



Briefrapport 703719035/2009

W.J. Lodder | M. Mooij | J.A.C. Schalk | N.G.F.M. van der Aa

Verkennend onderzoek naar Legionella in Nederlands regenwater

Detectie met behulp van moleculaire technieken

Briefrapport 703719035/2008

Verkennd onderzoek naar *Legionella* in Nederlands regenwater

Detectie met behulp van moleculaire technieken

W.J. Lodder
M. Mooij
J.A.C. Schalk
N.G.F.M. van der Aa

Contact:
N.G.F.M. van der Aa
Centrum Inspectie-, Milieu en Gezondheidsadviesing, IMG
monique.vandeaarivm.nl

IMG-vraagnummer: 3261

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van de VROM-Inspectie, in het kader van project M/703719/08/LH

Voorwoord

Dit onderzoek is tot stand gekomen met medewerking van het Laboratorium voor Milieumetingen (RIVM) de provincie Limburg en de Milieudienst Rijnmond DCMR. Zij hebben hun regenwatermonsters hiervoor beschikbaar gesteld. Speciale dank gaat uit naar de personen die de regenwatermonsters geleverd hebben: Bert Veldstra van de provincie Limburg, Paul Kummu van DCMR en Hans Verboom en Rens van Veen (RIVM).

Het concept rapport is becommentarieerd door Ana Maria de Roda Husman, Saskia Rutjes en Ans Versteegh.

© RIVM 2009

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

Rapport in het kort

Verkendend onderzoek naar *Legionella* in Nederlands regenwater

Dit rapport beschrijft de resultaten van een verkennende studie naar de aanwezigheid van *Legionella* in regenwater tijdens de zomerperiode van 2008. Regenwatermonsters van het Landelijk Meetnet Regenwater van het RIVM, alsmede stedelijke regenwatermeetnetten van de milieudienst Rijnmond en de provincie Limburg zijn geanalyseerd met behulp van moleculaire technieken.

In het verzamelde regenwater is geen *L. pneumophila*, *L. anisa* of *L. longbeachae* DNA aangetroffen. Over de detectiegrens kan op basis van de onderzoeksresultaten geen uitspraak worden gedaan. Hiervoor is meer specifiek kwantitatief onderzoek nodig.

Trefwoorden: landelijk meetnet regenwater (LMR), *Legionella*, PCR

Abstract

Screening of Dutch precipitation on *Legionella*

In this pilot study, precipitation was collected during the 2008 summer period and was screened for the presence of *Legionella*. Samples of the Netherlands National Precipitation Chemistry Network (LMR) which is operated by RIVM, as well as urban precipitation chemistry networks of DCMR Environmental Protection Agency and the province of Limburg, were analyzed with molecular techniques.

In the collected precipitation *L. pneumophila*, *L. anisa* or *L. longbeachae* DNA was not detected. However, the significance of the results requires further investigation.

Keywords: Netherlands National Precipitation Chemistry Network (LMR), *Legionella*, PCR

Inhoud

Samenvatting	8
1 Inleiding	9
1.1 Doelstelling	10
2 Methode	11
2.1 Regenwatermeetnetten	11
2.2 Meetapparatuur en bemonstering	12
2.3 Klimatologische omstandigheden en meetperiode	13
2.4 Methode opwerken regenwatermonsters	14
2.4.1 Filtratie	14
2.4.2 DNA extractie	14
2.4.3 Aantonen van Legionella DNA met PCR	15
2.4.4 Sequentie analyse en fylogenie	15
3 Resultaten	17
4 Discussie	19
4.1 Aanbevelingen	19
Referenties	21
Bijlage 1 Locaties regenwatermeetnetten	23
Bijlage 2 Klimatologische omstandigheden	24
Bijlage 3 Resultaten	25

Samenvatting

In de hier beschreven studie is de aanwezigheid van *Legionella pneumophila* en *Legionella non-pneumophila* in regenwater onderzocht tijdens de zomerperiode van 2008. De aanleiding voor dit onderzoek is het feit dat de besmettingsbron van *Legionella* bijna nooit met zekerheid kan worden vastgesteld. Tevens zijn er verschillende studies die erop wijzen dat regenval en temperatuur geassocieerd zijn met een toename van patiënten met legionellose. Het is onduidelijk of *Legionella* in regenwater terecht zou kunnen komen, maar contact van regenwater met aerosolen in de lucht die *Legionella* bevatten zou mogelijk kunnen zijn.

Voor de monsternamen is aangesloten bij de bestaande landelijke en stedelijke regenwatermeetnetten in Nederland: het Landelijk Meetnet Regenwater (LMR) van het RIVM, alsmede stedelijke regenwatermeetnetten van de milieudienst Rijnmond (DCMR) en de provincie Limburg. De verwachting is dat de kans op de aanwezigheid van *Legionella* in regenwater uit stedelijke gebieden groter is dan in regenwater uit landelijke gebieden, aangezien in stedelijke gebieden waarschijnlijk meer bronnen van *Legionella* aanwezig zijn.

Regenwatermonsters uit de periode week 14 (31 maart 2008) tot en met week 33 (17 augustus 2008) zijn geanalyseerd met behulp van twee PCR-methoden, de 16S real-time PCR en de *Mip* real-time PCR. Uit het onderzoek blijkt dat het verzamelde regenwater bacteriën bevat, maar er is geen *L. pneumophila*, *L. anisa* of *L. longbeachae* DNA aangetroffen.

Met de 16S real-time PCR methode, die ook gebruikt wordt voor detectie in drinkwater, gaven alle onderzochte regenwatermonsters een positief signaal. Uit nadere sequentie analyses bleek het echter niet om *Legionella* te gaan, maar om andere bacteriën zoals *Pseudomonas*. Deze methode is voor regenwatermonsters niet specifiek genoeg gebleken om een onderscheid te maken tussen *Legionella* DNA en DNA afkomstig van andere bacteriën.

Met behulp van de *Mip* real-time PCR kon in geen van de onderzochte regenwatermonsters *L. pneumophila*, *L. anisa* of *L. longbeachae* worden aangetoond. In twee regenwater monsters van de provincie Limburg werden wel DNA sequenties gevonden die overeenkomst vertoonden met *Legionella* sequenties, maar die niet getypeerd konden worden als bekende *Legionella* stammen. Mogelijk betreft het nog niet eerder getypeerde *Legionella* stammen.

Omdat niets bekend is over de efficiëntie van de gebruikte DNA-extractie en gevoeligheid van de *mip*-PCR methoden voor toepassing op regenwater, kan geen uitspraak worden gedaan over de detectiegrens. Hiervoor is meer specifiek kwantitatief onderzoek nodig. Ook dient het effect van de bewaarperiode van het verzamelde regenwater op de analyseresultaten te worden onderzocht.

