

RIVM rapport 213690 003

**Onderzoek naar de bron van een epidemie van
legionellose na de Westfriese Flora in
Bovenkarspel**

JW den Boer¹, E Yzerman², J Schellekens¹,
JP Bruin², W van Leeuwen¹, K Mooijman¹,
H Veenendaal³, AMC Bergmans⁴, AN van der Zee⁴,
RJ van Ketel⁵, H Tijsen⁶, MAE Conyn-van
Spaendonck¹

Juni 2000

1. Rijksinstituut voor de Volksgezondheid en Milieu
2. Stichting Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid, Haarlem
3. Kennisinstituut voor water (KIWA)
4. Stichting Streeklaboratorium Tilburg
5. Academisch Medisch Centrum, Amsterdam
6. Inspectie van W & V

Dit onderzoek werd verricht in opdracht en ten laste van het Ministerie van VWS, in het kader van project 213690/05, Infectieziektebestrijding / Legionellose

Inhoud

1.	Inleiding	6
2.	Probleemstelling	8
3.	Materiaal en methoden	9
3.1.	Inleiding	9
3.2.	Inventarisatie van de omgeving van de CNB-hallen	9
3.3.	Inspectie van het waterleidingsysteem van de CNB-hallen	9
3.4.	Inventarisatie en classificatie van potentieel risicovolle producten	10
3.5.	Bemonstering van het waterleidingnet en van potentieel risicovolle producten	11
3.6.	Interviews omtrent watergebruik	12
3.7.	PCR, kweek en serotypering van <i>Legionella pneumophila</i>	13
3.8.	Verzamelen van patiëntenisolaten	14
3.9.	Moleculaire typering van <i>Legionella</i> isolaten	14
4.	Resultaten	16
4.1.	Chronologie van het onderzoek	16
4.2.	Bovenkarspel en de CNB-hallen	17
4.2.1.	De situatie in de CNB-hallen, vóór de WF van 1999	17
4.2.2.	De situatie in de CNB-hallen tijdens de WF van 1999	18
4.3.	Een beschrijving van de waterketen in drie compartimenten	18
4.3.1.	Het aanvoerende waterleidingnet (PWN)	18
4.3.2.	Het waterleidingsysteem van de CNB-hallen (CNB)	23
4.3.3.	Producten die tijdens de Westfriese Flora met water gedemonstreerd werden (WF)	24
4.4.	Een overzicht, per compartiment, van watergebruik voor, tijdens en na de WF	25
4.4.1.	Watergebruik PWN-compartiment	25
4.4.2.	Watergebruik CNB-compartiment	26
4.4.3.	Watergebruik WF-compartiment	26
4.5.	Een overzicht van potentieel risicovolle producten, ingedeeld in vier risicocategorieën	29
4.6.	Een overzicht, per compartiment, van alle voor microbiologisch onderzoek beschikbare monsters	31
4.6.1.	Beschikbare monsters PWN-compartiment	31
4.6.2.	Beschikbare monsters CNB-compartiment	33
4.6.3.	Beschikbare monsters WF-compartiment	36
4.7.	Kweek en PCR resultaten van alle beschikbare monsters	37
4.7.1.	Kweek en PCR resultaten PWN-compartiment	37
4.7.2.	Kweek en PCR resultaten CNB-compartiment	38
4.7.3.	Kweek en PCR resultaten WF-compartiment	38
4.8.	Typeringsresultaten	42
4.8.1.	Patiënt-isolaten	42
4.8.2.	Omgevingsisolaten	43
5.	Discussie	51
5.1.	Volledigheid en sensitiviteit van de bemonstering	51
5.2.	Bijdrage van verschillende apparaten aan de verspreiding van <i>L. pneumophila</i>	53
5.3.	Herkomst van B-1, B-2 en B-3	55
5.4.	Vergelijking met de resultaten van het patiënt-controle en het cohort-onderzoek	56
6.	Conclusies	59

Dankbetuiging	61
Literatuur	62
Bijlage 1: Vragenlijst CIE/RIVM over watergebruik bij whirlpool demonstraties	63
Bijlage 2: Vragenlijst CIE/RIVM over watergebruik bij standhouders (telefonische enquête)	64
Bijlage 3: Vragenlijst IW&V over watergebruik door standhouders	66
Bijlage 4: Chronologische volgorde van aansluiting van stands met een eigen watervoorziening	67
Bijlage 5: Beschrijving van het watergebruik bij potentieel risicovolle producten die gedemonstreerd werden	68
Bijlage 6: Overzicht van alle beschikbare monsters van potentieel risicovolle producten die tijdens de WF gedemonstreerd werden	74
Bijlage 7: Analyse rapport van de monsternamen door het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid te Haarlem	77
Bijlage 8: Analyse rapport van de monsternamen door Kiwa	80
Bijlage 9: Lijst met afkortingen	81
Bijlage 10: Lijst van tabellen en figuren	82
Bijlage 11: Verzendlijst	83

Abstract

In March 1999 results from an exploratory case-control study indicated that the most probable origin of a large epidemic of legionnaire's disease had to be directly located at or in the surroundings of the Westfrieze Flora (WF) in Bovenkarspel (Province of Noord-Holland, Netherlands). The WF is a yearly exhibition of flowers, and agricultural and consumer products, which was held in 1999 from 19 to 28 February. After inspecting the premises and making an inventory of all exhibits, a list of potential sources was drawn up. The water supply system and all the still available equipment using water were sampled.

A risk assessment was done for each potential source by interviewing exhibitors. In total, sixteen products were found potentially hazardous: two whirlpools, two bubblemats (perforated rubber mats meant for the bottom of a water-filled bathtub through which air can be blown at high speed), eleven fountains and a sprinkler installation.

Legionella pneumophila was isolated from two whirlpools and a sprinkler installation. With the use of molecular-biological techniques (PFGE, ERIC/REP-PCR and AFLP), three different genotypes were identified. These were B-1, B-2 and B-3 (B for Bovenkarspel). To enable comparison of these isolates with patient isolates, all microbiology laboratories in the Netherlands collaborated in collecting patient isolates related to the epidemic. In total 29 isolates were collected, 28 of which were genetically identical to B-1; the other one was genetically identical to B-2. Through the risk assessment based on the reported use and estimating the degree of contamination from the microbiological investigation of the three culture-positive products, the most probable source contributing the most to the spread of *L. pneumophila* was found to be the whirlpool located in hall 3 of the WF premises. It is not possible to rule out the contribution made to spreading by the whirlpool in hall 4, whereas the sprinkler's contribution to spreading is not probable. The contribution to spreading by the fountains and bubblemats is also unlikely. Although *Legionella* spp was not isolated from the water supply system, the organism was likely introduced into the three products from this system. These results were confirmed by the outcome of a case-control study and a cohort study, both designed to pinpoint the exact location of exposure to *Legionella* spp on the WF premises. They showed the whirlpool in hall 3 to be the most probable source of infection (reported separately).

Samenvatting

In maart 1999 kwam uit de resultaten van een oriënterend patiënt-controle onderzoek naar voren dat de bron van een omvangrijke *Legionella* epidemie zich op of rond de Westfriesse Flora (WF) te Bovenkarspel (Noord-Holland) moest bevinden. De WF is een jaarlijkse tentoonstelling van bloemen en agrarische en consumentenproducten, die in 1999 werd gehouden van 19 tot en met 28 februari. Na inspectie van het terrein en inventarisatie van de exposanten werd een lijst opgesteld van potentiële bronnen. Het waterleidingsysteem en alle watergebruikende installaties die nog voorhanden waren, werden bemonsterd. Aan de hand van interviews met exposanten, werd een risico-inschatting voor elke potentiële bron gemaakt. In totaal waren zestien producten potentieel risicovol: twee whirlpools, twee bubbelmatten (geperforeerde rubber matten, bedoeld om op de bodem van een met water gevuld bad te leggen, waardoorheen met hoge snelheid lucht kan worden geblazen), elf fonteinen en een vernevelaar. Uit drie apparaten, twee whirlpools en een vernevelaar, werd *Legionella pneumophila* geïsoleerd. Gebruikmakend van serotypering en moleculair-biologische technieken (PFGE, ERIC/REP en AFLP), werden drie verschillende genotypen onderscheiden: B-1, B-2 en B3 (B van Bovenkarspel). Om deze isolaten met patiënten-isolaten te kunnen vergelijken werkten alle microbiologische laboratoria van Nederland mee met het verzamelen van patiënten-isolaten gerelateerd aan de epidemie. Van in totaal 29 verzamelde isolaten waren 28 genetisch identiek aan B-1, het andere was genetisch identiek aan B-2. Gebruikmakend van risico-inschatting gebaseerd op gemeld gebruik en gebruikmakend van een microbiologische inschatting van de mate van besmetting van de drie kweek-positieve producten, droeg de whirlpool in hal 3 van het WF-terrein zeer waarschijnlijk het meeste bij aan verspreiding van *L. pneumophila*. Het is niet uit te sluiten dat de whirlpool in hal 4 een bijdrage heeft geleverd aan de verspreiding, terwijl een bijdrage van de vernevelaar onwaarschijnlijk is. Ook een bijdrage aan de verspreiding door de fonteinen en de bubbelmatten is onwaarschijnlijk. Hoewel *Legionella* spp niet werden geïsoleerd uit het waterleidingsysteem, is het waarschijnlijk dat de *Legionella* bacteriën de drie producten binnenkwamen vanuit dit systeem. Deze resultaten worden bevestigd door de uitkomsten van een patiënt-controle en een cohort onderzoek, uitgevoerd om de exacte locatie van blootstelling aan *Legionella* spp op het WF-terrein vast te stellen, die aangeven dat de whirlpool in hal 3 de meest waarschijnlijke bron van infectie is (zie separate RIVM-rapporten).

1. Inleiding

In de tweede week van maart 1999 werden twaalf patiënten met een atypische pneumonie opgenomen in het Westfries Gasthuis (WFG) in Hoorn. Op 13 maart werd vastgesteld, met een urine-antigeen test, dat alle twaalf patiënten aan legionellose leden. Op 13 maart 1999 bleek uit de resultaten van een oriënterende patiënt-controle studie onder tien patiënten en 21 controles, uitgevoerd door de GGD Westfriesland, dat de bron van dit cluster van legionella-pneumonie zich op of rond de kort daarvoor beëindigde Westfrieze Flora (WF) in Bovenkarspel (Noord-Holland) moest bevinden. Alle tien patiënten hadden de WF bezocht, terwijl slechts vier van de 21 ongematchte buurtgenoten daar geweest waren (Yates gecorrigeerde $\chi^2=14.81$; $p=0,0001$)¹.

De WF, die van 19 t/m 28 februari werd gehouden in de hallen van de Coöperatieve Nederlandse Bloembollencentrale (CNB) in Bovenkarspel, omvatte behoudens een bloemententoonstelling ook een agrarische beurs en een huishoudbeurs, en trok circa 80.000 bezoekers uit binnen- en buitenland. Vanwege de waarschijnlijkheid van nog niet gediagnosticeerde gevallen onder de bezoekers en de mogelijke gevolgen hiervan voor adequate therapie, werd op 13 maart via de media nationaal alarm geslagen.

Om de omvang van de epidemie te monitoren werd een casus-register geopend en werd aan alle artsen in Nederland gevraagd WF-gerelateerde gevallen van pneumonie bij de lokale GGD te melden.

Tabel 1 geeft inzicht in de omvang en de ernst van de legionella-epidemie. Het betreft de stand van gegevens in het casus-register tot 15 juni 1999^a. In de voetnoot^b is de definitie voor zekere, vermoedelijke, mogelijke en overige ziektegevallen beschreven.

^a Bron: RIVM / LCI, op basis van gegevens verschaft door de GGD's

^b Zeker geval: Bezoeker van de Westfrieze Flora met een klinisch beeld van een longontsteking en een infiltraat op de thoraxfoto met een positieve kweek op *L.pneumophila*, en/of met een viervoudige titerstijging van antistoffen tegen *L.pneumophila* in gepaarde sera, en/of met een positieve urine antigeen test voor *L.pneumophila*.

Vermoedelijk geval: Bezoeker van de Westfrieze Flora met een klinisch beeld van een longontsteking en een infiltraat op de thoraxfoto met eenmalig hoge titers van antistoffen tegen *L.pneumophila* in serum, en/of met een positieve immunofluorescentie test, en/of met een positieve PCR voor *L.pneumophila*, of bij wie geen *L.pneumophila* diagnostiek bekend of verricht is en bij wie geen andere verwekker werd gevonden.

Mogelijk geval: Bezoeker van de Westfrieze Flora met een klinisch beeld van een longontsteking zonder bevestiging met een thoraxfoto, maar met laboratoriumbevestiging voor een *L.pneumophila* infectie met één van de bovenvermelde (zie zeker én vermoedelijk) microbiologische methoden.

Overig: Bezoeker van de Westfrieze Flora met een klinisch beeld van een mogelijk *L.pneumophila* infectie (longontsteking, griepachtig beeld of luchtweginfectie), zonder enige diagnostische bevestiging.

Tabel 1: Omvang en ernst van de legionella-epidemie^c

Zeker	123	Van wie overleden	17
Vermoedelijk	58	„	4
Mogelijk	11	„	0
Overig	50	„	7
Totaal	242	„	28

Op advies van het Bestuurlijk Afstemmingsoverleg (BAO), verleende het ministerie van Volksgezondheid Welzijn en Sport (VWS) het Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM) op 13 maart 1999 de opdracht om onderzoek te verrichten naar de oorzaak van deze epidemie².

Hiervoor was het noodzakelijk om enerzijds *Legionella* spp uit potentiële bronnen te isoleren en anderzijds de blootstelling aan *Legionella* spp zo precies mogelijk te lokaliseren. Beide bevindingen zijn nodig om tot een sluitende verklaring te komen voor het ontstaan van de epidemie.

In separate RIVM-rapporten worden de resultaten beschreven van een patiënt-controle onderzoek onder bezoekers van de WF en van een cohort-onderzoek onder medewerkers van de WF, gericht op lokalisatie van de blootstelling aan *Legionella* spp. In dit rapport worden de resultaten beschreven van de inventarisatie, risk-assessment en het microbiologisch onderzoek van potentiële bronnen van de legionella-epidemie.

^c Bron: GGD's/ LCI/ RIVM; zoals bekend op 5 augustus 1999

2. Probleemstelling

Het vinden van één of meer bronnen van de legionella-epidemie in Bovenkarspel is, naast het epidemiologisch lokaliseren van de blootstelling, een essentieel onderdeel van de wetenschappelijke bewijsvoering van de oorzaak van de epidemie.

Dit betekent concreet:

1. Het opsporen van alle potentiële besmettingsbronnen die tijdens de WF gebruikt of gedemonstreerd werden
2. Het isoleren van *Legionella* spp uit potentiële besmettingsbronnen
3. Het verzamelen van patiëntenisolaten
4. Het typeren van omgevingsisolaten en patiëntenisolaten
5. Het vergelijken van het genetisch materiaal van omgevingsisolaten met patiëntenisolaten

3. Materiaal en methoden

3.1. Inleiding

De gevolgde methodiek bestond uit de volgende onderdelen:

1. Inventarisatie van potentiële bronnen in de omgeving van de CNB-hallen aan de hand van een topografische kaart
2. Inspectie van de het totale complex van de CNB-hallen, teneinde een zo volledig mogelijk beeld te krijgen van het totale in pandige waterleidingnet
3. Opstellen van een lijst van potentieel risicovolle producten onder standhouders van de beurs ten tijde van de Westfriese Flora
4. Bemonstering van potentiële bronnen
5. Interviews omtrent watergebruik om inzicht te krijgen in risicovolle processen
6. PCR en kweek van *Legionella pneumophila*
7. Verzamelen van patiëntenisolaten, teneinde een vergelijking met omgevingsisolaten mogelijk te maken
8. Moleculaire typering van legionella-isolaten, zowel van omgevingsmonsters als van patiënten

3.2. Inventarisatie van de omgeving van de CNB-hallen

Aan de hand van een topografische kaart van het gebied rondom de CNB-hallen werd gezocht naar koeltorens die in de industrie gebruikt worden en naar andere open wateroppervlakten in de omgeving.

3.3. Inspectie van het waterleidingsstelsel van de CNB-hallen

Om de situatie ter plaatse in kaart te brengen werden de CNB-hallen en hun directe omgeving geïnspecteerd. Van de hallen werd het totale in pandige waterleidingsstelsel geïnventariseerd vanaf de aanleverpunten van het Provinciaal Waterleidingbedrijf Noord-Holland (PWN). Aanvankelijk gebeurde dit aan de hand van visuele inspectie, later werden door de CNB plattegronden en tekeningen die in het verleden bij iedere aanpassing van het waterleidingsstelsel waren gemaakt, ter beschikking gesteld. Daarbij werd gekeken naar gebruikte materialen, positie van tappunten, geisers en boilers, de aanwezigheid van dode uiteinden en de lokalisatie van brandslangen. Aan de hand van de bevindingen werden te bemonsteren plaatsen in kaart gebracht.

3.4. Inventariseren en classificeren van potentieel risicovolle producten

Gebruikmakend van een door de organisatie van de WF ter beschikking gesteld overzicht van alle standhouders die op de WF stonden, werden standhouders geïnterviewd door medewerkers van het Centrum voor Infectieziekten Epidemiologie van het RIVM (CIE/RIVM). Op basis van deze telefonische interviews werd een lijst van potentieel risicovolle producten opgesteld. Hiermee werden producten bedoeld, waarbij demonstratie gepaard ging met watergebruik of -verbruik (uitgezonderd huishoudelijk gebruik van water: koffie/thee zetten, afwassen). Ook airconditioningsapparatuur werd als potentieel risicovol gezien. Alle op deze lijst voorkomende standhouders zijn bezocht door een bemonsteringsteam, dat uitgebreid en gedetailleerde informatie omtrent watergebruik tijdens de WF verzamelde (zie 2.6). Deze informatie werd vervolgens gebruikt voor een risico-inschatting omtrent het watergebruik in een stand, teneinde te komen tot een lijst van potentiële bronnen. Voor de risico-inschatting werden acht criteria gebruikt. Door aan de aanwezigheid van elke van deze criteria één punt toe te kennen, werd het risico op groei en verspreiding van *Legionella* in de diverse stands gescoord. Om een volledig overzicht te krijgen werden alle stands met potentieel risicovolle producten op een plattegrond ingetekend. De stands werden daarbij ingedeeld in vier categorieën op grond van de risicoscore: verwaarloosbaar risico (1 en 2 punten), enig risico (3 en 4 punten), risicovol (5 en 6 punten) en zeer risicovol (7 en 8 punten).

De acht gebruikte criteria waren:

1. Het gebruik van leidingwater op enigerlei wijze.
2. Een watertemperatuur die in de groeirange van *Legionella* spp ligt (20-43°C)³.
3. Een watertemperatuur gelijk aan het optimum van de groeicurve van *Legionella* spp (37°C)³.
4. Het ontbreken van desinfectie van water met een temperatuur in de groeirange van *Legionella* spp (20-43°C).
5. Het niet verversen van water dat van een temperatuur is die in de groeirange van *Legionella* spp ligt (20-43°C).
6. Aërosolvorming ten gevolge van vernevelen, bruisen, bubbelen, spuiten onder hoge druk, mits het water een temperatuur heeft die lager is dan 60 °C (boven die temperatuur kunnen *Legionella* spp niet overleven). Stoomvorming is niet risicovol, omdat door het borrelen van kokend water weliswaar aërosolvorming optreedt, maar *Legionella* spp zich bij 100 °C niet kunnen handhaven^d.

^d Bron: Persoonlijke mededeling Mevr. I.L.Tuinman, TNO/PML, Rijswijk

7. De duur van de aërosolvorming, mits het water een temperatuur heeft die lager is dan 60°C (boven die temperatuur kunnen *Legionella* spp niet overleven).
8. De grootte van het oppervlak waar aërosolen gevormd werden, mits het water een temperatuur heeft die lager is dan 60°C (boven die temperatuur kunnen *Legionella* spp niet overleven).

3.5. Bemonstering van het waterleidingnet en van potentieel risicovolle producten

Voor de uitvoering van de bemonstering selecteerde het RIVM het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid te Haarlem (SLHa) en het Kiwa (Kennisinstituut voor water), op basis van bestaande expertise en lopend onderzoek.

Naar *Legionella pneumophila* werd gezocht in drie compartimenten van de waterketen.

1. De aanvoerende waterleiding, die loopt tot aan de twee aansluitpunten van de CNB-hallen.
Water uit deze leiding is vanuit twee waterputten bij de aansluitpunten bemonsterd, zowel door het SLHa en het Kiwa als door het Provinciaal Waterleidingbedrijf Noord-Holland,
2. Het waterleidingsysteem van de CNB-hallen.
De monsternamen van de in pandige waterleidingen werd verricht bij de in kaart gebrachte monsterplaatsen (zie 2.3.).
3. Potentieel risicovolle producten die tijdens de Westfriese Flora met water gebruikt of gedemonstreerd werden, alsmede airconditioningsystemen. Gezien het mogelijke risico van verdere verspreiding van potentiële bronnen had het opsporen van deze potentieel risicovolle producten de hoogste prioriteit. Daartoe werd door de inspecteur infectieziekten, na tratering van onder verdenking staande apparatuur, aan de betrokken GGD verzocht op zo kort mogelijke termijn een monsternamen te organiseren. De monsternamen gebeurde met medewerking van de eigenaren van de producten, op basis van vrijwilligheid en werd verzorgd door medewerkers van het SLHa, later bijgestaan door medewerkers van Microbiologisch laboratorium voor Gezondheidsbescherming van het RIVM (MGB/RIVM). In voorkomende gevallen werd aan eigenaren gevraagd hun apparatuur af te staan. De procedure was verder gericht op volledigheid van het aantal te bemonsteren apparaten.

De bemonstering gebeurde volgens NEN-norm 6265 (legionella-bemonstering)⁴. Daar waar deze niet van toepassing was, werd getracht zo gericht en adequaat mogelijk te bemonsteren. Van de beide aanvoerputten van PWN-leidingwater zijn door SLHa en PWN meerdere monsters genomen van één liter. Het Kiwa heeft van beide monsterpunten een monster van 20 liter genomen. Van het lokale koude en warme waterleidingsysteem werden monsters van 1 liter van de in kaart gebrachte tappunten opgevangen. Zowel het eerste water werd bemonsterd, als water afkomstig van verder gelegen stukken leiding (na doorspoeling). Van inpandige polyethyleen(PE)-leidingen en brandslangen werd restwater verzameld. Bovendien werden de leidingen en brandslangen op diverse plaatsen doorgesneden (destructieve bemonstering) teneinde het afnemen van biofilms mogelijk te maken.

Bij apparaten werd steeds één liter (rest)water, voor zover nog aanwezig, in een steriele Erlenmeyer opgevangen. Biofilms werden met wattendragers uitgestreken. Bij het ontbreken van restwater zijn (onderdelen van) apparaten gespoeld met gedestilleerd water, hetgeen vervolgens weer werd verzameld. Tevens zijn verdachte onderdelen of stukken van apparaten (pompen, filters, sluitringen, luchtinlaten) voor bemonstering meegenomen. Bij twee whirlpools was het onmogelijk om biofilms van interne waterleidingen te bereiken. Na aankoop van beide apparaten werden zij na demontage bemonsterd (destructieve bemonstering).

Indien voldoende materiaal verkregen kon worden, zijn door het SLHa reservemonsters van 10 ml bewaard bij -70°C.

