



Rapport 703719039/2009

J.A.C. Schalk | W.J. Lodder | S.A. Rutjes | F.M. Schets | A.M. de Roda Husman

Legionella in water

Ontwikkeling van een amoebe-kweek-PCR methode
voor detectie van legionella

RIVM Rapport 703719039/2010

Legionella in water

Ontwikkeling van een amoebe-kweek-PCR methode voor detectie van legionella

J.A.C. Schalk
W.J. Lodder
S.A. Rutjes
F.M. Schets
A.M. de Roda Husman

Contact:
J.A.C. Schalk
Laboratorium voor zoönosen en omgevingsmicrobiologie
marjolijn.schalk@rivm.nl

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

© RIVM 2010

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

Dankwoord

Wij willen graag Sjoerd Euser en Jeroen de Boer van Streeklaboratorium Haarlem bedanken voor het ter beschikking stellen van *L. pneumophila* stam Lyon 004. Daarnaast willen wij Sharon van Rooyen bedanken voor hulp bij het uitvoeren en analyseren van de experimenten.

Rapport in het kort

Legionella in water

Ontwikkeling van een amoebe-kweek-PCR methode voor detectie van legionella

Specifieke soorten legionellabacteriën kunnen schadelijk zijn voor de volksgezondheid. Het RIVM heeft een nieuwe methode ontwikkeld waarmee legionellabacteriën die in water zitten, kunnen worden aangetoond. Eerst worden legionellabacteriën gekweekt op amoeben, eencelligen waarin de bacteriën kunnen groeien. De vermeerderde bacteriën worden vervolgens aangetoond met *polymerase chain reaction* (PCR) of met kweek op mediumplaten.

Jaarlijks worden veel gevallen van longontsteking als gevolg van een legionellabacterie gemeld bij het RIVM. Het lukt echter zelden om in de omgeving van deze patiënten de bron van de besmetting te vinden. Dit komt waarschijnlijk doordat bestaande methoden niet in staat zijn om alle legionellabacteriën in watermonsters op te sporen. De amoebe-kweek PCR-methode kan dit naar verwachting wel, maar dit moet nog worden gevalideerd.

Trefwoorden:

Legionella, detectie, water

Abstract

***Legionella* in water**

Development of an amoeba coculture-PCR method for detection of *Legionella*

Some *Legionella* species can be harmful for public health. The National Institute for Public Health and the Environment (RIVM) has developed a new method for detecting *Legionella* bacteria that are present in water. First, samples that are investigated for the presence of *Legionella* are placed onto amoeba which are single-celled organisms in which *Legionella* bacteria can grow. The multiplied bacteria are subsequently detected by polymerase chain reaction (PCR) or culture on solid agar plates.

Each year many cases of pneumonia caused by *Legionella* are reported to the RIVM. However, it is hardly ever possible to find the source of infection in the patient's environment. This is probably due to the fact that current methods for detecting *Legionella* in water samples are limited. We anticipate that the amoebic coculture-PCR method will be able to overcome these limitations although this still has to be validated.

Key words:

Legionella, detection, water

Inhoud

Samenvatting	7
1 Aanleiding	8
2 Legionellose	9
2.1 Ziektebeeld	9
2.2 Legionellose-meldingen	9
2.3 Legionellose-uitbraken	11
2.4 Bronopsporing	11
2.4.1 Bron in Nederland	11
2.4.2 Bron in buitenland	12
3 Legionellabacteriën	13
3.1 Levenscyclus	14
3.2 Besmettingsroute	15
3.3 Infectierisico	15
4 Detectiemethoden	17
4.1 Klassieke kweek	17
4.2 Moleculaire detectiemethoden	18
4.3 Amoebe-kweek PCR	19
4.3.1 Ontwikkeling amoebe-kweek PCR-methode	20
5 Discussie	26
6 Aanbevelingen	27
Literatuur	28
Bijlage 1	34

Samenvatting

Ondanks aangepaste wetgeving voor legionella en strengere naleving hiervan is in de afgelopen jaren het aantal legionellose-meldingen toegenomen. De precieze oorzaak van de stijging in legionellose-meldingen is onduidelijk. De verbeterde diagnostiek en de toegenomen aandacht voor legionella na een uitbraak van legionella op een bloemenshow in Bovenkarspel in 1999 dragen mogelijk bij aan deze stijging. Echter, het werkelijke aantal jaarlijkse legionellose gevallen is zeer waarschijnlijk hoger dan het aantal gemelde gevallen, vanwege onderdiagnostiek. In de omgeving van legionellose patiënten kan nog zelden een besmettingsbron worden vastgesteld. Mogelijk hebben bestaande methoden voor detectie van legionella in watermonsters beperkingen in het aantonen van voor de volksgezondheid relevante legionellabacteriën. Daarnaast worden mogelijk niet de juiste bronnen bemonsterd. Er is nagenoeg niets bekend over de voor de volksgezondheid relevante infectieuze dosis van legionella.

De huidige kweekmethode voor detectie van legionella in watermonsters heeft als nadeel dat deze tijdrovend is. Bovendien wordt een deel van de voor de volksgezondheid relevante legionellabacteriën gemist, omdat niet alle infectieuze legionellabacteriën kweekbaar zijn op mediumplaten. Detectie met behulp van *polymerase chain reaction* (PCR) geeft wel snel resultaat en hiermee kunnen zowel de kweekbare- als niet-kweekbare legionellabacteriën aangetoond worden. In het merendeel van de geteste watermonsters geeft PCR een positief resultaat, maar omdat genetisch materiaal wordt aangetoond duidt dit niet noodzakelijkerwijs op de aanwezigheid van levende, infectieuze legionellabacteriën. Er kan wél een uitspraak worden gedaan over de infectiviteit van de aangetroffen legionellabacteriën als een PCR-techniek vooraf gegaan wordt door een kortdurende kweek op gevoelige cellen. Bij het RIVM is een dergelijke celkweek-PCR-methode voor detectie van legionella ontwikkeld. Hierbij wordt gebruikgemaakt van amoeben. Dit zijn eencelligen, die in het milieu de natuurlijke gastheer van legionella zijn. Deze methode geeft snel resultaat en de verwachting is dat met deze methode ook de niet-kweekbare, infectieuze legionellabacteriën gedetecteerd kunnen worden. Dit moet echter nog worden uitgetest. De amoebe-kweek PCR-methode kan na optimalisatie en validatie mogelijk worden gebruikt om bij uitbraaksituaties legionella te detecteren in potentiële bronnen.

1 **Aanleiding**

Legionella is al geruime tijd een bekende veroorzaker van legionellose. De identificatie van deze bacterie in 1976, bij veteranen die ziek waren geworden na een bijeenkomst in Philadelphia, was het startsein van veelvuldig onderzoek naar legionellose en methodiekontwikkeling ten behoeve van detectie van legionellabacteriën. In Nederland is het besef dat legionella een gevaar voor de volksgezondheid kan zijn vooral ontstaan na de epidemie in 1999, waarbij bezoekers van een bloemenshow in Bovenkarspel ziek werden en een aantal patiënten ook werkelijk gediagnosticeerd werd met legionellose. Zeker 188 mensen zijn ziek geworden, waarvan er 21 zijn overleden (Den Boer et al., 2002). Hierdoor ontstond grote maatschappelijke onrust en werd aangedrongen op maatregelen die deze omvangrijke epidemieën in de toekomst zouden kunnen voorkomen. Ondanks aangepaste wetgeving en strengere naleving hiervan is in de afgelopen jaren het aantal legionellose-meldingen toegenomen (Dijkstra et al., 2008). In de omgeving van legionellose patiënten kan nog zelden een besmettingsbron worden vastgesteld (Den Boer et al., 2008). Bestaande detectiemethoden hebben mogelijk beperkingen in het aantonen van voor de volksgezondheid relevante legionellabacteriën en mogelijk worden niet de juiste bronnen bemonsterd. Behalve leidingwater worden meer en meer andere bronnen geïdentificeerd, zoals koeltorens (Van den Hoek et al., 2006), die kunnen bijdragen aan de ziektelast, waarbij echter ook mogelijke andere bronnen, zoals regenwater, zouden moeten worden beschouwd (Lodder et al., 2009). Vooralsnog is onbekend aan hoeveel legionellabacteriën men moet worden blootgesteld om geïnfecteerd te raken met legionella, al dan niet gevolgd door ziekte (Schets en De Roda Husman, 2004). Informatie over de dosis van legionella in potentiële bronnen bij uitbraaksituaties kan inzicht geven over de relevante infectieuze dosis.

Een nieuwe aanpak voor detectie van legionellabacteriën, gebaseerd op procedures regulier toegepast in de virologie (Fang en Pincus, 1995), combineert vermeerdering op cellen gevolgd door detectie met een moleculaire techniek. Hiermee kan een uitspraak worden gedaan over de aanwezigheid van infectieuze legionellabacteriën in water. Toepassing van een dergelijke geïntegreerde celkweek-PCR voor legionella kan mogelijk een antwoord geven op een aantal belangrijke, nog altijd openstaande, onderzoeksvragen waarop beleid gebaseerd kan worden ten einde legionellose door blootstelling aan water te voorkomen.

2 Legionellose

2.1 Ziektebeeld

Er zijn meerdere ziektebeelden bij individuen met een legionella-infectie beschreven.

Legionellapneumonie (veteranenziekte) kan variëren van milde tot zeer ernstige vormen van longontsteking. De longontsteking gaat gepaard met hoge koorts, hoofdpijn en mogelijk andere klachten. Pontiac-koorts, eveneens veroorzaakt door legionella, is een zelf limiterende griepachtige ziekte waarbij geen longontsteking optreedt (WHO, 2007). Tevens vindt bij veel individuen een asymptomatische infectie plaats, waarbij geen ziekteverschijnselen optreden maar wel antistoffen worden gevormd (Boshuizen et al., 2001).

