangeleverd door experts, en de uiteindelijke zoekopdrachten, uitgevoerd op 18 februari 2022, leverde 1333 artikelen op met Scopus en 1684 met Embase. De gebruikte zoektermen zijn weergegeven in Bijlage 5.

Tekstbox 1 Combinatie van zoektermen die per zoekopdracht zijn gebruikt. De samenstelling van de zoektermen is weergegeven in bijlage 5.

Zoekopdracht in Scopus, uitgevoerd op 18-02-2022

- #1 column 1 water in title/abstract/keywords -> 4.968.865 resultaten
- #2: column 2 legionella in title/abstract/keywords -> 301.738 resultaten
- #3: column 3 diagnostics in title/abstract/keywords -> 32.291.811 resultaten
- #4: column 4 research verbs in title/abstract/keywords -> 42.223.612 resultaten
- #5: column 5 comparative verbs in title/abstract/keywords -> 25.563.770 resultaten
- #6: #1 AND #2 AND #3 AND #4 AND #5 -> 12.505 resultaten
- #7: column 2 legionella in the title -> 17.681 resultaten
- #8: repeat AND PUBYEAR > 2009 AND LANGUAGE (english) -> 532 resultaten (25/29 background articles found)
- **#9: #1 AND #7 AND #4 AND PUBYEAR > 2009 AND LANGUAGE (english) -> 1.333 resultaten (all background articles found)**

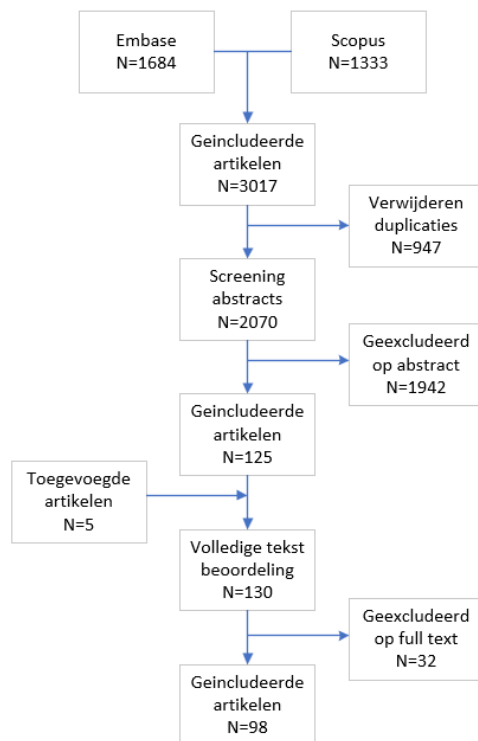
Zoekopdracht in Embase, uitgevoerd op 18-02-2022

- #1: (water OR water* OR (cooling AND tower*) OR aerosol):ti,ab,kw
- #2: legio*:ti OR (l.:ti AND pneumophila:ti) OR (l.:ti AND species:ti)
- #3: (detect* OR enumerat* OR test* OR predict* OR quantif* OR diagnos* OR identif* OR analy* OR monitor* OR technique):ti,ab,kw
- **#4: #1 AND #2 AND #3 AND english:la AND [2010-2022]/py -> 1.684**

Na de zoekopdracht werden eerst de dubbele artikelen (n=947) uitgesloten. Daarna werden titel en abstract van de overgebleven artikelen gescreend door twee personen (zie figuur 1). Hierbij werden de volgende in- en exclusiecriteria gesteld voor de selectie van relevante studies:

- Gepubliceerd (of geaccepteerd) in peer-reviewed tijdschriften;
- Methode voor de detectie van *Legionella spp.* of *Legionella pneumophila* in water;
- Vergelijkingsstudie (evaluatie) of validatiestudie;
- Periode 2010 – 2020;
- Engelstalig.

Na de screening van de abstracts bleven 125 artikelen over en hier werden 5 artikelen aan toegevoegd op basis van expert opinie (Arvand et al., 2011; LeChevallier, 2019; McCuin et al., 2021; Veenendaal et al., 2017; Whiley & Taylor, 2016). Vervolgens werden de 130 studies op basis van volledige tekstbeoordeling gescreend voor definitieve inclusie. In het geval van onzekerheden qua inclusie/exclusie zijn alle gescreende studies die als "twijfelachtig" zijn beoordeeld opnieuw onafhankelijk beoordeeld door een ander persoon. Verdere discrepanties tijdens de screening/studieselectie werden opgelost door discussie en consensus tussen de projectteamleden.



Figuur 1 Resultaten van de literatuurstudie voor de detectie van *Legionella spp.* en *Legionella pneumophila* in water.

Voor de extractie van gegevens was een gegevensverzamelingsformulier in het programma Formdesk gemaakt welke vervolgens was getest op een selectie (n= 5) van de definitief geïncludeerde artikelen. Nadat er overeenstemming was bereikt over het formulier, werden de gegevens

geëxtraheerd. Informatie werd verzameld over de artikelen, zoals het doel van de studie en het studietype. Daarnaast werden eigenschappen van de meetmethoden genoteerd, zoals de duur van de procedure, het gebruikte volume, het detectielimiet en voor- en nadelen van de meetmethoden genoemd in de artikelen. Tijdens het doornemen van de volledige teksten werden 32 artikelen geëxcludeerd omdat deze artikelen geen analyses voor water beschreven of slechts een beperkt deel van de detectie van *Legionella spp.* of *Legionella pneumophila* in water omvatten. Ook zaten er drie reviews bij, welke in een later stadium werden gebruikt om de algemene voor- en nadelen van de gevonden methoden te toetsen of aan te vullen.

3.2 Afstemming met relevante partijen

In overleg met Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat was afgesproken om praktijkervaringen op te halen bij drinkwaterlaboratoria over de detectie van *Legionella spp.* en *Legionella pneumophila* in drinkwater. Hiervoor heeft afstemming plaatsgevonden met drie vertegenwoordigers van drinkwaterlaboratoria welke jarenlange ervaring hebben op dit gebied. Hierbij hebben zij hun ervaringen met diverse detectiemethoden voor *Legionella* in water gedeeld. Er is ook afstemming geweest met NEN, over het tot stand komen van de huidige (inter)nationale normen voor detectie van *Legionella spp.* in (drink)water en samenhangende documenten.

3.3 Verwerken van de gegevens

De resultaten van de literatuurstudie werden verder geanalyseerd om een duidelijk overzicht te kunnen geven welke methoden beschikbaar zijn, en op welk type water deze kunnen worden toegepast. Ook werden specifieke kenmerken van de verschillende methoden verzameld en in een overzicht weergegeven.

Informatie afkomstig uit de reviews over methodiek vergelijking voor de detectie van *Legionella spp.* en *Legionella pneumophila* in water werd aangevuld met de specifieke informatie beschreven in de 98 artikelen. Hierdoor ontstaat een zeer uitgebreid overzicht met de voor- en nadelen van de methoden. Daarnaast is de input van de drinkwaterlaboratoria opgenomen in tekstboxen in de resultaten. De informatie afkomstig van NEN is opgenomen in hoofdstuk 2 als achtergrondinformatie.

4 Resultaten

4.1 Literatuurstudie

De kweekmethode volgens ISO 11731 werd het meest beschreven. In totaal werd deze methode 56 keer beschreven, waarbij verschillende jaargangen van de norm werden gebruikt. Andere kweekmethoden werden 29 keer beschreven, waarvan 14 keer de Legiolert © methode. Moleculaire detectie met behulp van PCR werd 61 keer beschreven, waarvan 17 keer een viability PCR. De LAMP methode werd 5 keer beschreven. Een combinatie van kweekmethode met moleculaire detectie, Scan-VIT, werd 5 keer beschreven. Immunologische detectiemethoden werden 21 keer beschreven en dan voornamelijk immunomagnetische separatie (9) en immunofluorescentie (6).

Van de 98 artikelen bevatten 66 artikelen een vergelijking tussen twee of meer methoden, waarvan slechts vier artikelen een validatiestudie beschreven. De volgende methoden werden beschreven in de vier validatiestudies:

- **Legipid® Bioalarm Legionella Assay** (Rodríguez Albalat et al., 2012) voor de detectie van *Legionella pneumophila*. De methode is gebaseerd op een combinatie van immunomagnetische separatie en een enzym-immunoassay. De validatiestudie werd uitgevoerd in het kader van het Association of Official Analytical Collaboration (AOAC) Research Institute Performance Tested MethodSM-programma.
- **Scan-VIT-Legionella** (Bargellini et al., 2010) voor de detectie van *Legionella pneumophila* en *Legionella spp.* De methode is gebaseerd op een combinatie van een kweekmethode en fluorescentie op basis van specifieke fluorescerend gelabelde DNA-probes. De validatiestudie werd uitgevoerd volgens ISO 17994:2004.
- **L.p. SG1 DETECT kit** (Keserue et al., 2021) voor de detectie van *Legionella pneumophila* serogroup 1. De methode is gebaseerd op een combinatie van immunomagnetische separatie en flowcytometrie. De validatiestudie werd uitgevoerd in het kader van het AOAC Research Institute Performance Tested MethodSM-programma.
- **New Legionella spp. quantitative kit** (Diatheva, Fano, Italy) (Omiccioli et al., 2015) voor de detectie van *Legionella spp.* op basis van moleculaire detectie met behulp van PCR. De validatiestudie is uitgevoerd op basis ISO/TS 12869:2012. De prestaties op natuurlijke monsters zijn onbekend en de evaluatie is uitsluitend een technische evaluatie.

In de literatuurstudie werd geen validatiestudie beschreven over Legiolert en ISO 11731:2017, maar uit de vergelijkingsstudies en internationale documenten blijkt dat deze methoden wel gevalideerd zijn:

- **Legiolert©** voor de detectie van *Legionella pneumophila*. De methode is gebaseerd op groei in een vloeibaar medium en detectie op basis van een kleuromslag. De Legiolert heeft het

AFNOR NF Validation Certification, onder de referentie No IDX 33/06 – 06/19.

- **NEN-EN-ISO 11731:2017** voor de detectie van *Legionella spp.* De methode is gebaseerd op groei van kolonies op een vast medium (agar), een zogenoemde kweekplaat. Vervolgens worden de kolonies bevestigd en kan onderscheid gemaakt worden tussen *Legionella pneumophila* en *Legionella non-pneumophila*. Gegevens voor het vaststellen van de prestatiekenmerken werden verzameld in overeenstemming met NEN-EN-ISO 13843.

Uit de artikelen werden de specifieke kenmerken van de methoden en ook de voor- en nadelen gehaald. Deze werden in de volgende paragrafen behandeld.

4.2 Voor- en nadelen van de diverse detectiemethoden voor *Legionella spp.* en *Legionella pneumophila* in water

In watermonsters, en zeker in drinkwater, is de hoeveelheid legionellabacteriën vaak te laag om direct de aantallen te kunnen bepalen. Daarom is het nodig om de bacteriën in het monster eerst te concentreren, door bijvoorbeeld membraanfiltratie of centrifugeren (Schalk & De Roda Husman, 2010). Tijdens concentratie treedt verlies op in het aantal legionellabacteriën. De recovery (percentage teruggevonden legionellabacteriën) na centrifugeren van watermonsters is ongeveer 30%, terwijl de recovery na (membraan)filtratie ongeveer 50% is (Inoue, 2020). Dit komt er op neer dat over het algemeen bij (membraan)filtratie een groter deel van de legionellabacteriën worden teruggevonden ten opzichte van het oorspronkelijke aantal dan bij centrifugeren. In de volgende paragrafen worden de voor- en nadelen van de diverse detectiemethoden voor *Legionella spp.* en *Legionella pneumophila* in water beschreven op basis van de literatuurstudie. Voor validatie en verificatie worden prestatiekenmerken voor de (alternatieve) methode vastgesteld en deze werden, indien beschikbaar, ook meegenomen in de voor- en nadelen van de detectiemethode. In hoofdstuk 2 staan veelgebruikte termen voor validatie en verificatie. De kenmerken worden daarna samengevat in tabel 1.

4.2.1 Kweekmethoden

Met het gebruik van kweekmethoden kunnen kweekbare legionellabacteriën worden aangetoond, terwijl dode bacteriën van *Legionella* met deze methode niet gedetecteerd worden. Er zijn verschillende kweekmethoden voor de detectie van *Legionella spp.* en/of specifiek *Legionella pneumophila* beschikbaar die hieronder verder worden uitgelegd.

4.2.1.1 ISO 11731

De ISO 11731 is een gestandaardiseerde kweekmethode die wereldwijd gezien wordt als de gouden standaard voor de detectie van *Legionella spp.* in water. Deze kweekmethode is toepasbaar op alle soorten watermonsters, waaronder drinkwater, industrieel- en afvalwater en natuurlijk water (NEN-EN-ISO, 2017a). De methode beschrijft welke combinaties van voorbehandelingen en voedingsbodems nodig zijn voor ieder type watermonster. Voor de publicatie van ISO 11731:2017 is een validatiestudie uitgevoerd en zijn de prestatiekenmerken van de

methode opgenomen in de norm (zie hoofdstuk 2) (NEN-EN-ISO, 2017a).

In Nederland worden door laboratoria drinkwatermonsters geanalyseerd conform de NEN-EN-ISO 11731:2017, waarmee *Legionella spp.* kan worden aangetoond. Er wordt dus niet direct onderscheid gemaakt tussen *L. pneumophila* en *L. non-pneumophila*. Deze norm beschrijft een op kweek gebaseerde methode, die sinds 2018 wettelijk verplicht is voor *Legionella spp.* monitoring in water en sindsdien binnen Nederlandse laboratoria van kracht is (IenW, 2019).

De methode uit de NEN-EN-ISO 11731:2017 omvat veel stappen en is ingewikkelder dan methoden voor de detectie van veel andere bacteriën. De stappen zijn als volgt: 1) concentratie van watermonsters, 2) voorbehandeling van geconcentreerde monsters, 3) gebruik van selectieve agarplaten, 4) bacteriekweek en telling, en 5) identificatie/bevestiging van Legionella. Om het daadwerkelijke aantal legionellabacteriën zo goed mogelijk aan te kunnen tonen, is het belangrijk om het verlies van legionellabacteriën in elke stap te minimaliseren (Inoue, 2020).

In het merendeel van de artikelen (n=56) werd de ISO 11731 beschreven, waarbij naar verschillende versies van de ISO werd verwezen (1998, 2004, 2006, 2008 en 2017). Niet alle artikelen noemden expliciet welke versie van de ISO werd gevolgd. Dit betekent dat de resultaten van de artikelen onderling niet altijd goed te vergelijken zijn. In een aantal artikelen werden ook de voor- en nadelen van de methode beschreven, welke hieronder zijn samengevat. De ervaringen van de Nederlandse drinkwaterlaboratoria met de kweekmethode staan in tekstbox 2.

Voordelen:

- De methode is geschikt voor **meerdere typen water**: drink-, industriële, afval- en natuurlijke watermonsters (NEN-EN-ISO, 2017a; Walker & McDermott, 2021).
- Detectie van *Legionella spp.*, waarbij vervolgens *L. pneumophila* kan worden onderscheiden van *non-pneumophila*. Typering van ***L. pneumophila*** en **andere legionellabacteriën** is ook mogelijk op de geïsoleerde kolonies (Ditommaso et al., 2014; Lee et al., 2011; NEN-EN-ISO, 2017a; Rech et al., 2018).
- **Kwantitatief**. Deze methode geeft het aantal legionellabacteriën in watermonsters, weergegeven als kve per volume onderzocht water, en wordt meestal uitgedrukt als kve/L (NEN-EN-ISO, 2017a; Walker & McDermott, 2021). De groei van **kweekbare bacteriën** biedt de mogelijkheid om het aantal aanwezige legionellabacteriën te kwantificeren (Walker & McDermott, 2021).
- **Hoge specificiteit en gevoeligheid**. In NEN-EN-ISO 11731:2017 worden de prestatiekenmerken van de methode weergegeven en de hoge specificiteit (95,3%) en gevoeligheid (99%) (NEN-EN-ISO, 2017a).
- De detectielimiet is afhankelijk van de methode welke gekozen wordt uit de NEN-EN-ISO 11731:2017 en kan sterk variëren van 100 kve per liter tot 1.000.000 kve per liter (NEN-EN-ISO, 2017a). Voor drinkwater is de **detectielimiet laag** met 100 kve

per liter (NEN-EN-ISO, 2017a), of zelfs 50 kve per liter (Lizana et al., 2017). Voor monsters met een hoge achtergrondflora, zoals koeltorens of afvalwater, ligt de detectielimiet vaak hoger, en kan het zelfs 1.000.000 kve per liter.

- In de ringonderzoeken voor het bepalen van de prestatiekenmerken van de methode werden verschillende monsters, met zowel lage als hoge achtergrond, onderzocht. De **recovery** is minimaal 64% waarbij watermonsters ook een voorbehandeling hebben ondergaan (NEN-EN-ISO, 2017a). Voorbehandeling van watermonsters kan resulteren in een lagere recovery (NEN-EN-ISO, 2017a). De recovery is ook lager wanneer filters niet direct op een agarplaat worden gelegd, maar de bacteriën eraf worden gewassen. Checa et al. (2021) toonden aan dat door een filtratiestap en elutiestappen de recovery zelfs kan afnemen tot 20-30% (Checa et al., 2021).
- Verschillende **selectieve agarplaten** kunnen zowel zelf bereid worden als verkregen worden als commerciële producten.
- **Vergelijking met historische monsters.** De mogelijkheid om resultaten te vergelijken met historische monsters die met dezelfde methode zijn geanalyseerd (Walker & McDermott, 2021).
- Kan worden gebruikt om Legionella isolaten uit **klinische en omgevingsmonsters te vergelijken** (Walker & McDermott, 2021) voor bijvoorbeeld bronopsporing bij epidemiologische uitbraken (Rech et al., 2018).

Nadelen:

- **Tijd tot resultaten.** De detectie met deze kweekmethode is tijdrovend. groeien zeer langzaam op vaste groeimedia, en hoewel de ISO-norm geen definitieve laboratoriumincubatietijd voor platen specificeert, wordt een bereik van tussen de 7 en 10 dagen gegeven. In de praktijk incuberen de meeste laboratoria platen gedurende ten minste 10 dagen (Maio et al., 2020; Walker & McDermott, 2021).
- **Geen detectie van levensvatbare maar niet-kweekbare legionellabacteriën (VBNC).** De plaatkweekmethode is alleen in staat om Legionellabacteriën te detecteren die kolonies vormen op agarplaten (**kweekbaar**). Daarom kunnen legionellabacteriën die geen kolonies vormen op agarplaten, waaronder niet alleen dode bacteriën maar ook Legionella in een levensvatbare maar niet-kweekbare toestand, niet worden gedetecteerd door de plaatkweekmethode (Inoue, 2020). Keserue et al. (Keserue et al., 2021) geeft aan dat 10-60% van de legionellabacteriën worden gemist bij gebruik van de kweekmethode (recovery 40-90%).
- **Lagere recovery bij andere watertypen.** De chemische en biologische samenstelling van water afkomstig uit koeltorens en verdampingscondensators, zorgt voor een lagere recovery met de kweekmethode dan bij bijvoorbeeld drinkwater (Lizana et al., 2017).
- **Voorbehandeling van het water is noodzakelijk.** Wanneer de populatie van niet-legionellabacteriën ('achtergrondflora' in de watermonsters niet voldoende wordt verminderd door de voorbehandeling, wordt de groei van Legionella geremd, zelfs

wanneer selectieve agarplaten worden gebruikt (Inoue, 2020). Drinkwater en water uit warmwaterreservoirs vereisen vaak minder voorbehandelingen dan monsters verzameld uit koeltorens, omdat ze over het algemeen minder natuurlijk achtergrondflora hebben (Walker & McDermott, 2021; Whiley & Taylor, 2016). Voorbehandeling kost veel additioneel materiaal, tijd en extra stappen (McCuin et al., 2021). De voorbehandelingen (zuur- of hittebehandeling) worden uitgevoerd om niet-legionellabacteriën te verminderen, al heeft dit niet altijd het gewenste effect (Collins et al., 2015). Legionella kan ook beschadigd raken door de voorbehandeling, bijvoorbeeld als de pH van het monster tijdens de behandeling te laag is, de zuurbehandelingstijd te lang is, of als de behandelingstemperatuur te hoog is of de warmtebehandelingstijd te lang is (Inoue, 2020; McCuin et al., 2021). Dit leidt tot een lagere recovery van de methode.

- **Vals negatieve resultaten.** Snelgroeïende commensale micro-organismen aanwezig in het water maskeren Legionella kolonies op agarplaten (Collins et al., 2015; Walker & McDermott, 2021). Legionellabacteriën hebben vaak minstens 5-7 dagen nodig voordat kolonies zichtbaar worden, waarbij concurrerende en sneller groeiende bacteriën de groei van legionellabacteriën onmogelijk kunnen maken of het oppervlak van kweekplaten volledig overgroeiden. Hierdoor worden de Legionella kolonies gemaskeerd (Whiley & Taylor, 2016). Wanneer veel verontreinigende micro-organismen op de agarplaten groeien, worden legionellabacteriën niet gedetecteerd ondanks dat ze aanwezig zijn in het water (Inoue, 2020), wat leidt tot **vals negatieve resultaten**. In ISO 11731 wordt het percentage vals-negatieve van 1,4% weergegeven als prestatiekenmerk (NEN-EN-ISO, 2017a).
- De kweekmethode kan **vals-positieve resultaten** opleveren vanwege hoge verdunningsfactoren en identificatiefouten bij het tellen van kolonies (Eble et al., 2021; Keserue et al., 2021). In ISO 11731 wordt het percentage vals-positieve van 3,3% weergegeven als prestatiekenmerk (NEN-EN-ISO, 2017a).
- **Aanvullende apparatuur en materialen voor concentreren.** Het concentreren van het watermonster, om een groter volume te kunnen onderzoeken, vereist extra apparatuur en materialen, bijvoorbeeld centrifugebuizen, pipetten, membranen, filterhouders en buffers (McCuin et al., 2021).
- **Expertise laboratoriummedewerkers.** Met name voor andere watertypen dan drinkwater moet het laboratoriumpersoneel kiezen uit verschillende procedures, behandelingen en selectieve kweekmedia (McCuin et al., 2021). Daarnaast moeten laboratoriumanalisten bekwaam en ervaren zijn in het identificeren van typische kolonies. De individuele interpretatie van tellingen, evenals de identificatie van geïsoleerde kolonies kan leiden tot een subjectief resultaat (Toplitsch et al., 2018; Walker & McDermott, 2021). Dit leidt tot veel verschil in resultaten binnen en tussen laboratoria, waardoor de reproduceerbaarheid van resultaten in het geding komt (Collins et al., 2015; Ditommaso et al., 2010).