1 Inleiding

In de hier beschreven studie is de aanwezigheid van *Legionella pneumophila* en *Legionella non-pneumophila* in regenwater onderzocht. Aanleiding voor dit onderzoek is het feit dat slechts bij 3% van de legionellose patiënten in de periode 2000-2006 de besmettingsbron van *Legionella* met zekerheid kon worden vastgesteld (Versteegh et al. 2007, website BEL-project). In het BEL-project (Bemonsterings Eenheid Legionella-pneumonie) worden bij het optreden van legionellose potentiële bronnen van *Legionella* geregistreerd die bij bronopsporing werden achterhaald.

Er zijn studies die erop wijzen dat regenval en temperatuur geassocieerd zijn met een toename van het aantal patiënten met legionellose (Fisman et al., 2005; Hicks et al., 2007; Karagiannis et al. 2008). De auteurs kunnen echter niet verklaren hoe de regenval de toename veroorzaakt. Er is weinig bekend over de aanwezigheid van *Legionella* in regenwater. Verschillende studies hebben aangetoond dat regenwater verzameld via het dak gecontamineerd kan zijn met bacteriën, waaronder ook *Legionella* (Ahmed et al., 2008; Simmons et al., 2008; Albrechtsen 2002; Schets et al., 2005, 2007). Er wordt aangenomen dat deze bacteriële contaminaties afkomstig zijn van vervuilingen van het dak door insecten, vogels of kleine dieren. Echter, Evans et al. (2006) tonen aan dat er ook een verband is tussen microbiële contaminatie van het verzamelde regenwater en weersomstandigheden. Dit wijst er indirect op dat micro-organismen in de lucht beter overleven en dat afspoeling bijdraagt aan de contaminatie van het regenwater verzameld via het dak.

Bacteriën kunnen in de lucht vervoerd worden via bodemdeeltjes, fragmenten van planten of dieren, pollen of sporen of als agglomeraties van cellen (Jones and Harrison, 2004). Verschillende studies hebben transmissie van bacteriën via de lucht aangetoond. Turnbull et al. (1998) rapporteerden concentraties van *Bacillus anthracis* in de lucht op locaties beneden-winds van plaatsen met karkassen van zieke dieren. Bacteriën in de lucht werden ook gemeten in de buurt van een locatie waar semi-solid sewage werd uitgespreid (Pillai et al., 1996), in de buurt van een sewage-sludge disposal site (Dowd et al., 2000) en in de buurt van een composteringscentrum (Folmsbee and Strevett, 1999). Metingen in landelijk en stedelijk gebied tonen aan dat in stedelijke gebieden de concentraties aan bacteriën in de lucht hoger zijn dan in landelijke gebieden met maxima in de maanden mei en juni (di Giorgio et al., 1995). Meteorologische omstandigheden hebben invloed op de concentratie bacteriën in de lucht (gereviewed door Jones and Harrison, 2004). De hoeveelheid bacteriën in de lucht neemt toe bij hogere temperatuur en windsnelheid (di Giorgio et al., 1995). Een recent voorbeeld van verspreiding van bacteriën via de lucht is de Q-koorts epidemie in Nederland in 2007 en 2008 als gevolg van de verspreiding van *Coxiella burnetii* via aerosolen (Schimmer et al., 2008). Ook *Legionella* kan zich mogelijk via de lucht verspreiden via aerosolen (Baskerville et al., 1981). Het is onduidelijk of *Legionella* in regenwater terecht zou kunnen komen, maar een mogelijke route zou kunnen zijn via contact van regenwater met aerosolen in de lucht, afkomstig van bijvoorbeeld koeltorens.

1.1 Doelstelling

In deze studie werd onderzocht of regenwater een potentiële bron van *Legionella* kan zijn. Het doel is het bepalen van de aanwezigheid van *Legionella pneumophila* en *Legionella non-pneumophila* in regenwater tijdens de zomerperiode. Hierbij wordt de volgende vraagstelling onderzocht:

Is *Legionella* (*pneumophila* en *non-pneumophila*) in de zomermaanden aanwezig in regenwater?

De verwachting is dat in regenwater uit stedelijke gebieden de kans op de aanwezigheid van *Legionella* groter is dan in regenwater uit landelijke gebieden. In stedelijke gebieden komen mogelijk meer risicobronnen voor dan in landelijke gebieden (Versteegh et al., 2007).

2 Methode

Vanwege toegang tot bestaande landelijke en stedelijke regenwatermeetnet-locaties, is bij het bemonsteren van *Legionella* in regenwater uit praktisch oogpunt hierbij aangesloten. Met behulp van deze meetnetten wordt regenwater routinematig bemonsterd en geanalyseerd op de chemische samenstelling van het water. Het Landelijk Meetnet Regenwater (LMR) van het RIVM levert regenwatermonsters uit landelijke gebieden. De milieudienst Rijnmond (DCMR) en de provincie Limburg leveren regenwatermonsters uit stedelijke gebieden.

2.1 Regenwatermeetnetten

De meeste regenwatermonsters zijn afkomstig van het Landelijk Meetnet Regenwater (LMR) van het RIVM. Het LMR heeft op elf locaties in landelijke gebieden meetpunten staan. Het regenwater wordt bij deze meetnetten routinematig geanalyseerd op hoofdcomponenten en zware metalen. Onder de hoofdcomponenten vallen vrij zuur, natrium, kalium, calcium, magnesium, fluoride, chloride, nitraat, ammonium, sulfaat, en fosfaat. Onder de zware metalen vallen arseen, cadmium, kobalt, koper, ijzer, nikkel, lood, chroom, vanadium en zink. Alle elf locaties zijn in dit onderzoek meegenomen voor het bepalen van de aanwezigheid van *Legionella* in regenwater.

De overige meer stedelijke regenwatermonsters zijn afkomstig uit twee verschillende regio's, namelijk het Rijnmondgebied en Limburg. Milieudienst Rijnmond (DCMR) heeft in totaal zes meetlocaties. Daarvan zijn er drie gebruikt voor deze studie, waarvan er twee in een stedelijke omgeving liggen. De provincie Limburg heeft vijf meetlocaties. Voor dit onderzoek zijn er vier onderzocht, waarvan er twee in of nabij een stedelijk gebied liggen. Tabel 2.1 geeft een overzicht van alle locaties, zowel stedelijk als landelijk, van de meetnetlocaties waarvan het regenwater in deze studie onderzocht wordt op de aanwezigheid van *Legionella*. In Bijlage 1 zijn deze meetnetten op een kaart weergegeven.