3.6. Interviews omtrent watergebruik

Voor het inventariseren van watergebruik werden afhankelijk van de fase van het onderzoek en de aard van het product drie verschillende vragenlijsten gebruikt. Daarnaast werd door medewerkers van SLHa en van het MGB/RIVM bij elke monsternamen naar watergebruik gevraagd. Door het CIE/RIVM-onderzoeksteam werd een vragenlijst opgesteld voor standhouders die een whirlpool of een bubbelmat demonstreerden. Deze vragenlijst was gericht op de wijze van watergebruik in hun stand (zie bijlage 1). Door medewerkers van het CIE/RIVM werd telefonisch bij standhouders geïnformeerd naar hun watergebruik. Ook hierbij is een vragenlijst gebruikt (zie bijlage 2). Door de Inspectie Waren en Veterinaire Zaken (IW&V) is bij alle standhouders werkend met potentieel risicovolle producten, een proces-verbaal afgenomen aan de hand van een vragenlijst (zie bijlage 3).

Bij de interpretatie van de gegevens die uit de interviews over watergebruik door standhouders naar voren kwamen, is ervan uitgegaan dat uitsluitend waarheidsgetrouwe antwoorden gegeven zijn. Als in processen-verbaal, opgesteld door de inspecteurs van de IW&V, verklaringen van standhouders herroepen of bijgesteld werden, werd steeds de meest recente verklaring gebruikt.

3.7. PCR, kweek en serotypering van *Legionella pneumophila*

Een recent door het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid te Tilburg (SLTi) ontwikkelde en derhalve nog experimentele Polymerase Ketting Reactie (Polymerase Chain Reaction; PCR), specifiek voor *L. pneumophila*, werd uitgevoerd op watermonsters. Voor deze PCR werden watermonsters geconcentreerd middels centrifugatie. Een deel van het concentraat werd gebruikt in een PCR met nog niet eerder beschreven legionella-specifieke primers, welke aangrijpen op het gen voor 16S rRNA⁵. De PCR-producten werden geanalyseerd door middel van agarose gelelectroforese en dot blot hybridisatie met een *L. pneumophila*-specifieke oligonucleotide probe.

Voor het isoleren van *L. pneumophila* werden door het SLHa de standard operating procedures (SOP's) P-BAC-80-1 en P-BAC-915 gevolgd, door Kiwa NEN-norm 6265. De gebruikelijke veiligheidsnormen werden daarbij in acht genomen. Watermonsters werden geconcentreerd middels filtratie. Het geconcentreerde residu werd gebruikt voor enting of eventuele verdere bewerking. Afhankelijk van de eerste kweekresultaten bestond de bewerking uit verdunning, hittebehandeling of behandeling met antibiotica. Onderdelen van apparaten, zoals filters en sluitringen werden afgedrukt en/of uitgestreken op selectieve voedingsbodems en daarna in aankweekmedia opgewerkt. Monsters uit deze media werden beënt, eventueel na voorbehandeling. Uitgenomen leidingdelen werden opgekweekt in water. De gebruikte voedingsbodems voor isolatie van *Legionella* spp bestonden uit een basis van charcoal yeast extract agar, aangevuld met groei- en selectieve supplementen. De voedingsbodems werden na 48 uur en daarna dagelijks beoordeeld op groei van *Legionella* spp met behulp van een stereomicroscoop. Verdachte kolonies werden rein gestreken, rein gekweekt, biochemisch gedetermineerd en vervolgens serologisch getypeerd. Voor de serotypering werd gebruik gemaakt van de legionella-antiseren van DenkaSeiken (cat. nr. 311-701); deze kit bevat antiseren tegen *L. pneumophila* serogroep 1, 2, 3, 4, 5, 6 en een viertal non-*pneumophila* stammen (*L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. micdadei* en *L. bozemanii*).

Tevens werd geagglutineerd met antisera van de Microscreen kit (Microgen Biproducts Ltd., cat. nr. M45), welke gericht zijn tegen *L. pneumophila* serogroep 1 en *L. pneumophila* serogroep 2 tot en met 14. Op deze manier kon gedifferentieerd worden tussen serogroepen 1, 2, 3, 4, 5, 6 en 7 tot en met 14. Positieve isolaten werden voor onmiddellijke moleculaire typering (zie 2.9) naar het RIVM gestuurd. De isolaten werden tevens naar het SLTi gestuurd, waar zij volgens de AFLP-methode (zie 2.9) getypeerd werden.

3.8. Verzamelen van patiëntenisolaten

Alle medisch microbiologische laboratoria in Nederland zijn door het Laboratorium voor Infectieziekten-diagnostiek en perinatale Screening van het RIVM (LIS/RIVM) schriftelijk benaderd met de vraag of zij patiëntenisolaten, gerelateerd aan de legionella-epidemie in Bovenkarspel, wilden insturen voor nadere typering ten einde vergelijking met eventuele omgevingsisolaten mogelijk te maken. Na ontvangst werden stammen onmiddellijk geserotypeerd op dezelfde wijze als SLHa (zie 2.7) en onmiddellijk gegenotypeerd (zie 2.9). In een later stadium werd ook genotypering volgens de AFLP methode verricht (zie 2.9.).

3.9. Moleculaire typering van legionella-isolaten

Voor de bepaling van het DNA-profiel werd een zogenaamde 'touch-down'-PCR⁶ uitgevoerd. Voor de PCR-reacties werd gebruik gemaakt van zowel REP- (Repetitive Extragenic Palindromes) als ERIC- (Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus) oligonucleotide-primers (Perkin Elmer), zoals beschreven door Versalovic *et al.*⁷, met de volgende modificaties: (a) de polymerase-reactie werd uitgevoerd met SuperTaq polymerase (HT Biotechnology Ltd.), (b) de primer-concentratie bedroeg 20 pmol per 25 ul reactiemix en (c) de agarosegel werd samengesteld in 0,5x Tris-Boraat-EDTA (TBE) –buffer. De temperatuurtrajecten voor de REP- en de ERIC-PCR liepen respectievelijk van 67°C naar 57°C en van 71°C naar 61°C. De PCR-producten werden geanalyseerd met behulp van elektroforese in 1% agarose gedurende 2,5 h bij 100 V.

PFGE-analyse vond plaats zoals beschreven door Grothues en Tummler⁸. De bandenpatronen van zowel de PCR- als de PFGE-reacties werden ingevoerd in de Bionumerics-database (Applied Maths, versie 1.0), teneinde de DNA-fingerprints onderling te kunnen vergelijken en clusteren.

AFLP-analyse van *L. pneumophila* isolaten vond plaats zoals beschreven door Mazurek et al⁹, met de volgende modificaties: chromosomaal DNA werd geïsoleerd m.b.v. de Qiagen DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Duitsland), digestie vond plaats gedurende 4 uur met slechts 1 enzym (*Xba*I), en ligatie gedurende 2 uur met slechts 1 adapter (AX), de AFLP PCR werd uitgevoerd met SuperTaq DNA polymerase (HT Biotechnology), TaqStart Antibody (Clontech), en 50 pmol van primer PX in 25 µl-reacties, en de PCR-produkten werden gescheiden met behulp van elektroforese in 1,5% agarose gedurende 3 h bij 120 V. De bandenpatronen van AFLP-reacties werden vervolgens geanalyseerd m.b.v de GelCompar software (Applied Maths, versie 4.1), teneinde de DNA-fingerprints onderling te kunnen vergelijken en clusteren.

4. Resultaten

4.1. Chronologie van het onderzoek

Op advies van het Bestuurlijk Afstemmingsoverleg (BAO) verzocht het Ministerie van VWS het RIVM op zaterdag 13 maart 1999 direct te beginnen met het bemonsteren van verdachte apparatuur. Het RIVM besteedde de bemonstering en een deel van het microbiologische onderzoek uit aan het SLHa, dat in het verleden in samenwerking met de GGD Zuid-Kennemerland reeds expertise op dit terrein had ontwikkeld. Voor ondersteuning bij monsterneming, registratie en administratie werden twee medewerkers van MGB/RIVM aan het bemonsteringsteam van het SLHa toegevoegd. In het Centrum voor Infectieziekten Epidemiologie (CIE) van het RIVM werd een onderzoeksteam ingesteld en een onderzoekscoördinator aangewezen. Op zondag 14 maart besprak het CIE/RIVM-onderzoeksteam een door de organisatie van de WF ter beschikking gestelde lijst van potentieel risicovolle producten met de IGZ. Eerste prioriteit was te voorkomen dat deze apparaten nog verder gebruikt zouden worden. Op maandag 15 maart stelde de organisatie van de WF aan het CIE/RIVM de complete lijst van stands beschikbaar. Telefonisch vroeg het RIVM bij alle standhouders na of potentieel risicovolle producten op hun stand waren gebruikt. Zo werd de lijst van potentieel risicovolle producten aangevuld. Deze lijst werd leidraad bij het bemonsteren. Het bemonsteren gebeurde op basis van vrijwilligheid. Op 30 maart werd een eerste inventarisatie gemaakt van alle beschikbare gegevens van het microbiologische brononderzoek. Op 1 april werden deze gegevens met alle betrokken partijen besproken. Een extra inspanning werd wenselijk geacht. Besloten werd een buitenlandse expert bij het onderzoek te betrekken. Dit leidde tot een overleg met Dhr. John V. Lee, (Public Health Laboratory Service, Water and Environmental Microbiology Research Unit, Queen's Medical Centre, Nottingham), op 7 april 1999. Uit deze bespreking kwam een aantal aanbevelingen naar voren, die leidden tot een tweede bemonsteringsronde waarbij het waterleidingnetwerk van de CNB-hallen en twee whirlpools destructief bemonsterd werden. Voor deze ronde is het Kiwa gevraagd eveneens monsters te nemen en te onderzoeken. Op 29 april is met alle betrokken partijen de eerste en tweede monsterneming opnieuw geëvalueerd. Dit leidde tot nog enkele monsternemingen op 4, 10 en 11 mei, waarbij de aandacht uitging naar het waterleidingsysteem van de CNB-hallen. Op 26 juni 1999 kwamen de finale kweek- en typeringsresultaten beschikbaar.

4.2. Bovenkarspel en de CNB-hallen

De gemeente Stede Broec bestaat uit drie plaatsen: Grootebroek, Bovenkarspel en Lutjebroek (zie figuur 1). De CNB-veilinghallen bevinden zich aan de oostgrens van de bebouwde kom van deze gemeente, in de plaats Bovenkarspel. Ten noorden en ten oosten van de hallen ligt onbebouwd terrein; ten zuiden de Hoofdstraat met woonhuizen en de spoorlijn Hoorn-Enkhuizen en ten westen van de hallen ligt de woonwijk Zuidervoert. In de onmiddellijke omgeving van de veilinghallen bevinden zich geen koeltorens. Ook is er geen sprake van industrie die op grote schaal nevel produceert. Tijdens de WF was het terrein via een eigen NS-station te bereiken (zie figuur 2).

De CNB bestaat uit een complex van dertien (veiling)hallen, die niet alle gebruikt werden tijdens de WF. In de periode van 19 tot en met 28 februari 1999 kwamen bezoekers in de volgende hallen: 2 (de mijnzaal of veilingzaal), 3 en 4 (samen de consumentenbeurs), 5 en 13 (samen de bloemententoonstelling), 8 (de agri-beurs) en 9 (de kinderboerderij). De plattegrond op figuur 3 laat zien waar de verschillende hallen zich in het veilinggebouw bevinden. De op de WF aanwezige stands verschilden niet van de jaren ervoor wat betreft de gedemonstreerde apparaten.

4.2.1. De situatie in de CNB-hallen vóór de WF van 1999

In het jaar voorafgaande aan de WF van 1999 werden de hallen 3, 4, 5, 8, 9 en 13 als volgt gebruikt: In aansluiting op de WF 1998 werd hal 3 door het plaatsen van een tussenwand tijdelijk in twee gedeelten gesplitst. In het westelijke deel werd een aantal evenementen gehouden: een verzamelbeurs, een vogeltjesmarkt, een vlooiemarkt en een concert. Hierna werd het westelijke deel alleen voor opslag gebruikt. In het oostelijke deel van de hal werden van juni tot half september 1998 bloembollen bij een constante temperatuur van 23°C bewaard. Van half september 1998 tot 1 februari 1999 werden in het oostelijke deel van hal 3 irisbollen bewaard bij minimaal 30°C.

In aansluiting op de WF van 1998 werd hal 4 gebruikt als boedelveiling, als neerzethal voor bloembollen en als opslagplaats van fust en van leliebollen. Hal 4 is in die tijd niet verwarmd. Hal 5 werd in het jaar voorafgaand aan de WF van 1999 alleen gebruikt voor opslag en bewerking. Hal 8 werd gebruikt als tennishal en als opslagplaats van bloembollen, waarbij een constante temperatuur van 20-23°C gehandhaafd werd. Hal 9 werd gebruikt voor de opslag van bloembollen en van fust, waarbij de minimumtemperatuur 20°C was.

Hal 13 werd gebruikt voor de opslag van bloembollen.

4.2.2. De situatie in de CNB-hallen tijdens de WF van 1999

Door diverse standhouders van de consumentenbeurs is tijdens de interviews over watergebruik opgemerkt dat het dit jaar erg warm was in hun stand. Door hen werden temperaturen tussen de 20 en 25 °C genoemd. Standhouders van de agribeurs noemden bij herhaling 18 °C als de temperatuur die in hal 8 tijdens de WF heerste. Ook werd spontaan door verschillende standhouders gewezen op het gebruik van heaters, die voor veel luchtcirculatie zorgden.

4.3. Een beschrijving van de waterketen in drie compartimenten

De waterketen valt in verschillende onderdelen uiteen (zie plattegronden op figuur 2 t/m 4). De aanvoer van water naar het complex van de CNB-hallen wordt verzorgd door het Provinciale Waterleidingbedrijf Noord-Holland (PWN). In het hallencomplex heeft de CNB naast het vaste waterleidingsysteem in een aantal hallen additionele polyethyleen-leidingen (PE-leidingen) laten aanleggen, die niet in de muur liggen. In hal 3 en in hal 4 gaat het om twee systemen van PE-waterleidingen, waarvan er één het gehele jaar onder druk blijft, vanwege het gebruik van brandslangen. Het andere PE-systeem blijft het gehele jaar hangen, zonder druk. Tijdens de WF verhuurde een installatiebedrijf een aantal tijdelijke waterleidingen, die deels op de bestaande en deels op het drukloze PE-systeem werden aangesloten. Op de bloemententoonstelling legden medewerkers van een tuin- en bloemencentrum een bloementuin aan, waarvan fonteinen onderdeel uitmaakten. Verder hingen op verschillende plaatsen in de diverse hallen brandslangen. Per compartiment volgt hieronder een meer gedetailleerde beschrijving.

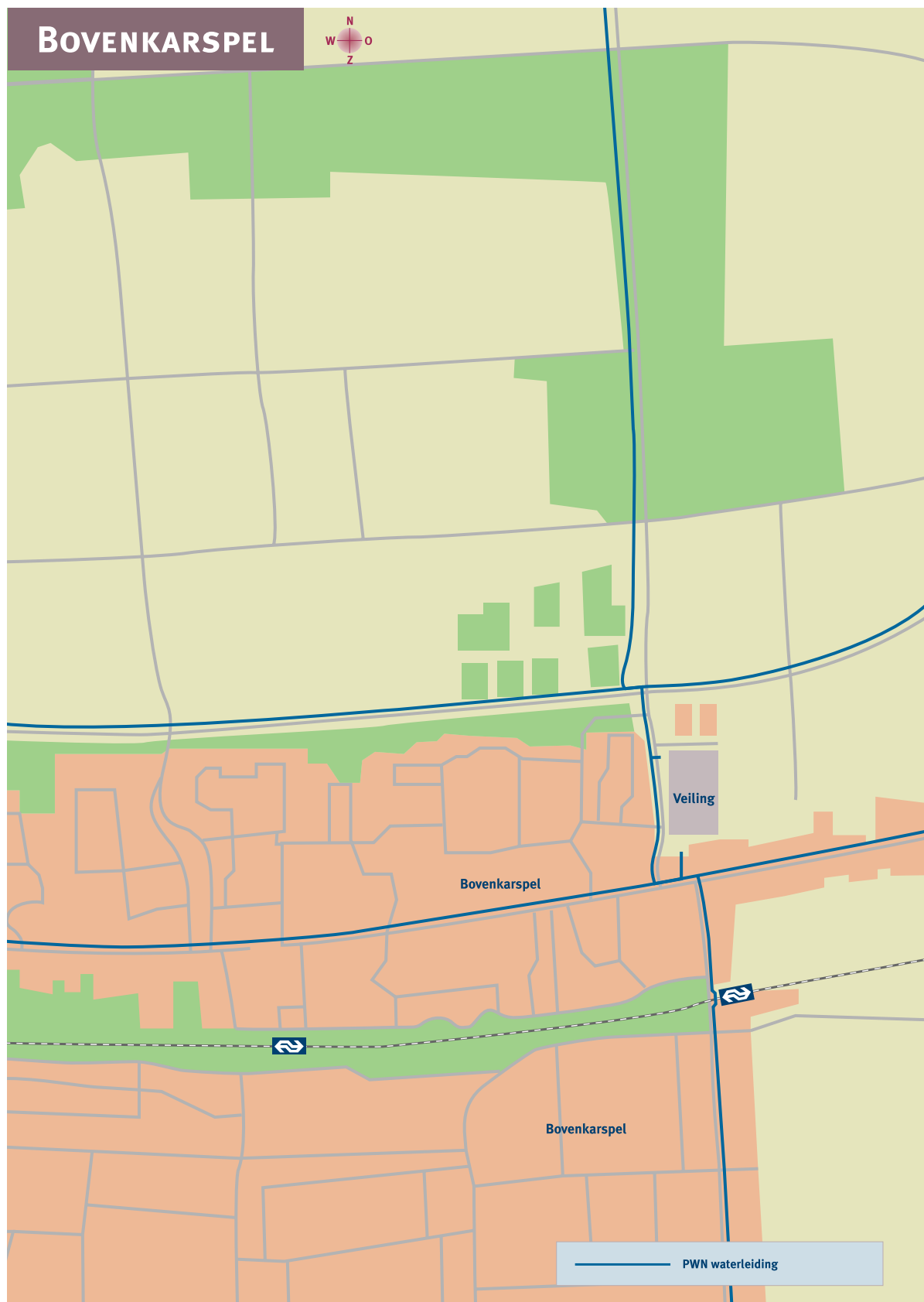
4.3.1. Het aanvoerende waterleidingnet (PWN)

Het PWN voorziet de CNB hallen via twee aansluitingen van water: Hoofdstraat 1 en Veilingweg 5. De wateraansluitingen liggen aan het begin van de PWN-waterleidingen die de gemeente Bovenkarspel van water voorzien^e. De aansluiting van Hoofdstraat 1 voorziet de hallen 1, 2, 3, 4, 5 en 6 van water; de aansluiting van Veilingweg 5 voorziet de hallen 7, 8, 9,

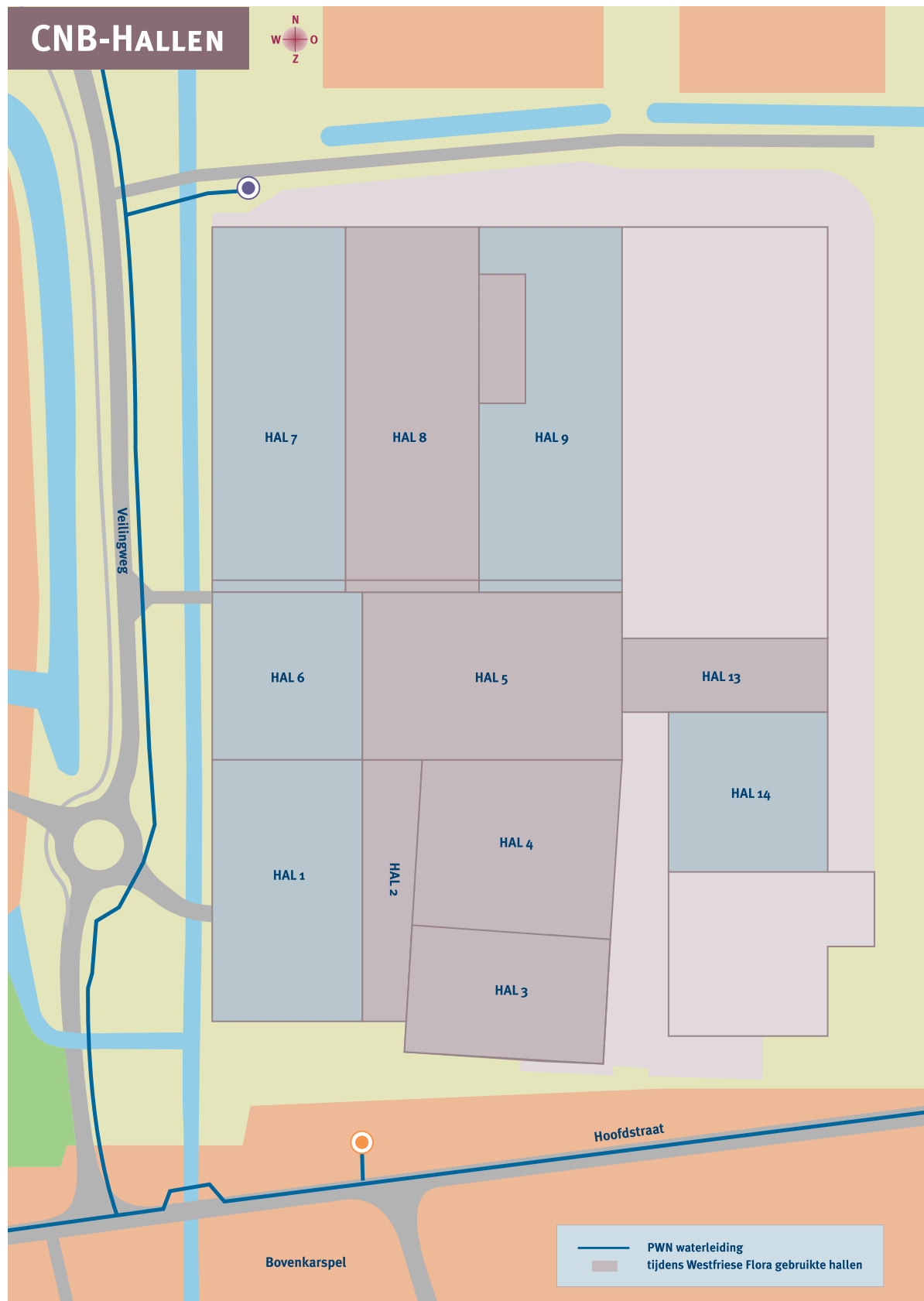
^e Bron: Vertegenwoordiger Provinciaal Waterleidingbedrijf Noord-Holland



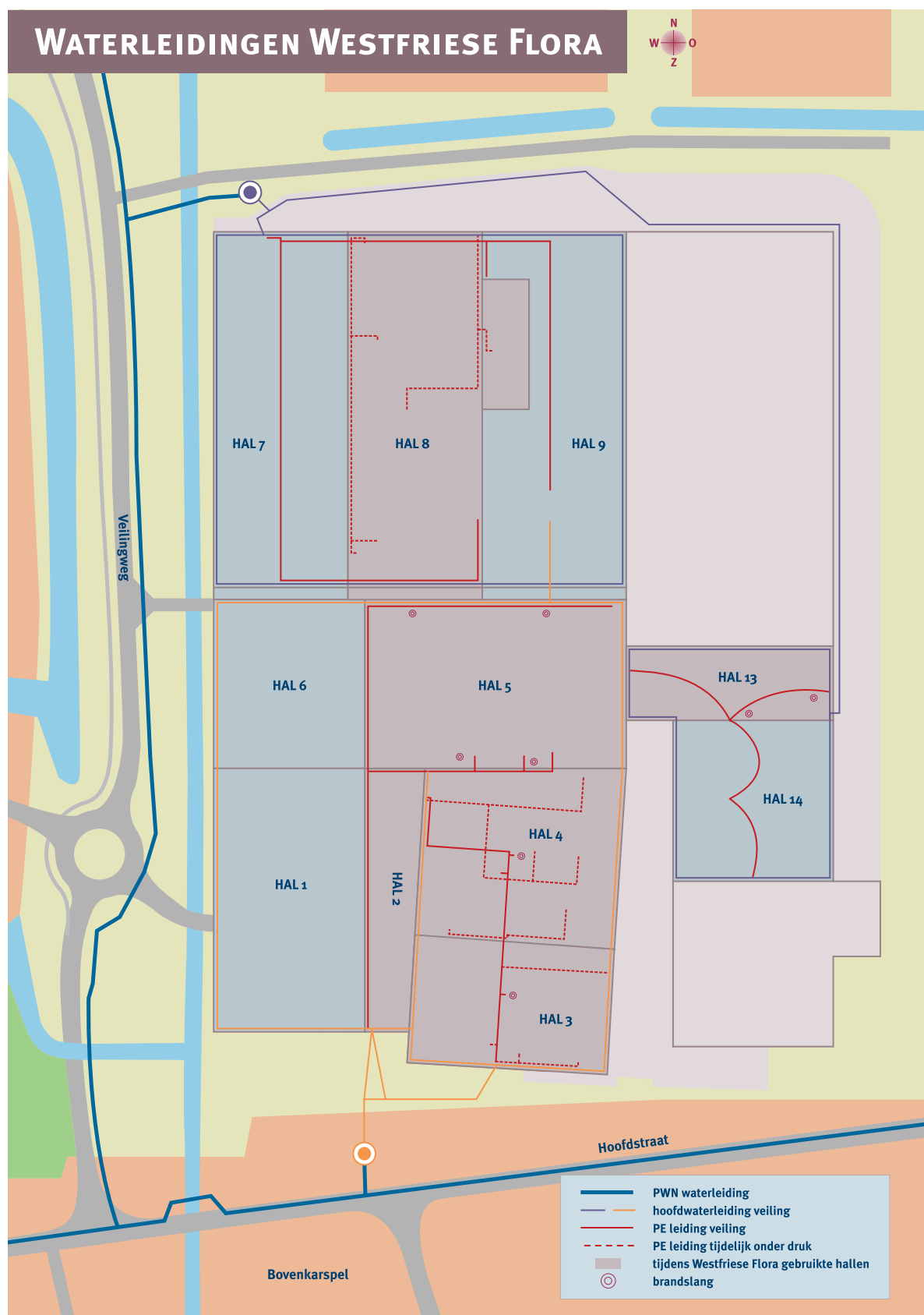
Figuur 1 *Topografie regio Stede Broec*



Figuur 2 Bereikbaarheid Westfriese Flora te Bovenkarspel



Figuur 3 Plattegrond van de CNB hallen



Figuur 4 Waterleidingen Westfriese Flora

13 en 14 van water. Enige uitzondering is één brandhaspel in hal 9, die gevoed wordt vanuit hal 5 en daarmee van water voorzien wordt via de aansluiting van Hoofdstraat 1.

