

RIVM rapport 330000004/2004

Gezondheidsaspecten van *Legionella* in water

F.M. Schets en A.M. de Roda Husman

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van Directoraat Generaal Milieubeheer, Directie Bodem, Water en Landelijk gebied in het kader van project 734301, Normstelling en Advisering Drinkwater, ten behoeve van intern project 330000, Watermicrobiologie, deelproject Legionella.

RIVM, Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, telefoon: 030 - 274 91 11; fax: 030 - 274 29 71

Abstract

Legionella pneumophila is a cause of severe pneumonia in humans. *Legionella* bacteria are found in all freshwater environments. Particularly in artificial environments people may be exposed to *Legionella* containing aerosols. In this brief overview of the state of the art of *Legionella* research it is shown that, although many research groups study *Legionella*, many questions on this complex pathogen remain to be answered. Because complete elimination of *Legionella* from all water systems is impossible, public health protection should be aimed at minimising the risk of contamination by taking adequate preventive measures. However, this requires insight into factors that result in the formation of biofilms and that enable *Legionella* to colonise water systems and multiply on biofilms. The presence of *Legionella* in a water system is known to not always result in illness of exposed persons; therefore it is important to unravel the public health significance of the detection of *Legionella* in a water system. This requires optimisation of the detection method for *Legionella* in water, which lacks sensitivity and specificity, and comparison of *Legionella* isolates from patients and water. Additional research is clearly indispensable in building a solid foundation for current and future legislation.

Inhoud

Samenvatting	4
1. Inleiding	5
2. <i>Legionella</i>	6
2.1 Kenmerken	6
2.2 Gezondheidsaspecten	6
2.3 Epidemiologie	7
2.4 Protozoa en biofilms	8
2.5 Levenscyclus	9
2.6 Pathogeniteit	10
3. Detectie	12
3.1 Kweekmethoden	12
3.2 Moleculaire methoden	13
3.3 Overige methoden	14
4. Preventie	16
4.1 Reductie besmettingsrisico	16
4.2 Beheersmaatregelen	16
4.3 Surveillance	17
5. Wetgeving	18
5.1 Drinkwater	18
5.2 Zwembaden	18
5.3 Woningen	19
5.4 Arbeidsomstandigheden	19
5.5 Normstelling	19
6. Risicoanalyse	20
7. Discussie	21
8. Conclusies	25
Literatuur	26

Samenvatting

Het besef dat legionellose, veroorzaakt door *Legionella pneumophila*, een infectieziekte is die in Nederland tot doden kan leiden ontstond na de explosie van legionellose onder de bezoekers aan de West-Friese Flora in Bovenkarspel in 1999. *Legionella* blijkt overal in waterige milieus aanwezig te zijn. Met name in kunstmatige waterige milieus speelt blootstelling aan aerosolen een rol en vormt *Legionella* een potentieel risico voor de volksgezondheid. Preventieve maatregelen dienen er op gericht te zijn het besmettingsrisico zo klein mogelijk te maken. Om adequate preventieve maatregelen te kunnen treffen is kennis omtrent de factoren die bepalen of *Legionella* zich in een leidingnet kan vermenigvuldigen tot voor de volksgezondheid relevante niveaus vereist. Tevens is het van belang te weten wat de betekenis van de aanwezigheid van *Legionella* in een leidingsysteem voor de volksgezondheid is. In dit rapport wordt een beknopt overzicht gegeven van de huidige kennis over *Legionella* en aan de hand van de formulering van een aantal onderzoeksvragen is aangegeven waar het nog aan kennis ontbreekt en onderzoek noodzakelijk is.

Legionella overleeft als intracellulaire parasiet in protozoa die grazen op biofilms. Indien inzicht wordt verkregen in de invloed van onder andere watersamenstelling, leidingmateriaal en het patroon van watergebruik op de vorming van biofilms en kolonisatie van leidingwatersystemen door *Legionella* kunnen preventieve maatregelen worden genomen. Onderzoek dient zich tevens te richten op de vraag welke *Legionella* soorten (*pneumophila* vs. non-*pneumophila*) ziekte veroorzaken bij de mens en wat deze *Legionella* soorten pathogeen maakt. Een complexe wisselwerking tussen verschillende mechanismen, beïnvloed door omgevingsfactoren, lijkt de virulentie van *Legionella* soorten te bepalen.

De in de Nederlandse wetgeving voorgeschreven kweekmethode voor de detectie van *Legionella* in water dient geoptimaliseerd te worden omdat zowel de gevoeligheid als de specificiteit onvoldoende zijn. Het is eveneens onvoldoende bekend wat het aantonen van verschillende *Legionella* soorten in leidingwater aan het tappunt met behulp van deze methode betekent voor de volksgezondheid. Door *Legionella* stammen uit patiëntenmateriaal en uit water te typeren en te vergelijken kan worden vastgesteld welke stammen die in het milieu aanwezig zijn de potentie hebben om ziekte bij de mens te veroorzaken.

Wanneer een risicoanalyse zich zou richten op berekening van de kans op ziekte bij aanwezigheid van *Legionella* in leidingwater in plaats van op vaststelling van het risico dat de leidingwaterkwaliteit niet aan de gestelde eis, die gebaseerd is op het voorzorgbeginsel en niet op een dosis-respons relatie, voldoet, zou beter aangegeven kunnen worden of een waterinstallatie daadwerkelijk een volksgezondheidsprobleem vormt.

Dit overzicht van de belangrijkste hiaten in de kennis over de gezondheidsaspecten van *Legionella* in water geeft aan dat onderzoek ter onderbouwing van huidige en toekomstige wetgeving onontbeerlijk is.

1. Inleiding

Legionella kan ernstige longontsteking bij de mens veroorzaken. Het besef dat legionellose een infectieziekte is die in Nederland tot doden kan leiden ontstond na de explosie van legionellose onder de bezoekers aan de West-Friese Flora in Bovenkarspel in 1999 (Den Boer *et al.*, 2002a), waarbij een groot aantal mensen besmet werd, sommigen een zeer ernstig ziektebeeld ontwikkelden en een aantal mensen overleden. Ten einde ziekte explosies van deze omvang in de toekomst te voorkomen werd de ‘Tijdelijke regeling legionellapreventie in leidingwater’ (Anonymous, 2000a) opgesteld. Deze wettelijke regeling had een intensivering van het aantal metingen tot gevolg.

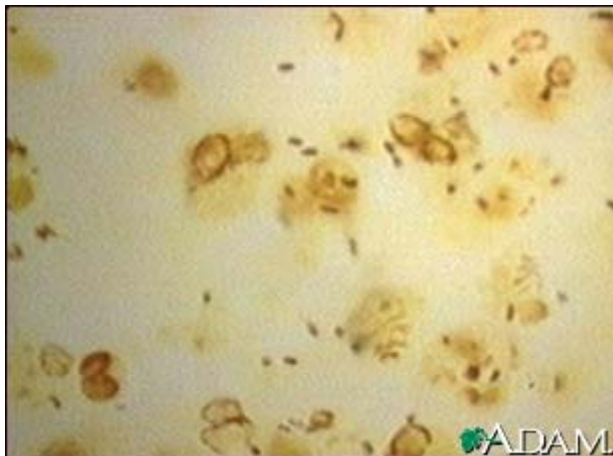
Legionella bacteriën blijken overal in zowel natuurlijke als door de mens gecreëerde waterige milieus aanwezig te zijn. Met name in kunstmatige waterige milieus speelt blootstelling aan ontstane aërosolen een rol en vormt *Legionella* een potentieel risico voor de volksgezondheid. De aanwezigheid van *Legionella* in een leidingwaterinstallatie leidt echter niet per definitie tot ziekte bij blootgestelde personen. Verschillende factoren bepalen of de bacterie zich al dan niet kan vermenigvuldigen tot voor de volksgezondheid relevante niveaus. Om ziekte te kunnen veroorzaken lijkt voorts verspreiding via aërosolen vereist en dient de bacterie de weerstand van de blootgestelde gastheer te overwinnen. Kennis omtrent de factoren die bepalen of *Legionella* een leidingnet kan koloniseren alsmede over de betekenis voor de volksgezondheid van de aanwezigheid van *Legionella* in een leidingsysteem, bijvoorbeeld bij routine monitoring, maakt het mogelijk om adequate preventieve maatregelen te treffen.