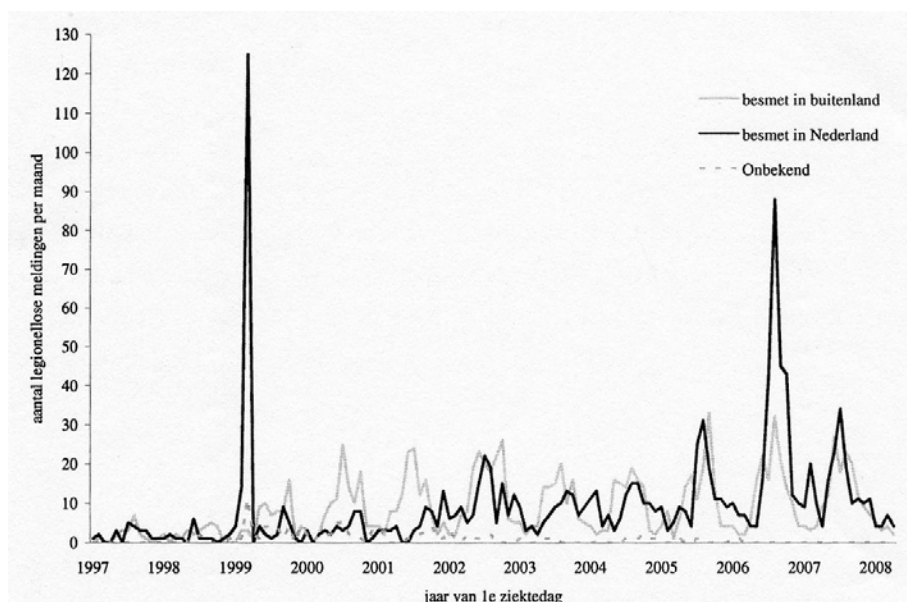
Bij een pneumonie wordt onderscheid gemaakt tussen ‘community acquired’ pneumonie (CAP) en nosocomiale infecties. Bij een CAP is de infectie opgelopen in de normale dagelijkse omgeving en bij een nosocomiale infectie is de infectie opgelopen in het ziekenhuis. Wereldwijd is bij 0,5-10% van de CAP's sprake van legionellose (WHO, 2007). In het rapport van de Gezondheidsraad is voor de Nederlandse situatie geschat dat 5% van de CAP's legionellose betreft (Gezondheidsraad, 2003). *Legionella pneumophila* is in circa 90% van de gediagnosticeerde humane legionella-infecties de veroorzaker (Fields et al., 2002; Baum et al., 2008), maar er wordt ook *Legionella non-pneumophila* uit klinisch materiaal geïsoleerd. Het betreft dan meestal immuungecompromiteerde patiënten (Muder en Yu, 2002).

Onduidelijk is nog wat de precieze nasleep van de ziekte (sequelae) is, zowel voor blootgestelde mensen met als zonder risicofactoren. Na de uitbraak in Bovenkarspel zijn de personen die een pneumonie hebben opgelopen gevolgd en patiënten hebben aangegeven twee jaar na de uitbraak nog diverse klachten te hebben, waaronder vermoeidheid, kortademigheid, spier- en gewrichtspijnen en andere lichamelijke en geestelijke klachten (Lettinga et al., 2002).

2.2 Legionellose-meldingen

Legionellose is in Nederland aangifteplichtig. Het aantal meldingen van legionellose in Nederland is in de afgelopen jaren sterk gestegen (Figuur 1; Dijkstra et al., 2008). De precieze oorzaak van de stijging in legionellose-meldingen is onduidelijk. De verbeterde diagnostiek en de toegenomen aandacht voor

legionella na een uitbraak van legionella op een bloemenshow in Bovenkarspel in 1999 draagt zeker bij aan deze stijging. Mogelijk dat ook veranderende klimatologische omstandigheden een oorzaak hiervan zijn. Het blijkt immers dat veel regenval en hoge luchtvochtigheid geassocieerd zijn met een toename van legionellose (Fisman et al., 2005; Hicks et al., 2007), ook in Nederland (Karagiannis et al., 2008). Klinisch is moeilijk onderscheid te maken tussen longontstekingen veroorzaakt door legionellabacteriën en andere microbiële verwekkers (Mulazimoglu en Yu, 2001), wat de diagnostiek en behandelwijze door de arts bemoeilijkt. In de jaarrapportage respiratoire infectieziekten 2007/2008 (Dijkstra et al., 2008) wordt vermeld dat bij ruim driekwart van de personen die in Nederland in het ziekenhuis waren opgenomen met een longontsteking de ziekteverwekker niet bekend was. In 2007/2008 werden 296 gevallen van legionellose gemeld, waarvan 142 patiënten de infectie mogelijk in het buitenland hadden opgelopen (Dijkstra et al., 2008). Een onderrapportage¹ en onderdiagnostiek² van legionellose kan niet worden uitgesloten gezien het grote aantal longontstekingen waarbij de veroorzaker onbekend is. Het werkelijke aantal gevallen van legionellose ligt dus waarschijnlijk hoger (Versteegh et al., 2009).



Figuur 1: Aantal meldingen van legionellose in de periode 1997 - april 2008

Meldingen zijn weergegeven naar maand van eerste ziekte dag en onderscheid is gemaakt tussen gevallen waarbij de infectie meest waarschijnlijk werd opgelopen in binnenland of buitenland (bron: Osiris). Uit: Jaarrapportage respiratoire infectieziekten 2007/2008, Dijkstra et al., 2008

¹ Onderrapportage: gevallen van legionellose worden niet gemeld. Legionellose veroorzaakt door legionellasoorten anders dan *Legionella pneumophila* is niet opgenomen in de meldingscriteria, is niet meldingsplichtig.

² Onderdiagnose: testen geven een vals-negatieve uitslag of bij een pneumonie wordt niet op legionella getest.

2.3 Legionellose-uitbraken

Uitbraken van legionella-infecties worden veroorzaakt door blootstelling van gevoelige personen aan een bron. Deze bronnen kunnen zeer divers van aard zijn, zoals besmet water uit koeltorens, whirlpools, spas, sauna's, fonteinen, ijsmachines, watervernevelaars en douches (Benkel et al., 2000; Den Boer et al., 2002; Bencini et al., 2005). Grond is ook in toenemende mate een bron waaruit legionella geïsoleerd wordt en die als oorzaak van besmettingen wordt geïdentificeerd (Koide et al., 2001; O'Connor et al., 2007; Den Boer et al., 2007). Koeltorens zijn veelvuldig beschreven als bron van omvangrijke legionellabesmettingen (Garcia-Fulgueiras et al., 2003; Rota et al., 2005; Nguyen et al., 2006; Sabria et al., 2006; Van den Hoek et al., 2006), waarbij soms hoge concentraties legionellabacteriën in het koeltorenwater gevonden werden. Bentham (2000) beschrijft hoe in een periode van 16 weken routinematig watermonsters uit koeltorens bemonsterd en geanalyseerd werden, waarbij in een aantal gevallen, na monsters met redelijk lage concentraties legionellabacteriën, vervolgens hoge concentraties legionellabacteriën gemeten werden.

2.4 Bronopsporing

Wanneer een individu besmet raakt met legionella is het belangrijk om zo snel mogelijk de bron van de besmetting op te sporen, om verdere legionella-infecties te voorkomen. Bij de bronopsporing worden mogelijke bronnen van besmetting, zoals reizen naar het buitenland en blootstelling aan risicovolle gebouwen en/of bronnen, zoals sauna's, ziekenhuizen en koeltorens geïnventariseerd.

2.4.1 Bron in Nederland

In het kader van bronopsporing is het BEL-project (Bemonsterings Eenheid Legionellapneumonie) in 2002 van start gegaan (www.belproject.nl). Het project wordt uitgevoerd door het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid in Haarlem en de GGD Kennemerland. De GGD bepaalt aan de hand van een aantal criteria of bemonstering van mogelijke besmettingsbronnen zinvol is (Euser et al., 2009). Het streeklaboratorium in Haarlem voert de monsternamen en detectie uit, in zowel water als patiënten, en heeft een landelijk registratiesysteem voor het opsporen van epidemiologische clusters. Uiteraard worden, indien mogelijk, maatregelen getroffen om verdere ziektegevallen te voorkomen. De ernst van deze maatregelen, bijvoorbeeld sluiten van een sauna of uitschakelen van een koeltoren, is afhankelijk van de waarschijnlijkheid van de bron, type installatie maar ook de technische staat en de kwaliteit van het beheersplan. Ook het aantal en de gevoeligheid van de blootgestelde personen en of een match tussen omgeving- en patiëntenisolaat werd aangetoond spelen bij deze maatregelen een belangrijke rol.

Bij slechts een klein aantal van het totale aantal patiënten kan met behulp van kweek uit het patiëntenmateriaal legionella geïsoleerd en getypeerd worden, wat de bronopsporing bemoeilijkt. Wanneer uit patiënten een typeerbare legionellabacterie is geïsoleerd wordt desondanks maar zelden de besmettingsbron gevonden. Van 2002 tot halverwege 2006 kon maar bij 3% van de onderzochte patiënten de besmettingsbron worden achterhaald (Den Boer et al., 2008).

2.4.2 Bron in buitenland

Er is op Europees niveau een surveillance systeem voor legionella, waarvoor de ‘European Working Group on Legionella Infections’ (EWGLI) de legionella-infecties documenteert die gemeld worden door een groot aantal Europese landen (Ricketts et al., 2008). Nederland meldt de gevallen van legionella-infecties opgelopen in het buitenland bij EWGLI, zodat per legionellabesmetting de mogelijke bron gelokaliseerd kan worden en andere aangesloten Europese landen zich op de hoogte kunnen stellen van risicolocaties. Het land waar de legionella-infectie heeft plaatsgevonden wordt gewaarschuwd zodat direct maatregelen getroffen kunnen worden, zoals bronopsporing en desinfectie van de bron. Ten bate van bronopsporing is een sequence-based typing methode ontwikkeld waarmee legionella-isolaten getypeerd kunnen worden (Gaia et al., 2005; Ratzow et al., 2007). Op de website van EWGLI (www.ewgli.org) is het mogelijk om een database te raadplegen en legionella-isolaten te identificeren.

3 Legionellabacteriën

Legionella is een gram-negatieve, beweeglijke, staafvormige bacterie, die goed groeit onder aerobe omstandigheden. Het is een intracellulair pathogeen dat wel in waterige milieus kan overleven maar voor de vermeerdering een gastheer(cel) nodig heeft, zoals protozoa (Fields et al., 2002).

Legionellabacteriën hebben zeer specifieke voedingseisen: ze hebben het zwavelhoudende aminozuur L-cysteïne en ijzer nodig om te kunnen groeien (Feeley et al., 1978). Legionellabacteriën komen van nature voor in diverse milieus, zoals oppervlaktewater en in de bodem. Ze komen echter ook veelvuldig voor in kunstmatige waterige milieus zoals whirlpools, koeltorens en vernevelaars, waarin de legionellabacteriën veel minder concurrentie ondervinden van andere bacteriën dan in natuurlijke milieus (Swanson en Hammer, 2000). Legionellabacteriën kunnen in heel lage concentraties in leidingsystemen overleven, waardoor er altijd een risico bestaat dat ze zich, onder gunstige omstandigheden, relatief snel kunnen vermenigvuldigen en het leidingsysteem kunnen koloniseren.

Inmiddels zijn al meer dan 50 soorten legionellabacteriën bekend (WHO, 2007). Legionellasoorten worden verder onderverdeeld in serogroepen. Bij *L. pneumophila* worden zestien serogroepen onderscheiden. De soorten *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. hackeliae*, *L. sainthelensi*, *L. spiritensis*, *L. erythra*, *L. quinlivanii* en *L. londiniensis* omvatten ieder twee serogroepen. Van de resterende soorten is één serogroep bekend (WHO, 2007). Andere, nog niet geklassificeerde bacteriën, behoren waarschijnlijk ook tot de familie *Legionellaceae*. *L. pneumophila* is in circa 90% van de gediagnosticeerde humane legionella-infecties de veroorzaker (Fields et al., 2002), maar ook *Legionella non-pneumophila*'s zijn geassocieerd met klinische gevallen, waaronder *L. bozemanii*, *L. micdadei*, *L. longbeachae*, *L. dumoffii*, *L. feeleeii*, *L. wadsworthii* en *L. anisa* (zie Tabel 1).