- **Onderschatting bij lage concentraties Legionella.** Kweek is vaak geoptimaliseerd om te selecteren op de groei van *L. pneumophila*, en als zodanig kunnen andere soorten die slechts zelden ziekte veroorzaken, minder goed worden aangetoond (Walker & McDermott, 2021). Dit kan ook sterk verschillen per type medium dat voor de kweekmethode wordt gebruikt (Scaturro, Poznanski, et al., 2020). Verondersteld wordt dat lage concentraties legionellasoorten, anders dan *L. pneumophila* die gewoonlijk volgens de standaardmethode worden aangetroffen, een onderschatting is van de werkelijke aantallen van deze bacteriën (Maio et al., 2020). Daarnaast groeien *L. non-pneumophila* langzamer dan *L. pneumophila* waardoor *L. non-pneumophila* kolonies worden gemaskeerd door de overvloedige groei van *L. pneumophila* en/of andere micro-organismen (Maio et al., 2020). Anderzijds is het mogelijk dat dat een lage concentratie van een virulente *L. pneumophila* wordt gemist in aanwezigheid van een hoge concentratie van *L. non-pneumophila* (van der Mee-Marquet et al., 2006). Dit blijkt soms ook uit ervaringen bij de bemonstering ten behoeve van de bronopsporing van patiënten in Nederland.
- **Selectieve agarplaten** tonen vaak verschillen in de groei van Legionella, afhankelijk van de producent, zelfs als het medium zogenaamd hetzelfde is. Het is wenselijk om de prestaties van het kweekmedium van tevoren te evalueren wanneer het kweekmedium zelf wordt bereid. Het groeivermogen van Legionella varieert afhankelijk van het type agar, gistextract en het gebruikte actieve koolpoeder (Inoue, 2020). Sommige Legionella-soorten groeien niet of niet goed op standaard kweekmedia (Collins et al., 2015). Hoewel het gebruik van niet-selectieve media wordt aanbevolen om de recovery van *L. pneumophila* en *non-pneumophila*-bacteriën te verhogen, zorgt de meestal aanwezige achtergrondflora, met name bij niet-drinkwater, dat het noodzakelijk is om een selectief medium te gebruiken (Maio et al., 2020).

Tekstbox 2 Ervaringen van Nederlandse drinkwaterlaboratoria met Legionella kweekmethode. Bron: de drinkwaterlaboratoria

Ervaringen van Nederlandse drinkwaterlaboratoria met Legionella kweekmethode

In Nederland is door de jaren heen veel onderzoek en ervaring opgedaan naar screening van *Legionella* in water. Na de *Legionella*-uitbraak in Bovenkarspel in 1999 werd de controle van drinkwaterinstallaties vanuit de overheid geïntensiveerd, waarna er ook meer onderzoek is uitgevoerd naar het verbeteren van de Legionella-diagnostiek. Dit resulteerde in 2007 tot de herziene NEN-norm voor *Legionella*-kweek (NEN 6265, oorspronkelijke versie was gepubliceerd in 1991).

In de huidige situatie worden door laboratoria drinkwatermonsters geanalyseerd conform NEN-EN-ISO 11731;2017, waarmee *Legionella*, inclusief *L. pneumophila*, kan worden aangetoond. Voordat deze op kweek gebaseerde norm in werking trad, werd binnen Nederland

NEN 6265 toegepast, wat de basis vormde voor NEN-EN-ISO 11731:2017. De laboratoria hebben na de invoering van ISO 11731 hun processen aangepast, met als doel het verhogen van de analysekwaliteit en om de kostprijs van de analyses laag te houden. Sinds de invoering van NEN-EN-ISO 11731:2017 worden meer kweekbare *L. non-pneumophila* species en minder *L. pneumophila* aangetoond (zie tabel T1).

Tabel T1 Percentage *Legionella* positief bevestigde monsters bij gebruik van NEN 6265:2007 en bij gebruik van NEN-EN-ISO 11731:2017 in matrix A (hoofdzakelijk drinkwatermonsters). Bron data WEC Vitens.

Variabele	NEN 6265 (in 2016)	NEN-EN-ISO 11731 (in 2021)	Vershil
<i>Legionella non-pneumophila</i>	22,0%	25,9%	3,9%
<i>L. pneumophila sg1</i>	0,7%	0,3%	-0,3%
<i>L. pneumophila sg2-15</i>	0,4%	0,3%	-0,1%
Mengcultuur <i>non-pneumophila</i> en <i>L. pneumophila</i>	0,6%	0,5%	-0,1%
Totaal	23,7%	27,0%	3,4%

Een ander nadeel van de kweekanalyse is naast de lange analysedoorlooptijd ook de vele kweekplaten die voor de kweek nodig zijn, wat een negatief effect heeft op duurzaamheid. Per monster worden er gemiddeld negen kweekplaten gebruikt. Na de kweek worden de platen weggegooid, wat dus zorgt voor een grote afvalstroom. Het voordeel van de kweekmethode is en blijft dat wanneer *Legionella* wordt aangetoond dit een bevestiging is dat de aanwezige *Legionella (pneumophila)* nog levensvatbaar is. Met DNA fingerprint technieken zoals Next Generation Sequencing kunnen de gekweekte kolonies worden gebruikt voor bronopsporingsonderzoek door het genetisch profiel (genomen) van de gevonden *Legionella* stammen te vergelijken met die van verschillende (water)bronnen.

Door Nederlandse drinkwaterlaboratoria (en KWR) zijn technologieën ontwikkeld waarmee *Legionella* verdachte kolonies sneller kunnen worden bevestigd, mede bedoeld om de analysedoorlooptijd van de kweekmethode te verkorten. Alternatieve bevestigingsmethoden, die succesvol binnen de laboratoria zijn gevalideerd (conform NEN-EN-ISO 16140 serie) en geïmplementeerd zijn weergegeven in tabel T2.

Tabel T2 Overzicht van gevalideerde alternatieve bevestigingsmethodes

Test	<i>Legionella</i> typering	Opmerking
UV bevestiging	<i>Legionella</i> soorten die onder UV helderblauw oplichten	UV negatieve kolonies worden bevestigd met een aanvullende methode (o.a. <i>L. pneumophila</i>)
MaldiTof	Alle <i>Legionella</i> soorten	Serotypering tot op heden niet mogelijk
PCR	<i>L. non-pneumophila</i> <i>L. pneumophila sg1</i> <i>L. pneumophila sg2-15</i>	Bij een aantal organisaties die PCR bevestiging gebruiken kan serotypering op <i>L. pneumophila</i> worden uitgevoerd.

Het effect op de analysedoorlooptijd verschilt overigens per laboratorium omdat dit samenhangt met het aantal monsters met verdachte *Legionella* en welke soort *Legionella* wordt aangetroffen. Door de verworven kennis hebben Nederlandse experts op internationaal vlak een koplopperspositie weten te bewerkstelligen op het gebied van *Legionella* diagnostiek en spelen een prominente rol bij de ontwikkeling in *Legionella* normen.

4.2.1.2

Meest waarschijnlijke aantal

Een andere kweekmethode voor het aantonen van *Legionella* is gebaseerd op het bepalen van het meest waarschijnlijke aantal (MWA). Hierbij worden verschillende hoeveelheden van een monster in een vloeibaar medium onderzocht en vervolgens met behulp van een statistische methode het MWA per 100 ml bepaald. Legiolert © was de enige MWA methode die in de literatuurstudie werd beschreven. De Legiolert Test detecteert *Legionella pneumophila* in watermonsters en is gebaseerd op een bacteriële enzym detectiemethode die de aanwezigheid van *L. pneumophila* signaleert door het omzetten van een substraat dat aanwezig is in het Legiolert-reagens tot een bruine kleur indicatief voor groeiende stammen van *L. pneumophila*.

De Legiolert © methode werd in 14 artikelen beschreven. De studies werden allemaal in meer of mindere mate gesponsord door de leverancier. In een aantal artikelen werden de voor- en nadelen van de Legiolert © methode beschreven, welke hieronder zijn samengevat. De ervaringen van de Nederlandse drinkwaterlaboratoria met de MWA methode staan in tekstbox 3.

Voordelen:

- De methode is geschikt voor **meerdere typen water**: drinkwater, industrieel (proces)water, afvalwater en natuurlijke watermonsters (Walker & McDermott, 2021). Voor watermonsters met een hoog aantal niet-legionella-organismen, zoals die van koeltorens, is aangetoond dat MWA meerdere voordelen heeft (Walker & McDermott, 2021).
- De methode detecteert **alleen *L. pneumophila*** (Scaturro, Buffoni, et al., 2020; Walker & McDermott, 2021).
- **Kwantitatief**. Deze methode geeft het meest waarschijnlijke aantal legionellabacteriën in watermonsters, weergegeven in MWA per volume onderzocht water, en wordt meestal uitgedrukt als MWA/L. De groei van **kweekbare bacteriën** biedt de mogelijkheid om het aantal aanwezige legionellabacteriën te kwantificeren (Walker & McDermott, 2021).
- **Hoge specificiteit en gevoeligheid**. De methode genereert gemiddeld hogere tellingen en heeft een hogere specificiteit voor *L. pneumophila* (97,9%) in vergelijking met de bestaande ISO 11731 kweekmethode (Rech et al., 2018; Spies et al., 2018; Walker & McDermott, 2021). De gevoeligheid met Legiolert voor drinkwatermonsters is hoger dan de ISO 11731 wanneer er lage concentraties in het water zitten, en de afgesproken regels voor het tellen van micro-organismen worden gehanteerd (Spies et al., 2018). Volgens Rech et al. (2018) is de specificiteit en gevoeligheid voor niet-drinkwater respectievelijk 97% en 84%. De specificiteit voor drinkwater is 96,5% (Boczek et al., 2021). Mogelijk kan dit worden verklaard doordat sommige micro-

organismen zich beter vermenigvuldigen in een vloeibaar medium, een fenomeen dat voor een aantal andere bacteriën ook wordt waargenomen (Checa et al., 2021).

- **Recovery.** De recovery van de MWA is in één studie vastgesteld en is met 70,6% vergelijkbaar of beter dan de ISO 11731 (McCuin et al., 2021).
- **Geen voorbehandeling nodig.** Het watervolume dat onderzocht wordt is maximaal 100 ml (Walker & McDermott, 2021) en minimaal 10 ml (McCuin et al., 2021). Er is geen voorbehandeling nodig voor drinkwater, omdat de methode minder gevoelig is voor stoorflora (Barrette, 2019; Walker & McDermott, 2021). Dit heeft als voordeel dat er geen extra verlies in recovery optreedt wat bij het toepassen van voorbehandelingen wel het geval kan zijn.
- Kan worden gebruikt om *Legionella* isolaten uit **klinische en omgevingsmonsters te vergelijken** (Walker & McDermott, 2021) voor bijvoorbeeld bronopsporing bij epidemiologische uitbraken (Rech et al., 2018).
- **Expertise laboratoriummedewerkers.** De testen kunnen in vergelijking met ISO 11731 gemakkelijk worden uitgevoerd (Rech et al., 2018; Walker & McDermott, 2021). De resultaten die worden verkregen zijn eenduidig met weinig interpretatie, waardoor het ook objectiever is (Barrette, 2019; Hirsh et al., 2021; LeChevallier, 2019). Legiolert © maakt gebruik van een eenvoudige monstervoorbereiding en testprocedure (Barrette, 2019; Rech et al., 2018).

Nadelen:

- **Tijd tot resultaten.** De detectie met deze kweekmethode is tijdrovend. De methode geeft binnen 7 dagen het meest waarschijnlijke aantal *Legionella pneumophila* (Monteiro et al., 2021; Walker & McDermott, 2021), dit is wel korter dan de standaard kweekmethode volgens ISO 11731.
- **Geen detectie van *Legionella non-pneumophila*.** De methode is gericht op de detectie van *L. pneumophila*. Andere legionellabacteriën zullen niet worden gedetecteerd met deze methode (Scaturro, Buffoni, et al., 2020; Walker & McDermott, 2021).
- **Geen detectie van levensvatbare maar niet-kweekbare (VBNC) legionellabacteriën.** MWA methoden tonen VBNC's niet aan (Walker & McDermott, 2021). In de studie van Boczek et al. (2021) wordt aangegeven dat dit voor Legiolert © niet is onderzocht.
- **Vals-positieve** resultaten zijn mogelijk in zowel drinkwater als niet-drinkwater en varieert tussen 0% - 4,6% (Barrette, 2019; Boczek et al., 2021; Hirsh et al., 2021; LeChevallier, 2019; Rech et al., 2018; Sartory et al., 2017). Het hoogste percentage vals-positieve resultaten werd gevonden in niet-drinkwater, namelijk proceswater van koeltorens (Barrette, 2019). Er zijn wel enkele niet-legionellabacteriën geïdentificeerd die een vals-positief resultaat (3,5%) gaven (Boczek et al., 2021).

Tekstbox 3 Ervaringen van Nederlandse drinkwaterlaboratoria met MWA-methode voor detectie van Legionella pneumophila. Bron: de drinkwaterlaboratoria

Ervaringen van drinkwaterlaboratoria met MWA-methode voor *L. pneumophila*

In 2018 is ervaring opgedaan met de Legiolert © methode die alleen door IDEXX wordt aangeboden. Legiolert © is een MWA kweekmethode waarbij *L. pneumophila* gedetecteerd wordt door een kleur of troebelheidsverandering. Net als andere kweekmethoden vereist de Legiolert © methode een incubatietijd van zeven dagen op 37 °C. Een beperkt vergelijkingsonderzoek met drinkwatermonsters toonde beperkte verschillen in *L. pneumophila* detectie tussen uitkomsten van de Legiolert © en de referentiemethode (NEN-EN-ISO 11731). Er is destijds besloten om de Legiolert © niet te valideren en geen presentatiekernmerken vast te stellen omdat in de Nederlandse drinkwaterregeling detectie voor *Legionella spp.* stond en er geen ruimte was voor enkel de detectie van *Legionella pneumophila*.

4.2.1.3

Amoebekweek

De laatste kweekmethode die uit het literatuuronderzoek naar voren kwam is de amoebekweek. Bij de amoebekweekmethode worden watermonsters eerst aangebracht op amoeben. Deze eencelligen zijn de natuurlijke gastheer van legionellabacteriën, waarin legionella zich kan vermenigvuldigen (Schalk & De Roda Husman, 2010). Door deze verrijkingstap zijn de legionellabacteriën vervolgens aan te tonen op agarplaten (Schalk & De Roda Husman, 2010).

In totaal zijn twee wetenschappelijke artikelen gevonden in deze literatuurstudie die de amoebekweek omschreven, waarvan één artikel de voor- en nadelen beschreef. Daarnaast hebben de auteurs ook informatie gebruikt uit drie RIVM publicaties (Schalk & De Roda Husman, 2010; Schalk et al., 2011; Schalk et al., 2012).

Voordelen:

- De methode is geschikt voor **meerdere typen water**: drinkwater, industrieel (proces)water, afvalwater en natuurlijke watermonsters (Schalk & De Roda Husman, 2010).
- Naast het aantonen van **kweekbare** bacteriën is het met deze methode ook mogelijk om legionellabacteriën in de **levensvatbare maar niet-kweekbare** (VBNC) toestand te detecteren (Edagawa et al., 2015; Schalk & De Roda Husman, 2010).
- **Stoorflora**. 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 (Schalk & De Roda Husman, 2010).

Nadelen:

- **Tijd tot resultaten**. De detectie met deze kweekmethode is tijdrovend. De methode geeft binnen 7 dagen het aantal bevestigde *Legionella spp.*
- **Expertise laboratoriummedewerkers**. Welke legionellasoorten kunnen worden aangetoond hangt af van de amoebesoor

(Schalk et al., 2011), dus kennis en expertise van het laboratoriumpersoneel is noodzakelijk.

- **Arbeidsintensief.** De methode is zeer bewerkelijk en vergt dan ook veel tijd en kennis van de uitvoerder van de protocollen (Schalk et al., 2011).

4.2.2 *Moleculaire detectie*

Legionella bevat genomisch materiaal, zoals DNA, dat kan worden aangetoond via moleculaire detectie. Dit is veelal een enzymatische methode waarbij specifiek DNA van Legionella wordt vermeerderd en vervolgens zichtbaar gemaakt. Hiervoor worden de legionellabacteriën eerst geconcentreerd door het watermonster te filtreren of centrifugereren en vervolgens wordt uit het concentraat of direct van het filter DNA geïsoleerd via een DNA-extractiemethode (Schalk & De Roda Husman, 2010). Het DNA kan worden aangetoond door middel van amplificatie en detectie middels 'polymerase chain reaction' (PCR), waarbij reactiebestanddelen (m.n. primers en probes) bepalen welke legionellasoorten gedetecteerd kunnen worden. De moleculaire detectiemethode is specifiek voor het detecteren van genen uit Legionella. Een gen dat aanwezig is kan worden geamplificeerd en gedetecteerd, ongeacht of de bacteriën levend of dood zijn. Dit in tegenstelling tot kweekmethoden die alleen levende bacteriën kunnen detecteren. In de ISO/TS 12869:2019 worden voorbeelden gegeven van gevalideerde primers en probes voor de detectie van *Legionella spp.* op basis van het 16S ribosomaal RNA gen en *Legionella pneumophila* op basis van het mip-gen (ISO/TS, 2019). Maar er zijn ook andere primers en probes mogelijk voor de detectie van deze of andere specifieke genen. Het detecteren van de genen kan met behulp van PCR of 'loop-mediated isothermal amplification' (LAMP) (Inoue, 2020). In tegenstelling tot PCR, waarbij de reactie wordt uitgevoerd met een reeks stappen van wisselende temperatuur, wordt LAMP uitgevoerd bij een constante temperatuur en is er geen thermische cyclus nodig. Moleculaire detectie is in de meeste gevallen gevoeliger, specifiek en sneller dan klassieke analysemethoden zoals kweekmethoden.

4.2.2.1 qPCR / LAMP

Met kwantitatieve PCR (qPCR) of LAMP (qLAMP) kan de hoeveelheid target-DNA die na een bepaald aantal cycli wordt geproduceerd, worden gebruikt om te bepalen hoeveel kopieën van het DNA (en dus een indicatie van het aantal bacteriën) aanwezig waren in het oorspronkelijke watermonster. Dit wordt weergegeven in genoomeenheden (GE) (Walker & McDermott, 2021).

De hoge reproduceerbaarheid, specificiteit, snelheid en kwantitatieve aspecten van qPCR hebben ervoor gezorgd dat qPCR door de Association Française de Normalisation (AFNOR) en ISO is geaccepteerd als een standaardmethode voor de detectie en kwantificering van *Legionella spp.* en *L. pneumophila* (normen NF T90-471 en ISO/TS 12869:2019, respectievelijk). De PCR-methode beschreven in ISO/TS 12869:2019 wordt ook genoemd als alternatieve methode in de tekst van de Europese drinkwaterrichtlijn 2020 (Walker & McDermott, 2021).

Moleculaire technieken met behulp van PCR werden 66 keer beschreven in de geselecteerde artikelen van de literatuurstudie, waarbij het 49 keer om qPCR ging en enkele malen (5) om de LAMP methodiek. De

ervaringen van de Nederlandse drinkwaterlaboratoria met qPCR staan in tekstbox 4.

Voordelen:

- **Tijd tot resultaten: snelle test.** Het verwerken van de watermonsters en rapporteren van de resultaten kan binnen 24 uur, en in sommige gevallen zelfs binnen één tot enkele uren. Er is ook een mogelijkheid om op locatie (on-site) detectie uit te voeren (Samhan et al., 2017; Walker & McDermott, 2021) (Yáñez et al., 2011; Yasmon et al., 2010; Zhan et al., 2016; Zhou et al., 2011).
- Deze methode kan **zowel *Legionella pneumophila* als *Legionella spp.*** aantonen (Reuter et al., 2021). Het is mogelijk om gelijktijdig *Legionella spp.* en *Legionella pneumophila* te detecteren en te onderscheiden met minimum vereisten aan extra materiaal, tijd en initieel monstervolume (Reuter et al., 2021). De detectie kan zich ook richten op enkel *Legionella pneumophila*.
- Het detecteren van **kweekbare** legionellabacteriën is mogelijk, maar ook wanneer deze in de **levensvatbare maar niet-kweekbare** (VBNC) toestand zijn (Guillemet et al., 2010; Walker & McDermott, 2021) of wanneer de bacteriën in amoebes aanwezig zijn (Collins et al., 2015).
- **Kwantitatief.** Deze methode biedt de mogelijkheid om de concentratie van de micro-organismen in de monsters te kwantificeren met behulp van real-time PCR (Walker & McDermott, 2021).
- De methode heeft een **hogere specificiteit en gevoeligheid** in drinkwater evenals niet-drinkwater (Walker & McDermott, 2021) (Touren-Bodilis et al., 2011; Yáñez et al., 2011; Yasmon et al., 2010; Zhan et al., 2016; Zhou et al., 2011). In water met een hoge achtergrondflora werd in de studie van Díaz-Flores et al. (2015) een gevoeligheid van 91,7% aangetoond met qPCR, terwijl dit met kweek slechts 58,3% was.
- **Lage detectielimieten** (Walker & McDermott, 2021; Yáñez et al., 2011), met detectie van *L. pneumophila* in lage concentraties (Islam et al., 2017). Echter wanneer er veel PCR remmende stoffen in het watermonster zitten, en het genomisch materiaal 1:10 wordt verdund voor resultaten (Whiley & Taylor, 2016) zal de detectielimiet toenemen. Dit kan bijvoorbeeld bij koelwater het geval zijn.
- **Recovery.** Bij het opwerken van monsters voor qPCR kan verlies optreden tijdens concentratie van het watermonster en extractie van het genomisch materiaal, maar de recovery is hoger dan bij de kweekmethode (Lee et al., 2011). De recovery voor de genomische extractie uit watermonsters zonder en met hoge troebelheid varieerde van respectievelijk 80,8 tot 85% (Collins et al., 2017). In een andere studie was de recovery voor het extraheren van genomisch materiaal uit diverse water typen hoger dan 92% (Toplitsch et al., 2021). ISO/TS 12869:2019 beschrijft waaraan de recovery moet voldoen en deze moet worden uitgerekend (ISO/TS, 2019). In de ISO/TS 12869:2019 is vastgelegd dat de robuustheid moet worden bepaald door de karakterisering van het matrixeffect. Hierin staat dat de recovery

niet wezenlijk wordt beïnvloed door het type matrix dat wordt geanalyseerd.