Tabel 2.1: Landelijke en stedelijke regenwatermeetnetlocaties waarvan regenwater is onderzocht op aanwezigheid Legionella.

Locatie meetstation	Stations nummer	Type locatie: stedelijk of landelijk	Meetnetbeheerder
Vredepeel	131	Landelijke locatie	LMR
Beek- vliegveld	134	Landelijke locatie	LMR
Gilze-Rijen	231	Landelijke locatie	LMR
Philipinne	318	Landelijke locatie	LMR
Rotterdam-vliegveldweg	434	Landelijke locatie	LMR
De Zilk	444	Landelijke locatie	LMR
Wieringerwerf	538	Landelijke locatie	LMR
De Bilt	628	Landelijke locatie	LMR
Speuls-Garderenseweg	732	Landelijke locatie	LMR
Valthermond	929	Landelijke locatie	LMR
Kollumerwaard	934	Landelijke locatie	LMR
Maastricht	n.v.t.	Stedelijke locatie	provincie Limburg
Herkenbosch	n.v.t.	Landelijke locatie, rand van dorp nabij rioolwaterzuivering	provincie Limburg
Helden	n.v.t.	Stedelijke locatie	provincie Limburg
Ysselsteyn	n.v.t.	Landelijke locatie, bij klein dorp	provincie Limburg
Bergambacht	8861	Landelijke locatie	DCMR
Nieuwkoop	8431	Stedelijke locatie, nabij oppervlaktewater en bebouwing	DCMR
Voorschoten	8252	Stedelijke locatie, rand van bebouwing en nabij rioolwaterzuivering	DCMR

2.2 Meetapparatuur en bemonstering

De meetnetten bestaan uit regenwatervangers met hieraan gekoppeld elektronische apparatuur voor de besturing van het apparaat. De vanger is een kast met een gesloten deksel. De regenwatervanger gaat open zodra het regent en sluit één minuut nadat de regensensor weer droog is. De regenvanger is lichtdicht afgesloten en geconditioneerd op 5°C in de gehele ruimte. De regen wordt opgevangen in een trechter en via een slang in de fles(sen) geleid. In de regenwatervangers van LMR en DCMR bevinden zich drie flessen, zie Figuur 1. Elke fles bevat regenwater van één week. Na elke week wordt de fles automatisch gewisseld. Om de twee weken worden de monsters opgehaald voor analyse op hoofdcomponenten en zware metalen in de laboratoria. De twee flessen worden samengevoegd tot één monster. De monsters van LMR en DCMR zijn dus twee-weken monsters.

Het regenwater van de provincie Limburg wordt opgevangen in één fles, zie Figuur 2. Deze fles wordt om de vier weken opgehaald en voor analyse naar het laboratorium gebracht. De monsters van de provincie Limburg zijn dus vier-weken monsters. In de watervangers van de provincie Limburg is geen koelsysteem aangebracht. De monsters hebben dezelfde temperatuur als de buitenlucht.



Figuur 1: Regenwatervanger LMR, locatie de Bilt.



Figuur 2: Regenwatervanger provincie Limburg, locatie Maastricht.

Het regenwater dat niet gebruikt wordt voor de standaardanalyse op hoofdcomponenten en zware metalen, wordt naar het RIVM verstuurd (door DCMR onder gekoelde condities). De gewenste minimale hoeveelheid per monster is 500 ml. De analyses worden uitgevoerd door Laboratorium voor Zoönosen en Omgevingsmicrobiologie (LZO) bij het RIVM.

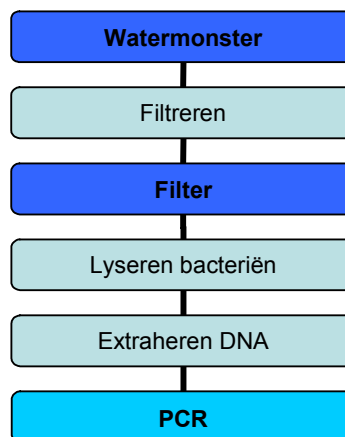
De meetunits in het veld worden regelmatig met Milli-Q water en een metaalvrije kwast schoongemaakt. De flessen waarin het regenwater wordt opgevangen worden gerecycled. Na gebruik worden ze schoongemaakt. De flessen van LMR en DCMR worden op 40 graden gewassen met een fosfaatvrije zeepoplossing en vervolgens geneutraliseerd op basis van organisch zuur. De flessen van de provincie Limburg worden alleen met Milli-Q water schoongespoeld.

2.3 Klimatologische omstandigheden en meetperiode

Legionellose komt het meest voor bij weersomstandigheden met een hoge luchtvochtigheid (>70%) en warme temperaturen (weekgemiddelde >17°C) (Karagiannis et al. 2008). De grootste kans op deze weersomstandigheden is in de zomerperiode. Met behulp van meteorologische data van het KNMI zijn deze meest ideale omstandigheden afgeleid (Website KNMI). Het gaat dan om een weekgemiddelde temperatuur groter dan 17°C met tevens een relatieve luchtvochtigheid groter dan 70%. Deze klimatologische omstandigheden werden waargenomen in de weken 23, 26, 27, 30, 31, 32 en 35. De grafiek in Bijlage 2 geeft inzicht in de klimatologische omstandigheden (luchtvochtigheid en temperatuur) gedurende de zomermaanden eind april tot en met begin september 2008. De regenwatermonsters betreffen een meetperiode van 2 of 4 weken. Bij de keuze van de te analyseren regenwatermonsters is zoveel mogelijk aangesloten bij de weken met de meest gunstige weersomstandigheden

2.4 Methode opwerken regenwatermonsters

De standaard voorgeschreven detectiemethode van *Legionella* in water is de NEN 6265, waarbij de watermonsters na filtratie uitgespateld worden op BCYE platen, waarop de *Legionella* bacteriën kunnen groeien. Een voorwaarde bij microbiologische (kweek)methoden is dat de watermonsters binnen 24 uur na monsterneming ingezet worden. Dit omdat de aanwezige bacteriën na langere tijd bewaren geïnactiveerd kunnen raken en daardoor niet meer te detecteren zijn met de reguliere kweekmethoden. Omdat het bij deze regenwater monsters nooit haalbaar was om binnen 24 uur na monsterneming te testen is besloten om eventueel aanwezig *Legionella* DNA met behulp van PCR-methoden aan te tonen volgens onderstaand schema.



Schematische weergave hoe de opwerkmethode van watermonsters plaatsvindt voor detectie met behulp van PCR,.