Tabel 1. Overzicht van legionellasoorten en de associatie met klinische gevallen

Legionellasoorten, geassocieerd met klinische gevallen		Legionellasoorten, (nog) niet geassocieerd met klinische gevallen	
<i>L. anisa</i>	<i>L. parisiensis</i>	<i>L. adelaidensis</i>	<i>L. londiniensis</i>
<i>L. birminghamensis</i>	<i>L. pneumophila</i>	<i>L. beliardensis</i>	<i>L. lytica (comb. nov.)</i>
<i>L. bozemanii</i>	<i>L. sainthelensi</i>	<i>L. brunensis</i>	<i>L. moravica</i>
<i>L. cincinnatiensis</i>	<i>L. tusconensis</i>	<i>L. busanensis</i>	<i>L. nautarum</i>
<i>L. dumoffii</i>	<i>L. wadsworthii</i>	<i>L. cherrii</i>	<i>L. quateirensis</i>
<i>L. erythra</i>	<i>L. waltersii</i> *	<i>L. drancourtii</i>	<i>L. quinlivanii</i>
<i>L. feeleeii</i>		<i>L. drozanskii</i>	<i>L. rowbothamii</i>
<i>L. gormanii</i>		<i>L. fairfieldensis</i>	<i>L. rubrilucens</i>
<i>L. hackeliae</i>		<i>L. fallonii</i>	<i>L. santicrucis</i>
<i>L. jordanis</i>		<i>L. geestiana</i>	<i>L. shakespearei</i>
<i>L. lansingensis</i>		<i>L. genomospecies</i>	<i>L. spiritensis</i>
<i>L. longbeachae</i>		<i>L. gratiana</i>	<i>L. steigerwaltii</i>
<i>L. maceachernii</i>		<i>L. gresilensis</i>	<i>L. taurinensis</i>
<i>L. micdadei</i>		<i>L. israelensis</i>	<i>L. worsleiensis</i>
<i>L. oakridgensis</i>		<i>L. jamestowniensis</i>	

Gebaseerd op WHO rapport 2007, *Konig et al., 2005

3.1 Levenscyclus

Legionella groeit en vermeerderd zich in de in het water aanwezige protozoa, zoals amoeben. Deze protozoa komen voor in biofilms in bijvoorbeeld waterleidingen. Legionella wordt door de protozoa opgenomen via fagocytose en verblijft in de protozoa in een vacuole. De protozoa voorzien de legionellabacterie van voedingsstoffen waardoor deze kan repliceren. De levenscyclus van legionella bestaat uit tenminste twee fasen, de transmissieve fase en de replicatieve fase. Tijdens de replicatieve fase vermeerderen de legionellabacteriën zich in de protozoa. De bacteriën zijn in deze replicatieve fase onbeweeglijk, lang en filamenteus. Als de voedingsstoffen in de vacuole van de amoëbe opraken, veranderen de nakomelingen en gaan ze over in de transmissieve fase, waarbij de nakomelingen uit de gastheercel kunnen ontsnappen, buiten de gastheercel kunnen overleven en opnieuw een nieuwe gastheer kunnen infecteren (Molofsky en Swanson, 2004). De bacteriën in deze transmissieve fase zijn korte en erg beweeglijke staafjes (Byrne en Swanson, 1998; Hammer en Swanson, 1999).

L. pneumophila vertoont, na intracellulaire replicatie in protozoa, resistentie tegen stress. De bacterie is bestand tegen hoge temperaturen, zuur en pesticiden waardoor deze kan overleven in het milieu (Abu Kwaik et al., 1997). Het is beschreven dat de intracellulaire vermeerdering van legionellabacteriën in protozoa de infectiviteit van legionellabacteriën voor humane macrofagen vergroot (Cirillo et al., 1994; Cianciotto, 2001).

3.2 Besmettingsroute

In situaties waarin water verneveld wordt, bijvoorbeeld bij toepassing van vernevelaars, in whirlpools of bij koeltorens, kan legionella in aerosolen in de lucht terechtkomen. Het aantal vernevelde bacteriën hangt af van de oorspronkelijke concentratie in het water. In aerosolen kunnen ook amoeben aanwezig zijn, of vacuoles die door deze amoeben worden afgescheiden, waarin zich honderden of zelfs duizenden legionellabacteriën kunnen bevinden (Rowbotham, 1980; 1986). Mensen kunnen geïnfecteerd worden door het inademen van aerosolen die legionellabacteriën (al dan niet in een amoebe of vacuole) bevatten of door inademen van leidingwater. De overleving van legionella in aerosolen hangt onder andere af van de heersende omgevingstemperatuur, de relatieve luchtvochtigheid en de grootte van de aerosolen. Het trilhaarepitheel in het bovenste gedeelte van de longen kan in een groot aantal gevallen de ingeademde bacteriën verwijderen zonder dat ziekte optreedt. Echter, als de bacteriën in het onderste gedeelte van de longen, de longblaasjes, terechtkomen kunnen zij zich na fagocytose in de macrofagen intracellulair vermenigvuldigen en vervolgens infecties aan de ademhalingswegen veroorzaken (Fields et al., 2002). Er is geen mens-op-mens transmissie van legionellabacteriën beschreven (WHO, 2004).

3.3 Infectierisico

Het aantal bacteriën waaraan een individu moet worden blootgesteld om geïnfecteerd te raken met legionella, de zogenaamde dosis-respons relatie, is vooralsnog onbekend. Op basis van infectie-experimenten waarbij gebruik werd gemaakt van cavia's zijn wel infectierisicoschattingen gedaan maar onduidelijk is in hoeverre dit diersmodel werkelijk overeenkomt met infectie bij de mens (Armstrong en Haas, 2007; 2008). Op basis van dit diersmodel is het risico geschat van het oplopen van een legionella-infectie tijdens douchen (Bouwknegt et al., in preparation ^{a,b}).

Om de dosis-respons relatie beter te kunnen schatten, kunnen vrijwilligersstudies worden uitgevoerd of respons kan worden geschat in uitbraaksituaties, als de dosis is gekwantificeerd waaraan de patiënt is blootgesteld. Echter, vanwege het ernstige ziektebeeld en mogelijke complicaties en sequelae, is het onverantwoord vrijwilligersstudies uit te voeren waarbij mensen aan verschillende doses en soorten legionella worden blootgesteld om hun respons vast te stellen en hieruit vervolgens een dosis-respons relatie te kunnen schatten. In geval van legionella-geassocieerde ziekteuitbraken is zelden of nooit bekend hoeveel van welke legionellabacteriën in de bron aanwezig waren, zeker niet op het moment van blootstelling vanwege de incubatieperiode van twee tot tien dagen. De huidige norm voor de maximaal toelaatbare hoeveelheid legionella is 100 kve (kolonie-vormende eenheden) per liter water, maar deze norm is niet gebaseerd op dosis-respons relaties, omdat hiervoor de wetenschappelijke kennis vooralsnog ontbreekt.

Niet iedereen die in aanraking komt met legionellabacteriën raakt geïnfecteerd of wordt ziek. Dit is afhankelijk van veel verschillende pathogeen-, gastheer- en omgevingsfactoren. Of er een infectie plaatsvindt en ziekte optreedt, is onder andere afhankelijk van de hoeveelheid bacteriën die bij de gastheer binnendringt, wat de virulentie is van de binnengedrongen legionellasoort en de gevoeligheid van het blootgestelde individu. Er zijn bepaalde kwetsbare groepen mensen in de samenleving die meer risico lopen ziek te worden als gevolg van een legionella-infectie, zoals immuungecompromiteerden en individuen met ernstig onderliggend lijden, zoals mensen met chronische longziekten, diabetes of kwaadaardige bloedziekten. Andere risicofactoren voor het oplopen van legionellose zijn veel roken, hoge leeftijd, en mannelijk geslacht. Mensen met onderliggend lijden hebben bovendien een hogere kans om aan de ziekte te overlijden (el Ebiary et al., 1997).

4 Detectiemethoden

Verschillende methoden kunnen worden toegepast voor de detectie van legionellabacteriën in milieumonsters die hieronder worden weergegeven.

4.1 Klassieke kweek

De gouden standaard voor de detectie van legionella in water is nog steeds de kweek op “buffered charcoal yeast extract” (BCYE) – platen. Voor detectie van legionella in water is de methode uitgewerkt in de Nederlandse norm NEN 6265 (Anoniem, 2007). De methode bestaat uit membraanfiltratie van het monster, gevolgd door uitplaten op BCYE-platen waaraan al dan niet antibiotica zijn toegevoegd om groei van andere bacteriën te remmen. Legionellakolonies worden bevestigd door ze door te strijken op platen met en platen zonder L-cysteïne. Legionella groeit niet op platen zonder L-cysteïne. Bevestiging kan ook met behulp van de *Polymerase Chain Reaction* (PCR) worden uitgevoerd.

Legionellakolonies op BCYE-platen hebben een karakteristieke morfologie met een korrelige structuur en een matglazen uiterlijk. Er kunnen kleurvariaties van de kolonies voorkomen van melkachtig wit tot groen of paars. Onder UV-licht zijn bepaalde legionellasoorten autofluorescerend. Bepaalde legionellasoorten vermenigvuldigen zich sneller dan anderen en vormen hierdoor sneller zichtbare kolonies en zijn eerder en makkelijker te bepalen. Typering van de karakteristieke kolonies verkregen na 7 dagen kweken op BCYE kan met behulp van serologische testen, maar ook met PCR worden uitgevoerd.

Doordat de kweekmethode weinig selectief is, worden de legionellabacteriën in aanwezigheid van veel achtergrondflora, in meerdere of mindere mate geremd. Er zijn twee voorbereidingstappen voorhanden die dit probleem kunnen reduceren. Hierbij wordt een gedeelte van het monster voorbehandeld met behulp van zoutzuur en een gedeelte door een hittebehandeling. Zowel de onbehandelde als de behandelde delen van de monsters worden hierna uitgeplaat op de diverse BCYE-platen. Veranderingen in de samenstelling van de BCYE-platen die worden aangebracht om de selectiviteit te verbeteren hebben vaak een negatief gevolg voor de opbrengst. Zowel de samenstelling en de pH van BCYE-platen, als de incubatietemperatuur van de platen is van invloed op de legionellasoorten en de aantallen die kunnen worden aangetoond (Veenendaal en in 't Veld, 2005; Veenendaal en Van der Kooij, 2008). Theoretisch kan gesteld worden dat het aantal aangetoonde

bacteriën gelijk is aan de numerieke waarde van het aantal kolonies per onderzocht volume water. De theoretische detectielimiet van de methode is 50 kolonie vormende eenheden (kve) per liter water. Echter de aanwezigheid van stoorflora en andere (matrix)invloeden kunnen de detectie beïnvloeden, wat kan leiden tot onderschatting van het werkelijke aantal bacteriën in water.