4.3.2. Het waterleidingstelsel van de CNB-hallen (CNB)

Het vaste waterleidingnet bestaat uit koperen leidingen. In totaal zijn er zestien koudwatertappunten: in hal 3 zijn er vier tappunten, in hal 4 eveneens vier tappunten (bij de werkplaats), in hal 8 in totaal zes (vier bij gewone toiletten, één bij het invaliden toilet en één achterin) en in hal 9 twee stuks, die via een PE-leiding zijn verbonden met het vaste waterleidingnet (één op het invalidetoilet en één elders). Warmwatertappunten bevinden zich bij het restaurant (boiler), de werkplaats (boiler), hal 1 (boiler), in de douches van de tennishal (hal 8; boiler die alleen werd gebruikt door de restauranthouder), in het CNB-kantoor (hal 6) en in het Theatercafé van de WF (hal 6; restaurant; twee geisers)^f.

Om tegemoet te komen aan de wensen van standhouders om over een eigen wateraftappunt te beschikken werden in de week voorafgaand aan de WF PE-waterleidingen aangelegd door een installatiebedrijf. Dit bedrijf verzag standhouders op de consumentenbeurs op verzoek van water en afwatering. Hierbij werd gebruik gemaakt van twee bestaande PE-systemen die aanwezig waren in de hallen 3 en 4, waarvan er één het gehele jaar onder druk stond vanwege de sinds vijf jaar aangesloten brandslangen. Vanaf deze systemen werden via koppelstukken van PE diverse stands aangesloten, waar behoefte was aan een eigen watervoorziening. Het drukloze PE-systeem werd in hal 4 in de week voorafgaand aan de WF aangesloten, waarbij gebruik gemaakt werd van één van de bestaande tappunten. Het gehele PE-leidingnet hing, op 4 meter hoogte, aan de spanten van de hallen. Van het totale waterleidingnet is een tekening beschikbaar (zie figuur 4).

Voor het aanleggen van de bloemententoonstelling (in hal 5 en 13) werden bassins gevuld met koud water uit één van de brandslangen in hal 14. Hierin kwamen pompen te liggen, die voor de druk van de fontein zorgden. Het water recirculeerde, maar werd nauwelijks warmer dan de omgevingstemperatuur van 10 tot 15°C. In verband met de brandveiligheid hingen verspreid over de diverse hallen haspels met brandslangen. Voor de WF zijn een aantal van deze slangen van belang: de brandslang van de Mijnsaal (hal 2) was direct op het vaste waterleidingnet aangesloten. In hal 3 en in hal 4 hing een brandslang, die via een PE-leiding aangesloten was op het waterleidingnet. Ook in de hallen 5 (vier stuks), 13 (twee stuks) en 14 (één) hingen brandslangen.

^f Bron: Vertegenwoordiger CNB

4.3.3 Producten die tijdens de Westfriese Flora met water gedemonstreerd werden (WF)

Bij alle onderdelen van de WF werd water gebruikt: in de mijnzaal (hal 2), op de bloemententoonstelling (hal 5 en 13), op de consumentenbeurs (hal 3 en 4) en op de agribeurs (hal 8). In de mijnzaal, waar bloemen en bloembollen geveild werden, stonden emmers met koud water, waarin tulpen werden getoond. Op de bloemententoonstelling stonden in totaal 77 bedrijven met een inzending. De tentoonstelling vond plaats in de hallen 5 en 13 van de CNB. De temperatuur in deze ruimten was 10-15°C, vanwege de houdbaarheid van de bloemen. Warm water werd niet gebruikt. Wel waren elf fonteinen verdeeld over de ruimte (tien kleine en één grote) geplaatst. Iedere fontein bestond uit een bassin en een onder water gelegen pomp. De twee hallen werden gescheiden door een watergordijn (waterval, gebruikmakend van een pomp) waarlangs bezoekers konden passeren^g.

In hal 3 van de consumentenbeurs stonden 52 stands. In negen van deze stands werden potentieel risicovolle producten gebruikt of gedemonstreerd. In hal 4 van de consumentenbeurs ging het om twaalf van de in totaal 71 stands. Op de Agri-beurs in hal 8 stonden in totaal 58 bedrijven met producten gerelateerd aan de bloembollenteelt, waarvan vijf met potentieel risicovolle producten. Warm water werd bij geen van de producten gebruikt. Enkele bollenpelmachines waren in staat koud water te vernevelen. Echter, vanwege de grote plassen water die hierbij zouden ontstaan, werd de verneveling tijdens de WF niet gedemonstreerd^h. Wel werd tijdens de WF een vernevelaar gedemonstreerd in stand 848. In hal 9, waar de kinderboerderij was, werden geen potentieel risicovolle handelingen met water uitgevoerd. In tabel 2 wordt een overzicht gegeven van bedrijven die een stand hadden met mogelijk risicovolle producten/handelingenⁱ.

^g Bron: Vertegenwoordiger van het tuin- en bloemencentrum dat in 1999 belast was met het aanleggen van de bloementuin van de WF

^h Bron: Vertegenwoordiger van machinefabriek stand 838

ⁱ Bron: Organisatie van de WF; telefonische enquête door CIE/RIVM; interviews door Inspectie W&V

Tabel 2. Overzicht potentieel risicovolle producten op de WF

locatie	standnr	Potentieel risicovol product
Hal 2	-	Emmers gevuld met koud water waarin bloemen
Hal 3	301	Bloemen en planten
	309	Whirlpool (tevens: bak met koud water en fontein)
	318	Kaarsenmakerij met au-bain-Marie
	322	Airconditioningsapparaat in de stand
	323	Zeemdemonstratie
	327	Stoomreinigers (boiler met watertemperatuur van 100 °C)
	335	Anti-condens apparatuur
	337	Bubbelbad
	355	Anticondensmiddel voor brillen
Hal 4	405	Whirlpool
	409	Airconditioningsapparaat in de stand
	410	Strijkbout
	411	Bruisbad met koud water, stoomcleaner 100 °C
	414	Luchtbevochtigers voor in huis demonstratie (stoom-waterkoker)
	436	Drinkwatercontainers om water te zuiveren
	437	Demonstratie staafmixer: soep werd gemaakt met water uit waterleiding ter plekke
	447	Demonstratie schoonmaakdoek: koud water van de WF werd met een bloemenspuit op en ruit gespoten en schoongemaakt
	451	Demonstratie schoonmaakdoek: koud water van de WF werd met een bloemenspuit op en ruit gespoten en schoongemaakt
	453	Besproeien van planten in kassen
	454	Vernevelen van planten
	458	Zelfgemaakte kamerfontein gevuld met van huis meegebracht water
Hal 5 & 13	-	Elf fontein; watergordijn; emmers gevuld met koud water waarin bloemen
Hal 8	835	Bakken met water uit de hal
	838	Vernevelaar die niet gedemonstreerd werd tijdens de WF
	846	Druppelirrigatie voor open grond, kraanwater van WF; leidingen, slangen, vochtmeetapparatuur
	848	Vernevelaar (tank met water, 5 dagen gestaan, temperatuur omgeving), sproeide regelmatig
	851	Bollen in potgrond en in water

4.4. Een overzicht, per compartiment, van watergebruik voor, tijdens en na de WF

De beschrijving valt uiteen in drie onderdelen: Het aanvoerende waterleidingnet van het PWN (3.4.1.), het waterleidingsysteem van de CNB-hallen (3.4.2.) en potentieel risicovolle producten op de WF (3.4.3.).

4.4.1. Watergebruik PWN-compartiment

Het PWN ging na of er in de weken voorafgaande aan de WF veranderingen zijn toegepast, onderhoud was gepleegd of reparaties waren uitgevoerd aan de aanvoerleidingen. Er was in die periode niets veranderd^j.

^j Bron: Vertegenwoordiger Provinciaal Waterleidingbedrijf Noord-Holland

4.4.2. Watergebruik CNB-compartiment

De CNB ging na of er in de weken voorafgaand aan de WF veranderingen waren toegepast, onderhoud was gepleegd of reparaties waren uitgevoerd aan de aanvoerleidingen. Er was in die periode niets veranderd^k.

De brandslangen werden één keer per jaar functioneel geïnspecteerd. De laatste keer dat dit gebeurde was in maart 1998. Tijdens de WF werd door diverse standhouders gebruik gemaakt van deze slangen om water te tappen.

Het installatiebedrijf dat tijdelijke leidingen aanlegde, volgde dezelfde werkwijze als voorafgaande jaren. Een week voorafgaand aan de WF zijn er tijdelijke aansluitingen van de PE-leiding naar de stands in hal 3 en in hal 4 afgetakt en is de leiding in beperkte mate doorgespoeld door een medewerker van het installatiebedrijf. Dit gebeurde tijdens het testen op lekkage, telkens als een nieuwe stand werd aangesloten. In totaal werden vanaf 12 februari 1999 zeventien bedrijven door het installatiebedrijf van een wateraansluiting voorzien. In bijlage 4 is aangegeven in welke chronologische volgorde het aansluiten gebeurde. Op de plattegrond van pagina 32 zijn deze stands met blauw aangegeven.

4.4.3. Watergebruik WF-compartiment

Bijlage 5 omvat een gedetailleerde beschrijving van het watergebruik van producten die tijdens de WF met water gedemonstreerd werden in de te onderscheiden delen van de WF: in de mijnzaal (hal 2), op de bloemententoonstelling (hal 5 en 13), op de consumentenbeurs (hal 3 en 4) in op de agribeurs (hal 8).

Hieronder wordt deze beschrijving samengevat in tabel 3.

Tabel 3: Overzicht van watergebruik bij potentieel risicovolle producten

Loka- tie	Nr.	Product	1e tap	Plaats	Vol. (l)	Temp. (°C)	Aërosol- vorming	Hande- ling	Freq.	Desin- fectie	Bijvul- len	Plaats	vol. (l)	Freq.	Totaal vol. (l)
Hal 2	-	Bloemen	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Omge- ving	Neen	Opslag bloemen	N.v.t.	Neen	Neen	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	Onbe- kend
Hal 3	301	Bloemen	Onbe- kend	Niet van CNB	100	Omge- ving	Neen	Bloemen in bak water	Dage- lijks	Neen	Neen	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	100
		Planten	15-02	Toilet hal 3	Onbe- kend	Omge- ving	Neen	Dompe- len plant	Dage- lijks	Neen	Ja	Toilet hal 3	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend

^k Bron: Vertegenwoordiger CNB

Tabel 3, vervolg

Loka- tie	Nr.	Product	1e tap	Plaats	Vol. (l)	Temp. (°C)	Aëro sol- Vorm ing	Hande- ling	Freq.	Desin- fectie	Bijvul- len	Plaats	Vol. (l)	Freq.	Totaal Vol. (l)
	309	Whirlpool	17-02	Brand- slang hal 3	1000	37-38	Ja	Demo bruisen	Conti- nu	Neen ¹	Ja	Brand- slang hal 3	150	1x; 23-02	1150
		Waterzuil	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Omge- ving	Neen	Geen	N.v.t.	Neen	Neen	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	Onbe- kend
	318	Kaarsen	Onbe- kend	Toilet Hal 3	Onbe- kend	70	Neen	Smelten kaarsvet	Conti- nu	Neen	Neen	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	Onbe- kend
	322	Matras- sen; airco	N.v.t. ^m	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	n.v.t.
	323	Zemen	19-02	Stand 324	5	Omge- ving	Neen	Schoon- maken spiegel	Elke demo	Neen	Ja	Stand 324	16	10	160
	327	Stoom- reiniger	Onbe- kend	Toilet Hal 3	Onbe- kend	100 ⁿ)	Neen	Onbe- kend	Onbe- kend	Neen	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend
	335	Anti- Condens middel	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	100	Neen	Bril in stoom houden	Elke demo	Neen	Ja	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend
	337	Bubbel- mat	Onbe- kend	Brand- slang hal 3 of hal 4	Onbe- kend	Omge- ving	Ja	Demo bubbe- len	Conti- nu	Neen	Ja	Brand- slang hal 3 of 4	Onbe- kend	Vier keer	Onbe- kend
	355	Brillen- reiniger ^o	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	100	Nee	Bril reini- gen met tissue	Conti- nu	Neen	Ja	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend
Hal 4	405	Whirlpool	17-02	Brand- slang hal 2	600	37-38	Ja	Demo bruisen	Enige malen	Neen	Ja	Brand- slang hal 4	600	1x; 23 of 24-02	1200
	409	Potten en airco	N.v.t. ^p	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
	410	Stoom- strijkijzer	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	100 ^q	Nee	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend
	411	Bubbel- mat	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Omge- ving	Ja	Demo bubbe- len	Conti- nu	Neen	Ja	Onbe- kend	Onbe- kend	1x per 2 dagen	Onbe- kend
	414	Anti- condens middel	19-02 19-02	Tap- punt hal 4 Tap- punt hal 4	Onbe- kend 5	100 Omge- ving	Nee Ja	Bril in stoom houden Bespui- ten ruit	Conti- nu Per demo	Ja, met chloor neen	Ja Chloor- bleek	Tap- punt hal 4 2 tap- punten hal 4	Onbe- kend 5	Onbe- kend 2x daags	Onbe- kend 100

¹ Was voor desinfectie voorzien van een ozongenerator, die echter dusdanig afgesteld was, dat deze bij maximale werking van de pomp afsloeg.

^m Airconditioning systeem bleek geen water te gebruiken

ⁿ Volgens opgave standhouder. In de stand werden ook stoomstrijkijzers verkocht, die echter niet gedemonstreerd werden

^o Achteraf bleek een in deze stand gebruikte waterkoker niet gebruikt te zijn om brillen in stoom te houden, maar om thee te zetten

^p Airconditioning systeem bleek geen water te gebruiken

^q Volgens opgave van fabrikant

Tabel 3, vervolg

Loka tie	Nr.	Product	1e tap	Plaats	Vol. (l)	Temp. (°C)	Aërosol- vorming	Hande- ling	Freq.	Desin- fectie	Bijvul- len	Plaats	Vol. (l)	Freq.	Totaal Vol. (l)
	436	Osmose appa- raatuur	N.v.t. ^r	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
		Drinkwa- ter coolers	N.v.t. ^s	N.v.t.	N.v.t.	4	Nee	Uitdelen bekertje water	Per demo	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
	437	Staaf- mixer	19-02	Eigen water	Onbe- kend	Omge- ving	Nee	Schoon- spoelen	Na enkele de-mo's	Neen	Ja	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
	447	Schoon- maak doekje	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Omge- ving	Neen	Bevocht- tigen doek	Per demo	Neen	Ja	Toilet Hal 9	Onbe- kend	1x per drie dagen	Onbe- kend
	451	Schoon- maak doekje	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Omge- ving	Neen	Schoon- spoelen doek	Onbe- kend	Neen	Ja	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend
	453	Kassen	18-02	Brand- slang hal 4	Onbe- kend	24	Neen	Begieten zand en potgrond	Één- malig	Neen	Neen	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
	454	Planten	17-02	Tap- punt hal 4	1	Omge- ving	Ja	Bespui- ten planten	2x daags	Neen	Ja	Tap- punt hal 4	1	2x daags	20
	458	Potten en water- fontein	N.v.t. ^t	N.v.t.	N.v.t.	Omge- ving	Ja	Geen	N.v.t.	Neen	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
Hal 5 & Hal 13	N.v.t.	Fontei- nen	15-02	Brand- slang hal 8	Onbe- kend	Omge- ving	Ja	N.v.t.	Continu	Neen	Neen	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	Onbe- kend
	n.v.t.	Bloemen	Onbe- kend	Brand- slang hal 8	Onbe- kend	Omge- ving	Neen	Begieten bloemen	Dage- lijks	Neen	Ja	Brand- slang hal 8	Onbe- kend	Dage- lijks	Onbe- kend
Hal 8	835	Bloemen	22-02	Onbe- kend	Onbe- kend	Omge- ving	Neen	Begieten bloemen	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend	Onbe- kend
	838	Land- bouw machine	N.v.t. ^u	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.
	846	Irrigatie- systeem	22-02	Tap- punt hal 8	10	Omge- ving	neen	Drup- pen	Conti-nu	Geen	Ja	Tap- punt hal 8	2	1x; 25-02	12
	848	Verneve- laar	24-02	Tap- punt hal 8	30 tot 50	Omge- ving	ja	Demo verne- velen	1x per 2 uur plus demo's	Geen	Neen	N.v.t.	N.v.t.	N.v.t.	Onbe- kend
	851	Bollen	22-02	Tap- punt hal 8	75	Omge- ving	neen	Opslag	N.v.t.	Neen	Ja	Tap- punt hal 8	10	Onbe- kend	Onbe- kend

^r Hierbij bleek geen water gebruikt te zijn^s Gezuiverd en gekoeld drinkwater dat te drinken werd aangeboden^t Waterfontein werd gevuld met gedestilleerd water^u Bollenpelmachine met vernevelaar, bleek niet gebruikt te zijn tijdens de WF (Bron: vertegenwoordiger machinefabriek stand 838)

4.5. Een overzicht van potentieel risicovolle producten, ingedeeld in vier risicocategorieën

Aan de hand van acht criteria (zie pagina 10) en gebruik makend van bovenstaande gegevens werd een risico-inschatting gemaakt van het watergebruik in een stand. Door aan de aanwezigheid van elke van de acht criteria één punt toe te kennen, werd het watergebruik in de diverse stands gescoord. In tabel 4 wordt per stand aangegeven hoe de score tot stand kwam.

De meeste potentieel risicovolle producten blijken aan de hand van de acht gebruikte criteria een verwaarloosbaar risico op te leveren (1 of 2 punten). In totaal zestien producten (waaronder een groep van elf fonteinën) bleken enigszins tot zeer risicovol en werden daarom aangemerkt als potentiële bron (zie tabel 5).

Op figuur 5 zijn de scores in een viertal kleuren ingetekend in een plattegrond van de tijdens de WF gebruikte CNB-hallen. De volgende indeling in categorieën is gebruikt:

1. Blauw: 1 of 2 punten (verwaarloosbaar risico)
2. Geel: 3 of 4 punten (enig risico)
3. Oranje: 5 of 6 punten (risicovol)
4. Rood: 7 of 8 punten (zeer risicovol)

Zeventien stands met een eigen wateraansluiting (zie bijlage 4) zijn eveneens op deze plattegrond terug te vinden. Aangezien in deze stands water vooral voor huishoudelijke doeleinden gebruik werd (spoelen, afwassen, koffie en thee zetten), scoorden zij volgens de bovenbeschreven criteria laag (1 of 2 punten; verwaarloosbaar risico) en zijn in de plattegrond blauw ingetekend. Bij drie van hen (411, 440, en 824) was een boiler aangesloten voor warm water met een temperatuur boven de 70°C.

Tabel 4. Overzicht risico-score potentieel risicovolle producten

Lokatie	Nr.	Product	Water	Temp. Groei	Temp. 37°C	Ontbreken desinfectie	Niet ver- versen water	Aërosol- vorming	Continu	Groot oppervlak	Totaal
hal 2	-	Bloemen	1	0	0	0	0	0	0	0	1
hal 3	301	Bloemen	1	0	0	0	0	0	0	0	1
		Planten	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	309	Whirlpool	1	1	1	1	1	1	1	1	8
		Waterzuil	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	318	Kaarsen	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	323	Zemen	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	327	Stoom- reiniger	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	335	Anti- Condens middel	1	0	0	0	0	0	0	0	1
hal 4	337	Bubbel- mat	1	0	0	0	0	1	1	1	4
	405	Whirlpool	1	1	1	1	0	1	0	1	6
	410	Stoom- strijkijzer	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	411	Bubbelmat	1	0	0	0	0	1	1	1	4
	414	Anticonde ns middel, stoom	1	0	0	0	0	0	0	0	1
		Anticonde ns middel, sput	1	0	0	0	0	1	0	0	2
	436	Drinkwater coolers	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	437	Staafmixer	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	447	Schoon- maak doekje	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	451	Schoon- maak doekje	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	453	Kassen	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	454	Planten	1	0	0	0	0	1	0	0	2
hal 5	-	Fonteinen	1	0	0	0	0	1	1	1	4
	-	Bloemen	1	0	0	0	0	0	0	0	1
hal 8	835	Bloemen	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	846	Irrigatie- systeem	1	0	0	0	0	0	0	0	1
	848	Verneve- laar	1	0	0	0	0	1	0	1	3
	851	Bollen	1	0	0	0	0	0	0	0	1

Tabel 5. Overzicht van potentiële bronnen

Lokatie	Nr.	Product	Water	Temp. Groei	Temp. 37 °C	Ontbreken desinfectie	Niet versen water	Aërosol-vorming	Continu	Groot oppervlak	Totaal
hal 3	309	Whirlpool	1	1	1	1	1	1	1	1	8
	405	Whirlpool	1	1	1	1	0	1	0	1	6
	337	Bubbelmat	1	0	0	0	0	1	1	1	4
hal 4	411	Bubbelmat	1	0	0	0	0	1	1	1	4
hal 5 & 13	-	Fonteinen	1	0	0	0	0	1	1	1	4
hal 8	848	Vernevelaar	1	0	0	0	0	1	0	1	3

4.6. Een overzicht, per compartiment, van alle voor microbiologisch onderzoek beschikbare monsters

Bij het bespreken van de monsters wordt dezelfde volgorde aangehouden als bij het overzicht van de waterketen (PWN, CNB, WF). In bijlage 7 is een overzicht opgenomen van alle monsters die door het SLHa zijn genomen, in bijlage 8 een overzicht van de monsternamen door het Kiwa.