2.4.1 Filtratie

Het te onderzoeken regenwater werd over een 0,2 µm filter gefiltreerd (Isopore filter; Millipore, Etten-Leur, Nederland), waarbij de aanwezige *Legionella* bacteriën op het filter achterblijven. De hoeveelheid water die per monster werd gefiltreerd werd bepaald door de fles, waar het water in werd bewaard, voor en na de filtratie te wegen.

2.4.2 DNA extractie

Om het DNA uit het oorspronkelijke regenwatermonster te kunnen isoleren werd het filter overgebracht in een 50 ml buis met 10 ml lysisbuffer (Biomerieux, Boxtel, Nederland). Na een incubatie van 30 minuten, waarbij de buis met daarin het filter en de lysisbuffer werd geroteerd, werd het vrijgekomen DNA geëxtraheerd met een magnetische extractiemethode (NucliSense; Biomerieux). De extractie werd uitgevoerd volgens het protocol van de fabrikant. Het geëxtraheerde DNA werd opgenomen in 50 µl elutiebuffer.

2.4.3 Aantonen van Legionella DNA met PCR

16S real-time PCR

Het gen dat codeert voor 16S ribosomaal RNA is een universeel geconserveerd gebied in bacterieel DNA. Dit gen is aanwezig in *Legionella* bacteriën maar ook in alle andere bacteriën. Omdat de 16S rRNA genen van alle *Legionella* species onderling een hoge mate van homologie vertonen kunnen met behulp van een generieke *Legionella* 16S real-time PCR alle *Legionella* species worden aangetoond. De primers en probe die gebruikt zijn voor de 16S PCR zijn eerder beschreven (Diederien et al, 2007) en amplificeren een 201 bp product. Voor de PCR is gebruik gemaakt van het LightCycler 480 apparaat (Roche, Minheim, Duitsland) en de Lightcycler 480 Probes Master kit (Roche). Vijf microliter geïsoleerd DNA, of tien-voudige verdunningen van dit DNA, werden toegevoegd aan 15 µl PCR mix in een 96-wells plaat. De PCR mix bestond uit 1x Probes Master (Roche), 1,1 µM van de primers en 0,7 µM van de probe. De 96 wells-plaat werd 10 minuten bij 95°C geïncubeerd, gevolgd door 45 cycli van amplificatie: 10 seconden bij 95°C, 50 seconden bij 50°C en 1 seconde bij 72°C, waarna nog 10 seconden bij 40 °C werd gekoeld. De hoeveelheid van het geamplificeerd PCR-product werd, na voltooiing van iedere cyclus, gedurende de hele PCR assay bepaald door middel van een fluorescentie meting.

Mip real-time PCR

Detectie van DNA van een specifiek *Legionella* species werd uitgevoerd met behulp van een *mip* real-time PCR. Het *mip*-gen is een virulentie gen van *Legionella* en vertoont veel variatie tussen de verschillende *Legionella* species. Op basis van deze variaties kan met behulp van een *mip*-PCR onderscheid worden gemaakt tussen verschillende *Legionella* species. De real-time PCR assay werd uitgevoerd op het Lightcycler 480 apparaat en amplificeert een 155 bp gedeelte van het *mip*-gen (Lodder et al., 2009). De primers die hierbij gebruikt werden zijn FP3 en RP5. De hoeveelheid van het geamplificeerde product werd na voltooiing van elke PCR cyclus gemeten met behulp van de fluorescentie. Hierbij werd gebruik gemaakt van 3 specifieke probes, gericht tegen *L. pneumophila*, *L. anisa* en *L. longbeachae*. De reactie en analyse werd uitgevoerd zoals bij de 16S real-time PCR is beschreven, waarbij de 3 probes in 3 afzonderlijke reacties zijn getest.

