



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

Detectiemethoden voor legionella in water

Rapport 703719063/2010

J.A.C. Schalk | A.M. de Roda Husman



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

Detectiemethoden voor legionella in water

RIVM Rapport 703719063/2010

Colofon

© RIVM 2010

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'.

JAC Schalk, RIVM
AM de Roda Husman

Contact:
JAC Schalk
Laboratorium voor zöonosen en omgevingsmicrobiologie
marjolijn.schalk@rivm.nl

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

Dankwoord

Wij willen graag Bart Wullings van KWR, Frank Schuren van TNO-Zeist, Maarten Offinga van Legyon en Saskia Rutjes van het RIVM bedanken voor het becommentariëren van het rapport.

Rapport in het kort

Detectiemethoden voor legionella in water

Het RIVM heeft een overzicht gemaakt van bestaande en nieuwe methoden om legionella in water aan te tonen. Dit is gemaakt in opdracht van de VROM Inspectie, die inzicht wil hebben in de kenmerken en toepassingsmogelijkheden van bestaande en nieuwe methoden.

Legionella komt overal in het milieu voor, maar mensen raken vooral geïnfecteerd als zij bacteriën inademen die zijn uitgegroeid in watersystemen die door de mens zijn gemaakt. Voorbeelden daarvan zijn bubbelbaden, koeltorens en leidingwatersystemen. Legionellapreventie is erop gericht de groei van legionella in dergelijke watersystemen te voorkomen.

Bepaalde collectieve leidingwaterinstallaties, zoals in ziekenhuizen, moeten volgens het Waterleidingbesluit periodiek gecontroleerd worden op de aanwezigheid van legionella. Dit dient te gebeuren conform de NEN 6265, een kweekmethode op agarplaten. De NEN 6265 heeft een aantal beperkingen. Zo kunnen legionellabacteriën gemist worden doordat ze niet groeien op agarplaten of doordat ze overgroeid worden door andere bacteriën.

Nieuwe methoden, zoals *Polymerase Chain Reaction*, de legionella-chip of amoëbe-kweek, kunnen voordelen bieden ten opzichte van de wettelijk vereiste kweekmethode. Ze kunnen bijvoorbeeld wel de legionellabacteriën detecteren die niet zijn te kweken op agarplaten. Nieuwe methoden hebben echter ook beperkingen. Een aantal van deze methoden tonen bijvoorbeeld ook dode bacteriën aan, waardoor na een reinigingsmaatregel niet kan worden vastgesteld of het legionella-probleem in een installatie verholpen is. Nader onderzoek dient te worden uitgevoerd om vast te stellen of nieuwe methoden of een combinatie van methoden in staat zijn een beter beeld te geven van legionellagroei in een leidingwaterinstallatie dan de NEN 6265.

Trefwoorden:

Legionella, Detectie, Water, Kweek, PCR

Abstract

Detection methods for *Legionella* in water

The RIVM has compiled an overview of current and new methods for the detection of *Legionella* in water. The study was carried out by order of the VROM-Inspectorate with the aim of obtaining an insight into the characteristics and applications of current and newly developed methods.

Legionella is omnipresent in the environment, but infection mainly results from the direct inhalation of bacteria that have multiplied in man-made water systems, such as whirlpools, cooling towers and tapwater systems. Regulations for the prevention of *Legionella* target the growth of *Legionella* in these water systems.

The Waterleidingbesluit of 2004 requires that certain collective tapwater systems, such as those in hospitals, be checked regularly for the presence of *Legionella* using a standardized culture method, NEN 6265. However, the NEN 6265 method has been shown to have a number of limitations, among which are that the *Legionella* bacteria can be missed because they do not grow on the agar plates or are overgrown by other bacteria.

New methods, including polymerase chain reaction (PCR), a Legionella-chip or amoebic-coculture, have a number of advantages over the NEN 6265 method, such as the ability to detect *Legionella* bacteria that are missed on the NEN 6265 agar plates. However, the new methods also have their own characteristic limitations. Some methods detect both living and dead bacterial cells, with the result that it cannot be determined if – following the eradication measure – the *Legionella* within an installation has actually been eliminated. Further research is required to determine if one of these new methods or a combination of methods will lead to improved detection of *Legionella* in tapwater systems.

Key words:

Legionella, Detection, Water, Culture, PCR

Inhoud

Dankwoord—3

Samenvatting—7

1 Inleiding—8

2 Concentreren van legionella in watermonsters—10

3 Kweekmethoden—11

- 3.1 Kweek op BCYE-platen—11
- 3.1.1 NEN 6265 en ISO11731—11
- 3.1.2 Bevestigen en typeren—13
- 3.1.3 Invloed van de methode op de detectie—13
- 3.1.4 Nadelen van de kweekmethode op BCYE-platen—14
- 3.2 Amoebekweek—14

4 Moleculairbiologische methoden—16

- 4.1 PCR—16
- 4.1.1 Onderscheid dode en levende bacteriën—17
- 4.1.2 Vergelijking PCR met BCYE-kweekmethoden—17
- 4.1.3 Viability-PCR—18
- 4.2 Legionella-chip—19
- 4.3 FISH—20

5 Immunologische detectie—21

- 5.1 Immunofluorescentie—21
- 5.2 Immunochromatografie—22

6 Betekenis alternatieve methoden—23

Literatuur—27

Samenvatting

Hoewel legionella overall in het milieu voorkomt schuilt het risico op blootstelling vooral in inademing van bacteriën die zijn uitgegroeid in door de mens gemaakte watersystemen. Legionellapreventie is er op gericht de groei van legionella in watersystemen te voorkomen. In het Waterleidingbesluit uit 2004 is vastgelegd dat bepaalde leidingwaterinstallaties periodiek gecontroleerd moeten worden op de aanwezigheid van legionellabacteriën. Dit dient te gebeuren conform de NEN 6265, een kweekmethode op BCYE-platen. Deze methode is tijdrovend en heeft bovendien als nadelen dat de aanwezigheid van legionella gemaskeerd kan worden door de aanwezigheid van andere micro-organismen en dat bepaalde legionellabacteriën gemist worden. Naast de kweekmethode komen meer en meer alternatieve methoden beschikbaar die zijn gericht op detectie van legionella in water. Deze alternatieve methoden zijn onder te verdelen in celkweekmethoden, zoals amoebekweek; moleculairbiologische methoden, zoals *Polymerase Chain Reaction* (PCR), legionella-chip en FISH; en immunologische methoden, zoals immunofluorescentie en immunochromatografie. Dit rapport geeft een overzicht van bestaande en nieuwe methoden en beschrijft de mogelijke waarde van deze methoden voor legionellapreventie in leidingwaterinstallaties.

Alternatieve methoden voor de NEN 6265 hebben ieder hun eigen mogelijkheden en beperkingen. Hiertegenover staan de beperkingen van de NEN 6265, die nu volgens het Waterleidingbesluit dient te worden gebruikt. Nader onderzoek is nodig om de waarde van alternatieve methoden voor het aantonen van legionellagroei in een installatie te beoordelen. Validatie van methoden is noodzakelijk om de prestatiekenmerken, zoals juistheid, detectielimiet en reproduceerbaarheid te kunnen vaststellen. Daarnaast is het zinvol om voor nieuwe methoden te bepalen in hoeverre de detectie verstoord wordt in een achtergrond van andere bacteriën. Diverse soorten watermonsters, zoals monsters van grond- en oppervlaktewater, drinkwatermonsters 'af pompstation', watermonsters uit diverse leidingwaterinstallaties en koelwatermonsters zouden met diverse detectiemethoden getest moeten worden om de waarde van deze methoden ten opzichte van elkaar te kunnen vaststellen voor de specifieke matrix. Bij een dergelijke vergelijking wordt duidelijk in hoeverre nieuwe methoden legionellabacteriën aantonen die met de NEN 6265 worden gemist.

1 Inleiding

Legionellapneumonie (veteranenziekte) is een ernstige vorm van longontsteking die wordt veroorzaakt door de legionellabacterie (Fields et al., 2002). De bacterie kan ziekte veroorzaken wanneer aërosolen met de bacterie worden ingeademd. Hoewel legionella overal in het milieu voorkomt, schuilt het risico op blootstelling vooral in inademing van bacteriën die zijn uitgegroeid in door de mens gemaakte watersystemen (Steinert et al., 2002). Legionella groeit en vermeerderd zich in protozoa, zoals amoeben, die aanwezig zijn in water (Fields et al., 2002). Dit zijn eencellige organismen.



Figuur 1 Legionellabacteriën

Deze protozoa komen voor in biofilms in bijvoorbeeld waterleidingen. Een biofilm is een laag bacteriën die kan ontstaan op het grensvlak tussen water en harde materialen, zoals de binnenkant van leidingwaterinstallaties. Protozoa voeden zich met de bacteriën in biofilms (Greub en Raoult, 2004). Een aantal bacteriën, waaronder legionella, zijn resistent tegen digestie door protozoa (Greub en Raoult, 2004). De protozoa voorzien de legionellabacterie van voedingsstoffen waardoor deze in de protozoa kan vermeerderen. Er zijn bepaalde omstandigheden die de vorming van biofilm en de groei van legionella bevorderen. Dit zijn bijvoorbeeld de aanwezigheid van bepaalde voedingsstoffen, de aanwezigheid van ijzer (corrosie), stilstaand water (bijvoorbeeld bij dode leidingen) en een temperatuur tussen de 25 en 45°C (WHO, 2007).