De ecologie en pathogeniteit van *Legionella* zijn echter complex en hoewel er wereldwijd veel onderzoek naar *Legionella* wordt gedaan, blijken toch vele hiaten in de kennis aanwezig te zijn. Het is duidelijk dat een adequate *Legionella* preventie nog veel ondersteunend onderzoek behoeft. Dit rapport geeft een beknopt overzicht van de huidige kennis over *Legionella*, maar heeft niet de intentie om gedetailleerde informatie over elk aspect van de complexe studie van het pathogeen *Legionella* te geven. Binnen- en buitenlandse onderzoekstrajecten die op dit moment worden bewandeld worden belicht en er wordt een aantal onderzoeksvragen geformuleerd. Tevens wordt aangegeven op welke wijze de projectgroep Watermicrobiologie van het Microbiologisch laboratorium voor Gezondheidsbescherming (MGB) van het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) een zinvolle bijdrage zou kunnen leveren aan het beantwoorden van deze onderzoeksvragen en daarmee het invullen van de kennishiaten met betrekking tot de gezondheidsaspecten van *Legionella* in water.

2. *Legionella*

2.1 Kenmerken

Legionella bacteriën zijn Gram-negatieve, aërobe, monopolaire flagellaire staafjes met een optimale groeitemperatuur van 35 °C (bereik 25 tot 42 °C). Zij komen overal in waterige milieus voor, zowel in natuurlijke als in kunstmatige door de mens gecreëerde milieus. In natuurlijke milieus komen zij meestal in lage aantallen voor, terwijl in kunstmatige milieus vaak hoge dichtheden worden waargenomen. Een verhoogde watertemperatuur, de aanwezigheid van protozoa die als gastheer kunnen dienen, de samenstelling van leidingmateriaal en de organische en anorganische samenstelling van het water spelen hierbij een belangrijke rol. In kunstmatige milieus is een specifieke combinatie van beschikbare nutriënten aanwezig zodat snelle vermenigvuldiging van de bacteriën kan plaatsvinden. Een dergelijke combinatie komt in natuurlijke milieus veel minder vaak voor en zou daar ook veel eerder leiden tot een snelle groei van andere bacteriën dan *Legionella* (Steinert *et al.*, 2002). Er zijn inmiddels 48 *Legionella* soorten ontdekt en beschreven (Fields *et al.*, 2002). De meeste humane infecties (> 90 %) worden veroorzaakt door *L. pneumophila*, maar 19 andere soorten worden ook in relatie tot ziekte bij de mens genoemd (Muder en Yu, 2002).



Figuur 1 Microscopische opname van *Legionella* bacteriën
Bron: Centers for Disease Control (CDC)

2.2 Gezondheidsaspecten

Humane infecties vinden uitsluitend plaats door overdracht via aërosolen. Inhaleren van aërosolen waarin zich de bacteriën bevinden die de longblaasjes kunnen binnendringen, leidt bij gevoelige gastheren tot ziekte. Overdracht van persoon-op-persoon wordt niet

waargenomen (Swanson en Hammer, 2000). *L. pneumophila* is de veroorzaker van ‘Legionnaires’ disease’ (veteranenziekte of legionellose). Deze ziekte begint met milde symptomen, zoals hoesten, malaise, spierpijn, matige koorts en gastro-enteritis klachten. In een later stadium treden hoge koorts en ernstige longontsteking op. Op grond van klinische symptomen is het onmogelijk om onderscheid te maken tussen door *Legionella* veroorzaakte longontstekingen en longontstekingen met een andere veroorzaker. *L. pneumophila* is eveneens de veroorzaker van ‘Pontiac fever’: een milde, griepachtige ziekte die zelflimiterend is. Bij patiënten met ‘Pontiac fever’ treedt seroconversie op, maar tot op heden heeft men nooit *Legionella* uit patiëntenmateriaal kunnen isoleren. Een mogelijke verklaring die hiervoor wordt gegeven is dat ‘Pontiac fever’ wordt veroorzaakt door levensvatbare, niet kweekbare *Legionella* bacteriën. Tevens wordt gedacht dat veranderde virulentiefactoren een rol spelen of dat er toxische of hypersensitieve reacties in de gastheer optreden. Naast veteranenziekte en ‘Pontiac fever’ veroorzaakt *Legionella* ook wondinfecties en extrapulmonaire legionellose (Vos en Troelstra, 2001). Epidemiologische studies hebben aangetoond dat *Legionella* een opportunistische pathogeen is waar ouderen en personen met een immuun deficiëntie het meest gevoelig voor zijn (Steinert *et al.*, 2002).

Onderzoeksvraag:

Waarom wordt niet iedereen die aan Legionella blootgesteld wordt ziek?

2.3 Epidemiologie

De eerste geregistreerde explosie van legionellose vond plaats in 1976 in Philadelphia onder leden van het ‘American Legion Pennsylvania Chapter’ (Fraser *et al.*, 1977). De tot dan toe onbekende veroorzaker werd in 1979 *Legionella pneumophila* genoemd. Bij onderzoek van oud (patiënten)materiaal uit 1943 bleek dat deze bacterie al eerder geïsoleerd was (Fields *et al.*, 2002) en ook al veel eerder explosies van legionellose had veroorzaakt (Vos en Troelstra, 2001).

In Nederland worden patiënten met *Legionella* pneumonie sinds 1987 gemeld bij de Inspectie voor de Gezondheidszorg. Bij de aangifte van *Legionella* pneumonieën wordt vastgelegd of de infectie (vermoedelijk) in het buitenland of in Nederland is opgelopen. Op basis van de aangiften was de incidentie van *Legionella* pneumonie in Nederland in de periode 1987-1998 0,27 per 100.000 inwoners. In de periode 1999-2000 steeg de incidentie (zonder de gevallen van Bovenkarspel) naar 0,91 per 100.000 inwoners (Den Boer *et al.*, 2002b). Mannen blijken vaker ziek te worden dan vrouwen: de man-vrouw ratio is 2,6:1. In 2002 werd bovendien een duidelijke stijging van het aantal *Legionella* meldingen ten opzichte van 2001 waargenomen. Deze kon niet worden verklaard uit een verhoogde diagnostieaanvraag ten gevolge van verhoogde aandacht voor *Legionella*, noch door verbeterde diagnostiek of problemen met een van de diagnostische tests die voor vals positieve uitslagen gezorgd zou kunnen hebben. Het

aantal *Legionella*-meldingen zal derhalve nauwlettend in de gaten gehouden worden (Bosman *et al.*, 2002).

Onderzoeksvraag:

Welke Legionella soorten (pneumophila vs. non-pneumophila) veroorzaken ziekte bij de mens?

2.4 Protozoa en biofilms

Protozoa blijken essentieel te zijn voor de groei van *Legionella*; de bacterie overleeft als intracellulaire parasiet van vrij-levende protozoa. De protozoa die gevoelig zijn voor infectie met *L. pneumophila* komen veel voor in drinkwatervoorzieningen, met name in warmwater reservoirs (Swanson en Hammer, 2000). Er zijn tot nu toe 14 soorten amoeben, twee soorten protozoa en één slijmschimmel als gastheer voor *Legionella* gevonden. Uit leidingsystemen die geïnfecteerd zijn met *Legionella* zijn de meest frequent geïsoleerde protozoa soorten: *Acanthamoeba*, *Hartmannella* en *Naegleria* (Steinert *et al.*, 2002).

Protozoa voorzien *Legionella* van nutriënten en bieden een schuilplaats om ongunstige condities beter te kunnen overleven. De interactie tussen protozoa en *Legionella* zorgt er voor dat de bacterie in een verhoogde mate infectieus is. Het mechanisme hierachter is nog niet bekend, maar uit *in vitro* studies blijkt dat protozoa de intracellulaire groei van *Legionella* stimuleren en ondersteunen (Atlas, 1999; Fields *et al.*, 2002). Protozoa zijn de natuurlijke gastheren van *Legionella*, terwijl het infecteren van humane cellen opportunistisch is: bij geschikte omstandigheden infecteert de bacterie humane macrofagen.

Biofilms ontstaan wanneer micro-organismen gaan groeien op een oppervlak wat permanent in contact is met water. Het water en het leidingmateriaal leveren nutriënten voor groei van de micro-organismen. Protozoa die grazen op de biofilm kunnen dienst doen als gastheer voor *Legionella* (Van der Kooij *et al.*, 2003a). Modelstudies met biofilms hebben aangetoond dat *L. pneumophila* zich in biofilms zonder protozoa wel kan handhaven, maar niet kan vermenigvuldigen (Murga *et al.*, 2001; Fields *et al.*, 2002). Er dient hierbij wel opgemerkt te worden dat het gaat om kunstmatige systemen, waarvan de samenstelling nooit exact zo kan zijn als die van natuurlijke biofilms. De mogelijkheid dat overleving en vermenigvuldiging van *Legionella* in natuurlijke biofilms afwijken van de in deze studies verkregen resultaten blijft hierdoor open.

