

BTO 2005.033
Mei 2005

Detectie van *Legionella pneumophila* in water met een kwantitatieve real-time PCR-methode

Validatieonderzoek

BTO 2005.033
Mei 2005

Detectie van *Legionella pneumophila* in water met een kwantitatieve real- time PCR-methode

Validatieonderzoek

© 2005 Kiwa N.V.
Alle rechten voorbehouden.
Niets uit deze uitgave mag
worden verveelvoudigd,
opgeslagen in een
geautomatiseerd
gegevensbestand, of
openbaar gemaakt, in enige
vorm of op enige wijze,
hetzij elektronisch
mechanisch, door
fotokopieën, opnamen, of
enig andere manier, zonder
voorafgaande schriftelijke
toestemming van de
uitgever.

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

Telefoon 030 60 69 511
Fax 030 60 61 165
Internet www.kiwa.nl

Colofon

Titel

Detectie van *Legionella pneumophila* in water met een kwantitatieve real-time PCR-methode

Projectnummer

111440.100.001

Projectmanager

Wiel Senden

Kwaliteitsborgers

Harm Veenendaal en Dick van der Kooij

Auteurs

Bart Wullings, Gerhard Wubbels, Auke Douma en Remko Voogt

Dit rapport is selectief verspreid onder medewerkers van BTO-participanten en leden van de samenwerkingsprojectgroep IQ Corporation, Bioclear en Waterlaboratorium Noord en is verder niet openbaar.

Voorwoord

In 2003 is een herstart gemaakt van het project “Onderzoek naar snelle en kwantitatieve detectie van (ziekteverwekkende) micro-organismen door middel van Real-Time PCR” , gesubsidieerd door Senter (BTS00131). Deelnemers aan dit samenwerkingsproject waren IQ Corporation, Bioclear, Waterlaboratorium Noord en Kiwa Water Research. Het onderzoek dat bij Kiwa Water Research is uitgevoerd sloot aan bij het project Moleculair-biologische methoden, dat een onderdeel vormt van het BTO-programma.

Samenvatting

Met behulp van real-time PCR kan binnen een dag een kwantitatief resultaat worden verkregen over de aanwezigheid van *L. pneumophila* in water. Met de standaard kweekmethode is het resultaat pas na 7 tot 14 dagen beschikbaar. Voor de detectie van *L. pneumophila* met behulp van real-time PCR is een protocol ontwikkeld, inclusief nieuw ontworpen primers en een probe. Vervolgens is door Kiwa Water Research en Waterlaboratorium Noord een validatieonderzoek uitgevoerd conform de richtlijnen van de Raad voor Accreditatie (documentnummer SC 08). In totaal zijn 496 watermonsters geanalyseerd met zowel de real-time PCR-methode als de kweekmethode. Tevens is een 20-tal monsters van verschillende watertypen door de laboratoria van Kiwa en WLN geanalyseerd.

Prestatiekenmerken van de real-time PCR-methode voor *L. pneumophila*

- De PCR-methode is specifiek voor *L. pneumophila*. Dit is gebleken uit het analyseren van een *Legionella* stammencollectie en vele watermonsters;
- De juistheid van de PCR-methode is onvoldoende als gevolg van de het lage rendement (ca. 10%) van de DNA-isolatie;
- De herhaalbaarheid van de PCR-reactie is goed, evenals de lineariteit;
- De binnen-laboratorium reproduceerbaarheid en de tussen-laboratorium reproduceerbaarheid van de real-time PCR methode liggen gemiddeld op een niveau van ca. 62%. Dit niveau komt weliswaar nagenoeg overeen met het niveau van de kweekmethode, maar kan leiden tot grote verschillen (meer dan een factor 10) in de analyseresultaten van individuele monsters;
- De aantoonbaarheidsgrens, de detectiegrens en de robuustheid van de PCR-methode zijn niet experimenteel onderzocht;
- In 79% van de 496 geanalyseerde watermonsters was het kwalitatieve detectieresultaat gelijk, van de resterende monsters is in 17% alleen met de PCR-methode *L. pneumophila* aangetoond en in 4% alleen met de kweekmethode.
- In tweederde van de watermonsters met *Legionella* werd met de kweekmethode een hogere concentratie *L. pneumophila* is aangetoond dan met de real-time PCR-methode.

Tabel 1: Prestatiekenmerken van de real-time PCR-methode en de standaard kweekmethode (Kiwa laboratorium)

Prestatiekenmerk	Real-time PCR	Kweekmethode
Herhaalbaarheid van de PCR-reactie	rel. STD $\leq 12\%$ (3×10^2 DNA-kopieën) rel. STD $\leq 34\%$ (3×10^1 DNA-kopieën)	75% (9×10^3 kve)
Binnen-laboratorium reproduceerbaarheid	62%	50%
Tussen-laboratorium reproduceerbaarheid	62%; resultaten niet significant verschillend (t-toets: tweezijdig, 0,1)	-
Aantoonbaarheidsgrens	20 <i>mip</i> kopieën/l (theoretisch)	50 kve/l
Bepaalbaarheidsgrens	100 <i>mip</i> kopieën/l (theoretisch)	-
Lineariteit	hoge PCR-efficiëntie van 92-108% ($5-50.000$ DNA-kopieën)	-

De Real-time PCR-methode is geschikt voor kwalitatieve detectie (aan-/afwezigheid) van *L. pneumophila* in water, maar voor kwantitatieve detectie moet het rendement van de DNA-isolatie worden verbeterd. Toevoeging van een interne controle aan elk monster zal het mogelijk maken om het rendement van de opwerking van het DNA vast te stellen. Tevens zullen de prestatiekenmerken juistheid, herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid, robuustheid, en ook de vergelijkbaarheid met de kweekmethode opnieuw moeten worden vastgesteld

Inhoud

	Voorwoord	1
	Samenvatting	3
	Inhoud	5
1	Inleiding	7
1.1	Aanleiding onderzoek	7
1.2	Doel van het onderzoek	7
2	Opzet onderzoek	9
2.1	Fasering	9
3	Ontwikkelingsfase	11
3.1	Ontwerp van specifieke primers en probe	11
3.2	Protocol	13
3.3	DNA-oplossing voor kwantificering	14
3.4	Controle-monster	14
4	Validatie van de methode	15
4.1	Prestatiekenmerken en vergelijkbaarheid met de kweekmethode	15
4.1.1	Specificiteit	15
4.1.1.1	Conclusie	15
4.1.2	Juistheid	16
4.1.2.1	Conclusie	17
4.1.3	Herhaalbaarheid	17
4.1.3.1	Conclusie	18
4.1.4	Reproduceerbaarheid	18
4.1.4.1	Binnen-laboratorium reproduceerbaarheid	18
4.1.4.2	Tussen-laboratorium reproduceerbaarheid	18
4.1.4.3	Conclusie	20
4.1.5	Aantoonbaarheidsgrens	21
4.1.6	Bepaalbaarheidsgrens	21
4.1.7	Lineariteit	21
4.1.7.1	Conclusie	22
4.1.8	Robuustheid	22
4.1.9	Vergelijkbaarheid van de real-time PCR-methode met de kweekmethode	23
4.1.9.1	Vergelijking kweekmethode en PCR-methode bij Kiwa	23
4.1.9.2	Vergelijking PCR-methode en kweekmethode bij Waterlaboratorium Noord	24
4.1.9.3	Kwantitatieve vergelijking (beide laboratoria)	25
4.1.9.4	Conclusies	26

5	Conclusies en aanbevelingen	27
5.1	Conclusies	27
5.2	Aanbevelingen voor verder onderzoek	28
6	Literatuur	29
I	Bijlage	31

1 Inleiding

1.1 Aanleiding onderzoek

De standaardmethode voor het bepalen van de (mogelijke) aanwezigheid van *Legionella* in water is de kweekmethode volgens NEN 6265 (1). De analyseresultaten van de kweekmethode zijn echter pas na 7 tot 14 dagen beschikbaar. Door toepassing van detectiemethoden op basis van real-time PCR is het mogelijk om zowel kwalitatief als kwantitatief binnen een dag uitsluitsel te kunnen geven over de aanwezigheid van specifieke micro-organismen. In situaties waarbij bijvoorbeeld met de kweekmethode is gebleken dat een watersysteem besmet is met *Legionella* en reinigungsacties zijn uitgevoerd, is er veelal behoefte om snel over informatie te beschikken of de reiniging het gewenste effect heeft gehad. In geval van kweek moet een beheerder meer dan een week wachten; met PCR kan dit dezelfde dag bekend zijn. Een nadeel van de PCR-methode is echter dat de methode geen onderscheid maakt tussen levende en dode cellen.