- **Analyseren van veel monsters.** De methode is geschikt om grote aantallen monsters te analyseren (İslam et al., 2017; Toplitsch et al., 2018).

Nadelen

- De **specificiteit en gevoeligheid** van de diverse beschreven moleculaire detectiemethoden met behulp van PCR of LAMP zijn sterk afhankelijk van de gekozen DNA-extractie- en qPCR-technieken (primers en probes) en kunnen wisselende resultaten opleveren (Collins et al., 2017).
- **Overschatting van het aantal levensvatbare bacteriën.** Bij qPCR wordt geen onderscheid gemaakt tussen levensvatbare en niet-levensvatbare bacteriën. DNA in omgevingsmonsters kan zeer stabiel zijn en kan gedurende langere tijd worden aangetoond. In biofilm kan bijvoorbeeld DNA van niet-levensvatbare bacteriën dagen tot weken gedetecteerd worden (Whiley & Taylor, 2016). Ook is het met qPCR mogelijk dat er vrij DNA wordt aangetoond (Collins et al., 2015; Falzone et al., 2020). Dit kan leiden tot een overschatting van het aantal levensvatbare bacteriën (Collins et al., 2015).
- **Vals negatieven.** PCR-remmende verbindingen die aanwezig zijn in omgevingsmonsters, zoals humuszuur en fulvinezuur (Inoue 2020), kunnen vals negatieven veroorzaken (Guillemet et al., 2010; Walker & McDermott, 2021). Er zijn ook studies waarin geen remming werd aangetoond (Ditommaso, Giacomuzzi, et al., 2015). Het is echter aangetoond dat het uitvoeren van 1:10 verdunningen van DNA-extracten effectief is in het verminderen van remmers en het mogelijk maken van kwantificering van doel-DNA (Whiley & Taylor, 2016), dit is met name van toepassing voor water met PCR-remmende stoffen zoals proceswater of afvalwater. Met behulp van een interne controle kan worden onderzocht of er inhibitie ofwel remming heeft opgetreden om mogelijk vals-negatieven te voorkomen (Ditommaso, Giacomuzzi, et al., 2015).
- **Expertise laboratoriummedewerkers.** Voor de uitvoering van moleculaire technieken moeten de medewerkers getraind worden (Walker & McDermott, 2021). PCR en LAMP methoden vereisen een nauwkeurig ontwerp van primers en probes voor een goede detectie van *Legionella spp.* en/of *Legionella pneumophila* (Reuter et al., 2021).
- **Apparatuur en materialen zijn kostbaar.** Niet alle laboratoria beschikken over de moleculaire microbiologische faciliteiten, apparatuur, financiële middelen of opgeleid personeel voor routinematige moleculaire analyses (Walker & McDermott, 2021). Boss et al. (2018) meldt dat PCR meer manueel werk vereist en duurder is dan de kweekmethode.
- **Conversie** tussen GE (PCR/LAMP) en KVE (kweek) is voor *Legionella* nog niet mogelijk (Reuter et al., 2020). Detectie door qPCR is geschikt voor het frequent monitoren van veranderingen in *Legionella*concentraties, maar de exacte bepaling van het aantal legionellabacteriën is moeilijk (Krøjgaard et al., 2011).

4.2.2.2 Viability qPCR

Om de problemen aan te pakken die bij qPCR horen, namelijk dat ook dode en beschadigde legionellabacteriën worden aangetoond en dit leidt tot overschatting van het aantal levende aantal bacteriën, is viability qPCR ontwikkeld. Deze methode maakt gebruik van ethidium of propidiummonoazide, waardoor celvrij DNA niet beschikbaar is voor detectie met PCR (Walker & McDermott, 2021). Sommige studies hebben aangetoond dat voorbehandelingen met ethidium monoazide (EMA) en propidiummonoazide (PMA) voorafgaand aan DNA-extracties alleen amplificatie van levensvatbare bacteriën mogelijk maken. Bij blootstelling aan licht binden EMA en PMA zich aan DNA dat niet wordt beschermd door een celmembraan en voorkomt het de amplificatie ervan, en dus vermeerdering door qPCR. Deze methoden zijn niet geoptimaliseerd voor verschillende steekproeftypen en hun betrouwbaarheid en nauwkeurigheid wordt nog steeds betwist (Whiley & Taylor, 2016).

Viability qPCR werd 17x beschreven. De voor- en nadelen van deze methode, aanvullend op de voor- en nadelen van qPCR, zijn hieronder samengevat. De ervaringen van de Nederlandse drinkwaterlaboratoria met viability qPCR staan in tekstbox 4.

Voordelen

- **Tijd tot resultaten: snelle test.** Het verwerken van de watermonsters en rapporteren van de resultaten kan binnen 24 uur, en in sommige gevallen zelfs binnen één tot enkele uren (Schalk 2010).
- Aantonen van **levensvatbaarheid** (Qin et al., 2012; Walker & McDermott, 2021) waardoor resultaten bruikbaar zijn dan bij gebruik van een reguliere qPCR. Het detecteren van legionellabacteriën in de **levensvatbare maar niet-kweekbare** (VBNC) toestand is (net als bij qPCR) mogelijk, waardoor de resultaten bruikbaar zijn dan kweek (Yáñez et al., 2011).
- De methode heeft een **hogere specificiteit en gevoeligheid** in drinkwater als niet-drinkwater (Monteiro et al., 2021).
- Net als bij qPCR zijn de resultaten goed te interpreteren en kwantificeren (Monteiro et al., 2021), maar is de conversie naar kweekbare legionellabacteriën niet goed mogelijk (Reuter et al., 2020).

Nadelen

- **Overschatting levensvatbare bacteriën.** Als de concentratie van EMA of PMA te laag is, zal onvoldoende vrij DNA worden gebonden, wat resulteert in overschatting van de levende bacteriën (Whiley & Taylor, 2016). De verhouding tussen levende en dode cellen kan de efficiëntie van de methode beïnvloeden (Ditomaso, Ricciardi, et al., 2015).
- Als bacteriën zijn samengeklonterd zal EMA of PMA niet voldoende doordringen tot alle bacteriën. Daarnaast kunnen de intercalerende kleurstoffen niet door alle soorten celmembranen dringen. Beide nadelen resulteren erin dat de behandeling niet altijd het volledige gewenste effect heeft (Li et al., 2015; Lizana et al., 2017).
- PCR inhibitors in water kunnen de resultaten beïnvloeden (Qin et al., 2012), echter werd in een studie van Ditommaso geen

remming aangetoond (Ditommaso, Giacomuzzi, et al., 2015). Met behulp van een interne controle kan worden onderzocht of er inhibitie ofwel remming heeft opgetreden (Ditommaso, Giacomuzzi, et al., 2015). Deze methode is dus niet toepasbaar in watermonsters met een hoge troebelheid, omdat de EMA-behandeling wordt geremd door troebelheid in het monsterwater (Inoue, 2020).

- **Vals positieve resultaten.** Met deze methode kunnen vals positieven resultaten voorkomen doordat PMA niet alleen levensvatbare bacteriën markeert (Scaturro et al., 2016).

Tekstbox 4 Ervaringen van Nederlandse drinkwaterlaboratoria met Legionella qPCR en viability qPCR. Bron: de drinkwaterlaboratoria

Ervaringen Nederlandse drinkwaterlaboratoria met Legionella qPCR

In 2005 is in Nederland voor de detectie van *L. pneumophila* een qPCR ontwikkeld. Deze methode is gestandaardiseerd binnen Nederland, als NEN 6254:2013+C1. Daarnaast is er op internationaal niveau een vergelijkbaar document ontwikkeld: ISO/TS 12869:2019. Nederlandse experts hebben bijgedragen aan de inhoud van deze ISO Technical Specification door actief deel te nemen als expert aan de internationale werkgroep ISO/TC 147/SC 4/WG 17 'Legionella by PCR'. Nederlandse drinkwaterlaboratoria hebben ook praktische ervaring met de inzet van qPCR van *L. pneumophila* in water. Voorbeeld is een onderzoek van KWR waarin koelwatertorenmonsters zijn onderzocht met qPCR en de kweekmethode. Hieruit blijkt dat met de qPCR meer *L. pneumophila* is aangetoond in vergelijking met de kweekmede omdat de qPCR minder last heeft van remmende factoren, wat bij kweek (in de vorm van bijgroei) bij een aantal koeltorenmonsters wel het geval was. Vanwege deze bijgroei kon volgens dit onderzoek bij de kweek geen uitspraak worden gedaan over de aanwezigheid van *L. pneumophila*. Met dit onderzoek is de bruikbaarheid aangetoond van een snelle screening van koelwatertorenmonsters met qPCR-technologie, desgewenst gevolgd door een specifieke kweek van *L. pneumophila* (Veenendaal et al., 2017). Of dit ook voor drinkwatermonsters geldt is hierin niet onderzocht.

Laboratoria zijn bij gebruik van qPCR minder afhankelijk van één leverancier voor de benodigdheden, zoals primers, probes en reagentia. qPCR is een gevoelige methode voor vals-positieve resultaten (kruiscontaminatie). Dit betekent dat er speciale voorzorgsmaatregelen moet worden getroffen zoals het inrichten van speciale ruimtes en het gebruik van aparte instrumenten om zo de kans op kruiscontaminaties te voorkomen.

Een discussiepunt is de interpretatie van de qPCR positieve resultaten; met qPCR wordt naast kweekbare ook niet kweekbare *Legionella* aangetoond. Eén drinkwaterlaboratorium heeft naar aanleiding van dit vraagstuk een PMA-qPCR methode getest, waarmee onderscheid kan worden gemaakt tussen beschadigde - en intacte *L. pneumophila* cellen. In de praktijk blijkt dat de detectiegrens van deze PMA-qPCR methode ten opzichte van de klassieke qPCR en kweek niet haalbaar is. De PMA qPCR voor Legionella species is de afgelopen vier jaar op 86 drinkwatermonsters ingezet. Hierbij zijn in 76 monsters Legionella

species aangetoond en in tien monsters geen *Legionella* species. Voor de detectie van *Legionella pneumophila* met de PMA-qPCR waren er van deze 86 drinkwatermonsters geen positieve resultaten. Van de 86 monsters die zijn ingezet op de PMA-qPCR zijn bij 41 monsters kweekresultaten bekend. Van deze 41 monsters waren er 5 positief met de kweekmethode en 40 positief op de PMA-qPCR voor *Legionella* species. Dit is een indicatie dat met de PCR methode voor het meten van intacte *Legionella* species in bijna alle monsters een positief resultaat wordt verkregen, waarvan in het merendeel van deze monsters geen kweekbare *Legionella* is aangetoond.

De wetgeving schrijft momenteel voor dat alle *Legionella* species aangetoond moeten worden. De introductie van alternatieve analysemethoden zoals de qPCR is hierdoor geremd, als alternatief voor NEN-EN-ISO 11731:2017 omdat deze alternatieve methodes vaak zijn toegespitst op screening van specifieke *Legionella* soorten. Wat de PMA-qPCR methode betreft bevatten veel watermonsters een *Legionella* soort die niet te kweken is, maar wel met de qPCR kan worden aangetoond. Bij screening van watermonsters met de qPCR voor *Legionella* species wordt dus veel vaker *Legionella non-pneumophila* in watermonsters aangetoond, wat betekent dat met een *Legionella* species qPCR geen accurate indruk kan worden verkregen in relatie tot een risico voor de volksgezondheid, mits deze wordt aangevuld met een kweekmethode om de levensvatbaarheid mee aan te tonen. Echter wanneer monsters geanalyseerd worden op specifiek *L. pneumophila* wordt hiermee wel een weg geopend om alternatieve analysemethoden te gebruiken zoals in dit geval qPCR, mits deze wordt aangevuld met een kweekmethode om de levensvatbaarheid mee aan te tonen (of middels een voorbehandeling met PMA een gewenste detectielimiet kan worden bereikt). Dit omdat de kans dat *L. pneumophila* in een watermonster aanwezig is veel kleiner is dan *Legionella spp.*

4.2.2.3 Legionella chip

Net als bij andere PCR-methoden bestaat de chipmethode uit een filtratiestap, gevolgd door DNA-isolatie en PCR. Het PCR-product wordt geanalyseerd met behulp van de legionella-chip (Schalk & De Roda Husman, 2010). Er zijn verschillende vormen van chips beschikbaar, zoals een geminiaturiseerde real-time PCR of LAMP op een chip (real-time PCR-chipsysteem) waarbij direct online onderscheid gemaakt kan worden tussen *Legionella pneumophila* en *Legionella spp.* (Reuter et al., 2021). Het gebruik van een chip om Legionella aan te tonen werd slechts enkele malen toegepast (Reuter et al., 2021; Reuter et al., 2020; Samhan et al., 2017). De voor- en nadelen van deze methode, aanvullend op de voor- en nadelen van qPCR en viability qPCR, zijn hieronder samengevat. De ervaringen van Nederlandse drinkwaterlaboratoria met Legionella chip wordt weergegeven in tekstbox 5.

Voordelen

- Detectie van zowel ***Legionella spp.*** als ***Legionella pneumophila*** is mogelijk (Reuter et al., 2021). Het is dus ook mogelijk om de detectie alleen op *Legionella pneumophila* te richten.
- **Vals-positieven.** De methode kan op een chip worden uitgevoerd waardoor de kans op kruiscontaminatie (vals-positieven) wordt verkleind (Reuter et al., 2021).

Nadelen

- Chips richten zich vooral op detectie van DNA kan ook met deze methode geen onderscheid worden gemaakt tussen dood of levend (Schalk & De Roda Husman, 2010).
- Wel is een **voorbehandelingsmethode** ontwikkeld, de zogenaamde dead-or-alive test, waardoor alleen levensvatbare bacteriën worden gedetecteerd (Schalk & De Roda Husman, 2010). Of de methode ook geschikt is voor het testen van drinkwatermonsters zal moet blijken uit nader onderzoek (Schalk & De Roda Husman, 2010).

Tekstbox 5 Ervaringen van Nederlandse drinkwaterlaboratoria met Legionella chip. Bron: de drinkwaterlaboratoria

Ervaringen van de drinkwaterlaboratoria met Legionella chip

Eén drinkwaterlaboratorium heeft ervaring met de inzet van de micro-array technologie, voor de detectie van *L. pneumophila*. Deze technologie heet de Legionella chip en is in samenwerking met een kennisinstituut en een referentie laboratorium ontwikkeld, met als doel om een snelle technologie beschikbaar te hebben waarmee het type *Legionella (pneumophila)* kan worden bepaald. Deze chip bevat namelijk specifieke biomarkers waarmee een onderscheid kan worden gemaakt tussen de aanwezigheid van een *L. pneumophila* omgevingsstam of een *L. pneumophila* patiënt gerelateerde stam. De Legionella chip heeft wel als voordeel dat er een onderscheid kan worden gemaakt tussen intacte en beschadigde *L. pneumophila*, omdat de monsters worden behandeld met PMA. Het nadeel van deze technologie is dat niet rechtstreeks de concentratie *L. pneumophila* kan worden bepaald. Een aanvullende qPCR voor *L. pneumophila* moet uitsluitend geven over de concentratie aanwezige *L. pneumophila*.

Het onderzoek en verdere doorontwikkeling van deze micro-array is rond 2014 echter stopgezet mede omdat er in Nederland vanuit wetgeving werd gestuurd op aanwezigheid van *Legionella* species, en niet op *L. pneumophila* specifiek. Hierdoor had screening op *L. pneumophila* patiënt of omgevingsstam eveneens geen toegevoegde waarde.

- 4.2.2.4 Fluorescentie in situ hybridisatie (FISH)
- FISH) is een detectietechniek die gebruik maakt van specifieke fluorescerend gelabelde DNA-probes die zich richten op het ribosomaal RNA van de bacteriën (Schalk & De Roda Husman, 2010). Deze methode kan gecombineerd worden met een korte kweekmethode, van maximaal 2 dagen, om het gewenste micro-organisme te laten groeien en vervolgens aan te tonen met behulp van FISH (Baudart et al., 2015). Hierbij wordt eerst een watermonster gefiltreerd en vervolgens op een specifiek medium geïncubeerd. De microkolonies die ontstaan worden daarna gefixeerd, en vervolgens vindt hybridisatie plaats met een fluorescent gelabelde DNA probe (Baudart et al., 2015). De legionellabacteriën worden zichtbaar gemaakt met behulp van fluorescentie microscopie. Alleen levende legionellabacteriën bevatten voldoende rRNA om aangetoond te kunnen worden (Schalk & De Roda Husman, 2010).

De literatuurstudie omvat drie artikelen waarin de FISH methode voor de detectie van *Legionella* beschreven. Er zijn geen ervaringen van de drinkwaterlaboratoria ontvangen.

Voordelen

- **Tijd tot resultaten: snelle test.** Het verwerken van de watermonsters en rapporteren van de resultaten kan binnen 24 tot 48 uur (Baudart et al., 2015; Moreno et al., 2019), waardoor overgroei van non-*Legionella* wordt verminderd (Baudart et al., 2015; Moreno et al., 2019). Het is niet nodig om voor de detectie eerst genomisch materiaal te extraheren, wat ook tijds winst oplevert (Moreno et al., 2019).
- Detectie van zowel ***Legionella spp.*** als ***Legionella pneumophila*** is mogelijk (Moreno et al., 2019). Het is dus ook mogelijk om de detectie alleen op *Legionella pneumophila* te richten.
- De methode is gebaseerd op een (korte) incubatiestap en hiermee worden kweekbare legionellabacteriën aangetoond (Baudart et al., 2015; Moreno et al., 2019).
- Detecteren van legionellabacteriën in de **levensvatbare maar niet-kweekbare** (VBNC) toestand (Baudart et al., 2015; Moreno et al., 2019).
- **Storende flora** beperkt. Geen niet-specifieke bindingsproblemen of inhibitors die een storende werking hebben in de detectie middels hybridisatie (Moreno et al., 2019).

Nadelen

- De methode kent een vrij **hoge detectielimiet en kwantificatielimiet** in vergelijking met kweek (>1000 CFU/L) (Kirschner et al., 2012) (Schalk & De Roda Husman, 2010).
- Een specifieke toepassing van FISH, de zogenoemde CARD-FISH, kan geen duidelijk onderscheid maken **tussen levende en niet-levende bacteriën** (inactieve of afgestorven) zonder incubatie (Kirschner et al., 2012; Moreno et al., 2019). Toch geeft Baudart et al. (2015) aan dat resultaten goed zijn te vergelijken met de kweekmethode omdat beide methodes levensvatbaarheid in acht nemen (Baudart et al., 2015).
- De methode is (nog) niet bruikbaar voor grootschalig gebruik (Baudart et al., 2015).
- **Expertise laboratoriummedewerkers.** Voor de uitvoering van moleculaire technieken moeten de medewerkers getraind worden (Walker & McDermott, 2021). De methode vereisen een nauwkeurig ontwerp van probes voor een goede detectie (gevoeligheid en specificiteit) van *Legionella spp.* en/of *Legionella pneumophila* (Baudart et al., 2015).

4.2.2.5 ScanVIT- Legionella TM-methode

De ScanVIT-*Legionella* TM is een gevalideerde methode gebaseerd op de FISH techniek. Het is een combinatie van kweek en fluorescentie op basis van specifieke fluorescerend gelabelde DNA-probes. Deze techniek maakt kwantificering en de gelijktijdige detectie van kweekbare *Legionella spp.* en *L. pneumophila* binnen drie dagen mogelijk. Detectie van legionellabacteriën vindt plaats op een filtermembraan dat na filtratie van het watermonster, 72 uur wordt geïncubeerd op een

specifiek medium (GVPC-agar), en vervolgens in contact wordt gebracht met de fluorescente probe.

De Scan-VIT methode is in vier artikelen omschreven. De voor- en nadelen van de FISH-techniek gelden ook voor de Scan-VIT methode. Omdat deze specifieke methode is gevalideerd zijn hieronder de voor- en nadelen van Scan-VIT TM weergegeven.

Voordelen

- **Tijd tot resultaten: snelle test** met resultaten binnen drie dagen (Bargellini et al., 2010; Ditommaso et al., 2010; Gruas et al., 2013).
- Mogelijkheid om **zowel *Legionella pneumophila* als *Legionella spp.*** gelijktijdig aan te tonen (Ditommaso et al., 2010; Gruas et al., 2013). Het is dus ook mogelijk om de detectie alleen op *Legionella pneumophila* te richten.
- **Hoge specificiteit en gevoeligheid** (Bargellini et al., 2010; Gruas et al., 2013), vergelijkbaar of zelfs beter dan met de kweekmethode, ook op natuurlijke monsters.
- **Minder vals-negatieven** vergeleken met de kweekmethode bij lage concentraties Legionella (Bargellini et al., 2010).
- Effect **storende flora** beperkt. Met SCAN-VIT was er minder negatief effect van andere bacteriën, zoals *Pseudomonas*, dan bij de standaard kweekmethode (Bargellini et al., 2010).