Onderzoeksvraag:

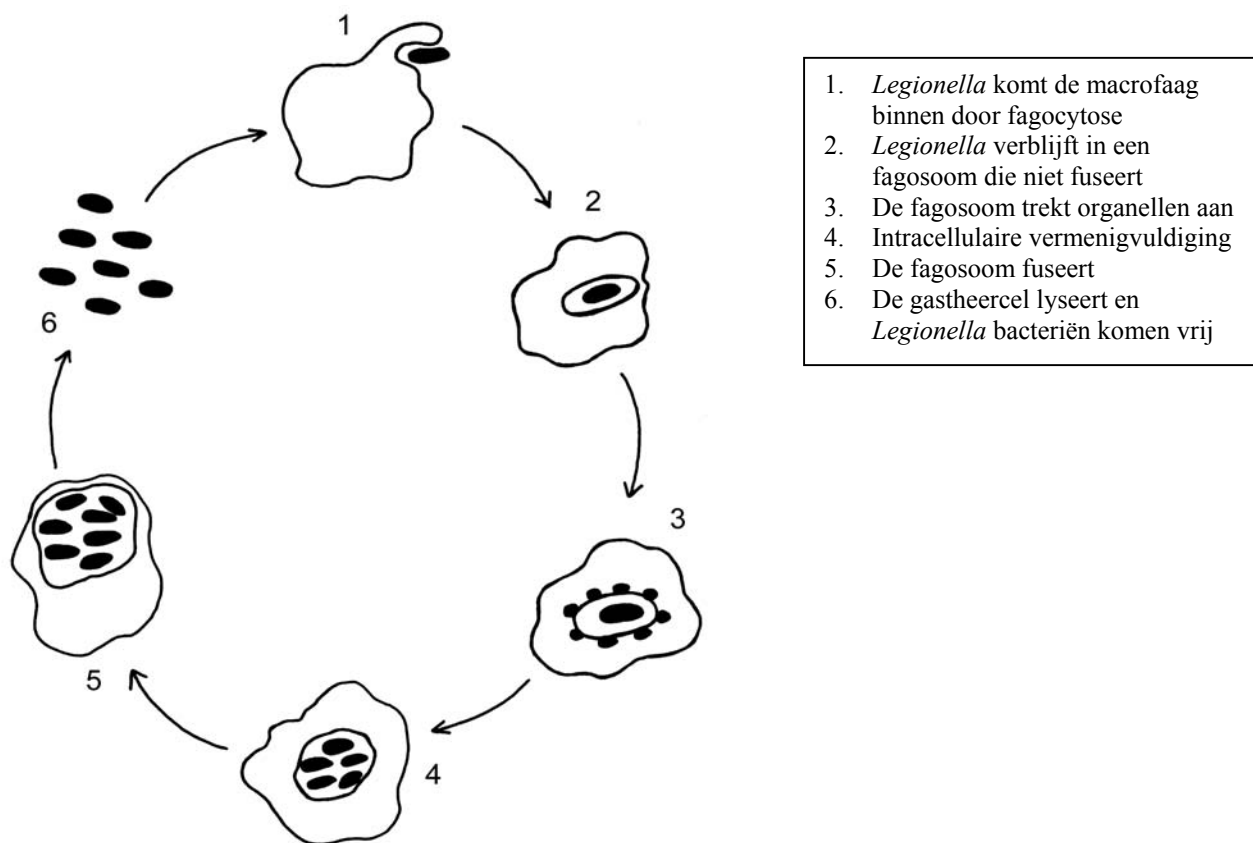
Wat is de invloed van bijvoorbeeld watersamenstelling, leidingmateriaal en het patroon van watergebruik op de vorming van biofilms en kolonisatie van leidingwatersystemen door Legionella?

2.5 Levenscyclus

De infectie van protozoa en die van humane macrofagen door *Legionella* bacteriën vertoont grote overeenkomsten. Veel van de factoren die overleving en replicatie van de *Legionella* bacteriën in protozoa bevorderen zijn ook nodig voor groei in macrofagen.

Legionella komt de macrofaag binnen door middel van fagocytose. Vervolgens verblijft de bacterie in een fagosoom. In tegenstelling tot wat normaliter gebeurt wanneer een organisme een macrofaag binnenkomt, fuseert de fagosoom niet met endosomen en lysosomen.

Bovendien wordt de verzuring van de vacuole gereduceerd doordat het gehele rijpingsmechanisme van de fagosoom door binnendringen van de bacteriën ontregeld raakt. De *Legionella* bevattende fagosoom trekt organellen zoals mitochondria, gladde blaasjes en ruw endoplasmatisch reticulum aan en wordt hiermee omringd. *Legionella* vermenigvuldigt zich in de fagosoom door middel van binaire deling en vormt een grote fagosoom die de gehele gastheercel vult. In de laatste fase van de vermenigvuldiging fuseert de *Legionella* fagosoom wel met lysosomen, maar zonder dat dit een negatief effect heeft op de *Legionella* bacteriën in de fagosoom. In de eerste fase van de infectie induceert *Legionella* apoptose (celdood) van de gastheercellen. In de post-exponentiële fase veroorzaakt *Legionella* necrose (verschrompelen) van de gastheercel door inductie van poriëvorming. Hierdoor wordt transmissie van *Legionella* bacteriën naar een nieuwe gastheer mogelijk gemaakt (Cianciotto, 2001; Fields *et al.*, 2002).



Figuur 2 De levenscyclus van *Legionella* in macrofagen

In de twee groeifasen die bij *Legionella* onderscheiden worden, hebben de bacteriecellen een verschillende morfologie en afwijkende eigenschappen. In de exponentiële groeifase hebben de bacteriën een verhoogde resistentie tegen natrium, zijn flagellen afwezig en zien de bacteriën er uit als lange filamenteuze staafjes. Deze hebben een lage cytotoxiciteit en zijn stress-gevoelig. Post-exponentiële bacteriën zijn korte, dikke staafjes. Ze zijn flagellair en zeer beweeglijk. Dit fenotype is resistenter tegen biociden en antibiotica en is bovendien invasiever en virulenter dan het exponentiële fenotype (Steinert *et al.*, 2002).

2.6 Pathogeniteit

De virulentie van *Legionella* wordt beïnvloed door vele pathogeniteitsfactoren die zelden los van elkaar, maar veelal in combinatie met elkaar of onder invloed van externe groeicondities, bepalen of een *Legionella* stam pathogeen is of niet. Groeicondities die onder experimentele omstandigheden invloed hebben op de infectiviteit voor macrofagen en proefdieren zijn onder andere de manier waarop het inoculum wordt gemaakt. Groei op Buffered Charcoal Yeast Extract agar resulteert in virulente bacteriën, terwijl groei op agar met een hoge concentratie zout selecteert voor avirulentie. Indien tijdens de kweek de hoeveelheid beschikbaar ijzer gelimiteerd is, neemt eveneens de virulentie af. Voorts zijn bacteriën uit de stationaire groeifase virulenter dan degene uit de exponentiële fase (Cianciotto, 2001; Steinert *et al.*, 2002). Een overzicht van een aantal van de (op dit moment bekende) belangrijkste factoren die een rol spelen bij de pathogeniteit van *Legionella*, alsmede de rol die deze factoren vermoedelijk spelen, wordt in tabel 1 gegeven.

Naast de in tabel 1 genoemde zogenaamde ‘surface factors’ en ‘secreted factors’, speelt ijzer een belangrijke rol bij de pathogeniteit van *Legionella*. De groei van *Legionella* binnen humane macrofagen is ijzer afhankelijk. De *Fur* regulator reguleert de ijzeropname, maar *Legionella* maakt bij de ijzeropname geen direct gebruik van de gastheercel. Wel worden uitgescheiden factoren en haem-bevattende bestanddelen van de gastheercel gebruikt. De genen *iraA*, *iraB* en *ccmC* en Fe^{3+} reductases dragen bij aan de omzetting van ijzer.

Enkele specifieke genen van *L. pneumophila* spelen ook een rol bij de pathogeniteit: *frgA* is betrokken bij de ijzeropname, terwijl *ligA* mogelijk bijdraagt aan de initiële opname van *L. pneumophila* door de gastheercel (Cianciotto, 2001; Steinert *et al.*, 2002).

Er zijn nog vele andere genen dan de hier genoemde die betrokken zijn bij de infectie van humane cellen door *Legionella*, maar hun exacte functie of de rol van hun genproduct is nog grotendeels onbekend en wordt onderzocht. Het is vooralsnog niet mogelijk om tegelijkertijd met het vaststellen van de aanwezigheid van *Legionella* vast te stellen of alle relevante pathogeniteitsfactoren aanwezig zijn.

Onderzoeksvraag:

Wat maakt Legionella soorten pathogeen voor de mens (virulentiefactoren) en hoe komt het dat verschillende stammen binnen dezelfde serogroep een verschillende virulentie hebben?