In 2001 is een project gestart met als doelstelling om snelle en kwantitatieve detectiemethoden te ontwikkelen voor ziekteverwekkende micro-organismen met behulp van real-time PCR. Dit project werd gesubsidieerd door Senter (BTS00131). Door verschillende redenen is het project in 2003 stilgelegd. In datzelfde jaar is een herstart gemaakt waarbij Kiwa Water Research als partner in het projectteam werd opgenomen. Het projectteam bestond vanaf dat moment uit IQ Corporation, Bioclear, Waterlaboratorium Noord en Kiwa Water Research. Na de herstart is de focus binnen het project komen te liggen op de ontwikkeling van een nieuwe methode voor de kwantitatieve detectie van *Legionella pneumophila* in (koel)water. In Nederland wordt meer dan 90% van de ziektegevallen van legionellose veroorzaakt door *L. pneumophila* (3). Het project is bij Kiwa Water Research onderdeel van het onderzoekprogramma (BTO) dat wordt uitgevoerd voor de Nederlands waterleidingbedrijven.

De kennis die wordt opgedaan in het onderzoek naar de ontwikkeling en validatie van een methode voor *L. pneumophila* is ook toepasbaar voor de ontwikkeling van vergelijkbare methoden voor andere relevante micro-organismen.

1.2 Doel van het onderzoek

- Ontwikkeling van een snelle en specifieke detectiemethode voor *L. pneumophila* op basis van real-time PCR;
- Validatie van de nieuwe methode gebaseerd op criteria opgesteld door de Raad voor Accreditatie (documentnummer SC 08).

2 Opzet onderzoek

In het eerste overleg van de projectgroep na de herstart (datum 21 november 2003) is besloten om het onderzoek te richten op de ontwikkeling van een nieuwe methode voor de kwantitatieve detectie van *Legionella pneumophila* in (koel)water. Bij aanvang van het onderzoek is een literatuuronderzoek uitgevoerd naar beschikbare gepubliceerde methoden voor detectie van *L. pneumophila* met behulp van real-time PCR. In totaal zijn 7 verschillende gepubliceerde primersets getest op specificiteit en PCR- efficiëntie (5,6,7,8). De specificiteit van de primers is getest met een panel van 10 *Legionella*-soorten die op basis van de sequentie van het *mip* gen het meest overeenkomen met *L. pneumophila*. Uiteindelijk bleek geen van de beschreven primers te voldoen aan de criteria specificiteit voor *L. pneumophila*, toepasbaarheid in combinatie met een specifieke probe en een hoge PCR-efficiëntie. Om deze redenen werd besloten om een methode te ontwikkelen met nieuwe primers en probe. Voor het kwantificeren van *L. pneumophila* in water is gekozen voor een DNA-standaard bestaande uit een gekloneerd fragment van het target gen van *L. pneumophila* in de PCR-reactie. De ontwikkelde methode is vervolgens onderworpen aan een validatie-onderzoek door Kiwa Water Research en Waterlaboratorium Noord (WLN). In beide laboratoria is voor het validatietraject een vrijwel gelijk detectieprotocol toegepast (zie 3.2). In totaal zijn 496 (praktijk) watermonsters geanalyseerd met de nieuwe methode. Hiervan zijn 145 watermonsters geanalyseerd door het Kiwa laboratorium en 351 watermonsters door het laboratorium van Waterlaboratorium Noord. Tevens zijn een 20-tal monsters van diverse watertypen zowel door Kiwa als WLN geanalyseerd.

2.1 Fasering

De fasering van het onderzoek is conform de taakomschrijving zoals die is opgenomen in het projectplan (bijlage 4). De resultaten beschreven in dit rapport zijn opgenomen in de voor dit onderzoek volgende relevante fasen:

- 3.1 Onderzoek naar kwantitatieve real-time PCR;
- 3.3 Onderzoek naar kwantitatieve real-time PCR (Q-PCR) detectie van organismen (*L. pneumophila*) in praktijkmonsters;
- 3.4 Selecteren van relevante micro-organismen (*L. pneumophila*);
- 3.5 Ontwerp van probe en primer sequenties specifiek voor *L. pneumophila* (hoofdstuk 3);
- 3.6 Ontwikkeling van real-time Q-PCR methode voor detectie van *L. pneumophila* in praktijkmonsters (hoofdstuk 4);
- 4.1 Valideren en toepasbaar maken van real-time Q-PCR voor het routinematig kwantitatief aantonen van *L. pneumophila* in verschillende typen milieumonsters (hoofdstuk 5).

3 Ontwikkelingsfase

3.1 Ontwerp van specifieke primers en probe

Voor de specifieke detectie van *L. pneumophila* zijn verschillende primers en taqman probes ontwikkeld. De primers en probes zijn ontworpen tegen het *mip*-gen (4). Dit gen is betrokken bij het infectieproces van protozoa en fagocyten. De sequentieverschillen tussen de verschillende *Legionella*-soorten maken dit gen zeer geschikt voor het ontwerpen van specifieke primers en probes. Voor het ontwerpen van de specifieke primers en probe zijn 338 verschillende sequenties van het *mip*-gen vergeleken. In deze collectie bevinden zich 89 referentiesequenties en 38 verschillende *Legionella*-soorten. De overige sequenties zijn afkomstig van milieu-isolaten. Op basis van de verschillen tussen de sequenties van *L. pneumophila* en de overige sequenties zijn vervolgens verschillende primerparen en probes ontwikkeld.

Van elk primerpaar zijn de PCR-efficiëntie en de specificiteit bepaald. De selectiecriteria zijn een goede PCR-efficiëntie (>85/90%) en de essay moet in staat zijn tussen de 1-10 DNA-kopieën per PCR-reactie aan te tonen. De specificiteit is getoetst met een panel van verwante *Legionella*-soorten (tabel 3). Uiteindelijk heeft dit geresulteerd in twee primerparen en een probe die voldoen aan de gestelde criteria (tabel 2). De specificiteit van de gehele detectieprotocol is apart beschreven als een van de prestatiekenmerken van de validatie (zie paragraaf 4.1.1). De lengte van het geamplificeerde fragment is 149 bp.

Tabel 2: Specifieke primers en probe voor detectie van *L. pneumophila* met behulp van real-time PCR

naam	primer/probe	lengte
Lpneu_f	primer	19
Lpneu_r	primer	21
Lpneu_p	"taqman" probe	22

Tabel 3: *Legionella*-stammen waarmee de specificiteit van PCR-primers is bepaald

Soort	serumgroep	ATCC
<i>L. pneumophila</i>	1	33152
<i>L. pneumophila</i>	2	33154
<i>L. pneumophila</i>	3	33155
<i>L. pneumophila</i>	4	33156
<i>L. pneumophila</i>	5	33216
<i>L. pneumophila</i>	6	33215
<i>L. pneumophila</i>	7	33823
<i>L. pneumophila</i>	8	35096
<i>L. pneumophila</i>	9	35289
<i>L. pneumophila</i>	10	43283
<i>L. pneumophila</i>	11	43130
<i>L. pneumophila</i>	12	43290
<i>L. pneumophila</i>	13	43736
<i>L. pneumophila</i>	14	43703
<i>L. birminghamensis</i>		43702
<i>L. bozemanii</i>	1	33217
<i>L. bozemanii</i>	2	35545
<i>L. brunensis</i>		43878
<i>L. cherri</i>		35252
<i>L. dumoffii</i>		33279
<i>L. erythra</i>		35303
<i>L. fairfieldensis</i>		49588
<i>L. feeleii</i> 1	1	35072
<i>L. feeleii</i> 2	2	35849
<i>L. gormanii</i>		33297
<i>L. gratiana</i>		49413
<i>L. hackeliae</i>		35999
<i>L. israelensis</i>		43119
<i>L. jamestowniensis</i>		35298
<i>L. jordanis</i>		33623
<i>L. londiniensis</i>		49505
<i>L. longbeachae</i>	1	33462
<i>L. longbeachae</i>	2	33484
<i>L. moravica</i>		43877
<i>L. oakridgensis</i>		33761
<i>L. parisiensis</i>		35299
<i>L. quinlivanii</i>		43830
<i>L. rubrilucens</i>		35304
<i>L. sainthelensis</i>		35248
<i>L. tusconensis</i>		49180
<i>L. wadsworthii</i>		33877
<i>L. worsleiensis</i>		49508