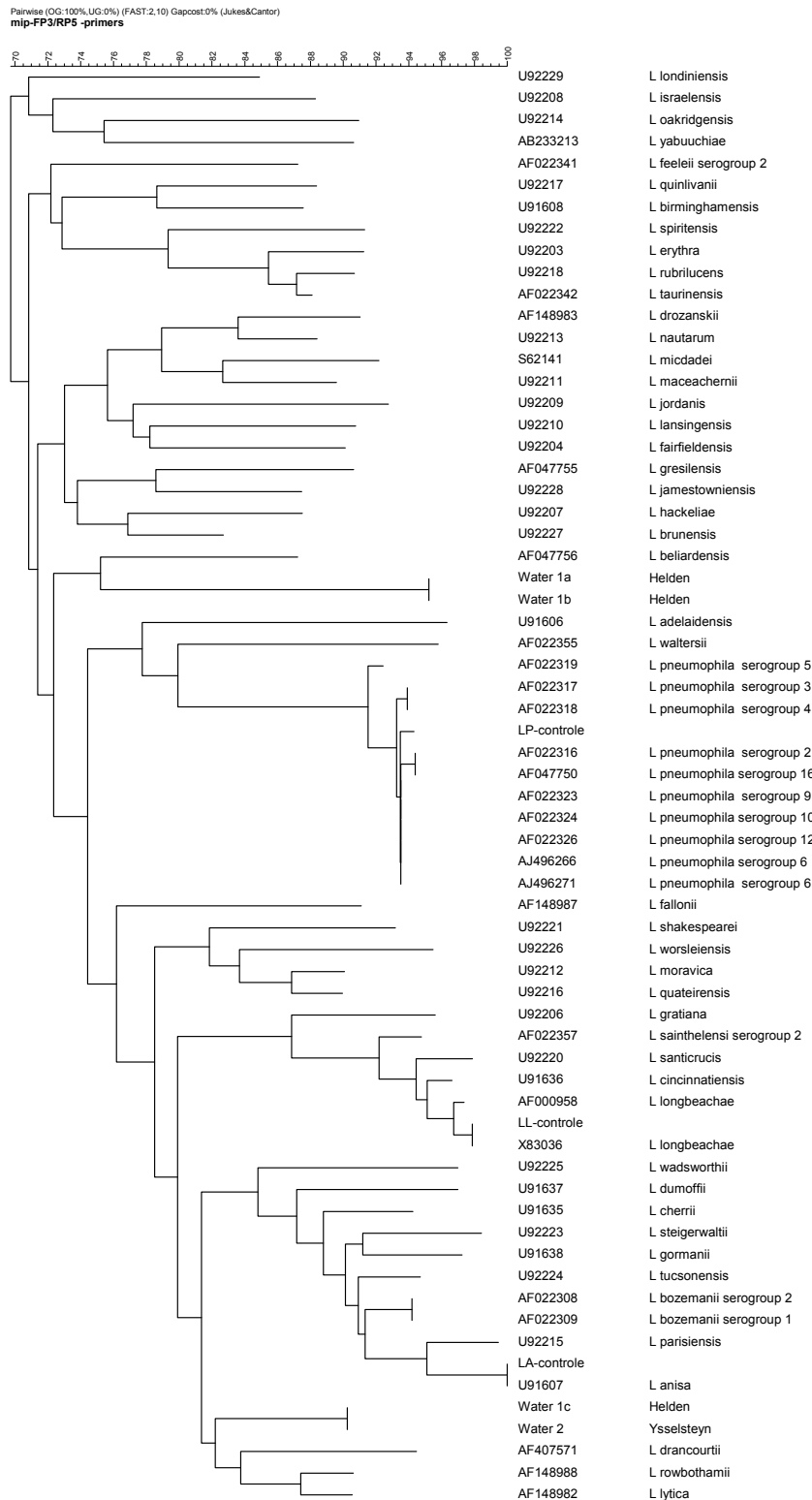
2.4.4 Sequentie analyse en fylogenie

Voor de bepaling van de exacte sequentie van de vermoedelijk positieve monsters zijn de PCR-producten gesequenced. Hiervoor zijn de PCR producten na gel elektroforese opgezuiverd met behulp van Qiaquick gel extraction kit (Qiagen, Venlo, Nederland). De PCR producten zijn na opzuiveren direct gebruikt in de sequentie reactie of de PCR producten zijn eerst gekloneerd in een vector. Na klonering in een pCRII-TOPO vector en transformatie in competente *E. coli* JM109 cellen is op diverse witte kolonies een M13 PCR ingezet. De M13 PCR producten werden geanalyseerd door elektroforese op een 2% agarose gel en gevisualiseerd onder UV na kleuring met SybrGold. De PCR producten met de verwachte grootte (399 bp) werden opgezuiverd met behulp van een Qiaquick PCR purification kit (Qiagen). De opgezuiverde PCR producten werden gesequenced met een BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA) en de sequenties werden geanalyseerd met behulp van Bionumerics 5.1 (Applied Maths, Kortrijk, België). De genetische verwantschap van de verkregen sequenties uit regenwater en *Legionella* sequenties uit de NCBI (National Center for Biotechnology Information) database is onderzocht door alignment van 161 nt van 16S ribosomaal RNA of van 115 nt van het *mip*-gen, gevolgd door fylogenetische analyse met behulp van Bionumerics 5.1 (Applied Maths).

3 Resultaten

Op geen van de 11 geselecteerde locaties van het LMR en de verschillende stedelijke locaties kon *Legionella* DNA in de regenwater monsters worden aangetoond (Tabel 1 en 2 in bijlage 3). De volumina van het regenwater varieerden van 100 ml tot en met ruim 2 liter waarbij de troebelheid van de monsters sterk van elkaar verschild. In de eerste twee series regenwater monsters verkregen vanuit het LMR (week 22–23 en 24–25) en in drie stedelijke regenwater monsters verkregen uit Maastricht (april–juni) kon, met behulp van een generieke 16S real-time PCR assay, geen *Legionella* DNA in de monsters aangetoond worden (Tabel 1). Weliswaar werd met deze PCR in alle monsters een positief PCR product verkregen, maar uit nadere sequentie analyse bleek dit PCR product niet afkomstig te zijn van *Legionella* bacteriën maar van andere aanwezige bacteriën, onder andere het DNA van *Pseudomonas* bacteriën. Om toch eventuele *Legionella* DNA, in een selectie van deze monsters, te kunnen aantonen is een real-time PCR assay ingezet met primers gericht op het *mip*-gen van *Legionella* en een specifieke probe gericht tegen *L. pneumophila*. Het *mip*-gen is specifiek voor *Legionella* waardoor er minder kans is dat de aanwezigheid van andere bacteriën leidt tot vals positieve signalen. Met de *mip* real-time PCR assay kon in de geselecteerde regenwatermonsters geen DNA van *L. pneumophila* worden aangetoond.

De derde serie regenwater monsters verkregen vanuit het LMR (week 30–31) en in de stedelijke regenwater monsters verkregen vanuit de provincie Limburg en verkregen vanuit het Rijnmond gebied (DCMR) zijn direct met behulp van een specifieke *mip* real-time PCR assay getest. Naast de specifieke probe gericht tegen *L. pneumophila* is ook gebruik gemaakt van een specifieke probe gericht tegen *L. anisa* en een tegen *L. longbeachae*. In geen van de geteste regenwater monsters kon DNA van *L. pneumophila*, *L. anisa* of *L. longbeachae* worden aangetoond (tabel 2). In 2 monsters, locaties Helden en Ysselsteyn week 14–18, werd een laag achtergrond signaal bij de *L. pneumophila* assay verkregen. Na gel electroforese bleek het PCR-product de verwachte grootte te hebben, namelijk 155 baseparen. De PCR producten afkomstig uit het regenwater uit Ysselsteyn en Helden (provincie Limburg) werden, na klonering en transformering, gesequenced. Voor deze locaties werden respectievelijk een en twee verschillende sequenties verkregen. Deze sequenties konden niet worden teruggevonden in de NCBI database, en dus niet worden bevestigd als zijnde bekende *Legionella* varianten. Een paar van deze sequenties vertonen wel veel overeenkomsten met andere *Legionella* spp. (Figuur 1). Mogelijk betreft het hier DNA afkomstig van nog niet eerder getypeerde *Legionella* spp.



Figuur 1 : Fylogenetische analyse van 115 nucleotide (nt) sequentie van het *mip*-gen.

4 Discussie

Uit het onderzoek blijkt dat het verzamelde regenwater bacteriën bevat, maar er is geen *L. pneumophila*, *L. anisa* of *L. longbeachae* DNA aangetroffen.

Met behulp van PCR, kan aanwezig DNA heel gevoelig aangetoond worden. In deze studie zijn regenwatermonsters onderzocht op de aanwezigheid van *Legionella* DNA met behulp van een 16S PCR. Alle onderzochte monsters gaven in deze test een positief PCR signaal. Bij nadere sequentie analyse van de PCR producten bleek het echter niet om *Legionella*, maar om andere bacteriën te gaan, zoals *Pseudomonas*. Kennelijk bevat het verzamelde regenwater bacteriën. De gebruikte 16S PCR is in regenwatermonsters niet specifiek genoeg om onderscheid te maken tussen *Legionella* DNA en DNA afkomstig van andere bacteriën. Het 16S gen van deze bacteriën vertoont veel homologie met het 16S gen van *Legionella* wat de vals positieve signalen kan veroorzaken. Bovendien kan het niet worden uitgesloten dat in de regenwatermonsters wel *Legionella* aanwezig is, maar mogelijk gemaskeerd wordt door de aanwezigheid van andere bacteriën.