Nadeel van de kweekmethode op BCYE-platen is verder dat minimaal 7 dagen geïncubeerd moet worden. De methode heeft dus een lange doorlooptijd, terwijl een snel testresultaat gewenst is om tijdig meer ziektegevallen te kunnen voorkomen. Daarnaast worden er grote verschillen in reproduceerbaarheid gevonden tussen laboratoria in ringonderzoeken (Van der Kooij et al., 2003). Ook is in verschillende studies aangetoond dat de standaardkweektest een onderschatting van het aantal infectieuze legionellabacteriën kan geven (Amann et al., 1995; Byrd et al., 1991; Colwell, 2000; Hussong et al., 1987; Delgado-Viscogliosi et al., 2005). In een voedselarme omgeving kunnen legionellabacteriën een levensvatbaar, maar niet kweekbaar stadium ingaan (viable but nonculturable, VBNC), waardoor detectie via standaardkweekmethoden vaak niet mogelijk is (England et al., 1982). Vitalisering van legionella-VBNC-cellen door incubatie met amoeben brengt de bacterie weer in een kweekbaar stadium (Sanden et al., 1992; Steinert et al., 1997). Het feit dat deze geïncubeerde legionellabacteriën ook goed kunnen repliceren in humane monocysten toont aan dat ze hun virulentie behouden. Mogelijk dat met het niet kunnen aantonen van VBNC-cellen via kweek een belangrijk deel van de voor de volksgezondheid relevante, potentieel infectieuze legionellabacteriën gemist worden (Steinert et al., 1997).

4.2 Moleculaire detectiemethoden

Als detectiemethode voor legionella in water kan ook PCR gebruikt worden. Dit is een methode waarmee specifiek legionella-DNA gedetecteerd en eventueel ook gekwantificeerd kan worden. Het grote voordeel van een PCR is dat snel resultaat wordt verkregen. Daarnaast worden alle legionellabacteriën aangetoond, zowel de kweekbare als de VBNC-bacteriën. PCR heeft echter als nadeel dat geen uitsluitsel gegeven kan worden over de levensvatbaarheid en infectiviteit van de aangetoonde legionellabacteriën. Indien monsters worden genomen na een reiniging of andere beheersmaatregel zal het bij detectie via PCR onduidelijk zijn of het hier gaat om levende of dode bacteriën (Wullings et al., 2007). Omdat niet altijd duidelijk is wat de historie van (en van de processen in) een waterleidingsysteem is, is het belangrijk om erg voorzichtig te zijn met het interpreteren van resultaten die zijn verkregen met PCR. In het merendeel van geteste watermonsters gaf PCR een

positief resultaat, terwijl met kweek veelal een negatief resultaat werd verkregen (Wullings et al., 2005; Diederien et al., 2007).

4.3 Amoebe-kweek PCR

Vanwege de nadelen verbonden aan kweek op platen en aan PCR is bij het RIVM een procedure ontwikkeld voor detectie van legionella door de vermeerdering van legionellabacteriën op amoeben (zie paragraaf 4.3.1 en Bijlage 1) gevolgd door detectie via bij voorkeur PCR of kweek op BCYE platen. Met deze methode kunnen snel levende legionellabacteriën in water worden aangetoond. Voor virussen wordt de laatste jaren al steeds meer gebruikgemaakt van toepassingen waarbij een kweek op cellen vooraf gaat aan detectie en typering met moleculaire technieken zoals PCR (Reynolds et al., 1996). Bij deze kweek-PCR-methoden wordt de gevoeligheid van kweek gecombineerd met de snelheid van PCR en wordt onderscheid gemaakt tussen infectieus en niet-infectieus. Er kan met behulp van PCR specifiek worden geselecteerd voor de detectie van bepaalde soorten. Doordat de kweek vooraf gaat aan de PCR kunnen ook relatief grote volumina worden onderzocht, wat bij het gebruik van alleen PCR een beperkende factor is. Verder hebben deze celkweek-PCR-methoden minder last van PCR-remmende stoffen en door de korte kweekstap heeft de aanwezigheid van eventueel stoorflora minder effect op de testresultaten. Een belangrijk voordeel van de kweek-PCR-methode voor detectie van legionella is dat met deze methode alleen infectieuze legionellabacteriën worden aangetoond.

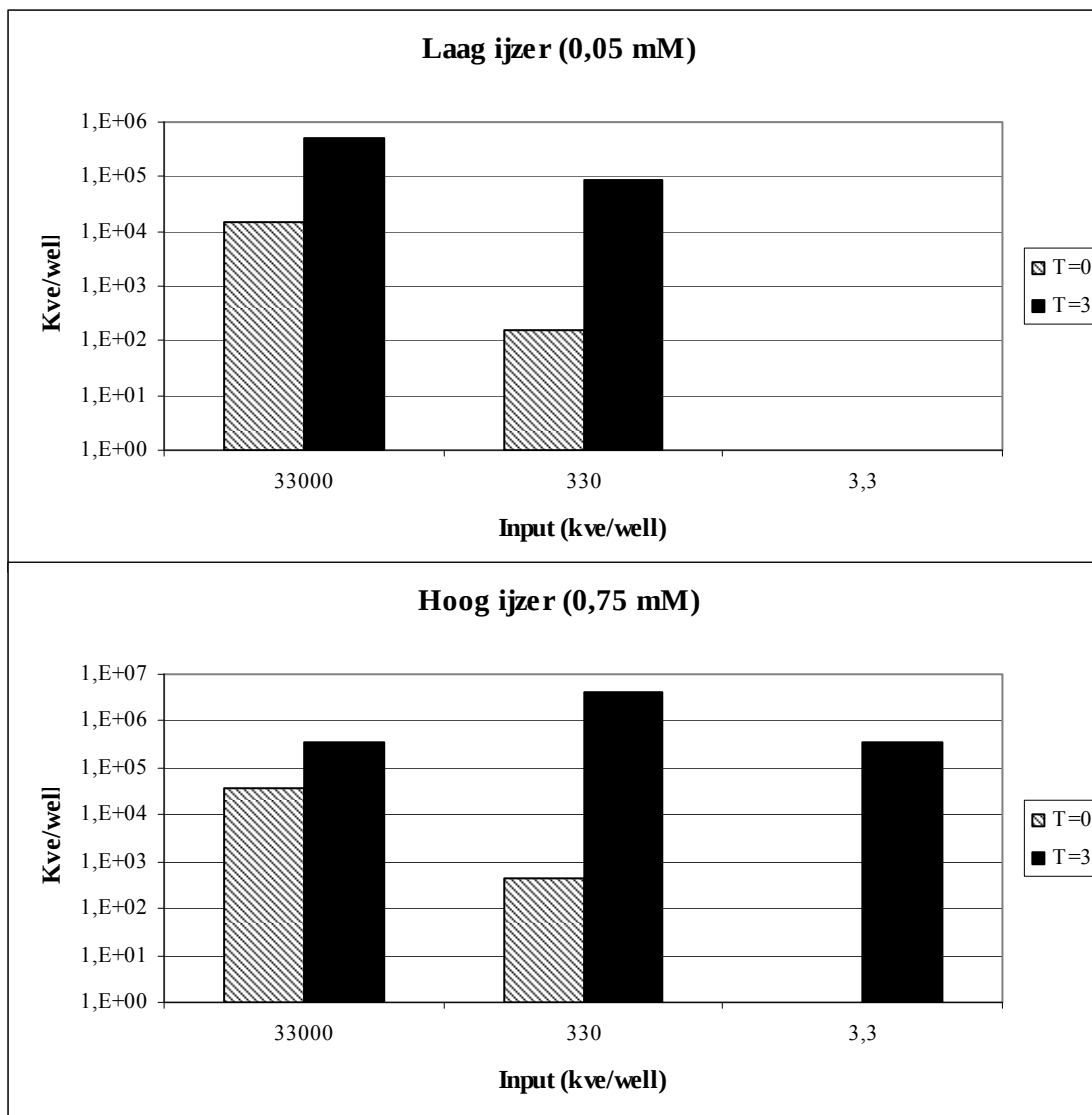
Verrijking van legionella in amoeben is al eerder gebruikt om levensvatbare *L. pneumophila* (Rowbotham, 1983; Seno et al., 2006) en *L. anisa* (La Scola et al., 2001) uit klinische- en milieu-monsters aan te tonen. Met deze methode kunnen VBNC-legionellabacteriën gedetecteerd worden (Alleron et al., 2008; Sanden et al., 1992; Steinert et al., 1997). Dit in tegenstelling tot kweek op platen waarbij VBNC- legionellabacteriën gemist worden. Voor de ontwikkeling van een kweek-PCR-methode voor legionella zijn verschillende parameters uitgezocht en geoptimaliseerd, die hieronder uiteengezet zullen worden.

4.3.1 Ontwikkeling amoebe-kweek-PCR methode

Voor de verrijking van infectieuze legionellabacteriën met een kweekstap werden twee amoebesoornten (*Acanthamoeba castelanii* en *Acanthamoeba polyphaga*) onderzocht. Hierbij werden met *A. polyphaga* iets betere resultaten verkregen voor replicatie van *L. pneumophila* (data niet getoond). Om tot een geoptimaliseerd protocol te komen (zie Bijlage 1) werden verschillende stappen, zoals de infectiestap, en materialen, zoals kweekplaten, in het protocol uitgezocht en vergeleken. De infectie en replicatie bleek het beste te verlopen door legionellabacteriën en amoeben in nauw contact met elkaar te brengen door deze samen af te draaien in een eppendorf vaatje en gedurende 2 uur bij 37°C te incuberen.

Vervolgens worden de amoeben met de bacteriën overgebracht naar een incubatieplaat en gedurende drie dagen bij 37°C geïncubeerd. De gerepliceerde legionellabacteriën worden na incubatie aangetoond met behulp van PCR of met behulp van kweek op plaat. Voor detectie met behulp van kweek wordt een deel van de amoebe-legionellaspensie, of verdunningen hiervan, uitgeplaat op BCYE platen.

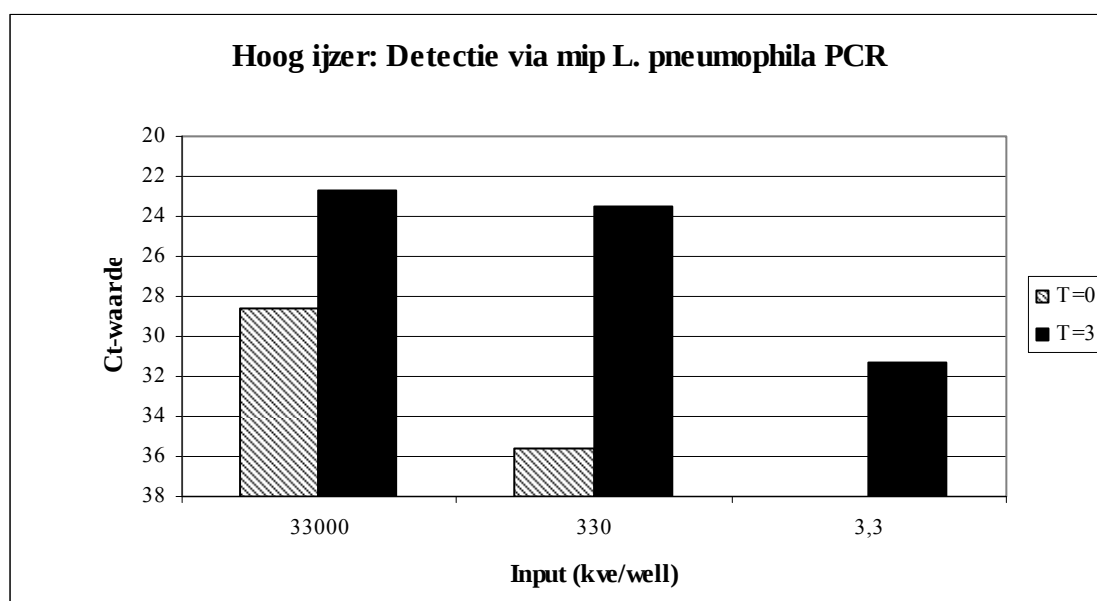
Door het aantal kolonies te bepalen bij de start van de incubatie van het sample met de amoeben (T=0) en 3 dagen na incubatie met amoeben (T=3) is vermeerdering van legionellabacteriën in de amoeben te meten. Met name een hoge ijzerconcentratie bleek een positief effect te hebben op de vermeerdering en detectie van lage aantallen legionellabacteriën (Figuur 2).