3.2 Protocol

Na het ontwerpen en testen van het primerpaar en van de probe is een protocol opgesteld. Dit protocol bestaat in grote lijn uit filtratie van watermonsters, DNA isolatie en PCR. De eerste twee onderdelen zijn gebaseerd op protocollen die op dit moment worden toegepast in het laboratorium. In elk experiment zijn naast de watermonsters ook een referentie DNA-monster ten behoeve van het kwantificeren van monsters (3.1) en een controlemonster (3.2) geanalyseerd. Het DNA-referentie monster is vanzelfsprekend alleen in de PCR geanalyseerd. In het validatieonderzoek is het protocol (2) zowel door Kiwa als door WLN toegepast. Het Kiwa-laboratorium heeft hierbij in de PCR-reactie gebruik gemaakt van de IQ Supermix en van de i-cycler real-time PCR-machine (Biorad Veenendaal). Bij WLN zijn de Stratagene Mastermix en de Stratagene Mx4000 real-time PCR-machine gebruikt.

Korte beschrijving van het detectieprotocol

Van elk watermonster is indien mogelijk 500 ml gefiltreerd door een 0,2µm polycarbonaatfilter. In elke meetserie is tevens 1 ml van een controlecel-suspensie gefiltreerd. Met behulp van de Magnapure III kit (Roche) is het DNA geïsoleerd en vervolgens met 100 µl elutiebuffer geëluëerd. Van deze DNA-isolaten is een 10^{-1} verdunning gemaakt. Het onverdunde en het 10x verdunde DNA-isolaat zijn met behulp van PCR in duplo geanalyseerd. Van de monsters en van het referentie-DNA is 10 µl DNA-suspensie aan een 40 µl PCR-reactie oplossing toegevoegd. Tot slot is met behulp van de DNA-referentie en de apparatuurspecifieke software de *L. pneumophila* DNA concentratie in de monsters bepaald.

Voor elke PCR-reactie is een ondergrens van 5 kopieën aangehouden. Indien minder dan 5 kopieën in een PCR (onverdund DNA) zijn aangetoond is het monster als "niet aangetoond" beoordeeld. Dit resulteert in een detectiegrens van 100 *mip* gen DNA kopieën per liter bij filtratie van een watervolume van 500 ml. Indien minder water wordt gefiltreerd, door verstopping van het filter, zal in verhouding de detectiegrens worden verhoogd; filtratie van 100 ml water resulteert in een detectiegrens van 500 kopieën/l.

De PCR-analyse resulteert in vier kwantitatieve waarden voor elk geanalyseerd monster, waaruit vervolgens de gemiddelde waarde is berekend. In een enkel monster is een afwijkende waarde ten opzichte van de drie andere waarden buiten de analyse gehouden (uitbijter). In monsters met een zeer laag aantal van het *mip* gen zijn alleen de resultaten van het onverdunde DNA gebruikt in de berekening. Remming van de PCR is zichtbaar indien het verschil tussen de twee geanalyseerde DNA-monster (10^0 en 10^{-1}) kleiner is dan een factor 10. In deze monsters zijn voor de berekeningen alleen de DNA-verdunning meegenomen waarin met behulp van de ijklijn meer dan 5 DNA-kopieën zijn aangetoond. De kwantitatieve waarden verkregen met het controlemonster zijn gebruikt als positieve controle in elk experiment en voor het berekenen van het rendement van het gehele protocol. Voor het rendement van de watermonsters is mogelijk ook de matrix van invloed.

3.3 DNA-oplossing voor kwantificering

Het gekloneerde *mip*-gen van *L. pneumophila* is gebruikt voor kwantitatieve detectie van *L. pneumophila* in water. Het *mip*-gen van *L. pneumophila* subsp. *pneumophila* strain philadelphia 1 serumgroep 1 (ATCC33152) is vermenigvuldigd m.b.v. PCR en vervolgens gekloneerd in een plasmide. Het recombinante plasmide is vervolgens geïsoleerd en nauwkeurig gekwantificeerd (zie bijlage 1). Op basis van de bekende lengte van het *mip*-gen en het plasmide is berekend hoeveel DNA kopieën per volume-eenheid aanwezig zijn. Deze referentie DNA-oplossing is vervolgens verdund zodat $5,0 \times 10^5$ *mip* kopieën/PCR reactie aanwezig zijn. De verdunningsreeks van het DNA-fragment is toegepast in elk PCR-experiment om een ijklijn te berekenen en onbekende watermonsters te kwantificeren (tabel 4). Het kloneren en kwantificeren van de referentie DNA-oplossing is uitgevoerd door IQ Corporation als onderdeel van dit project.

Verdunningschema

Originele oplossing: $1,6 \times 10^{10}$ kopieën/ μ l (Bijlage 1)

↓

780 μ l van 10^{-4} oplossing + 24,22 ml PCR-water

↓

$5,0 \times 10^5$ kopieën/ 10 μ l

(In PCR wordt 10 μ l per reactie toegevoegd)

↓

Verdunningsreeks (10^{-1}): 50.000 etc kopieën

Tabel 4: DNA-kopieën van het *mip*-gen in de decimale verdunningen voor het bepalen van de ijklijn

Verdunning	<i>mip</i> gen kopieën per PCR
1	50.000
2	5.000
3	500
4	50
5	5

3.4 Controle-monster

In elk experiment is naast de watermonsters een controlemonster geanalyseerd. Dit controlemonster bestaat uit een *L. pneumophila* celsuspensie in geautoclaveerd en 0,2 μ m gefiltreerd drinkwater. De *L. pneumophila* celconcentratie is bepaald met een door microscopische celtelling. Deze celsuspensie is ingevroren in vloeibare stikstof en vervolgens gedurende het onderzoek bij -80 °C bewaard. De concentratie van het controlemonster was $3,5 \times 10^4 \pm 9,1 \times 10^3$ cellen in een volume van 1 ml.

4 Validatie van de methode

4.1 Prestatiekenmerken en vergelijkbaarheid met de kweekmethode

De richtlijn met aanvullende criteria voor methode-validatie opgesteld door de Raad voor Accreditatie (document nummer SC08) is gehanteerd voor het validatie-onderzoek van de kwantitatieve PCR-methode. De methode kan worden gekarakteriseerd als een nieuwe kwantitatieve methode. Dit betekent dat alle prestatiekenmerken beschreven in het document moeten worden onderzocht. De betreffende prestatiekenmerken zijn: specificiteit, juistheid, herhaalbaarheid, reproduceerbaarheid (binnen-laboratorium en tussen-laboratorium), aantoonbaarheidsgrens, bepaalbaarheidsgrens, lineariteit en robuustheid. De juistheid, herhaalbaarheid, binnen-laboratorium reproduceerbaarheid is berekend op basis van de resultaten van het controlemonster. Tevens is in een groot aantal (praktijk) watermonsters de vergelijkbaarheid van de real-time PCR-methode met de standaard kweekmethode volgens NEN 6265 bepaald.

4.1.1 Specificiteit

De specificiteit is de mogelijkheid van de methode om alleen dat te meten wat men beoogt te meten

De selectiviteit van de primers en van de probe zijn bepalend voor de specificiteit van de real-time PCR-essay. De primers en probe zijn ontworpen op basis van 338 beschikbare *mip*-sequenties (3.1) en vervolgens getest op verschillende *Legionella* soorten en *L. pneumophila* stammen die behoren tot verschillende serumgroepen (tabel 3). Van elk van de stammen is DNA geïsoleerd en getest in de PCR op productvorming. Met geen van de non-*pneumophila*-soorten is een product gevormd dat is gedetecteerd met de probe. Daarentegen is met alle 13 geteste stammen van *L. pneumophila* wel een product gevormd. Op basis van dit resultaat kan worden geconcludeerd dat de specificiteit van de methode 100% is. Dit wordt bevestigd bij het analyseren van de 145 watermonsters (4.1.8). In 19 verschillende watermonsters is met de kweekmethode *Legionella* aangetoond. In geen van deze monsters was de PCR-methode positief. Op basis van serotypering van enkele kolonies bleek het in deze monsters te gaan om een non-*pneumophila*.