Met behulp van een PCR gericht tegen het *mip*-gen kon geen *L. pneumophila*, *L. anisa* en *L. longbeachae* worden aangetoond. Het *mip*-gen is specifiek voor *Legionella* en komt niet voor in andere bacteriën. Omdat niets bekend is over de gevoeligheid van de DNA-extractie en *mip*-PCR methode voor regenwatermonsters kan geen uitspraak worden gedaan over de waarschijnlijkheid dat de monsters inderdaad geen *Legionella* bevatten. De onderzochte volumina varieerden sterk en het is vooralsnog onduidelijk of er een optimaal te onderzoeken volume is. Naast de *Legionella* bacteriën worden ook andere bacteriën gefiltreerd en andere inhiberende stoffen die de detectie met behulp van PCR kunnen storen. De efficiëntie van *Legionella* DNA extractie uit regenwater en het effect van eventuele inhiberende factoren op de PCR dient nader uitgezocht te worden om een uitspraak te kunnen doen over de gevoeligheid van deze methode voor detectie van *Legionella* DNA in regenwater. Naar de aanwezigheid van andere *Legionella* species behalve *L. pneumophila*, *L. anisa* en *L. longbeachae*, is geen onderzoek gedaan maar ook deze andere *Legionella* species kunnen relevant zijn voor de volksgezondheid.

In twee regenwater monsters van de provincie Limburg (stedelijke locatie Helden en locatie nabij klein dorp Ysselsteyn) werd met de specifieke *L. pneumophila mip*-PCR een laag fluorescentie signaal verkregen. Deze PCR producten zijn verder geanalyseerd met behulp van sequentie analyse. De verkregen sequenties konden in de NCBI database niet worden gematched met een bekende *Legionella* stam. Maar doordat de verkregen sequenties wel sterk lijken op andere *Legionella* sequenties (ongeveer 60 of 80 % overeenkomst op een 115 nt stuk) kan niet worden uitgesloten dat het een nog niet getypeerde *Legionella* stam betreft. Opgemerkt dient te worden dat deze monsters ongekoeld bewaard waren en dus groei van eventueel aanwezige *Legionella* bacteriën in de monsters tijdens de bewaarperiode niet uitgesloten kan worden.

4.1 Aanbevelingen

- In een vervolg onderzoek is het aan te bevelen een selectie te maken van locaties welke een hoge incidentie van legionellose patiënten hebben, en in de nabijheid van een potentiële bron of vlakbij legionellose patiënten te bemonsteren.
- Het heeft de voorkeur om meer stedelijke locaties te monstern omdat hier meer invloeden zijn van mogelijke bronnen, bijvoorbeeld de aanwezigheid van koeltorens.

- In dit onderzoek was soms maar een paar honderd ml regenwater beschikbaar om PCR analyses op uit te voeren. Door in een vervolg onderzoek meer regenwater te bewaren, bestaat de mogelijkheid om de methode verder te optimaliseren voor toepassing op regenwater.
- Het effect van de bewaarperiode van het verzamelde regenwater op de aanwezigheid van *Legionella* dient nader te worden onderzocht.

Referenties

- Ahmed W, Huygens F, Goonetilleke A, Gardner T. Real-time PCR detection of pathogenic microorganisms in roof-harvested rainwater in Southeast Queensland, Australia. 2008; 74: 5490-5496.
- Albrechtsen HJ. Microbiological investigations of rainwater and graywater collected for toilet flushing. Water Sci. Technol. 2002; 46: 311-316.
- Baskerville A, Fizgeorge RB, Broster M, Hambleton P, Dennis PJ. Experimental transmission of legionnaires' disease by exposure to aerosols of *Legionella pneumophila*. Lancet 1981; 2: 1389-1390.
- Diederien BM, de Jong CM, Marmouk F, Kluytmans JA, Peeters MF, Van der Zee A. Evaluation of real-time PCR for the early detection of *Legionella pneumophila* DNA in serum samples. J Med Microbiol. 2007;56(Pt 1):94-101.
- Dowd SE, Gerba CP, Pepper IL, Pillai SD. Bioaerosol transport modeling and risk assessment in relation to biosolid placement. J. Environ. Qual. 2000; 29: 343-348.
- Evans CA, Coombes PJ, Dunstan RH. Wind, rain and bacteria: The effect of weather on the microbial composition of roof-harvested rainwater. Water Research 2006; 40: 37-44.
- Fisman DN, Lim S, Wellenius GA, Johnson C, Britz P, Gaskins M, Maher J, Mittleman MA, Spain CV, Haas CN, Newbern C. It's not the heat, it's the humidity: wet weather increases legionellosis risk in the greater Philadelphia metropolitan area. J Infect Dis. 2005 Dec 15;192(12):2066-73
- Folmsbee M, Strevett KA. Bioaerosol concentration at an outdoor composting center. J. Air Manage Assoc. 1999; 49: 554-561.
- di Giorgio C, Krempff A, Guiraud H, Binder P, Tired C, Dumenil G. Atmospheric pollution by airborne microorganisms in the city of Marseilles. Atmos. Environ. 1995; 30: 155-160.
- Hicks LA, Rose CE Jr, Fields BS, Drees ML, Engel JP, Jenkins PR, Rouse BS, Blythe D, Khalifah AP, Feikin DR, Whitney CG. Increased rainfall is associated with increased risk for legionellosis. Epidemiol Infect. 2007 Jul;135(5):811-7.
- Jones AM, Harrison RM. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations – a review. Sci. Total Environ. 2004; 326: 151-180.
- Karagiannis I, Brandsema P, Van der Sande M. 2008. Warm, wet weather associated with increased Legionnaires' disease incidence in The Netherlands. Epidemiol. Infect. 17: 1-7.
- Lodder WJ, Schalk M, Rutjes SA, Schets FM, de Roda Husman AM (2009). *Legionella*. Impact van ziekteverwekkende *Legionella* bacteriën in leidingwater op de volksgezondheid in Nederland. RIVM rapport (in voorbereiding), RIVM, Bilthoven.
- Pillai SD, Widmer KW, Dowd SE, Ricke SC. 1996. Occurrence of airborne bacteria and pathogen indicators during land application of sewage sludge. Appl. Environ. Microbiol. 1996; 62: 296-299.

Schets FM, Italiaander R, Berg van der HHJL, Roda Husman de AM (2007). De invloed van weersomstandigheden op de microbiologische kwaliteit van hemelwater toegepast voor toiletspoeling en schoonmaken. RIVM rapport 703719017, RIVM, Bilthoven.