Om blootstelling aan legionella te voorkomen is in het Waterleidingbesluit uit 2004 opgenomen dat eigenaren van bepaalde collectieve, zogenoemde prioritaire, leidingwaterinstallaties aan legionellapreventie dienen te doen. Het betreft hierbij alleen die installaties die onder een bepaalde risicocategorie vallen, bijvoorbeeld omdat daar kwetsbare groepen verblijven, zoals in

ziekenhuizen. Legionellapreventie houdt in dat een eigenaar een risicoanalyse dient uit te voeren en een beheersplan dient op te stellen. In een beheersplan kan bijvoorbeeld zijn opgenomen dat periodiek thermische desinfectie wordt uitgevoerd of dat leidingen wekelijks worden doorgespoeld om de groei van legionella te voorkomen. Halfjaarlijks dienen monsters te worden genomen om te controleren of legionella aanwezig is in de installatie. Aanwezigheid van legionella duidt erop dat de beheersmaatregelen niet effectief zijn of niet correct worden uitgevoerd en dat er een risico is op blootstelling aan legionella voor de gebruikers van het water van de installatie.

Niet alle legionellasoorten zijn even gevaarlijk voor de mens. Er zijn momenteel 52 legionellasoorten bekend. Sommige soorten zijn verder onder te verdelen in serogroepen. Zo zijn er van *L. pneumophila* vijftien serogroepen bekend. Ongeveer 90% van de ziektegevallen is geassocieerd met *L. pneumophila*, met name serogroep 1 (Von Baum et al., 2008). Van de overige legionellasoorten, gezamenlijk ook wel *L. non-pneumophila* genoemd, is van 20 *L. non-pneumophila*-soorten beschreven dat ze ook geassocieerd zijn met humane ziektegevallen (WHO 2007, König et al., 2005). Wat de bijdrage van deze soorten is aan ziekte is niet duidelijk omdat humane diagnostiek met name gericht is op detectie van *L. pneumophila* serogroep 1. Het is aannemelijk dat gevallen van legionellose veroorzaakt door *L. non-pneumophila* gemist worden (Schalk et al., 2009). Onderzoek in Duitsland, waarbij uitgebreide diagnostiek werd ingezet, toonde aan dat bij 11% van de patiënten met een legionellapneumonie, waarbij de veroorzaker geïdentificeerd kon worden, het een *L. non-pneumophila* betrof (Von Baum et al., 2008).

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 aangetoond met behulp van de NEN 6265-methode (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*. Omdat maatregelen om legionellabesmetting te voorkomen kostbaar zijn en omdat slechts in een klein deel van de watermonsters *L. pneumophila* wordt aangetroffen, welke geassocieerd is met het overgrote deel van de ziektegevallen, is er discussie of het wenselijk is om legionelladetectie in het kader van legionellapreventie enkel te richten op *L. pneumophila*. Het RIVM heeft echter geadviseerd om detectie te blijven richten op alle legionellasoorten (Versteegh et al., 2009), aangezien de groei van legionella in een systeem, ongeacht de soort, een indicatie is voor het falen van de beheersmaatregelen. In geval van niet-effectieve maatregelen dienen aanvullende maatregelen genomen te worden, zodat eventuele blootstelling aan een ziekteverwekkende legionellasoort in de toekomst voorkomen wordt.

In het Waterleidingbesluit is vastgelegd dat monsternamen en detectie in het kader van legionellapreventie dient te gebeuren volgens een gestandaardiseerde methode, namelijk de NEN 6265. Het betreft een kweekmethode op BCYE-platen die informatie oplevert over de aantallen van op plaat kweekbare legionellabacteriën. Andere methoden zijn gebaseerd op detectie via celkweek, immunologische of moleculaire detectie. Dit rapport geeft een overzicht van reeds toegepaste en recent ontwikkelde methoden en beschrijft de mogelijke betekenis van deze methoden voor detectie van legionella ten bate van de evaluatie van de beheersmaatregelen die zijn uitgevoerd in een installatie ten behoeve van legionellapreventie.

2 Concentreren van legionella in watermonsters

De hoeveelheid legionellabacteriën in een watermonster is vaak te laag om direct de aantallen te kunnen bepalen. Daarom is het nodig om de bacteriën in het monster eerst te concentreren. Dit kan worden bewerkstelligd door membraanfiltratie of centrifugatie. Bij membraanfiltratie wordt een bepaalde hoeveelheid water (250 ml-1000 ml) gefiltreerd over een filter met poriën welke klein genoeg zijn om legionellabacteriën tegen te houden. Na filtratie worden de bacteriën van het filter losgemaakt door middel van ultrasoonbehandeling of vortexen van het filter in 5 ml van het oorspronkelijke water. Bij centrifugatie wordt een bepaald volume water afgedraaid in een centrifuge bij een laag toerental waarbij de legionellabacteriën naar beneden worden gedraaid, maar niet kapot worden gedrukt.

Bij zowel filtratie als centrifugatie is de opbrengst van de legionellabacteriën uit het oorspronkelijke monster nooit 100%. Bij filtratie kan het zijn dat niet alle bacteriën op het filter achterblijven, dat de bacteriën niet loslaten van het filter, of dat bacteriën de procedure niet overleven. Bij centrifugatie is het ook mogelijk dat bacteriën de procedure niet overleven of dat ze niet efficiënt naar beneden zakken. In de literatuur is beschreven dat filtratie een twee keer hogere opbrengst geeft dan centrifugatie (Ta et al., 1995). De opbrengst van filtratie loopt uiteen van 57-77% (Schulze-Röbbecke et al., 1999; Ta et al., 1995). Naast levende bacteriën zullen ook dode bacteriën met beide concentratieprocedures geïsoleerd worden. Na de concentratiestap kan detectie van legionellabacteriën in het concentraat plaatsvinden.

3 Kweekmethoden

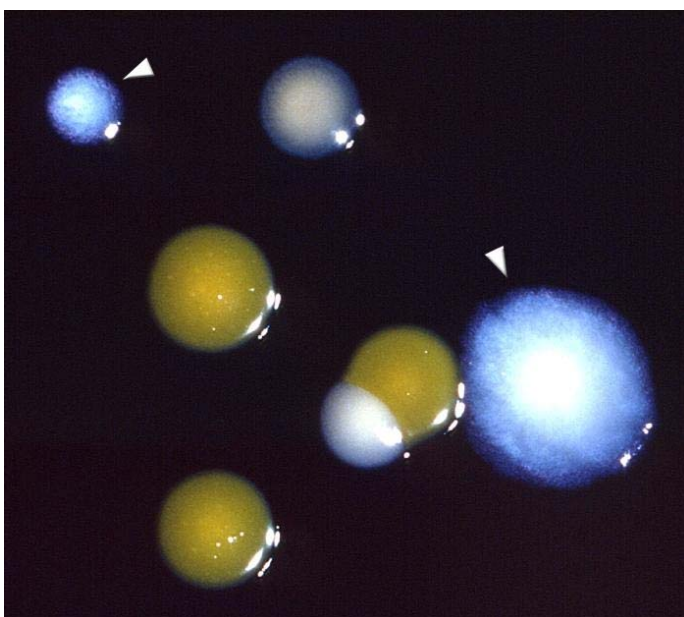
Kweekmethoden maken gebruik van de eigenschap van een bacterie om zich te kunnen vermenigvuldigen. Dit kan vermenigvuldiging op agarplaten zijn, die dusdanig van samenstelling zijn dat alle essentiële voedingsstoffen voor legionella aanwezig zijn. Ook kan gebruik worden gemaakt van cellen, zoals amoeben, waarin legionella zich intracellulair kan vermenigvuldigen. In dit hoofdstuk worden de methoden die zijn gebaseerd op kweken weergegeven.

3.1 Kweek op BCYE-platen

3.1.1 *NEN 6265 en ISO11731*

De gouden standaard voor detectie van legionella in watermonsters is de kweekmethode op Buffered Charcoal Yeast extract (BCYE)-platen. Legionella is een bacterie die voor groei bepaalde specifieke voedingseisen heeft. Zo zijn L-cysteïne en ijzer essentieel. Verder verloopt de groei optimaal bij een vrij nauwe pH-range. Op basis van deze eigenschappen is een optimale voedingsbodem voor legionella gedefinieerd op basis van het BCYE-medium. De kweekmethode op BCYE-platen is vastgelegd in een Nederlandse norm (NEN 6265:2007). Volgens deze methode worden eventuele legionellabacteriën in het monster eerst geconcentreerd door filtratie van het monster over een 0,2 µm filter, waarna de bacteriën van het filter worden losgemaakt via sonicatie van het filter in een potje met water en glasparels. Het uiteindelijke concentraat wordt uitgeplaat op BCYE-platen.

Legionellakolonies op BCYE-platen hebben een karakteristieke morfologie met een korrelige structuur en een matglazen uiterlijk (zie Figuur 2, legionellakolonies zijn aangeduid met een pijl). Er kunnen kleurvariaties van de kolonies voorkomen van melkachtig wit tot groen of paars. Sommige legionellasoorten vermenigvuldigen zich sneller dan anderen en vormen hierdoor sneller zichtbare kolonies en zijn eerder en gemakkelijker te bepalen.