4.6.1. Beschikbare monsters PWN-compartiment

Er werd op 15 maart 1999 en op 19 april 1999 bemonsterd uit twee putten (PWN aansluitingen). De eerste keer hadden de monsters een volume van een liter, de tweede keer een volume van 20 liter. De eerste bemonstering werd gezamenlijk door SLHa en PWN (voor eigen gebruik) uitgevoerd, de tweede door het Kiwa. In totaal werden vier monsters gekweekt door het SLHa, vier door het PWN, en twee door het Kiwa (zie tabel 6).

Tabel 6. Overzicht van de beschikbare monsters van de PWN-aansluitingen

Lokatie	Datum bemonstering	Soort monster	Aantal monsters	Instantie
Put Veilingweg 5	15-03-99	Water	4	SLHa/PWN Kiwa
	19-04-99	Water (20 l)	1	
Put Hoofdstraat 1	15-03-99	Water	4	SLHa/PWN Kiwa
	19-04-99	Water (20 l)	1	



Figuur 5 Overzicht van risicovolle handelingen met water op de Westfriesse Flora

4.6.2. Beschikbare monsters CNB-compartiment

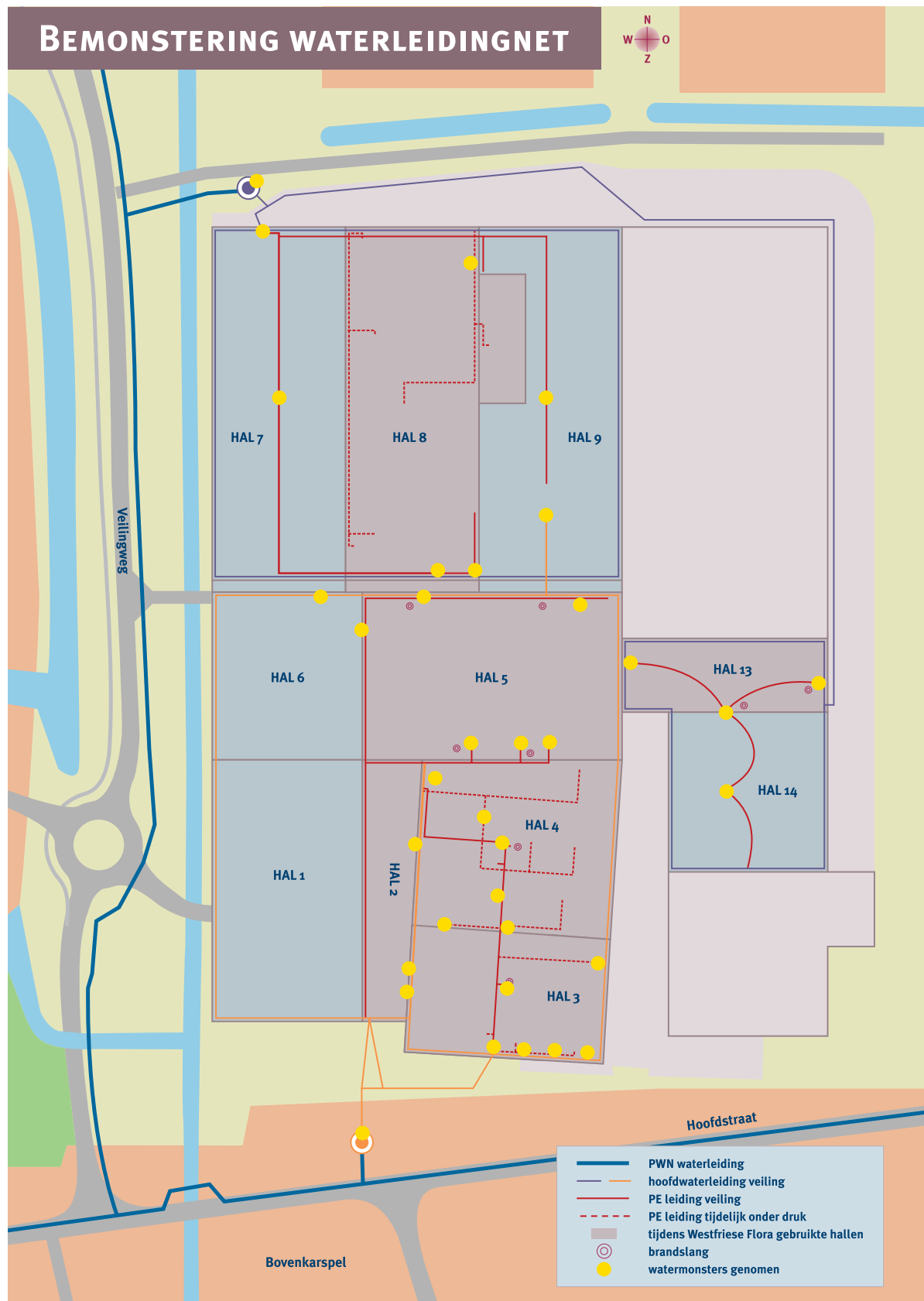
Het inpandige waterleidingnet van de CNB-hallen is bemonsterd op 14 en 16 maart en op 11 mei 1999. Op 14 en 16 maart zijn watermonsters genomen van tappunten in de hallen 2, 3, 4, 5, 6 en 8 (inclusief boilers, geisers en douches). Op 11 mei zijn watermonsters genomen van tappunten van hal 8, 13 en 14. In totaal zijn van het inpandige waterleidingnet 28 watermonsters afgenomen door het SLHa en 7 door het Kiwa.

Van de PE-leidingen in hal 3 en 4 werden op 14, 16 en 20 maart watermonsters genomen. Op 12 april werden zowel watermonsters afgenomen als uitstrijken van de binnenzijde van de leidingen (destructieve monsternamen) en werden diverse onderdelen bemonsterd. In totaal werden van het PE-systeem 22 monsters genomen door het SLHa en 16 monsters door het Kiwa.

Brandslangen, deels aangesloten op het inpandige, deels op het PE-systeem, werden bemonsterd op 14 maart (hal 5 en 13), 20 maart (hal 3, 4 en 5), 12 april (hal 3 en 4; destructief), 4 mei (hal 2), en op 11 mei (hal 7 en 9). In totaal zijn 33 monsters van brandslangen genomen door het SLHa en 21 monster door het Kiwa. Een overzicht van de diverse bemonsterde onderdelen van het waterleidingsysteem van de CNB-hallen is weergegeven in tabel 7 en de plattegrond op figuur 6 geeft een overzicht naar lokatie.

Tabel 7: Overzicht van de beschikbare monsters van de CNB-hallen

Lokatie	Datum bemonstering	Soort monster	Aantal monsters SLHa	Aantal monsters Kiwa
hal 2	16-03-99	Water van wasbak werkplaats CNB-leiding	2	
	04-05-99	Water uit brandhaspel	4	4
		Uitstrijk binnenzijde brandslang	2	2
		Stukken brandslang	2	2
hal 3	14-03-99	Restwater PE-leidingen	1	
		Water tappunt CNB-leiding	1	
	16-03-99	Water van tappunt invalidentoilet	2	
		Water uit reeds verwijderde PE-leiding	2	
		Uitstrijk PE-koppelstuk	1	
	20-03-99	Water uit brandslang	2	
		Uitstrijk mondstuk brandslang	1	
		Water uit afgesloten watermeter	1	
		Spoelsel van PE-leiding	1	
	12-04-99	Restwater PE-leidingen	2	1
		Uitstrijk binnenzijde PE-leidingen	2	3
		Stukken PE-leiding	2	1
		Rubber ring uit PE-koppelstuk	1	1
		Water uit brandslang	2	2
hal 4		Uitstrijk binnenzijde brandslang	1	2
		Stukken brandslang	2	1
	14-03-99	Restwater PE-leidingen	3	
	16-03-99	Water van tappunt wasbak CNB-leiding	2	
		Water uit reeds verwijderde PE-leiding	2	
	20-03-99	Water uit brandslang	2	
		Uitstrijk mondstuk brandslang	1	
	12-04-99	Restwater PE-leidingen	1	2
		Uitstrijk binnenzijde PE-leidingen	1	6
		Stukken PE-leiding	2	2
hal 5		Water uit brandslang	2	1
		Uitstrijk binnenzijde brandslang	1	3
		Stukken brandslang	2	1
	14-03-99	Water tappunt herentoilet	1	
		Water tappunt damestoilet	1	
hal 6		Water uit twee brandslangen	2	
	20-03-99	Water uit brandslang	1	
hal 7	16-03-99	Warm water van boiler	2	
		Warm water van twee geisers	4	
		Water tappunt herentoilet	2	
		Water tappunt damestoilet	2	
hal 8	11-05-99	Water uit brandslang	1	1
hal 9	16-03-99	Water tappunt toilet	2	
	11-05-99	Water tappunt wasbak CNB-leiding	1	1
		Warm water van boiler	1	1
		Water uit vulslang	1	1
		Warm water twee douches	2	2
		Water tappunt aanrecht CNB-leiding	1	1
hal 10	11-05-99	Water uit twee brandslangen	2	2
hal 11	14-03-99	Water uit drie brandslangen	3	
hal 12	11-05-99	Water uit luchtbevochtiger	1	1



Figuur 6 Overzicht van de bemonstering van het waterleidingnet op de Westfriese Flora

4.6.3. Beschikbare monsters WF-compartiment

Alle bedrijven die water gebruikten bij hun demonstraties zijn benaderd voor een eventuele monsternamen. Bij een deel van deze bedrijven is daadwerkelijk bemonsterd (zie tabel 8). In totaal ging het om 145 monsters. Met de bemonstering is gestart op 13 maart 1999. Bij enkele stands werd om uiteenlopende redenen niet bemonsterd (zie tabel 9).

Tabel 8: Overzicht van potentieel risicovolle producten die bemonsterd werden

Lokatie	Standnr.	Datum bemonstering	Soort monster	Aantal monsters	Instantie
Hal 3	309 (whirlpool)	14-03-99	Water	4	SLHa
		18-03-99	Filter	1	SLHa
	309 (waterzuil)	14-04-99	Zie tabel 14	24	SLHa/Kiwa
		18-03-99	Restwater waterzuil	1	SLHa
	335 (brillenreiniger)	14-03-99	Restwater 8 plantenspuiten	14	SLHa
		17-04-99	Restwater	5	SLHa
			Uitstrijken slangen	6	
			Slangen	7	
			Filter	1	
			Uitstrijk sproeikop	1	
			Sproeikop	3	
	337 (bubbelmat)	22-03-99	Uitstrijken bubbelmat	3	SLHa
Hal 4	405 (whirlpool)	15-03-99	Water	5	SLHa
		13-04-99	Spoelsel filter	1	SLHa/Kiwa
			Zie tabel 15	20	
	411 (bubbelmat)	17-03-99	Spoelsel bubbelmat	1	SLHa
		22-03-99	Uitstrijken bubbelmat	6	SLHa
	414 (anticondensmiddel)	14-03-99	Restwater plantenspuit	1	SLHa
			Sproeikop	1	
			Spoelsel afvoerslang	1	
			Restwater opvangbak	1	
		17-04-99	Uitstrijk slang	1	SLHa
			Slang	1	
	436 (osmose apparatuur)	18-03-99	Nieuwe flacons gezuiverd drinkwater	4	SLHa
	447 (schoonmaakdoek)	18-03-99	Restwater plantenspuit	1	SLHa
	454 (plantenhandel)	18-03-99	Plantenspuit	1	SLHa
			Plantengieter	1	
			Restwater emmers	1	
Hal 5 & 13	Bloemententoonstelling	13-03-99	Spoelsel fonteinpompen	5	SLHa
			Uitstrijk sproeikop	1	
			Teelaarde bassin fontein	1	
			Uitstrijk bassin fontein	1	
			Spoelsel PVC pijpen	1	
Hal 8	848 (vernevelaar)	18-03-99	Filter	3	SLHa
			Restwater filter	1	
			Restwater voorraadvat	4	
		03-06-99	Uitstrijk leidingen, kranen	6	SLHa
			Restwater	2	
	846 (irrigatiesysteem)	19-03-99	Uitstrijk slang	1	SLHa
			Restwater	1	
			Spoelsel	1	

Tabel 9. Overzicht van potentieel risicovolle stands die niet bemonsterd werden

Locatie	Standnummer	
Hal 2		In deze hal werden bloemen geveild. De emmers water waarin de te veilen bloemen stonden zijn niet meer bemonsterd.
Hal 3	301 (bloemenstand) 318 (kaarsenmakerij) 323 (zeem) 327 (stoomstrijk apparaat)	De gebruikte bloembakken waren reeds retour naar de veiling in Aalsmeer Au-bain-Marie gebruikt, die ingesteld stond op 70°C en bovendien afgesloten was Alle tijdens de WF gebruikte materialen waren inmiddels droog Hiervan zijn geen monsters. Door het bemonsterteam werd besloten, na de uitleg door een werknemer van de firma, dat het niet zinvol was om te bemonsteren, aangezien naar opgaaf van de fabrikant het gebruikte water altijd tot 100°C verhit werd.
Hal 4	410 (strijkijzer) 437 (staafmixer) 451 (schoonmaakdoekje) 453 (hobbykas) 458 (pottenbakker)	Hiervan zijn geen monsters. Door het bemonsterteam werd besloten, na de uitleg door een werknemer van de firma, dat het niet zinvol was om te bemonsteren, aangezien naar opgaaf van de fabrikant het gebruikte water altijd tot 100°C verhit werd. Alle tijdens de WF gebruikte apparatuur was inmiddels droog De tijdens de WF gebruikte materialen waren niet meer voorhanden Alle tijdens de WF gebruikte materialen waren inmiddels droog Het in de stand aanwezige fonteintje stond inmiddels droog
Hal 8	835 (bloemveiling) 851 (bollenkweker)	De tijdens de WF gebruikte bakken voor bewatering stonden droog Het voor de bollenkweek gebruikte water stond in een afgesloten krat.

De plattegrond op figuur 7 geeft een overzicht van alle bemonsterde stands. In een deel van de blauw ingekleurde stands werden producten gedemonstreerd die als potentieel risicovol waren aangemerkt en die later zonder risico bleken. In een ander deel van de blauw ingekleurde stands was de standhouder voorzien van een eigen wateraansluiting. Niet bij alle blauwgekleurde stands zijn monsters genomen. Wel zijn monsters genomen bij alle potentiële bronnen (geel, oranje en rood gekleurd).

4.7. Kweek en PCR-resultaten van alle beschikbare monsters

Van alle monsters werd een kweek ingezet. Tevens werd van alle watermonsters een *Legionella pneumophila*-PCR bepaling gedaan (SLTi). In het geval van de PE-leidingen, de brandslangen, de whirlpools en de tappunten van de standleidingen werden kweken ingezet door twee laboratoria (SLHa en Kiwa). Water afkomstig uit het aanvoerende systeem van de CNB-hallen werd door drie instellingen bemonsterd en gekweekt (PWN, SLHa en Kiwa).

4.7.1. Kweek en PCR-resultaten PWN-compartment

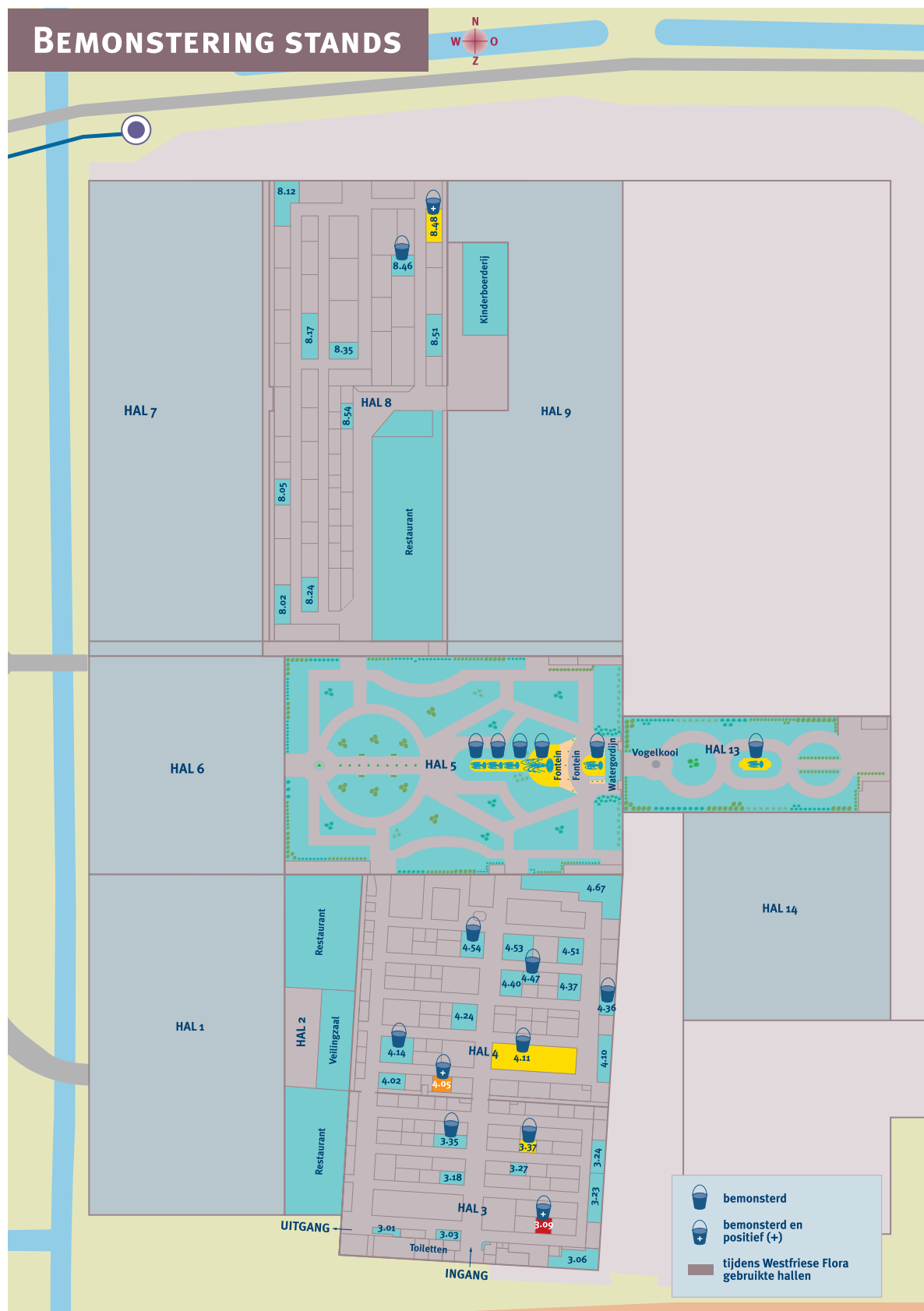
Uit geen van de monsters zijn *Legionella* spp gekweekt. Alle watermonsters waren negatief in de PCR.

4.7.2. Kweek en PCR-resultaten CNB-compartiment

Uit geen van de monsters zijn *Legionella* spp gekweekt. Alle watermonsters waren negatief in de PCR.

4.7.3. Kweek en PCR-resultaten WF-compartiment

Eén van de watermonsters, restwater van de whirlpool in hal 3, was positief in de *Legionella pneumophila*-PCR. Veertien monsters, van in totaal drie apparaten (de whirlpool in hal 3 [W3], de whirlpool in hal 4 [W4] en de vernevelaar in hal 8 [V8]), waren positief in de kweek op *L. pneumophila*. Drie monsters van de eerste bemonsteringsronde waren positief in de kweek (filters van W3, W4 en V8). Elf monsters van inwendige leidingen van W3 en geen van W4, afgenomen circa vier weken na detectie van de outbreak bij de destructieve bemonstering van inwendige leidingen van W3 en W4, waren positief in de kweek. Het restwater van W3 dat op 18/3/99 (5 dagen na detectie van de outbreak) positief was in PCR bevatte mogelijk ook levende legionella-bacteriën, maar kweken van dat restwater lieten steeds, ondanks herhaalde pogingen met verdunning en verhitte, veel en snelle overgroei met allerlei andere bacterie-soorten zien. Het filter van W3 dat bij de eerste bemonstering was afgenomen bevatte eveneens veel andere bacterie-soorten. De eerste kweken waren echter na enkele dagen reeds sterk verdacht voor overvloedige groei van *Legionella* spp (op basis van microscopische beoordeling van Gram-gekleurde preparaten van aaneenliggende morfologisch variabele kolonies op de kweekplaat, aangestipt na 48 uur incubatie van de primaire kweekplaat). Aanvankelijk was ook hier de overgroei met andere bacteriesoorten zo sterk dat het niet lukte de mogelijke *Legionella* spp rein te strijken (hetgeen nodig is voor identificatie en sero- en genotypering). Herhaalde malen werden van resten van het (bij kamertemperatuur en in gesloten plastic zak bewaarde) filter weer kweken ingezet waarbij het opviel dat de storende overgroei met andere bacterie-soorten in de loop der tijd leek af te nemen. Na de eerste niet gelukte isolatiepogingen werden begin april 1999 delen van het filter door het SLHa ook aangeboden aan Kiwa en het medisch microbiologisch laboratorium van het AMC voor parallelle isolatiepogingen. Uiteindelijk slaagden alle drie de laboratoria erin *Legionella pneumophila* uit filter W3 te isoleren door na 48 uur incubatie van een nieuw ingezette kweek de onder de microscoop reeds zichtbare, voor *Legionella* verdachte kolonies rein te strijken. Juist voordat de snel voortgaande overgroei dit weer onmogelijk zou maken. Dr. R. van Ketel (AMC) was de eerste die hierin slaagde, op 13 april 1999, een maand na inname van het filter.



Figuur 7 Overzicht van de bemonsterde stands op de Westfriesse Flora

Alle drie de laboratoria zagen op de primaire positieve kweekplaten van het filter van W3 na 48 uur incubatie reeds vele tientallen (tot honderden) legionella-kolonies. Bij de destructieve bemonstering van inwendige leidingen van W3 door SLHa en Kiwa werd in de kweek van vrijwel alle monsters door SLHa reeds bij de eerste poging tientallen kolonies van *L.pneumophila* aangetroffen, naast opnieuw groei van veel andere bacteriesoorten. Het filter van W4 dat bij eerste bemonstering was afgenomen bevatte geen andere bacterie-soorten (geen overgroei); de eerste kweekpoging was negatief; een enkele weken later ingezette nieuwe kweek van het in een afgesloten plastic zak bewaarde filter werd na 5 dagen positief met een tweetal kolonies van *L. pneumophila*. Bij de destructieve bemonstering van W4, vier weken na detectie van de outbreak, bleek het apparaat naar chloor te ruiken, was de vrije chloor concentratie in restwater 0.64 mg/l, en waren alle kweken negatief. Het filter van V8 dat bij eerste bemonstering was afgenomen bevatte aanzienlijke hoeveelheden andere bacteriesoorten (zij het minder extreem dan filter W3), was bij eerste poging negatief voor *L. pneumophila* en bij een tweede poging kort daarna positief na 5 dagen incubatie, met meer legionella-kolonies op de primaire kweekplaat (circa 20 kolonies) dan die van filter W4 (2 kolonies) en (aanzienlijk) minder kolonies dan die van filter W3 (vele tientallen kolonies). Bij tweede monsterneming waren de kweken negatief. De grote verschillen in aantallen kolonies op de primaire positieve kweekplaten suggereren dat de besmetting van W3 aanzienlijk sterker was dan die van W4 en V8. Dat W3 sterk besmet was werd gesteund door het vinden, bij een tweede, destructieve, bemonstering, van veel *L. pneumophila* in vrijwel alle monsters van inwendige delen van dit apparaat. De tweede, destructieve, bemonstering van W4 bleek negatief maar die bevinding bood geen inzicht, omdat het apparaat inmiddels met chloor gedesinfecteerd was. Tabel 10, 11 en 12 geven een overzicht in de tijd van de kweekbevindingen van de monsters van W3, W4 en V8.

Tabel 10: Kweek en PCR resultaten W3 (de whirlpool in hal 3)

Ronde	Datum	Soort monster	Kweek	Datum uitslag	PCR	Datum uitslag	Herhalingskweek	Datum uitslag	Laboratorium
Eerste	14-03	Water	Negatief; veel en snelle overgroei	25-03	Positief	24-03	Negatief; verminderde overgroei	17-05	AMC SLHa Kiwa
	18-3	Filter	Tientallen verdachte kolonies; veel en snelle overgroei	25-03	N.v.t.	N.v.t.	Tientallen <i>Legionella</i> kolonies, verminderde overgroei. Kiwa: honderden kolonies; weinig overgroei	13-04 15-04 01-06	
Tweede	14-04	Water	Tientallen <i>Legionella</i> kolonies; overgroei	17-04	Niet verricht	-	Niet verricht	-	SLHa
		Uitstrijk leiding	Tientallen <i>Legionella</i> kolonies; overgroei	17-04	Niet verricht	-	Niet verricht	-	SLHa; Kiwa ^v

Tabel 11: Kweek en PCR resultaten W4 (de whirlpool in hal 4)

Ronde	Datum	Soort monster	Kweek	Datum uitslag	PCR	Datum uitslag	Herhalingskweek	Datum uitslag	Laboratorium
Eerste	15-03	Water	Negatief; geringe overgroei	28-03	Negatief	08-04	Niet verricht	-	SLHa
		Filter	Negatief; geringe overgroei	28-03	N.v.t.	N.v.t.	Twee <i>Legionella</i> kolonies, geringe overgroei	06-04	
Tweede	13-04	Water	Negatief; geringe overgroei ^w	23-04	Niet verricht	-	Niet verricht	-	SLHa
		Uitstrijk leiding	Negatief; geringe overgroei	23-04	Niet verricht	-	Niet verricht	-	

Tabel 12: Kweek en PCR resultaten V8 (de vernevelaar in hal 8)

Ronde	Datum	Soort monster	Kweek	Datum uitslag	PCR	Datum uitslag	Herhalingskweek	Datum uitslag	Laboratorium
Eerste	18-03	Water	Negatief; overgroei	29-03	Negatief	08-04	Negatief; geringe overgroei	17-05	SLHa
		Filter	Negatief; geen overgroei	29-03	Niet verricht	-	Twintig <i>Legionella</i> kolonies; overgroei	26-03	
Tweede	03-06	Water	Negatief; geen overgroei	13-06	Niet verricht	-	Niet verricht	-	SLHa
		Uitstrijk leiding	Negatief; geen overgroei	13-06	Niet verricht	-	Niet verricht	-	

^v alleen kwalitatieve rapportage: positieve kweek^w Vrij chloor concentratie in het restwater was 0,64 mg/l

4.8. Typeringsresultaten

Hieronder worden de resultaten van sero- en genotypering van de patiëntenisolaten en van de omgevingsisolaten beschreven en getoond. Vervolgens is in drie tabellen de herkomst van de verschillende omgevingsisolaten te zien, aan de hand van de diverse bemonsterde onderdelen van de drie kweek-positieve apparaten.

4.8.1. Patiënt-isolaten

In totaal 29 *L. pneumophila* isolaten zijn ingezonden naar LIS/RIVM, welke volgens opgave van inzendende medisch microbiologische laboratoria afkomstig waren van patiënten met pneumonie die de Flora bezocht hadden. De eerste werd ontvangen op 16 maart (drie dagen na detectie van de outbreak), de laatste op 7 mei 1999. Alle 29 patiënten van wie een isolaat was ingezonden bleken voor te komen in het sinds het begin van de legionella-epidemie bijgehouden casus-register (zie ook pagina 5). Bij alle andere patiënten in het casus-register was de kweek negatief of niet verricht en was de diagnose legionella-pneumonie met een alternatieve methode gesteld (vooral: urine-antigeen test en serologie). De betreffende 29 ingezonden patiënt-isolaten omvatten dus hoogstwaarschijnlijk alle bij Flora-patiënten (in Nederland) geïsoleerde *Legionella* spp.

Steeds na ontvangst van één of enkele stammen werd genotypering verricht met de ERIC-PCR en de REP-PCR methode (snelle methode), gevolgd door genotypering met de meer bewerkelijke PFGE methode. Bij volgende experimenten werden steeds patiënt-isolaten van de eerdere experimenten meegenomen om mogelijke lichte veranderingen van patronen, die geïnduceerd kunnen worden door dag tot dag variaties in testomstandigheden, te ondervangen. Dit bezwaar van matige dag tot dag reproduceerbaarheid geldt vooral voor de ERIC/REP-PCR.

Achtentwintig van de 29 patiëntenisolaten waren serogroep 1 (O1) en hadden onderling identieke DNA-fingerprint patronen in zowel PFGE (het patroon werd provisorisch P1 genoemd) als ERIC (provisorisch E1 genoemd) en REP (provisorisch R1 genoemd). Dit genotype (O1/P1E1R1) werd “Bovenkarspel-1” (B-1) genoemd. Eén patiëntenisolaat was eveneens serogroep O1 maar had een afwijkend genotype (O1/P3E3R3), welke “Bovenkarspel-2” (B-2) werd genoemd. Gezien het onverwachte van die bevinding werd aan het inzendend laboratorium gevraagd het genotypisch afwijkende isolaat opnieuw in te zenden. Met dit nieuw ingezonden isolaat werden vervolgens dezelfde bevindingen gedaan zodat vergissing of verwisseling kon worden uitgesloten.

De verzamelde patiëntenisolaten werden vervolgens in AFLP getest (SLTi). De resultaten waren identiek aan die van de andere typeermethoden: B-1 stammen hadden onderling identieke AFLP patronen en de B-2 stam had een daarvan afwijkend AFLP patroon. De figuren op pagina 47 en 48 zijn respectievelijk de PFGE patronen en de AFLP patronen van de patiëntenisolaten weergegeven naar mate van overeenkomst tussen de patronen (dendrogram). Behoudens patiëntenisolaat 25 (RIVM-nummer 99-080, een B-2 stam) vallen alle patiëntenisolaten in één genotypisch identiek cluster (B-1), zowel in PFGE als AFLP. Niet-gerelateerde *L. pneumophila* serogroep O1-isolaten van patiënten die de Flora niet hadden bezocht en die de infectie uit een bekende andere bron hadden verkregen, gaven volstrekt andere en onderling verschillende patronen te zien (in PFGE de RIVM-nummers 99-76, 99-127, 99-126 en 99-94; in AFLP de RIVM-nummers 99-76 en 99-94).

4.8.2. Omgevingsisolaten

Bij SLHa leverde serotypering van 16 aselekt gekozen *L. pneumophila*-kolonies van de primaire positieve kweekplaat van filter W3 15x O1 en 1x O6 op. Dit suggereert dat O1 stammen kwantitatief dominant waren. Eén opgekweekte kolonie van O1 en de ene opgekweekte kolonie van O6 werden aangeboden voor genotypering. De O1 stam bleek het B-1 patroon te hebben. De O6 stam had een uniek patroon, O6/P7E7R7, en werd B-3 genoemd (niet aangetroffen bij patiënten).

Bij Kiwa leverde serotypering van 18 aselekt gekozen kolonies van de primaire positieve kweekplaat van filter W3 18x O1 op. Alle 18 opgekweekte kolonies werden separaat aangeboden voor genotypering. Dertien van de 18 stammen bleken B-1 te zijn en vijf van de 18 stammen B-2. Dit suggereert dat het filter meer B-1 dan B-2 stammen bevatte.

Bij AMC leverde serotypering van enkele kolonies van de primaire positieve kweekplaat van filter W3 O1 op. Genotypering van het ingezonden isolaat gaf patroon B-1.

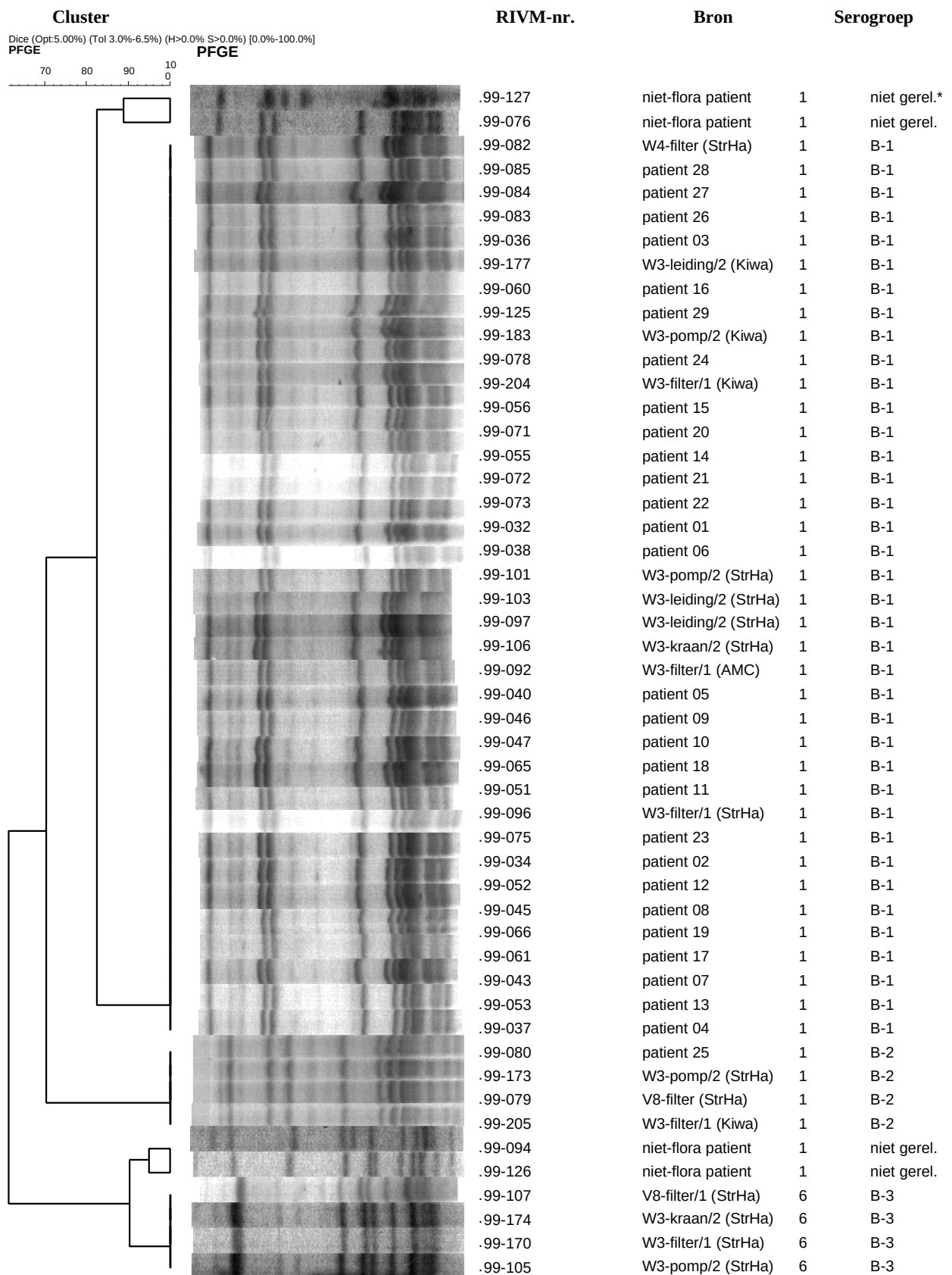
Bij SLHa leverde serotypering van multiële kolonies van de primair positieve kweekplaten van monsters van inwendige leidingen van W3 voor de meeste O1 en voor enkele O6 op. Dit suggereert dat O1 stammen in grotere mate aanwezig waren dan O6 stammen. Zes reingekweekte kolonies van O6 en tien reingekweekte kolonies van O1 werden separaat aangeboden voor genotypering. Alle zes O6 kolonies waren type B-3. Zes van de tien O1 kolonies waren type B-1 en vier van de tien type B-2. Dit laatste suggereert dat B-1 meer voor kwam dan B-2.

Bij Kiwa leverde serotypering van negen kolonies van de primaire positieve kweekplaten van inwendige leidingen van W3 bij alle negen kolonies O1 op. Alle negen kolonies werden na reinkweken aangeboden voor genotypering en alle waren B-1. Dit lijkt te bevestigen dat B-1 in inwendige leidingen van W3 dominant was.

De twee kolonies op de primaire positieve kweekplaat van filter W4 waren serogroep O1. Eén kolonie werd opgekweekt en aangeboden voor genotypering hetgeen B-1 opleverde.

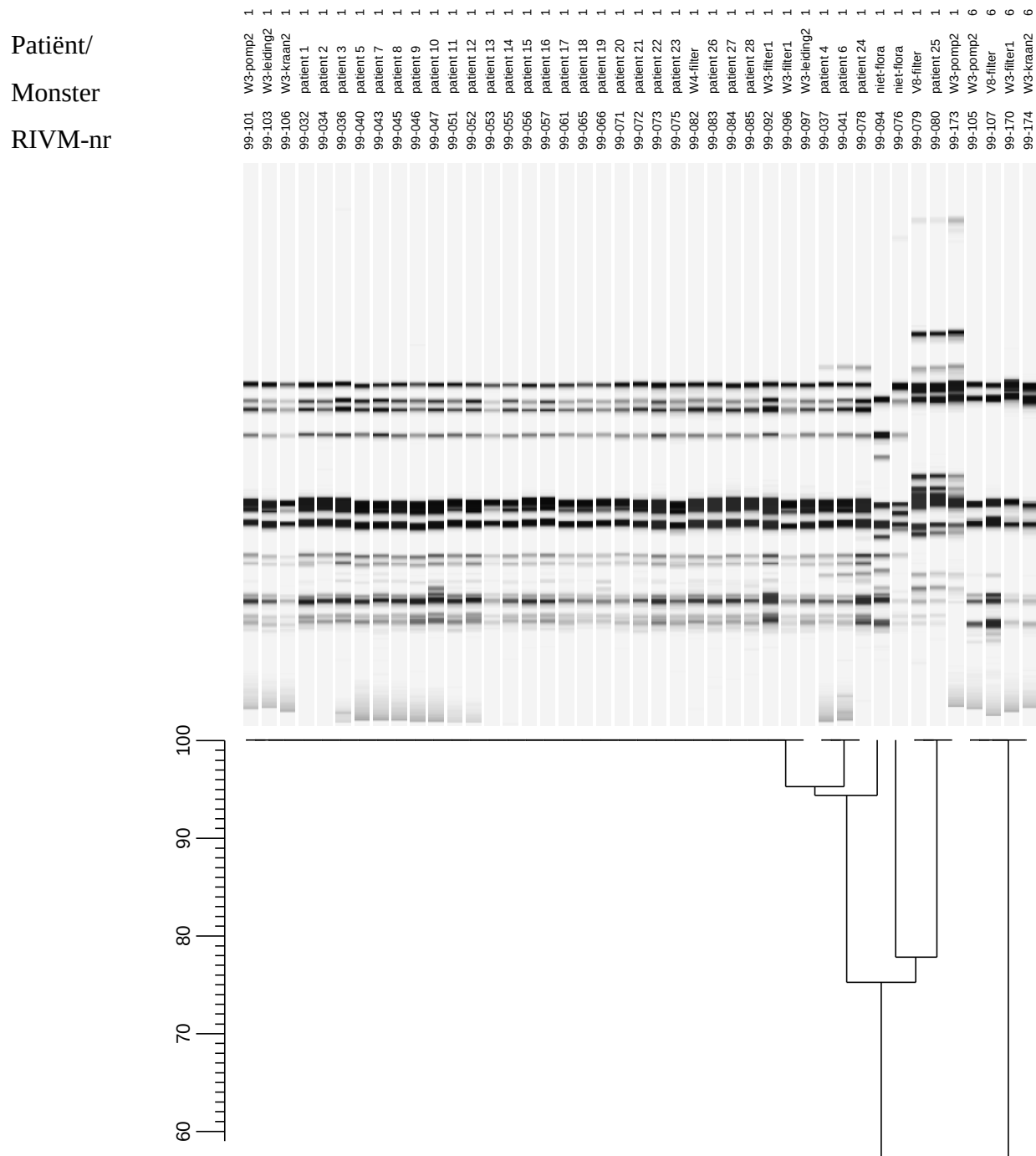
Van de primaire positieve kweekplaat van filter V8 werden van een tiental koloniesserotypering uitgevoerd: één was O6 en de anderen waren O1. Dit suggereert dat O1 aanzienlijk meer voorkwam in het filter dan O6. De O6 stam en één van de O1 stammen werden aangeboden voor genotypering: de O6 stam was B-3 en de O1 stam was B-2.

Op figuur 8 en figuur 9 zijn de PFGE en AFLP-dendrogrammen te zien (verklaring op pagina 47). In tabel 13 worden de typeerresultaten samengevat, vervolgens geven de tabellen 14 (W3), 15 (W4) en 16 (V8) een overzicht van de herkomst van de verschillende genotypen per apparaat.



- niet gerel. = niet gerelateerd aan de Flora

Figuur 8 Dendrogram van PFGE van *L. pneumophila*-isolaten van patiënten die de WF bezochten en van de *L. pneumophila*-isolaten uit apparatuur



Tabel 13. Samenvatting van de typeer-resultaten van L. pneumophila in drie apparaten

Apparaat	Whirlpool hal 3	Whirlpool hal 4	Vernevelaar hal 8
Genotypen	B-1, B-2 en B-3	B-1	B-2 en B-3

Verklaring van de dendrogrammen

W3-filter/1: betekent dat de betreffende stam (waarvan het DNA-fingerprint patroon getoond wordt) afkomstig is uit kweek van filter van whirlpool hal 3 welk filter bij de eerste bemonstering verkregen was.

W3-pomp/2: betekent dat de betreffende stam afkomstig is van kweek van uitstrijk van pomp van whirlpool hal 3 bij tweede destructieve bemonstering.

W4: whirlpool hal 4.

V8: vernevelaar hal 8.

Patiënt 1 t/m 29: de 29 kweek-positieve legionella-pneumonie-patiënten die ziek werden na bezoek aan de Flora (genummerd naar volgorde van binnenkomst van de isolaten bij RIVM-LIS).

Niet-Flora-patiënt: legionella-pneumonie-patiënten die de besmetting met zekerheid uit een andere bron (dan de Flora) hebben verkregen (controles).

De serogroep 6 isolaten uit de filters van W3 en V8 en uit de inwendige leidingen van W3 hebben onderling identieke patronen (cluster B-3). O1-isolaten uit filters van W3 en V8 en uit de inwendige leidingen van W3 hebben onderling identieke patronen gelijk aan dat van patiënt 25 en vormen cluster B-2. O1-isolaten uit filters van W3 en W4 en inwendige leidingen van W3 zijn identiek aan de meerderheid van de patiënt-isolaten en behoren tot cluster B-1.

In de tabellen 14, 15 en 16 wordt een overzicht gegeven van de herkomst van de drie verschillende genotypen.

Tabel 14. Resultaten van bemonstering en kweek op Legionella spp stand 309 (whirlpool)

Laboratorium	SLHa	Kiwa
Datum monstername	14-03-99	
Soort monster	Restwater uit pomp	
Aantal monsters	2	
<i>Legionella pneumophila</i>	in beide monsters niet aantoonbaar	
Datum monstername	14-03-99	
Soort monster	Restwater uit pomp	
Aantal monsters	2	
<i>Legionella pneumophila</i>	in beide monsters niet aantoonbaar	
Datum monstername	14-03-99	
Soort monster	Restwater	
Aantal monsters	1	
PCR	Positief	
Datum monstername	18-03-99	18-03-99
Soort monster	Filter	filter
Aantal monsters	4	4
<i>Legionella pneumophila</i>	Aanwezig	aanwezig
Genotype	B-1 en B-3	B-1 en B-2
Datum monstername	14-04-99	14-04-99
Soort monster	water uit interne leiding	water uit interne leiding
Aantal monsters	2	2
<i>Legionella pneumophila</i>	Aanwezig	in beide monsters niet aantoonbaar
Genotype	B-1 ^{x)}	
Datum monstername	14-04-99	14-04-99
Soort monster	Uitstrijk van interne leiding	uitstrijk van interne leiding
Aantal monsters	4	5
<i>Legionella pneumophila</i>	Aanwezig	aanwezig
Genotype	B-1, B-2 en B-3	B-1
Datum monstername	14-04-99	14-04-99
Soort monster	Uitstrijk van pomp	uitstrijk van pomp
Aantal monsters	1	3
<i>Legionella pneumophila</i>	Niet aantoonbaar	aanwezig
Genotype		B-1
Datum monstername	14-04-99	14-04-99
Soort monster	Uitstrijk van koperen kraan	uitstrijk van koperen kraan
Aantal monsters	1	1
<i>Legionella pneumophila</i>	Aanwezig	niet aantoonbaar
Genotype	B-1	
Datum monstername	14-04-99	14-04-99
Soort monster	Uitstrijk van twee rubber ringen	één rubber ring, twee kraanleertjes
Aantal monsters	2	3
<i>Legionella pneumophila</i>	in beide monsters niet aantoonbaar	in geen van drie monsters aantoonbaar

^x Serogroep 1; Eén band verschil in ERIC/REP t.o.v. patronen, zoals die bij 28 patiënten-isolaten, gerelateerd aan de epidemie van Bovenkarspel, aangetroffen zijn (B-1).