Schets FM, Berg HHJL van den, Lodder WJ, Docters van Leeuwen AE, Veld S in 't, De Roda Husman AM (2005). De microbiologische kwaliteit van hemelwater toegepast voor toiletspoeling, schoonmaken en tuinsproeien - inventariserend onderzoek. RIVM rapport 703719009, RIVM, Bilthoven

Schimmer B, Morroy G, Dijkstra F, Schneeberger PM, Weers-Pothoff G, Timen A, Wijkmans C, van der Hoek W. Large ongoing Q fever outbreak in the south of The Netherlands. Eurosurveillance 2008; 13: 1-3.

Simmons G, Jury S, Thornley C, Harte D, Mohiuddin J, Taylor M. A Legionnaires' disease outbreak: a water blaster and roof-collected rainwater systems. Water Research 2008; 42: 1449-1458.

Turnbull PCB, Lindeque PM, Le Roux J, Bennett AM, Parks SR. Airborne movement of anthrax spores from carcass sites in the Etosha National Park, Namibia. J. Appl. Microbiol. 1998; 84: 667-676.

Versteegh JFM, Brandsema PS, Aa van der NGFM, Dik HHJ, Groot de GM (2007). Evaluatie legionellapreventie Waterleidingwet. RIVM rapport 703719020, RIVM, Bilthoven.

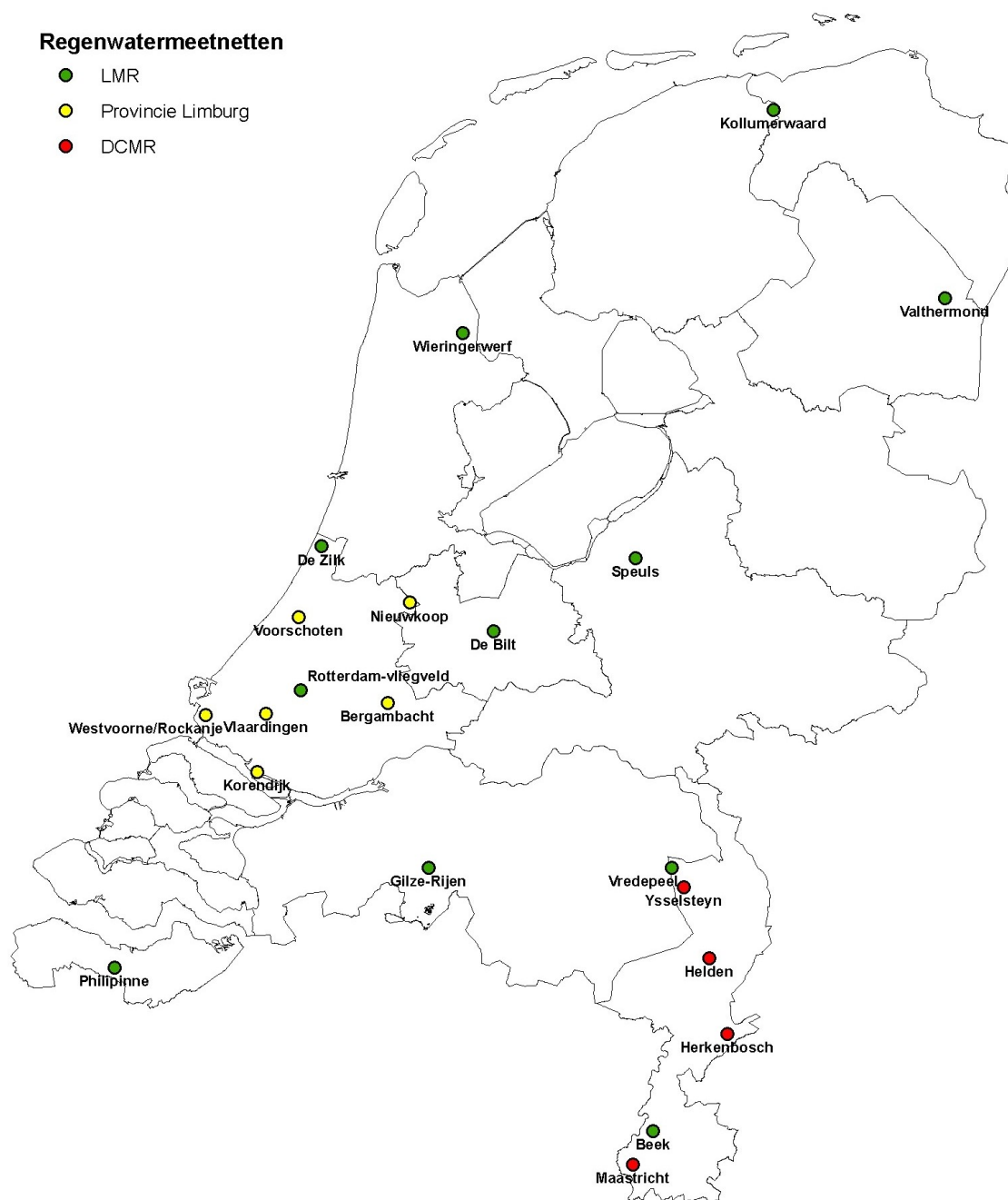
Website: www.knmi.nl

Betreft: klimatologische omstandigheden.