Nadelen

- Kolonies kunnen niet van het filter gehaald worden voor verder onderzoek (typeren of biochemische analyse) (Gruas et al., 2013) en daardoor
- kan geen vergelijking gemaakt worden tussen **klinische en omgevingsmonsters**.
- **Consistente onderschatting**. Deze methode biedt consistente onderschatting van *Legionella*-concentratie ten opzichte van kweek, zelfs in monsters met *Legionella*-concentraties boven 1.000 kve/L (Ditommaso et al., 2010).
- **Kwantitatief**. Deze methode biedt de mogelijkheid om de concentratie van de micro-organismen in de monsters te kwantificeren, maar Ditommaso et al. (2010) suggereert dat de methode aanbevolen zou moeten worden als kwalitatieve methode.
- **Expertise laboratoriummedewerkers**. Voor het tellen van de Legionella kolonies onder een fluorescentiemicroscopie is getraind personeel nodig (Bargellini et al., 2010).

4.2.3 Immunologische detectie

Legionellabacteriën kunnen worden gedetecteerd door middel van immunologische detectie op basis van detectie van antilichamen die aan legionella-eiwitten binden. De antilichamen zijn gelabeld waardoor ze door middel van een laser aangestraald worden, en via de microscoop of via flow cytometrie te detecteren zijn (Schalk & De Roda Husman, 2010). Immunologische technieken worden gelimiteerd door de specificiteit van de gebruikte antilichamen. De beschreven methoden richten zich alleen op de detectie van ***Legionella pneumophila***, maar dit is in principe ook mogelijk voor andere Legionella soorten.

4.2.3.1 Immunofluorescentie

Immunofluorescentie werd 9 keer beschreven in de geselecteerde artikelen van de literatuurstudie. De voor- en nadelen staan hieronder samengevat. Er zijn geen ervaringen van de drinkwaterlaboratoria ontvangen.

Voordelen

- **Tijd tot resultaten: snelle test.** Het verwerken van de watermonsters en rapporteren van de resultaten kan binnen 4 uur (Faria-Ramos et al., 2011; Schalk & De Roda Husman, 2010).
- De kosten zijn vergelijkbaar met kweek, en voor routinematig onderzoek is het makkelijk te automatiseren (Párraga-Niño et al., 2018).
- Detecteren van legionellabacteriën in de **levensvatbare maar niet-kweekbare** (VBNC) toestand is mogelijk (Párraga-Niño et al., 2018).
- **Hoge specificiteit en gevoeligheid** voor alle *Legionella pneumophila* serogroepen ten opzichte van de kweekmethode (Párraga-Niño et al., 2018; Parthuisot et al., 2011).

Nadelen

- Er kan **geen onderscheid** worden gemaakt tussen **dode en levende** legionellabacteriën (Párraga-Niño et al., 2018). Antilichamen binden aan niet-levensvatbare legionellabacteriën, waardoor het aantal infectieuze bacteriën wordt overschat (Schalk & De Roda Husman, 2010).
- **Detectielimiet** in natuurlijke monsters is onbekend (Párraga-Niño et al., 2018).
- De beschreven immunofluorescentiemethoden detecteren alleen ***L. pneumophila***. Andere legionellabacteriën zullen niet worden aangetoond (Faria-Ramos et al., 2011; Párraga-Niño et al., 2018; Parthuisot et al., 2011; Sboui et al., 2015; Wunderlich et al., 2016; Yamaguchi et al., 2017). Met behulp van anti-*Legionella* species magnetische bolletjes zouden wel andere *Legionella* soorten kunnen worden aangetoond (Walker & McDermott, 2021).

4.2.3.2 Immunomagnetische separatie (IMS)

IMS is een methode om legionellabacteriën te isoleren uit een (geconcentreerd) watermonster. Hierbij wordt gebruik gemaakt van magnetische bolletjes met antilichamen voor *Legionella*. IMS kan hierbij dus als zuiveringsstap dienen voor PCR of flowcytometrie (Füchslin et al., 2010) welke de legionellabacteriën vervolgens bevestigen en indien mogelijk ook kwantificeren. Een veelgebruikte methode voor het bevestigen van de bacteriën is door middel van geconjugeerd anti-*Legionella*-antilichaam. Hierdoor ontstaan gelabelde complexen die worden gevisualiseerd door de colorimetrische reactie na toevoeging van substraat (Díaz-Flores et al., 2015). Echter de legionellabacteriën zouden ook op een andere manier kunnen worden aangetoond, zoals met kweek op selectieve agarplaten (Allegra et al., 2011). Legipid © Bioalarm *Legionella* Assay is een gevalideerde methode die gebaseerd is op IMS en bevestiging met enzyme-linked colorimetrische detectie (Rodríguez Albalat et al., 2012). Een andere gevalideerde methode

gebaseerd op IMS, L.p. SG1 DETECT kit, bevestigt de legionellabacteriën met behulp van fluorescerende anti-Legionella-antilichamen die met behulp van flowcytometrie geteld worden.

In negen artikelen wordt de IMS beschreven, waarvan in twee artikelen de Legipid © Bioalarm Legionella Assay en in één artikel L.p. SG1 DETECT kit (Keserue et al., 2021) voor de detectie van *Legionella pneumophila* serogroup 1. De methode is gebaseerd op een combinatie van immunomagnetische separatie en flowcytometrie wordt beschreven. De IMS is een voorbereiding en wordt gecombineerd met verschillende detectietechnieken, wat het vergelijken van voor- en nadelen bemoeilijkt. Er zijn geen ervaringen van de drinkwaterlaboratoria ontvangen.

Voordelen

- **Tijd tot resultaten: snelle test.** De detectiemethode kan zeer snel worden uitgevoerd, waardoor resultaten binnen minder dan een uur beschikbaar kunnen zijn (Keserue et al., 2021; Walker & McDermott, 2021).
- Detectie van zowel ***Legionella spp.*** als ***Legionella pneumophila*** is mogelijk (Albalat et al., 2014; Díaz-Flores et al., 2015), echter focussen de meeste methoden zich alleen op *L. pneumophila* en in een enkel geval alleen op *L. pneumophila* serogroep 1 (Albalat et al., 2014; Keserue et al., 2021).
- Detecteren van legionellabacteriën in de **levensvatbare maar niet-kweekbare** (VBNC) toestand is mogelijk, waarbij de methode onderscheid maakt tussen intacte en beschadigde bacteriën (Albalat et al., 2014; Díaz-Flores et al., 2015).
- **Hoge gevoeligheid en specificiteit** (respectievelijk 96,6 en 100%), met een gerapporteerd rendement van 97,8% in vergelijking met de kweekmethode (ISO 11731:2017) (Walker & McDermott, 2021).
- **Recovery.** De IMS-methode verbetert over het algemeen de recovery van Legionella in omgevingsmatrices (Díaz-Flores et al., 2015). De recovery door IMS toe te passen in combinatie met kweek is significant hoger dan de standaard kweekmethode (Allegra et al., 2011). De recovery is hoogstens 69% (Keserue et al., 2021)
- **Vals positieve** resultaten voor de Legipid © Bioalarm Legionella Assay zijn 0% (Rodríguez Albalat et al., 2012).
- Effect **storende flora** zeer beperkt. Zelfs in zwaar verontreinigd water en in aanwezigheid van groeiremmers kan deze methode worden uitgevoerd, maar ook in kraanwater (Allegra et al., 2011; Walker & McDermott, 2021).
- **Mogelijkheid tot automatisering** is eenvoudig (Párraga-Niño et al., 2018).

Nadelen

- **Overschatten van kweekbare Legionellabacteriën.** Terwijl de antilichamen binden aan antigenen in de celwand is het mogelijk dat deze hechten aan VBNC en beschadigde bacteriën of fragmenten van celwanden en deze kunnen leiden tot overschatten van kweekbare legionellabacteriën. De fabrikant biedt een conversieformule zodat de colorimetrische signalen die door IMS-methoden worden geproduceerd, in combinatie met

fotometeruitlezingen, kunnen worden beschreven in "equivalente kolonievormende eenheden" (Füchslin et al., 2010; Walker & McDermott, 2021).

- **Vals negatieve resultaten.** Vals negatieve resultaten kunnen worden veroorzaakt door de gebruiker of door klompen bacteriën en ligt rond de 3,4% (Rodríguez Albalat et al., 2012).
- Immunologische technieken worden gelimiteerd door de **specificiteit van de gebruikte antilichamen.** Parthuisot et al. (2011) beschreven dat *L.pneumophila* serogroepen 7 en 11 niet gedetecteerd werden omdat hiervoor geen antilichamen in de gebruikte cocktail zaten. Het kan ook zo zijn dat Legionella in amoeben worden gemist, waardoor met de kweekmethode meer positieve resultaten worden gevonden (Keserue et al., 2012).
- **Expertise laboratoriummedewerkers** is nodig voor het uitvoeren van deze methode (Walker & McDermott, 2021).

4.2.3.3 Lateral flow assay (LFA)

LFA-technologieën werden in eerste instantie ontwikkeld voor klinische diagnostische doeleinden om *L. pneumophila*-antigeen in urine te detecteren, de urine-antigeentest (Walker & McDermott, 2021). De LFA is aangepast voor het testen van milieu monsters, maar net als bij de klinische tests wordt alleen *L. pneumophila* serogroep 1 gedetecteerd. De test maakt gebruik van een gelabeld antilichaam dat bindt aan elk *L. pneumophila* serogroep 1-antigeen dat in het monster aanwezig is. Dit wordt vervolgens zichtbaar gemaakt door middel van het verschijnen van rode lijnen in de test.

In de literatuurstudie werden geen specifieke artikelen gevonden waarbij de LFA-methode werd omschreven, dit werd alleen teruggevonden in een review paper (Walker & McDermott, 2021). Er zijn geen ervaringen van de drinkwaterlaboratoria ontvangen.

Voordelen

- **Tijd tot resultaten: snelle test.** De detectiemethode kan zeer snel worden uitgevoerd, waardoor resultaten binnen minder dan één uur beschikbaar kunnen zijn (Walker & McDermott, 2021).
- **Makkelijk hanteerbaar.** Testkits zijn klein, lichtgewicht, draagbaar, gemakkelijk ter plaatse te gebruiken (Walker & McDermott, 2021).
- De methode is geschikt voor **meerdere typen water:** drinkwater, industrieel (proces)water, afvalwater en natuurlijke watermonsters (Walker & McDermott, 2021).
- **Expertise laboratoriummedewerkers niet nodig.** De interpretatie van het resultaat is visueel, zodat gespecialiseerd personeel en laboratorium infrastructuur niet nodig zijn (Walker & McDermott, 2021).

Nadelen

- **Lage gevoeligheid.** In een aantal testen is aangetoond dat de gevoeligheid te laag is voor de bepaling van *L. pneumophila* serogroep 1 in sommige milieuwatermonsters (Walker & McDermott, 2021). De detectielimiet kan echter worden verbeterd en is naar verluidt ongeveer 100 CFU / L wanneer een extra filtratiestap wordt geïmplementeerd (Walker & McDermott, 2021).

- **Alleen detectie van *L. pneumophila* serogroep 1** (Walker & McDermott, 2021).
- **Niet kwantitatief.** De test is niet kwantitatief en geeft dus alleen een indicatie dat *L. pneumophila* serogroep 1 aanwezig of afwezig is in het geteste watermonster (Walker & McDermott, 2021).

4.3 Samenvatting van de resultaten

In onderstaande tabel zijn de kenmerken van de verschillende detectietechnieken weergegeven (Tabel 1), zoals deze in de literatuur zijn omschreven. De genoemde percentages zijn informatief, omdat het niet altijd duidelijk is hoe deze bepaald zijn en in welk type water.

Tabel 1 Overzicht van kenmerken van de verschillende methoden voor de detectie van *Legionella* spp. en *Legionella pneumophila* in water. In de tabel gebruikte referenties: ¹ (NEN-EN-ISO, 2017a); ² (Boczek et al., 2021); ³ (Petrisek & Hall, 2018); ⁴ (Spies et al., 2018); ⁵ (Sartory et al., 2017); ⁶ (Bedrina et al., 2013); ⁷ (Walker & McDermott, 2021); ⁸ (Kirschner et al., 2012); ⁹ (Baudart et al., 2015); ¹⁰ (Maio et al., 2020); ¹¹ (Ditomaso et al., 2010); ¹² (Keserue et al., 2012); ¹³ (Omiccioli et al., 2015); ¹⁴ (Rodríguez Albalat et al., 2012); ¹⁵ (Albalat et al., 2014); ¹⁶ (Párraga-Niño et al., 2018); ¹⁷ (Parthuisot et al., 2011); ¹⁸ (Ditomaso, Giacomuzzi, et al., 2015); ¹⁹ (Scaturro et al., 2016); ²⁰ (Boss et al., 2018); ²¹ (Lizana et al., 2017); ²² (Lu et al., 2011); ²³ (Reuter et al., 2020); ²⁴ (Bargellini et al., 2010); ²⁵ (Keserue et al., 2021); ²⁶ (Collins et al., 2017); ²⁷ (Toplitsch et al., 2021); ²⁸ (Allegra et al., 2011); ²⁹ (Monteiro et al., 2021); ³⁰ (McCuin et al., 2021); ³¹ (Yáñez et al., 2011); ³² (Chen & Chang, 2010); ³³ (Reuter et al., 2021); ³⁴ (Gruas et al., 2013); ³⁵ (Moreno et al., 2019); ³⁶ (Díaz-Flores et al., 2015); ³⁷ (Barrette, 2019); ³⁸ (Checa et al., 2021); ³⁹ (Rech et al., 2018). De afkortingen bij type water zijn als volgt: drinkwater (DW), oppervlaktewater (OW), (industriële) afvalwater (AW), industrieel water (IW). * oppervlaktewater zonder hoge troebelheid; ^ voor MWA-methoden in het algemeen & Gevoeligheid is de fractie van het totale aantal positieve kolonies dat correct is toegewezen als positief met de gebruikte methode; @ Specificiteit is de fractie van het totale aantal negatieve kolonies dat correct is toegewezen als negatief met de gebruikte methode; # kwantitatief maar aanbeloven als kwalitatieve methode (Ditomaso et al., 2010); \$ detectielimiet (de ondergrens van de detectiemethode, hoeveel micro-organismen nog kunnen worden aangetoond in een bepaald monstervolume) varieert en is afhankelijk van watertype en volume, dit is echter niet altijd even duidelijk weergegeven.

	Kweek			Moleculaire detectie						Immunologische detectie		
	ISO 11731	Legiolert	Amoebekweek	qPCR	Viability qPCR	LAMP	FISH	ScanVIT (FISH)	Immuno-fluorescentie	IMS	Legipid (IMS)	LFA
Analyse tijd	10 dagen	7 dagen	7 dagen	< 1 dag	< 1 dag	< 1 dag	< 2 dagen	< 3 dagen	< 1 dag	< 1 dag	< 1 dag	<
Onderzocht volume	< 1 liter	10 – 100 ml	20 ml					50 ml	< 1 liter	< 1 liter	100 ml	-
Water type	DW, OW, AW	DW, OW, AW	DW, OW, AW	DW, OW, AW	DW en OW*	DW, OW, AW	DW, OW, AW	DW, OW, AW	DW, OW	DW, OW, AW	DW, IW	DW, OW, AW
Kwantitatief	Ja ¹	Ja ^{2,3}	Nee ^{41, 42}	Ja ^{7,13,26}	Ja ^{9,20,31,32}	Ja ^{22,23}	Ja ^{22,23}	Ja ^{#10,11}	Ja ^{16,17}	Ja ^{25,37}	Ja ^{14,15}	Nee ⁷
Levende bacteriën	Ja ¹	Ja ^{2,3,4,5,7}	Ja ^{41, 42}	Ja ^{18,34}	Ja ^{19,31,32}	Ja ^{22,23}	Ja ^{22,36}	Ja ^{10,35}	Ja ^{16,17}	Ja ^{6,25,37}	Ja ^{14,15}	Ja ⁷
Dode bacteriën	Nee ^{1,7}	Nee ^{2,3,4,5}	Nee ^{41, 42}	Ja ^{18,34}	Nee ^{19,31,32}	Ja ^{22,23}	Nee ^{22,36}	Nee ^{10,11,35}	Ja ^{16,17}	Nee ^{6,25,37}	Nee ^{14,15}	Ja ⁷
VBNC	Nee ^{1,7}	Nee ^{^,7} ; niet onderzocht ²	Ja ^{41, 42}	Ja ^{18,34}	Ja ^{19,31,32}	Ja ^{22,23}	Ja ³⁶	Nee ¹⁰	Ja ¹⁶	Ja ²⁵	Ja ^{14,15}	Ja ⁷
Genomisch materiaal	Nee ¹	Nee ^{2,3,4,5}	Nee ^{41, 42}	Ja ^{18,34}	Ja ^{19,31,32}	Ja ^{22,23}	Ja ³⁶	Nee ^{10,11,35}	Nee ¹⁶	Nee ^{6,25,37}	Nee ^{14,15}	Nee ⁷
<i>Legionella</i> spp.	Ja ¹	Nee ^{2,3,4,5,40}	Ja ^{41, 42}	Ja ^{18,34}	Ja ^{19,32}	Ja ^{22,23}	Ja ^{22,36}	Ja ^{10,11}	Ja	Ja ³⁷	Ja ¹⁵	Nee ⁷
<i>L.pneumophila</i>	Ja ¹	Ja ^{2,3,4,5,40}	Ja ^{41, 42}	Ja ³⁴	Ja ^{19,31,32}	Ja ^{22,23}	Ja ^{22,36}	Ja ^{10,11}	Ja ^{16,17}	Ja ^{6,25}	Ja ^{14,15}	Ja ⁷
Gevoeligheid^{&}	99% ¹	Vergelijkbaar met standaard kweek ^{2,4,40} of (significant) hoger ^{29,40} (niet drinkwater); 84% ¹ (niet drinkwater)	-	Beter dan standaard kweek ⁷	91% ²⁰	100% ²²	-	89-91% ^{10,11}	Hoog ¹⁷	95,3-96,6% ^{6,7}	98% ¹⁴	-
Specificiteit[@]	95,3% ^{1,4}	96,4% -100% ^{2,3,4,5,39}	-	100% ^{7, 13}	97% ²⁰	91,53 – 93,33% ²²	-	-	Hoog ¹⁷	88-100% ^{6,7}	90% <i>L.spp.</i> ¹⁵ en 93% <i>L.pneumophila</i> ¹⁴	Onbekend ⁷
Detectielimiet^{\$}	>10 kve/L ⁷ 50-100 kve/L ^{1,21}	>10 kve/L ³⁰	>50 kve/L ⁴²	100 - 500 GE/L ^{7,13, 26}	80-160 GE/L ¹⁸ ; 100 cellen/L ²⁰	270 GE/L ²³	600 - 3500 kve/L ^{8,9}	20 kve/L ¹⁰	34 kve/L ¹⁷ - 70 kve/200mL ¹⁶	15 - 93 KVE/L ^{6,12, 25}	40 KVE/volume ¹⁵	100 KVE/L ⁷
Recovery	>64% ¹	70% ³⁰	-	38-75% ¹³ Extractie: 80,8 – 85% ²⁶ en 92-225% ²⁷	Zie qPCR			-	-	tot 69% ²⁵ , significant hoger dan kweek-methode ²⁸	-	-
Vals positief	3,3% ¹	0% - 4,6% ^{2,3,5,7,38,39}	-	Zeer beperkt ⁷	Ja ²¹	Ja	-	-	-	0-11,6% ^{6,7,25}	7% ¹⁴	Onbekend ⁷
Vals negatief	1,4% ¹	0-4,2% ^{2,7}	-	0% ⁷	Ja ²¹	Ja ²³	Ja ²⁴	Ja ²⁴	-	3,4-4,7% ^{6,7,25}	2% ¹⁴	Onbekend ⁷

Zoals in de eerdere paragrafen is beschreven hebben alle methoden, net als de ISO 11731, voor- en nadelen. De kenmerken van de diverse methoden staan weergegeven in tabel 1. Hieronder worden de kenmerken van deze methoden kort samengevat en vergeleken met de NEN-EN-ISO 11731. Naast de beschreven (prestatie)kenmerken van de methode is het belangrijk om de praktische haalbaarheid en continuïteit voor Legionella monitoring in drinkwater met de alternatieve methode te toetsen. In de literatuur worden ook detectiemethoden beschreven die legionellabacteriën goed kunnen detecteren, maar die in de praktijk te bewerkelijk zijn voor routine monitoring van watersystemen. Een voorbeeld hiervan is de amoebekweekmethode. Deze methode kan bijvoorbeeld wel bij bronopsporing gebruikt worden. Een wijziging van methode kan impact hebben op de bedrijfsvoering van een drinkwaterlaboratorium, zie tekstbox 6.

Kweekmethoden

Door de jaren heen zijn ontwikkelingen doorgevoerd in de NEN-EN-ISO 11731, waarbij de detectie van kweekbare *Legionella spp.* of *Legionella pneumophila* verbeterd is. Door de Nederlandse drinkwaterlaboratoria worden ook continue ontwikkelingen doorgevoerd om de detectie van Legionella te versnellen en verbeteren, zoals UV-bevestiging, Maldi-TOF en PCR bevestiging. Deze methoden zijn ook gevalideerd volgens ISO 16140-6 (NEN-EN-ISO, 2019). In Nederland is ook onderzoek uitgevoerd om aanpassingen te doen aan ISO 11731 om deze specifieker te maken voor de detectie van *Legionella pneumophila* (Veenendaal et al., 2017). In de periode 2007-2010 is binnen de normsubcommissie 'Microbiologische parameters' gewerkt aan de voorbereiding van het volgende normontwerp: Water – Detectie en telling van *Legionella pneumophila* – Methode met selectieve kweekmedia (Concept Ontwerp NEN 6253). In 2013 heeft de normsubcommissie besloten om het normontwikkelingstraject te annuleren, omdat er niet voldoende resultaten waren voor een statistische onderbouwing en er verschillen leken te zijn tussen verschillende analysemethoden. In dit besluit speelde tevens mee dat de overheid zich ging richten op *Legionella spp.* en niet specifiek op *Legionella pneumophila*. Wanneer de wetgeving de mogelijkheid biedt om in bepaalde situaties de monitoring enkel op *Legionella pneumophila* te richten zou de ontwikkeling van deze methode opnieuw kunnen worden opgepakt.