4.1.1.1 Conclusie

De real-time PCR methode is op basis van de resultaten van het onderzoek specifiek voor *L. pneumophila*. Analyseren van nog meer praktijkmonsters zal uiteindelijk uitwijzen of de specificiteit van de methode daadwerkelijk 100% is.

4.1.2 Juistheid

Juistheid is de mate van overeenkomst tussen de gemiddelde waarde van de real-time PCR-methode en de ware waarde.

De juistheid van de real-time PCR-methode is bepaald met een controlemonster dat gedurende het onderzoek herhaaldelijk is geanalyseerd. De concentratie *L. pneumophila* in het controlemonsters is voorafgaande aan het onderzoek bepaald met een microscopische telling (directe celtelling met acridine oranje) en de kweekmethode (direct uitspatelen op BCYE medium) (tabel 5). De kweekmethode is toegepast voordat de *Legionella*-suspensie met behulp van vloeibare stikstof is ingevroren en bewaard bij -80 °C. De directe celtelling is zowel voor als na invriezen uitgevoerd. De concentratie voor en na invriezen was gelijk.

Tabel 5: Concentratie *L. pneumophila* in het controlemonster voor het invriezen

Detectiemethode	Concentratie
Directe microscopische celtelling (TDC*)	$3,5 \times 10^4 \pm 9,1 \times 10^3$ cellen/ml
Kweekmethode	$1,4 \times 10^4 \pm 1,8 \times 10^3$ KVE/ml

*TDC, totale directe celtelling

In elke meetserie is 1 ml van het controlemonster volgens het protocol geanalyseerd. De juistheid van methode is vervolgens bepaald met de *L.pneumophila*-concentratie die is berekend met behulp van de DNA-ijklijn en de concentratie die is verkregen met de directe microscopische celtelling (TDC) en met de kweekmethode (tabel 6).

Tabel 6. De *L. pneumophila*-concentratie in het controlemonster geanalyseerd met de real-time PCR-methode ten opzichte van de concentratie bepaald met een microscopische telling (DTC) en de kweekmethode.

Exp	onverdund DNA			10x verdund [#]		
	PCR kopieën/ml)	Relatieve conc.		PCR (kopieën/ml)	Relatieve conc.	
		DTC (%)	Kweek (%)		DTC (%)	Kweek (%)
1	$7,1 \times 10^3$	20,3	50,7	$9,8 \times 10^3$	28,0	70,0
2	$1,8 \times 10^3$	5,1	12,9	$1,6 \times 10^3$	4,6	11,4
3	$3,5 \times 10^3$	10,0	25,0	$4,5 \times 10^2$	1,3	3,2
4	$2,5 \times 10^3$	7,1	17,9	$3,7 \times 10^3$	10,6	26,4
5	$3,8 \times 10^3$	10,9	27,1	$4,5 \times 10^3$	12,9	32,1
6	$1,5 \times 10^3$	4,3	10,7	$3,6 \times 10^3$	10,3	25,7
7	$2,6 \times 10^3$	7,4	18,6	$3,5 \times 10^3$	10,0	25,0
8	$7,1 \times 10^2$	2,0	5,1	$7,3 \times 10^2$	2,1	5,2
9	$3,6 \times 10^3$	10,3	25,7	$5,5 \times 10^3$	15,7	39,3
gem.	$3,0 \times 10^3$	8,6	21,5	$3,7 \times 10^3$	10,6	26,5

[#]: waarde is gecorrigeerd voor verdunning (x10)

De waarde van de directe celtelling is een zo goed mogelijke benadering van het werkelijke celtaantal in de suspensie. Het verschil tussen de directe celtelling en de kweekmethode wordt veroorzaakt door dode (niet kweekbare) cellen in het controlemonster. In alle geanalyseerde controlemonsters is de concentratie *L. pneumophila* bepaald met de kwantitatieve PCR-methode lager dan de concentraties bepaald met de directe celtelling en met de

kweekmethode. De relatieve concentratie (juistheid) van de PCR-methode is $8,6 \pm 5,3\%$ (onverdund) en $10,6\% \pm 8,1\%$ (10x verdund) ten opzichte van de directe celtelling en $21,5 \pm 13,3\%$ (onverdund) resp. $26,5 \pm 20,3\%$ (verdund) ten opzichte van de kweekmethode. De opbrengst van de PCR-methode ten opzichte van de directe celtelling is dus gering en vertoont bovendien een relatief grote spreiding. De juistheid van de PCR-methode is derhalve onvoldoende. De lage opbrengst van de isolatie van het DNA uit de cellen is de oorzaak is van de onvoldoende juistheid. Optimalisatie van deze DNA-isolatie is nodig om de concentratie van *L. pneumophila* in water met de real-time PCR-methode met voldoende betrouwbaarheid c.q. juistheid te bepalen. Toepassing van een interne controle biedt de mogelijkheid om te corrigeren voor verlies van DNA tijdens de opwerking. Deze interne controle maakt het ook mogelijk om eventuele remming van de PCR door storende componenten in het water zichtbaar te maken.

4.1.2.1 Conclusie

De juistheid van de kwantitatieve real-time PCR-methode bepaling is onvoldoende omdat de berekende concentratie met behulp van de DNA-ijklijn beduidend lager is dan de concentratie bepaald met zowel een directe celtelling als de kweekmethode (direct ingezet). Verbeteren van het rendement van de DNA-isolatie is noodzakelijk om de juistheid van de kwantitatieve real-time PCR-methode te vergroten. Toepassen van een interne controle biedt tevens de mogelijkheid om te corrigeren voor het rendement van de DNA-isolatie

4.1.3 Herhaalbaarheid

De herhaalbaarheid is een maat voor de spreiding tussen meetwaarden van identieke monsters verkregen onder dezelfde omstandigheden

De herhaalbaarheid van de PCR-reactie van de real-time PCR-methode is berekend met de afzonderlijke waarden de twee PCR-reacties van elke DNA-verdunding van de 9 geanalyseerde controlemonsters (tabel 7). De relatieve standaard afwijking (RSD) van de twee afzonderlijke PCR-reacties van elke DNA verdunding is een maat voor de herhaalbaarheid van de PCR. De RSD waarden van de gemiddelde waarde van de twee DNA-verdundingen geeft inzicht in de kwaliteit van de verdunding.

*Tabel 7 De gemiddelde *L. pneumophila* concentraties (mip-kopieën/ml) in het controlemonster en de relatieve standaard afwijking van in duplo uitgevoerde PCR-reacties bij de twee DNA-concentraties*

Exp.	onverdund DNA		10x verdund [#]	
	Gemiddeld aantal mip kopieën/ml	RSD (%)	Gemiddeld aantal mip kopieën/ml	RSD (%)
1	$7,1 \times 10^3$	1,5	$9,8 \times 10^2$	3,0
2	$1,8 \times 10^3$	3,9	$1,6 \times 10^2$	14,6
3	$3,5 \times 10^3$	5,6	$4,5 \times 10^1$	6,7
4	$2,5 \times 10^3$	0,0	$3,7 \times 10^2$	9,6
5	$3,8 \times 10^3$	0,9	$4,5 \times 10^2$	18,8
6	$1,5 \times 10^3$	12,0	$3,6 \times 10^2$	13,8
7	$2,6 \times 10^3$	2,7	$3,5 \times 10^2$	2,2
8	$7,1 \times 10^2$	1,1	$7,3 \times 10^1$	29,1
9	$3,6 \times 10^3$	*	$5,5 \times 10^2$	33,9

*afwijkende waarde die niet is meegenomen in berekening

De herhaalbaarheid van de PCR-reactie in duplo monsters met het onverdunde DNA is goed met een gemiddelde RSD van $3,5 \pm 3,9$ % op het niveau van gemiddeld $3,0 \times 10^2$ *mip*-gen kopieën in de PCR-reactie. Bij 10 x verdunning is de RSD-waarde gemiddeld $14,6 \pm 11\%$ op het niveau van gemiddeld 37 kopieën in de PCR-reactie. Dit kan worden verklaard door de lagere (10 x) DNA concentratie die net boven de onderste analysegrens van de PCR ligt (5 kopieën/PCR-reactie) en effecten (onnauwkeurigheid) als gevolg van verdunning. De PCR-reactie vormt een onderdeel van de gehele bepalingmethode. Dit betekent dat de herhaalbaarheid van de gehele methode gemiddeld minder goed zal zijn (hogere RSD) dan waargenomen met de controle monsters. Waarschijnlijk neemt de herhaalbaarheid ook af bij lagere DNA concentraties.

4.1.3.1 Conclusie

De herhaalbaarheid van de PCR-reactie met DNA van *L. pneumophila* in duplo monsters is goed. Verdunnen vermindert de herhaalbaarheid. De herhaalbaarheid van de gehele procedure moet worden vastgesteld in nader onderzoek.

4.1.4 Reproduceerbaarheid

De reproduceerbaarheid is een maat voor de spreiding tussen meetwaarden van identieke monsters geanalyseerd met dezelfde methode onder verschillende omstandigheden

4.1.4.1 Binnen-laboratorium reproduceerbaarheid

De beoordeling van de binnen-laboratorium reproduceerbaarheid is gebaseerd op de resultaten verkregen met het controlemonster dat bij 9 verschillende meetseries is geanalyseerd. De reproduceerbaarheid, uitgedrukt als RSD van de vastgestelde concentratie van *L. pneumophila*, is berekend voor de onverdunde en de verdunde DNA-concentraties. De RSD van het onverdunde DNA is 62%, van de 10 x DNA verdunning is deze met 77% iets hoger. Deze binnen-laboratorium reproduceerbaarheid is iets minder (hogere RSD) dan voor de kweekmethode (50% bij Kiwa). Uit Tabel 8 kan worden afgeleid dat bij de verkregen RSD niveau's de minimum en maximum waarden onderling een factor 10 à 20 kunnen verschillen. De binnen-laboratorium reproduceerbaarheid van de methode is dus minder goed dan de herhaalbaarheid van de PCR-reactie (4.1.3). De oorzaak van dit verschil is waarschijnlijk voornamelijk gelegen in het geringe en variabele rendement van de DNA-isolatie.

Tabel 8: Binnen-laboratorium reproduceerbaarheid van de real-time PCR-methode op basis van het controlemonster

Parameter	Concentratie <i>L. pneumophila</i> (<i>mip gen kopieën</i>)	
	onverdund DNA	10x verdund
gemiddelde	$3,0 \times 10^3 \pm 1,9 \times 10^3$	$3,7 \times 10^3 \pm 2,8 \times 10^3$
RSD	62	77
minimum	$7,1 \times 10^2$	$4,5 \times 10^2$
maximum	$7,1 \times 10^3$	$9,8 \times 10^3$

*Op basis van gemiddelde van de twee DNA-concentraties

4.1.4.2 Tussen-laboratorium reproduceerbaarheid

De tussen-laboratorium reproduceerbaarheid is bepaald op basis van 20 verschillende watermonsters die zijn verdeeld over twee flessen en

vervolgens zowel bij Kiwa als WLN zijn geanalyseerd (Tabel 9). Tevens zijn de resultaten weergegeven in Fig. 1.

Tabel 9 Analyseresultaten van 20 watermonsters met behulp van de real-time PCR-methode door Kiwa en WLN.

Monster	Concentratie <i>L. pneumophila</i> (mip gen kopieën/l)		gemiddelde	RSD (%)
	Kiwa	WLN		
1	$7,4 \times 10^3$	$3,2 \times 10^3$	$5,3 \times 10^3$	56
2	$1,4 \times 10^4$	$1,2 \times 10^4$	$1,3 \times 10^4$	10,8
3	$2,1 \times 10^3$	$4,5 \times 10^2$	$1,28 \times 10^3$	91,5
4	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	Nvt
5	$<1,3 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	Nvt
6	$<1,3 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	Nvt
7	$5,0 \times 10^2$	$2,3 \times 10^2$	365	52,3
8	$1,2 \times 10^4$	$3,3 \times 10^3$	$7,7 \times 10^3$	80,4
9	$<1,3 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	Nvt
10	$1,8 \times 10^3$	$4,5 \times 10^2$	$1,1 \times 10^2$	84,8
11	$1,5 \times 10^2$	$4,0 \times 10^2$	$2,8 \times 10^2$	64,2
12	$1,8 \times 10^2$	$8,1 \times 10^3$	$4,1 \times 10^3$	135
13	$2,0 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	3,4
14	$4,1 \times 10^3$	$2,1 \times 10^3$	$3,1 \times 10^3$	45,6
15	$8,3 \times 10^2$	$1,0 \times 10^3$	$9,1 \times 10^2$	13,1
16	$1,9 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	$<1,0 \times 10^2$	82,5
17	$1,4 \times 10^4$	$3,3 \times 10^2$	$7,2 \times 10^3$	135
18	$4,2 \times 10^3$	$5,1 \times 10^2$	$2,4 \times 10^2$	110
19	$1,6 \times 10^3$	$1,9 \times 10^3$	$1,8 \times 10^3$	12,1
20	$6,8 \times 10^2$	$4,9 \times 10^2$	$5,9 \times 10^2$	22,9

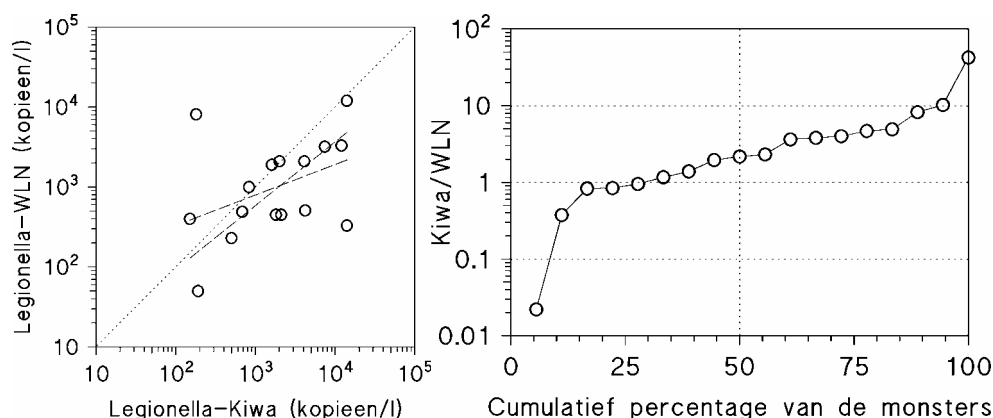


Fig. 1. Verband tussen resultaten van metingen uitgevoerd bij WLN en bij Kiwa met een 20-tal watermonsters. Meetresultaten beneden de detectiegrens zijn niet opgenomen. De stippellijn (links) geeft $Y=X$ aan. De onderbroken lijnen in deze figuur geven het berekende verband tussen de meetwaarden (lineaire regressie). In de figuur rechts is per monster het quotiënt van het meetresultaat bij Kiwa en van WLN weergegeven.

Met behulp van een (gepaarde) T-toets (tweezijdig, 5%) is vastgesteld dat de concentraties van *L. pneumophila* geanalyseerd door Kiwa en WLN in de

verschillende watermonsters niet significant verschillend zijn. Uit Tabel 9 en Fig. 1 blijkt dat in een aantal gevallen de meetresultaten onderling sterk verschillen. Uit regressie-analyse blijkt dat er alleen een significante correlatie tussen de meetresultaten is ($r^2 = 0,66$; $p < 0,001$) als enkele uitbijters worden weggelaten.

4.1.4.3 Conclusie

De binnen-laboratorium reproduceerbaarheid is voor het onverdunde DNA 62% en voor de 10x-DNA verdunning 77% en zijn iets hoger dan de waarde die geldt voor de kweekmethode. De tussen-laboratorium reproduceerbaarheid (bepaald met slechts twee laboratoria) is gemiddeld eveneens 62%. De afzonderlijke waarden zijn niet significant verschillend op basis van de gepaarde t-toets (tweezijdig, 95% betrouwbaarheid). De meetresultaten kunnen onderling echter relatief sterk verschillen. Dit is echter ook het geval bij de kweekmethode. Nader onderzoek met een verbeterde methode (hoger rendement van DNA-isolatie) en meer laboratoria is nodig voor het vaststellen van de prestatiekenmerken van de real-time PCR methode.

4.1.5 Aantoonbaarheidsgrens

De aantoonbaarheidsgrens is de laagste, volgens het voorschrift gemeten, concentratie in het analysemonster, waarvan de aanwezigheid nog met een bepaalde onzekerheid kan worden vastgesteld.

In de PCR-reactie is het mogelijk één specifiek DNA-fragment aan te tonen. Dit resulteert in een theoretische aantoonbaarheidsgrens van 20 mip gen kopieën/l indien 500 ml water wordt gefiltreerd en 1/10 van het geïsoleerde DNA in de PCR-reactie wordt geanalyseerd. De werkelijke aantoonbaarheidsgrens van de methode kan worden bepaald in verdunningen van suspensies met een bekende bacterieconcentratie. Dit onderzoek is niet uitgevoerd

4.1.6 Bepaalbaarheidsgrens

De bepaalbaarheidsgrens is de laagste, volgens het voorschrift gemeten, concentratie in het analysemonster, waarvan de meetwaarde nog met een bepaalde onzekerheid kan worden vastgesteld.

In elke individuele PCR-reactie is een ondergrens aangehouden van 5 kopieën. De reden is dat de resultaten van minder dan 5 kopieën moeilijk zijn te interpreteren. Hierdoor is de bepaalbaarheidsgrens van de methode 100 mip-gen DNA kopieën/l indien 500 ml water is gefiltreerd. Concentreren van meer of minder water zal naar verhouding de detectiegrens verlagen resp. verhogen.

4.1.7 Lineariteit

De lineariteit is het rechtlijnig verband tussen het meetsignaal en de hoeveelheid te bepalen component.

De lineariteit van de PCR-methode is geanalyseerd op basis van de richtingscoëfficiënt van de ijklijn verkregen met DNA. De lineariteit van de gehele methode is niet bepaald. Deze wordt mede beïnvloed door variaties in het rendement van de DNA-isolatie.

De monsters van de DNA-ijklijn bevatten tussen de 50.000 en 5 DNA-kopieën (Tabel 4). De helling van de lijn geeft informatie over de efficiëntie van de PCR-reactie en is afhankelijk van in de mate van DNA-vermenigvuldiging (verdubbeling) in iedere PCR-cyclus. Hierbij geldt:

$$E = e^{\ln 10 / s} - 1,$$

waarbij E = efficiëntie van de PCR-reactie en s= richtingscoëfficiënt van de ijklijn.

Een PCR-efficiëntie van 100% betekent dat na elke cyclus de DNA-concentratie is verdubbeld en is een kwaliteitsmaat voor de PCR primers en probe. Van elk monster opgenomen in de ijklijn is de oorspronkelijke concentratie DNA uitgezet tegen de "threshold cycle" i.e. het moment dat de DNA-concentratie boven de detectiegrens uitkomt. Elk DNA-monster in de ijklijn is in duplo geanalyseerd. De correlatiecoëfficiënt van de threshold-

waarden van de verschillende monsters geeft ook inzicht in de lineariteit van de methode. In tabel 10 zijn de PCR-efficiëntie en de correlatiecoëfficiënt weergegeven van de verschillende real-time PCR-experimenten.

De PCR-efficiëntie van de verschillende DNA-ijklijnen varieert van minimaal 90,2 tot maximaal 107,7%. Uit deze waarde blijkt dat het DNA in de PCR-reactie optimaal wordt vermenigvuldigd. De spreiding wordt veroorzaakt door het verdunnen van de DNA-suspensie (tabel 4).

Tabel 10. De PCR-efficiëntie en de correlatiecoëfficiënt van de DNA-ijklijn geanalyseerd met behulp van de real-time PCR-methode.

<i>Experiment</i>	<i>PCR-efficiëntie (%)</i>	<i>Correlatiecoëfficiënt (r²)</i>
1	91,6	0,99
2	99,7	1,00
3	90,2	1,00
4	93,8	1,00
5	105,1	0,99
6	95,9	1,00
7	107,7	0,99
8	96,1	1,00
9	96,8	1,00

4.1.7.1 Conclusie

De hoge mate van PCR-efficiëntie en de hoge correlatiecoëfficiënt tonen aan dat de PCR binnen de gemeten DNA-concentratiereeks een hoge mate van lineariteit vertoont tussen het meetsignaal (threshold waarde) en de hoeveelheid oorspronkelijk DNA.

4.1.8 Robuustheid

De robuustheid is de ongevoeligheid van de methode voor variaties in de omstandigheden en de methodevariabelen bij de uitvoering

De robuustheid van de methode is niet afzonderlijk geanalyseerd. Tijdens het onderzoek is gebruik gemaakt van verschillende batches primers, probe, taq-polymerase, DNA-isolatie kits en filters. De robuustheid van de PCR-methode moet nader worden bepaald na verbeteren van het rendement van de DNA-opwerkmethode.

4.1.9 Vergelijkbaarheid van de real-time PCR-methode met de kweekmethode

De vergelijkbaarheid van de real-time PCR-methode met de kweekmethode is zowel kwalitatief als kwantitatief bepaald. De standaard kweekmethode is uitgevoerd volgens NEN6265. Enkele moeilijk filtreerbare watermonsters zijn rechtstreeks uitgespateld (grafiek 1). Van elk watermonster zijn, indien groei van *Legionella* optrad, enkele kolonies getypeerd met behulp van een agglutinatiekkit met antisera (Oxoid). De agglutinatiekkit kan onderscheid maken tussen specifiek *L. pneumophila* serumgroep 1 (sg1) en *L. pneumophila* sg2-14 en de *Legionella* soorten *L. anisa*, *L. bozemanii* sg1 & sg2, *L. dumofii*, *L. gormanii*, *J. jordanis*, *L. longbeachae* sg1 & sg2 en *L. micdadei*.

In totaal zijn door de laboratoria van Kiwa en Waterlaboratorium Noord 496 watermonsters geanalyseerd (Kiwa-laboratorium 145 en WLN 351). Alleen de monsters waarbij na (sero)typering is aangetoond dat de kolonies behoren tot *L. pneumophila* worden beschouwd als positief voor het kweekresultaat. Dit verhoogt de mogelijkheid om de twee (totaal) verschillende detectiemethoden te vergelijken. De watermonsters omvatten monsters van warmleidingwater, koelwater en vele andere watermonsters aangeboden aan de laboratoria in de onderzoeksperiode.

4.1.9.1 Vergelijking kweekmethode en PCR-methode bij Kiwa

Een vergelijking van de twee detectiemethoden laat zien dat in 86% van de geanalyseerde watermonsters het kwalitatieve (aan/afwezigheid) resultaat gelijk is (tabel 11). Hierbij moet echter worden aangetekend dat in het overgrote deel van deze monsters met geen van beide methoden *Legionella* is waargenomen. In 6% van de watermonsters was de PCR-methode positief en de kweekmethode negatief. In geen van deze monsters was de detectiegrens van de kweekmethode (detectiegrens 50 CFU/l en 1000 CFU/l voor direct uitspatelen) de beperkende factor. Een positieve PCR en een negatieve kweek kunnen door verschillende redenen worden veroorzaakt. Het aangetoonde DNA kan afkomstig zijn van dode bacteriën en/of niet kweekbare bacteriën. Ook kan remming optreden bij de kweekmethode als gevolg van bijgroei.

Tabel 11. Detectieresultaat van 145 watermonsters geanalyseerd met de kweekmethode en de Real-time PCR-methode door KIWA

Detectiemethode		aantal monsters	percentage (%)
PCR	Kweek		
+	+	44	30
-	-	81	56
+	-	9	6
-	+	11	8
totaal		145	100

In 8% van de monsters was de kweekmethode positief en de PCR-negatief. In de meeste van deze monsters is dit veroorzaakt door de hogere detectiegrens van de PCR-methode (tabel 12).

Tabel 12: Waarschijnlijke oorzaak van een negatieve PCR-uitslag en een positieve kweek

Oorzaak	aantal	uitleg
onder detectiegrens	8	Detectiegrens PCR is hoger dan of vrijwel gelijk dan de concentratie aangetoonde kweekbare <i>Legionella</i> -bacteriën
twee typen <i>Legionella</i>	1	de gekweekte <i>Legionella</i> -bacteriën behoorden tot twee typen, een <i>L. pneumophila</i> en een non-pneumophila
onbekend	2	Geen oorzaak te achterhalen (kweek: $1,2 \times 10^3$ kve/l en $9,5 \times 10^2$ kve/l)

In 8 monsters was de detectiegrens van de PCR-methode van tussen de 100 en 270 DNA-kopieën, hoger dan het aantal gekweekte *Legionella*-bacteriën. Het filter dat wordt gebruikt voor het concentreren van watermonsters voor de PCR-methode (25 mm) is kleiner dat wordt toegepast in de kweekmethode (45 mm). Het bleek voor deze monsters niet mogelijk een halve liter water over dit kleinere filter te filtreren. In iets meer dan 1% van de watermonsters (2 monsters) is geen verklaring gevonden wat de reden kan zijn geweest dat wel *Legionella*-bacteriën zijn gekweekt maar dat de PCR-methode negatief was. In 13% van de watermonsters (19 monsters) is *Legionella* gekweekt maar bleken de gekweekte *Legionella*-bacteriën na serotypering niet te behoren tot *L. pneumophila*. In al deze monsters was de PCR-methode negatief.

4.1.9.2 Vergelijking PCR-methode en kweekmethode bij Waterlaboratorium Noord

In 76% van de watermonster geanalyseerd door WLN is het kwalitatieve detectieresultaat gelijk (tabel 13). Van deze in totaal 267 watermonsters is in het overgrote deel (244) geen *L. pneumophila* aangetoond. In 7% van de monsters is zowel met de PCR-methode als de kweekmethode *L. pneumophila* aangetoond. Ook in de praktijk wordt in een vergelijkbaar percentage monsters *L. pneumophila* aangetoond met de kweekmethode.

Tabel 13: Detectieresultaat van 351 watermonsters geanalyseerd met zowel de kweek als de real-time PCR-methode door WLN

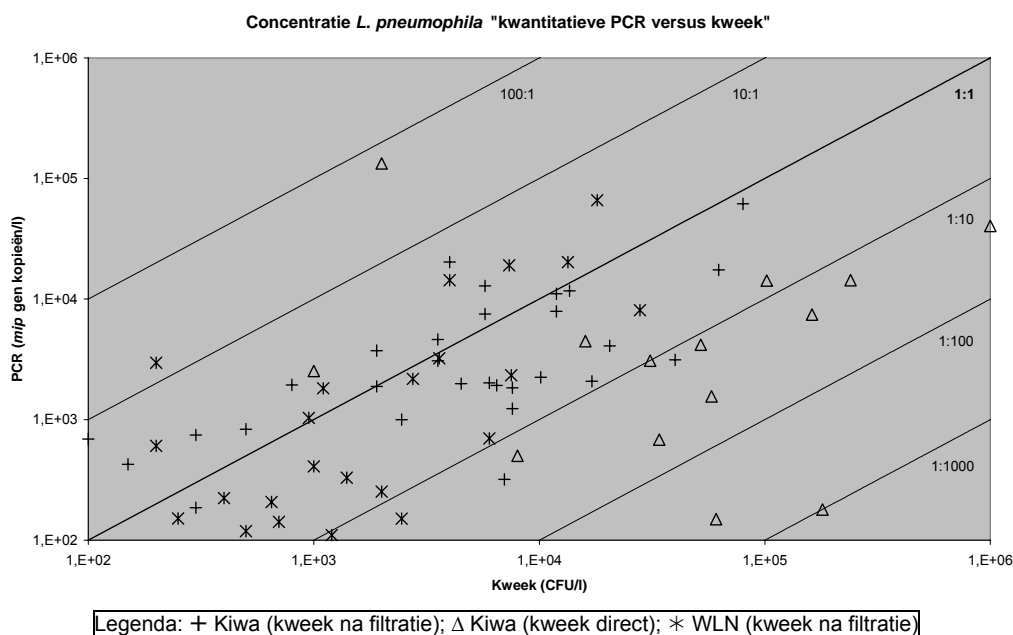
Detectiemethode		aantal monsters	percentage (%)
PCR	Kweek		
+	+	23	7
-	-	244	69
+	-	73	21
-	+	11	3
totaal		351	100

In 21 % van de monsters bleek de PCR-methode een positief resultaat te hebben terwijl de kweekmethode negatief was. In meer dan de helft van deze monsters was de matrix koelwater (39 monsters). Deze monsters vertoonden met de kweekmethode veel bijgroei van andere bacteriën. Hierdoor zijn de agarplaten vaak moeilijk te beoordelen op de aanwezigheid van *Legionella*-kolonies. In 3 watermonsters zijn de geanalyseerde kolonies getypeerd als non-*pneumophila* terwijl met de PCR-methode *L. pneumophila* is aangetoond. Mogelijk waren in de monsters meerdere typen *Legionella* aanwezig. Een klein percentage van 3% (11 monsters) is positief met de kweekmethode terwijl er met de PCR geen *L. pneumophila* is aangetoond. In 2 monsters is het resultaat van de kweekmethode (50 kve/l) onder de bepaalbaarheidsgrens van de PCR-methode en in 8 monsters is de concentratie lager dan 1000 kve/l. Remming van de PCR door de matrix en

een lage opbrengst van de DNA-isolatie lijken de belangrijkste oorzaken van een negatief PCR-resultaat en een positieve kweekuitslag.

4.1.9.3 Kwantitatieve vergelijking (beide laboratoria)

De analyseresultaten van 67 watermonsters waarin met de PCR-methode en met de kweekmethode *L. pneumophila* is aangetoond zijn weergegeven in figuur 2. In tweederde van de watermonsters is met kweekmethode een hogere concentratie *Legionella* aangetoond dan met de real-time PCR-methode.



Figuur 2. Aantal *L. pneumophila* gedetecteerd met de kwantitatieve real-time PCR-methode in vergelijking met de kweekmethode

De verwachting was dat de PCR-methode in het algemeen een hogere uitslag te zien zou geven dan de kweekmethode. In 31% van de monsters blijkt dit het geval te zijn en kan dit mogelijk worden verklaard door het voorkomen van niet kweekbare en/of dode bacteriën in de watermonsters of remming van de kweekmethode (zie hierboven). In 45 monsters liet de kweekmethode een hogere uitslag zien. Een klein aantal van 14 watermonsters is in de kweek rechtstreeks ingezet (ongefiltreerd). In 13 van deze monsters is de uitslag van de kweekmethode hoger dan de PCR-methode. Bij rechtstreeks uitspatelen van het water op het semi-selectieve agarmedium is het rendement van de kweekmethode hoger dan na concentreren met behulp van filtratie.

Het lage rendement van de isolatie van het DNA uit de bacteriën (ca 10%, zie 4.1.2) is de meest waarschijnlijke oorzaak van het relatief grote aantal monsters waarin met de kwantitatieve PCR-methode een lagere concentratie *L. pneumophila* is aangetoond dan met de kweekmethode. In het validatieonderzoek is gebruik gemaakt van een ijklijn op basis van geïsoleerd (plasmide) DNA. Dit referentie DNA is rechtstreeks aan de PCR-reactie toegevoegd. Hierdoor wordt bij het kwantificeren van de monsters niet gecorrigeerd voor rendementsverliezen die optreden tijdens concentreren van de cellen en de DNA-isolatie. Feitelijk wordt met een DNA-ijklijn dus de

specifieke DNA concentratie in het geïsoleerde DNA gekwantificeerd en niet het rendement van de gehele bepaling.