Tabel 15. Resultaten van bemonstering en kweek op *Legionella* spp stand 405 (whirlpool)

Laboratorium	SLHa	Kiwa
Apparaat	Whirlpool	Whirlpool
Datum monstername	15-03-99	
Soort monster	Restwater uit bassin	
Aantal monsters	5	
<i>Legionella pneumophila</i>	in geen van de vijf monsters aantoonbaar	
Datum monstername	15-03-99	
Soort monster	Filter	
Aantal monsters	4	
<i>Legionella pneumophila</i>	Aanwezig	
Genotype	B-1	
Datum monstername	13-04-99	
Soort monster	Uitstrijk binnenzijde kuip	
Aantal monsters	1	
<i>Legionella pneumophila</i>	Niet aantoonbaar	
Datum monstername	13-04-99	13-04-99
Soort monster	Water uit pomp	water uit pomp
Aantal monsters	1	2
<i>Legionella pneumophila</i>	Niet aantoonbaar	niet aantoonbaar
Datum monstername	13-04-99	13-04-99
Soort monster	Water uit inblaasopening	water uit inblaasopening
Aantal monsters	1	2
<i>Legionella pneumophila</i>	Niet aantoonbaar	niet aantoonbaar
Datum monstername	13-04-99	13-04-99
Soort monster	Uitstrijk van inblaasopening	uitstrijk van inblaasopening
Aantal monsters	1	1
<i>Legionella pneumophila</i>	Niet aantoonbaar	niet aantoonbaar
Datum monstername	13-04-99	13-04-99
Soort monster	Uitstrijk van pompleiding	uitstrijk van pompleiding
Aantal monsters	1	1
<i>Legionella pneumophila</i>	Niet aantoonbaar	niet aantoonbaar
Datum monstername	13-04-99	13-04-99
Soort monster	Mondstuk heater	mondstuk heater
Aantal monsters	1	2
<i>Legionella pneumophila</i>	Niet aantoonbaar	niet aantoonbaar
Datum monstername	13-04-99	13-04-99
Soort monster	Rubber ring waterinlaat	rubber ring afsluiter
Aantal monsters	1	1
<i>Legionella pneumophila</i>	Niet aantoonbaar	niet aantoonbaar
Apparaat	Whirlpool	whirlpool
Datum monstername	13-04-99	19-04-99 en 10-05-99
Soort monster	Inblaasroosters	inblaasroosters
Aantal monsters	1	1
<i>Legionella pneumophila</i>	Niet aantoonbaar	niet aantoonbaar
Datum monstername		13-04-99
Soort monster		water uit kuip
Vrij chloor (mg/l)		0,64

Tabel 16. Resultaten van bemonstering en kweek op *Legionella* spp stand 848 (vernevelaar)

Laboratorium	SLHa	Kiwa
Apparaat	Vernevelaar	vernevelaar
Datum monstername	18-03-99	
Soort monster	Restwater uit voorraadvat	
Aantal monsters	4	
<i>Legionella pneumophila</i>	niet aantoonbaar	
Datum monstername	18-03-99	
Soort monster	Restwater uit filter	
Aantal monsters	1	
<i>Legionella pneumophila</i>	Niet aantoonbaar	
Datum uitslag		
Datum monstername	18-03-99	
Soort monster	Filter	
Aantal monsters	3	
<i>Legionella pneumophila</i>	Aanwezig	
Datum uitslag		
Genotype	B-2 en B-3	
Datum monstername	03-06-99	
Soort monster	Restwater uit vat	
Aantal monsters	1	
<i>Legionella pneumophila</i>	Niet aantoonbaar	
Datum monstername	03-06-99	
Soort monster	Uitstrijken leidingen en kraan	
Aantal monsters	6	
<i>Legionella pneumophila</i>	Niet aantoonbaar	
Datum monstername	03-06-99	
Soort monster	Restwater bij pomp	
Aantal monsters	1	
<i>Legionella pneumophila</i>	Niet aantoonbaar	

5. Discussie

In dit hoofdstuk worden de volgende onderwerpen besproken:

- 5.1. Volledigheid en sensitiviteit van de bemonstering
- 5.2. Bijdrage van verschillende apparaten aan de verspreiding van *Legionella*
- 5.3. Herkomst van B-1, B-2 en B-3
- 5.4. Vergelijking met de resultaten van het patiënt-controle en het cohort-onderzoek

5.1. Volledigheid en sensitiviteit van de bemonstering

De epidemie van Bovenkarspel is in zoverre bijzonder dat *Legionella* spp in meerdere potentiële bronnen aangetroffen werd. Bij vijf van de tien grootste beschreven legionella-epidemieën (geselecteerd op basis van verzamelde literatuurgegevens uit de Medline-databank) werd geen omgevingsisolaat gevonden (zie tabel 17) en moest men zich bij uitspraken over de bron van de epidemie volledig op het epidemiologische onderzoek baseren^y. Bij alle tien epidemieën is uitgebreid bemonsterd zonder dat een omgevingsisolaat gevonden is, wat aangeeft dat bemonstering van verdachte apparaten als methode niet erg sensitief is.

Tabel 17. Overzicht van tien grote epidemieën van legionella-pneumonie

Jaar	Plaats	Bron	LD casus	Fatale LD casus	Pneumonie casus	Identiek omgevings-isolaat aangetoond
1976	Philadelphia, VS	Hotel lobby	182	29	35	Niet
1980	Burlington, Vermont, VS	Koeltoren	85	22		Niet
1985	Stafford, VK	Ziekenhuis	68			In water van koeltoren ziekenhuis
1979	Vasteras, Zweden	Koeltoren	68	1		In water van koeltoren winkelcentrum
1988	Barcelona, Spanje	Bouwput?	56			Niet
1982	Parijs, Frankrijk	Ziekenhuis	47			Niet
1987	Wollongong, Australië	Koeltoren?	44			Niet
1978	Memphis, Tennessee, VS	Koeltoren ziekenhuis	44			Niet; wel zelfde serotype in water koeltoren
1988	Bolton, VK	Koeltoren machinefabriek	37			In water van koeltoren
1983	Berlijn, Duitsland	ziekenhuis	35			In waterleidingsstelsel ziekenhuis

^y Selectie van legionella-epidemieën op basis van literatuuronderzoek, waarbij door verschillende auteurs verschillende definities van legionella-epidemie werden gehanteerd

De verschillende compartimenten van de waterketen van de WF zijn alle uitvoerig bemonsterd. Van de twee PWN-aansluitpunten is in totaal 48 liter bemonsterd. Van het waterleidingnet van de CNB-hallen zijn in totaal 127 monsters genomen. Door twee laboratoria zijn alle tappunten en alle in de literatuur bekende kwetsbare onderdelen van het gehele CNB-waterleidingnet bemonsterd. Geen van de monsters bleek *Legionella* spp te bevatten. Van alle 33 mogelijk risicovolle producten op de WF bleven er, na ondervraging van de gebruikers, 27 over waarbij daadwerkelijk water gebruikt werd. Zes van deze 27 producten werden geacht met enig of veel risico op groei en verspreiding van *Legionella* spp gepaard te gaan. Alle zes hierbij gebruikte apparaten werden bemonsterd. Drie van deze apparaten bleken *Legionella* spp te bevatten. Van de resterende 21 apparaten, die naar huidig inzicht bij risicoloze handelingen gebruikt werden, waren er 15 niet meer voorhanden of stonden droog (waarbij groei van *Legionella* spp onmogelijk is). De overige zes werden bemonsterd en bleken geen *L. pneumophila* te bevatten.

In Nederland is in 1983 en 1984 door het RIVM onderzoek gedaan naar het voorkomen van *L. pneumophila* in drinkwater. Van 79 objecten, verspreid over het land, werden 100 koudwatermonsters van elk drie liter genomen. Vijf hiervan waren positief voor *Legionella* spp, in een concentratie van 0,04 tot 1,6 CFU/ml (CFU=colony forming units; kolonie vormende eenheden) bij een temperatuur tussen de 10 en 16°C¹⁰. Het onderzoek van PWN-drinkwater in de onderhavige studie was negatief. Door het PWN is herhaaldelijk onderzoek gedaan naar het voorkomen van *Legionella* spp in door dit bedrijf geleverd drinkwater, maar het organisme is niet aangetoond^z. Het voorkomen van zeer lage concentraties van *Legionella* spp in PWN drinkwater is daarmee echter niet uitgesloten.

Van de sensitiviteit van de bemonstering van waterleidingen is bekend dat het afnemen van uitstrijken van biofilm een hoge opbrengst heeft. Herhaaldelijke monsterneming waarbij het waterleidingnet tussentijds niet gebruikt wordt, waardoor *Legionella* spp kunnen uitgroeien, geven eveneens een hoge opbrengst. Bekend is dat *L. pneumophila*-stammen jarenlang in hetzelfde waterleidingnet kunnen overleven. Uitstrijken van leidingen werden bij de eerste monsterneming van de leidingen van de CNB-hallen niet uitgevoerd. Bij latere monsterneming werden een aantal waterhoudende leidingen wel uitgestreken. De totale monsterneming ging in een aantal sessies. De reden hiervoor was dat in het begin geen plattegronden voorhanden waren en er water getapt werd op geleide van visuele inspectie. Ook maakte nieuwe informatie uit interviews met standhouders monsternamen in een groter deel van het waterleidingsysteem nodig.

^z Bron: Vertegenwoordiger Provinciaal Waterleidingbedrijf Noord-Holland

Het bemonsteren van de zes apparaten die gebruikt werden bij handelingen gepaard gaande met enig tot veel risico op groei en verspreiding van *Legionella* spp, gebeurde enige weken na hun gebruik op de WF. In de drie kweek-positieve apparaten was nog water aanwezig. Daarentegen waren zowel de restmaterialen van de fontein en als de twee bubbelmatten nagenoeg droog, zodat de kans om bij deze apparaten *Legionella* spp aan te tonen bij voorbaat al klein was. Het overleg met een buitenlandse expert leidde zowel tot aanvullingen van de kweekmethoden als tot aanvulling van de monsternamen (destructie bemonstering van de twee whirlpools). Aanpassing van de kweekmethode leverde geen extra positieve kweken op; de destructieve monsterneming van de whirlpool uit hal 3 bevestigde de indruk dat W3 een hoge besmettingsgraad had.

5.2. Bijdrage van verschillende apparaten aan de verspreiding van *L. pneumophila*

Uitspraken over de bijdrage van verschillende apparaten aan de verspreiding van *L. pneumophila* zijn afhankelijk van de validiteit van de gegevens over het gebruik ervan, die in interviews zijn verzameld.

Van whirlpools is reeds langer bekend dat zij onder baders epidemieën van legionella-pneumonie kunnen veroorzaken. Whirlpools zijn efficiënte amplificatoren en verspreiders van *Legionella* spp. De temperatuur van het water (37°C) is optimaal voor de groei van *Legionella* spp, en het bubbelen en bruisen veroorzaakt aërosolen, waardoor *Legionellae* zich kunnen verspreiden en kunnen worden ingeademd. Er is tot op heden slechts één epidemie beschreven van een whirlpooldemonstratie. Daarbij kregen 23 mensen een legionella-pneumonie¹¹. Bij deze epidemie verbleven patiënten korte of langere tijd in de buurt van een whirlpool. Bij een epidemie op een cruise ship werden behalve baders ook personen ziek die zich alleen in de buurt van de whirlpool hadden bevonden¹².

Beide whirlpools in Bovenkarspel werden twee dagen voorafgaand aan de beurs terplekke met koud water gevuld. Gedurende de gehele duur van de WF is het water van beide baden tussen 37 en 39°C gehouden, met uitzondering van de nachten. Het water van de whirlpool in hal 4 is tijdens de WF éénmalig (na zes dagen of zeven dagen) volledig ververs, het water van het andere bad is éénmalig bijgevoerd met vers water. Beide whirlpools maakten gebruik van luchtdoorstroming, waardoor aërosolen ontstonden. De whirlpool in hal 3 heeft overdag continu aangestaan, in tegenstelling tot de whirlpool in hal 4, die alleen op verzoek werd gedemonstreerd. Desinfectie is bij de whirlpool van hal 3 niet effectief geweest als gevolg van een falend feedbacksysteem voor de toevoer van ozon; bij de whirlpool van hal 4 is geen desinfectie toegepast. Het feit dat het water van de whirlpool in hal 3 tussentijds niet ververs is en de continue aërosolvorming door deze whirlpool maakt het waarschijnlijk dat het bad in

hal 3 meer tot de verspreiding heeft bijgedragen dan het bad in hal 4. Waarschijnlijk is de *Legionella* concentratie in de whirlpool in hal 4 tussentijds verlaagd door de water verversing. Van vernevelaars en fonteinën is beschreven dat zij tot epidemieën kunnen leiden ^{13,14,15}.

Bij één van de door een fontein veroorzaakte epidemieën liep de watertemperatuur ten gevolge van opwarming door lampen op tot 29°C. Ook bij de vernevelaar werd het water door lampen opgewarmd. In Bovenkarspel was het voorraadvat van de vernevelaar in hal 8 vier dagen na de opening van de WF gevuld met water van de CNB-hallen. Het apparaat werd slechts korte tijd (iedere twee uur gedurende drie seconden) tijdens de WF gedemonstreerd, waarbij in totaal 15 liter water verneveld werd gedurende vijf dagen. De temperatuur in de hal was tijdens de WF 10 tot 15°C. Amplificatie van *Legionella* spp bij dergelijk lage temperaturen is onwaarschijnlijk, terwijl opwarming van het water door warmlopen van de pomp eveneens onwaarschijnlijk is, gegeven de korte duur van verneveling (drie seconden elke twee uur). Indien de vernevelaar *Legionella* spp bevattende aerosolen verspreidde, was dit dus in een lage concentratie. Dit maakt het onwaarschijnlijk dat de vernevelaar substantieel heeft bijgedragen aan de besmetting van personen met *Legionella* spp.

Zoals hierboven reeds vermeld, zijn fonteinën eerder beschreven als veroorzakers van epidemieën van legionella-pneumonieën, waarbij een hoge temperatuur van het water een grote rol speelt. In hal 5 en in hal 13, waar overdag tijdens de WF elf fonteinën in werking waren, was volgens geïnterviewde standhouders de temperatuur 10-15°C. Voor de fonteinën werden kleine pompen gebruikt in grote bassins. Aangenomen mag worden dat de door deze pompen geproduceerde warmte niet voldoende was om het bassinwater tot temperaturen boven de 20°C te brengen. Amplificatie van *Legionella* spp bij dergelijk lage temperaturen is onwaarschijnlijk. Indien de fonteinën *Legionella* spp bevattende aerosolen verspreidden, was dit dus in een lage concentratie. Dit maakt het onwaarschijnlijk dat de fonteinën substantieel hebben bijgedragen aan de verspreiding van *Legionella* spp.

Van bubbelmatten is (nog) niet beschreven dat zij epidemieën van legionella-pneumonieën kunnen veroorzaken. Dit soort mat wordt onderin een bad bevestigd en veroorzaakt in met water gevulde baden een bruiseffect doordat een hoeveelheid lucht continu door een aantal kleine gaatjes in de mat geblazen wordt. Deze matten veroorzaken aerosolen en kunnen om die reden verspreiders van *Legionella* spp zijn. Op de WF werden in hal 3 en in hal 4 bubbelmatten gedemonstreerd. In beide gevallen werd het gebruikte water niet opgewarmd; wel werd de door het bad geblazen lucht warm als gevolg van verhitting van de motor (bron: standhouder). De omgevingstemperatuur van beide hallen werd door diverse standhouders hoog genoemd (20-25°C). 's Nachts zal de temperatuur fors lager geweest zijn, zodat de gemiddelde watertemperatuur waarschijnlijk niet boven de 20°C is geweest. Zelfs als van

continu 25°C wordt uitgegaan, is het onwaarschijnlijk dat de bubbelmatten hebben bijgedragen tot verspreiding omdat amplificatie bij 25°C veel trager verloopt dan bij 37°C.

^{16,17} Bovendien is van één van de twee standhouders bekend dat hij viermaal het water van zijn bad heeft ververst, de ander deed dit om de andere dag.

Vanuit microbiologisch oogpunt was het gevonden verschil in het aantal kolonies op de primaire positieve kweekplaten van de drie kweek-positieve apparaten een belangrijke bevinding, vanwege de suggestie dat de besmetting van W3 aanzienlijk sterker was dan die van W4 en V8. Dit zou kunnen duiden op een grotere bijdrage van W3 in de verspreiding van *Legionella* spp.

In W3 werden drie verschillende genotypen van *Legionella pneumophila* aangetroffen waarbij de indruk bestond dat het genotype B-1 meer voorkwam dan genotype B-2 en B-3.

In V8 werden twee verschillende genotypen aangetroffen waarbij de indruk was dat B-2 dominant was over B-3. In W4 werd alleen genotype B-1, in waarschijnlijk kleine hoeveelheid, aangetroffen. Deze bevindingen passen bij de bij patiënten-isolaten aangetroffen verhouding tussen B-1, B-2 en B-3 (28:1:0).

5.3. Herkomst van B-1, B-2 en B-3

De meest plausibele verklaring voor de herkomst van de drie genotypen is dat de drie apparaten waarin zij werden aangetroffen deze ontvingen vanuit een gemeenschappelijke bron kwamen: de waterleiding van de CNB-hallen. Dat geen *Legionella* gevonden werd in het leidingwater is geen bewijs dat het er niet in voorkwam: *Legionella* is vaak aanwezig in koud water in zeer lage concentraties en de kans om een zeer lage concentratie aan te tonen door bemonstering is klein. Hoewel de kweken van dit systeem negatief waren, is indirect bewijs voor deze verklaring voorhanden, in ieder geval voor B2 en B3. Deze genotypen zijn aangetroffen in twee apparaten, die fysiek 125 meter van elkaar verwijderd waren. Uit W3 en uit V8 zijn B-2 en B-3 gekweekt. Beide niet eerder met water gevulde apparaten zijn in de CNB-hallen met water gevuld. Aangezien hal 3 (whirlpool) en hal 8 (vernevelaar) gescheiden waterleidingsystemen hebben (Veilingweg 1 en Hoofdstraat 5), zouden B-2 en B-3 via verschillende aftakkingen van het PWN-leidingnet het CNB-waterleidingnet binnengekomen moeten zijn. B-1 is alleen in het deel van de CNB-hallen aangetroffen, waarvan het waterleidingnet door de PWN via het aansluitpunt Hoofdstraat 5 van water wordt voorzien. Dit is ook het deel van de hallen waarin de beide whirlpools zich bevinden, zodat B-1 ofwel afkomstig is uit dit deel van de waterleiding van de CNB-hallen, ofwel afkomstig uit één van beide apparaten waarbij kruisbesmetting is opgetreden. Het is niet uit te sluiten dat kruisbesmetting is opgetreden. Uit diverse publicaties blijkt dat met *Legionella* spp besmette

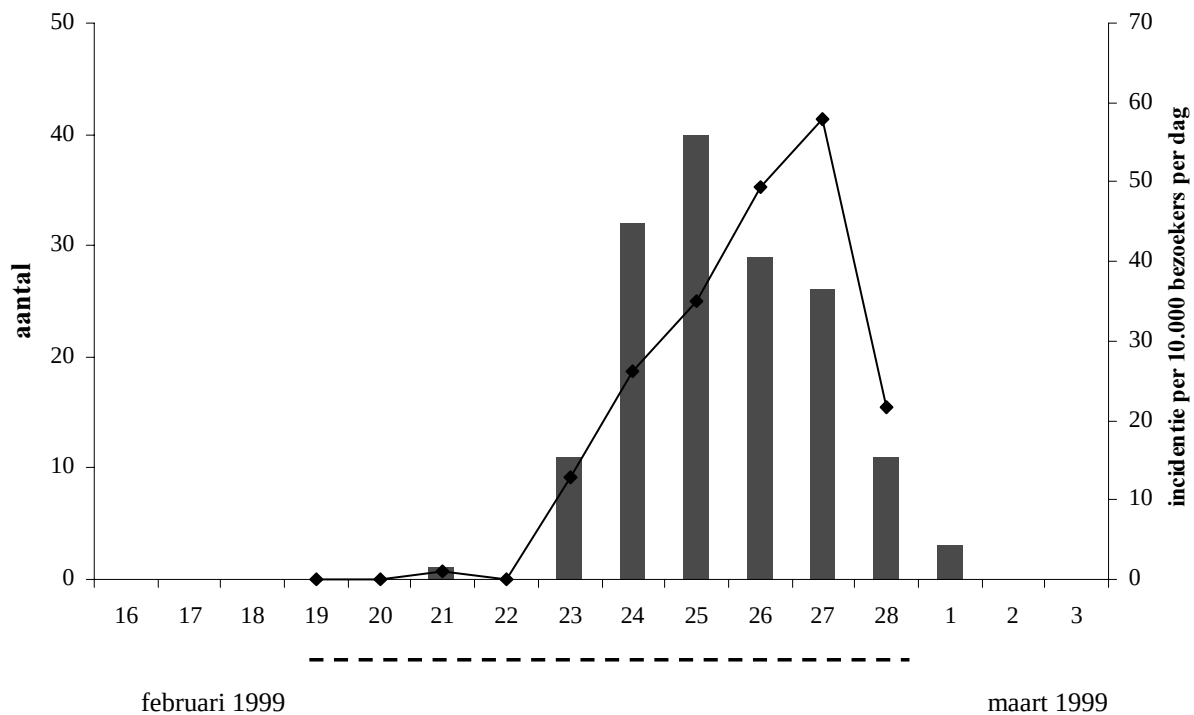
koeltorens mensen kunnen infecteren, waarbij de slachtoffers de bron nooit dichterbij dan één kilometer zijn genaderd. Besmetting treedt op doordat aerosolen met de wind meegevoerd worden en door mensen ingeademd worden. Hoe hoger de luchtvochtigheid en hoe lager de temperatuur, hoe beter *Legionella* spp overleven in dergelijke aerosolen. Onbekend is of de concentraties *Legionella* spp in de aerosolen die bij een mens tot pneumonie leiden, voldoende zijn om een bad te besmetten. Kruisbesmetting van de vernevelaar in hal 8 lijkt uitgesloten, omdat een te besmetten open wateroppervlak bij dit apparaat ontbreekt. Retrograde besmetting van het filterwater van de vernevelaar (waaruit B-2 en B-3 gekweekt zijn) via de poriën van de vernevelaar is onrealistisch, zodat B-2 en B-3 vrijwel zeker uit het CNB-waterleidingnet afkomstig moeten zijn. Kruisbesmetting van de whirlpool in hal 3 met B-1 door de whirlpool in hal 4 is niet uit te sluiten, maar dit lijkt onwaarschijnlijk vanwege de extra tijd die nodig zou zijn voor amplificatie alvorens een voor infectie van mensen voldoende hoge *L. pneumophila* concentratie bereikt zou zijn in de whirlpool in hal 3. Kruisbesmetting van de whirlpool in hal 4 met B-1 door de whirlpool in hal 3 is ook niet uit te sluiten. Op grond van het gebruik van de whirlpool in hal 4 is het onwaarschijnlijk dat dit apparaat een grote bijdrage had in de verspreiding van *L. pneumophila*, terwijl toch uit het filter B-1 gekweekt is.

5.4. Vergelijking met de resultaten van het patiënt-controle en het cohort-onderzoek

De sterke aanwijzingen voor W3 als ziekmakende bron worden bevestigd door de resultaten van een patiënt-controle onderzoek en een cohort-onderzoek^{aa}. Beide epidemiologische studies, die in separate rapporten beschreven worden, geven als uitkomst dat W3 de besmettingsbron was voor de meerderheid van de, en mogelijk alle, gevallen van legionella-pneumonie.

De observatie dat gedurende de eerste zeven dagen na vulling van W3 slechts bij één immuungecompromiteerde bezoeker van de WF legionella-pneumonie is vastgesteld (zie figuur 10), wijst op een periode van tenminste vier dagen gedurende welke amplificatie van *Legionella pneumophila* in die whirlpool plaatsvond alvorens een gevaarlijke concentratie bereikt werd. De lage attack-rate gedurende de eerste dagen geeft aan dat de initiële concentratie, ondanks aerosol vorming, niet ziekmakend was voor gezonde bezoekers.

^{aa} Eindrapportage aan het Ministerie van VWS, 22 augustus 1999



Figuur 10 Gevallen van veteranenziekte naar laatste bezoekdag; de stippellijn geeft de dagen aan waarop de Westfriese flora plaatsvond.^{bb}

Zowel uit de patiënt-controle studie als uit de cohort-studie komt duidelijk naar voren dat de bron van deze epidemie zich in hal 3 heeft bevonden. De resultaten van deze twee studies ondersteunen de bevindingen van dit rapport, dat W3 de grootste bijdrage in de verspreiding van *L. pneumophila* moet hebben gehad.

^{bb} Als patiënten de WF meerdere dagen bezochten, is de laatste bezoekdag voor deze curve gebruikt

6. Conclusies

1. Met het aantonen van twee aan patiëntenisolaten genotypisch identieke *Legionella pneumophila* omgevingsisolaten in drie apparaten die op de WF gebruikt werden, staat nagenoeg vast dat de bron van de epidemie van WF-geassocieerde legionella-pneumonieën zich heeft bevonden op de WF, die in de CNB-hallen te Bovenkarspel gehouden werd.
2. Van de drie apparaten heeft de whirlpool in hal 3 waarschijnlijk het meest bijgedragen aan verspreiding van *L. pneumophila* in de CNB-hallen, tijdens de WF. Argumenten hiervoor zijn dat de bij microbiologisch onderzoek gevonden bacteriële concentratie aanzienlijk sterker was dan die van de twee andere kweek-positieve apparaten, het water niet ververst is tijdens de Flora, geen werkzame desinfectie werd toegepast, dat het apparaat in tegenstelling tot de andere apparaten overdag tijdens de Flora continue bubbelde en bruiste en op een temperatuur van 37-39°C werd gehouden.
3. De conclusies van dit onderzoek ten aanzien van de belangrijkste (ziekmakende) besmettingsbron (W3) worden bevestigd door de uitkomsten van een patiënt-controle en een cohort onderzoek, uitgevoerd om de exacte lokatie van blootstelling aan *Legionella* spp op het WF-terrein vast te stellen, die aangeven dat de whirlpool in hal 3 de meest waarschijnlijke bron van infectie is (zie separate RIVM-rapporten).
4. *Legionella* is waarschijnlijk in de whirlpool in hal 3 binnengekomen bij de vulling van het apparaat op 17 februari. De epidemische curve geeft aan dat een amplificatie periode van enkele dagen nodig was om de concentratie te doen stijgen tot voor de mens ziekmakende hoogte.
5. Niet uitgesloten kan worden dat de whirlpool in hal 4 heeft bijgedragen aan de verspreiding van *Legionella* spp. Desinfectie werd bij dit apparaat evenmin toegepast. Bij deze whirlpool werd een lage bacteriële concentratie gevonden en werd het water halverwege de Flora volledig ververst, terwijl het apparaat alleen tijdens demonstraties bubbelde en bruiste.
6. Verspreiding door de vernevelaar in hal 8 is eveneens niet uit te sluiten, maar niet erg waarschijnlijk gezien het beperkte gebruik van het apparaat en de temperatuur van het water in het apparaat, welke zeker lager dan 20 °C was.
7. Verspreiding door andere potentieel risicovolle apparaten, zoals de fontein in hal 5 en 13 en de bubbelmat-baden in hal 3 en hal 4 is evenmin uit te sluiten, maar onwaarschijnlijk gezien de temperatuur van het gebruikte water (lager dan 20 °C), het

regelmatige verversen van het water en omdat twee weken na beëindiging van de WF in deze apparaten geen *L. pneumophila* werd aangetroffen.

8. Het is waarschijnlijk dat *L. pneumophila* de drie kweek-positieve apparaten is binnengekomen met water uit het waterleidingnetwerk van de CNB-hallen, die de bacteriën op haar beurt mogelijk via het PWN waterleidingnetwerk heeft binnengekregen. Argumenten hiervoor zijn het isoleren van identieke genotypen van *L. pneumophila* in v er van elkaar verwijderde apparaten, de constatering dat twee van de drie apparaten nieuw waren (W3 en V8) en nooit eerder met water gevuld en het gegeven dat alle drie apparaten gevuld werden met water uit de waterleiding van de CNB-hallen.
9. De concentratie van de vermoedelijk in de waterleiding van de CNB-hallen voorkomende *Legionella* zou met name in de hallen 3 en 4 verhoogd geweest kunnen zijn, omdat de op drie meter hoogte hangende PE-leiding in deze hallen met water gevuld was en gedurende enige maanden niet gebruikt was, terwijl in het Oostelijke deel van hal 3 voorafgaande aan de Flora temperaturen van tenminste 30  C heersten. Een dergelijke situatie is gunstig voor handhaving of zelfs uitgroei van *L. pneumophila*; de whirlpools W3 en W4 werden vóór opening van de Flora gevuld met water uit die ringleiding, op een moment dat er nog weinig doorstroming was geweest.
10. De *Legionella* die vermoedelijk in de waterleiding van de CNB-hallen aanwezig was zou zowel in de delen achter PWN-aansluiting "Hoofdstraat 1" als achter PWN-aansluiting "Veilingweg 5" moeten hebben gezeten omdat W3 en W4 vanuit het ene en V8 vanuit de andere gevuld zijn.
11. Het is mogelijk dat de *Legionella* in de waterleiding van de CNB-hallen is gekomen door introductie van (vrijwel zeker zeer lage concentraties) vanuit het PWN-waterleidingnet.
12. Dat *L. pneumophila* niet werd aangetroffen in water van PWN-aansluitingen en in de waterleidingen van de CNB-hallen kan verklaard worden door zeer lage concentraties (PWN) en door fors gebruik en doorstroming van het CNB-waterleiding systeem tijdens de WF waardoor een initiële hogere concentratie 'uitgespoeld' kan zijn.

Dankbetuiging

De auteurs danken het bestuur van de Stichting Westfrieze Flora, de medewerkers van de Westfrieze Flora en van de CNB-hallen en de exploitanten van de stands op de Flora voor hun bereidwillige medewerking aan het onderzoek. Diverse GGD's, (streek)laboratoria en inspecteurs van de Inspectie Waren en Veterinaire Zaken hebben zorg gedragen voor de veiligstelling van risicovolle apparatuur en voor de beschikbaarheid van patiëntenstammen voor het typeringsonderzoek. Voor de uitvoering van de sero- en genotypering danken we Henk Brunings, Henny Maas, Max Heck, Erik van Lierop en Wim Wannet van het Laboratorium voor Infectieziektendiagnostiek en perinatale Screening, voor zijn advies André Henken van het Microbiologisch Laboratorium Gezondheidsbescherming en voor de assistentie bij het veldwerk Jack Schijven. Marie-Louise Heijnen en vele medewerkers van het CIE voerden de telefonische interviews uit. De inzet van deze en vele niet met naam genoemde collegae was onmisbaar voor het omvangrijke onderzoek naar de bron van de legionellose-epidemie na de Westfrieze Flora.

Literatuur

1. Slijkerman F, Van Steenberg J, verslag OMT vergadering dd. 13-03-99 (OMT/99/002)
2. Conyn-van Spaendonck MAE, Melker HE de, Sprenger MJW. Organisatie van infectieziektenbestrijding. In: Melker HE de, Conyn-van Spaendonck MAE, Sprenger MJW, red. Infectieziekten in Nederland. Epidemiologie, diagnostiek en bestrijding. Bilthoven: Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu. Den Haag: SDU Uitgeverij, 1997:99-110.
3. Vermehrungs- und Abtötungstemperaturen natürlich vorkommender Legionellen, Schulze-Röbbecke R, et al., Zbl. Bakt. Hyg. B 1987;184:495-500
4. Nederlands Normalisatie Instituut. Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek naar de aanwezigheid en het aantal kolonievormende eenheden (KVE) van *Legionella* bacteriën. NEN 6265. 1991; 1^e druk
5. Van der Zee en Bergmans et al, publicatie in voorbereiding
6. Don, RH, Cox PT, Wainwright BJ, Baker K and Mattick JS. 'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acids Res. 1991;19:4008.
7. Versalovic J, Koeuth T and Lupski JR (1991) Distribution of repetitive DNA sequences in eubacteria and application to fingerprinting of bacterial genomes. Nucleic Acids Research 19:6823-6831
8. Grothues D and Tummler B (1987) Genome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* by field inversion gel electrophoresis. FEMS Microbiology Letters 48:419-422.
9. Mazurek G.H., V. Reddy, B.J. Marston, W.H. Haas, and J.T. Crawford. 1996. DNA fingerprinting by infrequent-restriction-site amplification. J. Clin. Microbiol. 34: 2386-90.
10. Kranen HJ (namens een werkgroep), De aanwezigheid van *Legionella* spp in door drinkwater gevoede watersystemen in Nederland, RIVM rapport 840140001, Bilthoven 1988
11. Legionnaires disease associated with a whirlpool spa display, Anonymous, MMWR 1997;46;04:83-6
12. Jernigan DB, Hofmann Jo, Cetron MS, et al. Outbreak of Legionnaires' disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. Lancet 1996;347:494-99
13. Outbreak of Legionnaire's disease linked to a decorative fountain by molecular epidemiology, Gary Hlady W, et al, Am J Epidemiol 1993;138:555-62
14. Outbreak of Pontiac fever due to *Legionella anisa*, Fenstersheib MD et al, Lancet 1990;336:35-7
15. Communitywide outbreak of Legionnaires' disease associated with a grocery store mist machine, Mahoney FJ et al, JID 1992;165:36-9
16. Effect of temperature, pH, and oxygen level on the multiplication of naturally occurring *Legionella pneumophila* in potable water, Wadowsky et al, Applied and Environmental Microbiology 1985; 1197-1205
17. Effects of water chemistry and temperature on the survival and growth of *Legionella pneumophila* in potable water systems, Rogers J, et al, 1993: 248-54. In: Legionella, current status and emerging perspectives, by Barbaree JM et al;

Bijlage 1 Vragenlijst CIE/RIVM over watergebruik bij whirlpool demonstraties

VRAGEN TEN AANZIEN VAN WHIRLPOOLS

1. Wanneer is whirlpool vóór deze beurs voor het laatst gebruikt?
2. Welke handelingen zijn er toen uitgevoerd vóór opslag van de whirlpool? Hoe was de whirlpool opgeslagen? Kan er nog water in leidingen hebben gezeten? Wanneer werden de filters voor het laatst vervangen of schoongemaakt?
3. Wat is de standaard schoonmaakprocedure, met name van de leidingen?
4. Hoe is de whirlpool voor de beurs met water gevuld? Vanuit welke watertoevoer/leidingsysteem
5. Werd een desinfectans b.v. chloor gebruikt? Is er een verandering geweest sinds de laatste beurs in gebruikt middel?
6. Werd het water tijdens de beurs ververst? Zo ja, hoe vaak?
7. Is het water tijdens de beurs op temperatuur gebleven / gehouden?
8. Werd het water buiten de openingstijden ook gecirculeerd?
9. Was er iets anders dan anders op deze beurs?
10. Is er documentatie (instructie onderhoud, onderhoudsschema, logboek) beschikbaar?
11. Is de whirlpool op dit moment in gebruik? Waar? Tot wanneer?

Indien de pool momenteel in gebruik is en dat na vandaag ook zal zijn, moet contact worden opgenomen met de Inspecteur Infectieziekten, de heer Jan van Wijngaarden; tel 0653233188

Documentatie (instructie onderhoud, onderhoudsschema, logboek) toevoegen.
Bij inspectie/bemonstering serienummer van whirlpool noteren.

Bilthoven, 14 maart 1999

Bijlage 2 Vragenlijst CIE/RIVM over watergebruik bij standhouders (telefonische enquête)

Telefonisch vragenformulier standhouders consumentenbeurs WF (21-28 februari 1999)

Doel

- a. mogelijke bronnen i.v.m. de vragenlijst
- b. actieve case-finding voor patiënt-controle studie
- c. samenstellen van cohort standhouders

Algemeen

- a. Naam bedrijf:
- b. Standnummer:
- c. Telefoonnummer:
- d. Gebeld door:
- e. Datum:
- f. Tijdstip:

1. Introductie

- a. Voorstellen
- b. Reden: onderzoek i.v.m. veteranenziekte na WF
- c. Waarom worden zij benaderd: alle standhouders
- d. Waarom worden zij benaderd: opsporen zieke personen
- e. Waarom worden zij benaderd: onderzoek bij alle standhouders (besmet zonder ziek)
- f. Waarom worden zij benaderd: maken vragenlijst mogelijke bronnen
- g. Tijdsdruk (bron snel vinden)
- h. Wie kan deze vragen beantwoorden
- i. Onderzoek in opdracht van minister
- j. Heeft u zelf enig idee wat de oorzaak kan zijn de gevallen van veteranenziekte?

2. Soort product (zit er water in/om/bij/etc)

- a. Verificatie plaats en tijd stand
- b. Welke soort producten
- c. Bij welke producten is water betrokken (volledig opsommen)
- d. Was er op een andere manier water in uw stand

3. Medewerkers

Cave: een aantal casus zijn reeds bekend

- a. Zijn er medewerkers ziek (griepachtig ziektebeeld sinds 19 februari of longontsteking in ziekenhuis sinds begin dit jaar) geworden?
- b. Zo ja, wie? Naam en toenaam, hoe of via wie bereikbaar (i.v.m. mondeling interviewen casus)
- c. Vandaag een volledige lijst van alle standmedewerkers (ook opbouwen) op de WF, hoe zijn deze bereikbaar voor deelname aan het onderzoek (precies adres, telnr, naam, 24 uur bereikbaarheid, fax, e-mail), liefst naar CIE faxen

4. Gegevens over bereikbaarheid van het bedrijf plus definitieve afspraken

- a. Naam contactpersoon
- b. Volledige bereikbaarheid van deze persoon (24 uur)
- c. Vandaag voldoende info over mogelijke casus dat ze benaderd kunnen worden
- d. Afspraak over volledige lijst van standwerkers voor morgen 12.00 uur (16 maart)
- e. Nadere informatie (lieft schriftelijk/fax) over “product”

5. Bereikbaarheid van RIVM

- a. Fax: 030 - 274 4409
- b. Telefoon: 030 – 274 3679
- c. E-mail: hans.van.vliet@rivm.nl
- d. Post: RIVM t.a.v. A. Bosman, CIE (pb 75), Postbus 1, 3720 BA Bilthoven

OVERIGE BIJZONDERHEDEN

PROCEDURE

Wie bellen?

Alle standhouders

Volgorde

Eerst standhouders waarvan product ons onbekend is, dan de rest

Door wie

Hans van Vliet, Marie-Louise Heijnen & Sabine Neppelenbroek

15 maart 1999

Bijlage 3. Vragenlijst IW&V over watergebruik door standhouders

De volgende vragen dienen minimaal gesteld te worden.

1. In welke hal heeft u gestaan en vanaf welke datum? Wat was de laatste dag dat u op de WF aanwezig bent geweest?
2. Wat was het apparaat waarmee u op de beurs heeft gestaan?
3. Heeft u bij dat apparaat water gebruikt? Zo ja, omschrijven van de toepassing (water in badkuip, whirlpool, condens voor brillenglazen, stoom voor strijkijzers, e.d.)
4. Was het een volledig nieuw, niet eerder gebruikt apparaat of is bedoeld apparaat eerder gebruikt (b.v. op een andere beurs of showroom)? Is er toen eveneens water gebruikt? Kwam dat water van de locatie aldaar of was dat water b.v. van huis meegenomen?
5. Als het water afkomstig is van de Westfriese Flora, van welk tappunt is het water dan afkomstig (nauwkeurig omschrijven, welke brandslang, toiletruimte)? Welke dag/tijdstip hebt u dat water getapt en wat was de hoeveelheid water?
6. Hebt u tussentijds water verversd en zo ja hoeveel keer? Is er water uit meerdere tappunten gebruikt, zo ja welke? Hoeveel liter water hebt u tijdens de beurs gebruikt?
7. Werd tijdens het gebruik van het apparaat het water verwarmd? Wat was de temperatuur van het water/aërosol en was de temperatuur van het water gedurende de beurs constant?
8. Is het water op enigerlei wijze gedesinfecteerd? Is het apparaat tijdens de beurs gereinigd? Zo ja, wat waren de middelen die hiervoor werden gebruikt?
9. Waar bevindt zich het apparaat dat op de WF is gebruikt op dit moment?

Bijlage 4. Chronologische volgorde van aansluiting van stands met eigen watervoorziening

Een aantal stands had een eigen watervoorziening. In onderstaande tabel wordt per hal een chronologische overzicht gegeven van het aansluiten van water door een installatiebedrijf^{cc}.

Tabel 18. Chronologische volgorde van aansluiting van stands met eigen watervoorziening

lokatie	nr.	
hal 3	303	Op 12 februari werd een gootsteen met uitstort aangesloten voor deze organisatie. De afvoerbak van ongeveer 30 liter inhoud is twee of drie keer gevuld en geleegd
	304	Op 15 februari werd een aanrechtblok aangesloten dat niet apart gespoeld is. Bij het uitproberen van de kraan en de afvoer werd dit kortdurend wel gedaan
	306	Op 15 februari werd een uitstortgootsteen aangesloten, die enkele keren werd uitgeprobeerd
	324	Op 17 februari werd een aanrechtblok aangesloten, die twee of drie minuten werd doorgespoeld
Hal 4	466	Op 15 februari werd een aanrecht, een afwasmachine en een bar aangesloten. Er werd ruim doorgespoeld
	440	Op 15 februari werd water aangesloten voor een aanrecht blokje met een boiler. Het water werd een halve minuut doorgespoeld
	437	Op 15 februari werd water aangesloten voor een uitstortgootsteen. Het water werd een halve minuut doorgespoeld
	424	Op 17 of 18 februari werd water aangesloten voor een uitstortgootsteen. Het water werd een halve minuut doorgespoeld
	402	Op 17 februari werd water aangesloten voor een gootsteen. Het water werd een halve minuut doorgespoeld
	411	Op 17 februari werd water aangesloten voor een aanrechtblok, een afwasmachine en een boiler. Een afvoerbak van 30 liter is daarbij driemaal gevuld en geleegd
Hal 8	802	Bij deze stand werd een uitstortgoot aangesloten. Op vrijdag 19 februari onder druk gezet, beproefd en weer afgesloten. Op maandag 22 februari 's ochtends opnieuw onder druk gezet
	805	Bij deze stand werd een keukenblok aangesloten. Op vrijdag 19 februari onder druk gezet, beproefd en weer afgesloten. Op maandag 22 februari 's ochtends opnieuw onder druk gezet
	812	Bij deze stand werd een biertap met glazenspoelbak aangesloten. Op vrijdag 19 februari onder druk gezet, beproefd en weer afgesloten. Op maandag 22 februari 's ochtends opnieuw onder druk gezet
	817	Bij deze stand werd een keukenblok met een uitstortgootsteen aangesloten. Op vrijdag 19 februari onder druk gezet, beproefd en weer afgesloten. Op maandag 22 februari 's ochtends opnieuw onder druk gezet
	824	Bij deze stand werd een keukenblok met boiler aangesloten. Op vrijdag 19 februari onder druk gezet, beproefd en weer afgesloten. Op maandag 22 februari 's ochtends opnieuw onder druk gezet
	854	Bij deze stand werd een uitstortgootsteen aangesloten. Op vrijdag 19 februari onder druk gezet, beproefd en weer afgesloten. Op maandag 22 februari 's ochtends opnieuw onder druk gezet
Hal 9	-	Op 15 februari werd water aangesloten voor de in de kinderboerderij aanwezige dieren. Daarnaast werd water aangesloten voor een uitstortgootsteen

^{cc} Bron: Vertegenwoordiger installatiebedrijf

Bijlage 5 Beschrijving van het watergebruik bij potentieel risicovolle producten die tijdens de WF gedemonstreerd werden

Hal 2

In deze hal werd in de mijnzaal (ook veilingzaal geheten) bloemen geveild. De te veilen bloemen stonden in veilingbakken. Deze bakken en hun inhoud werden dagelijks door een kweker ververst. Onderin de bakken stond een laagje koud water, afkomstig van de veiling. Er werd tijdens de WF geen water aan de bakken toegevoegd. Eveneens in deze hal bevonden zich twee restaurants: één ter hoogte van hal 3 en één ter hoogte van hal 4. In de restaurants werd warm water van geisers gebruikt.

Hal 3

1. Bloemenhandel (standnummer 301)

In deze stand werden bloemen en planten verkocht. Onder in de containers van de bloemen stond water. Planten werden zonodig in een emmer water ondergedompeld. Het water werd in hal 3 in het invalidentoilet gehaald. In de bloemencontainers zat al water van de veiling VBA uit Aalsmeer. Gedurende de WF werd naar schatting 100 liter water gebruikt.

2. Whirlpool (standnummer 309)

In deze stand werd een meerpersoons whirlpool gedemonstreerd met een inhoud van ongeveer 1000 liter. Het bad werd uit de VS geïmporteerd en is daar niet met water gevuld geweest. Op de WF is het bad voor het eerst in gebruik genomen. Daarvoor stond het bad op een beurs in Almere, waar het niet met water gevuld werd en ook niet gedemonstreerd. Het bad is op 16 februari geplaatst en op 17 februari gevuld met koud water gebruikmakend van de brandslang van hal 3. Het water is meteen opgewarmd tot de gewenste temperatuur: tussen de 37 en 38°C. Vanaf dit moment tot het einde van de beurs werd het water tijdens de openingsuren van de WF op deze temperatuur gecirculeerd. 's Nachts werd het systeem afgesloten en werd de whirlpool ter isolatie afgedekt met noppenfolie. Tijdens de openingsuren van de beurs bruiste het bad continu, waarbij lucht door het bad gevoerd werd. Alleen bij zeer geringe belangstelling werd het bruisen stopgezet. Op woensdag 23 februari werd het bad met 150 liter water bijgevuld met water gebruikmakend van dezelfde brandslang in hal 3. De whirlpool was voorzien van een ozongenerator, die echter dusdanig afgesteld was, dat deze bij maximale werking van de pomp afsloeg. De whirlpool draaide permanent op maximale capaciteit, waarbij de pomp maximaal werkte, zodat niet of nauwelijks ozon aan het water werd toegevoegd. Verder

was in de stand een waterzuil aanwezig, waarvan het water recirculeerde. De zuil was op de WF met koud water gevuld. Het water werd niet opgewarmd.

3. Kaarsenmakerij (standnummer 318)

In deze stand werden kaarsen gemaakt en verkocht. Hierbij werd een afgesloten au-bain-marie ketel gebruikt. Deze werd aan het begin van de WF gevuld met kraanwater uit de toiletruimte nabij de ingang. De ketel werd tijdens de WF niet meer bijgevuuld.

4. Matrassen (standnummer 322)

In deze stand werden matrassen, kussens en dekens gedemonstreerd, waarbij geen water gebruikt werd. Er werd een airconditioning systeem gebruikt. De airco bestond uit een kast met een rooster. Lucht uit de omgeving werd aangezogen, langs het rooster met koelsysteem (met freon) geleid en vervolgens weer uitgeblazen. Condenswater werd opgevangen en weggegooid.

5. Zeem (standnummer 323)

In deze stand werden zemen gedemonstreerd bij het schoonmaken van een spiegel. Het hierbij gebruikte koude water kwam uit standnummer 324. Dagelijks werd ongeveer 16 liter water verbruikt.

6. Stoomstrijkapparaat (standnummer 327)

In deze stand werden stoomstrijkijzers getoond (zonder verbruik van water) en stoomreinigers gedemonstreerd. De stoom van de stoomreinigers had een temperatuur van 100°C.

7. Brillenreiniger (standnummer 335)

In een waterkoker werd water aan de kook gebracht om waterdamp te produceren. De damp werd gebruikt om de effectiviteit van een anticondensmiddel voor brillen te demonstreren. Het water werd steeds aan de kook gebracht.

8. Bruisbad (standnummer 337)

In deze stand werd gedemonstreerd hoe met een bubbelmat een bad tot bubbelbad omgebouwd kan worden. Met behulp van een motortje werd lucht door kleine gaatjes van een op de bodem van het bad gelegen kunststof matje geblazen. Het motortje stond van 17 tot en met 27 februari dagelijks van 10.00 tot 18.00 uur aan. De demonstratie werd met koud water gegeven, dat overigens vanwege de hoge omgevingstemperatuur mogelijk boven de 20 °C was. Het bad werd gevuld met water uit de brandslang van hal 3. Tijdens de beurs werd het bad vier keer gelegegd en opnieuw gevuld. Reden hiervoor was dat beursgangers zeep in het water gooiden, hetgeen tot schuimvorming leidde. Bij het hervullen werd dezelfde brandslang gebruikt.

9. Brillenreiniger (standnummer 355)

In een waterkoker en in een Turkse kan werd water aan de kook gebracht om waterdamp te produceren. De damp werd gebruikt om de effectiviteit van een anticondensmiddel voor brillen te demonstreren. Het water werd steeds aan de kook gebracht.