Figuur 2. Effect van ijzer-concentratie op replicatie van legionella in amoeben

Een amoebe-kweek experiment werd uitgevoerd zoals beschreven in Bijlage 1, waarbij Acanthamoeba polyphaga werden geïnfecteerd met verschillende hoeveelheden *L. pneumophila*. De infectie werd uitgevoerd in AC buffer met 0,05 of 0,75 mM ijzer. Na 0 en 3 dagen incubatie werd de hoeveelheid *L. pneumophila* bacteriën per compartiment in een incubatieplaat (well) bepaald door een deel van de amoebe-legionellasuspensie uit te platen op BCYE platen. Kve: kolonievormende eenheden.

Voor detectie via PCR wordt uit een deel van de amoebe-legionellaspensie DNA geïsoleerd en gedetecteerd met een PCR specifiek voor het *mip* gen van *L. pneumophila* of met een PCR specifiek voor het 16S ribosomaal RNA gen, waarmee alle legionellasoorten worden gedetecteerd. PCR-resultaten worden uitgedrukt in threshold cycle (Ct-waarde). De Ct-waarde is omgekeerd evenredig aan de logaritme van de concentratie legionella-DNA aan het begin van de PCR-reactie: Naarmate er meer legionella-DNA aanwezig is aan het begin van de PCR-reactie zal de Ct-waarde lager zijn. Zowel bij detectie van legionellabacteriën met behulp van kweek als detectie met behulp van PCR (Figuur 3) wordt vermeerdering van legionellabacteriën in amoeben waargenomen.

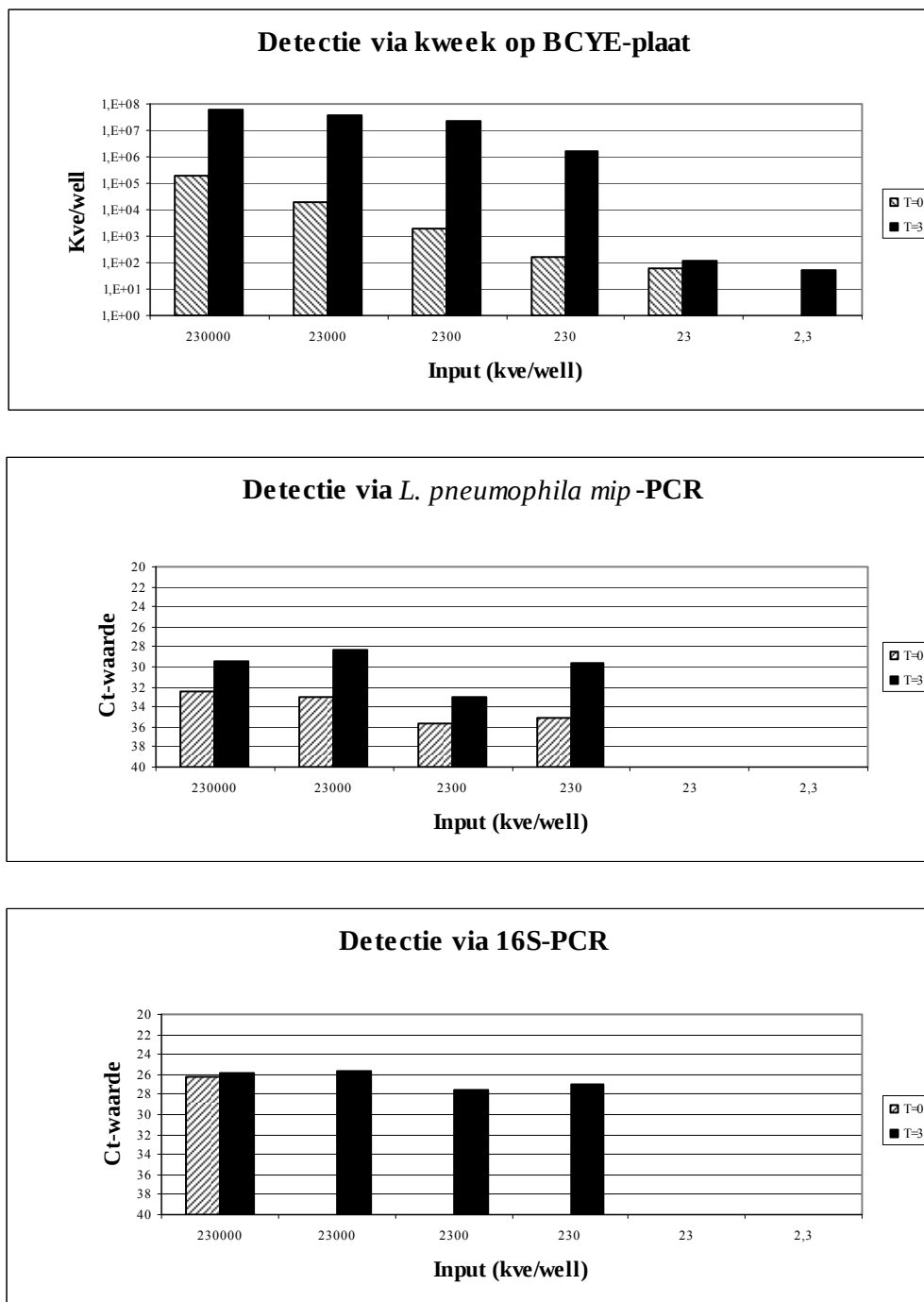


Figuur 3. Detectie via PCR

Uit de T=0 en T=3 samples van het experiment beschreven in Figuur 2 in aanwezigheid van hoge ijzerconcentratie is legionella-DNA geïsoleerd en gedetecteerd via een *mip*-PCR, specifiek voor *L. pneumophila*. Kve: kolonie-vormende eenheden; Ct: threshold cycle.

De detectiegrens van de amoebe-kweek PCR-methode is bepaald door amoeben te infecteren met verschillende hoeveelheden legionellabacteriën. Na 0 en 3 dagen kweek op amoeben werden de aantallen legionellabacteriën bepaald met behulp van PCR of door uitplaten op BCYE-platen. Hierbij werd zowel gebruik gemaakt van een *mip*-PCR specifiek voor *L. pneumophila* en een 16S-PCR waarmee alle legionellasoorten gedetecteerd worden (zie Figuur 4).

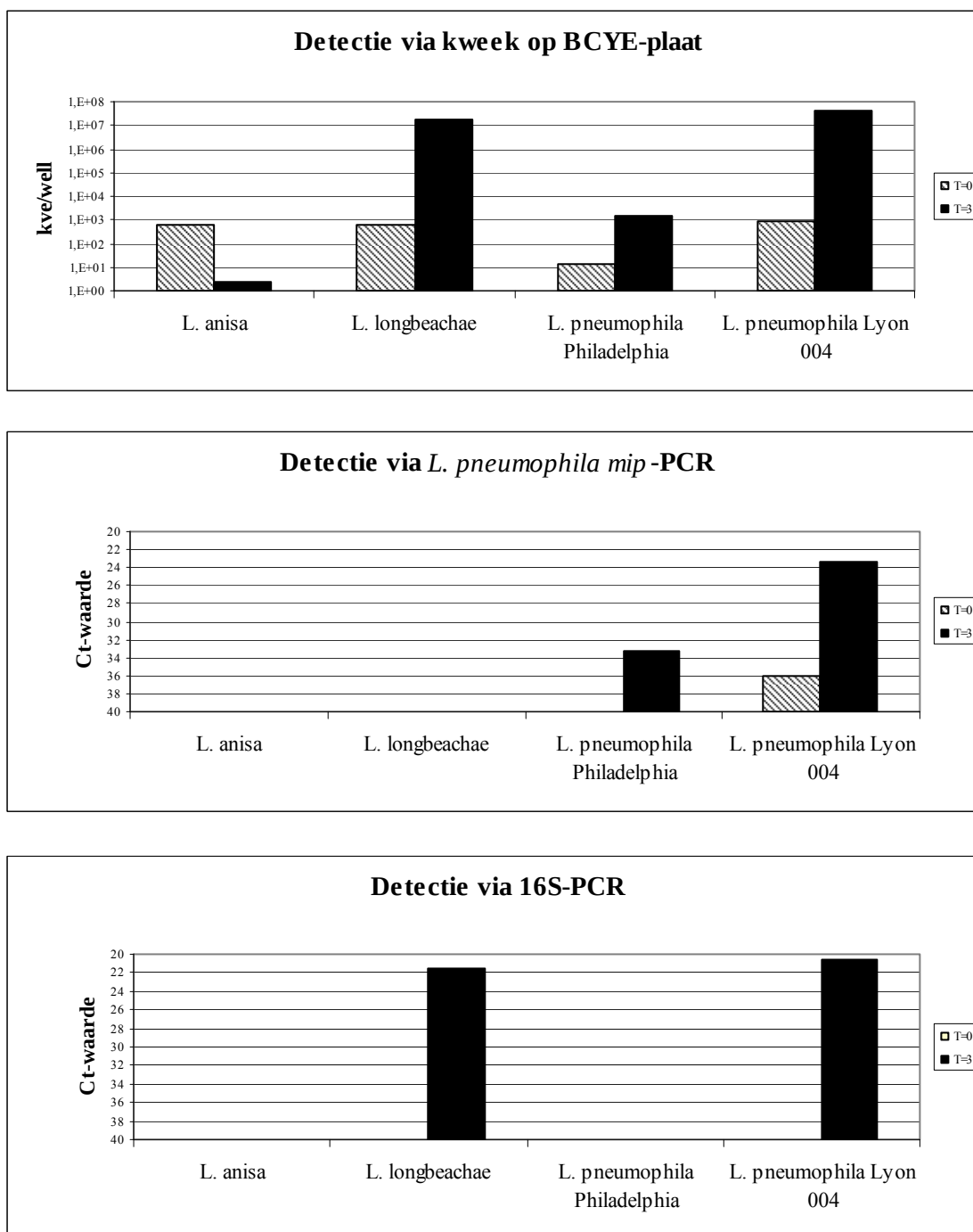
Het vermogen om zich in de amoebe *A. polyphaga* te vermeerderen is uitgezocht voor 3 legionellasoorten, nl. *L. anisa*, *L. longbeachae* en *L. pneumophila*. Hierbij zijn voor *L. pneumophila* twee stammen gebruikt: stam Philadelphia en AFLP type 004 Lyon (zie Figuur 5).