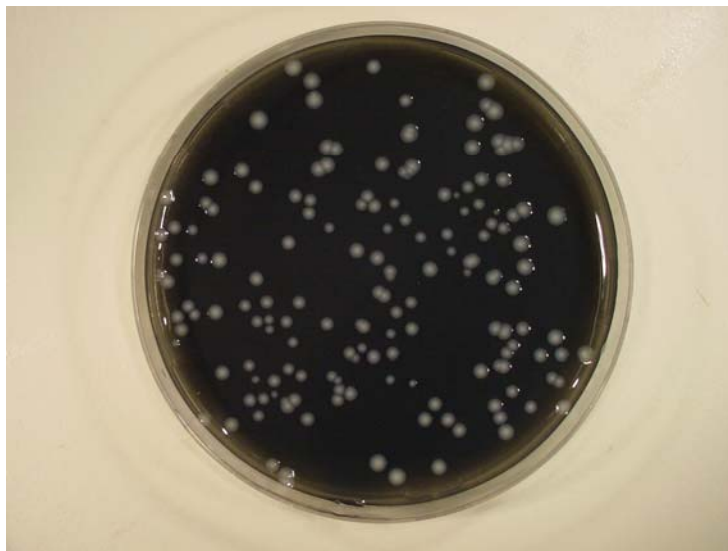
Tabel 1 Factoren die een rol spelen bij de pathogeniteit van *Legionella*

‘surface factors’	rol	referentie
lipopolysaccharide (LPS)	verlies van het <i>rcp</i> gen resulteert in verminderde weerstand tegen cationische peptiden en vermogen om gastheercellen te infecteren	Cianciotto, 2001
major outer membrane proteïne (MOMP)	bindingsplaats, regelt de opname van <i>Legionella</i> via de CR1 en CR3 receptoren van de macrofaag	Steinert <i>et al.</i> , 2002
flagellen	bevorderen de invasie van gastheercellen, maar zijn niet vereist voor intracellulaire replicatie	Dietrich <i>et al.</i> , 2001
type IV pili	bevorderen complement onafhankelijke hechting van bacteriën aan gastheercellen	Cianciotto, 2001
macrophage inhibitor proteïn (Mip)	<i>mip</i> gen is nodig voor de eerste stadia van intracellulaire infectie	Wieland <i>et al.</i> , 2002
outer membrane proteïn	25 kDa eiwit zorgt voor hechting aan macrofagen	Cianciotto, 2001
heat shock proteïn (hsp60)	60 kDa heat shock proteïn bevordert invasie van epitheel cellen	Cianciotto, 2001
<i>ptsP</i> ortholog	zorgt voor volledige expressie van de virulentie, waarschijnlijk door bevordering van intracellulaire groei	Higa en Edelstein, 2001
‘secreted factors’		
bruin pigment	gevormd door tussenkomst <i>Lly</i> eiwit dat mogelijk een rol speelt bij ecologische adaptatie	Steinert <i>et al.</i> , 2002
hitte stabiel peptide	vermeend toxine, nog niet gezuiverd en genetisch geïdentificeerd, betekenis onbekend	Cianciotto, 2001
type II eiwit secretie systeem	transporteert afbraak enzymen, afhankelijk van type IV prepilin peptidase; mutaties in <i>lsp</i> genen die coderen voor het type II secretie systeem verminderen de infectiviteit voor macrofagen en protozoa	Cianciotto, 2001
dot/icm secretie systeem	membraan gebonden type IV secretie apparaat, gecodeerd door <i>dot</i> en <i>icm</i> genen; belangrijk voor intracellulaire niche, remt fusie van fagosoom met endosomen of lysosomen, is betrokken bij inductie van gastheercel apoptose	Zink <i>et al.</i> , 2002

3. Detectie

3.1 Kweekmethoden

De kweek van *Legionella* op Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) medium wordt nog steeds gezien als de gouden standaard voor detectie van *Legionella* in zowel patiëntenmateriaal als water. Aan dit medium worden α -ketoglutaarzuur en antibiotica toegevoegd om andere aanwezige bacteriën, die sneller groeien dan *Legionella* en die de bepaling kunnen verstoren, te onderdrukken (Fields *et al.*, 2002). Door monsters water van tevoren te behandelen met zuur (pH 2,2) of hitte (30 min 50 °C) wordt een hoger percentage monsters positief voor *Legionella* gevonden.



*Figuur 3 Groei van Legionella op Buffered Charcoal Yeast Extract medium
Bron: Kiwa Water Research*

Door toepassing van membraanfiltratie is het ook mogelijk om relatief lage aantallen *Legionella* in monsters water te detecteren. Een methode voor detectie van *Legionella* in water, bestaand uit hitte behandeling van het monster en membraanfiltratie gevolgd door isolatie op BCYE agar, is uitgewerkt in de Nederlands norm NEN 6265 (Anonymous, 1991). Er bestaat eveneens een internationale norm, ISO/DIS 11731-2 (Anonymous, 2001a), waarin een vrijwel identieke methode beschreven is. Het belangrijkste verschil bestaat uit de anders samengestelde antibioticaoplossing die aan het BCYE medium wordt toegevoegd. De detectiegrens van de kweekmethoden voor *Legionella* in water ligt vooralsnog op 50 organismen per liter.

De opbrengst van de kweekmethoden is variabel en bovendien onvolledig omdat niet alle *Legionella* soorten even efficiënt op de media kunnen groeien. Er zijn tevens soorten die in het geheel niet op de media kunnen groeien. De opbrengst wordt door verschillende factoren

beïnvloed. Veranderingen die worden aangebracht om de selectiviteit te verbeteren, zoals een zuur- of hittebehandeling, of toevoeging van antibiotica, hebben vaak een negatief gevolg voor de opbrengst, en omgekeerd. Verschillen in de samenstelling van de voedingsbodem, de gebruikte membraanfilters en de wijze waarop hittebehandeling van het monster en pH-correctie van het medium worden uitgevoerd, spelen een belangrijke rol (Van der Kooij *et al.*, 2003b). Laboratoria die veel ervaring hebben met de detectie van *Legionella* vinden het organisme vaker dan minder ervaren laboratoria (Fields *et al.*, 2002). Uit resultaten van Nederlandse ringonderzoeken blijkt dat de opbrengsten verkregen door verschillende laboratoria bij analyse van hetzelfde monster water zeer variabel zijn (Van der Kooij *et al.*, 2003b).

Een bijkomend nadeel van kweekmethoden voor *Legionella* is dat de resultaten pas na zeven tot tien dagen verkregen worden.

Onderzoeksvraag:

Kunnen kweekmethoden zodanig worden geoptimaliseerd dat zowel de gevoeligheid als de specificiteit worden verbeterd?

3.2 Moleculaire methoden

3.2.1 FISH

Fluorescentie *in situ* hybridisatie (FISH) is gebaseerd op de aanname dat alleen intacte en levende cellen voldoende ribosomaal (r) RNA bevatten om zodanig door specifieke fluorescerende probes gekleurd te worden dat microscopische detectie van het fluorescentiesignaal mogelijk is. Door gebruik te maken van gerichte probes kan specifiek het rRNA van *L. pneumophila* worden aangekleurd. De methode kan onderscheid maken tussen dode en levende cellen en geeft snel resultaat. Door een geringe gevoeligheid is deze methode echter minder geschikt voor directe detectie van *Legionella* in leidingwater (Wullings *et al.*, 2002).

3.2.2 PCR

Voor de detectie van *Legionella* zijn verschillende methoden op basis van de polymerase ketting reactie (PCR) ontwikkeld (Atlas, 1999). Door gebruik te maken van specifieke probes kan ervoor gekozen worden alleen *L. pneumophila* of juist alle *Legionella* soorten aan te tonen. Voor detectie van *L. pneumophila* worden specifieke primers gericht tegen een sequentie in het 5S rRNA gen of het *mip* (macrophage infectivity potentiator) gen veel gebruikt. Probes gericht tegen het 16S rRNA gen detecteren alle *Legionella* soorten (Fields *et al.*, 2002). Mahbubani *et al.* (1990) hebben speciaal voor detectie van *Legionella* in water een PCR ontwikkeld. Een belangrijk voordeel van PCR methoden ten opzichte van kweekmethoden is dat een analyseresultaat veel sneller wordt verkregen. Bovendien kan bij

analyse van klinische monsters direct onderscheid gemaakt worden tussen soorten, dit in tegenstelling tot wat met serologische methoden mogelijk is.

3.2.3 Real-time PCR

Meer recent zijn real-time PCR methoden voor detectie van *Legionella* ontwikkeld. Deze detecteren dezelfde sequenties als de conventionele PCR methoden. Ze geven echter een veel sneller resultaat, vaak al binnen enkele uren, terwijl na de PCR reactie geen aanvullende analyse meer nodig is. Wellinghausen *et al.* (2001) ontwikkelden een real-time PCR methode voor detectie van *Legionella* in water. Met deze PCR methode werden veel hoger aantallen *Legionella* gevonden dan met kweekmethoden. PCR methoden detecteren echter naast kweekbare bacteriën ook niet-kweekbare bacteriën en DNA (fragmenten) van dode bacteriecellen. Er kan met PCR methoden geen onderscheid gemaakt worden tussen dode en levende cellen.