Figuur 2 Legionellakolonies op een BCYE-plaat

Doordat de kweekmethode weinig selectief is, groeien ook andere bacteriën (bijgroei) dan legionella op de platen. De groei van legionellabacteriën kan in aanwezigheid van veel bijgroei geremd worden. Aan de platen kunnen antibiotica toegevoegd worden om bijgroei te onderdrukken. Indien het een monster betreft waarin veel bijgroei verwacht wordt, kan het monster worden uitgeplaat op MWY-platen. Dit zijn BCYE-platen met een aangepaste samenstelling aan antibiotica (zie Tabel 1). Ook kan het monster gepasteuriseerd worden. Hierbij wordt een gedeelte van het monster gedurende dertig minuten verhit bij 50°C. Zowel het gepasteuriseerde als het niet-gepasteuriseerde monster worden vervolgens uitgeplaat. Pasteurisatie reduceert de bijgroei, maar heeft ook invloed op de opbrengst van legionella.

De internationale norm voor kweek van legionellabacteriën op BCYE-platen is ISO 11731-2:2007. Deze wijkt op een aantal punten af van de Nederlandse norm. Het belangrijkste verschil is de iets afwijkende samenstelling van de BCYE-platen (zie Tabel 1). Ook volgens deze norm kunnen monsters worden uitgeplaat op platen met antibiotica (GVPC-platen).

Tabel 1 Samenstelling BCYE-platen volgens NEN 6265 en ISO 11731

NEN 6265	MWY (NEN)	ISO 11731	GVPC (ISO)
IJzerpyrofosfaat	IJzerpyrofosfaat	IJzerpyrofosfaat	IJzerpyrofosfaat
L-cysteïne	L-cysteïne	L-cysteïne	L-cysteïne
Oxoglutaarzuur	Oxoglutaarzuur	α -ketoglutaraat	α -ketoglutaraat
Pimaricine			
Actieve poederkool	Actieve poederkool	Actieve poederkool	Actieve poederkool
Yeast-extract	Yeast-extract	Yeast-extract	Yeast-extract
Agar	Agar	Agar	Agar
Gebufferd met	Gebufferd met	Gebufferd met	Gebufferd met
ACES:	ACES:	ACES:	ACES:
pH 6,8	pH 6,8	pH 6,9	pH 6,9
Eventueel:	Glycine		Glycine
Polymixine-B-sulfaat	Polymixine-B-sulfaat		Polymyxine-B-sulfaat
Cefazoline	Anisomycine		Cycloheximide
	Vancomycine		Vancomycine
	Broomthymolblauw		
	Broomcresolpurper		

3.1.2 *Bevestigen en typeren*

Indien kolonies zijn gevormd op de plaat dient bevestigd te worden of het daadwerkelijk een legionellakolonie betreft. Dit gebeurt door de kolonie door te strijken op platen mét en platen zónder L-cysteïne. Indien het legionella betreft, treedt geen groei op op platen zonder L-cysteïne en wel op de platen met L-cysteïne. Bevestiging kan ook met behulp van de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) worden uitgevoerd, waarbij op basis van het DNA van de bacterie onderscheid wordt gemaakt tussen legionella en andere bacteriën.

Om vast te stellen om welke legionellasoort het gaat kunnen vervolgens verschillende typeringsmethoden worden gebruikt. Met serologische testen kan onderscheid worden gemaakt tussen *L. pneumophila* serogroep 1, *L. pneumophila* serogroep 2-14 en *L. non-pneumophila*. Ook kunnen moleculair biologische methoden worden gebruikt, zoals PCR of sequencing, om op basis van DNA-basepaarvolgorde (sequentie) kolonies te typeren.

Aan de hand van het aantal legionellakolonies op een plaat en het onderzocht volume water kan de concentratie legionellabacteriën in het water worden berekend. De theoretische detectielimiet van de kweekmethode is afhankelijk van de hoeveelheid water die gefiltreerd wordt en het deel van het concentraat dat wordt uitgeplaat op BCYE-platen. De NEN 6265 schrijft voor dat tenminste 0,5 liter water gefiltreerd dient te worden. Bij filtratie van 0,5 liter water er en uitplaten van 1/50e deel van het concentraat bedraagt de detectielimiet 100 kolonievormende eenheden (kve) per liter. Bij filtratie van 1 liter bedraagt dit 50 kve per liter.

3.1.3 *Invloed van de methode op de detectie*

Uit een studie, uitgevoerd door KWR Watercycle Research Institute, waarbij voedingsbodems, bereid met medium volgens de NEN 6265-methode, de ISO-methode en commercieel verkrijgbare voedingsbodems (GVPC en MWY) zijn vergeleken, blijkt dat voor relatief schone drinkwatermonsters de NEN 6265-methode de hoogste opbrengst voor verschillende legionellasoorten geeft (Veenendaal en In 't Veld, 2005). Echter, voor koelwatermonsters wordt op de platen bereid volgens zowel de NEN 6265- als de ISO-methode meer bijgroei gezien dan op de commercieel verkrijgbare voedingsbodems GVPC en MWY. Voor koelwatermonsters wordt dan ook op de GVPC- en MWY-voedingsbodems meer legionella aangetoond (Veenendaal en In 't Veld, 2005). Welke voedingsbodems de beste resultaten geven hangt dus sterk af van het type water dat onderzocht wordt. De selectieve platen (platen met antibiotica) hebben vooral invloed op de opbrengst van *L. non-pneumophila* (Lee et al., 1993). Deze kan meer dan tien keer lager zijn dan wanneer het monster op BCYE-platen zonder antibiotica wordt uitgeplaat, terwijl dit op *L. pneumophila* nauwelijks effect heeft (Ta et al., 1995). Veranderingen in de samenstelling van de BCYE-platen die worden aangebracht om de selectiviteit te verbeteren hebben vaak een negatief gevolg voor de opbrengst. Zowel de samenstelling en de pH van BCYE-platen, als de incubatietemperatuur van de platen is van invloed op de legionellasoorten en de aantallen die worden aangetoond (In 't Veld en De Wagt, 2002; Veenendaal en In 't Veld, 2005; Veenendaal en Van der Kooij, 2007; Veenendaal en Van der Kooij, 2008). Naast samenstelling van de platen hebben ook monsternamen en concentratiemethoden effect op de opbrengst van legionellabacteriën (Ta et al., 1995). Vanwege het effect van verschillende methoden op de legionellaopbrengst is standaardisatie essentieel om resultaten te kunnen interpreteren en vergelijken. Echter, ook met een

gestandaardiseerde methode, zoals de NEN 6265, worden nog verschillen tot een factor 10 gevonden tussen laboratoria (Van der Kooij et al., 2003).

3.1.4 Nadelen van de kweekmethode op BCYE-platen

Nadeel van de kweekmethode op BCYE-platen is dat minimaal zeven dagen geïncubeerd moet worden voordat legionellakolonies goed zichtbaar zijn. Vervolgens is bevestiging nodig om aan te tonen dat het daadwerkelijk legionella betreft. Afhankelijk van de gebruikte methode kan dit nog enkele dagen in beslag nemen. De kweekmethode heeft dus een lange doorlooptijd. Daarnaast kent de methode een hoge variatie tussen laboratoria (Van der Kooij et al., 2003) en kan de groei van legionella op plaat worden geremd door de aanwezigheid van bijgroei. Verder is in verschillende studies aangetoond dat de kweekmethode op BCYE-platen een onderschatting van het aantal levende legionellabacteriën kan geven (Hussong et al., 1987, Amann et al., 1995; Byrd et al., 1991; Delgado-Viscogliosi et al., 2005; Dusserre et al., 2008; Gião et al., 2009). In een voedselarme omgeving kunnen legionellabacteriën een levensvatbaar, maar niet kweekbaar stadium ingaan (viable but nonculturable, VBNC), waardoor detectie via kweek op BCYE-platen vaak niet mogelijk is (England et al., 1982; Yamamoto et al., 1996). Mogelijk dat met het niet kunnen aantonen van VBNC-cellen een belangrijk deel van de voor de volksgezondheid relevante legionellabacteriën gemist wordt (Steinert et al., 1997). Wat het aandeel is van VBNC-cellen in watermonsters is niet bekend en verschilt waarschijnlijk per type water. Ook kunnen legionellabacteriën aanwezig zijn in amoeben en daardoor worden gemist met de kweekmethode op plaat. Daarnaast zijn er legionellasoorten die in het geheel niet kweekbaar zijn op platen, maar alleen intracellulair in andere organismen kunnen groeien, de zogenaamde legionella-like amoebal pathogens (LLAPs, zie paragraaf 3.2). Ook deze worden gemist met de kweekmethode.