Figuur 4. Detectielimiet van amoebe-kweek PCR-methode

Een amoebe-kweek experiment werd uitgevoerd zoals beschreven in Bijlage 1, waarbij *A. polyphaga* werd gespiked met verschillende verdunningen van een vloeibare *L. pneumophila* kweek. Na 0 en 3 dagen incubatie werd de hoeveelheid *L. pneumophila* bacteriën in de compartimenten van de kweekplaat (wells) bepaald via kweek, *L. pneumophila* mip-PCR of *L. species* 16S-PCR.

Kve/well: kolonievormende eenheden per well; Ct: threshold cycle.



Figuur 5. Specificiteit van de amoebe-kweek PCR-methode

Een amoebe-kweek experiment werd uitgevoerd zoals beschreven in Bijlage 1, waarbij *Acanthamoeba polyphaga* werd gespiked met verschillende verdunningen van een vloeibare *L. anisa*, *L. longbeachae*, *L. pneumophila* Philadelphia en *L. pneumophila* 004 Lyon kweek. Na 0 en 3 dagen incubatie werd de hoeveelheid legionellabacteriën bepaald via kweek, *L. pneumophila* mip-PCR of *L. species* 16S-PCR. Kve/well: kolonievormende eenheden per well; Ct: threshold cycle.

Uitlezen van de resultaten via kweek op BCYE-platen bleek gevoeliger dan uitlezen via PCR. Bij uitlezen via kweek op BCYE-platen zijn al lage aantallen van 2-3 levende legionellabacteriën te detecteren na replicatie op amoeben. Bij uitlezen via PCR is de gevoeligheid van de methode lager, waarschijnlijk omdat slechts een gedeelte van de amoebe-legionella suspensie wordt onderzocht. Aangezien uitlezen via PCR veel minder arbeidsintensief is dan uitlezen via kweek op BCYE-platen heeft dit de voorkeur. Bovendien zijn bij uitlezen met behulp van PCR de resultaten al binnen 1 dag beschikbaar terwijl het bij uitlezen door middel van kweek minimaal 4 dagen duurt voordat telbare kolonies te zien zijn op plaat. Daarom dient de methode nog geoptimaliseerd worden om de gevoeligheid van de PCR te verbeteren. Opvallend is dat *L. anisa* niet groeit in *Acanthamoeba polyphaga*, terwijl *L. longbeachae* en *L. pneumophila* goed groeien (Figuur 5). Met name detectie van *L. pneumophila* serogroep 1 AFLP type 004 Lyon is relevant aangezien dit een type is dat veelvuldig bij patiënten wordt waargenomen maar nauwelijks in het milieu wordt aangetroffen (den Boer et al., 2008). De amoebe-kweek- PCR methode kan bij de detectie van legionella in milieumonsters uitkomst bieden omdat hiermee mogelijk wel de pathogene legionellabacteriën gedetecteerd kunnen worden die met de standaard kweek methode op BCYE platen gemist worden. Dit dient echter nog onderzocht te worden.

5 Discussie

In de omgeving van legionellosepatiënten kan nog zelden een besmettingsbron worden geïdentificeerd (Den Boer et al., 2008). Bovendien bestaat er een discrepantie tussen de legionellasoorten die vooral bij patiënten worden gevonden en de legionellasoorten die in watermonsters worden aangetroffen (Doleans et al., 2004; Diederer et al., 2007; Den Boer et al., 2008). Dit is slechts gedeeltelijk te verklaren door toepassing van methoden voor klinische diagnostiek die voornamelijk selectief voor *L. pneumophila* zijn (Schalk et al., 2009). Andere verklaringen kunnen zijn dat niet de juiste bronnen bemonsterd worden (Den Boer et al., 2008) of dat met de bestaande detectiemethoden voor legionella in water een deel van de voor de volksgezondheid relevante legionellabacteriën gemist worden. Zo is beschreven dat bepaalde levende legionellabacteriën niet kweekbaar zijn op BCYE platen (Steinert et al., 1997). Deze viable but not culturable (VBNC) legionellabacteriën kunnen wel infectieus zijn voor de mens.

In dit onderzoek is een procedure ontwikkeld voor gevoelige detectie van levende legionellabacteriën in water via kweek op amoeben. De verwachting is dat met de amoebe-kweek-PCR methode VBNC legionellabacteriën die met de huidige kweek op BCYE-platen worden gemist wel kunnen worden aangetoond (Pagnier et al., 2008; Steinert et al., 1997). Een tweede voordeel van deze amoebe-kweek-PCR methode is dat deze een korte doorlooptijd heeft. Resultaten zijn al na 4 dagen beschikbaar. Juist als de aanwezigheid van legionella vermoed wordt, is het belangrijk om dit snel te bevestigen om verdere risico's voor de volksgezondheid te voorkomen door de juiste beheersmaatregelen te treffen. Een derde voordeel van de amoebe-kweek-PCR methode is dat alleen levende legionellabacteriën worden aangetoond. Dit in tegenstelling tot detectie van legionella-DNA met behulp van PCR waarmee geen onderscheid gemaakt kan worden tussen levende of dode bacteriën en dus geen uitspraak kan worden gedaan over potentieel gevaar voor de volksgezondheid. De toepasbaarheid van de methode voor het testen van milieumonsters en de meerwaarde van de methode ten opzichte van de klassieke kweek op BCYE-platen en PCR dient echter nog te worden bepaald.

Bij uitbraaksituaties zou de amoebe-kweek-PCR-methode kunnen worden ingezet om legionella te bepalen in potentiële bronnen. Door het inzetten van humane cellijnen bij de methode in plaats van amoeben kan met de methode mogelijk ook een uitspraak worden gedaan over het ziek-makend vermogen van de aangetoonde legionellabacteriën.

6 Aanbevelingen

- Om verbetering in bronopsporing te bereiken ten behoeve van preventie van infectie met legionella zullen andere methoden moeten worden ontwikkeld en ingezet, waarbij de amoebe-kweek-PCR mogelijk een goed alternatief biedt.
- Nader onderzoek uitvoeren naar de aantallen en soorten legionellabacteriën die met de amoebe-kweek PCR methode kunnen worden aangetoond en uittesten van de methode op milieumonsters.
- Gebruik van humane cellijnen voor de celkweek-PCR-methode om te onderzoeken of hiermee specifiek pathogene legionellabacteriën aangetoond kunnen worden.
- Bepalen van de dosis-respons relatie vanuit uitbraaksituaties door gegevens te verzamelen over de dosis en typen legionellabacteriën in potentiële bronnen.
- Uitvoeren van kwantitatieve risico-analyses voor legionella, om meer inzicht te krijgen in het risico van blootstelling van een individu aan legionellabacteriën in specifieke situaties.

Literatuur

- Abu Kwaik, Y., Gao, L.Y., Harb, O.S. en Stone, B.J. (1997). Transcriptional regulation of the macrophage-induced gene (*gspA*) of *Legionella pneumophila* and phenotypic characterization of a null mutant. *Molecular Microbiology*. 24, 629-642.
- Alleron, L., Merlet, N., Lacombe, C. en Frère, J. (2008). Long-term survival of *Legionella pneumophila* in the viable but nonculturable state after monochloramine treatment. *Current Microbiology*. 57, 497-502.
- Amann R.I., Ludwig W. en Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiology Reviews*. 59, 143-169
- Anoniem. (2007). NEN 6265 Water – Detectie en telling van *Legionella*.
- Armstrong, T.W. en Haas, C.N. (2007). A quantitative microbial risk assessment model for Legionnaires' disease: animal model selection and dose-response modeling. *Risk Analysis*, 27, 1581-1596.
- Armstrong, T.W. en Haas, C.N. (2008). Legionnaires' disease: evaluation of a quantitative microbial risk assessment model. *Journal of Water and Health*, 6, 149-166.
- Von Baum, H., Ewig, S., Marre, R., Suttorp, N., Gonschior, S., Welte, T., Lück, C. (2008) for the Competence Network for Community Acquired Pneumonia study Group. Community-acquired *Legionella* pneumonia: new insights from the German Competence Network for Community Acquired Pneumonia. *Clin. Infect. Dis.* 46: 1356-1364.
- Bencini, M.A., IJzerman, E.P., Bruin, J.P. en den Boer, J.W. (2005). Drie patiënten met *Legionella*-pneumonie, in verband gebracht met een sauna, een koeltoren en een caravan in Nederland. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 149, 1973-1977.
- Benkel, D.H., McFlure, E.M., Woolard, D., Rullan, J.V., Miller, G.B. Jr., Jenkins, S.R., Hershey, J.H., Benson, R.F., Pruckler, J.M., Brown, E.W., Kolczak, M.S., Hackler, R.L., Rouse, B.S. en Breiman, R.F. (2000). Outbreak of Legionnaires' disease associated with a display whirlpool spa. *International Journal of Epidemiology*, 29, 1092-1098.
- Bentham, R.H. (2000). Routine sampling and the control of *Legionella* spp. in cooling tower water systems. *Current Microbiology*. 41, 271-275.
- den Boer, J.W., Yzerman, E.P., Schellekens, J., Lettinga, K.D., Boshuizen, H.C., Van Steenberghe, J.E., Bosman, A., Van den Hof, S., Van Vliet, H.A., Peeters, M.F., Van Ketel, R.J., Speelman, P., Kool, J.L. en Conyn-Van Spaendonck, M.A. (2002). A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerging Infectious Diseases*. 8, 37-43.