Meest waarschijnlijke aantal

Een methode die in de literatuur veel vergeleken werd met ISO 11731 was de MWA methode van Legiolert ©. Deze detectiemethode is gevalideerd en is gestandaardiseerd volgens de Franse normalisatieorganisatie (AFNOR) (van Der Wielen et al., 2021). Uit de literatuur blijkt dat deze methode *Legionella pneumophila* vergelijkbaar of beter aantoonde dan NEN-EN-ISO 11731 (Petrisek & Hall, 2018; Sartory et al., 2017; Scaturro, Buffoni, et al., 2020; Spies et al., 2018). De methode is toepasbaar op drinkwater, maar ook op water met een hoge achtergrondflora (Petrisek & Hall, 2018; Sartory et al., 2017; Scaturro, Buffoni, et al., 2020; Spies et al., 2018). De MWA methode detecteert net als de ISO 11731 kweekbare legionellabacteriën. Het drinkwatermonster wordt in z'n geheel toegevoegd aan de test, zonder

concentratiestap en voorbehandeling. Hierdoor zal er minder verlies in recovery zijn. Een ander voordeel van de methode is dat deze eenvoudig is uit te voeren en de resultaten makkelijk te interpreteren zijn. Ook al is de MWA methode sneller dan de standaard ISO 11731, de doorlooptijd is nog steeds 7 dagen. Ondanks dat er een verschil in gevoeligheid lijkt te zijn voor kwantificering werd door Petrisek and Hall (2018) geen statistisch verschil aangetoond tussen Legiolert © en ISO 11731:2004 voor drinkwater. Beide methoden lijken even gevoelig te zijn voor het bepalen van de aanwezigheid / afwezigheid van *L. pneumophila*. Ook voor niet-drinkwater werd geen statistisch verschil aangetoond en werd geconcludeerd dat beide methoden een gelijkwaardige gevoeligheid hebben (Petrisek & Hall, 2018). Ook (Rech et al., 2018) toonde een vergelijkbare gevoeligheid aan in niet-drinkwater, maar bij hogere *Legionella pneumophila* concentraties was de gevoeligheid met Legiolert © hoger. Tenslotte wordt het product Legiolert © geleverd door één leverancier en is het medium niet door de laboratoria zelf te maken. In de literatuurstudie werden geen andere MWA methoden gevonden waarbij het mogelijk is om de media zelf te produceren.

Moleculaire detectie

Internationaal is er een gestandaardiseerde methode met behulp van kwantitatieve PCR beschreven in ISO/TS 12869:2019 'Water quality – Detection and quantification of *Legionella spp.* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)'. In Nederland, is de NEN 6254+C1:2013 'Water – Detectie en kwantificering van *Legionella pneumophila* - Methode met kwantitatieve polymerase chain reaction (qPCR)' ontwikkeld. Maar ook in de literatuurstudie worden vele moleculaire detectiemethoden beschreven waarmee *Legionella spp.*, *Legionella pneumophila* of beide kan worden aangetoond. Een voordeel van moleculaire detectie is dat het een zeer snelle methode is met resultaat binnen 1 dag. Ook is de gevoeligheid en specificiteit erg hoog. In het kader van legionellapreventie, zijn alternatieve methoden voor de ISO 11731 alleen geschikt als deze methoden groei van legionella in leidingwaterinstallaties kunnen vaststellen. De aanwezigheid van legionella DNA of legionella-eiwitten geven een indicatie dat er dode of kweekbare legionellabacteriën aanwezig zijn, maar dit is niet (zonder meer) geschikt om te meten.

Uit een studie van Wullings en Van der Kooij (2006) blijkt dat het ingaande water ook al legionella-DNA bevat. Daarom kan door het richten op detectie van DNA van alle legionellasoorten, zoals een 16S-PCR, geen uitspraak worden gedaan over groei van *Legionella*. Het aantal positieve monsters met PCR is hoger in vergelijking met kweekmethoden, doordat de methode ook DNA van beschadigde, gestreste of VBNC-bacteriën die aanwezig zijn in een monster, met name in chemisch behandeld water, aantoonbaar maakt. Dit betekent onder meer dat er na desinfectie van een watersysteem nog steeds *Legionella* DNA zal worden aangetoond, waardoor niet goed beoordeeld kan worden of het beheer effectief is. Dit beperkt de bruikbaarheid van de qPCR op *Legionella spp.* De qPCR kan echter wel een interessante methode zijn wanneer deze gericht wordt op *Legionella pneumophila*, aangezien *L.*

pneumophila veel minder frequent in leidingwater voorkomt dan *Legionella spp.* (zie tekstbox 5). De methode is dan vooral bruikbaar om de afwezigheid van *L. pneumophila* aan te tonen. Collins et al. (2017) beschrijft zelfs een negatief voorspellende waarde van de qPCR voor *L. pneumophila* van 100% is. Er zijn ook aanvullingen op qPCR mogelijk waarbij onderscheid gemaakt kan worden tussen levende en dode legionellabacteriën, de zogenoemde viability-qPCR. Deze 'viability' methodes overschatten soms het aantal levende bacteriën, (Whiley & Taylor, 2016), omdat het onderscheid tussen levende en dode bacteriën niet voldoende kan worden gemaakt (Scaturro et al., 2016). Daarnaast heeft de verhouding tussen levende en dode cellen invloed op de efficiëntie van de methode (Ditommaso, Ricciardi, et al., 2015). Ook blijkt uit de praktische ervaring dat de detectiegrens van viability-qPCR hoger is ten opzichte van de qPCR en het kweken van *Legionella* uit een viability-PCR positief monster niet altijd haalbaar is.

De review van Whiley and Taylor (2016) liet duidelijk zien dat bij de kweekmethode de kans groter is om de aanwezigheid van *Legionella spp.* in watermonsters te onderschatten. Van de bijna 4000 monsters afkomstig van 28 studies werd in 72% van de monsters *Legionella* aangetoond met qPCR, terwijl dit met de kweekmethode 34% was. Eén studie rapporteerde gelijkwaardige resultaten met behulp van qPCR en kweek (Whiley & Taylor, 2016). Terwijl moleculaire methoden genomische eenheden detecteren, totaal aantal bacteriën (qPCR) of levende bacteriën (viability-qPCR), geeft de kweekmethode kolonievormende eenheden. De methoden hebben eigenlijk verschillende informatie (Lizana et al., 2017). Voor moleculaire methoden is het lastig om dit te vertalen naar het aantal kweekbare *Legionella* (Yin et al., 2022). Er zijn wel pogingen gedaan om een omrekenfactor vast te stellen tussen qPCR, viability-qPCR en cultuur (Ditommaso, Ricciardi, et al., 2015). Hierin stelden de auteurs voor om de qPCR waarde uitgedrukt in GU 28 keer te delen om een kve-schatting te verkrijgen (Ditommaso, Ricciardi, et al., 2015). Een omrekenfactor als deze vereist echter meer onderzoek om een consensus te worden (Lizana et al., 2017). Ook zal gekeken moeten worden naar een goed handelingsperspectief bij een positief qPCR signaal.

qPCR kan een rol spelen in Legionellapreventie en vroegtijdig signaleren van de aanwezigheid van *Legionella pneumophila*. De qPCR methode kan mogelijk bruikbaar zijn om trends waar te nemen. Door zeer frequent monsters te nemen kan een stijgende trend als groei worden geïnterpreteerd. Dit kan nuttig zijn om snel in te grijpen bij een stijgende trend. De bevindingen met qPCR zijn dan ook van belang voor environmental surveillance in ziekenhuizen en grote watersystemen (Yin et al., 2022).

Immunologische detectie

Immunologische detectietechnieken zijn meestal zeer snelle methoden met resultaat binnen één dag. Een ander voordeel is de hoge gevoeligheid (95,3%-98%) en specificiteit (88,4%-100%). Maar ook uit de literatuurstudie worden vele immunologische detectiemethoden beschreven waarbij *Legionella spp.*, *Legionella pneumophila* of beiden kunnen worden aangetoond. Immunologische

technieken worden gelimiteerd door de specificiteit van de gebruikte antilichamen. De IMS methode kan worden toegepast in combinatie met kweek, en kan op deze manier een goede voorbehandeling van een watermonster met veel stoorflora zijn.

Tekstbox 6 Ervaringen van Nederlandse drinkwaterlaboratoria met invoering van alternatieve methoden. Bron: de drinkwaterlaboratoria

Ervaringen van de drinkwaterlaboratoria met invoering van alternatieve methoden.

Een verandering naar een niet kweekgerelateerde analysemethode kan een behoorlijke impact hebben op de bedrijfsvoering van een laboratorium, zeker voor organisaties die de huidige flow van de productie hebben ingericht op de methode zoals beschreven in NEN-EN-ISO 11731.

Echter, wat vaststaat is dat er binnen de drinkwatersector veel waarde wordt gehecht aan betere en innovatieve analysemethoden, waarbij naast een sneller resultaat de detectie op *L. pneumophila* verbeterd kan worden. Voor elke (nieuwe) methode, mits deze niet door één leverancier wordt geleverd, geldt dat een landelijke validatie meer inzicht geeft over de betekenis van het analyseresultaat. Het advies is om bij een eventuele aanpassing van het kweekmedium en/of bij het kiezen van een andere analysemethode deze methode landelijk te laten valideren door een gerenommeerde organisatie. Daarnaast is het advies om voor deze validatie een praktijkstudie uit te voeren, waarbij als eis moet worden gesteld dat de nieuwe methode gelijkwaardig of beter *L. pneumophila* detecteert in vergelijking met de NEN-EN-ISO 11731:2017 methode. Ervaring is inmiddels dat een praktijkstudie andere inzichten geeft, omdat de validatie experimenten vaak in een laboratorium setting wordt uitgevoerd. Dit geldt zeker voor methoden die in wetenschappelijke tijdschriften zijn gepubliceerd omdat de setting waarin deze experimenten zijn uitgevoerd geheel anders kunnen zijn dan in praktijksituaties.

Een ander aspect dat door de drinkwaterlaboratoria is aangehaald betreft dat naast het kwalitatieve aspect de kosten van een analyse ook een rol spelen. De kosten voor *L. pneumophila* monitoring moet voor een organisatie die een Legionella analyse laat uitvoeren laag zijn, liefst in vergelijking met de huidige kosten van de kweekanalyse.

5 Discussie

Beschikbare methoden voor de detectie van *Legionella spp.* en/of *Legionella pneumophila* in water

De wettelijk voorgeschreven methode om *Legionella spp.* in drinkwater te bepalen is beschreven in NEN-EN-ISO 11731 (Drinkwaterbesluit). Dit is een gestandaardiseerde methode die wereldwijd gezien wordt als de gouden standaard voor de detectie van *Legionella spp.* Een belangrijk voordeel van de NEN-EN-ISO 11731:2017 is dat kweekbare legionellabacteriën worden aangetoond. Door de jaren heen zijn diverse aanpassingen en verbeteringen doorgevoerd in de ISO om de detectie van *Legionella spp.* te verbeteren in zowel drinkwater als andere watertypen. Het aantonen van legionella conform de ISO 11731 heeft echter een aantal beperkingen, zoals lange doorlooptijd van meer dan 7 dagen tot het resultaat, maskering van Legionella door bijgroei van andere micro-organismen op de agarplaten en lastig te interpreteren resultaten. Een andere beperking is verlies in opbrengst dat optreedt bij watermonsters met veel stoorflora. Dit speelt voornamelijk voor niet-drinkwater. Voor drinkwater wordt het monster veelal in behandeling genomen zonder voorbehandeling.

Uit het literatuuronderzoek blijkt dat er diverse veelbelovende detectiemethoden beschikbaar zijn voor detectie van *L. pneumophila*, *Legionella spp.* of beide. Hiervan zijn er vijf gevalideerd. Hierdoor zijn prestatiekenmerken van die methoden bekend en is aangetoond dat deze methoden gelijkwaardig of beter zijn dan ISO 11731. De gevalideerde methoden zijn gebaseerd op verschillende detectietechnieken: kweek (Legiolert®), moleculaire detectie (New Legionella *spp.* quantitative kit), combinatie kweek en moleculaire detectie (Scan-VIT-Legionella) of immunologie (Legipid® Bioalarm Legionella Assay en L.p. SG1 DETECT kit). Het kan zijn dat er ook nog andere methoden gevalideerd zijn in het buitenland dan uit deze literatuurstudie naar voren is gekomen. Bijvoorbeeld doordat deze niet zijn gepubliceerd in wetenschappelijke artikelen in de geselecteerde databases of niet in het Engels zijn gepubliceerd. Na de datum van het literatuuronderzoek kunnen ook ontwikkelingen van nieuwe methoden voor de detectie van Legionella in water hebben plaatsgevonden die mogelijk ook gevalideerd zijn. Hierdoor is het aan te bevelen om nieuwe ontwikkelingen te blijven volgen.

Methoden die zich specifiek richten op de detectie van Legionella, zoals PCR of immunologische methoden, hebben minder last van de storende effecten van andere micro-organismen dan ISO 11731 (Yanez et al., 2007). Hoewel, ook hierbij kan remming en beperkte detectiegrens optreden door aanwezige stoffen die de detectie hinderen (Yanez et al., 2007).

De meeste artikelen beschreven methoden die niet gevalideerd zijn. Voor de niet-gevalideerde methoden zijn niet alle prestatiekenmerken altijd bekend, en is het onduidelijk in hoeverre de methoden gelijkwaardig of beter zijn in het detecteren van *L. pneumophila* en/of

Legionella spp. in drinkwater dan ISO 11731. Het is noodzakelijk om aanvullend onderzoek te doen naar de prestatiekenmerken, waaronder een validatiestudie, om te onderzoeken of deze methoden als alternatief kunnen dienen voor ISO 11731. Het vergelijken van de verschillende methoden om tot een 'ideale' methode te komen is lastig, omdat hierbij verschillende factoren een rol spelen:

- Door de jaren heen zijn ontwikkelingen en verbeteringen doorgevoerd in de NEN-EN-ISO 11731 wat resulteerde in verschillende versies van ISO 11731. In de gevonden literatuur zijn de alternatieve methoden vergeleken met verschillende versies van ISO 11731 en dit kan een effect hebben op het toetsen van de gelijkwaardigheid.
- Niet voor alle detectiemethoden zijn alle prestatiekenmerken en andere eigenschappen van de methode inzichtelijk, wat vergelijken van methoden lastig maakt.
- Grote variatie in het aantal vergelijkende studies voor een andere methode ten opzichte van de referentiemethode. Enkele methoden werden slechts in één artikel vergeleken en een andere methode in 12 artikelen.
- Vergelijkingsstudies zijn voor diverse toepassingen uitgevoerd, bijvoorbeeld detectie van verschillende soorten *Legionella* of verschillende typen en hoeveelheden water.

Het is op basis van de huidige gegevens niet mogelijk om één 'ideale' methode aan te wijzen voor de detectie van *Legionella pneumophila* of *Legionella spp.* in water. Het is aan te bevelen om in gesprek met deskundigen te bepalen welke methoden het meest geschikt zijn om te gebruiken als monitoringsinstrument voor het legionellabeheer en welke voorwaarden hieraan gesteld moeten worden.

Aandachtspunten bij keuze methoden

In het rapport van Berenschot en KWR wordt aanbevolen om voor sommige prioritaire instellingen de monitoring alleen te richten op *L. pneumophila*. Mocht dit inderdaad worden toegestaan en de lijst van alle potentieel ziekmakende *Legionella spp.* naar *Legionella pneumophila* voor sommige prioritaire instellingen wordt aangepast (van Der Wielen et al., 2021), dan is het aan te bevelen om rekening te houden met de volgende aspecten:

- Detectie *L. pneumophila* vs. *Legionella spp.*
Het is aan te bevelen om een methode te gebruiken die zich enkel richt op de detectie van *Legionella pneumophila* en niet alle *Legionella* species. Anders zal om een handelingsperspectief gevraagd worden in het geval er toch andere *Legionella* species worden gevonden. Er zijn methoden die enkel *Legionella pneumophila* aantonen.
- Gelijkwaardigheid en detectielimiet
Om aan te tonen of een methode voor de detectie van *Legionella spp.* of *Legionella pneumophila* kan worden toegepast dient deze methode gelijkwaardig te zijn aan de voorgeschreven methode (NEN-EN-ISO 11731). Hiervoor wordt een validatie of verificatie uitgevoerd. Dit betekent dat de prestaties van de gevalideerde methoden in een laboratorium setting niet meer dan een bepaald percentage afwijken van de ISO 11731. De toegestane verschillen, bijvoorbeeld in de recovery, kunnen soms echter

aanzienlijk zijn terwijl de methode toch gelijkwaardig kan zijn. Voor een specifieke methode voor *Legionella pneumophila* dient deze methode *L. pneumophila* gelijkwaardig of beter te detecteren in vergelijking met de NEN-EN-ISO 11731:2017 methode. Een methode voor *Legionella spp.* dient gelijkwaardig of beter *Legionella spp.* te detecteren in vergelijking met de NEN-EN-ISO 11731:2017. Verder betekent de verklaring van gelijkwaardigheid door validatie nog niet dat middels studies is aangetoond dat er geen relevante verschillen zijn tussen de methodes in praktijksituaties. Daarom is het ook aan te bevelen om een praktijkstudie uit te voeren om meer informatie te verkrijgen zoals de recovery, de opbrengst van voorbehandelingen en het effect van stoorflora in de Nederlandse omstandigheden met natuurlijke monsters.

Een afweging die kan worden gemaakt is om *L. pneumophila* qPCR in te zetten om afwezigheid van *L. pneumophila* aan te tonen. Bij het aantonen van *L. pneumophila* middels de qPCR dient vervolgens een andere methode te worden ingezet om levende *L. pneumophila* aan te tonen.

- Toepasbaarheid op verschillende watertypen
Net als NEN-EN-ISO 11731 kunnen de verschillende detectiemethoden die in de literatuur beschreven werden, worden toegepast op verschillende watertypen, zoals drinkwater, industrieel proceswater of natuurlijke watermonsters. Echter het watertype heeft een effect op de recovery (terugvinding) van de legionellabacteriën. Hoe schoner het watermonster, hoe hoger de recovery. Wanneer het watermonster geconcentreerd en/of voorbehandeld wordt, is het noodzakelijk om de recovery van Legionella van de methode inclusief de voorbehandeling te bepalen (Inoue, 2020). Uit de literatuurstudie kon de recovery niet voor alle detectiemethoden worden achterhaald. Ook het effect van de verschillende voorbehandelingen per methode op de recovery was niet altijd bekend. Het is daarom aan te bevelen om de recovery voor de verschillende matrices te bepalen met de bijbehorende voorbehandelingen en/of concentratiemethoden. Methoden zonder concentratiestap en/of voorbehandeling, zoals de MWA methode, hebben dit probleem niet.
- Onderscheid tussen dode en levende legionellabacteriën voor de toepasbaarheid na uitvoeren desinfectie of correctieve maatregelen
In monsters die kort na een chemische of thermische desinfectie worden genomen kan veel legionella-DNA worden aangetoond. Het is immers de bedoeling legionellabacteriën te inactiveren waardoor het DNA vrijkomt en uit de literatuurstudie blijkt dat het DNA nog weken aanwezig kan blijven. Een gevolg kan zijn dat je na het nemen van maatregelen om de verhoogde concentratie te verwijderen meer legionella DNA aantoot. Dit maakt methoden die dode Legionella aantonen minder geschikt voor gebruik na desinfecterende maatregelen. Het is nog onduidelijk hoe lang na het nemen van deze desinfecterende maatregelen een overschatting van het aantal legionellabacteriën aanhoudt door de aanwezigheid van DNA van dode bacteriën. Daarnaast zijn er ook methoden die continu desinfecterende stoffen toevoegen aan het drinkwater zoals bij koper-

zilverionisatie. Ook hier kan legionella-DNA worden aangetoond en is niet met zekerheid vast te stellen dat het alleen om dode bacteriën gaat. Bij voorkeur wordt voor herbemonsteringen of bij gebruik van desinfecterende technieken gebruikgemaakt van methoden die levende *Legionella* aantonen.

- Praktische haalbaarheid en kosten
Een afweging van de kosten (investeringen/materiaal/tijd/ impact te bemonsteren locatie) en baten (inzicht krijgen of er *L. pneumophila* aanwezig is en zo ja of groei wordt beheerst) is van belang in de keuze om een geschikte methode te kunnen toepassen. De praktische haalbaarheid om een methode in een laboratorium te kunnen uitvoeren met de te onderzoeken monsters en monsterstroom is essentieel. Daarnaast is het van belang dat continuïteit van een detectiemethode kan worden gegarandeerd, waarbij de laboratoria hebben aangegeven dat het niet wenselijk is om afhankelijk te zijn van één leverancier. Dit kan betekenen dat een methode een zeer goed alternatief kan zijn op basis van gelijkwaardigheid, maar dat het (bijna) niet mogelijk is om deze methode te implementeren vanwege bijvoorbeeld kosten, continuïteit of doorstromingsnelheid van monsters.
- Rol van VBNC
Legionella kan onder bepaalde omstandigheden een VBNC stadium ingaan, waardoor de bacterie met verschillende detectiemethoden gemist wordt, bijvoorbeeld NEN-EN-ISO 11731 of MWA. Echter, de legionellabacteriën in de VBNC toestand zijn mogelijk nog wel infectieus en kunnen onder gunstige condities uitgroeien in de installatie. Na desinfectie van een watersysteem kan de aanwezigheid van VBNC's leiden tot snelle groei en daarmee terugkeer van legionellabacteriën in het systeem. Daarom is het gunstig wanneer een methode naast kweekbare bacteriën ook *Legionella* VBNC's kan aantonen. Echter, een dergelijke methode toont vaak ook dode *Legionella* aan waardoor interpretatie van de resultaten lastig is. Totdat een goed onderscheid mogelijk is tussen dood en levend kan deze eigenschap niet worden meegewogen.
- Mogelijkheid tot typering van isolaten
Het is een pré wanneer met een detectiemethode de gevonden legionellabacteriën verder kunnen worden getypeerd. Op deze manier kunnen isolaten uit klinische en omgevingsmonsters worden vergeleken en bijdragen aan bijvoorbeeld bronopsporing bij epidemiologische uitbraken (Rech et al., 2018). Echter, de bemonstering zoals genoemd in de Regeling Legionellapreventie in drinkwater en warm tapwater wordt alleen gezien als indicator voor de uitvoering van het legionellabeheer en is dus geen voorwaarde voor routine monitoring van drinkwatersystemen.