De real-time PCR methoden combineren een hoge specificiteit met een hoge gevoeligheid, met name voor detectie van *Legionella* in klinische monsters (Templeton *et al.*, 2003; Wilson *et al.*, 2003). Verschillende componenten uit water of biofilms kunnen een remmend effect op de PCR hebben. Real-time PCR methoden worden daarom voorzien van een interne inhibitie controle (Wellinghausen *et al.*, 2001) die de mogelijkheid biedt vast te stellen of een negatief resultaat wordt veroorzaakt door inhiberende factoren in het monster of door afwezigheid van *Legionella* DNA.

Onderzoeksvraag:

Hoe kan met behulp van PCR onderscheid worden gemaakt tussen levende en dode Legionella bacteriën en wat is de relevantie van de met PCR verkregen resultaten voor de volksgezondheid?

3.3 Overige methoden

3.3.1 DFA

Legionella bacteriën kunnen met behulp van aan fluoresceïne gekoppelde antisera gekleurd worden, waarna microscopische detectie mogelijk is. Deze directe fluorescentie methode (DFA) geeft binnen enkele uren resultaat, maar is, vooral indien gebruik gemaakt wordt van polyklonale sera, weinig specifiek. Monoklonale sera zijn specifiek. Er is een commercieel monoklonaal preparaat verkrijgbaar dat zeer specifiek genoemd wordt en gericht is tegen alle serogroepen van *L. pneumophila*. Er worden echter wel kruisreacties met sporen van *Bacillus cereus* uit water gerapporteerd (Fields *et al.*, 2002).

3.3.2 Klinische diagnostiek

De detectie van *Legionella* in patiëntenmateriaal met behulp van serologische methoden verliest steeds verder terrein. Met de ontdekking van nieuwe *Legionella* soorten is gebleken dat er regelmatig kruisreacties optreden waardoor de specificiteit van deze methoden beperkt wordt (Steinert *et al.*, 2002). Bovendien zijn er meerdere monsters van het patiëntenmateriaal nodig, die drie tot zes weken na elkaar genomen dienen te worden, en wordt bij 25 % van de patiënten helemaal geen verhoogde Ig G titer waargenomen. In de diagnostiek heeft daarom een verschuiving plaatsgevonden naar het gebruik van urineantigeen testen. Hiermee is een vroege diagnose mogelijk omdat antigenen al enkele dagen na het verschijnen van de eerste symptomen te detecteren zijn. De urineantigeen testen zijn specifiek voor *L. pneumophila* serogroep 1. Hoewel dit de meest voorkomende veroorzaker van legionellose is, kan toch tot 40 % van de ziektegevallen gemist worden, omdat zij veroorzaakt worden door andere serogroepen of soorten (Fields *et al.*, 2002).

3.3.3 Typering

Voor typering van geïsoleerde *Legionella* stammen worden gaschromatografie, gebaseerd op de unieke 3-hydroxy en 2-3-dihydroxy vetzuren in het *Legionella* lypopolysaccharide, en de moleculaire technieken Pulsed Field Gel Electroforese (PFGE) en Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) gebruikt (Steinert *et al.*, 2002; Fry *et al.*, 2002).

Tabel 2 Voor- en nadelen van verschillende in hoofdstuk 3 genoemde detectiemethoden voor *Legionella* in water

	Methode				
	kweek op BCYE	FISH	PCR	real-time PCR	DFA
onderscheid levend/dood	+	+	-	-	-
specificiteit	-	+	+	+	+/-
gevoeligheid	-	-	+	++	+/-
snelheid	-	+	+	++	+

++: zeer goed, + : goed, +/- : matig, - : slecht

4. Preventie

4.1 Reductie besmettingsrisico

Legionella is alom vertegenwoordigd in waterige milieus waardoor absolute eliminatie van de bron van legionellose niet mogelijk is. Preventieve maatregelen dienen er op gericht te zijn het besmettingsrisico voor met name kwetsbare groepen, zoals ouderen en personen met een verzwakt afweersysteem, zo klein mogelijk te maken. Hiertoe dient er gestreefd te worden naar zo volledig mogelijke eliminatie van de pathogeen uit leidingwaterinstallaties en het aanleggen van zodanige condities dat uitgroei tot concentraties die gevaar opleveren voor de volksgezondheid niet kan plaatsvinden. Goede richtlijnen voor gebruik van aërosol-vormende apparaten zoals koeltorens en whirlpools zijn eveneens van groot belang.



*Figuur 4 In dode leidingen met weinig doorstroming kan Legionella zich vermenigvuldigen
Bron: Wilco van der Lugt Installatietechniek v.o.f., Alkmaar*

4.2 Beheersmaatregelen

Maatregelen die uitgroei van *Legionella* in (leiding)watersystemen kunnen voorkomen bestaan uit het behandelen van het water door het te bestralen met UV-licht, te desinfecteren met ozon of chloor of door toepassing van koper-zilver ionisatie. Het doorspoelen van leidingen met water met een temperatuur van ruim boven 60 °C en het daarna instellen van de watertemperatuur aan de tappunten op tenminste 60 °C, wordt, ook in Nederland, als preventieve maatregel geadviseerd (Vos en Troelstra, 2001; Steinert *et al.*, 2002). Optimalisatie van het leidingnet door verwijdering van dode leidingen en het inkorten van aftakkingen verkleint het aantal plaatsen waar *Legionella* zich kan vermeerderen in stilstaand water. Door de vorming van biofilms te voorkomen of te beperken, wordt de effectiviteit van desinfectieprocessen vergroot. In biofilms dringen desinfecterende middelen en hitte minder

goed door, terwijl protozoa in biofilms, die *Legionella* bacteriën bescherming bieden, resistentie tegen biociden kunnen ontwikkelen (Steinert *et al.*, 2002). In zorginstellingen waar veel personen uit risicogroepen bij elkaar verblijven, moet de preventiestrategie gericht zijn op goed onderhoud van de leidingwatersystemen. Verhoging van de watertemperatuur in het leidingnet (gecombineerd met thermostatische mengkranen om verbranding te voorkomen) is een bewezen effectieve preventieve maatregel (Fields *et al.*, 2002).

Onderzoeksvraag:

Hoe kan biofilmvorming en daarmee kolonisatie door Legionella in leidingwatersystemen worden voorkomen?



*Figuur 5 De watertemperatuur aan het tappunt dient minimaal 60 °C te zijn
Bron: Wilco van der Lugt Installatietechniek v.o.f., Alkmaar*

4.3 Surveillance

Patiënten met een longontsteking die in zorginstellingen verblijven moeten routinematig met behulp van de juiste diagnostische testen onderzocht worden op de aanwezigheid van een infectie met *Legionella*. Indien gevallen van legionellose worden geconstateerd kan direct met epidemiologisch en omgevingsonderzoek worden gestart. Door lokalisatie en eliminatie van de besmettingsbron kan verdere transmissie worden voorkomen.

Gebaseerd op een risicoinventarisatie dient in zorginstellingen routinematig omgevingsonderzoek plaats te vinden. Er moet onder andere rekening gehouden worden met het type patiënten dat verzorgd wordt, de ouderdom en complexiteit van het leidingwatersysteem, een eerdere *Legionella* besmetting en het al dan niet gebruiken van biociden.

5. Wetgeving

5.1 Drinkwater

De verantwoordelijkheid met betrekking tot *Legionella* preventie is in Nederland vastgelegd in een aantal wetten. In de Waterleidingwet is vastgelegd dat de eigenaar van een collectieve leidingwaterinstallatie de plicht heeft om deugdelijk drinkwater ter beschikking te stellen. In het aan de Waterleidingwet gekoppelde Waterleidingbesluit (Anonymous, 2001b) is bovendien opgenomen dat het leidingwater geen micro-organismen mag bevatten in zodanig concentraties dat er nadelige effecten op de volksgezondheid kunnen optreden.

Naar aanleiding van de uitbraak van legionellose in Bovenkarspel in 1999, is op 15 oktober 2000 de 'Tijdelijke regeling legionellapreventie in leidingwater' (Anonymous, 2000a) ingesteld. Hierin is de verplichting voor eigenaren van collectieve leidingwaterinstallaties en zorginstellingen opgenomen om te inventariseren of er een risico op groei van *Legionella* in de waterinstallatie bestaat. Indien blijkt dat dit zo is en er beheersmaatregelen nodig zijn, dient een beheersplan opgesteld te worden. De uitvoering daarvan moet worden vastgelegd in een logboek.