- den Boer, J.W., Yzerman, E.P., Jansen, R., Bruin, J.P., Verhoef, L.P., Neve, G. en van der Zwaluw, K. (2007). Legionnaires' disease and gardening. *Clinical Microbiology and Infection*. 13, 88-91.
- den Boer, J.W., Bruin, J.P., Verhoef, L.P., Van der Zwaluw, K., Jansen, R. en Yzerman, E.P. (2008). Genotypic comparison of clinical *Legionella* isolates and patient-related environmental isolates in The Netherlands, 2002-2006. *Clinical Microbiology and Infection*. 14, 459-466.
- Boshuizen, H.C., Neppelenbroek, S.E., van Vliet, H., Schellekens, J.F., Boer, J.W., Peeters, M.F., en Spaendonck, M.A. (2001). Subclinical *Legionella* infection in workers near the source of a large outbreak of legionnaires disease. *Journal of Infectious Diseases*. 184, 515-518.
- Bouwknegt, M., Lodder, W.J., Schijven, J.F., Schalk, J.A.C. en de Roda Husman, A.M. (in preparation). Estimation of the inhalation exposure to *Legionella pneumophila* and risk of infection during showering.
- Bouwknegt, M., Schalk, J.A.C., de Roda Husman, A. (in preparation). A quantitative microbiological risk assessment model for estimation of *Legionella* infection risks due to showering in saunas.
- Byrd, J.J., Xu H.S., en Colwell R.R. (1991). Viable but Nonculturable Bacteria in Drinking Water. *Applied and Environmental Microbiology*. 57, 875-878.
- Byrne, B., en Swanson, M.S. (1998). Expression of *Legionella pneumophila* virulence traits in response to growth conditions. *Infection and Immunity*. 66, 3029-3034.
- Cianciotto, N.P. 2001. Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. *Int. J. Med. Microbiol.* 5: 331-343.
- Cirillo, J.D., Falkow, S. en Tompkins, L.S. (1994). Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii* enhances invasion. *Infection and Immunity*. 62, 3254-3261.
- Colwell, R.R. (2000). Viable but nonculturable bacteria: a survival strategy. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 6, 121-125.
- Delgado-Viscogliosi, P., Simonart, T., Parent, V., Marchand, G., Dobbelaere, M., Pierlot, E., Pierzo, V., Menard-Szczebara, F., Gaudard-Ferveur, E., Delabra, K. en Delattre, J.M. (2005). Rapid method for enumeration of viable *Legionella pneumophila* and other *Legionella* spp. in water. *Applied and Environmental Microbiology*. 71, 4086-4096.
- Diederén, B.M.W., de Jong, C.M.A., Aarts, I., Peeters, M.F. en van der Zee, A. (2007). Molecular evidence for the ubiquitous presence of *Legionella* species in dutch tap water installations. *Journal of Water & Health* 5, 375-383.
- Dijkstra, F., Gageldonk-Lafeber, A.B. van, Brandsema, P., Friesema, I.H.M., Robert-Du Ry van Beest Holle, M., Lubben, I.M. van der, Wilbrink, B., Meijer, A., Hoek, W. van der en Sande, M.A.B. van der (2008). Jaarrapportage respiratoire infectieziekten 2007/2008. RIVM briefrapport 210231003/2008.

- Doleans, A., Aurell, H., Reyrolle, M., Lina, G., Freney, J., Vandenesch, F., Etienne, J. en Jarraud, S. (2004). Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *Journal of Clinical Microbiology*. 42, 458-460.
- el Ebiary, M., Sarmiento, X., Torres, A., Nogu , S., Mesalles, E., Bodi, M. en Almirral, J. (1997). Prognostic factors of severe *Legionella* pneumonia requiring admission to ICU. *Am. J. resp. Critical Care Medicine*. 156, 1467-1472.
- England, A.C. 3rd, Fraser, D.W., Mallison, G.F., Mackel, D.C., Skaliy, P. en Gorman, G.W. (1982). Failure of *Legionella pneumophila* sensitivities to predict culture results from disinfectant-treated air-conditioning cooling towers. *Applied and Environmental Microbiology*. 43, 240-244.
- Euser, S.M., Brandsema, P., Ruijs, W.L.M., den Boer, J.W. (2009). Resultaten van de bronopsporings eenheid *Legionella*-pneumonie (BEL) 2007-2008. *Infectieziekten Bulletin*, 6, 192-194.
- Fang, H. en Pincus, S.H. (1995) Unique insertion sequence and pattern of CD4 expression in variants selected with immunotoxins from human immunodeficiency virus type 1-infected T cells. *Journal of Virology*. 69, 75-81.
- Feeley, J.C., Gorman, G.W., Weaver, R.E., Mackel, D.C. en Smith, H.W. (1978). Primary isolation media for Legionnaires' disease bacterium. *Journal of Clinical Microbiology*. 8, 320-325.
- Fields, B.S., Benson, R.F. en Besser, R.E. (2002). *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clinical Microbiology Reviews*. 15, 506-526.
- Fisman, D.N., Lim, S., Wellenius, G.A., Johnson, C., Britz, P., Gaskins, M., Maher, J., Mittleman, M.A., Spain, C.V., Haas, C.N. en Newbern, C. (2005). It's not the heat, it's the humidity: wet weather increases legionellosis risk in the greater Philadelphia metropolitan area. *Journal of Infectious Diseases*. 15, 2066-2073
- Gaia, V., Fry, N.K., Afshar, B., Luck, P.C., Meugnier, H., Etienne, J., Peduzzi, R. en Harrison, T.G. (2005). Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology*. 43, 2047-2052.
- Garcia-Fulgueiras, A., Navarro, C., Fenoll, D., Garcia, J., Gonzalez-Diego, P., Jimenez-Bunuales, T., Rodriguez, M., Lopez, R., Pacheco, F., Ruiz, J., Segovia, M., Balandron, B. en Pelaz, C. (2003). Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain. *Emerging Infectious Diseases*. 9, 915-921.
- Gezondheidsraad (2003). Bestrijding van *Legionella*. Den Haag: Gezondheidsraad, publicatie nr 2003/12.
- Hammer, B.K. en Swanson M.S. (1999). Co-ordination of *Legionella pneumophila* virulence with entry into stationary phase by ppGpp. *Molecular Microbiology*, 33, 721-731.

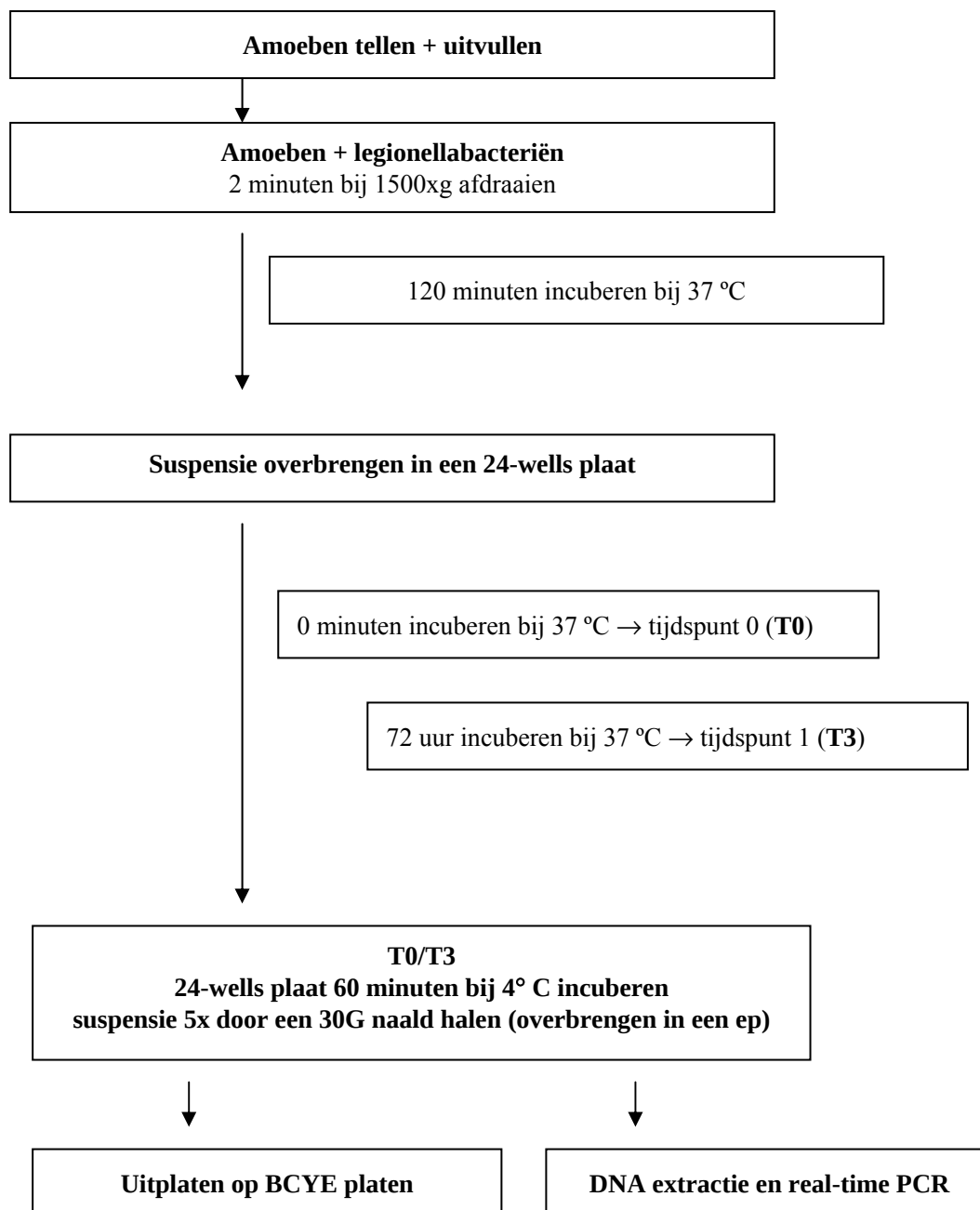
- Hicks, L.A., Rose, C.E. Jr, Fields, B.S., Drees, M.L., Engel, J.P., Jenkins, P.R., Rouse, B.S., Blythe, D., Khalifah, A.P., Feikin, D.R. en Whitney, C.G. (2007). Increased rainfall is associated with increased risk for legionellosis. *Epidemiology and Infection*. 135, 811-817.
- van den Hoek, J.A., IJzerman, E.P. en Coutinho, R.A. (2006). *Legionella*-uitbraak in Amsterdam: koeltoren als bron. *Nederlands Tijdschrift voor Geneeskunde*, 150, 1808-1811.
- Hussong, D., Colwell, R.R., O'Brien, M., Weiss, E., Pearson, A.D., Weiner, R.M. en Burge, W.D. (1987). Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media, *Bio/Technology* 5, 947-950.
- Karagiannis, I., Brandsema, P. en Van der Sande, M. (2008). Warm, wet weather associated with increased Legionnaires' disease incidence in The Netherlands. *Epidemiology and Infection*. 17, 1-7.
- van der Kooij, D., Veenendaal, H. en Scheffer, W. (2003). Kwantitatieve bepaling van *Legionella* in water: na 21 jaar nog in kinderschoenen ! *H₂O*, 4, 21-23.
- Koide, M., Arakaki, N. en Saito, A. (2001). Distribution of *Legionella longbeachae* and other legionellae in Japanese potting soils. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 7, 224-227.
- Konig, C., Hebestreit, H., Valenza, G., Abele-Horn, M. en Speer, C.P. (2005). *Legionella waltersii* – a novel cause of pneumonia? *Acta Paediatrica*, 94, 1505-1518.
- La Scola, B., Mezi, L., Weiller, P.J. en Raoult, D. (2001). Isolation of *Legionella anisa* using an amoebic coculture procedure. *Journal of Clinical Microbiology*. 39, 365-366.
- Lettinga, K.D., Verbon, A., Nieuwkerk, P.T., Jonkers, R.E., Gersons, B.P., Prins, J.M. en Speelman, P. (2002). Health-related quality of life and posttraumatic stress disorder among survivors of an outbreak of Legionnaires disease. *Clinical Infectious Diseases*. 35, 11-17.
- Lodder, W.J., Mooij, M., Schalk, J.A.C. en van der Aa, N.G.F.M. (2009). Verkennend onderzoek naar *Legionella* in Nederlands regenwater: Detectie met behulp van moleculaire technieken. Briefrapport 703719035.
- Molofsky, A.B. en Swanson, M.S. (2004). Differentiate to thrive: lessons from the *Legionella pneumophila* life cycle. *Molecular Microbiology*. 53, 29-40.
- Muder, R.R. en Yu, V.L. (2002). Infection due to *Legionella* species other than *L. pneumophila*. *Clinical Infectious Diseases*. 35, 990-998.
- Mulazimoglu L. en Yu VL. 2001. Can Legionnaires disease be diagnosed by clinical criteria? A critical review. *Chest*. 120, 1049-1053
- Nguyen, T.M., Illef, D., Jarraud, S., Rouil, L., Campese, C., Che, D., Haeghebaert, S., Ganiayre, F., Marcel, F., Etienne, J. en Desenclos, J.C. (2006). A community-wide outbreak of legionnaires disease linked to industrial cooling towers--how far can contaminated aerosols spread? *Journal of Infectious Diseases*. 193, 102-111.