3.2 Amoebekweek

Legionellabacteriën kunnen in het milieu groeien in amoeben (Rowbotham, 1980). Dit gegeven heeft geleid tot het gebruik van amoeben voor de isolatie van legionella uit klinische monsters (Rowbotham et al., 1983; La Scola et al., 2001) en milieumonsters (Thomas et al., 2006; 2008; Barbaree et al., 1986). Bij deze amoebekweekmethode wordt een monster (na concentratie) aangebracht op amoeben. Eventueel aanwezige legionellabacteriën kunnen zich in de amoeben vermeerderen. Deze vermeerderde legionellabacteriën worden vervolgens aangetoond via kweek op BCYE-platen of via microscopie. Het blijkt dat met de amoebekweekmethode ook VBNC-bacteriën worden aangetoond die met de standaard kweekmethode op BCYE-platen worden gemist (Garcia et al., 2007; Alleron et al., 2008; Sanden et al., 1992; Steinert et al., 1997). Zo toonde Steinert et al. (1997) aan dat *L. pneumophila* na incubatie in water na verloop van tijd niet meer aantoonbaar is met kweek op BCYE-platen. Na toevoeging van amoeben werden de legionellabacteriën weer kweekbaar op BCYE-platen. Kennelijk gaan legionellabacteriën onder bepaalde condities een VBNC-stadium in en komen na een incubatiestap met amoeben weer in een kweekbaar stadium. Ook desinfectieprocedures kunnen er toe leiden dat legionellabacteriën niet meer detecteerbaar zijn met behulp van BCYE-kweek, maar nog wel levend. Zo toonde Garcia et al. (2007) aan dat na behandeling met chloor legionellabacteriën niet meer kweekbaar waren op platen, maar nog wel aantoonbaar met de amoebekweek.

Met de amoebekweekmethode kunnen ook de zogenaamde legionella-like amoebal pathogens (LLAPs) worden aangetoond (Rowbotham, 1983; Fallon en

Rowbotham, 1990). Dit zijn bacteriën die op legionella lijken, maar met kweek op BCYE-platen nog nooit zijn geïsoleerd. Hoeveel patiënten ziek worden als gevolg van LLAPs is onbekend, immers met de standaard klinisch diagnostische methoden zoals urineantigeentest en kweek op BCYE-platen worden ze niet aangetoond.

In hoeverre amoebekweek geschikt is als standaard detectiemethode voor legionella in watermonsters is onduidelijk. Het blijkt dat er verschil is tussen verschillende amoebesoornten in gevoeligheid voor infectie met verschillende legionellasoornten (Dey et al., 2009). Sommige legionellasoornten blijken helemaal niet te groeien in bepaalde amoebesoornten (Schalk et al., 2010; Moffat en Tompkins, 1992; Neumeister et al., 1997). Verder heeft de methode een lange doorlooptijd omdat na de kweekstap in amoeben nog een kweekstap op BCYE-platen plaatsvindt. Het RIVM heeft de amoebekweekmethode geoptimaliseerd waarbij na de kweekstap in amoeben, de vermeerderde legionellabacteriën worden aangetoond met behulp van PCR. Dit levert een aanzienlijke tijdwinst op (Schalk et al., 2010). In hoeverre deze amoebekweek-PCR-methode toegepast kan worden op praktijkmonsters moet nog verder onderzocht worden. Met de amoebekweekmethode kan alleen een uitspraak worden gedaan over de aan- of afwezigheid en niet over de aantallen legionellabacteriën in water.

4 Moleculairbiologische methoden

In dit hoofdstuk worden de methoden voor de detectie van legionella behandeld die gebaseerd zijn op technieken uit de moleculaire biologie.

4.1 PCR

Legionella bevat DNA dat kan worden aangetoond via PCR. Dit is een enzymatische methode waarbij specifiek DNA met een bepaalde sequentie wordt vermeerderd en vervolgens zichtbaar gemaakt. Hiertoe wordt een watermonster eerst gefiltreerd en vervolgens wordt uit het concentraat of direct van het filter DNA geïsoleerd via een DNA-extractiemethode. Het DNA kan worden aangetoond door middel van PCR. Het type PCR bepaalt welke legionellasoorten gedetecteerd kunnen worden. De sequentie van het geconserveerde 16S-rRNA-gen vertoont veel overeenkomsten tussen de verschillende legionellasoorten, waardoor met een 16S-PCR alle legionellasoorten gedetecteerd kunnen worden. Ook met een PCR gericht op het 23S-rRNA-gen (Nazarian et al., 2008) kunnen alle legionellasoorten gedetecteerd worden. Het *macrophage infectivity potentiator (mip)*-gen vertoont grote verschillen in sequentie tussen soorten. Daardoor kunnen voor het *mip*-gen PCRs worden ontworpen waarmee specifiek bepaalde legionellasoorten kunnen worden gedetecteerd, bijvoorbeeld *L. pneumophila* (Wullings et al., 2007). Ook PCR-methodes gericht op andere genen, zoals het *L. pneumophila dotA*-gen (Yanez et al., 2007), zijn beschreven. De specificiteit van de PCR-methode bepaalt of veel vals-positieven worden verkregen. Ook andere bacteriën, behalve legionella, hebben bijvoorbeeld een 16S-rRNA-gen en kruisreactie kan leiden tot vals-positieve resultaten.

Een veel toegepaste methode tegenwoordig is kwantitatieve PCR (qPCR) waarmee de hoeveelheid DNA in het monster gekwantificeerd kan worden. Omdat PCR gevoelig is voor remming door aanwezigheid van bepaalde stoffen in het monster kan een interne positieve controle worden meegenomen in de PCR als controle op het goed verlopen van de PCR. Hierbij wordt een stukje DNA aan de PCR toegevoegd en ook gekwantificeerd via PCR. Hiermee kan berekend worden wat de mate van remming is tijdens de PCR. Als deze controle al tijdens de extractie wordt toegevoegd wordt een beeld gekregen van de efficiëntie van de DNA-extractie en de PCR samen (Wullings et al., 2007). In Nederland is een norm ontwikkeld voor detectie van *L. pneumophila* DNA in water door middel van PCR (ontwerp-NEN 6254) gericht op het *mip*-gen van *L. pneumophila*.

Er zijn verschillende commerciële methoden beschikbaar voor detectie van legionella-DNA gebaseerd op PCR, zoals PCR-kits gericht op detectie van DNA van alle legionellasoorten (*L. spp.*) van onder andere Biovisible, Ingene, Minerva labs, BioRad en Genesystems en PCR-kits gericht op detectie van *L. pneumophila* DNA van onder andere Qiagen, Geneproof, Biorad en Genesystems. De PCR-methoden van Biorad en Genesystems zijn gevalideerd door Afnor, het Franse normalisatie-instituut.

Een PCR heeft grofweg een detectielimiet van 2-15 genoom kopieën per reactie (Yanez et al., 2007; Wullings et al., 2002). Hoeveel genoom kopieën per liter water kunnen worden aangetoond, hangt onder andere af van de hoeveelheid water die wordt gefiltreerd, de hoeveelheid concentraat die in bewerking wordt genomen voor de DNA-isolatie en het volume van het uiteindelijke isolaat dat wordt gebruikt voor een PCR. De *L. pneumophila* PCR zoals beschreven in

ontwerp-NEN 6254 heeft een detectielimiet van 5 *mip*-kopieën per PCR en 100 *mip*-kopieën/L bij onderzoek van 0,5 liter water (Wullings et al., 2007). In een beperkte validatiestudie zijn ook overige prestatiekenmerken onderzocht. Hieruit blijkt dat de specificiteit van de methode hoog is: van 26 van de 28 monsters die met kweek positief waren voor *L. pneumophila* werd ook met de PCR-methode een positief resultaat behaald. Wel werden voor praktijkmonsters met de PCR-methode hogere aantallen *L. pneumophila* gevonden dan met de kweekmethode (Wullings et al., 2007).

4.1.1 *Onderscheid dode en levende bacteriën*

Het grote voordeel van PCR is dat binnen één dag resultaat wordt verkregen. Daarnaast worden zowel de kweekbare als de VBNC-bacteriën gedetecteerd en, afhankelijk van de gebruikte PCR-methode, (een deel van) de LLAPs. PCR heeft echter als nadeel dat geen uitsluitel gegeven kan worden over de levensvatbaarheid van de aangetoonde legionellabacteriën. Waarschijnlijk verdwijnt vrij DNA bij de filtratiestap voor een groot deel door het filter, maar DNA wat aanwezig is in dode, intacte bacteriën zal wel geïsoleerd worden en aangetoond met de PCR. Het is onduidelijk hoe lang het duurt voordat dode bacteriën lyseren en het DNA vrijkomt in het water. Indien monsters worden genomen na een reinigingsmaatregel zal het bij detectie via PCR onduidelijk zijn of het hier gaat om levende of dode bacteriën (Wullings et al., 2007; Dusserre et al., 2008). Zo laat een studie van Dusserre et al. (2008) zien dat na chloorinactivatie *L. pneumophila*-cellen niet meer te detecteren zijn met kweek op BCYE-platen na een behandeling met een lage hoeveelheid chloor, terwijl met PCR geen reductie in PCR-signaal wordt verkregen ten opzichte van het onbehandelde monster, ook niet na filtratie van het monster. Met een detectiemethode waarmee levende bacteriën kunnen worden aangetoond (ChemChrome V6, zie paragraaf 5.1) worden bij de behandeling met laag chloor nog wel levende bacteriën aangetoond, weliswaar minder dan ten opzichte van het onbehandelde monster. Ook met een amoebekweekmethode laat men zien dat er nog levende bacteriën aanwezig zijn. Bij een hoge hoeveelheid chloor is met geen van de methoden nog legionella aantoonbaar, ook niet met PCR. Deze studie laat zien dat PCR VBNC-legionellabacteriën aantoonbaar, maar ook dode, nog niet gelyseerde bacteriën. Wullings et al. (2007) beschrijft dat na thermische desinfectie legionellabacteriën niet meer detecteerbaar zijn met kweek, terwijl met PCR geen reductie in legionella-aantallen wordt gevonden. Omdat niet altijd duidelijk is wat de historie van een waterleidingsstelsel is, is het belangrijk om erg voorzichtig te zijn met het interpreteren van resultaten die zijn verkregen met PCR, omdat niet duidelijk is of het dode, kweekbare of VBNC-legionellabacteriën betreft (Wullings et al., 2007).