De 'Tijdelijke regeling legionellapreventie in leidingwater' had een werkingsduur van twee jaar, die eindigde op 15 oktober 2002. Om ook hierna preventieve maatregelen ter bescherming van de volksgezondheid te kunnen voorschrijven is het 'Ontwerpbesluit tot wijziging van het Waterleidingbesluit in verband met de preventie van legionella in leidingwater' opgesteld (Anonymous, 2002). Dit ontwerpbesluit zet de Tijdelijke regeling om in een Algemene Maatregel van Bestuur. Bij het opstellen van dit ontwerpbesluit is gebruik gemaakt van de resultaten van een studie waarin de Tijdelijke regeling is geëvalueerd (Anonymous, 2003a). Tussen het vervallen van de Tijdelijke regeling en de inwerkingtreding van de Algemene Maatregel van Bestuur kan voor optreden tegen misstanden met betrekking tot *Legionella* in leidingwater worden teruggevallen op de Waterleidingwet en het Waterleidingbesluit.

5.2 Zwembaden

De veiligheid met betrekking tot *Legionella* in zwemgelegenheden (onder andere whirlpools, knuffelmuren, nevelgrotten, fonteinen) is geregeld in de Wet en het bijbehorend Besluit Hygiëne en Veiligheid Badinrichtingen en Zwemgelegenheden (Anonymous, 2000b). Douches in deze gelegenheden vallen echter onder de Waterleidingwet, wat er toe leidt dat eigenaren van bad- en zwemgelegenheden waarin zich douches bevinden ook een risicoanalyse, zoals beschreven in de Tijdelijke regeling, dienen uit te voeren.

5.3 Woningen

Eind 2003 is de LegionellaCode voor woninginstallaties gepubliceerd (Anonymous, 2003b). Deze geeft richtlijnen voor installateurs van waterinstallaties in woningen en bevat bovendien een zogenaamd ‘Model gebruiksinstructie’ voor bewoners. Zij kunnen daarmee vaststellen welke *Legionella* preventiemaatregelen zij zelf kunnen treffen.

5.4 Arbeidsomstandigheden

Per 1 januari 2004 is het ‘Besluit tot wijziging van de Beleidsregels arbeidsomstandighedenwetgeving’ in werking getreden (Anonymous, 2004). In deze beleidsregel wordt aangegeven hoe werknemers beschermd kunnen worden tegen de risico's van blootstelling aan *Legionella* bij gebruik van leidingwater als proceswater. Het gaat dan bijvoorbeeld om koeltorens en luchtbehandelingsinstallaties. Op apparatuur die bestemd is voor verkoop aan consumenten en waarin water wordt verwarmd of verneveld, zoals bijvoorbeeld bubbelbaden, hogedrukspuiten of fonteinen, is naast deze beleidsregel de Warenwet van toepassing.

5.5 Normstelling

De normstelling voor *Legionella* ligt op 100 kolonie vormende eenheden (kve) per liter, vastgesteld door gebruik te maken van de methode beschreven in NEN 6265 (Anonymous, 1991). Deze norm is niet gebaseerd op dosis-respons studies, maar op het voorzorgbeginsel. Dit betekent dat er bij overschrijden van deze norm niet per definitie sprake is van een volksgezondheidsrisico.

Het water wat door waterleidingbedrijven wordt afgegeven aan de hoofdkraan bevat zeer geringe hoeveelheden kweekbare *Legionella* bacteriën. Het aantreffen van 100 kve/L aan het tappunt geeft aan dat in de leidingen groei heeft opgetreden. Het is in een dergelijke situatie niet uit te sluiten dat verdere vermeerdering plaatsvindt en er op een later moment hoeveelheden *Legionella* in het water aanwezig zullen zijn die wel een gezondheidsrisico opleveren. Bij een dergelijke normoverschrijding moeten maatregelen getroffen worden om de groei te beheersen. Indien bij een meting meer dan 1000 kve/L worden aangetroffen, gaat men er van uit dat er wel een direct gezondheidsrisico is en moet(en) de betreffende leiding(en) worden afgesloten. Deze handelwijze is vastgelegd in de Handhavingsuitvoeringsmethode Leidingwater (Anonymous, 2001c).

Onderzoeksvraag:

Wat is de betekenis van wat er volgens de huidige wetgeving en met de huidige kweekmethoden aan verschillende Legionella soorten uit leidingwater aan het tappunt wordt gedetecteerd voor het optreden van ziekte?

6. Risicoanalyse

Indien het 'Ontwerpbesluit tot wijziging van het Waterleidingbesluit in verband met de preventie van legionella in leidingwater' van kracht wordt, zal in het Waterleidingbesluit opgenomen zijn dat eigenaren van collectieve watervoorzieningen een risicoanalyse dienen uit te voeren met betrekking tot het risico dat niet wordt voldaan aan de eis dat het leidingwater minder dan 100 kve *Legionella* bacteriën per liter bevat. Er wordt op deze manier echter niet vastgesteld of er een verhoogd gezondheidsrisico is voor mensen die aan aerosolen van dit leidingwater worden blootgesteld.

Onderzoeksvraag:

Is er een dosis-respons relatie voor pathogene Legionella te berekenen?

7. Discussie

De *Legionella* problematiek is zeer complex. *Legionella* is overal in natuurlijke en kunstmatige aquatische milieus aanwezig, maar wat dit betekent voor de volksgezondheid is niet altijd duidelijk. In deze discussie wordt aan de hand van de in de vorige paragrafen gestelde onderzoeksvragen, in gegaan op onderzoeklijnen die op dit moment, zowel nationaal als internationaal, gevolgd worden en waarvan de onderzoeksresultaten bij kunnen dragen aan het geheel of gedeeltelijk beantwoorden van deze vragen. Er wordt eveneens aangegeven of het RIVM al dan niet een bijdrage levert of zou kunnen leveren aan het beantwoorden van vragen op het gebied van gezondheidsrisico's van *Legionella* in water.

Onderzoeksvraag:

Wat maakt Legionella soorten pathogeen voor de mens (virulentiefactoren) en hoe komt het dat verschillende stammen binnen dezelfde serogroep een verschillende virulentie hebben?

De meeste humane infecties worden veroorzaakt door *L. pneumophila* serogroep 1, maar ook *L. pneumophila* stammen uit andere serogroepen (Benin *et al.*, 2002) en non-*pneumophila* stammen (Muder en Yu, 2002) blijken in staat ziekte bij de mens te veroorzaken. Niet alle stammen van één serogroep of soort doen dit onder alle omstandigheden. Groeicondities en vele virulentiefactoren blijken een rol te spelen bij de pathogeniteit van *Legionella*. De aanwezigheid of afwezigheid van bepaalde factoren blijkt echter niet altijd tot gevolg te hebben dat een stam wel of niet pathogeen is. Een zeer complexe wisselwerking tussen verschillende mechanismen en regulatiesystemen, die bovendien beïnvloed wordt door omgevingsfactoren (inclusief de afweer van de gastheer), lijkt de virulentie van *Legionella* soorten te bepalen (Cianciotto, 2001). Door verschillende internationale onderzoeksgroepen wordt diepgaand fundamenteel onderzoek uitgevoerd naar de pathogeniteit van *Legionella*.

Onderzoeksvraag:

Welke Legionella soorten (pneumophila vs. non-pneumophila) veroorzaken ziekte bij de mens?

In het kader van het European Working Group for Legionella Infection (EWGLI) project vindt surveillance van met name 'travel-associated' legionellose plaats. In dit project worden *Legionella* isolaten uit patiënten, die in het buitenland legionellose hebben opgelopen, vergeleken met isolaten uit mogelijke besmettingsbronnen. Tevens worden ringonderzoeken

georganiseerd die ontwikkeling en optimalisering van typeringsmethoden tot doel hebben (Fry *et al.*, 2002).

Onderzoeksvraag:

Wat is de betekenis van wat er volgens de huidige wetgeving en met de huidige kweekmethoden aan verschillende Legionella soorten uit leidingwater aan het tappunt wordt gedetecteerd voor het optreden van ziekte?

Epidemiologisch en brononderzoek kan leiden tot het lokaliseren van besmettingshaarden en maakt daarmee het inperken van explosies mogelijk omdat maatregelen ter preventie van verdere verspreiding van besmettingen genomen kunnen worden. Het screenen van patiëntenmateriaal maakt het mogelijk om een collectie van stammen aan te leggen die in staat zijn gebleken om bij de mens ziekte te veroorzaken. Door deze stammen met behulp van verschillende technieken te typeren en de typeringsuitslagen te vergelijken met die van stammen uit verschillende milieucompartimenten kan worden vastgesteld welke stammen die in het milieu aanwezig zijn de potentie hebben om ziekte bij de mens te veroorzaken. Indien deze gegevens worden opgeslagen in een breed toegankelijke database kan, wanneer een monster water positief voor *Legionella* wordt bevonden, het isolaat vergeleken worden met de database. Zo kan worden vastgesteld of er een potentieel risico voor de volksgezondheid bestaat en kunnen controlerende maatregelen worden genomen.

Het Laboratorium voor Infectieziektendiagnostiek en Screening (LIS) van het RIVM neemt deel aan het EWGLI project en draagt zorg voor de typering van zowel patiëntenisolaten als omgevingsisolaten (Wannet *et al.*, 2001). Door implementatie van een detectiemethode voor *Legionella* uit water zou het Microbiologisch Laboratorium voor Gezondheidsbescherming (MGB) in situaties waarin sprake is van een ziekteuitbraak zorg kunnen dragen voor de isolatie van *Legionella* uit verdachte watercompartimenten. Door het uitvoeren van een zogenaamde 'environmental surveillance' kan MGB een bijdrage leveren aan de opbouw van een database van in het milieu voorkomende *Legionella* soorten in situaties waar al dan niet sprake is van een explosie van ziektegevallen.

Onderzoeksvraag:

Hoe kan biofilmvorming en daarmee kolonisatie door Legionella in leidingwatersystemen worden voorkomen?

Legionella wordt overal in waterige milieus aangetroffen en zal vrijwel nooit volledig te elimineren zijn. Het is gebleken dat leidingsystemen waaruit *Legionella* door middel van desinfectie en/of thermische behandeling werd verwijderd, enige tijd na beëindiging van de behandeling opnieuw gekoloniseerd werden (Saby *et al.*, 2003). Het beleid dient er derhalve

op gericht te zijn het risico voor de volksgezondheid te beperken tot een acceptabel niveau. Daarbij moet er naar gestreefd worden in leidingwatersystemen zodanige condities te scheppen dat groei van *Legionella* beperkt blijft.

Onderzoeksvraag:

Wat is de invloed van bijvoorbeeld watersamenstelling, leidingmateriaal en het patroon van watergebruik op de vorming van biofilms en kolonisatie van leidingwatersystemen door Legionella?

Onderzoek naar het voorkómen van biofilmvorming is van belang, evenals ecologische studies die opheldering kunnen verschaffen over de condities in watersystemen die de groei van *Legionella* positief of negatief beïnvloeden. Zolang niet bekend is welke soorten een gezondheidsrisico vormen zal men zich hierin vooralsnog op alle *Legionella* soorten moeten richten. Kiwa Water Research neemt deel aan een Europees project waarin het effect van desinfectiemiddelen op *Legionella* in relatie tot biofilms wordt onderzocht. Tevens zal door Kiwa Water Research in een proefinstallatie onderzoek gedaan worden naar het effect van verschillende omgevingsfactoren op de overleving van *Legionella*.

Onderzoeksvraag:

Kunnen kweekmethoden zodanig worden geoptimaliseerd dat zowel de gevoeligheid als de specificiteit worden verbeterd?

In het kader van de nieuwe wetgeving op het gebied van *Legionella* preventie (Anonymous, 2002), die in 2004 in werking zal treden, zullen op vele locaties monsters water genomen moeten worden. Analyse van deze monsters dient volgens de Nederlandse wet uitgevoerd te worden met behulp van de kweekmethode voor *Legionella* in water, zoals die beschreven staat in NEN 6265 (Anonymous, 1991), of een gelijkwaardige methode. Er zijn echter veel problemen met deze methode. Vele factoren, zoals verschillen in de samenstelling van de voedingsbodem, de gebruikte membraanfilters en de wijze waarop hittebehandeling van het monster en pH-correctie (In 't Veld en de Wagt, 2001) van het medium worden uitgevoerd, beïnvloeden het resultaat van een analyse. De methode volgens NEN 6265 is minder selectief dan de methode volgens ISO/DIS 11731-2 (Anonymous, 2001a). Dit resulteert in een hogere opbrengst, maar eveneens in maskeren van *Legionella* bacteriën door andere micro-organismen wanneer water met veel achtergrondflora (bijvoorbeeld uit koeltorens) wordt onderzocht. De methode volgens NEN 6265 detecteert alle *Legionella* soorten, terwijl de methode volgens ISO/DIS 11731-2 voornamelijk *L. pneumophila* detecteert. Zowel het niet kunnen genereren van een analyseresultaat bij gebruik van een minder selectieve methode (NEN 6265), als het niet detecteren van *Legionella* soorten die mogelijk

van belang zijn voor de volksgezondheid bij gebruik van een selectievere methode (ISO/DIS 11731-2), is ongewenst. Het is daarom van groot belang dat er onderzoek plaatsvindt naar mogelijkheden om de kweekmethode voor *Legionella* in water te optimaliseren. Middels zitting in de Kontaktgroep Kwaliteitsborging Bacteriologisch Onderzoek (KKBO) is MGB betrokken bij de discussie die hieromtrent plaatsvindt. In de KKBO hebben naast RIVM en Kiwa Water Research vertegenwoordigers van de meeste Nederlandse waterleidinglaboratoria zitting.

Onderzoeksvraag:

Hoe kan met behulp van PCR onderscheid worden gemaakt tussen levende en dode Legionella bacteriën en wat is de relevantie van de met PCR verkregen resultaten voor de volksgezondheid?

Naast kweekmethoden zijn ook PCR methoden voorhanden om *Legionella* in water aan te tonen. Met deze methoden wordt in vrijwel elk monster water een positief resultaat gevonden. Het is van belang PCR methoden zodanig te optimaliseren dat onderscheid tussen levende en dode bacteriën gemaakt kan worden en dat eveneens kwantitatieve gegevens verkregen worden. Tevens dient onderzocht te worden wat de betekenis van de resultaten verkregen met PCR methoden voor de volksgezondheid is.

Onderzoeksvraag:

Is er een dosis-respons relatie voor pathogene Legionella te berekenen?

De risicoanalyse zoals die voor *Legionella* dient te worden uitgevoerd door de eigenaren van collectieve waterinstallaties is gericht op de kwaliteit van het leidingwater, maar berekent niet of personen die blootgesteld worden aan aërosolen van dit leidingwater een verhoogde kans lopen om ziek te worden. Om nauwkeurig te kunnen berekenen of het ziekterisico onder de grenswaarde van één infectie per 10.000 personen per jaar ligt, ontbreken nog veel gegevens, waaronder een dosis-respons relatie. Het is echter mogelijk om door middel van een onzekerheidsanalyse vast te stellen hoe goed het risico op basis van de huidige kennis kan worden berekend. Tevens kan met behulp van een gevoeligheidsanalyse worden berekend hoe groot de invloed van verschillende componenten van de berekening is op de uitkomst, het berekende ziekterisico.

8. Conclusies

De Gezondheidsraad (2003) geeft aan dat wanneer een grenswaarde van één infectie per 10.000 personen per jaar als acceptabel risico wordt gehanteerd, de huidige incidentie van legionellose in Nederland te hoog is en dat preventieve maatregelen ter voorkoming van humane infecties met *Legionella* nodig zijn. De Nederlandse wetgeving biedt tal van mogelijkheden eigenaren van diverse waterinstallaties die een risico kunnen vormen te verplichten preventieve maatregelen te treffen. Deze wetgeving is gebaseerd op de huidige kennis omtrent *Legionella*, die echter verre van volledig is. Op basis van de (vernieuwde) wetgeving zal water uit vele waterinstallaties met behulp van een kweekmethode onderzocht worden op de aanwezigheid van *Legionella*. Wat het aantreffen van *Legionella* in deze waterinstallaties betekent voor de volksgezondheid is op dit moment nog niet geheel duidelijk. Aanvullend onderzoek ter onderbouwing van huidige en toekomstige wetgeving is daarom onontbeerlijk.

Literatuur

Anonymous

Bacteriologisch onderzoek van water – Onderzoek naar de aanwezigheid en het aantal kolonievormende eenheden (KVE) van *Legionella*-bacteriën (NEN 6265)
Nederlands Normalisatie Instituut, Delft 1991

Tijdelijke regeling legionellapreventie in leidingwater

Staatscourant 2000a; 199

Anonymous

Besluit Hygiëne en Veiligheid Badinrichtingen en Zwemgelegenheden
Staatsblad van het Koninkrijk der Nederlanden 2000b; 482

Anonymous

Water quality – Detection and enumeration of *Legionella* – Part 2: Direct membrane filtration method for waters with low bacterial counts (ISO/DIS 11731-2)
International Organization for Standardization, Geneva 2001a

Anonymous

Besluit tot wijziging van het Waterleidingbesluit in verband met de richtlijn betreffende de kwaliteit van voor menselijk consumptie bestemd water
Staatsblad van het Koninkrijk der Nederlanden 2001b; 31

Anonymous

Handhavingssuitvoeringsmethode (HUM) Leidingwater (17270/186)
Ministerie van Volkshuisvesting, Ruimtelijke Ordening en Milieubeheer, Inspectie Milieuhygiëne, Den Haag 2001b

Anonymous

Ontwerpbesluit tot wijziging van het Waterleidingbesluit in verband met de preventie van legionella in leidingwater
Staatscourant 2002; 154

Anonymous

Evaluatie regeling legionellapreventie en Waterleidingbesluit
Tweede Kamer, vergaderjaar 2002-2003, 26 442 en 28 499, 2003a; 17

Anonymous

ISSO/Uneto-VNI-Richtlijn-30.5 LegionellaCode Woninginstallaties
www.isso.nl 2003b

Anonymous

Besluit tot wijziging van de Beleidsregels arbeidsomstandighedenwetgeving
Staatscourant 2004; nog te publiceren

Atlas RM

Legionella: from environmental habitats to disease pathology, detection and control
Environm Microbiol 1999; 1 (4): 283-293

Benin AL, Benson RF, Arnold KE, Fiore AE, Cook PG, Williams LK, Fields B, Besser RE

An outbreak of travel-associated Legionnaires disease and Pontiac fever: the need for
enhanced surveillance of travel-associated legionellosis in the United States
J Intect Dis 2002; 185: 237-243

Boer JW den, Yzerman EPF, Schellekens J, Lettinga KD, Boshuizen HC, van Steenberg JE, Bosman A, van den Hof S, van Vliet HA, Peeters MF, van Ketel RJ, Speelman P, Kool JL, Conyn-van Spaendonck MAE

A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999
Emerg Infect Dis 2002a; 8 (1): 37-43

Boer JW den

Preventie van *Legionella*-pneumonie, een gerichte aanpak
Infect Bull 2001b; 12 (12): 449-451

Boer JW den, Friesema IHM, Hooi JD

Gemelde *Legionella*-pneumonie in Nederland, 1987-2000
Ned Tijdschr Geneesk 2002b; 146 (7): 315-320

Bosman A, Nijhof M, Brandsema P

Steeds meer legionellose-meldingen
Infect Bull 2002; 13 (8): 305-308

Cianciotto NP

Pathogenicity of *Legionella pneumophila*
Int J Med Microbiol 2001; 291: 331-343

Dietrich C, Heuner K, Brand BC, Hacker J, Steinert M

Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of
eukaryotic host cells
Infect Immu 2001; 69 (4): 2116-2122

Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS, the field investigation team
Legionnaires' disease
N Engl J Med 1977; 297 (22): 1189-1197

Fields BS, Benson RF, Besser RE
Legionella and Legionnaires' disease: 25 year of investigation
Clin Microbiol Rev 2002; 15 (3): 506-526

Fry NK, Bangsberg JM, Bergmans A, Bernander S, Etienne J, Franzin L, Gaia V, Hasenberger P, Baladrón Jiménez B, Jonas D, Lindsay D, Mentula S, Papoutsis A, Struelens M, Uldum SA, Visca P, Wannet W, Harrison TG
Designation of the European Working Group on *Legionella* infection (EWGLI) Amplified Fragment Length Polymorphism Types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 and results of intercentre proficiency testing using a standard protocol
Eur J Clin Microbiol 2002; 21: 722-728

Gezondheidsraad
Bestrijding van legionella (nr. 2003/12)
Gezondheidsraad, Den Haag, 2003

Higa F, Edelstein PH
Potential virulence role of the *Legionella pneumophila ptsP* ortholog
Infect Immun 2001; 69 (8): 4782-4789

In 't Veld S, de Wagt J
Snelle herziening van NEN 6265 Legionella-onderzoek aanbevolen
H₂O 2002; 9: 15-16

Kooij D van der, Veenendaal H, Scheffer W
Biofilmvorming en groei van *Legionella* op leidingmaterialen in een experimentele warmtapwaterinstallatie
H₂O 2003a; 11: 19-21

Kooij D van der, Veenendaal H, Wullings B
Kwantitatieve bepaling van *Legionella* in water: na 21 jaar nog in kinderschoenen!
H₂O 2003b; 4: 21-23

Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J, Atlas RM
Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods
Molec Cell Probes 1990; 4: 175-187

Muder RR, Yu VL

Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*
Clin Infect Dis 2002; 35: 990-998

Murga R, Forster TS, Brown E, Pruckler JM, Fields BS, Donlan RM

Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a modal potable-water system
Microbiol 2001; 147: 3121-3126

Saby S, Vidal A, Kittel J, Giloupe S, Lotierzo M

Control of *Legionella* in biofilms: evidence for disinfection inefficiencies in al pilot hot water distribution system
Presentation at the International Symposium on Health-Related Water Microbiology, Cape Town 14-19 september 2003

Steinert M, Hentschel U, Hacker J

Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray
FEMS Microbiol Rev 2002; 26: 149-162

Swanson MS, Hammer BK

Legionella pneumophila pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages
Annu Rev Microbiol 2000; 54: 567-613

Templeton KE, Scheltinga SA, Sillekens P, Crielaard JW, van Dam A, Goossens H, Claas ECJ

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 2003; 41 (9): 4016-4021

Vos MC, Troelstra A

Legionella, diagnose en preventie
Infect Bull 2001; 12 (12): 431-436

Wannet WJB, van der Zwaluw WK, Maas HME, Heck MEOC, Brunings H, Elzenaar CE, Schellekens JFP

Diagnostiek en surveillance van *Legionella* door het RIVM
Infect Bull 2001; 12 (12): 447-448

Wellinghausen N, Frost C, Marre R

Detection of Legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR
Appl Environm Microbiol 2001; 67 (9): 3985-3993

Wilson DA, Yen-Lieberman B, Reischl U, Gordon SM, Procop GW

Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the *mip* gene

J Clin Microb 2003; 41 (7): 3327-3330

Wieland H, Faigle M, Lang F, Northoff H, Neumeister B

Regulation of the *Legionella mip*-promotor during infection of human monocytes

FEMS Microbiol Lett 2002; 212; 127-132

Wullings B, Voogt R, Veenendaal H, van der Kooij D

The fluorescent in situ hybridization test in comparison with culture for detection of *Legionella pneumophila* in water samples

In: Legionella, ed. Marre R et al.

ASM Press, Washington DC 2002; 51: 263-266

Zink SD, Pedersen L, Cianciotto NP, Kwaik YA

The dot/icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages

Infect Immu 2002; 70 (7): 1657-1663

Bijlage 1 Verzendlijst

1. DGM, Directeur Drinkwater, Water, Landbouw, Drs. H.G. von Meijenfeldt
2. Inspecteur Generaal VROM-Inspectie, Mr. G.J.R. Wolters
3. Directeur-Generaal Milieubeheer, Ir. J. van der Vlist
4. Ir. W. Cramer, VROM/DGM, Directie BWL
5. Dr. B.J.A.M. Haring, VROM/DGM, Directie BWL
6. C.J.M. van den Bogaard, VROM-Inspectie Directie Beleidszaken
7. Drs. L. Groen, VROM-Inspectie Regio Noord
8. M. Kouwe, VROM-Inspectie Regio Oost
9. Ir. F. Wetsteyn, VROM-Inspectie Regio Noord-West
10. Drs. R.A.G. te Welscher, VROM-Inspectie Regio Zuid-West
11. Ir. F.A.M. Swinkels, VROM-Inspectie Regio Zuid
12. W. Reinhold, VROM
13. Dr. J. van Wijngaarden, Inspectie Gezondheidszorg, VWS
14. Voorzitter van de Gezondheidsraad, Prof. Dr. J.A. Knottnerus
15. Prof. Dr. ir. D. van der Kooij, Kiwa Water Research, Nieuwegein
16. Ir. B. Wullings, Kiwa Water Research, Nieuwegein
17. Dr. G.J. Medema, Kiwa Water Research, Nieuwegein
18. H. Veenendaal, Kiwa Water Research, Nieuwegein
- 19-24. Leden KKBO
25. W. Posthouwer, Landelijk Platform Wateradviesbedrijven, Rossum
26. Depot Nederlandse Publikaties en Nederlandse Bibliografie
27. Directie RIVM
28. Prof. Dr. Ir. D. Kromhout, Directeur Sector VCV
29. Dr. ir. A. Mensink, Hoofd MGB
30. Dr. ir. A.H. Havelaar, Plaatsvervangend Hoofd MGB
31. Dr. A.M. de Roda Husman, Projectleider Watermicrobiologie
32. Ir. J.F.M Versteegh, IMD
33. Dr. ing. W.J.B. Wannet, LIS
34. Dr. J.F.P. Schellekens, LIS
- 35-36. Auteurs
37. SBC/Communicatie
38. Bureau Rapportenregistratie
39. Bibliotheek RIVM
- 40-44. Bureau Rapportenbeheer
- 45-55. Reserve exemplaren