Gevolgen voor de regelgeving:

- Differentiatie tussen prioritaire instellingen
In het evaluatierapport van Berenschot en KWR adviseren de auteurs om de regelgeving en het beheersplan voor een aantal prioritaire instellingen te richten op *Legionella pneumophila*, terwijl voor locaties waar veel mensen met een ernstig verzwakt

immuunsysteem voorkomen ('prioritaire zorginstellingen'¹), wordt geadviseerd om de monitoring te blijven richten op alle *Legionella species* (van Der Wielen et al., 2021). Hieruit volgt dat voor de 'prioritaire zorginstellingen' de huidige norm van < 100 kve/L wordt behouden en de ISO 11731 (of een vergelijkbare gevalideerde methode) de detectiemethode blijft. Voor de andere prioritaire instellingen zal een andere omschrijving van de norm moeten worden gemaakt (zie volgende punt). Er dient wel een duidelijke omschrijving te komen welke prioritaire instellingen onder welke categorie vallen, en of er ook binnen één prioritaire instelling nog een verschillende keuze voor detectie gemaakt kan worden kunnen zijn.

- Aanpassen van de norm voor sommige prioritaire instellingen
In het Drinkwaterbesluit is opgenomen dat de norm voor drinkwater en warm tapwater < 100 kve/L is. In de '[Regeling legionellapreventie in drinkwater en warm tapwater](#)' is in artikel 4, lid 1, een lijst met ziekmakende legionellasoorten opgenomen waarvoor de norm van < 100 kve/L geldt (IenW, 2019). Voor zover bekend beperkt geen enkel laboratorium zich tot deze legionellasoorten maar worden watermonsters op *Legionella spp.* geanalyseerd. Dit betekent dat met de methode in de huidige wetgeving het voor bepaalde prioritaire instellingen nog niet mogelijk is om alleen *Legionella pneumophila* te onderzoeken. Daarnaast worden alleen met de kweekmethoden die gebruik maken van voedingsbodems het aantal kve bepaald. Andere detectietechnieken geven Legionella weer in MWA (Legiolert ©), genoomeenheden (moleculairbiologische technieken) of legionellacellen (immunologische detectie). Dit is niet hetzelfde als het aantal kve en dus niet conform de huidige regelgeving. Mogelijk dat met een omrekenfactor het aantal kve kan worden vastgesteld, alleen is hiervoor aanvullend onderzoek voor nodig. Ook zou verder nagegaan moeten worden of een aanpassing in de wetgeving een oplossing kan zijn om andere detectiemethoden te kunnen toepassen die gelijkwaardig of beter zijn dan NEN-EN-ISO 11731. Hierbij kan bijvoorbeeld gedacht worden aan:
 - aanpassen van kolonievormende eenheden naar (levende of kweekbare) legionellabacteriën;
 - bepalen van de *afwezigheid* van *Legionella pneumophila* in een bepaald volume drinkwater in plaats van het aantal *Legionella pneumophila* in drinkwater als indicatie voor het beheer van de installatie.
 - aanpassen van de omschrijving 'aantonen van minder dan 100 kve/L' naar 'afwezigheid bij een minimale detectielimiet' per detectiemethode, ook wel een onderste analysegrens genoemd. De verschillende methoden hebben een andere detectielimiet waarbij verschillende eenheden worden gedetecteerd. Hierdoor kan de norm van '100' niet voor alle detectiemethoden worden behouden.

¹ Nog nader te specificeren welke (zorg)instellingen hieronder vallen. Voor de leesbaarheid is er voor gekozen de algemene term 'prioritaire zorginstellingen' te gebruiken.

Monstername

Of er *Legionella (pneumophila)* wordt aangetoond hangt naast een goede detectiemethode en een deskundig laboratorium ook af van de locatie waar het monster wordt genomen, hoe het monster wordt genomen en de kwaliteit en frequentie van monstername. Legionellabacteriën in leidingwaterinstallaties zijn niet homogeen verdeeld in het water (National Academies of Sciences, 2020). De bacteriën vermeerderen zich in protozoa en bevinden zich veelal in de biofilm (Abu Khweek & Amer, 2018; Shen et al., 2015). Delen van de biofilm met legionellabacteriën kunnen, bijvoorbeeld door verandering in de waterflow, loslaten en uiteindelijk worden verneveld (Abu Khweek & Amer, 2018; Shen et al., 2015). Hierdoor is de monstername een momentopname; zeker aangezien voor de meeste beheersplannen een halfjaarlijkse monsterfrequentie geldt. Het aantonen van legionellabacteriën in het kader van legionellapreventie dient daarom gezien te worden als een indicatie of het beheer correct wordt uitgevoerd. Het kan ook niet los gezien worden van het legionella-beheersplan: het is alleen een controlemaatregel voor het beheer. Het uitvoeren van correct beheer bij prioritaire instellingen dient centraal te staan, ongeacht of een bemonstering positief of negatief is. Het aantal *Legionella* dat wordt aangetoond is niet direct te relateren aan het gezondheidsrisico. Er wordt frequent *Legionella* aangetoond bij een routinecontrole van een locatie, maar het is uitzonderlijk dat er vervolgens ook patiënten worden gemeld die aan de installatie te relateren zijn. In het huidige monsternameprotocol (NEN-EN-ISO 19458 'Water quality – Sampling for microbiological analysis') wordt de eerste liter weggespoeld. De manier van monstername in Nederland wijkt met deze werkwijze af van de monstername in andere landen (Rhoads et al., 2022). Zoals verwoord in het rapport van Berenschot/KWR is er juist mogelijkheid voor legionellagroei en -blootstelling in deze laatste liter. Het is daarom aan te bevelen om ook een deel van de eerste liter ook te bemonsteren (Rhoads et al., 2022). Aanvullend kan nog beter inzicht in mogelijke aanwezigheid van *Legionella (pneumophila)* worden verkregen als de doucheslang wordt gewabt aangezien dan ook de biofilm wordt meegenomen (Shen et al., 2015). In een overzichtsstudie van Pereira et al. (2021) wordt het monitoren met steriele swabs ook toegelicht. Dergelijke voorschriften voor monstername dienen te worden uitgewerkt in een update van het monsternameprotocol.

6 Conclusie en aanbevelingen

In deze studie worden veelbelovende detectiemethoden voor *Legionella spp.* en specifiek *L. pneumophila* beschreven, maar er is er niet één die er in positieve zin bovenuit springt. Het is niet mogelijk om op basis van deze literatuurstudie één detectiemethode aan te wijzen die het meest geschikt is voor de detectie van *Legionella spp.* of in het bijzonder voor *L. pneumophila*. Maar het gegeven overzicht met de aandachtspunten kan bijdragen aan de selectie van potentiële detectiemethoden en aan de voorwaarden die gesteld moeten worden voor het toepassen van deze methoden.

Het is wettelijk toegestaan om een andere detectiemethode dan NEN-EN-ISO 11731 te gebruiken wanneer gelijkwaardigheid is aangetoond volgens NEN-EN-ISO 13843:2017 of de NEN-EN-ISO 16140 serie. Dit komt er in de praktijk op neer dat een detectiemethode gevalideerd dient te zijn en voordat deze in gebruik wordt genomen door een laboratorium geverifieerd dient te worden. In het Drinkwaterbesluit is vastgesteld dat de norm voor drinkwater en warm tapwater < 100 kve legionellabacteriën per liter is. In de 'Regeling legionellapreventie in drinkwater en warm tap water' is aangewezen dat dit geldt voor een lijst van een aantal ziekmakende legionellasoorten. In de praktijk betekent dit dat er gekeken wordt naar *Legionella spp.* omdat er geen methode is die alleen naar die soorten kijkt. Dit betekent dat één methode kolonievormende legionellabacteriën moet aantonen en niet alleen *Legionella pneumophila*. Echter, veel detectiemethoden bepalen geen kve/L. Hierdoor zal er onderzoek gedaan moeten worden naar de omrekenfactor of besloten moeten worden geen eenheid op te nemen in de regelgeving. Er kan bijvoorbeeld voor gekozen worden om voor sommige prioritaire instellingen in de regelgeving op te nemen dat evaluatie van het beheer moet worden uitgevoerd indien *L. pneumophila* aanwezig is. Hiervoor moet worden verkend of dit in de wetgeving kan worden gewijzigd.

Een voorwaarde voor toepassen van een alternatieve methode is dat de methode gevalideerd en geverifieerd is. Door het zorgvuldig formuleren van bredere eisen waaraan methodes moeten voldoen is het mogelijk dat verschillende detectiemethodes naast elkaar gebruikt kunnen worden, en kunnen ook toekomstige innovaties worden gebruikt wanneer deze voldoen aan de eisen. Daarnaast hebben de waterlaboratoria aangegeven dat hun voorkeur uitgaat naar een methode die niet door één leverancier kan worden geleverd. Het dient ook een methode te zijn die goed en zonder veel extra kosten geïmplementeerd kan worden in de verschillende laboratoria.

Voor prioritaire instellingen waar veel mensen met een ernstig verzwakt immuunsysteem verblijven wordt door Berenschot en KWR geadviseerd te blijven monitoren op *Legionella spp.* Wanneer voor de verschillende prioritaire (zorg)instellingen verschillende methoden worden geselecteerd is het belangrijk om helder te krijgen in hoeverre deze vergelijkbaar zijn. Zowel validatie als een aanvullend praktijkonderzoek van alternatieve methoden is noodzakelijk om de prestatiekenmerken, zoals juistheid, detectielimiet en reproduceerbaarheid voor een bepaald

watertype te kunnen vaststellen. Hierdoor kan de beoogde veiligheid worden geborgd.

Aanbevelingen beleid

- Op basis van de literatuurstudie kan geen bepaalde 'alternatieve' detectiemethoden voor *Legionella pneumophila* of *Legionella spp.* worden aanbevolen. Wel is het aan te bevelen dat in de regelgeving de mogelijkheid blijft bestaan om een andere methode te gebruiken die gelijkwaardig of beter is dan de NEN-EN-ISO 11731, mits deze gevalideerd is.
- Indien voor sommige prioritairere locaties de monitoring enkel op *L. pneumophila* gericht is, heeft het de voorkeur dat het water ook alleen hierop wordt onderzocht. Echter wanneer in deze locaties toch *Legionella spp.* wordt aangetoond anders dan *L. pneumophila* is het aan te bevelen een handelingsperspectief te bieden over benodigde maatregelen en acties.
- De regelgeving is momenteel gebaseerd op de detectie van kolonievormende legionellabacteriën (kve). De literatuurstudie laat zien dat er naast de ISO 11731 verschillende gevalideerde detectietechnieken zijn maar deze methoden tonen geen kve/L aan. Het is daarom aan te bevelen bij voorbaat te onderzoeken hoe de juridische omschrijving in de regelgeving kan worden aangepast zodat er ruimte is voor nieuwe methoden waarbij ook de kwaliteit voldoende wordt geborgd; gelijkwaardig of beter aan NEN-EN-ISO 11731. In deze literatuurstudie zijn voorwaarden opgenomen waarmee andere detectiemethoden in de regelgeving kunnen worden opgenomen, zoals formulering van eisen aan de minimale detectiegrens.
- Overleg met de (drinkwater)laboratoria en deskundigen welke methoden het beste kunnen worden geïmplementeerd. Het voorbereidende werk voor een dergelijk overleg zou kunnen plaatsvinden in de NEN Normcommissie 'Microbiologische parameters' of de contactgroep Biologie.

Aanbevelingen onderzoek

- Een duidelijke vertaling (conversiefactor) van resultaten met moleculairbiologische detectiemethoden naar het aantal kweekbare Legionellabacteriën ontbreekt. Verder onderzoek is nodig naar een omrekenfactor voor het vergelijken van de resultaten met de in de wetgeving genoemde kve, als kve in de wetgeving blijft bestaan.
- Het is noodzakelijk om naast de prestatiekenmerken, zoals omschreven voor validatie of verificatie, ook nader onderzoek wordt uitgevoerd om meer informatie te verkrijgen over de vergelijkbaarheid van methoden bijvoorbeeld over de recovery, effect van voorbehandelingen en detectielimiet.

Dankwoord

Wij willen graag Adrie Atsma (Vitens), Rik de Vries (WLN) en Esther van Harmelen-Vrins (RPS) bedanken voor hun bijdrage over de ervaringen vanuit de drinkwaterlaboratoria. Ook willen we Laura Mout (NEN) bedanken voor haar bijdrage aan de achtergrondinformatie over (inter)nationale normen voor Legionella detectie in water en validatie en verificatie (hoofdstuk 2). Wilma Jacobs en Kirsten Mooijman (RIVM) willen we bedanken voor het reviewen van de informatie over validatie en verificatie. Tot slot bedanken we ook Ingmar Janse, Melissa Stunnenberg en Robin van Leerdam (RIVM) voor het reviewen van het rapport.

Literatuur

- Abu Khweek, A., & Amer, A. O. (2018). Factors mediating environmental biofilm formation by *Legionella pneumophila*. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 8(FEB). <https://doi.org/10.3389/fcimb.2018.00038>
- Albalat, G. R., Broch, B. B., Bono, M. J., & Chen, Y. (2014). Method modification of the legipid® *Legionella* fast detection test kit: Performance Tested MethodSM 111101. *Journal of AOAC International*, 97(5), 1403-1409. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.14-029>
- Allegra, S., Girardot, F., Grattard, F., Berthelot, P., Helbig, J. H., Pozzetto, B., & Riffard, S. (2011). Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve *Legionella pneumophila* serogroup 1 recovery from environmental samples. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), 952-961. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04955.x>
- Arvand, M., Jungkind, K., & Hack, A. (2011). Contamination of the cold water distribution system of health care facilities by *Legionella pneumophila*: Do we know the true dimension? *Eurosurveillance*, 16(16), 19844. <https://doi.org/doi:https://doi.org/10.2807/ese.16.16.19844-en>
- Bargellini, A., Marchesi, I., Leoni, E., Mansi, A., Cristino, S., Marcelloni, A. M., & Borella, P. (2010). Inter-laboratory validation of a rapid assay for the detection and quantification of *Legionella* spp. in water samples. *Letters in Applied Microbiology*, 51(4), 421-427. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02910.x>
- Barrette, I. (2019). Comparison of legiolert and a conventional culture method for detection of *legionella pneumophila* from cooling towers in Québec. *Journal of AOAC International*, 102(4), 1235-1240. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.18-0245>
- Baudart, J., Guillaume, C., Mercier, A., Lebaron, P., & Binet, M. (2015). Rapid quantification of viable *Legionella* in nuclear cooling tower waters using filter cultivation, fluorescent in situ hybridization and solid-phase cytometry. *Journal of Applied Microbiology*, 118(5), 1238-1249. <https://doi.org/10.1111/jam.12783>
- Bedrina, B., Macián, S., Solís, I., Fernández-Lafuente, R., Baldrich, E., & Rodríguez, G. (2013). Fast immunosensing technique to detect *Legionella pneumophila* in different natural and anthropogenic environments: comparative and collaborative trials. *BMC Microbiol*, 13, 88. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-88>
- Boczek, L. A., Tang, M., Formal, C., Lytle, D., & Ryu, H. (2021). Comparison of two culture methods for the enumeration of *Legionella pneumophila* from potable water samples. *Journal of Water and Health*, 19(3), 468-477. <https://doi.org/10.2166/WH.2021.051>
- Boss, R., Baumgartner, A., Kroos, S., Blattner, M., Fretz, R., & Moor, D. (2018). Rapid detection of viable *Legionella pneumophila* in tap water by a qPCR and RT-PCR-based method. *Journal of Applied Microbiology*, 125(4), 1216-1225. <https://doi.org/10.1111/jam.13932>

- Checa, J., Carbonell, I., Manero, N., & Martí, I. (2021). Comparative study of Legiolert with ISO 11731-1998 standard method- conclusions from a Public Health Laboratory. *Journal of Microbiological Methods*, 186. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2021.106242>
- Chen, N. T., & Chang, C. W. (2010). Rapid quantification of viable legionellae in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR: ORIGINAL ARTICLE. *Journal of Applied Microbiology*, 109(2), 623-634. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2010.04678.x>
- Collins, S., Jorgensen, F., Willis, C., & Walker, J. (2015). Real-time PCR to supplement gold-standard culture-based detection of Legionella in environmental samples. *Journal of Applied Microbiology*, 119(4), 1158-1169. <https://doi.org/10.1111/jam.12911>
- Collins, S., Stevenson, D., Walker, J., & Bennett, A. (2017). Evaluation of Legionella real-time PCR against traditional culture for routine and public health testing of water samples. *Journal of Applied Microbiology*, 122(6), 1692-1703. <https://doi.org/10.1111/jam.13461>
- Díaz-Flores, A., Montero, J. C., Castro, F. J., Alejandres, E. M., Bayón, C., Solís, I., Fernández-Lafuente, R., & Rodríguez, G. (2015). Comparing methods of determining Legionella spp. in complex water matrices. *BMC Microbiology*, 15(1). <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0423-7>
- Ditommaso, S., Giacomuzzi, M., Gentile, M., & Zotti, C. M. (2010). Evaluation of the usefulness of a new direct immunofluorescence assay (ScanVIT-Legionella™) for monitoring hospital water systems contaminated with Legionella spp. *Letters in Applied Microbiology*, 50(4), 341-346. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02797.x>
- Ditommaso, S., Giacomuzzi, M., Ricciardi, E., & Zotti, C. M. (2015). Viability-qPCR for detecting Legionella: Comparison of two assays based on different amplicon lengths. *Molecular and Cellular Probes*, 29(4), 237-243. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2015.05.011>
- Ditommaso, S., Ricciardi, E., Giacomuzzi, M., Arauco Rivera, S. R., Ceccarelli, A., & Zotti, C. M. (2014). Overestimation of the Legionella spp. load in environmental samples by quantitative real-time PCR: Pretreatment with propidium monoazide as a tool for the assessment of an association between Legionella concentration and sanitary risk. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 80(4), 260-266. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2014.09.010>
- Ditommaso, S., Ricciardi, E., Giacomuzzi, M., Arauco Rivera, S. R., & Zotti, C. M. (2015). Legionella in water samples: How can you interpret the results obtained by quantitative PCR? *Molecular and Cellular Probes*, 29(1), 7-12. <https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.09.002>
- Eble, D., Gehrig, V., Schubert-Ullrich, P., Köppel, R., & Fuchsli, H. P. (2021). Comparison of the culture method with multiplex PCR for the confirmation of Legionella spp. and Legionella pneumophila. *Journal of Applied Microbiology*, 131(5), 2600-2609. <https://doi.org/10.1111/jam.15103>

- Edagawa, A., Kimura, A., Kawabuchi-Kurata, T., Adachi, S., Furuhashi, K., & Miyamoto, H. (2015). Investigation of legionella contamination in bath water samples by culture, amoebic co-culture, and real-time quantitative PCR methods. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 12(10), 13118-13130. <https://doi.org/10.3390/ijerph121013118>
- Falzone, L., Gattuso, G., Lombardo, C., Lupo, G., Grillo, C. M., Spandidos, D. A., Libra, M., & Salmeri, M. (2020). Droplet digital PCR for the detection and monitoring of Legionella pneumophila. *International Journal of Molecular Medicine*, 46(5), 1777-1782. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2020.4724>
- Faria-Ramos, I., Cardoso, A., Costa-De-Oliveira, S., Santos-Antunes, J., Barbosa, J., Rodrigues, A. G., & Pina-Vaz, C. (2011). Legionella pneumophila detection and viability evaluation by flow cytometry [Conference Abstract]. *Clinical Microbiology and Infection*, 17, S736. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03559.x>
- Füchslin, H. P., Kötzsch, S., Keserue, H. A., & Egli, T. (2010). Rapid and quantitative detection of Legionella pneumophila applying immunomagnetic separation and flow cytometry. *Cytometry Part A*, 77(3), 264-274. <https://doi.org/10.1002/cyto.a.20858>
- Gruas, C., Álvarez, I., Lara, C., García, C. B., Savva, D., & Arruga, M. V. (2013). Identification of Legionella spp. in Environmental Water Samples by ScanVIT-Legionella™ Method in Spain. *Indian Journal of Microbiology*, 53(2), 142-148. <https://doi.org/10.1007/s12088-013-0363-6>
- Guillemet, T. A., Lévesque, B., Gauvin, D., Brousseau, N., Giroux, J. P., & Cantin, P. (2010). Assessment of real-time PCR for quantification of Legionella spp. in spa water. *Letters in Applied Microbiology*, 51(6), 639-644. <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2010.02947.x>
- Hirsh, M., Baron, J. L., Mietzner, S., Rihs, J. D., & Stout, J. E. (2021). Cross-reactivity of the IDEXX Legiolert method with other Gram-negative bacteria and waterborne pathogens leads to false-positive assay results. *Letters in Applied Microbiology*, 72(6), 750-756. <https://doi.org/10.1111/lam.13469>
- Inoue, H. (2020). Interpreting the results of the conventional plate culture and gene detection methods for legionella detection in environmental water samples. *Biocontrol Science*, 25(3), 121-129. <https://doi.org/10.4265/BIO.25.121>
- İslam, A., Güvenir, M., Süer, K., Çetiner, S., & Şanlıdağ, T. (2017). Comparing efficiency between conventional and molecular methods for detecting Legionella pneumophila in dental unit waterline systems. *Polish Journal of Environmental Studies*, 26(3), 1419-1423. <https://doi.org/10.15244/pjoes/67368>
- ISO (1998). ISO 11731:1998 'Water – Detectie en telling van Legionella'.
- ISO (2004). ISO 11731-2:2004 'Water quality – Detection and enumeration of Legionella – Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts'.
- ISO/TS (2019). ISO/TS 12869:2019 'Water quality - Detection and quantification of Legionella spp. and/or Legionella pneumophila by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)'.