4.1.9.4 Conclusies

De twee methoden die zijn vergeleken detecteren geheel verschillende aspecten van *L. pneumophila*, respectievelijk het aantal *mip* gen kopieën en het aantal kweekbare cellen. Het kwalitatieve (aan-/afwezigheid) analyseresultaat is gelijk in 79% van de 496 geanalyseerde. In 17% van de monsters is met de PCR-methode *L. pneumophila* aangetoond en was de kweekmethode negatief. Mogelijke verklaringen zijn de aanwezigheid van dode en/of niet kweekbare cellen en remming van de kweekmethode door storende bijgroei (koelwatermonsters). In 4% van de monsters was het resultaat tegengesteld en was de kweekmethode positief en de PCR negatief. In veel van deze monsters is een laag aantal kweekbare bacteriën aangetoond en is de waarschijnlijke oorzaak een iets hogere bepaalbaarheids grens van de PCR-methode en/of een laag rendement van de DNA-isolatie. In tweederde van de geanalyseerde watermonsters was de uitslag van de kweekmethode hoger (kve/l) dan de PCR-methode (*mip* kopieën/l). Belangrijkste verklaringen zijn het direct inzetten van de kweekmethode waardoor het rendement hoog is en opnieuw het lage rendement van de DNA-isolatie waardoor er relatief veel verlies optreedt tijdens het opwerken van de monsters.

De mate van overeenkomst tussen beide methoden kan worden verbeterd door een hoger rendement van de DNA-isolatie.

5 Conclusies en aanbevelingen

5.1 Conclusies

- Uit onderzoek van 338 *mip*-sequenties, analyse van een aantal *Legionella* stammen en een groot aantal watermonsters blijkt dat de real-time PCR methode met nieuw ontworpen primers en probe specifiek is voor *L. pneumophila*;
- De juistheid van de real-time PCR-methode is onvoldoende als gevolg van het geringe rendement (ca. 10%) van de DNA-isolatie. De juistheid kan worden verbeterd door optimalisatie van het isolatierendement en het toepassen van een interne controle met DNA;
- De herhaalbaarheid van de PCR-reactie van identieke DNA-monsters in demiwater is goed;
- Binnen de gemeten DNA-concentratiereeks van de ijklijn (5-50.000 DNA kopieën) is er een hoge PCR-efficiëntie (92-108%) en een zeer goede lineariteit;
- De binnen-laboratorium reproduceerbaarheid op basis van controlemonsters in demiwater bedraagt 62% en komt overeen met de kweekmethode. Echter, bij een dergelijke reproduceerbaarheid kan het verschil tussen de minimum waarde en de maximum waarde een factor 10 of meer bedragen;
- De tussen-laboratorium reproduceerbaarheid na analyse van 20 verschillende watermonsters bij Kiwa en WLN bedraagt 62%. De afzonderlijke waarde zijn niet significant verschillend op basis van de gepaarde t-toets (tweezijdig, 0,1), maar kunnen, maar relatief grote verschillen kunnen optreden bij individuele monsters;
- De bepaalbaarheidsgrens is gesteld op 100 *mip* gen kopieën/l, de aantoonbaarheidsgrens is 20 *mip* gen kopieën/l. Deze grenzen, die onder meer afhankelijk zijn van het watervolume dat in onderzoek wordt genomen, zijn niet experimenteel geverifieerd;
- De robuustheid van de methode is niet afzonderlijk geanalyseerd maar lijkt goed met betrekking tot de PCR-methode. De DNA-isolatie moet echter worden verbeterd en ook is er nog onduidelijkheid over de invloed van de watersamenstelling (matrix) op de PCR-methode;
- In 79% van de in totaal 469 geanalyseerde watermonsters komt het kwalitatieve detectieresultaat van de nieuwe real-time PCR-methode en de kweekmethode overeen. Echter, in het overgrote deel van deze monsters werd met geen van beide methoden *Legionella* waargenomen;
- In 39% van de monsters met *Legionella* was het kwalitatieve resultaat van de beide methoden gelijk, maar gaf de kweekmethode meestal een hogere concentratie dan de PCR-methode. De oorzaak van dit verschil is gelegen in het geringe rendement van de DNA-isolatie;
- In 48% van de monsters met *Legionella* is *L. pneumophila* alleen aangetoond met de PCR-methode. Oorzaken voor het betere resultaat van de PCR-methode zijn de aanwezigheid van dode of niet kweekbare bacteriën in het monster en/of remming van de kweekmethode (koelwater) door bijgroei;
- In 13% van de monsters met *Legionella* is een relatief lage concentratie (max 10^3 /l) *L. pneumophila* gekweekt en was de PCR-methode negatief

hetgeen waarschijnlijk wordt veroorzaakt door het lage rendement van de DNA-isolatie;

5.2 Aanbevelingen voor verder onderzoek

- Het rendement van de DNA-isolatie dient te worden verbeterd tot een niveau van 50-60%;
- Een interne controle moet worden ontwikkeld, waarmee het mogelijk wordt om per monster het rendement van de opwerking van het DNA vast te stellen;
- Na optimalisatie van DNA-isolatie en ontwikkeling van een interne controle moeten de prestatiekenmerken opnieuw worden bepaald. Hierbij dient de tussen-laboratorium reproduceerbaarheid met meerdere laboratoria te worden bepaald;
- De vergelijking van de PCR-methode en de kweekmethode dient te worden uitgevoerd in water met *Legionella*. Toevoeging van *Legionella* aan diverse watertypen is hierbij een optie. Bij de kweekmethode dient duidelijk onderscheid te worden gemaakt tussen monsters die direct zijn uitgespateld en monsters waarbij filtratie is toegepast.

6 Literatuur

1. **Anonymous.** Bacteriological examination of water; Examination on the presence and the number of colony forming units (CFU) of *Legionella*-bacteria. Nederlands Norm: NEN 6265.
2. **Anonymous.** 2002. Onderzoek naar *Legionella* met behulp van PCR: Kiwa-huisvoorschrift LMB-043.
3. **den Boer, J. W., I. H. Friesema, and J. D. Hooi.** 2002. [Reported cases of *Legionella pneumonia* in the Netherlands, 1987-2000]. *Ned Tijdschr Geneeskd* **146**:315-20.
4. **Engleberg, N. C., C. Carter, D. R. Weber, N. P. Cianciotto, and B. I. Eisenstein.** 1989. DNA sequence of *mip*, a *Legionella pneumophila* gene associated with macrophage infectivity. *Infect Immun* **57**:1263-70.
5. **Herpers, B. L., B. M. de Jongh, K. van der Zwaluw, and E. J. van Hannen.** 2003. Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of *Legionella spp.* and *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* **41**:4815-6.
6. **Reischl, U., H. J. Linde, N. Lehn, O. Landt, K. Barratt, and N. Wellinghausen.** 2002. Direct detection and differentiation of *Legionella spp.* and *Legionella pneumophila* in clinical specimens by dual-color real-time PCR and melting curve analysis. *J Clin Microbiol* **40**:3814-7.
7. **Templeton, K. E., S. A. Scheltinga, P. Sillekens, J. W. Crielaard, A. P. van Dam, H. Goossens, and E. C. Claas.** 2003. Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplex real-time PCR assay for detection of *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species. *J Clin Microbiol* **41**:4016-21.
8. **Wilson, D. A., B. Yen-Lieberman, U. Reischl, S. M. Gordon, and G. W. Procop.** 2003. Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the *mip* gene. *J Clin Microbiol* **41**:3327-30.

I Bijlage

SpectroQuant™

The amount of molecules is calculated with aid of the molecular weight in basepairs. Therefore, check the DNA sizes before starting.

Please fill in the Sample-ID in the **lilac** bars



Please fill in the OD₂₆₀ values of the Negative control in the **orange** bars

Please fill in the OD₂₆₀ values of the samples in the **blue** bars

Please fill in the corresponding dilution-factor in the **green** bars

Please fill in the corresponding DNA (vector) size in the **yellow** bars

SpectroQuant™ Measurements for estimation of dsDNA concentration (ng/ml)

Samples to Quantitate (StQ)

Defined is that at OD₂₆₀ is 1 the concentration is 50 ng.ml⁻¹

Defined is that OD₂₆₀ is 4x EM₅₂₀

	Optical Density_StQ 260 nm					
	Duplo 1	Duplo 2	Mean			
Negative control	0,000	0,000	0,000			

Sample_ID	Optical Density_StQ 260 nm		Dilution factor	Size (bp)	Concentration	
	Duplo 1	Duplo 2			µg.µl ⁻¹	molecules.µl ⁻¹
pCR2.1TOPO-mip	0,177	0,163	40	4633	3,40E-01	1,67E+10
pCR2.1TOPO-mip	0,322	0,335	20	4633	3,29E-01	1,62E+10
pico-std.	0,034	0,033	40	4301	6,70E-02	3,55E+09
pico-std.	0,066	0,068	20	4301	6,70E-02	3,55E+09