Website: www.belproject.nl

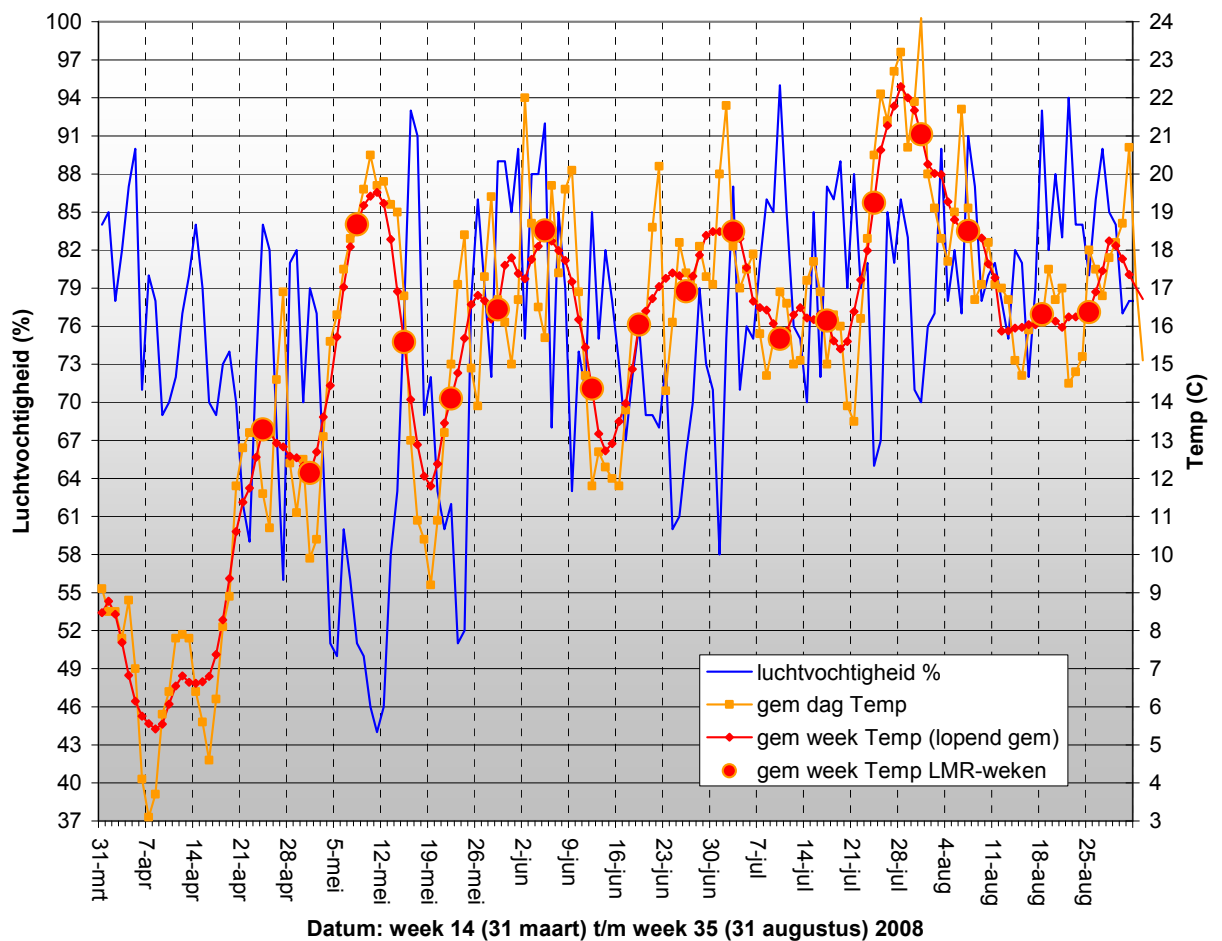
Betreft: informatie over het Bemonsterings Eenheid Legionella-pneumonie (BEL)-project.

Bijlage 1 Locaties regenwatermeetnetten



Figuur 1: Locaties stedelijke en landelijke regenwatermeetnetten.

Bijlage 2 Klimatologische omstandigheden



Figuur 1: Klimatologische omstandigheden gedurende onderzoeksperiode (bron: KNMI)

Bijlage 3 Resultaten

Tabel 1: Analyse resultaten regenwater.

Locatie	LMR nummer	Week	Volume regenwater (ml)	Deeltjes ¹	16S <i>L. spp</i>	16S product gesequenced	<i>L. pneumophila</i> (mip)
Wieringerwerf	538	22–23	186	++	? ²	Ja	–
		24–25	107	+	?	Ja	–
De Zilk	444	22–23	406	++	?	Ja	–
		24–25	n.g. ³	n.g.	n.g.	n.g.	n.g.
Rotterdam airport	434	22–23	330	+	?	Ja	–
		24–25	275	+	?	Ja	–
Philippine	318	22–23	524	++	?	Ja	–
		24–25	508	+	?	Ja	–
Vliegbasis Gilzen-Rijen	231	22–23	335	+	?	Ja	–
		24–25	394	+	?	Ja	–
Maastricht-Aken airport	134	22–23	520	+	?	Ja	–
		24–25	401	+	?	Ja	–
Vredepeel	131	22–23	530	+++	?	Ja	–
		24–25	183	+	?	Ja	–
De Bilt	628	22–23	524	+	?	Ja	–
		24–25	267	+++	?	Ja	–
Speuld	732	22–23	455	+	?	Ja	–
		24–25	366	++	?	Ja	–
Valthermond	929	22–23	527	+	?	Ja	–
		24–25	387	+	?	Ja	–
Kollumerwaard	934	22–23	224	+	?	Ja	–
		24–25	328	+	?	Ja	–

Maastricht		14–17	513	+	?	Nee	–
		18–21	507	+	?	Nee	–
		22–25	508	+	?	Nee	–

¹ +: deeltjes zichtbaar; ++: redelijk wat deeltjes zichtbaar; +++: veel deeltjes zichtbaar.

² ?: niet te interpreteren resultaat.

³ n.g.: niet getest.

Tabel 2: Analyse resultaten regenwater met specifieke *Legionella* probes.

Locatie	LMR nummer	Week	Volume regenwater (ml)	Deeltjes ¹	<i>L. pneumophila</i> (mip)	<i>L. anisa</i> (mip)	<i>L. longbeachae</i> (mip)	Mip-product gesequenced
Wieringerwerf	538	30–31	1038	+	–	–	–	
De Zilk	444	30–31	1040	+	–	–	–	
Rotterdam airport	434	30–31	1041	–	–	–	–	
Philippine	318	30–31	1030	+	–	–	–	
Vliegbasis Gilzen-Rijen	231	30–31	2072	+	–	–	–	
Maastricht-Aken airport	134	30–31	2071	+	–	–	–	
Vredepeel	131	30–31	1037	–	–	–	–	
De Bilt	628	30–31	1030	–	–	–	–	
Speuld	732	30–31	1035	–	–	–	–	
Valthermond	929	30–31	805	+	–	–	–	
Kollumerwaard	934	30–31	1038	–	–	–	–	

Herkenbosch		14–17	283	–	–	–	–	
		18–21	253	+	–	–	–	
		22–25	267	–	–	–	–	
		26–29	220	–	–	–	–	
Helden		14–17	279	+	– ²	–	–	Ja
		18–21	264	–	–	–	–	
		22–25	259	+	–	–	–	
		26–29	247	+	–	–	–	
Ysselsteyn		14–17	283	–	– ²	–	–	Ja
		18–21	260	–	–	–	–	
		22–25	258	–	–	–	–	
		26–29	232	–	–	–	–	
Maastricht		26–29	257	–	–	–	–	
Nieuwkoop		26–29	432	–	–	–	–	
Voorschoten		26–29	414	–	–	–	–	
Bergambacht		26–29	428	–	–	–	–	

¹ +: deeltjes zichtbaar; ++: redelijk wat deeltjes zichtbaar; +++: veel deeltjes zichtbaar.

² laag achtergrond signaal.

RIVM

Rijksinstituut
voor Volksgezondheid
en Milieu

Postbus 1
3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl