



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

**Longitudinale studie naar de aanwezigheid  
van legionella en amoeben in  
drinkwaterinstallaties**

RIVM briefrapport 703719082/2011  
J.A.C. Schalk et al.



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

## **Longitudinale studie naar de aanwezigheid van legionella en amoeben in drinkwaterinstallaties**

RIVM Briefrapport 703719082/2011  
J.A.C. Schalk et al.

## Colofon

© RIVM 2011

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'.

J.A.C. Schalk, RIVM  
S. Redeker, Het Waterlaboratorium  
A.E. Docters van Leeuwen, RIVM  
W.J. Lodder, RIVM  
A.M. de Roda Husman, RIVM

Contact:

J.A.C. Schalk  
Laboratorium voor zoönosen en omgevingsmicrobiologie  
[marjolijn.schalk@rivm.nl](mailto:marjolijn.schalk@rivm.nl)

Dit onderzoek werd verricht in opdracht van Inspectie Leefomgeving en Transport, Programma Schoon en veilig water, in het kader van project M/703719 Monitoring en handhaving drinkwaterwet, toezicht drinkwater en legionella

## Dankwoord

Wij willen graag de eigenaars en beheerders van de drinkwaterinstallaties van de zorginstellingen die hebben deelgenomen aan deze studie en de medewerkers van betrokken adviesbureaus bedanken voor hun medewerking. Verder willen wij graag de medewerkers van Omegam Water bedanken voor de monsternamen.

## Rapport in het kort

### **Longitudinale studie naar de aanwezigheid van legionella en amoeben in drinkwaterinstallaties**

In Nederland wordt bij prioritaire instellingen met collectieve leidingwaterinstallaties, zoals ziekenhuizen en verzorgingstehuizen, twee keer per jaar gecontroleerd of legionella in de waterleidingen aanwezig is. De concentratie legionellabacteriën in het water moet wettelijk lager zijn dan 100 kolonievormende eenheden per liter. De eigenaren van dergelijke collectieve installaties zijn verplicht om maatregelen te nemen om legionella-infecties te voorkomen. Oudere mensen of mensen die verzwakt zijn, zijn namelijk gevoeliger om ziek te worden van een infectie met legionella.

Uit onderzoek van het RIVM blijkt dat de concentratie van legionellabacteriën in korte tijd sterk kan variëren, tot een factor 50. Beheerders van prioritaire collectieve drinkwaterinstallaties wordt daarom aanbevolen om eventuele maatregelen niet alleen op basis van de resultaten van een controle te nemen. Het is minstens zo belangrijk om ervoor te zorgen dat de drinkwaterinstallaties goed worden geïnstalleerd en onderhouden. Zo moeten temperaturen waarbij legionella goed kan groeien, worden voorkomen en mag het water in de leidingen niet te lang stilstaan. De studie is uitgevoerd in opdracht van de Inspectie voor Leefomgeving en Transport (ILT).

In het onderzoek zijn de koudwaterleidingen van drie drinkwaterinstallaties gedurende tien maanden onderzocht op legionella. Bij deze drinkwaterinstallaties is in het verleden meerdere malen legionella aangetroffen. Dit keer werden in de watermonsters twee soorten legionellabacteriën aangetroffen, de *Legionella anisa* of *Legionella gormanii*. De *Legionella pneumophila*, de legionellasoort die verantwoordelijk is voor het merendeel van de ziektegevallen in Nederland, is niet aangetroffen.

Trefwoorden:

Legionella, amoeben, *Legionella pneumophila*, *Legionella non-pneumophila*

## Abstract

### **Longitudinal study for the presence of *Legionella* and amoebae in tap water installations**

In the Netherlands, the collective drinking water installations of institutes such as hospitals and nursing homes, should be checked twice a year for the presence of *Legionella* bacteria. The *Legionella* concentration should be lower than 100 colony forming units (cfu) per litre. The owners of these collective drinking water installations are obliged to take measures for the prevention of *Legionella* infections. Elderly people or people who are weak or vulnerable are at risk of becoming ill if they are infected with *Legionella*.

In the current study, carried out by the RIVM, it was found that the concentration of *Legionella* bacteria in drinking water installations can vary over a short period by a factor of fifty. Owners of collective drinking water installations are therefore advised not to take measures that are based only on the results of the periodic controls. It is equally important to ensure the correct installation and maintenance of drinking water installations. For example, temperatures at which *Legionella* grows easily must be prevented and water in the pipes should not be stationary for too long. This study was commissioned by the Dutch Human Environment and Transport Inspectorate (ILT).

In the study, the cold water pipes of three drinking water installations were examined over a period of ten months for the presence of *Legionella*. This concerned water installations in which *Legionella* had been detected several times in the past. On examination, two species of *Legionella* were found in the water samples, *Legionella anisa* and *Legionella gormanii*. *Legionella pneumophila*, the *Legionella* species that is responsible for most of the cases of *Legionella* pneumonia in the Netherlands, was not found in this study.

Keywords:

*Legionella*, amoebae, *Legionella pneumophila*, *Legionella non-pneumophila*

## Inhoud

Dankwoord—3

Samenvatting—7

### **1 Inleiding—8**

### **2 Materiaal en methoden—11**

2.1 Monsternamen—11

2.2 Detectie van legionella volgens NEN6265—11

2.3 Vaststellen spreiding NEN6265—11

2.4 Detectie van legionella met de amoebekweek—11

2.5 Sequentie-analyse van legionellastammen—12

2.6 Determinatie amoeben—12

2.7 Tellen van amoeben—12

### **3 Resultaten—13**

3.1 Selectie locaties—13

3.2 Variatie in legionella-aantallen in de tijd—13

3.3 Isolatie van legionella met behulp van amoebekweek—16

3.4 Variatie in legionellasoorten in de tijd—17

3.5 Correlatie aanwezigheid legionella en amoeben in drinkwatermonsters—18

### **4 Discussie—21**

4.1 Variatie legionella-aantallen—21

4.2 Variatie legionellasoorten—21

4.3 Associatie legionella en amoeben—23

Literatuur—25

## Samenvatting

Onder gunstige omstandigheden kunnen legionellabacteriën in een drinkwaterinstallatie uitgroeien tot hoge aantallen. Om blootstelling aan legionellabacteriën te voorkomen is in het Drinkwaterbesluit uit 2011 (Staatsblad nummer 293, 2011) en de Regeling legionellapreventie (Staatscourant nummer 10828, 2011), opgenomen dat eigenaren van bepaalde, zogenaamde prioritaire, collectieve leidingwaterinstallaties aan legionellapreventie dienen te doen. Het gaat om installaties die worden gebruikt door mensen die een hogere kans hebben om na infectie ziek te worden van de legionellabacterie, bijvoorbeeld doordat ze een verminderd afweersysteem hebben. Bij deze installaties dient een risicoanalyse te worden uitgevoerd en, indien nodig, moeten beheersmaatregelen worden uitgevoerd, zoals regelmatig spoelen van de leidingen. Om te controleren of de beheersmaatregelen doeltreffend zijn, moeten twee maal per jaar watermonsters worden genomen en geanalyseerd op de aanwezigheid van legionellabacteriën. Dit dient te gebeuren volgens de NEN6265, een kweekmethode op BCYE-agarplaten. Het water moet minder dan 100 kolonievormende eenheden (kve) legionellabacteriën per liter bevatten. De vraag is echter of de halfjaarlijkse periodieke controles een duidelijk beeld geven van de legionellabesmetting van een installatie. Mogelijk kunnen de aantallen legionellabacteriën in een drinkwaterinstallatie in een korte tijd variëren en om dit te onderzoeken is een longitudinale studie uitgevoerd bij een drietal prioritaire collectieve leidingwaterinstallaties.

Drie prioritaire collectieve leidingwaterinstallaties werden geselecteerd die in het verleden meerdere malen een legionellabesmetting hadden gemeld aan Inspectie Leefomgeving en Transport (ILT, voorheen VROM-Inspectie), met een legionellasoort die niet tot de soort *Legionella pneumophila* behoorde. Deze locaties zijn in de tijd intensief bemonsterd. De monsters zijn geanalyseerd op legionella met behulp van de kweekmethode op BCYE-platen en tevens is de aanwezigheid van amoeben in de monsters bepaald. Amoeben zijn de natuurlijke gastheer van legionella. De gemeten variatie in legionella-aantallen bedroeg tot 1,7 log<sub>10</sub>-eenheden (factor vijftig) in twee weken tijd. Of bij een locatie een overschrijding (> 100 kve/L) wordt waargenomen en wat de hoogte van de overschrijding is, kan dus sterk afhangen van het moment van monsternamen.

De geïsoleerde legionellabacteriën behoorden tot de soort *L. anisa*. Bij één locatie werd *L. gormanii* aangetoond als werd gemeten met een alternatieve detectiemethode, de amoebekweekmethode. *L. pneumophila* werd niet aangetroffen. Mengsels van meerdere legionellasoorten in hetzelfde monster werden niet aangetroffen. *L. anisa* wordt als minder ziekteverwekkend beschouwd in vergelijking tot *L. pneumophila* die in Nederland verantwoordelijk wordt gehouden voor de meeste ziektegevallen. Echter, de aanwezigheid van andere legionellasoorten dan *L. pneumophila* (*Legionella non-pneumophila*) wordt tevens beschouwd als een indicatie dat er in de installatie omstandigheden zijn waaronder legionella kan groeien, ook de soort *L. pneumophila*. In de watermonsters werden meerdere malen amoebesoorten aangetoond waarvan bekend is dat legionella erin kan groeien. Er werd geen associatie gevonden tussen de legionella-aantallen en de aantallen amoeben.



## 1 Inleiding

Veteranenziekte is een ernstige vorm van longontsteking die kan ontstaan na inademing van aërosolen die besmet zijn met legionella. Deze aërosolen zijn afkomstig uit watersystemen waarin legionella zich heeft kunnen vermeerderen. Voorbeelden van dergelijke watersystemen zijn koeltorens (van den Hoek et al., 2006; Nguyen et al., 2006) en whirlpools (den Boer et al., 2002; Euser et al., 2010; Benkel et al., 2000), maar ook in drinkwaterinstallaties kan legionella groeien en ziektegevallen veroorzaken (Craun et al., 2010). Er zijn bepaalde omstandigheden die de groei van legionella bevorderen. Dit zijn bijvoorbeeld de aanwezigheid van bepaalde voedingsstoffen, de aanwezigheid van ijzer (corrosie), stilstaand water (bijvoorbeeld bij dode leidingen) en een temperatuur tussen de 25 en 45°C (WHO, 2007).

Om blootstelling aan legionellabacteriën te voorkomen is in het Drinkwaterbesluit uit 2011 (Staatsblad nummer 293, 2011) en de Regeling legionellapreventie (Staatscourant nummer 10828 2011), opgenomen dat eigenaren van bepaalde, zogenaamde prioritaire, collectieve leidingwaterinstallaties aan legionellapreventie dienen te doen. Het gaat om installaties die worden gebruikt door mensen die een hogere kans hebben om na infectie ziek te worden van de legionellabacterie, bijvoorbeeld doordat ze een verminderd afweersysteem hebben. Bij deze installaties dient een risicoanalyse te worden uitgevoerd en, indien nodig, moeten beheersmaatregelen worden uitgevoerd, zoals regelmatig spoelen. Om te controleren of de beheersmaatregelen doeltreffend zijn, moeten twee maal per jaar watermonsters worden genomen en geanalyseerd op de aanwezigheid van legionellabacteriën. Dit dient te gebeuren volgens de NEN6265, een kweekmethode op BCYE-agarplaten. In deze gestandaardiseerde procedure is vastgelegd hoe monsternamen en analyse van de monsters op legionella via een kweekmethode op BCYE-platen dient te gebeuren. Indien legionella wordt aangetroffen in een concentratie van 100 kolonievormende eenheden per liter (kve/L) of hoger dienen maatregelen genomen te worden om de legionellabacterie te bestrijden en de groei van legionella in de toekomst te voorkomen. Indien de besmetting hoger is dan 1000 kve/L dient dit te worden gemeld aan ILT.

Vermeerdering van legionella in de leidingen vindt plaats in protozoa (Lau en Ashbolt, 2009; Fields et al., 2002; Rowbotham, 1980). Dit zijn eencellige organismen die in het water kunnen voorkomen. Deze protozoa zijn onder andere te vinden in biofilms aan de binnenkant van waterleidingen. Een biofilm is een laag micro-organismen omgeven door slijm. Protozoa voeden zich met de bacteriën die voorkomen in de biofilm (Greub en Raoult, 2004). Echter, bepaalde intracellulaire bacteriën, zoals legionella, hebben mechanismen ontwikkeld om te overleven en zelfs te vermenigvuldigen in protozoa (Lau en Ashbolt, 2009). In studies is aangetoond dat in drinkwater legionella zich alleen kan vermeerderen in deze protozoa (Wadowsky et al., 1988). Er zijn twintig soorten amoeben, twee soorten ciliaten en een slijmzwam beschreven waarin legionella zich kan vermeerderen (zie tabel 1, Lau en Ashbolt, 2009). Doordat legionella in de protozoa beschermd is tegen biociden en hoge temperaturen (Lau en Ashbolt, 2009) kan een legionellabesmetting in een installatie lastig te verhelpen zijn.

Tabel 1 Protozoa, waarin legionella zich kan vermeerderen

Type
<b>Amoeben</b>
<i>Acanthamoeba castellani</i>
<i>Acanthamoeba culbertsoni</i>
<i>Acanthamoeba hatchetti</i>
<i>Acanthamoeba polyphaga</i>
<i>Acanthamoeba palestinensis</i>
<i>Acanthamoeba royreba</i>
<i>Amoeba proteus</i> strain × D
<i>Comandonia operculata</i>
<i>Echinamoeba exudans</i>
<i>Filamoeba nolandi</i>
<i>Hartmannella</i> spp.
<i>Hartmannella cantabrigiensis</i>
<i>Hartmannella vermiformis</i>
<i>Naegleri fowleri</i>
<i>Naegleri gruberi</i>
<i>Naegleri jadini</i>
<i>Naegleri lovaniensis</i>
<i>Paratetramitus jugosis</i>
<i>Vahlkampfia</i> spp.
<i>Vahlkampfia jugosa</i>
<i>Vahlkampfia ustiana</i>
<b>Ciliaten</b>
<i>Tetrahymena pyriformis</i>
<i>Tetrahymena thermophila</i>
<b>Slijmzwam</b>
<i>Dictyostelium discoideum</i>

Uit: Lau en Ashbolt, 2009

Niet alle legionellasoorten zijn even ziekmakend. *Legionella pneumophila*, is verantwoordelijk voor de meeste ziektegevallen in Nederland. Daarnaast zijn nog twintig legionellasoorten bekend die geassocieerd zijn met ziekte. Met de NEN6265 methode worden alle op BCYE-agar kweekbare legionellasoorten aangetoond, zowel de ziekmakende als de soorten die, voor zover bekend, geen ziekte veroorzaken. In het merendeel van de meldingen van legionella-overschrijdingen in een installatie, gaat het om een *Legionella non-pneumophila*, dat wil zeggen een legionellasoort die niet tot de soort *L. pneumophila* behoort (Versteegh et al., 2007). In een onderzoek waarbij drinkwatermonsters werden geanalyseerd met de NEN6265 methode werd de soort *L. anisa* het meest aangetroffen (van der Kooij et al., 2007). Het RIVM heeft geadviseerd om monsternamen te blijven richten op alle legionellasoorten en niet enkel op de meest ziekmakende soort *L. pneumophila* (Versteegh et al., 2009). Dit omdat de aanwezigheid van andere soorten dan *L. pneumophila* een indicatie kan vormen voor ontoereikende beheersmaatregelen voor een installatie en dus aangeeft dat groei van *L. pneumophila* mogelijk is. Er zijn echter zowel argumenten en onderzoeksresultaten aan te dragen die dit standpunt ondersteunen (Stout et al., 2007; van der Mee-Marquet et al., 2006) als bestrijden (Stout et al., 2007; van der Kooij et al., 2007).

In deze studie is gekeken of in installaties waarin *Legionella non-pneumophila* soorten zijn aangetroffen in de loop van de tijd ook *L. pneumophila* wordt aangetoond. Daarnaast is gekeken of een enkele monsternamen een goed beeld

geeft van de besmetting in een installatie door een installatie meerdere malen te bemonsteren in de tijd en te kijken in hoeverre de legionellaconcentratie varieert. Hiertoe zijn drie locaties geselecteerd en bemonsterd. Omdat legionella amoeben nodig heeft om te kunnen groeien is er ook gekeken of er een associatie is tussen de aanwezigheid van legionella en de aanwezigheid van amoeben.

## 2 Materiaal en methoden

### 2.1 Monstername

Op de geselecteerde locaties werden monsters genomen van de koudwaterleiding, zoals beschreven in de NEN6265:2007 (Water- Detectie en telling van Legionella). Hierbij werd eerst een liter van het kraanwater afgetapt en weggegooid. Vervolgens werd één monster van een halve liter genomen voor detectie van legionella en een monsters van vijf liter voor detectie van amoeben.

### 2.2 Detectie van legionella volgens NEN6265

Filtratie en analyse van de monsters werd uitgevoerd volgens NEN 6265: 2007. Hierbij werd een halve liter van het monster gefiltreerd over een 0,2µm polycarbonaat filter (Millipore, Billerica, MA, USA). Het filter werd vervolgens twee minuten gesoniceerd in vijf milliliter van het oorspronkelijke water. Het concentraat werd vervolgens uitgeplaat op tien BCYE-platen (Oxoid Ltd., Hampshire, UK), twee BCYE-platen met antibiotica (AB, Oxoid) en twee BCYE-platen zonder cysteïne (Oxoid), waarbij 100 µl per plaat werd uitgespateld. Platen werden vervolgens gedurende zeven dagen geïncubeerd bij 37°C en geïnspecteerd op de aanwezigheid van legionellakolonies. Verdachte legionellakolonies werden doorgestreken op BCYE-platen met en zonder cysteïne. Indien geen groei optrad op de platen zonder cysteïne en wel op de platen met cysteïne was dit een bevestiging dat het een legionellabacterie betrof. Identificatie van de legionellasoort werd uitgevoerd met behulp van sequentie-analyse zoals hieronder beschreven.

### 2.3 Vaststellen spreiding NEN6265

Om de spreiding van de NEN6265 methode vast te stellen werd een *L. pneumophila* Philadelphia stam opgekweekt in YEM-medium (Yeast extract 1% w/v) met legionella BCYE Growth supplement (Oxoid). Deze kweek werd vervolgens uitgevuld in porties en ingevroren bij -70°C. Per experiment werd een ampul ontdooid en tienvoudig doorverdund in Page's amoebal saline (PAS, Rowbotham, 1983). Van de 10<sup>-5</sup> en 10<sup>-6</sup> verdunningen werd een milliliter toegevoegd aan een halve liter steriel demiwater en dit werd vervolgens gefiltreerd en uitgeplaat zoals hierboven beschreven. Tevens werden de verdunningen van de ampul uitgeplaat op BCYE-platen om de oorspronkelijke concentratie aan legionellabacteriën in de ampul te bepalen. Na een week incubatie bij 37° werden legionellakolonies geteld op de platen en werd de oorspronkelijke legionellaconcentratie in het demiwater berekend. Dit werd zesmaal onafhankelijk herhaald. Van de zes metingen werd het gemiddelde van de log-getransformeerde waarden berekend en de bijbehorende standaarddeviatie.

### 2.4 Detectie van legionella met de amoebekweek

Naast de NEN6265 werden drinkwatermonsters tevens geanalyseerd op de aanwezigheid van legionella met behulp van de amoebekweekmethode zoals uitgebreid beschreven in Schalk et al. (2011). Bij de amoebekweek wordt 100 µl van het monster op amoeben gebracht. Legionellabacteriën zullen zich vermeerderen in de amoeben. De vermeerderde bacteriën kunnen vervolgens worden aangetoond door kweek op BCYE-platen. De amoebekweekmethode is

geen kwantitatieve methode en geeft alleen een resultaat over aan- of afwezigheid van levende legionellabacteriën.

## **2.5 Sequentie-analyse van legionellastammen**

Bevestigde legionellastammen werden nader geanalyseerd door middel van sequentie-analyse van een deel van het *mip*-gen (Schalk et al., 2011).

## **2.6 Determinatie amoeben**

Ten behoeve van de determinatie van amoeben volgens Redeker (2009) werd 1 liter monster in duplo steriel over een cellulose nitraat filter van 0,45 µm (Sartorius, Goettingen) gefiltreerd met een zuigkracht niet lager dan -0,3 Bar. De trechter werd nagespoeld met steriel kraanwater en er werd gefiltreerd tot er op het filter nog net een filmpje vocht was waar te nemen. Het filter werd met het ruitpatroon naar beneden, overgedaan in een potje (container 125 ml, PP, Ø74 mm, Boom BV, Meppel) waaraan drie tot vijf gesteriliseerde rijstkorrels in circa tien tot twaalf milliliter oorspronkelijk water waren toegevoegd. Het deksel werd na dichtdraaien één slag opengedraaid. Bij elke serie werd een blanco controle monster ingezet. Deze blanco bestond uit een potje gevuld met tien tot twaalf milliliter steriel kraanwater en drie tot vijf gesteriliseerde rijstkorrels. De monsters en blanco controle monsters werden in het donker geïncubeerd bij 20°C en eventueel bij 44 °C. Het vloeistofniveau van de kweken werd regelmatig aangevuld met gesteriliseerd leidingwater. Na een tot twee weken kweken werd er een microscopisch cuvet gemaakt door met een pipet circa anderhalve milliliter monster (uit de kweken en de blanco) steriel uit de petrischaal over te brengen in een cuvet volgens van Heusden (1972). Het cuvet werd onderzocht met een omkeermicroscop (IX71 Olympus, Zoeterwoude) bij 600 maal vergroting en differentieel interferentie contrast (DIC). De amoebesoornten werden gedetermineerd en vastgelegd met behulp van microscopische fotografie. De kweken werden op deze wijze frequent (wekelijks) onderzocht totdat schimmelgroei de aangroei van nieuwe biofilm verhinderde.

## **2.7 Tellen van amoeben**

Ten behoeve van het tellen van amoeben werd 1 tot 2,5 liter monster direct gefixeerd met enkele druppels lugol (lugoloplossing voor fytoplanktonanalyse Boom BV), bezonken en afgeheveld. Dit monster werd microscopisch onderzocht bij 600 maal vergroting met DIC. De amoeben en cysten werden geteld en het aantal amoeben en cysten per liter werd vastgesteld (van Heusden, 1972). De onderste analysegrens is afhankelijk van het aantal getelde banen onder de microscoop en het volume van het monster.

## 3 Resultaten

### 3.1 Selectie locaties

Met behulp van de Holmes database van ILT werden twee locaties geselecteerd waar in het verleden meerdere malen een melding was gedaan van het aantreffen van *Legionella non-pneumophila*. De historie van legionella-meldingen in 2008 en 2009 voor deze locaties is weergegeven in onderstaande tabel. Een derde locatie werd geselecteerd via de GGD. Deze locatie was gekoppeld aan een legionellosepatiënt. De patiënt had hoogstwaarschijnlijk legionellose opgelopen bij reinigingswerkzaamheden van de leidingen bij het plaatsen van een nieuwe boiler. Bij een bezoek van BEL (bronopsporingseenheid legionella) aan deze locatie werd *Legionella non-pneumophila* aangetroffen. Locatie vier betreft een nieuwbouwlocatie waar bij een periodieke controle éénmaal legionella werd aangetroffen. Deze locatie is tijdens het onderzoek toegevoegd en slechts een aantal malen bemonsterd. Alle vier de locaties zijn zorgwoningen waar geestelijk gehandicapten verblijven.

Tabel 2 Legionellameldingen van locatie 1 en 2 in 2008 en 2009

Locatie 1		Locatie 2	
25/4/08	100 kve/L	17/11/08	1100 kve/L
31/10/08	7500 kve/L	13/1/09	< 100 kve/L
26/5/09	10900 kve/L	28/5/09	5500 kve/L
21/7/09	1200 kve/L		
23/9/09	<125 kve/L		

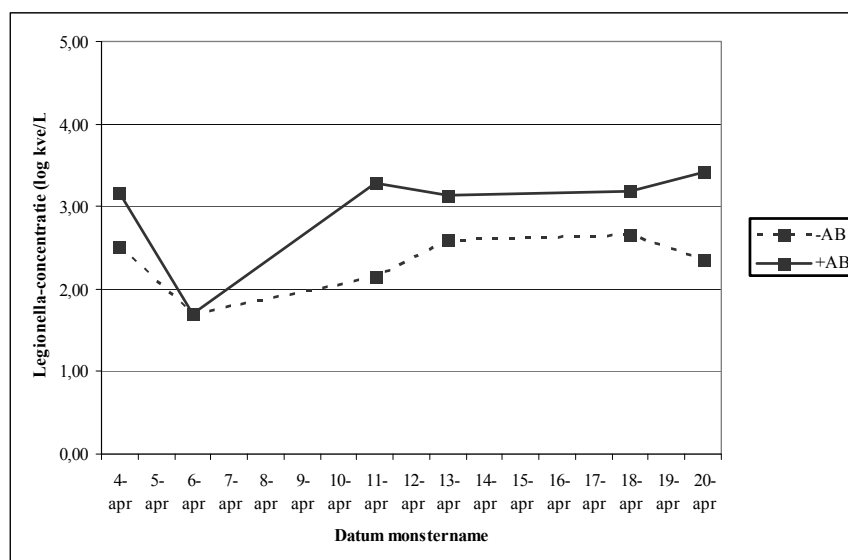
### 3.2 Variatie in legionella-aantallen in de tijd

Op de locaties een tot en met drie zijn tien monsternames uitgevoerd in de tijd: eenmaal in oktober en november 2010, zes maal in april 2011 en nog eenmaal in juli en augustus 2011. Op locatie vier is in april 2011 driemaal een monstername uitgevoerd. Detectie van legionella in deze monsters is uitgevoerd zoals beschreven in paragraaf 2.2. Hierbij werd monster uitgeplaat op zowel BCYE-platen zonder antibiotica (-AB, tien platen), en op BCYE-platen met antibiotica (+AB, twee platen). De theoretische detectielimiet van de methode hangt af van het totaalvolume aan onderzocht water. De detectielimiet bedraagt 10 kve/L voor de -AB platen (waarbij in totaal 100 milliliter van het oorspronkelijke water is onderzocht op tien platen) en 50 kve/L voor de +AB platen (waarbij in totaal twintig milliliter water is onderzocht op twee platen). Resultaten van de metingen zijn weergegeven in onderstaande tabel. De metingen in oktober en december 2010 en juli en augustus 2011 waren voor alle locaties negatief en zijn niet weergegeven in de tabel. In figuur 1 en 2 zijn de legionella-aantallen bij de locaties twee en drie gedurende drie weken in april weergegeven.

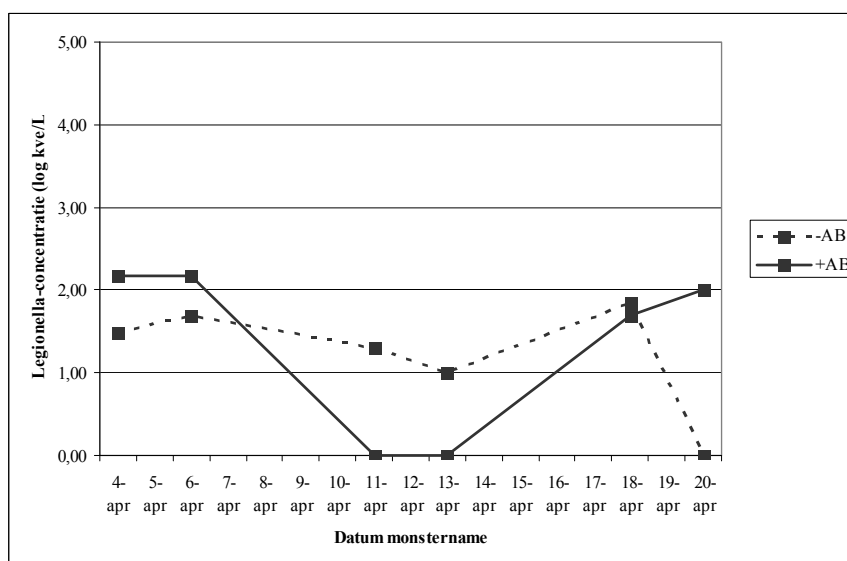
Tabel 3 Legionellaconcentraties in drinkwaterinstallaties in de tijd (kve/L)

Locatie	+/- AB	4 April	6 April	11 April	13 April	18 April	20 April
1	-	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	+	<50	<50	<50	<50	50	50
2	-	320	50	140	390	450	230
	+	1500	50	1900	1350	1550	2600
3	-	30	50	20	10	70	<10
	+	150	150	<50	<50	50	100
4	-	nd	<10	<10	<10	nd	nd
	+	nd	<50	<50	<50	nd	nd

nd = niet uitgevoerd



Figuur 1 Variatie in legionella-aantallen binnen 3 weken bij locatie 2



Figuur 2 Variatie in legionella-aantallen binnen 3 weken bij locatie 3

De analyseresultaten afkomstig van de +AB platen waren in de meeste gevallen hoger dan de analyseresultaten afkomstig van –AB platen. Bij sommige monsters werd alleen bij de +AB platen legionella aangetroffen. Bij locatie een werd alleen legionella aangetoond bij de analyse op BCYE-platen met antibiotica, op 18 en 20 april. De variatie in legionella-aantallen gedurende de drie bemonsteringsweken in april was voor deze locatie van < 50 kve/L (nul kolonies geteld) tot 50 kve/L (een kolonie geteld). De legionellaconcentratie ligt voor deze locatie dus net rond de detectielimiet van de methode. Voor locatie twee varieerden de legionella-aantallen van 50 kve/L (1 kolonie geteld) tot 2600 kve/L (52 kolonies geteld) in een periode van twee weken. Voor locatie drie varieerden de legionella-aantallen van <50 kve/L (0 kolonies geteld) tot 150 kve/L (3 kolonies geteld). Ook voor deze locatie geldt dat de legionellaconcentratie net rond de detectielimiet lag.

Om te bepalen of de verschillen in legionellaconcentratie tussen verschillende monsternamen data werd veroorzaakt door de spreiding van de analysemethode, werd de spreiding bepaald voor twee besmettingsniveaus van 7600 kve/L ( $3,9 \log_{10}$ ) en 760 kve/L ( $2,9 \log_{10}$ ) zoals beschreven in §2.3 voor zowel uitplaten op tien –AB platen als het uitplaten op twee +AB platen. De spreiding van de methode en van de gemeten legionellaconcentraties in april 2011 bij locatie twee en drie is weergegeven in tabel 4. De spreiding in de gemeten legionellaconcentraties op de zes monsternamedata is groter dan de spreiding van de methode.

Uit tabel 4 blijkt verder dat voor de demiwater monsters waaraan legionella is toegevoegd de spreiding van de methode bij uitplaten tien –AB platen vergelijkbaar is als bij uitplaten op twee +AB-platen. Wel liggen de aantallen die worden gevonden op de +AB platen iets lager doordat de antibiotica in de platen de groei van legionella iets remmen. De spreiding is het hoogst voor het laagste besmettingsniveau. Verder blijkt uit tabel 4 dat de legionellaconcentratie die gemeten wordt, altijd lager is dan wat er in het monster is gestopt. Dit komt doordat tijdens de filtratiestap verlies optreedt van bacteriën en/of doordat bacteriën de methode niet overleven. De opbrengst van de methode is circa 58%.



Tabel 4 Spreiding van de NEN6265 methode voor twee besmettingsniveaus en spreiding in legionellaconcentratie voor locatie twee en drie.

Besmettings niveau kve/L (log <sub>10</sub> )	Gemiddelde	SD	Gemiddelde	SD
	log <sub>10</sub> kve/L	log <sub>10</sub> kve/L	kve/L	log <sub>10</sub> kve/L
	<b>-AB</b>		<b>+AB</b>	
760 (2,9)	2,68	0,18	2,62	0,17
7600 (3,9)	3,70	0,10	3,59	0,08
Locatie 2	2,33	0,36	2,98	0,64
Locatie 3	1,22	0,67	1,34	1,05

SD = standaarddeviatie

### 3.3 Isolatie van legionella met behulp van amoebekweek

In het kader van een ander onderzoek is een nieuwe detectiemethode voor legionella, de amoebekweekmethode, vergeleken met de NEN6265 methode. Hiertoe zijn ook een aantal monsters uit deze studie getest met beide detectiemethoden (Schalk et al., 2011). De amoebekweekmethode is geen kwantitatieve methode en er kan dus alleen uitspraak worden gedaan over aan- of afwezigheid van legionella in een monster. Van de achttien geteste monsters waren zes monsters met beide methoden positief, vijf monsters met beide methoden negatief, vier monsters negatief met de NEN6265 methode en positief met de amoebekweek en drie monsters positief met de NEN6265 methode en negatief met de amoebekweek (zie tabel 5 en Schalk et al., 2011).

Tabel 5 Vergelijking legionella detectie met NEN6265 en amoebekweek

Locatie	Datum monstername	NEN 6265	Amoebekweek
		Kve/L	positief/negatief
1	6-4-11	< 10	neg
	11-4-11	< 10	neg
	13-4-11	< 10	neg
	18-4-11	50	neg
	8-8-11	< 10	neg
2	6-4-11	50	pos
	11-4-11	1900	pos
	13-4-11	1350	pos
	18-4-11	1550	pos
	8-8-11	< 10	pos
3	6-4-11	150	pos
	11-4-11	20	neg
	13-4-11	10	pos
	18-4-11	70	neg
	8-8-11	< 10	neg
4	6-4-11	< 10	pos
	11-4-11	< 10	pos
	13-4-11	< 10	pos

Bij de vier monsters die met de NEN6265 methode negatief waren en met de amoebekweek positief was met de NEN6265 methode veel bijgroei op de platen aanwezig, waardoor de groei van legionella op plaat waarschijnlijk onderdrukt

werd. Dit betrof alle drie de monsters van locatie vier en een monster van locatie twee.

### 3.4 Variatie in legionellasoorten in de tijd

Van legionellastammen geïsoleerd met de NEN6265 methode en de amoebekweekmethode is een deel van het *mip*-gen na amplificatie geanalyseerd met behulp van sequentie-analyse zoals beschreven in paragraaf 2.5. Door vergelijking van de sequenties met sequenties uit databases kon worden vastgesteld welke legionellasoorten het betrof. In tabel 6 is voor elke locatie aangegeven hoeveel kolonies konden worden geteld met de NEN6265 methode en hoeveel daarvan zijn getypeerd met behulp van sequentie-analyse en wat de resultaten hiervan waren. Tevens zijn de typeringsresultaten voor de kolonies die werden geïsoleerd met de amoebekweekmethode weergegeven.

Tabel 6 Variatie in legionellasoorten in de tijd bij isolatie met NEN6265 en amoebekweek

Loc.	Dat.	NEN6265				Amoebekweek	
		# kol. -AB	# kol. +AB	# kol. analyse	L. spp	# kol. analyse	L. spp
Loc. 1	18/4	0	1	1/1	<i>L. anisa</i>		
	20/4	0	1	1/1	<i>L. anisa</i>		
Loc. 2	4/4	32	30	25/62	<i>L. anisa</i>		
	6/4	5	1	5/6	<i>L. anisa</i>	10	<i>L. anisa</i>
	11/4	14	38	25/52	<i>L. anisa</i>	10	<i>L. anisa</i>
	13/4	39	27	19/66	<i>L. anisa</i>	10	<i>L. anisa</i>
	18/4	45	31	10/76	<i>L. anisa</i>	10	<i>L. anisa</i>
	20/4	23	52	10/75	<i>L. anisa</i>		
Loc. 3	8/8					9	<i>L. anisa</i>
	4/4	3	3	2/6	<i>L. anisa</i>		
	6/4	5	3	8/8	<i>L. anisa</i>	10	<i>L. anisa</i>
	11/4	2	0	2/2	<i>L. anisa</i>		
	13/4	1	0	1/1	<i>L. anisa</i>	10	<i>L. anisa</i>
	18/4	7	1	8/8	<i>L. anisa</i>		
Loc. 4	20/4	0	2	2/2	<i>L. anisa</i>		
	6/4					5	<i>L. gormanii</i>
	11/4					5	<i>L. gormanii</i>
	13/4					5	<i>L. gormanii</i>

Loc. = Locatie

Dat. = Datum in 2011

# kol. -AB = aantal kolonies geteld op -AB platen

# kol. +AB = aantal kolonies geteld op +AB platen

# kol. analyse = aantal kolonies geanalyseerd door sequentie-analyse

L. spp = legionellasoort

Bij locatie een, twee en drie werden met beide methoden alleen *L. anisa* bacteriën geïsoleerd. Bij locatie vier werd alleen met de amoebekweek legionella aangetroffen. Dit betrof *L. gormanii*. Er zijn geen mengsels van legionellasoorten aangetroffen in de drinkwatermonsters en er is geen *L. pneumophila* aangetroffen.

### 3.5 Correlatie aanwezigheid legionella en amoeben in drinkwatermonsters

Op vijf van de tien bemonsteringsdata zijn extra monsters genomen voor analyse op de aanwezigheid van amoeben. Hiertoe werden amoeben gekweekt uit de monsters en nader gedetermineerd. In tabel 8 is een voorbeeld van het verloop van een kweek ten behoeve van detectie van amoeben weergegeven. De aangetroffen schimmelsporen zijn in de tabel opgenomen omdat ze een cruciale rol in de groeipotentie van de bacteriën en daaraan gekoppeld de amoeben spelen. Als eenmaal schimmelsporen in de kweek verschijnen is detectie van amoeben niet meer mogelijk. In de kweken komen niet nader gedetermineerde zoöflagellaten voor. Deze zijn opgenomen omdat bepaalde amoeben zoals Naegleria een flagellaat stadium kennen. In de kweken bij 44 °C is bacteriegroei waargenomen maar er zijn geen flagellaten, amoeben of cysten van amoeben aangetroffen. Voorbeelden van amoeben die zijn aangetroffen in de monsters staan weergegeven in Figuur 4. In tabel 9 is aangegeven hoeveel amoeben en cysten werden geteld in de monsters en welke amoebesoorten er werden gedetermineerd. Ter vergelijking zijn in de tabel de resultaten voor de legionellabemonsteringen op de desbetreffende data weergegeven. Resultaten voor de aantallen amoeben en aantallen legionella zijn tevens grafisch weergegeven in Figuur 3. Bij slechts twee van de vijftien monsters die zijn geanalyseerd op amoeben is ook legionella aangetroffen. In deze monsters was het aantal amoeben niet hoger of lager dan in de monsters die negatief waren voor legionella. Er is dus geen relatie gevonden tussen de aantallen amoeben en aantallen legionella. Ook was de variatie aan amoeben in deze monsters niet afwijkend ten opzichte van de monsters waarin geen legionella werd aangetroffen.

*Tabel 8 Voorbeeld van het verloop van een amoebenkweek bij 20 °C*

<b>Locatie 2 4/7</b>	<b>Kweekleeftijd in dagen</b>						
Leeftijd	9	15	23	31	37	80	114
Mayorella	+	+	+	+			
Platyamoeba	+						
Hartmannella						+	
Zoöflagellaten	+	+	+				+
schimmelsporen				+	+	+	+

+ = aangetroffen in de kweek

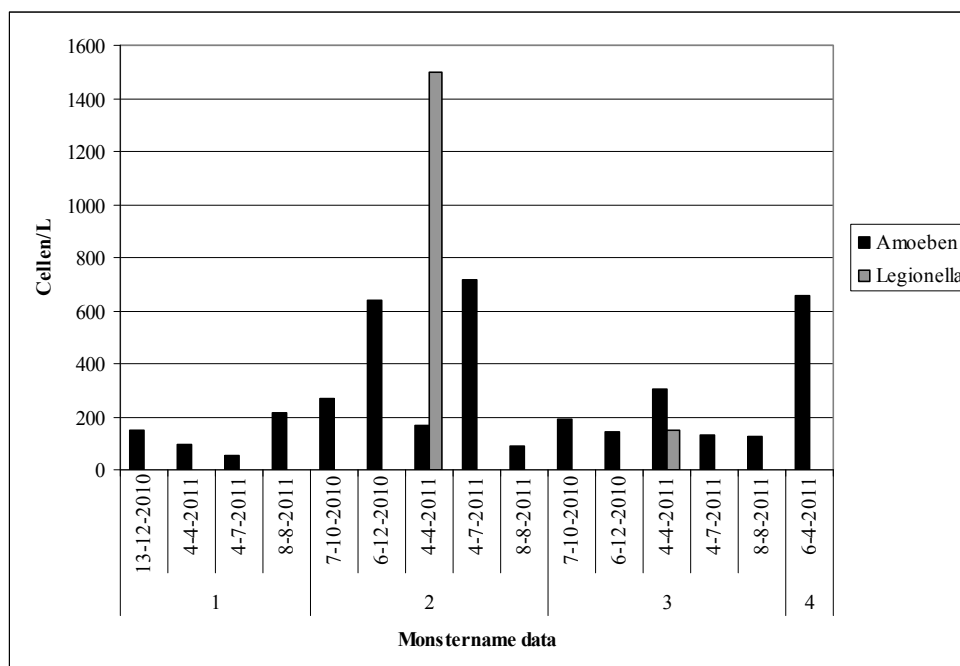
Tabel 9 Aanwezigheid legionella en amoeben of cysten van amoeben in drinkwatermonsters

Locatie	Datum	Legionella KVE/L	Cysten Cells/L	Amoeben Cells/L	Totaal Cells/L	Amoebesoorten
1	13/12	< 10	148	0	148	H, P
	4/4	< 10	71	24	95	H, P, N, Ve
	4/7	< 10	56	0	56	N, P
	8/8	< 10	100	113	213	Ve
2	7/10	< 10	103	165	268	H, P, M, Va
	6/12	< 10	509	130	639	H, P, N, M, Ve
	4/4	1500	24	141	165	H, P, Va, Ve
	4/7	< 10	282	433	715	M, P
	8/8	< 10	50	38	88	H, M, Ve
3	7/10	< 10	129	65	194	-
	6/12	< 10	0	146	146	H, Ve
	4/4	150	47	259	306	H, P, Ve
	4/7	< 10	38	94	132	N, P
	8/8	< 10	63	63	126	P
4	8/4	< 10	63	596	659	H, P

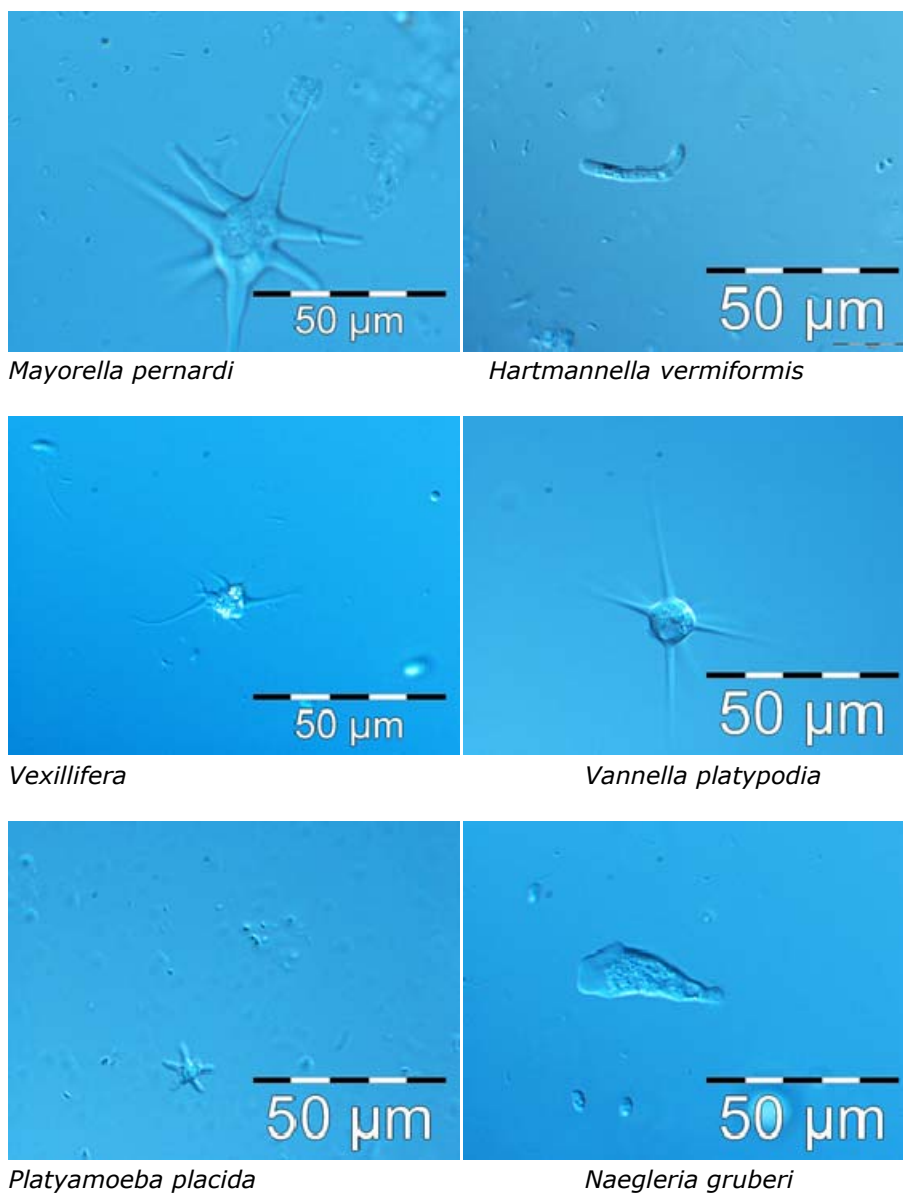
H= *Hartmannella vermiformis*\*, P= *Platyamoeba placida*\*, N=*Naegleria gruberi*\*, M=*Mayorella penardi*, Va=*Vannella platypodia*\*, Ve=*Vexillifera*\*

- = geen amoeben gevonden na kweken bij 20 °C

\*= Deze amoebe wordt in de literatuur als gastheer voor legionella genoemd



Figuur 3 Correlatie aanwezigheid legionella en amoeben in drinkwatermonsters voor locatie 1 tot en met 4.



Figuur 4 Amoeben, aangetroffen in drinkwatermonsters

## 4 Discussie

### 4.1 Variatie legionella-aantallen

Vier locaties zijn in de periode november 2010 tot september 2011 meerdere malen bemonsterd en geanalyseerd op de aanwezigheid van legionella, waarbij gedurende de maand april de locaties intensief zijn bemonsterd. In deze maand werd bij alle bemonsterde locaties legionella aangetroffen. De spreiding in de gemeten legionellaconcentraties in april 2011 bij locatie twee en drie was groter dan de spreiding van de methode. De schommelingen in de legionellaconcentraties geven dus een reële schommeling in legionella-aantallen in de installatie weer en worden niet veroorzaakt door de spreiding van de methode. De verschillen kunnen worden veroorzaakt door groei van de legionellabacterie in de installatie, maar kunnen ook veroorzaakt worden door het moment van de monsternamen in relatie tot gebruik van het tappunt. Als het tappunt vlak voor monsternamen intensief is gebruikt, zal de gemeten concentratie waarschijnlijk afwijken ten opzichte van een monsternamen op een moment dat het tappunt al enkele dagen niet gebruikt is geweest. Vanwege deze fluctuatie in legionella-aantallen kan een tappunt door het gekozen moment van monsternamen wel of niet onder de wettelijke norm van 100 kve/L vallen. Een halfjaarlijkse legionellacontrole geeft dus geen goed beeld van de aanwezigheid van legionella in een installatie. Bij het nemen van beslissingen over de te nemen beheersmaatregelen is het dus belangrijk om niet slechts de analyseresultaten te gebruiken als leidraad, maar ook de resultaten van de risicoanalyse te beschouwen. Verder blijkt dat ondanks maatregelen de legionellabesmetting in de onderzochte installaties steeds weer terugkeert.

De detectielimiet van de NEN6265 methode hangt af van het volume van het monster water dat gefiltreerd is en van de hoeveelheid van dit filtraat wat geanalyseerd is op BCYE-platen. Gebruikelijk is om een halve liter te filtreren en de bacteriën van het filter op te nemen in vijf milliliter van het oorspronkelijke water. Hiervan wordt vervolgens twee maal 100 µl uitgeplaat. De theoretische detectielimiet van de methode bedraagt dan vijftig kve/L. Omdat in de hier gebruikte procedure totaal een milliliter van het concentraat is geanalyseerd op tien -AB platen en 200 µl van het concentraat op twee +AB platen betrof de detectielimiet van de methode respectievelijk tien kve/L en vijftig kve/L voor de -AB en +AB platen. Ondanks de hogere detectielimiet voor de +AB platen werden met deze platen toch vaker monsters positief bevonden. Ook werden met de +AB platen meestal meer legionellakolonies geteld. Dit kwam waarschijnlijk doordat de antibiotica in de platen de groei van andere bacteriën onderdrukte wat de detectie van legionella verbeterde ten opzichte van de -AB platen. In een aantal monsters werd met de -AB en +AB platen volgens de NEN6265 methode een negatief resultaat verkregen, waarbij met de amoebekweek wel legionella werd geïsoleerd. Dit waren monsters waarin veel groei van andere bacteriën op de platen te zien was. Door de aanwezigheid van andere, storende bacteriën kunnen monsters geanalyseerd met de NEN6265 methode dus ten onrechte negatief worden bevonden voor legionella.

### 4.2 Variatie legionellasoorten

De legionellasoorten die bij locatie een, twee en drie werden aangetroffen in april 2011 betrof in alle gevallen *L. anisa*, ongeacht de gebruikte analysemethode. Er werden geen mengsels van legionellasoorten aangetroffen en geen *L. pneumophila*. Bij locatie vier werd op alle drie de bemonsteringsdata

*L. gormanii* aangetroffen. *L. anisa* en *L. gormanii* zijn beide legionellasoorten die geassocieerd zijn met ziekte (WHO, 2007). In Nederland worden deze soorten niet vaak geïsoleerd bij patiënten. Van de gemelde legionellosepatiënten in Nederland met een positieve kweek (N=320) in de periode 2006-2010 betrof het éénmaal een *L. anisa*. *L. gormanii* werd in deze periode niet aangetroffen bij een patiënt (Brandsema et al., 2011; Dijkstra et al., 2009).

Omdat in november en december 2010 en juli en augustus 2011 geen legionella werd aangetroffen, kan geen uitspraak worden gedaan over variatie in legionellasoorten op langere termijn. Alleen op locatie twee werd in augustus met de amoebekweekmethode ook *L. anisa* aangetroffen. Het verdient aanbeveling om de onderzochte locaties ook in de toekomst te onderzoeken op legionella om te kijken of dezelfde legionellasoorten persisteren in het systeem en of groei van *L. pneumophila* voorkomt in deze installaties. Omdat in deze studie alleen de koudwaterleidingen zijn onderzocht, verdient het aanbeveling om in vervolgstudies ook de warmwaterleidingen te bemonsteren.

Uit een Duitse studie waarbij de legionella-isolaten die gedurende tien jaar werden geïsoleerd vanuit drinkwaterinstallaties in ziekenhuizen zijn getypeerd, bleek dat in iedere installatie slechts een tot vier typen *L. pneumophila* predominant voorkwamen in elk drinkwatersysteem, zelfs na het toepassen van thermische desinfectie (Oberdorfer et al., 2008). Hoe ouder de installatie hoe meer typen er werden aangetroffen in het drinkwater. Indien een *L. pneumophila* stam aanwezig is, is deze moeilijk te verwijderen uit het systeem. Dit blijkt ook uit een studie in de Verenigde Staten waar eenzelfde legionellastam gedurende acht jaar persisteerde in een hotel en in deze periode verschillende ziektegevallen veroorzaakte (Silk et al., 2011). De aanwezigheid van het ene type sluit de aanwezigheid van het andere type niet uit, maar de hoeveelheid verschillende typen *L. pneumophila* die werden gevonden in de installaties was beperkt. Ook in andere studies is beschreven dat meerdere legionellasoorten gelijktijdig kunnen voorkomen. Zo wordt in een studie onder twintig ziekenhuizen in de Verenigde Staten beschreven dat in negen ziekenhuizen mengsels van *L. anisa* en *L. pneumophila* of van verschillende serogroepen van *L. pneumophila* voorkomen (Stout et al., 2007). Het is echter opvallend dat ook in deze studies maar enkele legionellasoorten worden aangetroffen. In een Italiaanse studie (Napoli et al., 2009) waarin drinkwater intensief werd onderzocht op het voorkomen van legionella werd voornamelijk *L. pneumophila*, *L. micdadei* en *L. bozemanii* aangetroffen. In een Zwitserse studie waarbij ook amoebekweek werd gebruikt gevolgd door kweek op BCYE-platen voor detectie van legionella werden elf van de tweehonderd drinkwatermonsters positief bevonden (Thomas et al., 2006). In negen monsters werd *L. anisa* geïsoleerd en in twee monsters *L. pneumophila*. In een andere Nederlandse studie waar 11541 (drink)watermonsters werden onderzocht waren 18,5% van de monsters positief (van der Kooij et al., 2007). Van de positieve monsters betrof het in 16% van de monsters *L. pneumophila*, 72% *L. anisa* en 11% andere legionellasoorten. De andere legionellasoorten dan *L. anisa* en *L. pneumophila* werden aangetroffen in koelwatermonsters. De variëteit in legionellasoorten die in drinkwaterinstallaties wordt gevonden lijkt dus beperkt. Het verdient aanbeveling om nader onderzoek te doen naar de legionellasoorten die drinkwaterinstallaties koloniseren met verschillende methoden. Indien blijkt dat slechts een beperkt aantal kweekbare legionellasoorten voorkomt in drinkwaterinstallaties is het mogelijk om detectie te beperken tot deze dominante legionellasoorten. Dit zou de introductie van snellere testen mogelijk maken, die mogelijk minder last hebben van de storende effecten van andere bacteriën.

### 4.3 Associatie legionella en amoeben

In deze studie werden bij alle vier de bemonsterde locaties en bij alle bemonsteringen amoeben aangetroffen waarvan bekend is dat ze een gastheer kunnen zijn voor legionella. Ook werd bij alle vier de locaties legionella aangetroffen op minstens één van de monsternamen data. Er werd geen associatie gevonden tussen de aantallen amoeben en legionellaconcentratie in de monsters. In een andere studie is wel een associatie gevonden tussen de aanwezigheid van amoeben en de aanwezigheid van legionella (Thomas et al. 2006). Hierbij werden tweehonderd locaties onderzocht op de aanwezigheid van legionella waarvan vijftien positief voor amoeben. De monsters die amoeben bevatten waren vaker positief voor legionella dan monsters die geen amoeben bevatten. In het onderzoek beschreven in dit rapport zijn alleen locaties bemonsterd waar al meerdere malen legionellabesmetting is geconstateerd. Het verdient aanbeveling om het onderzoek uit te breiden met installaties waar niet eerder legionella is gemeten om vast te kunnen stellen of de aanwezigheid van bepaalde soorten amoeben een indicator kunnen zijn van mogelijke groei van legionella in de installatie.

In deze studie werd eerst een monster van een halve liter genomen ten bate van legionella-analyse en vervolgens een monster van vijf liter ten bate van telling en detectie van amoeben. Hierdoor wordt het monster voor de analyse van amoeben uit een ander deel van de installatie genomen dan het monster voor legionella-analyse. Dit zou kunnen verklaren waarom er geen kwantitatieve relatie is gevonden tussen de aantallen amoeben en legionella. Het verdient aanbeveling om in een vervolgonderzoek beide analyses uit hetzelfde monster uit te voeren.