Hal 4

10. Whirlpool (standnummer 405)

Dit tweepersoons bad heeft een inhoud van 613 liter. Het bad werd op 16 februari geplaatst en op 17 februari 's middags gevuld met koud water afkomstig van de brandslang in hal 2 (de mijnzaal of veilingzaal). Omdat de brandslang niet lang genoeg was, werd hij verlengd met een eigen slang. Op 23 of 24 februari werd het bad opnieuw gevuld met schoon water. Het verschonen gebeurde, omdat herhaaldelijk twee personen voor demonstratie in het bad aanwezig waren. Het vullen gebeurde ditmaal vanuit de brandslang van hal 4. Tijdens de WF werd het water overdag op een constante temperatuur van 37 tot 38 °C gehouden. Het water werd overdag continu doorgestroomd. Lucht werd alleen doorgeblazen als het bruiseffect gedemonstreerd werd. Er werden geen geurstoffen, reinigings- of desinfectiemiddelen toegevoegd. Wel werd bij de tweede vulling een uitvlokmiddel in het water gedaan, teneinde het water helder te krijgen.

11. Potten (standnummer 409)

In deze stand werden potten en pannen gedemonstreerd waarbij geen water gebruikt werd. Er was een airconditioningsysteem aanwezig. De airco bestond uit een kast met een rooster. Lucht uit de omgeving werd aangezogen, langs het rooster met koelsysteem (met freon) geleid en vervolgens weer uitgeblazen.

12. Strijkijzer (standnummer 410)

In deze stand werd een strijkijzer gedemonstreerd. De door dit apparaat geproduceerde stoom had een temperatuur van 100°C volgens de standhouder.

13. Bruisbad (standnummer 411)

In deze stand werd gedemonstreerd hoe met een bubbelmat een bad tot bubbelbad omgebouwd kan worden. Met behulp van een motortje wordt lucht door kleine gaatjes van een op de bodem van het bad gelegen kunststof matje geblazen. De demonstratie werd met koud water gegeven, dat vanwege de hoge omgevingstemperatuur mogelijk boven de 20 graden was.

14. Anticondensmiddel (standnummer 414)

In deze stand werd een anticondensmiddel gedemonstreerd op een met stoom beslagen spiegel en op een met water bevochtigde ruit. De stoom werd gemaakt met een waterkoker, die telkens tot 100°C werd verhit. Het water voor de waterkoker was afkomstig van twee tappunten in hal 4, ter hoogte van stand 471 en van stand 402. De ruit werd met water bevochtigd met behulp van een hogedrukspuit. Het hierbij gebruikte water had dezelfde herkomst. De spuit werd tweemaal daags gevuld met vijf liter koud water en werd gedesinfecteerd met een huishoud-chloorbleekmiddel.

15. Osmose-apparaat (standnummer 436)

Naast osmose-apparaat werden in deze stand drinkwatercoolers gedemonstreerd. Het drinkwater, dat hierbij gebruikt werd, was afkomstig van een producent die verzegelde flessen aanleverde. In totaal zijn 25 flessen uitgeschonken.

16. Staafmixer (standnummer 437)

In deze stand werd een staafmixer gedemonstreerd, die tussen de demonstraties door met koud water werd schoongespoeld. De stand had een, door een installatiebedrijf aangelegde, eigen watervoorziening.

17. Schoonmaakdoekje (standnummer 447)

In deze stand werden speciale, van polyestervezel gemaakte schoonmaakdoekjes gedemonstreerd. De doeken werden natgemaakt met een bloemenspuit, waarna vette oppervlakken gereinigd werden. Eenmaal per drie dagen werd deze spuit in een naburig toilet gevuld met koud water.

18. Schoonmaakdoekje (standnummer 451)

In deze stand werden inlegzooltjes, bloemschikkertjes en micro-schoonmaakdoekjes gebruikt. Voor het schoonmaken van de doekjes werd koud water uit een naburig toilet gebruikt.

19. Hobbykas (standnummer 453)

In deze stand waren hobbykassen te koop. Een van de kassen had een kweekbodem van zand, waarin een verwarmingskabel de temperatuur op 24°C bracht. Dit zand en de erboven gelegen laag potgrond werd bevochtigd met water uit de brandslang van hal 4.

20. Plantenhandel (standnummer 454)

In deze stand waren planten te zien. Voor het bevochtigen werd een plantenspuit gebruikt. Deze werd gevuld ter hoogte van stand 460, waar zich een tappunt bevindt. Tweemaal daags werd de spuit (inhoud 1 liter) gevuld met koud water.

21. Pottenbakker H. (standnummer 458)

In deze stand stond een pottenbakker met potjes en een waterfontein met gedestilleerd water.

Hal 5 en 13

Op de bloemententoonstelling in hallen 5 en 13 werd dagelijks koud water, getapt via de brandslang van hal 8, gebruikt om bloemen te begieten. De fontein werd 15 februari, vijf dagen voorafgaand aan de WF, geïnstalleerd. Op die dag werden de bassins gevuld met water uit de brandslang van hal 8. Tijdens de WF zijn de bassins niet meer bijgevuld. 's Avonds en 's nachts werden de pompen afgezet. De warmte die ontstond door de pompen van de fontein veroorzaakte geen grote temperatuurverhoging van het water. Het water werd hooguit 15°C^{dd}.

Hal 8

Op de agribeurs in hal 8 werd in vijf stands water gebruikt.

1. Bloemenhandel (standnummer 835)

Hier werden bloemen op oase getoond, waarbij geen nevel ontstond. De bakken waren tijdens de WF gevuld met water.

2. Machinefabriek (standnummer 838)

In deze stand waren landbouwmachines te koop. Eén ervan was een bollenpelmachine, die een vernevelingsinstallatie had, die echter tijdens de WF niet gedemonstreerd werd. De andere machines maakten geen gebruik van water.

3. Irrigatiesysteem (standnummer 846)

In deze stand werd een druppelirrigatiesysteem voor open veldteelten gedemonstreerd (afmetingen 70x70 cm). Op 22 februari werd een bak met 10 liter koud leidingwater gevuld, afkomstig uit een fontein bij stand nr. 846. Op 25 februari werd de bak bijgevuld met twee liter water. Het water werd niet verwarmd.

4. Vernevelaar (standnummer 848)

Hier werd tussen 22 en 26 februari een bevochtiginginstallatie gedemonstreerd, die toe te passen is bij het verbouwen van groenten. Op 22 februari werd een vat gevuld met water van een tappunt in hal 8. Later werd dit vat niet meer bijgevuld. Tijdens de WF werd naar schatting tien liter water verneveld. Dit gebeurde van 3 meter hoogte. Na klachten van de

^{dd} Bron: Vertegenwoordiger waterinstallatiebedrijf

naburige caissière over het vocht en de herrie die het apparaat veroorzaakte, is minder frequent verneveld. Na afloop van de WF was in het voorraadvat nog 20 liter water over^{ee}.

5. Bollenkweker (standnummer 851)

In deze stand werd een bollenkweek op spijkerbed in plastic kratten gedemonstreerd. De aluminium tafel, waarop de kratten stonden, werd op 22 februari gevuld met ongeveer 75 liter koud water van een wasbak vlakbij de ingang en daarna afgesloten. Tijdens de WF werd daar nog eens tien liter aan toegevoegd.

^{ee} Bron: Vertegenwoordiger producent

Bijlage 6 Overzicht van alle beschikbare monsters van potentieel risicovolle producten die tijdens de WF gedemonstreerd werden

Hal 3

1. Whirlpool (standnummer 309)

Op 14 maart werd water bemonsterd van dit bad. Op 18 maart werd het filter verkregen en gekweekt. Tevens werd water van een papieren filter en een bij de stand horende waterzuil bemonsterd (beide keren door SLHa). Op 14 april werd bij een destructieve monsternamen (door SLHa en Kiwa) zowel water opgevangen als interne water- en luchtleidingen en pomponderdelen bemonsterd op biofilm met behulp van een wattendrager. Ook werden rubberen ringen gespoeld en direct op kweek gezet.

2. Matrassen (standnummer 322)

Op 19 maart werd het airconditioningsysteem, dat op deze stand gebruikt werd, bemonsterd. De uitlaat van het inmiddels droge systeem werd gespoeld en er werden uitstrijken van twee inlaatroosters en van een filter afgenomen door SLHa.

3. Brillenreiniger (standnummer 335)

Van acht spuiten werd restwater bemonsterd en werd de sproeikop gespoeld. Alle monsters werden gefiltreerd en op kweek gezet. De slangen van deze spuiten werden destructief bemonsterd.

4. Buisbad (standnummer 337)

De op de WF gebruikte mat werd nog in Zuid-Laren en op een beurs in Duitsland gedemonstreerd. Op 19 maart kwam de mat terug bij de firma. Op 22 maart werden de matten op het SLHa aangeboden voor onderzoek. Daar werd de binnenkant van de matten uitgestreken. Van deze uitstrijken werden kweken ingezet.

5. Brillenreiniger (standnummer 355)

Het stoomgedeelte en de theepot van een Turkse kan werden gespoeld met fysiologisch zout. Het spoelsel werd gefiltreerd en vervolgens op kweek gezet.

Hal 4

6. Whirlpool (standnummer 405)

Op 15 maart werd water bemonsterd van dit bad. Tevens werd het filter in zijn totaliteit bemonsterd. Bij een destructieve monsternamen op 13 april was een chloorlucht te ruiken. Het vrije chloor gehalte van het water uit de kuip bedroeg op dat moment 0,64 mg/l. Bij

deze monstername werd zowel water bemonsterd als interne water- en luchtleidingen en pomponderdelen bemonsterd op biofilm met behulp van een wattendrager. Ook werden rubber ringen, een sluiters, een waterpomp, een inblaasrooster en een additief direct op kweek gezet.

7. Potten (standnummer 409)

Op 19 maart werd het in deze stand gebruikte airconditioningsysteem bemonsterd. Van nog aanwezig water onder in het systeem werden twee monsters genomen. De in- en uitlaat van het systeem werden met een wattendrager uitgestreken.

8. Bruisbad (standnummer 411)

Op 17 maart werd een bubbelmat, volgens de firma de mat die op de WF werd gedemonstreerd, bemonsterd. De monsters kwamen door spoeling tot stand. Op 22 maart werden delen van de matten door het SLHa direct op plaat geënt.

9. Anticondensmiddel (standnummer 414)

Restwater uit een plantenspuit werd direct geënt. De sproeikop werd met een wattendrager bemonsterd op biofilm en vervolgens direct op plaat gezet. Spoelsel van een afvoerslang werd gefiltreerd en op kweek gezet. Een restant water van een opvangbak werd direct op een plaat uitgestreken.

10. Osmose-apparatuur (standnummer 436)

In deze stands werden drinkwaterkoelers gedemonstreerd met flacon, gevuld met bronwater of met gezuiverd drinkwater. Geen op de WF gebruikte flacons was meer voorhanden. Twee nieuwe flacons werden bemonsterd.

11. Schoonmaakdoekje (standnummer 447)

De tijdens de WF gebruikte doeken waren niet meer voorhanden. Wel werd restwater uit een plantenspuit bemonsterd.

12. Plantenhandel (standnummer 454)

Een tijdens de WF gebruikte plantenspuit en -gieter werden bemonsterd. Tevens werd restwater uit emmers bemonsterd.

Hal 5 en 13

De bloemententoonstelling vond plaats in de hallen 5 en 13 van de CNB. Alle (meest opgedroogde) pompen, pijpen en aansluitstukken van de elf fontein en op deze tentoonstelling werden bemonsterd op 13 maart 1999. Van een zeildoeken bassin werden uitstrijken bemonsterd op biofilm met behulp van een wattendrager; tevens werd een restant teelaarde onderzocht.

Hal 8**1. Vernevelaar (stand 848)**

Op 18 maart 1999 werd restwater uit een voorraadvat en een filter van een vernevelaar bemonsterd. Op 3 juni 1999 werd opnieuw bemonsterd.

2. Irrigatiesysteem (stand 846)

Op 19 maart 1999 werd restwater uit de slangen van een irrigatiesysteem bemonsterd. In totaal werden drie monsters afgenomen.

Bijlage 7 Analyse rapport van de monsternamen door het Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid te Haarlem

Overzichtstabel.

In onderstaande tabel is opgenomen van welke objecten er kweken voor *Legionella pneumophila* zijn uitgevoerd met het daarbij behorende aantal afgenomen monsters en het kweekresultaat.

Lokatie	Stand nr.	Object	Omschrijving monsters	Datum monster	Aantal	Resultaat
Hal 5 & 13		Fonteinen	Fonteinpompen, teelaarde, zeildoek, pijpen	13-03-99	9	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
		CNB	Putten bij de hal (PWN)	15-03-99	4	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 3, 4, 5 en 13						
Entree, hal 3, 4 en 8						
Hal 3, 4 en 5						
Hal 3 en 4						
Hal 7, 8, 9 en 14						
Kantine en mijnzaal						
			Restwater tylene ringleiding, leidingwater toiletten, brandslangen	14-03-99	12	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
			Boilerwater, diverse wasbakken (leidingwater), geiser	16-03-99	9	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
	309		Brandslangen, tylene-leiding, watermeter	20-03-99	7	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
			Destructieve bemonstering	12-04-99	18	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
			Extra bemonstering	11-05-99	10	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
			Destructieve bemonstering, brandslangen mijnzaal	04-05-99	8	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 3		Whirlpool	Whirlpool restwater	14-03-99	4	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
			Whirlpool filter	18-03-99	4	<i>Legionella pneumophila</i> a: Serotype O1 (RIVM; E1/ b: Serotype O6 (RIVM: E7/R
			Restwater waterzuil	18-03-99	1	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar

Lokatie	Stand nr.	Object	Omschrijving monsters	Datum monster	Aantal	Resultaat
Hal 3	335	Brillen-reiniger	Destructieve bemonstering	13-04-99	10	<i>Legionella pneumophila</i> : a: Serotype O1 (RIVM: E1/ b: Serotype O1 (RIVM: E3/ c: Serotype O6 (RIVM: E7/
			8 plantenspuiten	14-03-99	14	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
			Destructieve bemonstering	17-04-99	23	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 4	409	Potten en pannen	Airco stof in- en uitlaat, vocht in airco	19-03-99	4	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 4	405	Whirlpool	Whirlpool restwater + filter	15-03-99	9	<i>Legionella pneumophila</i> Serotype O1 (RIVM: E1/
Hal 4	414	Anticon-dens middel	Destructieve bemonstering	13-04-99	8	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
			Plantenspuit met restwater, opvangbak spiegel, afvoerslang	14-03-99	4	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
			Destructieve bemonstering	17-04-99	2	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 3 & 4	355	PE-leiding	Restwater uit aftapleidingen, afvoerleiding, koppeling	16-03-99	5	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 3		Brillen-reiniger	Brillenreiniger op creme-basis-geen nevel bij geweest; demo met heet water voor thee in Turkse kan (kokend water)	25-03-99	2	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 4		Bubbel-mat	Spoelwater van 2 bubbelmatten	16-03-99 en 17-03-99	1	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 8	411	Bubbel-mat	Uitstrijken van 2 bubbelmatten	19-03-99	6	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
			Restwater uit vat van vernevelaar, restwater filter, filter	18-03-99	8	<i>Legionella pneumophila</i> , a: Serotype O1 (RIVM: E3/ b: Serotype O6 (RIVM: E7/
			Water uit vat en uitstrijken van leidingen	03-06-99	8	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 4	447	Schoon-maakdoek	Plantenspuit met restwater	18-03-99	1	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 4	454	Planten-handel	Restwater uit plantenspuit, plantengieter, emmers	18-03-99	3	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 4	436	Osmose appara-tuur	Flacons drinkwater en bronwater	18-03-99	4	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 8	846	Irrigatie systeem	Restwater van irrigatiesysteem, slang	19-03-99	3	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 3	337	Bubbel-mat	Uitstrijken van bubbel-mat	22-03-99	3	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 3	322	Matrassen	Airco stof in- en uitlaat + filter, spoelwater	19-03-99	5	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar

Bijlage 8 Analyse rapport van de monsternamen door Kiwa

Overzichtstabel (KIWA).

In onderstaande tabel is opgenomen van welke objecten er kweken voor *Legionella pneumophila* zijn uitgevoerd met het daarbij behorende aantal afgenomen monsters en het kweekresultaat.

Lokatie	Stand nr.	Object	Omschrijving monsters	Datum monster	Aantal	Resultaat
Hal 3 en 4 Hal 7, 8 en 9 Kantine en mijnzaal		CNB	Putten bij de hal (PWN)	19-04-99	2	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 3	309	whirlpool	Destructieve bemonstering	12-04-99	18	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
			Extra bemonstering	11-05-99	10	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
			Destructieve bemonstering, brandslangen kantine en mijnzaal	04-05-99	8	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
Hal 4	405	whirlpool	Whirlpool filter	12-04-99	1	<i>Legionella pneumophila</i> a: Serotype O1 (RIVM; E1/R1/P1) b: Serotype O1 (RIVM; E3/R3/F3)
			Destructieve bemonstering	13-04-99	14	<i>Legionella pneumophila</i> : a: Serotype O1 (RIVM; E1/R1/P1)
			Whirlpool filter	12-04-99	1	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar
			Destructieve bemonstering	12-04-99	10	<i>Legionella</i> niet aantoonbaar

Bijlage 9 Lijst met afkortingen

AFLP	Amplified Fragment Length Polymorphisms
AMC	Amsterdams Medisch Centrum
BAO	Bestuurlijk Afstemmingsoverleg
BCYE	Buffered Charcoal Yeast Extract
CFU	Colony Forming Units (kolonievormende eenheden)
CIE	Centrum voor Infectieziekten Epidemiologie
CNB	Coöperatieve Nederlandse Bloembollencentrale
ERIC/REP	Enterobacterial Repetitive Intergenic Consensus Repetitive Extragenic Palindromes
IGZ	Inspectie voor de Gezondheidszorg
IW&V	Inspectie Waren en Veterinaire zaken
Kiwa	Kennisinstituut voor water
LIS	Laboratorium voor Infectieziektendiagnostiek en perinatale Screening
MGB	Microbiologisch laboratorium voor Gezondheidsbescherming
PCR	Polymerase Chain Reaction
PE	Polyethyleen
PFGE	Pulsed-Field Gel Electrophoresis
PWN	Provinciaal Waterleidingbedrijf Noord-Holland
RIVM	Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu
SLHa	Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid te Haarlem
SLTi	Streeklaboratorium voor de Volksgezondheid te Tilburg
VWS	Volksgezondheid, Welzijn en Sport
WF	Westfriese Flora

Bijlage 10 Lijst van tabellen en figuren

Tabel 1	Omvang en ernst van de legionella-epidemie	7
2	Overzicht potentieel risicovolle producten op de WF	25
3	Overzicht watergebruik bij potentieel risicovolle producten	26
4	Overzicht risico-score potentieel risicovolle producten	30
5	Overzicht van potentiële bronnen	31
6	Overzicht van de beschikbare monsters van de PWN-aansluitingen	31
7	Overzicht van de beschikbare monsters van de CNB-hallen	34
8	Overzicht van potentieel risicovolle producten die bemonsterd werden	36
9	Overzicht van potentieel risicovolle stands die niet bemonsterd werden	37
10	Kweek en PCR resultaten W3 (de whirlpool in hal 3)	41
11	Kweek en PCR resultaten W4 (de whirlpool in hal 4)	41
12	Kweek en PCR resultaten V8 (de vernevelaar in hal 8)	41
13	Samenvatting van de typeer-resultaten van <i>L. pneumophila</i> in drie apparaten	47
14	Resultaten van bemonstering en kweek op <i>L. pneumophila</i> spp. stand 309	48
15	Resultaten van bemonstering en kweek op <i>L. pneumophila</i> spp. stand 405	49
16	Resultaten van bemonstering en kweek op <i>L. pneumophila</i> Spp. stand 848	50
17	Overzicht van tien grote epidemieën van <i>L. pneumophila</i>	51
18	Chronologische volgorde van aansluiting van stands met eigen watervoorziening	67

Figuur 1	Topografie regio Stede Broec	19
2	Bereikbaarheid Westfrieze Flora te Bovenkarspel	20
3	Plattegrond van de CNB hallen	21
4	Waterleidingen Westfrieze Flora	22
5	Overzicht van risicovolle handelingen met water op de Westfrieze Flora	32
6	Overzicht van de bemonstering van het waterleidingnet op de Westfrieze Flora	35
7	Overzicht van de bemonsterde stands op de Westfrieze Flora	39
8	Dendrogram van PFGE van <i>L. pneumophila</i> - isolaten van patiënten die de WF bezochten en van de <i>L. pneumophila</i> - isolaten uit apparatuur	45
9	Dendrogram van AFLP van <i>L. pneumophila</i> - isolaten van patiënten die de WF bezochten en van de <i>L. pneumophila</i> - isolaten uit apparatuur	46
10	Gevallen van veteranenziekte naar laatste bezoekdag; de stippellijn geeft de dagen aan waarop Westfrieze Flora plaatsvond	58

Bijlage 11 Verzendlijst

1	De Minister van Volksgezondheid, Welzijn en Sport, Dr.E.Borst-Eilers
2	Directeur-Generaal van de Volksgezondheid, dr. H.J. Schneider
3	Hoofdinspecteur voor de Gezondheidszorg, Drs. P.H. Vree (waarnemend)
4	Inspecteur Infectieziekten van de Inspectie Gezondheidszorg, J.K. van Wijngaarden, arts
5	Inspectie voor Waren & Veterinaire Zaken, Drs.D.H.Meijer
6	Directie Gezondheidsbeleid, VWS, Drs.M.I.Esveld
7	Directie Voorlichting en Communicatie, VWS, Drs. R.A.C. Praat
8	Inspectie voor Waren & Veterinaire Zaken, Dienst Zuid, de heer H. van Zoest
9	Landelijke Coördinatiestructuur Infectieziektenbestrijding
10	Officier van Justitie Alkmaar, Mr.C.P.A.C.van Riel
11	Gemeente Stede Broec
12	Westfries Gasthuis
13	Mr. L.F.Keyser-Ringnalda, Officier van Justitie, Alkmaar
14	Politie Noord-Holland Noord, J.Oost
15	Politie Noord-Holland Noord, B.Pannekoek
16	Voorzitter van de Gezondheidsraad
17-67	Artsen infectieziektenbestrijding GGD's
68-88	Artsen-microbiologen van de Streeklaboratoria
89-90	Kennisinstituut voor water (Kiwa)
91	Nederlandse Vereniging voor Infectieziekten
92	Nederlandse Vereniging voor Medische Microbiologie (NVMM)
93	dr. H. Bijkerk
94	prof.dr. J.Huisman
95	prof. dr. R.A. Coutinho
96-106	Leden Dutch Legionella study group (AMC)
107	TNO-PML
108	Provinciaal Waterleidingbedrijf Noord-Holland
109-110	Stichting Westfriese Flora
111-112	Directie CNB-hallen
113-115	De heer J.J.Jong
116-117	De heer J.Dijkman
118-121	De heer J.Vlam
122	Consumentenbond
123	Depot Nederlandse Publicaties en Nederlandse bibliografie
124	Directie RIVM
125	Directeur Sector Volksgezondheidsonderzoek RIVM
126	Hoofd CIE, drs.J.L.Kool
127	Hoofd LIO, dr.T.G.Kimman
128	Hoofd LIS, dr.J.G.Loeber
129	Hoofd MGB, dr.A.M.Henken
130	Hoofd CZO, Prof.dr.G.A.M.van den Bos
131	Hoofd NVIC, Dr.J.Meulenbelt
132	Hoofd LVO, Dr.H.C.Rümke
133	Hoofd LBM, Dr.E.Lebret
134	Ir.J.F.M.Versteeg
135-153	Leden IGZ-infectieziekten overleg RIVM
154	Commissie van Toezicht RIVM, Prof.dr.H.K.A. Visser, voorzitter

155-166	Auteurs
167	Hoofd Voorlichting en Public Relations RIVM
168	Bibliotheek RIVM
169	Bureau Rapportenregistratie
170-190	Bureau Rapportenbeheer
191-225	Reserve