- Keserue, H. A., Baumgartner, A., Felleisen, R., & Egli, T. (2012). Rapid detection of total and viable *Legionella pneumophila* in tap water by immunomagnetic separation, double fluorescent staining and flow cytometry. *Microbial Biotechnology*, 5(6), 753-763. <https://doi.org/10.1111/j.1751-7915.2012.00366.x>
- Keserue, H. A., Cornillie, N., Ehlert, A. K., Mills, D. C., Morger, D., Piffaretti, A., Schaffhauser, D. F., & Schwyzer, I. I. (2021). Validation of the *Legionella pneumophila* SG1 DETECT Kit for Quantification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 Bacteria in Potable Waters, Process Waters, and Surface Waters: AOAC Performance Tested Method SM 052002. *Journal of AOAC International*, 104(3), 776-789. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsaa126>
- Kirschner, A. K. T., Rameder, A., Schrammel, B., Indra, A., Farnleitner, A. H., & Sommer, R. (2012). Development of a new CARD-FISH protocol for quantification of *Legionella pneumophila* and its application in two hospital cooling towers. *Journal of Applied Microbiology*, 112(6), 1244-1256. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05289.x>
- Krøjgaard, L. H., Krogfelt, K. A., Albrechtsen, H. J., & Uldum, S. A. (2011). Detection of *Legionella* by quantitative-polymerase chain reaction (qPCR) for monitoring and risk assessment. *BMC Microbiology*, 11. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-254>
- LeChevallier, M. W. (2019). Monitoring distribution systems for *Legionella pneumophila* using Legiolert. *AWWA Water Science*, 1(1), e1122. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/aws2.1122>
- Lee, J. V., Lai, S., Exner, M., Lenz, J., Gaia, V., Casati, S., Hartemann, P., Lück, C., Pangon, B., Ricci, M. L., Scaturro, M., Fontana, S., Sabria, M., Sánchez, I., Assaf, S., & Surman-Lee, S. (2011). An international trial of quantitative PCR for monitoring *Legionella* in artificial water systems. *Journal of Applied Microbiology*, 110(4), 1032-1044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.04957.x>
- Li, H., Xin, H., & Li, S. F. Y. (2015). Multiplex PMA-qPCR Assay with Internal Amplification Control for Simultaneous Detection of Viable *Legionella pneumophila*, *Salmonella typhimurium*, and *Staphylococcus aureus* in Environmental Waters. *Environmental Science and Technology*, 49(24), 14249-14256. <https://doi.org/10.1021/acs.est.5b03583>
- Lizana, X., López, A., Benito, S., Agustí, G., Ríos, M., Piqué, N., Marqués, A. M., & Codony, F. (2017). Viability qPCR, a new tool for *Legionella* risk management. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 220(8), 1318-1324. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2017.08.007>
- Lu, X., Mo, Z. Y., Zhao, H. B., Yan, H., & Shi, L. (2011). LAMP-based method for a rapid identification of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 92(1), 179-187. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3496-8>
- Maio, S. D., Messina, G., Burgassi, S., Cardaci, R., Amodeo, D., Marco, F. D., Serafini, A., & Lenzi, D. (2020). Rapid detection of *Legionella* spp in water samples by ScanVIT method: comparison of acid vs heat treatment. *Annali di Igiene Medicina Preventiva e di Comunità*, 32(6), 635-647. <https://doi.org/10.7416/ai.2020.2385>

- McCuin, R. M., Bartrand, T. A., & Clancy, J. L. (2021). Legionella pneumophila recovery using Legiolert and a traditional culture method. *AWWA Water Science*, 3(3), e1228.
<https://doi.org/https://doi.org/10.1002/aws2.1228>
- Ministerie van Infrastructuur en Waterstaat (IenW) (2019). Regeling legionellapreventie in drinkwater en warm tapwater. BWBR0030166
<https://wetten.overheid.nl/BWBR0030166/2019-01-01/0/informatie>
- Monteiro, S. N., Robalo, A. M., & Santos, R. J. (2021). Evaluation of Legiolert™ for the Detection of Legionella pneumophila and Comparison with Spread-Plate Culture and qPCR Methods. *Current Microbiology*, 78(5), 1792-1797.
<https://doi.org/10.1007/s00284-021-02436-6>
- Moreno, Y., Moreno-Mesonero, L., & García-Hernández, J. (2019). DVC-FISH to identify potentially pathogenic Legionella inside free-living amoebae from water sources. *Environmental Research*, 176. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2019.06.002>
- National Academies of Sciences, E., and Medicine. (2020). *Management of Legionella in Water Systems*. The National Academies Press.
<https://doi.org/http://doi.org/10.17226/25474>
- NEN-EN-ISO (1985). NEN-EN-ISO 7704:1985 'Water quality – Requirements for the performance testing of membrane filters used for direct enumeration of microorganisms by culture methods'.
- NEN-EN-ISO (2003). NEN-EN-ISO 16140:2003 'Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods'.
- NEN-EN-ISO (2007). NEN-EN-ISO 19458:2007 'Water quality – Sampling for microbiological analysis'.
- NEN-EN-ISO (2008). NEN-EN-ISO 11731-2:2008 'Water – Detectie en telling van Legionella - Deel 2: Directe membraanfiltratiemethode voor water met een laag bacteriegehalte'.
- NEN-EN-ISO (2014a). NEN-EN-ISO 11133:2014 'Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media'.
- NEN-EN-ISO (2014b). NEN-EN-ISO 17994:2014 'Water quality - Requirements for the comparison of the relative recovery of microorganisms by two quantitative methods'.
- NEN-EN-ISO (2016). NEN-EN-ISO 16140-2:2016 'Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method'.
- NEN-EN-ISO (2017a). NEN-EN-ISO 11731:2017 'Water quality - Enumeration of Legionella'.
- NEN-EN-ISO (2017b). NEN-EN-ISO 13843:2017 'Water quality – Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods'.
- NEN-EN-ISO (2018). NEN-EN-ISO 8199:2018 'Water quality – General requirements and guidance for microbiological examinations by culture'.

- NEN-EN-ISO (2019). NEN-EN-ISO 16140-6: 2019 'Microbiology of the food chain — Method validation — Part 6: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods for microbiological confirmation and typing procedures'.
- NEN-EN-ISO (2020). NEN-EN-ISO 16140-4: 2020 'Microbiology of the food chain — Method validation — Part 4: Protocol for method validation in a single laboratory'.
- NEN-EN-ISO (2022). NPR 7394:2022 'Water – Algemene principes bij kwaliteitsborging van moleculairbiologisch onderzoek voor micro-organismen en environmental DNA'.
- NEN (2007). NEN 6265:2007 'Water – Detectie en telling van Legionella'.
- NEN (2013). NEN 6254+C1:2013 "Water – Detectie en kwantificering van Legionella pneumophila - Methode met kwantitatieve polymerase chain reaction (qPCR)".
- NEN (2014). NPR 6266:2014 'Water – Toelichting bij de detectie van Legionella volgens NEN 6265'.
- NEN (2019). NPR 6278:2019 'Water – Toelichting bij de telling van Legionella volgens NEN-EN-ISO 11731'.
- Omiccioli, E., Schiavano, G. F., Ceppetelli, V., Amagliani, G., Magnani, M., & Brandi, G. (2015). Validation according to ISO/TS 12869:2012 of a molecular method for the isolation and quantification of legionella spp. in water. *Molecular and Cellular Probes*, 29(2), 86-91.
<https://doi.org/10.1016/j.mcp.2014.12.004>
- Párraga-Niño, N., Quero, S., Ventós-Alfonso, A., Uria, N., Castillo-Fernandez, O., Ezenarro, J. J., Muñoz, F. X., Garcia-Nuñez, M., & Sabrià, M. (2018). New system for the detection of Legionella pneumophila in water samples. *Talanta*, 189, 324-331.
<https://doi.org/10.1016/j.talanta.2018.07.013>
- Parthuisot, N., Binet, M., Touron-Bodilis, A., Pougard, C., Lebaron, P., & Baudart, J. (2011). Total and viable Legionella pneumophila cells in hot and natural waters as measured by immunofluorescence-based assays and solid-phase cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 77(17), 6225-6232.
<https://doi.org/10.1128/AEM.00393-11>
- Pereira, A., Silva, A. R., & Melo, L. F. (2021). Legionella and Biofilms-Integrated Surveillance to Bridge Science and Real-Field Demands. *Microorganisms*, 9(6).
<https://doi.org/10.3390/microorganisms9061212>
- Petrisek, R., & Hall, J. (2018). Evaluation of a most probable number method for the enumeration of Legionella pneumophila from North American potable and nonpotable water samples. *Journal of Water and Health*, 16(1), 57-69.
<https://doi.org/10.2166/wh.2017.118>
- Qin, T., Tian, Z., Ren, H., Hu, G., Zhou, H., Lu, J., Luo, C., Liu, Z., & Shao, Z. (2012). Application of EMA-qPCR as a complementary tool for the detection and monitoring of Legionella in different water systems. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(5), 1881-1890. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0986-x>
- Rech, M. M., Swalla, B. M., & Dobranic, J. K. (2018). Evaluation of Legiolert for Quantification of Legionella pneumophila from Non-potable Water. *Current Microbiology*, 75(10), 1282-1289.
<https://doi.org/10.1007/s00284-018-1522-0>

- Reukers, D. F. M. L., van Asten, L., Brandsema, P., Dijkstra, F., Donker, G. A., van Gageldonk-Lafeber, B., Hooiveld, M., de Lange, M. M. A., Marbus, S., Teirlinck, A. C., Meijer, A., & van der Hoek, W. (2018). *Surveillance van griep en andere luchtweginfecties: winter 2017/2018*.
- Reuter, C., Hentschel, S., Breitenstein, A., Heinrich, E., Aehlig, O., Henkel, T., Csáki, A., & Fritzsche, W. (2021). Chip-based duplex real-time PCR for water quality monitoring concerning *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. *Water and Environment Journal*, *35*(1), 371-380. <https://doi.org/10.1111/wej.12635>
- Reuter, C., Slesiona, N., Hentschel, S., Aehlig, O., Breitenstein, A., Csáki, A., Henkel, T., & Fritzsche, W. (2020). Loop-mediated amplification as promising on-site detection approach for *Legionella pneumophila* and *Legionella* spp. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *104*(1), 405-415. <https://doi.org/10.1007/s00253-019-10286-3>
- Rhoads, W. J., Sindelar, M., Margot, C., Graf, N., & Hammes, F. (2022). Variable *Legionella* Response to Building Occupancy Patterns and Precautionary Flushing. *Microorganisms*, *10*(3).
- Rodríguez Albalat, G., Bedrina Broch, B., & Jiménez Bono, M. (2012). Validation of the Legipid® Bioalarm *Legionella* assay. *Journal of AOAC International*, *95*(5), 1440-1451. <https://doi.org/10.5740/jaoacint.12-146>
- Raad voor Accreditatie RvA. (2020). *Toelichtend document microbiologie. RvA-T002-NL Versie 4.0, 29-09-2020*
- Samhan, F. A., Stedtfeld, T. M., Waseem, H., Williams, M. R., Stedtfeld, R. D., & Hashsham, S. A. (2017). On-filter direct amplification of *Legionella pneumophila* for rapid assessment of its abundance and viability. *Water Research*, *121*, 162-170. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.05.028>
- Sartory, D. P., Spies, K., Lange, B., Schneider, S., & Langer, B. (2017). Evaluation of a most probable number method for the enumeration of *Legionella pneumophila* from potable and related water samples. *Letters in Applied Microbiology*, *64*(4), 271-275. <https://doi.org/10.1111/lam.12719>
- Sboui, D., Souiri, M., Reynaud, S., Palle, S., Ismail, M. B., Epalle, T., Mzoughi, R., Girardot, F., Allegra, S., Riffard, S., & Othmane, A. (2015). Characterisation of electrochemical immunosensor for detection of viable not-culturable forms of *Legionella pneumophila* in water samples. *Chemical Papers*, *69*(11), 1402-1410. <https://doi.org/10.1515/chempap-2015-0170>
- Scaturro, M., Buffoni, M., Girolamo, A., Cristino, S., Girolamini, L., Mazzotta, M., Sabattini, M. A. B., Zaccaro, C. M., Chetti, L., Laboratory, M. A. N., Bella, A., Rota, M. C., & Ricci, M. L. (2020). Performance of legiolert test vs. ISO 11731 to confirm *legionella pneumophila* contamination in potable water samples. *Pathogens*, *9*(9), 1-8. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090690>

- Scaturro, M., Fontana, S., Dell'eva, I., Helfer, F., Marchio, M., Stefanetti, M. V., Cavallaro, M., Miglietta, M., Montagna, M. T., De Giglio, O., Cuna, T., Chetti, L., Sabattini, M. A. B., Carlotti, M., Viggiani, M., Stenico, A., Romanin, E., Bonanni, E., Ottaviano, C., . . . Ricci, M. L. (2016). A multicenter study of viable PCR using propidium monoazide to detect Legionella in water samples. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(3), 283-288. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.04.009>
- Scaturro, M., Poznanski, E., Mupo, M., Blasior, P., Seeber, M., Prast, A. M., Romanin, E., Girolamo, A., Rota, M. C., Bella, A., Ricci, M. L., & Stenico, A. (2020). Evaluation of GVPC and BCYE media for legionella detection and enumeration in water samples by ISO 11731: Does plating on BCYE medium really improve yield? *Pathogens*, 9(9), 1-6. <https://doi.org/10.3390/pathogens9090757>
- Schalk, J. A., & De Roda Husman, A. M. (2010). *Detectiemethoden voor legionella in water*. RIVM Rapport 703719063/2010. <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/703719063.pdf>
- Schalk, J. A., Docters van Leeuwen, A. E., Lodder, W. J., Euser, S., den Boer, J. W., & de Roda Husman, A. M. (2011). *Detectie van legionella met een amoebekweekmethode*. RIVM Briefrapport 703719083/2011 <https://www.rivm.nl/bibliotheek/rapporten/703719083.pdf>
- Schalk, J. A. C., van Leeuwen, A. E. D., Lodder, W. J., de Man, H., Euser, S., den Boer, J. W., & de Roda Husman, A. M. (2012). Isolation of Legionella pneumophila from pluvial floods by amoebal coculture. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4519-4521. <https://doi.org/10.1128/AEM.00131-12>
- Shen, Y., Monroy, G. L., Derlon, N., Janjaroen, D., Huang, C., Morgenroth, E., Boppart, S. A., Ashbolt, N. J., Liu, W. T., & Nguyen, T. H. (2015). Role of biofilm roughness and hydrodynamic conditions in Legionella pneumophila adhesion to and detachment from simulated drinking water biofilms. *Environ Sci Technol*, 49(7), 4274-4282. <https://doi.org/10.1021/es505842v>
- Spies, K., Pleischl, S., Lange, B., Langer, B., Hübner, I., Jurzik, L., Luden, K., & Exner, M. (2018). Comparison of the Legiolert™/Quanti-Tray® MPN test for the enumeration of Legionella pneumophila from potable water samples with the German regulatory requirements methods ISO 11731-2 and ISO 11731. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 221(7), 1047-1053. <https://doi.org/10.1016/j.ijheh.2018.07.006>
- Tingley, L. Turnbull, J.D., Corbin, C., Day, J., Vaghji, L., Hannah, M., Afshar, B. and Chalker, V., (in progress). Species of the bacterial family Legionellaceae: a review, publication in progress.
- Toplitsch, D., Platzer, S., Pfeifer, B., Hautz, J., Mascher, F., & Kittinger, C. (2018). Legionella detection in environmental samples as an example for successful implementation of qPCR. *Water (Switzerland)*, 10(8). <https://doi.org/10.3390/w10081012>

- Toplitsch, D., Platzer, S., Zehner, R., Maitz, S., Mascher, F., & Kittinger, C. (2021). Comparison of updated methods for legionella detection in environmental water samples. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 18(10). <https://doi.org/10.3390/ijerph18105436>
- Touron-Bodilis, A., Pougard, C., Frenkiel-Lebossé, H., & Hallier-Soulier, S. (2011). Usefulness of real-time PCR as a complementary tool to the monitoring of Legionella spp. and Legionella pneumophila by culture in industrial cooling systems. *Journal of Applied Microbiology*, 111(2), 499-510. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05063.x>
- van der Kooij, D., Wubbels, G., & Veenendaal, H. R. (2007). Legionellabacteriën in leidingwaterinstallaties behoren meestal tot de ongevaarlijke soort Legionella anisa. *H2O*, 33-35.
- van der Mee-Marquet, N., Domelier, A.-S., Arnault, L., Bloc, D., Laudat, P., Hartemann, P., & Quentin, R. (2006). Legionella anisa, a possible indicator of water contamination by Legionella pneumophila. *Journal of Clinical Microbiology*, 44(1), 56-59. <https://doi.org/10.1128/jcm.44.1.56-59.2006>
- van Der Wielen, P. W., Wierenga, W., Oesterholt, F., Oostdijk, A., & van der Werff, A. (2021). *Met recht naar een doeltreffender legionellapreventie. Een toekomstgerichte evaluatie van de regelgeving over legionellapreventie in leidingwaterinstallaties op basis van een wetenschappelijke en juridische analyse.*
- Veenendaal, H. R., Brouwer-Hanzens, A. J., & van der Kooij, D. (2017). Incubation of premise plumbing water samples on Buffered Charcoal Yeast Extract agar at elevated temperature and pH selects for Legionella pneumophila. *Water Research*, 123, 439-447. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2017.06.077>
- Walker, J. T., & McDermott, P. J. (2021). Confirming the Presence of Legionella pneumophila in Your Water System: A Review of Current Legionella Testing Methods. *Journal of AOAC International*, 104(4), 1135-1147. <https://doi.org/10.1093/jaoacint/qsab003>
- Whiley, H., & Taylor, M. (2016). Legionella detection by culture and qPCR: Comparing apples and oranges [Review]. *Critical Reviews in Microbiology*, 42(1), 65-74. <https://doi.org/10.3109/1040841X.2014.885930>
- Wunderlich, A., Torggler, C., Elsässer, D., Lück, C., Niessner, R., & Seidel, M. (2016). Rapid quantification method for Legionella pneumophila in surface water. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 408(9), 2203-2213. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9362-x>
- Yamaguchi, N., Tokunaga, Y., Goto, S., Fujii, Y., Banno, F., & Edagawa, A. (2017). Rapid on-site monitoring of Legionella pneumophila in cooling tower water using a portable microfluidic system. *Scientific Reports*, 7(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-03293-9>
- Yáñez, M. A., Nocker, A., Soria-Soria, E., Múrtula, R., Martínez, L., & Catalán, V. (2011). Quantification of viable Legionella pneumophila cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR. *Journal of Microbiological Methods*, 85(2), 124-130. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.02.004>

- Yasmon, A., Yusmaniar, Karuniawati, A., & Bela, B. (2010). Simultaneous detection of Legionella species and Legionella pneumophila by duplex PCR (dPCR) assay in cooling tower water samples from Jakarta, Indonesia. *Medical Journal of Indonesia*, 19(4), 223-227. <https://doi.org/10.13181/mji.v19i4.408>
- Yin, X., Chen, Y.-Z., Ye, Q.-Q., Liao, L.-J., Cai, Z.-R., Lin, M., Li, J.-N., Zhang, G.-B., Peng, X.-L., Shi, W.-F., & Guo, X.-G. (2022). Detection performance of PCR for Legionella pneumophila in environmental samples: a systematic review and meta-analysis. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 21(1), 12. <https://doi.org/10.1186/s12941-022-00503-9>
- Zhan, X. Y., Hu, C. H., & Zhu, Q. Y. (2016). Targeting single-nucleotide polymorphisms in the 16S rRNA gene to detect and differentiate Legionella pneumophila and non-Legionella pneumophila species. *Archives of Microbiology*, 198(6), 591-594. <https://doi.org/10.1007/s00203-016-1228-2>
- Zhou, G., Cao, B., Dou, Y., Liu, Y., Feng, L., & Wang, L. (2011). PCR methods for the rapid detection and identification of four pathogenic Legionella spp. and two Legionella pneumophila subspecies based on the gene amplification of gyrB. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91(3), 777-787. <https://doi.org/10.1007/s00253-011-3283-6>

Bijlage 1 Normcommissie 'Microbiologische parameters' en ontwikkeling van normen

Bron: NEN

Normsubcommissie 'Microbiologische parameters'

Normen over microbiologische methoden zijn afspraken die belanghebbende partijen als lid van de normsubcommissie 'Microbiologische parameters' met elkaar maken onder begeleiding van NEN.

Door goede afspraken over bijvoorbeeld analysemethoden worden representatieve, reproduceerbare en vergelijkbare resultaten verkregen. In sommige situaties ontwikkelt de normsubcommissie nationale documenten (bijvoorbeeld een NEN-norm) en in de meeste gevallen levert de normsubcommissie namens Nederland commentaar op internationale conceptnormen en periodieke evaluaties. De subcommissie telt ongeveer vijftien leden, afkomstig van organisaties die vooral in de (drink)watersector actief zijn. De commissie vormt een breed platform waarin vertegenwoordigers van de overheid, het bedrijfsleven en de wetenschap elkaar ontmoeten en besluiten nemen over bestaande en nieuwe normen. NEN en de commissieleden vertegenwoordigen Nederland gezamenlijk in internationale (ISO) en Europese (CEN) commissies: [CEN/TC 230](#) 'Water analysis' en [ISO/TC 147/SC 4](#) 'Water quality – Microbiological methods'.

Normalisatie en de rol van NEN

NEN, het Koninklijk Nederlands Normalisatie Instituut, is voor Nederland lid van CEN en ISO en heeft de taak om de Nederlandse inbreng te faciliteren via nationale norm(sub)commissies. NEN is de enige organisatie die dit kan uitvoeren in Nederland, omdat NEN als onafhankelijke stichting, wettelijk is aangewezen als de nationale normalisatie-instelling voor Nederland op grond van artikel 27 van de Europese Verordening 1025/2012. Hierdoor is NEN voor alle organisaties in Nederland dé toegangspoort tot internationale normalisatie. Op terreinen waar Nederland veel expertise en grote belangen heeft, kan NEN internationale secretariaten leiden. [ISO](#) en [CEN](#) hebben respectievelijk 166 leden en 34 leden. De leden vertegenwoordigen een even groot aantal landen, omdat per land één organisatie lid mag zijn van ISO en CEN. Via normcommissies biedt NEN vervolgens Nederlandse organisaties de mogelijkheid om te participeren aan Europese en mondiale technische commissies, zoals CEN/TC 230 en ISO/TC 147/SC 4.

Normalisatie is het proces om te komen tot een norm. Dit proces is open, transparant en gericht op consensus. Een breed draagvlak is de randvoorwaarde. De afspraken komen op basis van consensus tot stand en worden vastgelegd in een document. Dit kan een nationale (NEN),

Europese (EN) of mondiale (ISO) norm zijn maar bijvoorbeeld ook een praktijkrichtlijn (NPR).

Ontwikkeling van (inter)nationale normen voor watermicrobiologie

Wanneer een nationale norm voor watermicrobiologie wordt ontwikkeld of herzien, dan valt dit onder de verantwoordelijkheid van de normsubcommissie 'Microbiologische parameters'. Binnen de normsubcommissie worden dan verschillende conceptversies van een norm voorbereid, becommentarieerd en besproken. Daarna vindt de publieke commentaarronde van twaalf weken plaats. De normsubcommissie verwerkt vervolgens de commentaren en na een uitgebreide beoordeling vanuit NEN wordt de norm gepubliceerd. Tabel 1 van deze bijlage toont dit proces beknopt op nationaal niveau (zie tweede kolom). Steeds vaker doen methoden gebaseerd op moleculaire technieken hun intrede. De nieuwere technieken worden waar mogelijk opgenomen in de huidige methoden; dit gebeurt vaak bij de herziening van de norm of er worden nieuwe normen ontwikkeld. Deze kunnen dan, mits gevalideerd, worden toegepast. Binnen de normsubcommissie 'Microbiologische parameters' is de werkgroep 'Moleculairbiologische methoden' verantwoordelijk voor deze onderwerpen.

De inhoudelijke ontwikkeling en herziening van internationale normen voor watermicrobiologie vindt plaats binnen ISO/TC 147/SC 4 en de onderliggende werkgroepen. Zodra conceptdocumenten beschikbaar zijn om verschillende normontwikkelingsstadia te doorlopen, worden de conceptnormen gedeeld met de leden van ISO (dit zijn de nationale normcommissies voor watermicrobiologie waaronder de NEN-normsubcommissie 'Microbiologische parameters'); ieder land wordt dan gevraagd om commentaar te geven en te stemmen. Uiteindelijk doorlopen alle internationale normen enkele formele stemmingen bijvoorbeeld de "public enquiry". Als vervolgens via deze formele stemmingen consensus bereikt is, wordt het uiteindelijk een mondiale norm. Over het algemeen, duurt een normalisatietraject rond de drie jaar; dit is echter afhankelijk van de kwaliteit van bestaande documenten, de politieke gevoeligheid van het onderwerp en de noodzaak om ringonderzoeken te organiseren. Tabel 1 van deze bijlage toont een generiek overzicht van de verschillende stadia in een normontwikkelingstraject: tussen stadium 3 en stadium 4 wordt voor normen met analysemethoden een ringonderzoek georganiseerd, zodat prestatiekenmerken aan de norm kunnen worden toegevoegd. Dit is een internationaal ringonderzoek waaraan Nederlandse laboratoria kunnen deelnemen. Gedurende internationale normontwikkelingstrajecten heeft NEN, samen met de normcommissievoorzitter, een coördinerende rol om de leden van de normsubcommissie op één lijn te brengen en één stem met commentaar per norm aan ISO door te geven.

Tabel 1 Stadia in een normontwikkelingstraject

Stages	NEN	CEN	ISO
0) Preliminary [optional]		Preliminary Work Item (PWI)	Preliminary Work Item (PWI)
1) Proposal [mandatory]	Concept normontwerp	Activation of New Work Item (NWI)	New Work Item Proposal (NP) [enquiry in ISO/TC 147/SC 4 - national committees can vote and comment]
2) Preparatory [optional]		Working Draft (WD)	Working Draft (WD) [commenting possibility in WGs]
3) Committee [optional]			Committee Draft (CD) [internal enquiry in ISO/TC 147/SC4 - national committees can vote and comment]
4) Enquiry [mandatory]	Normontwerp (Ontw.)	Draft European Standard (prEN)	Draft International Standard (DIS) [public enquiry - national committees can vote and comment]
5) Approval [optional]		Draft European Standard for Formal Vote (FprEN)	Final Draft International Standard (FDIS) [national committees can vote and comment]
6) Publication [mandatory]	Nederlandse norm (NEN)	European Standard (EN)	International Standard (ISO)

Op internationaal niveau worden conceptdocumenten voorbereid door ISO/TC 147/SC 4-werkgroepen waar de uitgebreide inhoudelijke discussies plaatsvinden, commentaren worden verwerkt en de concepten worden aangepast. Via de normsubcommissie kunnen Nederlanders actief betrokken zijn bij deze ISO-werkgroepen. Dit kan in de rol van expert, projectleider of werkgroepvoorzitter. Nederlandse experts zijn betrokken bij verschillende ISO/TC 147/SC 4-werkgroepen, bijvoorbeeld:

- ISO/TC 147/SC 4/WG 17 'Legionella by PCR'
- ISO/TC 147/SC 4/WG 22 'Quality control of membrane filters'
- ISO/TC 147/SC 4/WG 28 'Quality control and validation of PCR methods'

Van WG 28 heeft Nederland ook het leiderschap. Door een Nederlands voorzitterschap en een professioneel secretariaat kan er mede voor gezorgd worden dat internationale normen beter aansluiten bij de Nederlandse praktijk. Wanneer een norm gepubliceerd is, wordt de verantwoordelijke ISO-werkgroep opgeheven. Dit was bijvoorbeeld ook het geval voor ISO/TC 147/SC 4/WG 10 'Legionella', waar Nederland van 2012 tot en met 2017 het leiderschap van had. Pas als in ISO/TC 147/SC 4 wordt besloten dat ISO 11731:2017 herzien moet worden, kan WG 10 weer gereactiveerd worden. Dit besluitvormingsproces kan Nederland, via de normsubcommissie, beïnvloeden door te stemmen op de periodieke evaluatie van ISO 11731:2017 die elke vijf jaar plaatsvindt of door tussentijds een voorstel voor herziening in te dienen bij ISO/TC 147/SC 4.

Voor meerdere internationale normen over watermicrobiologie is besloten dat deze voor Europa van extra belang zijn, bijvoorbeeld doordat er naar wordt verwezen in de Europese richtlijn betreffende de kwaliteit van voor menselijke consumptie bestemd water. Deze normen worden parallel ontwikkeld tussen CEN/TC 230 en ISO/TC 147/SC 4 (onder "Vienna Agreement"). Dit is ook gedaan voor ISO 11731:2017. De normalisatie-instituten die aangesloten zijn bij CEN moeten dan zowel bij CEN/TC 230 als ISO/TC 147/SC 4 reageren op de formele stemmingen over conceptnormen. Wanneer een Europese norm is goedgekeurd voor publicatie dan is Nederland, net als andere landen in Europa, verplicht om de norm over te nemen als nationale norm en mogelijke conflicterende nationale normen in te trekken. ISO 11731:2017 is een voorbeeld van een norm die parallel is ontwikkeld en is naast een mondiale norm, ook een Europese en nationale norm: NEN-EN-ISO 11731:2017. Daardoor is NEN 6265:2007 in 2017 ingetrokken. Het voordeel is nu dat door de ontwikkeling en invoering van NEN-EN-ISO 11731:2017 onderzoeksresultaten met elkaar vergeleken kunnen worden tussen laboratoria in verschillende landen en dan op mondiaal niveau.

Bijlage 2 Verschillen tussen nationale en internationale normen voor Legionella

Bron: NEN

Verschillen NEN 6265:2007 en NEN-EN-ISO 11731:2017

Door de publicatie van NEN-EN-ISO 11731:2017 is de nationale norm NEN 6265:2007 ingetrokken (NEN-EN-ISO, 2017a; NEN, 2007). De belangrijkste verschillen tussen beide normen zijn:

- Verdeling van de matrices.
- Keuze uit verschillende opwerkingsmethoden en type membraanfilters.
- Introductie van de zuurbehandeling: na de filtratiestap, krijgt het watermonster drie vergelijkingsvarianten, in plaats van twee: onbehandeld, waterbadbehandeling en een zuurbehandeling. Dat gebeurt voordat de bacteriën op de platen komen. Een zuurbehandeling onderdrukt stoorflora die kunnen afleiden van *Legionella*.
- Monsternamevolume (van 250 ml naar 500 ml) en monsternametijd (van 24 uur naar 48 uur).

Tabel 1 van deze bijlage toont een beknopt overzicht van de verschillen tussen beide normen.

Tabel 1 Beknopt overzicht van de verschillen tussen NEN 6265:2007 (NEN, 2007) en NEN-EN-ISO 11731:2017 (NEN-EN-ISO, 2017a)

	NEN 6265:2007	NEN-EN-ISO 11731:2017
Toepassingsgebied	Alle soorten – al dan niet verwarmd – water	Deze methoden zijn toepasbaar op alle type watermonsters, zoals drinkwater, industrieel water, afvalwater en oppervlaktewater. Deze methoden kunnen ook worden gebruikt voor water-gerelateerde matrices, bijvoorbeeld biofilm en sedimenten, etc.
Voedingsbodems	Buffered charcoal yeast extract (BCYE) Buffered charcoal yeast extract met antibiotica (BCYE+AB) Buffered charcoal yeast extract zonder L-cysteïne (BCYE–cys) Modified Wadowsky Yee (MWY)	BCYE BCYE+AB BCYE–cys MWY Glycine vancomycin polymyxin B cycloheximide (GVPC)
Membraanfilter	Polycarbonaat	Polycarbonaat of polyethersulfon cellulose

	NEN 6265:2007	NEN-EN-ISO 11731:2017
		nitraat of mixed cellulose esters
Monsterneming	Niet flamberen, 1 liter doorstromen, monster nemen ten minste 250 ml. Andere wijze monsterneming, volg NEN-EN-ISO 19458. Gekoeld bewaren (5 ± 3) °C, binnen 24 uur na monsternaming <i>Legionella</i> monster verwerken.	Voor de bemonstering, het vervoer en de opslag van de monsters zoals beschreven in ISO 19458. Binnen 48 uur na monsternaming <i>Legionella</i> monster verwerken. Voor Nederland is ook het Nederlands voorwoord in NEN-EN-ISO 11731:2017 van toepassing.
Werkwijze	Filtratie met wasprocedure, waarin de werkwijze wordt beschreven voor de matrices: - weinig storende flora - veel storende flora - hoge concentratie <i>Legionella</i>	Directe plaatmethode Zuurbehandeling Filtratie met wasprocedure Filter op plaatmethode (als optie) ISO 11731 bevat een bijlage waarin wordt aangegeven welke methode voor welke matrix (weinig storende flora, veel storende flora en heel veel storende flora) kan worden ingezet.
Incubatie	Geen tussentijdse inspectie <i>Legionella</i> kweken.	Wel tussentijdse inspectie van <i>Legionella</i> kweken.
Bevestiging aantal verdachte kolonies	Minimaal 5 verdachte kolonies, mits deze aanwezig zijn.	Minimaal 3 verdachte kolonies, mits deze aanwezig zijn.
Bevestiging alternatieve methodes	Als alternatief kan PCR als bevestigingsmethode worden gebruikt, mits deze conform NEN-EN-ISO 16140 is gevalideerd.	Er kunnen alternatieve procedures worden gebruikt om een kolonie als <i>Legionella</i> -soort te bevestigen, mits de geschiktheid van de alternatieve procedure is geverifieerd.

Verschillen NEN 6254+C1:2013 en ISO/TS 12869:2019

Aangezien ISO/TS 12869:2019 (ISO/TS, 2019) is ontwikkeld als 'Technical Specification' en niet als volledige norm, en daarnaast alleen bij ISO is gepubliceerd en niet bij CEN, kan Nederland de nationale norm NEN 6254+C1:2013 (NEN, 2013) behouden. Daarnaast is NEN 6254+C1:2013 alleen bedoeld voor *Legionella pneumophila* en niet voor *Legionella* spp. ISO/TS 12869:2019 heeft een bredere scope en is voor zowel *Legionella pneumophila* als *Legionella* spp. bedoeld. NEN 6254+C1:2013 is op een aantal punten strikter dan ISO/TS 12869:2019, bijvoorbeeld:

- Volgens NEN 6254+C1:2013 moet de 'positieve controle (cellen) recovery' elke monsterserie (geen directe criteria, wel

controlekaart) worden gedaan en volgens ISO/TS 12869:2019 moet de 'positieve controle (cellen) recovery' één keer per maand worden uitgevoerd.

- Plasmide interne controle bij gefiltreerd monster (recovery+ inhibitie PCR) wordt vermeld in NEN 6254+C1:2013 en in ISO/TS 12869:2019 is er geen interne controle bij extractie DNA [alleen interne controle als inhibitiecontrole PCR toegevoegd aan PCR reactie (inhibitie)].
- Criteria voor de efficiëntie van de kalibratielijn zijn in NEN 6254+C1:2013 tussen de 80 % en de 105 %, en in ISO/TS 12869:2019 tussen de 75 % en de 125 %.
- De interne controle heeft in NEN 6254+C1:2013 een unieke sequentie en in ISO/TS 12869:2019 een targetsequentie.

De beschreven methode van NEN 6254+C1:2013 is in de periode van 2006 tot 2008 door Nederlandse laboratoria gevalideerd, waarbij met name KWR de prestatiekenmerken van deze methode heeft vastgelegd. Deze validatie is uitgevoerd waarbij als richtlijn NEN-EN-ISO 16140:2003 'Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods' is gebruikt (NEN-EN-ISO, 2003). Deze validatie, inclusief een ringonderzoek, werd destijds in opdracht van het Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer (VROM) uitgevoerd. NEN-EN-ISO 16140:2003 bevat richtlijnen voor het valideren van snelle alternatieve methodes zoals qPCR.

ISO/TS 12869:2019 bevat een apart deel over hoe deze qPCR gevalideerd is, waarin niet wordt verwezen naar de ISO 16140 serie (ISO/TS, 2019). De wijze van valideren zoals deze voor NEN 6254+C1:2013 en ISO/TS 12869:2019 is uitgevoerd, is minder strikt dan zoals deze nu is beschreven in NEN-EN-ISO 16140-2:2016 'Microbiology of the food chain – Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method' (NEN-EN-ISO, 2016). Deze norm is als richtlijn gebruikt voor de validatie van NEN 6234:2021 Ontw. 'Water – Detectie van *Escherichia coli* – Methode met reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-qPCR)'.

Bijlage 3 Mogelijke herzieningen van en verbeterpunten voor normen

Bron: NEN

Gedurende de implementatie van NEN-EN-ISO 11731:2017, kwamen er diverse toekomstige verbeterpunten voor deze norm aan het licht en tevens zijn er nieuwe ontwikkelingen voor gerelateerde normen. De normsubcommissie heeft als doelstelling om hier goed van op de hoogte te blijven, verder onderzoek naar te doen en per verbeterpunt een vervolgstap te definiëren; dit geldt ook voor de normen die gebaseerd zijn op moleculairbiologische methoden (zoals NEN 6254+C1:2013 en ISO/TS 12869:2019). Op die manier blijven de betrouwbaarheid en vergelijkbaarheid van resultaten voor Legionella-analyses geborgd. Bij de periodieke evaluatie van ISO 11731:2017 in 2022 heeft NEN 'herzien met commentaar' gestemd en terugkoppeling over meerdere verbeterpunten vanuit Nederland gegeven aan ISO/TC 147/SC 4, bijvoorbeeld over:

- tussentijdse inspectie van Legionella-kweekplaten tijdens de incubatieperiode;
- alternatieve bevestiging van Legionella met uv-licht.

Op de periodieke evaluatie van ISO/TS 12869:2019 heeft NEN namens de normsubcommissie ook 'herzien met commentaar' gestemd. De hoofdlijnen van het ingediende commentaar gaan vooral over het verplaatsen van algemene eisen voor moleculairbiologisch onderzoek naar ISO/TS 16099 en het aanscherpen van ISO/TS 12869:2019, zodat de eisen meer overeenkomen met NEN 6254+C1:2013.

Of internationale normen herzien kunnen worden, hangt in eerste instantie af van de uitslag van de periodieke evaluatie, maar ook of een land bereid is om een projectleider en een secretariaat voor de ISO/TC 147/SC 4-werkgroep te leveren. Dit kan door Nederland worden gedaan of een ander land, zo heeft Frankrijk momenteel het leiderschap van ISO/TC 147/SC 4/WG 17 'Legionella by PCR'. In grote lijnen doorloopt een norm voor een herziening dezelfde stappen als die getoond zijn in tabel 1 voor een normontwikkelingstraject (zie bijlage 1). Zo'n traject duurt gemiddeld drie jaar. Sommige stadia kunnen overgeslagen worden als de inhoudelijke aanpassingen beperkt zijn. Voor de herziening van een nationale norm (bijv. NEN 6254) of praktijkrichtlijn (bijv. NPR 6278) is in ieder geval de publieke commentaaronde een vereiste net als actieve betrokkenheid van de normsubcommissie 'Microbiologische parameters'. De ervaring leert dat het herzien van een nationale norm vaak sneller gaat dan van een internationale norm. Een andere mogelijkheid is het ontwikkelen van een nieuwe (inter)nationale norm.

Bijlage 4 Generieke normen gerelateerd aan NEN-EN-ISO 11731

Bron: NEN

Voor de toepassing van normen voor specifieke micro-organismen, als Legionella, zijn normen nodig waar eisen voor meer generieke werkwijzen worden beschreven. Naar deze normen wordt verwezen in NEN-EN-ISO 11731:2017:

- NEN-EN-ISO 7704 'Water quality – Requirements for the performance testing of membrane filters used for direct enumeration of microorganisms by culture methods' (NEN-EN-ISO, 1985)
- NEN-EN-ISO 8199 'Water quality – General requirements and guidance for microbiological examinations by culture' (NEN-EN-ISO, 2018)
- NEN-EN-ISO 11133 'Microbiology of food, animal feed and water – Preparation, production, storage and performance testing of culture media' (NEN-EN-ISO, 2014a)
- NEN-EN-ISO 13843 'Water quality – Requirements for establishing performance characteristics of quantitative microbiological methods' (NEN-EN-ISO, 2017b)
- NEN-EN-ISO 19458 'Water quality – Sampling for microbiological analysis' (NEN-EN-ISO, 2007)

In Nederland bestaat daarnaast NPR 6268:2012 'Water – Algemene principes bij kwaliteitsborging van bacteriologisch onderzoek van water'. Recentelijk is de volgende praktijkrichtlijn ontwikkeld: NPR 7394:2022 'Water – Algemene principes bij kwaliteitsborging van moleculairbiologisch onderzoek voor micro-organismen en environmental DNA' (NEN-EN-ISO, 2022). Een groot deel van de kwaliteitscriteria in (inter)nationale normen voor een specifiek micro-organisme waarbij moleculairbiologische methoden (als PCR) worden toegepast, zijn generiek en toepasbaar voor de analyse van verschillende micro-organismen. Daarom heeft Nederland recentelijk bij ISO/TC 147/SC 4 het voorstel ingediend om het volgende document te ontwikkelen: ISO/AWI TS 16099 'Water quality – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection and quantification of microorganisms – Quality control and validation of molecular methods' (verwacht publicatiejaar: 2024 of 2025). Dit voorstel is goedgekeurd. De doelstelling is dat op die manier dezelfde basiseisen gelden voor de kwaliteitsborging en validatie van PCR-methoden in specifieke normen voor verschillende micro-organismen. Deze te ontwikkelen norm heeft dus indirect raakvlakken met NEN 6254+C1:2013 en ISO/TS 12869:2019.

Bijlage 5 Zoektermen voor literatuuronderzoek

Onderstaande zoektermen zijn gebruikt voor het literatuuronderzoek.

WATER

- Drinking water
- Water supply
- Potable water
- Tap water
- Water

LEGIONELLA

- Legionella
- Legionnaire's disease
- Pneumophila
- Legion*
- Legionella pneumophila
- Legionella species
- L. pneumophila

DIAGNOSTIEK

- Method*
- Culture*
- Molecular diagnostic technique*
- Bacterial load
- Agar
- Water microbiology
- qPCR
- RT-PCR
- RTPCR
- RT PCR
- IMS
- Immune assay
- Immunoassay
- haRPA
- Plate culture
- ISO-11731*
- ISO 11731*
- Legiolert*
- LAMP
- Measur*

ONDERZOEK

- Detect*
- Enumerat*
- Test*
- Predict*
- Quantif*
- Diagnos*
- Identif*
- Analy*

VERGELIJKEND

- Compar*
- Validat*
- Evaluat*

RIVM

De zorg voor morgen begint vandaag