Daarnaast adviseren wij om bij het onderzoek naar de aanwezigheid van amoeben en legionella in drinkwater ook onderscheid te maken tussen drinkwater afkomstig van oppervlaktewater of grondwater. Dit om te achterhalen of een bepaalde grondstof een hoger risico kent op het voorkomen van amoeben en/of legionella. Uit eerdere studies is gebleken dat amoeben niet volledig verwijderd worden bij drinkwaterzuiveringsprocessen (Valster et al., 2009; Thomas et al., 2008; Hoffmann en Michel, 2001). Naast legionella kunnen ook andere ziekteverwekkende bacteriën, zoals mycobacteriën, vibrio, helicobacter, afipia, bosea, chlamydia en pseudomonas groeien in amoeben, als ook mimivirussen (Greub en Raoult, 2004; Thomas et al., 2007; Corsaro et al., 2009). Verder kunnen amoeben een rol spelen in de bescherming van pathogene bacteriën tegen desinfectieprocedures (Lau en Ashbolt, 2009). Daarom is het van belang dat er aandacht is voor de aanwezigheid en groei van amoeben in drinkwaterinstallaties en maatregelen die de aanwezigheid of groei van amoeben in leidingen kunnen voorkomen.

#### Aanbevelingen voor beleid

1. Vanwege de mogelijke fluctuatie in legionella-aantallen moeten de halfjaarlijkse resultaten van de analyse van watermonsters niet als leidend, maar in samenhang met de risicoanalyse worden beschouwd bij beslissingen over de te nemen beheersmaatregelen.
2. Uit deze studie naar een gering aantal locaties blijkt dat slechts één legionellasoort een installatie lijkt te koloniseren. Of in de loop van de tijd de groei van andere legionellasoorten mogelijk is, is niet te concluderen uit deze studie. Het verdient hiertoe aanbeveling om de locaties langer te volgen in de tijd en bij meer installaties te bepalen



welke legionellasoorten met name voorkomen en de studie uit te breiden met warmwaterleidingen.

3. Ondanks herhaaldelijke beheersmaatregelen komen legionellabesmettingen in de onderzochte installaties steeds opnieuw terug. Het verdient aanbeveling te onderzoeken hoe vaak het voorkomt dat installaties een dergelijk chronische legionellabesmetting hebben en welke beheersmaatregelen wel en niet afdoende zijn om een dergelijke besmetting te bestrijden of te voorkomen.
4. Het verdient aanbeveling om nader onderzoek te doen naar de aanwezigheid van amoeben in drinkwaterinstallaties, de groei van pathogene bacteriën in deze amoeben en de volksgezondheidsrisico's hiervan.

## Literatuur

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., 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.

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., Breiman, R.F. (2000). Outbreak of Legionnaires' disease associated with a display whirlpool spa. *International Journal of Epidemiology*, 29, 1092-1098.

Brandsema PS, Dijkstra F, van Gageldonk-Lafeber AB, Snijders BEP, Meijer A, van der Hoek W. 2011. Jaarrapportage surveillance respiratoire infectieziekten 2010. RIVM briefrapport 210231008.

Corsaro D, Venditti D. 2009. Detection of Chlamydiae from freshwater environments by PCR, amoeba coculture and mixed coculture. *Res. Microbiol.* 160: 547-552.

Craun G.F., Brunkard JM., Yoder JS., Roberts VA., Carpenter J., Wade T., Calderon RL., Roberts JM., Beach MJ., Roy SL. 2010. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. *Clinical Microbiology Reviews* 23: 507-528.

Dijkstra F, Brandsema P, van Gageldonk-Lafeber AB, van der Hoek W. 2009. Jaarrapportage surveillance respiratoire infectieziekten 2008. RIVM briefrapport 210231004/2008.

Euser S.M., Pelgriom M., den Boer J.W. 2010. Legionnaires'disease and Pontiac fever after using a private outdoor whirlpool spa. *Scandinavian Journal of Infectious diseases*. 42: 910-916.

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.

Greub en Raoult, 2004. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* 17: 413-433.

Van Heusden, G.P.H. 1972. Estimation of the biomass of Plankton. *Hydrobiologia* 39: 165-208.

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.

Hoffmann R., Michel R. 2001. Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 203: 215-219.

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

Lau en Ashbolt, 2009, The role of biofilms and protozoa in *Legionella* pathogenesis: implications for drinking water. J. Appl. Microbiol. 107: 368-378.

Van der Mee-Marquet N., Domelier A., Arnault L., Bloc D., Laudat P., Hartemann P., Quentin R. 2006. *Legionella anisa*, a possible indicator of water contamination by *Legionella pneumophila*. J. of Clin. Microbiol. 44: 56-59.

Napoli C., Iatta R., Fasano F., Marsico T., Montagna M.T. 2009. Variable bacterial load of *Legionella* spp. in a hospital water system. Science of the Total Environment 408: 242-244.

Nguyen, T.M., Ilef, 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.

Oberdorfer K., Mussigbrodt G., Wendt C. 2008. Genetic diversity of *Legionella pneumophila* in hospital water systems. Int. J. Hyg. Environ. Health. 211: 172-178.

Redeker S. 2009. Aanwezigheid van kweekbare naaktamoeben (*Gymnamoebae*) in drinkwater, intern rapport Het Waterlaboratorium nr.200912.

Rowbotham, 1980, Preliminary report on the pathogenicity of *Legionella pneumophila* for freshwater and soil amoebae. J. Clin. Pathol. 33: 1179-1183.

Rowbotham TJ. 1983. Isolation of *Legionella pneumophila* from clinical specimens via amoeba and the interaction of those and other isolates with amoeba. J. Clin. Pathol. 36: 978-986.

Schalk J.A.C., A.E. Docters van Leeuwen, W.J. Lodder, S.M. Euser, J.W. den Boer, A.M. de Roda Husman. 2011. Detectie van legionella met een amoebekweek methode. RIVM Briefrapport 703719083

Silk BJ, Moore MR, Bergtholdt M, Gorwitz RJ, Kozak NA, Tha MM, Brown EW, Winchester JL, Labus BJ, Rowley P, Middaugh JP, Fields BS, Hicks LA. 2012. Eight years of Legionnaires' disease transmission in travellers to a condominium complex in Las Vegas, Nevada. Epidemiol. Infect. 4: 1-10.

Stout J.E. et al. 2007. Role of environmental surveillance in determining the risk of hospital-acquired legionellosis: a national surveillance study with clinical correlations. Infection control and hospital epidemiology 28: 818-824.

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

Thomas V, Casson N, Greub G, 2007. New *Afiplia* and *Bosea* strains isolated from various water sources by amoebal co-culture. Syst. Appl. Microbiol. 30: 572-579.

Thomas V., Loret J.F., Jousset M., Greub G. 2008. Biodiversity of amoebae and amoebae-resisting bacteria in a drinking water treatment plant. Env. Microbiol. 10: 2728-2745.

Valster R., et al. 2009. Protozoa in two unchlorated drinking water supplies identification by phylogenetic analysis of 18rRNA gene sequences, Applied and Environmental Microbiology.

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

Versteegh J.F.M., Brandsema P.S., van der aa N.G.F.M., Dik H.H.J., de Groot G.M. 2007. Evaluatie legionellapreventie Waterleidingwet. RIVM rapport 703719020.

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

Wadowsky RM, Butler LJ, Cook MK, Verma SM, Paul MA, Fields BS, Keleti G, Sykora JL, Yee RB, 1988, Growth-supporting activity for *Legionella pneumophila* in tap water cultures and implication of hartmanelli amoebae as growth factors. Appl. Environ. Microbiol. 54: 2677-2682.

WHO (2007) *Legionella* and the prevention of legionellosis.  
[www.who.int/water\\_sanitation\\_health/emerging/legionella.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf)

Dit is een uitgave van:

**Rijksinstituut voor Volksgezondheid  
en Milieu**

Postbus 1 | 3720 BA Bilthoven  
[www.rivm.nl](http://www.rivm.nl)