4.1.2 *Vergelijking PCR met BCYE-kweekmethoden*

In verschillende studies is de kweekmethode op plaat vergeleken met PCR; kweekpositieve monsters worden over het algemeen ook positief bevonden met een PCR-methode (Oesterholt et al., 2009; Diederens et al., 2007, Wullings et al., 2007). Met de PCR-methode worden meer samples positief bevonden dan met kweek (Yanez et al., 2007; Buchbinder et al., 2002; Dutil et al., 2006, Wullings et al., 2005; Diederens et al., 2007). Door Wullings et al. (2005) zijn 97 drinkwatermonsters afpompstation onderzocht met behulp van de 16S-PCR gericht op detectie van alle legionellasoorten en met behulp van kweek op agarplaten. Door Diederens et al. (2007) zijn 357 watermonsters van met name leidingwater onderzocht met behulp van de 16S-PCR gericht op detectie van alle legionellasoorten, de *mip*-PCR gericht op detectie van *L. pneumophila* en met

behulp van kweek. Het percentage positieve monsters is weergegeven in Tabel 2.

Tabel 2 Vergelijking BCYE-kweek en PCR-resultaten

	Wullings et al., 2005 N=97	Diederen et al., 2007 N=357
16S PCR	100%	82,6%
Mip-PCR		2,5%
Kweek	0%	2,3% L. pneu 0,6%/ L. non-pneu 1,7%

Uit de tabel blijkt dat in alle watermonsters afpompstation (Wullings et al., 2005) legionella-DNA wordt aangetroffen, terwijl resultaten met de kweekmethode negatief waren. Ook in de watermonsters van leidingwaterinstallaties (Diederen et al., 2007) wordt in het merendeel van de monsters legionella-DNA aangetroffen, terwijl slechts in 2,3% van de monsters kweekbare legionellabacteriën worden aangetroffen. Uit deze studies blijkt dat 16S-PCR geen geschikte methode is om het beheer van een leidingwaterinstallatie te monitoren. Immers, het water dat het waterleidingbedrijf verlaat bevat al veel legionella-DNA (meer dan 1000 kopieën per liter, Wullings et al., 2007), waardoor het te verwachten is dat het merendeel van de monsters genomen in een leidingwaterinstallatie ook positief zullen zijn, zoals ook blijkt uit de studie van Diederen et al. (2007). Een positief resultaat voor een 16S-PCR geeft geen informatie over mogelijke groei van legionella in een installatie.

In een studie van KWR (Wullings en Van der Kooij, 2006; Wullings et al., 2005) werd aangetoond dat legionella-DNA voorkomt in grondwater, oppervlaktewater, watermonsters genomen tijdens het zuiveringsproces, en gezuiverd drinkwater. Het merendeel van de genomen monsters was positief met PCR, terwijl resultaten met de kweekmethode negatief waren (Wullings en Van der Kooij, 2006; Wullings et al., 2005). Positieve monsters werden nader geanalyseerd met behulp van sequentieanalyse. Een deel van de geanalyseerde sequenties betrof legionellasoorten die ooit gerelateerd zijn aan ziekte, waaronder *L. anisa* (0,5%) en *L. pneumophila* (2,5%) en 65% betrof nog niet beschreven legionellasoorten, waarvan niet bekend is of deze ziekte kunnen veroorzaken. Mogelijk dat het hier soorten betreft die bij voorkeur groeien onder koude omstandigheden en die niet kweekbaar zijn op BCYE-platen (Wullings en Van der Kooij, et al., 2006). De relevantie van deze legionellasoorten voor de volksgezondheid is onduidelijk.

4.1.3 Viability-PCR

Onlangs zijn PCR-methoden ontwikkeld waarbij door middel van een voorbehandelingstap van het monster wel onderscheid kan worden gemaakt tussen dood en levend (viability-PCR). Hierbij wordt een chemische stof toegevoegd aan het monster die alleen binnendringt in dode bacteriën en daar aan het DNA bindt, waardoor het DNA van deze bacteriën niet meer beschikbaar is voor de PCR (Chang et al., 2009; Delgado-Viscogliosi et al., 2009; Chen en Chang, 2010). Een alternatieve methode is een PCR die gericht is op mRNA, wat alleen voorkomt in levende bacteriën (Kobayashi et al., 2009). De toepasbaarheid van deze methoden dient nog te worden uitgetest op drinkwatermonsters.

4.2 Legionella-chip

Een nieuwe methode voor moleculaire detectie van legionella is de legionella-chip. Deze is ontwikkeld door TNO-Zeist, Streeklaboratorium Haarlem en Waterbedrijf Vitens en zal op de markt worden gebracht door het bedrijf Legyon wat is gelieerd aan TNO-TB en Vitens. Met de legionella-chip kan op een snelle manier legionella-DNA gedetecteerd worden in watermonsters en kan bovendien onderscheid worden gemaakt tussen *L. pneumophila* serogroep 1, *L. pneumophila* serogroep 2-14 en *L. non-pneumophila*. Ook wordt de aanwezigheid van *L. anisa* aangeduid. Indien het aangetoonde DNA tot de soort *L. pneumophila* behoort kan de chip tevens een uitspraak doen over het feit of het een bekend ziekteverwekkend *L. pneumophila*-stam betreft. Tevens kan de chip aantonen of er sprake is van mengmonsters van *L. pneumophila* en *L. non-pneumophila* maar ook van twee of meer verschillende *L. pneumophila*-stammen. De chip geeft alleen informatie over de aan- of afwezigheid van legionella in het geteste water en niet over de aantallen. De doorlooptijd van het legionella-chip-analyseproces is circa vijf uur.

Net als bij andere PCR-methoden bestaat de methode uit een filtratiestap, gevolgd door DNA-isolatie en PCR. Het PCR-product wordt geanalyseerd met behulp van de legionella-chip. Omdat de chip informatie bevat over welke *L. pneumophila*-stammen in Nederland werden aangetroffen bij patiënten kan de chip onderscheid maken tussen bewezen ziekteverwekkende en niet-ziekteverwekkende *L. pneumophila*-stammen (IJzerman et al., 2010). Alleen voor de soort *L. pneumophila* kan de chip onderscheid maken tussen ziekteverwekkende en niet-ziekteverwekkende stammen. Andere ziekteverwekkende soorten, zoals bijvoorbeeld *L. longbeachae* en *L. anisa*, zal door de chip worden aangeduid als aanwezigheid van een niet-ziekteverwekkende legionellabacterie. Tevens doet de chip een uitspraak over de aanwezigheid van *L. anisa*. Verschuivingen binnen de soort *L. pneumophila* zullen gemonitord moeten worden om eventuele nieuw opkomende ziekteverwekkende stammen te identificeren. Voor toepassing in andere landen zal onderzoek moeten plaatsvinden naar het spectrum aan voorkomende stammen van *L. pneumophila* bij patiënten en in de omgeving.

Omdat de chip zich richt op detectie van DNA kan ook met deze methode geen onderscheid worden gemaakt tussen dood of levend. Wel is een voorbehandelingsmethode ontwikkeld, de zogenaamde dead-or-alive (DOA)-test, waardoor alleen levensvatbare bacteriën worden gedetecteerd. Het principe van de DOA-test is vergelijkbaar met het principe van de viability-PCR (paragraaf 4.1.3). De legionella-chip blijkt een goede voorspellende waarde te hebben voor bewezen pathogeen of niet-pathogeen zijn van geïsoleerde *L. pneumophila*-stammen afkomstig van patiënten of afkomstig uit het milieu (IJzerman et al., 2010). Of de methode ook geschikt is voor het testen van drinkwatermonsters zal moet blijken uit nader onderzoek.

4.3 FISH

Met FISH (fluorescent *in situ* hybridization) wordt 16S ribosomaal RNA (rRNA) van legionella gedetecteerd met behulp van DNA probes (Steinert et al., 1997; Buchbinder et al., 2002). Samples worden hiertoe eerst gefixeerd met formaldehyde, waarna hybridisatie wordt uitgevoerd met een fluorescent gelabelde DNA probe. Vervolgens kunnen de legionellabacteriën zichtbaar worden gemaakt met behulp van fluorescentie microscopie. Alleen levende legionellabacteriën bevatten genoeg rRNA om aangetoond te kunnen worden. FISH kent een vrij hoge bepalingsgrens van 1000 cellen/l (Wullings et al., 2002), wat een nadeel is ten opzichte van andere detectiemethoden. Ook andere studies (Dutil et al., 2006; Buchbinder et al., 2002) bevestigen dat FISH minder gevoelig is dan de kweekmethode; samples die positief resultaat gaven met kweek waren in enkele gevallen negatief met FISH. Andersom waren echter ook een aantal samples negatief in de kweekmethode, mogelijk omdat niet-kweekbare legionellabacteriën wel met FISH zijn aan te tonen (Dutil et al., 2006).