- O'Connor, B.A., Carman, J., Eckert, K., Tucker, G., Givney, R. en Cameron, S. (2007). Does using potting mix make you sick? Results from a *Legionella longbeachae* case-control study in South Australia. *Epidemiology and Infection*. 135, 34-39.
- Pagnier, I., Raoult, D. en La Scola, B. (2008). Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure. *Environmental Microbiology*. 10, 1135-44.
- Ratzow, S., Gaia, V., Helbig, J.H., Fry, N.K. en Lück, P.C. (2007). Addition of neuA, the gene encoding N-acetylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 45, 1965-1968.
- Reynolds, K.A., Gerba, C.P. en Pepper, I.L. (1996). Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure. *Applied and Environmental Microbiology*. 62, 1424-1427.
- Ricketts, K.D., Yadav, R. en Joseph, C.A. (2008). Travel-associated Legionnaires' disease in Europe: 2006. *Eurosurveillance*. 13, 1-5.
- Rota, M.C., Pontrelli, G., Scaturro, M., Bella, A., Bellomo, A.R., Trinito, M.O., Salmaso, S. en Ricci, M.L. (2005). Legionnaires' disease outbreak in Rome, Italy. *Epidem Infect*. 133, 853-859.
- Rowbotham, T.J. (1980). Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. *Journal of Clinical Pathology*. 33, 1179-1183.
- Rowbotham, T.J. (1983). Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *Journal of Clinical Pathology*. 36, 978-986.
- Rowbotham, T.J. (1986). Current views on the relationships between amoebae, legionellae and man. *Israel journal of medical sciences*. 22, 678-689.
- Sabria, M., Alvarez, J., Dominguez, A., Pedrol, A., Sauca, G., Salleras, L., Lopez, A., Garcia-Nunez, M.A., Parron, I. en Barrufet, M.P. (2006). A community outbreak of Legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source. *Clinical Microbiology and Infection*. 12, 642-647.
- Sanden, G.N., Morrill, W.E., Fields, B.S., Breiman, R.F. en Barbaree, J.M. (1992). Incubation of water samples containing amoebae improves detection of Legionellae by the culture method. *Applied Environmental Microbiology*. 58: 2001-2004.
- Schalk, J.A.C., Lodder, W.J., Brandsema, P., Notermans, D.W. en de Roda Husman, A.M. (2009) Klinische diagnostiek van *Legionella*-pneumonie in Nederland. RIVM Rapport 703719040.
- Schets, F.M. en de Roda Husman, A.M. (2004) Gezondheidsaspecten van *Legionella* in water. RIVM rapport 330000004.

- Seno, M., Sakaki, M., Ogawa, H., Matsuda, H. en Takeda, Y. (2006). Effective proliferation of low level *Legionella pneumophila* serogroup 1 cells using coculture procedure with *Acanthamoeba castellanii*. *Journal of Microbiological Methods*. 66, 564-567.
- Steinert, M., Emödy, L., Amann, R. en Hacker, J. (1997). Resuscitation of viable but nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63, 2047-2053.
- Swanson, M.S. en Hammer, B.K. (2000). *Legionella pneumophila* pathogenesis: a fateful journey from amoebae to macrophages. *Annual Review of Microbiology*. 54:567-613.
- Van der zee, A., Verbakel, H., de Jong, C., Pot, R., Bergmans, A., Peeters, M. (2002). Novel PCR-probe assay for detection of and discrimination between *Legionella pneumophila* and other *Legionella* species in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. 40, 1124-1125.
- Veenendaal, H.R. en In 't Veld, S. (2005). Vergelijking isolatiemediën voor *Legionella*. *H2O*, 13, 33-35.
- Veenendaal, H.R. en van der Kooij, D. (2008). Validatie van een selectieve kweekmethode voor *Legionella pneumophila* met een vaste voedingsbodem. KWR 08.024.
- Versteegh, J.F.M., Brandsema, P.S., Lodder, W.J., de Roda Husman, A.M, Schalk, J.A.C. en van der Aa, N.G.F.M. (2009) Betekenis van *Legionella*-soorten voor preventiebeleid van leidingwaterinstallaties. Briefrapport 609715003.
- WHO. (2004). Guidelines for drinking water quality, 3rd ed. Vol. 1. Recommendations, Geneva, WHO.
- WHO. (2007). *Legionella* and the prevention of legionellosis.
- Wullings, B., Wubbels, G. en van der Kooij, D. (2005). Niet-kweekbare, nog niet beschreven *Legionella*-bacteriën algemeen aanwezig in drinkwater. *H2O* 25/26: 43-46.
- Wullings, B., Wubbels, G., Veenendaal, H. en van der Kooij, D. (2007). Snelle, kwantitatieve detectie van *Legionella pneumophila* met Q-PCR. *H2O* 5: 39-41.

Bijlage 1

Protocol – Legionella kweek-PCR – schematisch :



Protocol – Legionella kweek-PCR – gedetailleerd :

- **Amoeben**

De amoeben, *Acanthamoeba polyphaga* (ATCC nummer: 30461) werden gekweekt in PYG-medium (20 g/L Proteose peptone (Difco, Amsterdam, Nederland), 1 g/L yeast extract (Oxoid, Hampshire, UK), 4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Duitsland), 0,4 mM CaCl_2 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Duitsland), 0,05 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma-Aldrich), 2,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 2,5 mM KH_2PO_4 (Merck), 0,1 M Glucose (Sigma-Aldrich), 0,1 % (w/v) $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck). Amoeben werden in 75 of 162 cm² flessen (Corning Costar, Corning, NY) bij 25 °C opgekweekt. De cellen werden 1 maal per 2 weken in een verdunning van ongeveer 1:8 doorgezet in een nieuwe kweek.

- **Legionella-stammen**

Voor kweek en infectie experimenten zijn *L. pneumophila* serogroep 1 stam Philadelphia (ATCC nummer: 33152), *L. anisa* (ATCC nummer: 35292) en *L. longbeachae* (ATCC nummer: 33462) gebruikt. *L. pneumophila* serogroep 1 AFLP type 004 Lyon is verkregen via Streeklaboratorium Haarlem. De legionellabacteriën zijn ingevroren als glycerolsuspensies bij -80 °C.

- **Infectie experiment**

De dag voor infectie werd 20 ml vers PYG-medium toegevoegd om de amoeben zoveel mogelijk in de tropozoïte vorm te houden of weer in deze vorm te brengen. De kweekflessen met amoeben werden op de dag van het infectie experiment twee maal gewassen met AC-buffer (4 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 0,4 mM CaCl_2 (Sigma Aldrich), 0,75 mM $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Sigma Aldrich), 2,5 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Merck), 2,5 mM KH_2PO_4 (Merck) en 0,1 % (w/v) $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Merck)) om het kweekmedium volledig te verwijderen. Vervolgens werden de amoeben, door middel van tikken tegen de kweekfles, weer in suspensie gebracht. De concentratie van de amoeben-suspensie werd bepaald door de amoeben in een telkamer te tellen. De amoeben (1×10^6) werden in 1,5 ml eppen, in een eindvolume van 400 µl AC-buffer, uitgevuld. De amoeben werden met 100 µl van het eluaat (gespiked water werd gefiltreerd volgens de NEN6265) of legionellasuspensie geïnfecteerd, 2 minuten afgedraaid bij 1500xg en werden vervolgens 2 uur geïncubeerd bij 37 °C. Bij ieder experiment werd een positieve controle (legionella met amoeben) en een negatieve controle (amoeben zonder legionella) meegenomen. Na de incubatiestap werd de infectiesuspensie (met daarin amoeben en de intracellulaire legionellabacteriën) overbracht naar een 24-wells plaat (Corning Costar). T=0 samples werden vanaf hier opgewerkt. De T=3 platen werden 3 dagen bij 37°C geïncubeerd.

- **Bepaling van de mate van vermeerdering van de legionellabacteriën**

De 24-wells plaat werden één uur in de koelkast gezet, om de amoeben gemakkelijker stuk te maken. De vloeistof in elke well werd door een 30G naald 5 maal op en neer gehaald om de amoeben stuk te maken en de eventueel intracellulair aanwezige legionellabacteriën vrij te maken en om de suspensie te homogeniseren. Detectie van de legionellabacteriën vond plaats via kweek of real-time PCR:

- Detectie via kweek

Van de amoebe-legionella suspensie en 10-voudige verdunningen hiervan in AC-buffer werd 100µl uitgeplaat op BCYE-platen. Na 3 dagen incubatie bij 37°C werden de legionellakolonies geteld.

- Detectie via real-time PCR

Uit de amoebe-legionellasuspensie werd DNA gezuiverd. Hierbij werd 100 µl suspensie aan 500 µl NucliSens lysisbuffer (BioMérieux) en 50 µl magnetische silica oplossing (BioMérieux) toegevoegd. Met behulp van een NucliSense miniMAG apparaat (BioMérieux) werden de magnetische silica bolletjes gewassen. Het DNA werd uiteindelijk geëluëerd in een volume van 50 µl en in een real-time PCR assay geanalyseerd door middel van een *mip*-PCR specifiek voor *L. pneumophila* of een 16S PCR specifiek voor alle legionellasoorten. De *mip*-PCR, zoals deze op het RIVM ontwikkeld is, amplificeert een 150 bp gedeelte van het *mip*-gen. De primers die hierbij gebruikt worden zijn FP3 (5'-GCTGARTTYAATAARAAAGC-3') en RP5 (5'-GTRTCYGMTTTRCCKGGTTT-3'). De hoeveelheid van het geamplificeerde product wordt na voltooiing van elke PCR cyclus gedurende de hele PCR assay gemeten met behulp van de fluorescentie meting. Hierbij wordt gebruik gemaakt van de specifieke probe, (5'-CAATACAACAACGCCTGGCTTGTTT-3'). Met de 16S-PCR wordt een 132-bp gedeelte van het 16S rRNA gen geamplificeerd. De gebruikte primers zijn beschreven door van der Zee et al. (2002); LEG-1 5'-TACCTACCCTTGACATACAGTG-3' en LEG-2 5'-CTTCCTCCGGTTTGTCAC-3'. Er wordt gebruik gemaakt van de volgende probe: 5'-CCGTAACGAGCGCAA-3'. Bij de uitvoering van de PCR is gebruik gemaakt van een LightCycler 480 apparaat (Roche, Minheid, 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 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.

RIVM

Rijksinstituut
voor Volksgezondheid
en Milieu

Postbus 1
3720 BA Bilthoven
www.rivm.nl