Een mogelijkheid om de gevoeligheid van FISH te verhogen is beschreven door Dutil et al. (2006). Zij kweeken het te onderzoeken sample kort in voedselarm medium (R2A-medium). Deze kweekstap activeert legionella waardoor de hoeveelheid bacteriën én de hoeveelheid rRNA in de bacteriën toeneemt en dus ook het fluorescentiesignaal toeneemt. In een onderzoek naar legionella in tandartspraktijken worden met de gecombineerde methode aanzienlijk meer positieve samples verkregen dan met de kweekmethode (63% vs. 18%). Alle samples die positief waren met kweek waren met deze gecombineerde FISH-methode ook positief. De doorlooptijd van deze gecombineerde methode is twee dagen en dus aanzienlijk korter dan de kweekmethode.

5 Immunologische detectie

Immunologische detectie van legionellabacteriën berust op detectie van legionella-eiwitten met behulp van antilichamen. De antilichamen zijn gelabeld waardoor ze zichtbaar gemaakt kunnen worden, bijvoorbeeld via microscopie of met behulp van een laser bij fluorescent gelabelde antilichamen of via chromatografie bij chromogeen (kleurstofvormende stof) gelabelde antilichamen. In dit hoofdstuk wordt een aantal verschillende immunologische detectiemethoden beschreven.

5.1 Immunofluorescentie

Direct fluorescent antibody (DFA) staining berust op directe detectie van legionellabacteriën in een monster met fluorescent gelabelde antilichamen die specifiek binden aan alle legionellasoorten of bepaalde legionellaserotypes. Deze techniek heeft echter een lage gevoeligheid ten opzichte van de kweekmethode op BCYE-platen en geeft veel achtergrond en kruisreactie met andere bacteriën (Edelstein et al., 1989; Flournoy et al., 1988). Om de achtergrond te verlagen bleek de indirecte fluorescentie assay (IFA) een goed alternatief, waarbij een specifiek antilichaam gedetecteerd wordt met een tweede antilichaam wat gelabeld is met een fluorochroom. Ook IFA kent echter een lage gevoeligheid in vergelijking tot de kweekmethode (Alary en Joly, 1992).

Een andere immunofluorescente detectiemethode betreft detectie via solid-phase cytometry (Aurell et al., 2004). Hierbij worden monsters gefiltreerd waarna incubatie met gelabelde monoclonale antilichamen plaatsvindt. Deze antilichamen binden aan legionella-eiwitten en worden vervolgens gedetecteerd met fluorescent gelabelde tweede antilichamen. Het filter wordt vervolgens gescand met een laser en het resulterende fluorescentie signaal wordt gedetecteerd. Met deze methode kan binnen vier uur specifiek de hoeveelheid *L. pneumophila* bepaald worden in watermonsters. De detectiegrens bedraagt 1 cel in 100 ml water (Aurell et al., 2004). Met deze methode worden in vergelijking met de kweekmethode op BCYE-platen meer watermonsters positief bevonden en is het aantal gedetecteerde legionellabacteriën ook hoger (Aurell et al., 2004). Het nadeel van deze immunofluorescentie detectiemethoden is dat geen onderscheid wordt gemaakt tussen dode en levende legionellabacteriën. Immers, antilichamen kunnen ook binden aan niet-levensvatbare legionellabacteriën.

Recent is een methode beschreven waarbij specifieke immunofluorescentie detectie van legionella wordt gecombineerd met detectie van een bacteriële 'viability' marker (Delgado-Viscogliosi et al., 2005). Deze marker (ChemChrome V6 van Chemunex) bestaat uit een niet-fluorescente precursor die na opname door de bacterie wordt gesplitst in een groen fluorescerend product. Dit gebeurt door esterases, die alleen aanwezig zijn in levende bacteriën. Detectie gebeurt via epifluorescentie microscopie. Deze immunological double-staining (IDS)-methode is vergeleken met de klassieke kweekmethode (Delgado-Viscogliosi et al., 2005). Voor samples met een hoge concentratie legionella kwamen de waarden voor de IDS-methode goed overeen met de kweekmethode. Voor samples met een lage concentratie legionella werd met de IDS-methode een hogere hoeveelheid legionella bepaald wat aangeeft dat deze methode een beter lineair bereik heeft in vergelijking met de kweekmethode. De IDS-methode resulteert in meer positieve samples (32 van de 38 onderzochte watersamples)

dan de kweekmethode (24 van de 38). De bepalingsgrens van de IDS-methode hangt af van de hoeveelheid water die wordt gefiltreerd en het aantal onderzochte microscoopvelden en bedraagt 176 legionellacellen per liter voor 100 ml geanalyseerd water en 100 onderzochte microscoopvelden. Theoretisch kan deze grens worden teruggebracht naar 1 cel per gefiltreerd volume (= 1 cel per 100 ml) indien het hele membraanfilter wordt onderzocht. De doorlooptijd van de IDS-methode is enkele uren.

5.2 Immunochromatografie

De FastPath-detectiemethode van Nalco berust op immunochromatografische detectie van *L. pneumophila* serogroep 1. Het is een methode waarbij legionellaeiwitten worden gedetecteerd met behulp van antilichamen, gelabeld met een chromogeen. Het principe van de Fastpath-methode is vergelijkbaar met het principe van de urineantigeentest. Een dip-stick wordt in het te onderzoeken concentraat gedoopt en indien na 25 minuten op het uitslagscherm een rood streepje verschijnt is dit een aanwijzing dat *L. pneumophila* serogroep 1 aanwezig is. Deze methode is voor detectie van legionella in koelwatermonsters vergeleken met de ISO-11731-kweekmethode en met een *L. pneumophila mip*-PCR (Oosterholt et al., 2009). In 47 van de 52 geteste monsters gaven alle drie de methoden interpreteerbare resultaten. In 3 van de 47 beoordeelde monsters is de Fastpath-methode positief terwijl de kweek negatief is. Bij 2 van deze monsters is ook de PCR negatief en betreft het waarschijnlijk vals-positieve resultaten. In 4 van de 47 resultaten is de FastPath negatief terwijl met kweek wel *L. pneumophila* serogroep 1-kolonies zijn geïsoleerd en betreft het dus vals-negatieve resultaten. Interpretatie van het uitleesvenster van de Fastpath-methode blijkt soms lastig te zijn (Oosterholt et al., 2009).

6 Betekenis alternatieve methoden

Monsternamen als onderdeel van het beheersplan voor legionellapreventie is bedoeld om te monitoren of de toegepaste beheersmaatregelen effectief zijn, met andere woorden of de groei van legionella in een leidingwaterinstallatie wordt voorkomen. In het Waterleidingbesluit is vastgesteld dat dit dient te gebeuren conform de NEN 6265 en dat de norm < 100 kolonievormende eenheden per liter (KVE/L) is. Het aantonen van legionellabacteriën duidt op groei van legionella in de installatie en geeft aan dat aanvullende maatregelen nodig zijn om legionella te verwijderen en groei te voorkomen. Het aantonen van legionella conform de NEN 6265 heeft een aantal beperkingen. De methode heeft een lange doorlooptijd van meer dan 7 dagen waardoor het lang duurt voor informatie over de veiligheid van het watersysteem voor wat betreft de aantallen legionellabacteriën beschikbaar is. Verder kan in monsters waar veel andere micro-organismen aanwezig zijn de aanwezigheid van legionella gemaskeerd worden door bijgroei op de agarplaten. Daarnaast kan legionella onder bepaalde omstandigheden een niet-kweekbaar stadium ingaan (VBNC), waardoor de bacterie gemist wordt met de NEN 6265 kweekmethode, terwijl deze nog wel infectieus is. Bovendien zijn bepaalde legionellasoorten helemaal niet kweekbaar. (Hussong et al., 1987; Garcia et al., 2007; Veenendaal en in 't Veld, 2005; van der Kooij et al., 2003). De legionella-stammen die het meest worden aangetroffen bij patiënten, worden met de kweekmethode op agarplaten zelden aangetroffen in het milieu (den Boer et al., 2008). Mogelijk worden verkeerde bronnen bemonsterd of komen deze stammen voor in zeer lage concentraties (den Boer et al., 2008), maar het is ook niet uit te sluiten dat door beperkingen van de kweek-methode op agarplaten voor het opsporen van legionella in water bepaalde risicovolle situaties worden gemist.

De vraag is of alternatieve methoden of een combinatie van methoden in staat zijn een beter beeld te geven van het voorkomen van legionella in Nederland dan de kweekmethode en daarmee het risico op legionellabesmetting en eventuele gevolgen voor de volksgezondheid kunnen beperken. In Tabel 3 zijn voor een aantal methoden de kenmerken aangegeven, zoals de doorlooptijd van de methode, detectie van kweekbare, VBNC en dode bacteriën, of het een kwantitatieve of kwalitatieve methode betreft, welke legionellasoorten gedetecteerd worden en het principe van detectie.

Met kweekmethoden, zoals de NEN 6265 en amoëbe-kweek worden alleen levende bacteriën aangetoond, waarbij de amoëbe-kweek als voordeel heeft dat ook de VBNC-bacteriën kunnen worden aangetoond die met de NEN 6265 methode worden gemist. Met moleculair-biologische en immunologische methoden, die zich richten op detectie van DNA of eiwitten, worden ook VBNC-bacteriën aangetoond, maar daarnaast ook dode bacteriën. Methoden die gebruikmaken van bepaalde viability-kenmerken, zoals viability-PCR, FISH, en IDS richten zich wel op detectie van levende bacteriën, zowel (op agarplaten) kweekbare als VBNC-bacteriën. Echter, resultaten moeten met voorzichtigheid geïnterpreteerd worden. Het ten onrechte benoemen van legionellabacteriën als levend is niet uitgesloten, doordat bijvoorbeeld bepaalde viability-kenmerken nog aanwezig kunnen zijn in dode bacteriën. Het onderscheid tussen dood en levend is bijvoorbeeld van belang wanneer monsters worden genomen na een reinigingsmaatregel. Met moleculair-biologische en immunologische methoden bestaat het risico dat DNA of eiwitten van dode bacteriën wordt aangetoond en

is het dus niet mogelijk om een uitspraak te doen over de effectiviteit van de reinigingsmaatregel.

De amoëbe-kweek, legionella-chip en immunochromatografie zijn kwalitatieve methoden, waarmee alleen een uitspraak kan worden gedaan over de aan-of afwezigheid van legionella en niet over aantallen. Het is de vraag of een kwantitatief resultaat van belang is, omdat er (nog) geen gegevens beschikbaar zijn over de infectieuze dosis van legionella. Weliswaar is de kans op blootstelling hoger naarmate de legionella-concentratie hoger is. Bij toepassing van dergelijke kwalitatieve methoden is een norm van 100 KVE/L niet te handhaven en zou deze moeten worden aangepast in een norm van afwezigheid van legionella, waarbij het van belang is om vast te stellen wat de detectielimiet van een dergelijke methode dient te zijn.

Bepaalde methoden richten zich op detectie van alle legionellasoorten en bepaalde methoden enkel op detectie van *L. pneumophila* of bepaalde *L. pneumophila* stammen. Het hangt van het onderzoek af welke legionellasoorten gedetecteerd dienen te worden. Voor monsternamen in het kader van de wettelijk vereiste legionellapreventie is het van belang de detectie te richten op alle legionellasoorten. Voor het vaststellen van het blootstellingsrisico van een besmette installatie of voor bronopsporing zou eventueel kunnen worden volstaan met methoden die zich richten op de meest ziekteverwekkende stammen. Echter, voor bronopsporing is het van belang dat een isolaat wordt verkregen van de in het water aanwezige legionellabacterie om verdere typering en vergelijking met de stam die bij de patiënt is gevonden mogelijk te maken. Hiervoor zijn kweekmethoden essentieel.

Alternatieve methoden voor de NEN 6265 in het kader van legionellapreventie zijn alleen geschikt als met deze methoden groei van legionella in leidingwaterinstallaties vastgesteld kan worden. De aanwezigheid van legionella-DNA of legionella-eiwitten kunnen een indicatie zijn dat groei van de bacterie in de leidingwaterinstallatie heeft plaatsgevonden. Echter, omdat legionella-DNA ook al aanwezig is in het water dat de installatie binnenkomt, zoals blijkt uit de studie van Wullings en Van der Kooij (2006) kan met detectiemethoden die zich richten op detectie van DNA van alle legionellasoorten, zoals een 16S-PCR, geen uitspraak worden gedaan over groei van legionella in de installatie.

Naast het niet kunnen aantonen van de VBNC en niet-kweekbare legionellasoorten is een ander belangrijk nadeel van de kweekmethode op agarplaten dat de aanwezigheid van legionella gemaskeerd kan worden door bijgroei op de platen. Dit is met name aan de orde bij monsters met een hoog gehalte aan organisch materiaal en onopgeloste bestanddelen, zoals monsters afkomstig van koeltorens (Oesterholt et al., 2009). Methoden, zoals PCR of immunologische methoden, die zich specifiek richten op de detectie van legionella hebben mogelijk minder last van de storende effecten van andere micro-organismen, hoewel ook hiervoor remming en beperkte detectiegrens kunnen optreden (Yanez et al., 2007).

Tabel 3 Eigenschappen van verschillende methoden voor legionelladetectie

Methode	Doorlooptijd	Detectie kweekbare ¹ , VBNC, dode bacteriën	Kwantitatief/kwalitatief	Legionella Soorten	Principe van detectie
BCYE-kweek NEN 6265	> 7 dagen	Kweekbaar	Kwantitatief	L. spp	Groei
Amoebekweek	> 7 dagen	Kweekbaar VBNC	Kwalitatief	L. spp ²	Groei
PCR	1 dag	Kweekbaar VBNC dode	Kwantitatief	L. spp of L. pneu of andere soort	DNA
Viability-PCR	1 dag	Kweekbaar VBNC	Kwantitatief	L. spp of L. pneu of andere soort	DNA + viability-kenmerk
Legionella-chip	1 dag	Kweekbaar VBNC dode	Kwalitatief	L. spp en L. anisa en L. pneu SG ³ 1 L. pneu SG2-14 en pathogene L. pneu en mengcultures	DNA
Legionella-chip + DOA-test	1 dag	Kweekbaar VBNC	Kwalitatief	L. spp en L. anisa en L. pneu SG1 L. pneu SG2-14 en pathogene L. pneu en mengcultures	DNA + viability-kenmerk
FISH	1 dag	Kweekbaar VBNC	Kwantitatief	L. spp.	rRNA
Immuno-fluorescentie	1 dag	Kweekbaar VBNC dode	Kwantitatief	L. spp. of L. pneu	Eiwit
IDS	1 dag	Kweekbaar VBNC	Kwantitatief	L. spp.	Eiwit + viability-kenmerk
Immuno-chromatografie		Kweekbaar VBNC dode	Kwalitatief	L. pneu SG1	Eiwit

¹ Onder kweekbaar wordt hier verstaan bacteriën die kunnen groeien op agar-platen

² Welke legionellasoorten kunnen worden aangetoond hangt af van de amoebe-soort die wordt gebruikt

³ SG: serogroep

Zoals uit bovenstaande blijkt, hebben alternatieve methoden voor de NEN 6265 ieder hun eigen mogelijkheden en beperkingen. Hiertegenover staan de beperkingen van de NEN 6265. Nader onderzoek is nodig om de waarde van alternatieve methoden voor het aantonen van legionellagroei in een installatie te beoordelen. Validatie van methoden is noodzakelijk om de prestatiekenmerken, zoals juistheid, detectielimiet en reproduceerbaarheid te kunnen vaststellen. Daarnaast is het zinvol om voor nieuwe methoden te bepalen in hoeverre de

detectie verstoord wordt in een achtergrond van andere bacteriën. Diverse soorten watermonsters, zoals monsters van grond- en oppervlaktewater, drinkwatermonsters 'af pompstation', watermonsters uit diverse leidingwaterinstallaties en koelwatermonsters zouden met diverse detectiemethoden getest moeten worden om de waarde van deze methoden ten opzichte van elkaar te kunnen vaststellen voor de specifieke matrix. Bij een dergelijke vergelijking wordt duidelijk in hoeverre nieuwe methoden legionellabacteriën aantonen die met de NEN 6265 worden gemist.

Literatuur

- Alary, M., R. Joly (1992) Comparison of culture methods and an immunofluorescent assay for the detection of *Legionella pneumophila* in domestic hot water devices. *Current Microbiology* 25: 19-23.
- Alleron, L., N. Merlet, C. Lacombe, J. Frère (2008) Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Current Microbiology* 57: 497-502.
- Amann, R.I., W. Ludwig, K.H. Schleifer (1995) Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*. 59, 143-169
- Aurell, H., P. Catala, P. Farge, F. Wallet, M. Le Brun, J.H. Helbig, S. Jarraud, P. Lebaron (2004) Rapid detection and enumeration of *Legionella pneumophila* in hot water systems by solid-phase cytometry. *Applied and Environmental Microbiology* 70: 1651-1657.
- Barbaree, J.M., B.S. Fields, J.C. Feeley, G.W. Gorman, W.T. Martin (1986) Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of *Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology* 51: 422-424.
- Baum, H. von, S. Ewig, R. Marre, N. Suttorp, S. Gonschior, T. Welte, C. Lück (2008) for the Competence Network for Community Acquired Pneumonia study Group. Community-acquired *Legionella* pneumonia: new insights from the German Competence Network for Community Acquired Pneumonia. *Clinical Infectious Diseases*. 46: 1356-1364.
- Buchbinder, S., K. Trebesius, J. Heesemann (2002) Evaluation of detection of *Legionella* spp. in water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture. *International Journal of Medical Microbiology* 292: 241-245.
- Byrd, J.J., H.S. Xu, R.R. Colwell (1991) Viable but nonculturable bacteria in drinking water. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 875-878.
- Chang, B., K. Sugiyama, T. Taguri, J. Amemura-Maekawa, F. Kura, H. Watanabe (2009) Specific detection of viable *Legionella* cells by combined use of photoactivated ethidium monoazide and PCR/real-time PCR. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 147-153.
- Chen, N.T. en C.-W. Chang (2010) Rapid quantification of viable legionellae in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR. *Journal of Applied Microbiology* 109: 623-634.
- Delgado-Viscogliosi, P., T. Simonart, V. Parent, G. Marchand, M. Dobbelaere, E. Pierlot, V. Pierzo, F. Menard-Szczebara, E. Gaudard-Ferveur, K. Delabra en J.M. Delattre (2005) Rapid method for enumeration of viable *Legionella pneumophila* and other *Legionella* spp. in water. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 4086-4096.

Delgado-Viscogliosi, P., L. Solignac, J.-M. Delattre (2009) Viability PCR, a culture-independent method for rapid and selective quantification of viable *Legionella pneumophila* cells in environmental water samples. *Applied and Environmental Microbiology* 75: 3502-3512.

Den Boer, J.W., Bruin, J.P., Verhoef, L.P., Van der Zwaluw, K., Jansen, R. en Yzerman, E.P. (2008).

Genotypic comparison of clinical *Legionella* isolates and patient-related environmental isolates in The Netherlands, 2002-2006. *Clinical Microbiology and Infection*. 14, 459-466.

Dey, R., J. Bodennec, M.O. Mameri, P. Pernin (2009) Free-living freshwater amoebae differ in their susceptibility to the pathogenic bacterium *Legionella pneumophila*. *FEMS Microbiology Letters* 290: 10-17.

Diederer, B.M.W., C.M.A. de Jong, I. Aarts, M.F. Peeters en A. van der Zee (2007) Molecular evidence for the ubiquitous presence of *Legionella* species in Dutch tap water installations. *Journal of Water & Health* 5, 375-383.

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

Dutil, S., S. Tessier, M. Veillette, C. Laflamme, A. Mériaux, A. Leduc, J. Barbeau, C. Duchaine (2006) Detection of *Legionella* spp. by fluorescent *in situ* hybridization in dental unit waterlines. *Journal of Applied Microbiology* 100: 955-963.

Edelstein, P.H. en M.A.C. Edelstein (1989) Evaluation of the Merifluor-*Legionella* immunofluorescent reagent for identifying and detecting 21 *Legionella* species. *Journal of Clinical Microbiology* 27: 2455-2458.

England, A.C. 3rd, D.W. Fraser, G.F. Mallison, D.C. Mackel, P. Skaliy, G.W. Gorman (1982) Failure of *Legionella pneumophila* sensitivities to predict culture results from disinfectant-treated air-conditioning cooling towers. *Applied and Environmental Microbiology* 43, 240-244.

Fallon, R.J. en T.J. Rowbotham (1990) Microbiological investigations into an outbreak of Pontiac fever due to *Legionella micdadei* associated with use of a whirlpool. *Journal of Clinical Pathology* 43: 479-483.

Fields, B.S., R.F. Benson, R.E. Besser (2002) *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews* 15: 506-526.

Flournoy, D.J., K.A. Belobraydic, S.L. Silberg, C.H. Lawrence, P.J. Guthrie (1988) False positive *Legionella pneumophila* direct immunofluorescent monoclonal antibody test caused by *Bacillus cereus* spores. *Diagnostic Microbiology and Infectious disease* 9: 123-125.

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

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

Greub, G. en D. Raoult (2004) Micro-organisms resistant to free-living amoebae. *Clinical Microbiology Reviews* 17: 413-433.

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

Kobayashi, H., M. Oethinger, M.J. Tuohy, G.W. Procop, G.S. Hall, T.W. Bauer (2009) Limiting false-positive polymerase chain reaction results: detection of DNA and mRNA to differentiate viable from dead bacteria. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease* 64: 445-447.

Konig, C., H. Hebestreit, G. Valenza, M. Abele-Horn, C.P. Speer (2005) *Legionella waltersii* – a novel cause of pneumonia? *Acta Paediatrica*, 94, 1505-1518.

Kooij, D. van der, H. Veenendaal, B. Wullings (2003) Kwantitatieve bepaling van legionella in water: na 21 jaar nog in kinderschoenen. *H2O* 4: 21-23.

Kooij, D. van der, G. Wubbels, H. Veenendaal (2007) Legionellabacteriën in leidingwaterinstallaties behoren meestal tot de ongevaarlijke soort *Legionella anisa*. *H2O* 5: 33-35.

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

Lee, T.C., R.M. Vickers, V.L. Yu, M.M. Wagener (1993) Growth of 28 *Legionella* species on selective culture media: a comparative study. *Journal of Clinical Microbiology* 31: 2764-2768.

Moffat, J.F. en L.S. Tompkins (1992) A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infection and Immunity* 60: 296-301.

Nazarian, E.J., D.J. Bopp, A. Saylor, R.J. Limberger, K.A. Musser (2008) Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. *Diagnostics Microbiology and Infectious Disease* 62: 125-132.

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

Oesterholt, F., D. van der Linde, B. Wullings, H. Veenendaal (2009) Een nieuwe methode voor screening van koelwater en proceswater op *Legionella pneumophila*. KWR 2009.004.

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

Rowbotham, T.J. (1983) Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *Journal of Clinical Pathology* 36: 978-986.

Sanden, G.N., W.E. Morrill, B.S. Fields, R.F. Breiman, J.M. Barbaree (1992) Incubation of water samples containing amoebae improves detection of Legionellae by the culture method. *Applied Environmental Microbiology*. 58: 2001-2004.

Schalk, J.A.C., W.J. Lodder, P. Brandsema, D.W. Notermans, A.M. de Roda Husman (2009) Klinische diagnostiek van *Legionella*-pneumonie in Nederland. RIVM Rapport 703719040.

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

Schulze-Röbbecke, R., P. Hartemann, R. Fimmers, C. Hagenau (1999) Comparison of membrane filtration methods for the recovery of legionellae from naturally contaminated domestic drinking water supplies. *Zentralblatt für Hygiene und Umweltmedizin* 202: 51-59.

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

Steinert, M., U. Hentschel, J. Hacker (2002) *Legionella pneumophila*: an aquatic microbe goes astray. *FEMS Microbiology Reviews* 26: 149-162.

Ta, A.C., J.E. Stout, V.L. Yu, M.M. Wagener (1995) Comparison of culture methods for monitoring Legionella species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 2118-2123.

Thomas, V., K. Herrera-Rimann, D.S. Blanc, G. Greub (2006) Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a hospital water network. *Applied Environmental Microbiology*. 72: 2428-2438.

Thomas, V., J-F. Loret, M. Jousset, G. Greub (2008) Biodiversity of amoeba and amoeba-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. *Environmental Microbiology* 10: 2728-2745.

Veenendaal, H. en S. in 't Veld (2005) Vergelijking isolatiemediën voor legionella. *H2O* 13: 33-35.

Veenendaal, H. en D. van der Kooij (2007) Een specifieke kweekmethode voor *Legionella pneumophila*. *H2O* 5: 36-38.

Veenendaal, H.R. en D. van der Kooij (2008) Validatie van een selectieve kweekmethode voor *Legionella pneumophila* met een vaste voedingsbodem. KWR 08.024.

Veld, S. in 't en J. de Wagt (2002) Snelle herziening van NEN6265, legionella-onderzoek aanbevolen. *H2O* 9: 15-16.

Versteegh, J.F.M., P.S. Brandsema, W.J. Lodder, A.M. de Roda Husman, J.A.C. Schalk, N.G.F.M. van der Aa (2009) Betekenis van *Legionella*-soorten voor preventiebeleid van leidingwaterinstallaties. RIVM Briefrapport 609715003.

WHO (2007) *Legionella* and the prevention of legionellosis.

Wullings, B., R. Voogt, H. Veenendaal, D. van der Kooij (2002) The fluorescent *in situ* hybridization test in comparison with culture for detection of *Legionella pneumophila* in water samples. In: *Legionella*, ed. R. Marre et al. ASM Press, Washington DC 2002; 51: 263-266

Wullings, B., G. Wubbels, D. van der Kooij (2005) Niet-kweekbare, nog niet beschreven legionella-bacteriën algemeen aanwezig in drinkwater. H2O 25/26: 43-46.

Wullings, B.A., D. van der Kooij (2006) Occurrence and genetic diversity of uncultured *Legionella* spp. in drinking water treated at temperatures below 15°C. *Applied Environmental Microbiology* 72: 157-166.

Wullings, B., G. Wubbels, H. Veenendaal, D. van der Kooij (2007) Snelle, kwantitatieve detectie van *Legionella pneumophila* met Q-PCR. H2O 5: 39-41.

Yamamoto, H., Y. Hashimoto, T. Ezaki (1996) Study of non-culturable *Legionella pneumophila* cells during multiple nutrient starvation. *FEMS Microbiol Ecology* 20: 149-154.

Yanez, M.A., V.M. Barbera, V. Catalan (2007) Validation of a new seminested PCR-base detection method for *Legionella pneumophila*. *Journal of Microbiological Methods* 70: 214-217.

Yzerman, E., J. den Boer, M. Caspers, A. Almal, B. Worzel, W. van der Meer, R. Montijn, F. Schuren (2010) Comparative genome analysis of a large Dutch *Legionella pneumophila* strain collection identifies five markers highly correlated with clinical strains. *BMC Genomics* 11: 433.

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl