



Dick van der Kooij, Kiwa Water Research
Gerhard Wubbels, Waterlaboratorium Noord
Gerrit Veenendaal, Waterlaboratorium Noord

Legionellabacteriën in leidingwaterinstallaties behoren meestal tot de ongevaarlijke soort *Legionella anisa*

***Legionella anisa*, een in 1985 voor het eerst beschreven legionellasoort, wordt in (leiding)waterinstallaties met de kweekmethode veel vaker waargenomen dan *L. pneumophila*. In Nederland is tot nu toe echter geen enkel geval van legionellose toegeschreven aan *L. anisa* en mondiaal is *L. anisa* in slechts enkele gevallen van legionellapneumonie aangetoond. Testen met cavia's en weefselkweken bevestigen dat *L. anisa* veel minder virulent is dan *L. pneumophila*. Daarom wordt aanbevolen om de alternatieve beheersmaatregelen voor de bestrijding van legionella-bacteriën in (leiding)waterinstallaties alleen te richten op *L. pneumophila*. Een specifieke kweekmethode voor de detectie van *L. pneumophila* is beschikbaar voor deze aanpak (zie het artikel hierna), evenals een kwantitatieve PCR-methode voor spoedeisende situaties en het uitvoeren van een snelle screening van monsterseries (zie het artikel op pagina 39).**



Sinds 2002 worden in Nederland jaarlijks gemiddeld circa 250 gevallen van legionellapneumonie gerapporteerd en in 2006 zelfs 446¹⁴⁾. Deze levensbedreigende ziekte wordt voornamelijk veroorzaakt door de bacterie *Legionella pneumophila*. Blootstelling aan verneveld water (aërosol) waarin dit organisme aanwezig is, vormt de oorzaak van besmetting. Naast *L. pneumophila* zijn inmiddels meer dan 50 kweekbare legionella-soorten beschreven. Aanwijzingen

bestaan dat nog veel meer soorten aanwezig zijn in water. *L. pneumophila* is wereldwijd verantwoordelijk voor meer dan 90 procent van de gerapporteerde ziektegevallen, maar enkele andere legionellasoorten, waaronder *L. bozemanii*, *L. longbeachae* en *L. micdadei*, kunnen eveneens ziekte veroorzaken. *L. pneumophila* is echter niet de meest voorkomende soort in het milieu en het grote aandeel in het aantal ziektegevallen is het gevolg van de grote virulentie van dit organisme. Binnen *L. pneumophila* wordt onderscheid gemaakt tussen de serogroepen 1 tot 15, waarbij vertegenwoordigers van serogroep 1 het meest virulent zijn. Een verdere differentiatie binnen deze groep is mogelijk op basis van gensequenties.

Het routinematige onderzoek naar legionellabacteriën in (leiding)water wordt uitgevoerd met behulp van de kweekmethode met het semiselectieve Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE)-medium¹⁰⁾. Legionellabacteriën vormen op deze voedingsbodem kenmerkende kolonies, maar bevestiging en vaststelling van de soort vereisen nader onderzoek. Voor leidingwa-

terinstallaties geldt als eis dat de concentratie van de kweekbare legionellabacteriën lager moet zijn dan 100 kolonievormende eenheden (kve) per liter water¹⁹⁾. Deze eis is eveneens van toepassing op het door de waterbedrijven afgeleverde drinkwater. In installaties met legionellabacteriën worden vaak non-pneumophilasoorten waargenomen. Met moleculaire technieken is een nauwkeurige identificatie mogelijk. Daaruit blijkt dat *Legionella anisa* een veel voorkomende kweekbare non-pneumophila-soort is. Ook vrijwel alle legionellabacteriën die in drinkwater worden waargenomen, behoren tot *L. anisa*, terwijl *L. pneumophila* niet wordt aangetoond. In Nederland is *L. anisa* tot nu toe nooit aangewezen als veroorzaker van ziektegevallen. De vraag is daarom of de regelgeving voor legionellabacteriën in leidingwater van toepassing moet blijven op situaties waarin de overschrijding van de genoemde kwaliteitseis wordt veroorzaakt door *L. anisa*.

Verspreiding en eigenschappen van *L. anisa*

L. anisa is voor het eerst beschreven in 1985⁷⁾. Het organisme was aangetroffen in het

Het onderzoek naar voorkomen en betekenis van *L. anisa* in (leiding)waterinstallaties is uitgevoerd in opdracht van VROM-Inspectie. VROM heeft RIVM de opdracht gegeven om het beleid op het gebied van de legionellaproblematiek te evalueren. In deze evaluatie, die deze maand wordt afgerond, zal ook de in dit artikel voorgestelde aanpak worden meegenomen.

leidingwater in een tweetal ziekenhuizen en in een industriële koeltoren (in de VS). De kolonies van deze bacteriën vertonen autofluorescentie bij blootstelling aan UV-licht. De naam 'anisa' (= ongelijk) is afgeleid van de waarneming dat niet alle isolaten dit gedrag in gelijke mate vertonen. *L. anisa* is in tal van landen, waaronder de Verenigde Staten, Brazilië, het Verenigd Koninkrijk, Frankrijk, Australië en Japan, aangetoond in koeltorens, leidingwaterinstallaties en fonteinen. In Nederland is al lang bekend dat de zogeheten non-pneumophila-soorten aanwezig kunnen zijn in installaties die met drinkwater worden gevoed, maar identificatie bleek moeilijk¹⁷. In leidinginstallaties in 16 van 400 eengezinswoningen, verdeeld over de voorzieningsgebieden van vier verschillende drinkwaterproductiebedrijven, werden legionellabacteriën aangetroffen in een concentratie die hoger was dan 100 kve/l¹². Door het beschikbaar komen van moleculaire technieken kon worden aangetoond dat alle isolaten behoorden tot de soort *L. anisa*. Dit organisme was ook de dominante legionella-soort in 26 van 40 huisinstallaties in een woonwijk met stadsverwarming, waarbij de watertemperatuur in de meterkast tot boven 25°C steeg¹⁵.

Tabel 1 geeft een overzicht van de typeringen van legionellasoorten, gekweekt uit een totaal aantal van 11541 watermonsters uit (leiding)waterinstallaties die werden onderzocht door Waterlaboratorium Noord (WLN) in de periode januari tot december 2006. In 18,5 procent van deze monsters werden legionellabacteriën aangetoond met de kweekmethode (NEN6265). In 83 procent van de legionellapositieve monsters werden non-pneumophilasoorten waargenomen; in 72 procent van deze monsters betrof het *L. anisa*. In koelwatermonsters werden enkele andere non-pneumophilasoorten waargenomen, met name *L. gormanii*, *L. cherrii* en *L. gratiana*. Het aandeel van deze bacteriën in de legionellapositieve monsters (2 procent) is vrijwel gelijk aan het aandeel van *L. pneumophila* (2,1 procent). In (leiding)waterinstallaties komt *L. anisa* dus veel vaker voor dan *L. pneumophila*.

De samenstelling van de voedingsbodem is van invloed op de opbrengst en de aard van de gekweekte legionellabacteriën. Verlaging van de pH van het BCYE-medium gaf een hogere opbrengst van non-pneumophilasoorten⁸. Inmiddels is duidelijk dat een pH-verlaging de groei van *L. anisa* op dit medium versterkt¹⁸. De aanpassing van het BCYE-medium heeft derhalve waarschijnlijk een toename veroorzaakt van de waarnemingen van *L. anisa* in (leiding)waterinstallaties. Bevestiging van de aanwezigheid van *L. pneumophila* en identificatie van serogroepen is mogelijk met serologische testen. Hiermee kan ook worden vastgesteld of het non-pneumophilasoorten betreft. Voor een goede identificatie van deze soorten, waartoe ook *L. anisa* behoort, zijn moleculaire technieken nodig. Deze technieken zijn inmiddels beschikbaar.

L. anisa stelt evenals *L. pneumophila* hoge eisen aan de voeding en is voor de groei in

het watermilieu aangewezen op protozoa die als gastheer dienen. Groei van *L. anisa* is onder meer waargenomen in de amoeben *Hartmannella vermiformis* (bij 35°C), *Acanthamoeba polyphaga* (32°C) en in de ciliaat *Tetrahymena pyriformis* (30°C)^{5,16}. Opvallend is dat *L. anisa* zich niet vermeerderde in protozoa bij een temperatuur van 37°C²⁰. Bij een onderzoek van 96 typen drinkwater met een lage temperatuur (beneden 15°C), dat werd uitgevoerd met behulp van PCR-methoden, werden veel niet kweekbare, niet beschreven legionella-soorten waargenomen²². *L. anisa* werd hierbij slechts eenmaal waargenomen, namelijk in drinkwater bereid uit oppervlaktewater. Deze gegevens en de eerdere vermelde waarnemingen met betrekking tot legionellabacteriën in woninginstallaties duiden erop dat *L. anisa* zich vooral handhaaft in situaties met een watertemperatuur boven 20°C, maar lager dan de temperatuur die optimaal is voor de groei van *L. pneumophila*.

L. anisa als ziekteverwekker

In 1989 is voor het eerst melding gemaakt van de isolatie van *L. anisa* uit patiëntmateriaal. In deze situatie werd het organisme tevens in het leidingwater aangetroffen¹. De betreffende persoon was onder behandeling

met chemotherapie. Ook bij het zeer beperkte aantal andere waarnemingen van *L. anisa* in patiëntmateriaal was sprake van een onderliggende ziekte. *L. anisa* is tevens geïsoleerd uit water (fonteinen) in relatie met een tweetal uitbraken van Pontiac-koorts. Een verhoogde antistoftiter voor *L. anisa* wees uit dat dit organisme de oorzaak van deze aandoening was^{3,9}.

Bij een internationale inventarisatie van incidentele gevallen van legionellose werd *L. pneumophila* waargenomen bij 91,5 procent van de 508 ziektegevallen (84,2 procent *L. pneumophila* serogroep 1). *L. anisa* werd bij één patiënt geïsoleerd²³. In Frankrijk behoorden twee (0,8 procent) van 259 stammen uit patiëntmateriaal tot de soort *L. anisa* en was *L. pneumophila* vertegenwoordigd met 256 (98,8 procent) isolaten². In 2003 en 2004 werden in Europa 6694 gevallen van legionellose gerapporteerd¹³. Van 916 gevallen werden isolaten verkregen. *L. pneumophila* vormde 98 procent van deze isolaten; *L. anisa* werd niet waargenomen. De waargenomen non-pneumophilasoorten waren *L. longbeachae*, *L. bozemanii*, *L. dumoffii*, *L. gormanii* en *L. micdadei*. Ook in Nederland vormt *L. pneumophila* 98 procent van de stammen geïsoleerd uit patiënten-

Tabel 1. Legionellabacteriën in watermonsters afkomstig uit leidingwaterinstallaties, koeltorens en luchtbevochtigers (gegevens Waterlaboratorium Noord, 2006).

legionellasoort	aantal monsters	aandeel positieve monsters
<i>L. pneumophila</i> sg 1	244 (2,1%)	11%
<i>L. pneumophila</i> sg 2-14	117 (1,0%)	5%
non-pneumophila	1.778 (15,4%)	83%
<i>L. anisa</i>	1.551 (13,4%)	72%
overige soorten	227 (2,0%)	11%
geen <i>Legionella</i> waargenomen	9.402 (81,5%)	n.v.t.
totaal aantal monsters	11.541 (100%)	n.v.t.

Tabel 2. Gedrag van *L. anisa* en *L. pneumophila* in diverse organismen en cellijnen.

test/organisme	<i>L. anisa</i>	<i>L. pneumophila</i>	referentie
<i>cavia's</i>			
- hoge ent (2,5 x 10 ⁹ *)	geen effect**	100% dood	4
- lage ent (4,4 x 10 ⁷ *)	geen effect	100% dood	4
- hoge ent (10 ⁹ cellen)	temperatuurverhoging binnen 24 uur, daarna geen effect [#]	niet getest	5
<i>humane cellen</i>			
bloedcellen	geen groei	sterke groei	5
lymfocyten	geen groei	sterke groei	5
monocyten (35°C)	geen groei	sterke groei	11
<i>protozoa</i>			
<i>Tetrahymena pyriformis</i> (35°C)	geen groei	sterke groei	4
<i>Tetrahymena pyriformis</i> (30°C)	sterke groei	variabele groei ^{##}	16
<i>Hartmannella vermiformis</i> (35°C)	sterke groei	sterke groei	5
<i>Hartmannella vermiformis</i> (37°C)	geen groei	sterke groei	20
<i>Acanthamoeba castellanii</i> (35°C)	geen groei	sterke groei	11

* = in buikholte, ** = geen infectie en geen dood waargenomen,
= geen infectie, ## = diverse stammen geen groei



Kolonies van twee serogroepen van *Legionella pneumophila* op BCYE-medium.

materiaal en is *L. anisa* niet waargenomen²⁴⁾. Non-pneumophilasoorten, waaronder *L. anisa* spelen dus geen rol van betekenis als ziekteverwekker bij de in Nederland gerapporteerde gevallen van legionellose.

In diverse testen is de virulentie van *L. anisa* bepaald en vergeleken met die van *L. pneumophila* (zie tabel 2). Opvallend is dat injectie van hoge concentraties van *L. anisa* in de buikholte bij cavia's zelfs geen infectie veroorzaakte, terwijl toediening van een veel lagere concentratie van *L. pneumophila* binnen enkele dagen tot de dood leidde. Ook vermeerderde *L. anisa* zich niet in humane fagocyten en weefselkweken. Deze geringe mate van virulentie werd als verklaring gezien voor het optreden van Pontiac-koorts in plaats van pneumonie⁴⁾. Pontiac-koorts wordt toegeschreven aan een allergische reactie op blootstelling aan een hoge concentratie van het organisme, waarbij geen infectie optreedt.

Aanpassing beleid bestrijding van *Legionella* wenselijk

Uit bovenstaande informatie komt naar voren dat *L. pneumophila* verreweg de belangrijkste veroorzaker is van legionellose, *L. anisa* veel vaker dan *L. pneumophila* aanwezig is in (leiding)waterinstallaties en dat *L. anisa* vrijwel niet ziekteverwekkend is. Hieruit kan worden afgeleid dat het beleid voor de preventie van legionellose in Nederland zich met name dient te richten op *L. pneumophila*. Toepassing van alternatieve beheersmaatregelen bij collectieve (leiding)waterinstallaties is dus alleen zinvol als *L. pneumophila* wordt aangetroffen. Deze benadering zal in vergelijking met de huidige aanpak van het legionellaprobleem tot een aanzienlijke reductie van de maatschappelijke kosten leiden. De doelmatigheid van het preventiebeleid wordt hierdoor vergroot. Bovendien sluit deze aanpak aan bij de wijze waarop legionellose wordt vastgesteld, namelijk met de urine-antigeentest die specifiek reageert op *L. pneumophila*.

Uit de frequente aanwezigheid van *L. anisa* in leidingwaterinstallaties kan worden afgeleid dat dit organisme zich onder bepaalde

omstandigheden in het watermilieu beter kan vermeerderen en handhaven dan *L. pneumophila*. Bestrijding van *L. anisa* (of een andere non-pneumophilasoort) in bepaalde situaties is mogelijk ongewenst, omdat eliminatie van *L. anisa* het natuurlijke evenwicht verstoort en *L. pneumophila* de opgevallende plaats zou kunnen innemen. Nader onderzoek kan uitwijzen in welk temperatuurtraject sprake is van competitie tussen *L. pneumophila* en *L. anisa*. Ook de aanwezigheid van andere non-pneumophilasoorten in (leiding)waterinstallaties verdient nadere aandacht, in combinatie met onderzoek naar de betekenis van deze organismen als veroorzaker van ziekte. Moleculaire technieken voor detectie en diagnose zijn hierbij goed bruikbaar⁹⁾.

Selectieve detectie van *L. pneumophila* maakt gerichte bestrijding van dit organisme in (leiding)waterinstallaties mogelijk. Daarom is recent een kweekmethode ontwikkeld voor de specifieke detectie van *L. pneumophila*¹⁸⁾. Tevens is een snelle kwantitatieve PCR-methode voor de detectie van dit organisme beschikbaar²¹⁾. Deze methode is geschikt voor toepassing in spoedeisende situaties en kan ook worden gebruikt voor een snelle screening van monsterseries. In geval van aanwezigheid van *L. pneumophila* (boven een bepaald niveau) kan alsnog worden besloten tot het toepassen van de selectieve kweekmethode.

De groei van *L. anisa*, andere non-pneumophilasoorten en andere micro-organismen met ongewenste eigenschappen, bijvoorbeeld *Pseudomonas aeruginosa*, mycobacteriën en bepaalde protozoa of schimmels in (leiding)waterinstallaties dient uiteraard zoveel mogelijk te worden verhinderd. Dit vereist een structurele aanpak gericht op het verminderen van de biofilmvormingspotentie van het water en van de materialen die in contact komen met water, alsmede het beperken van stagnatie van het water in de installaties. Deze aanpak is ook van belang voor het beperken van de groeimogelijkheden van *L. pneumophila*.

LITERATUUR

- Bornstein N., A. Mercatello, D. Marmet, M. Surgot, Y. Deveaux en J. Fleurette (1989). Pleural infection caused by *Legionella anisa*. *J Clin Microbiol.* nr. 9, pag. 2100-1.
- Doleans A., H. Aurell, M. Reyrolle, G. Lina, J. Freney, F. Vandenesch, J. Etienne en S. Jarraud (2004). Clinical and environmental distributions of *Legionella* strains in France are different. *J Clin Microbiol.* nr. 1, pag. 458-640.
- Fenstersheib M., M. Miller, C. Diggins, S. Liska, L. Detwiler, S. Werner, D. Lindquist, W. Thacker en R. Benson (1990). Outbreak of Pontiac fever due to *Legionella anisa*. *Lancet* 336 (8706), pag. 35-37.
- Fields B., J. Barbaree, E. Shotts, J. Feeley, W. Morill, G. Sanden en M. Dykstra (1986). Comparison of guinea pig and protozoan models for determining virulence of *Legionella* species. *Inf. Immunity* 53(3), pag. 553-559.
- Fields B., J. Barbaree, G. Sanden en W. Morrill (1990). Virulence of a *Legionella anisa* strain associated with Pontiac fever: an evaluation using protozoan, cell culture, and guinea pig models. *Infect Immun.* 58(9), pag. 3139-3142.
- Gezondheidsraad (2003). Bestrijding van *Legionella*. Publicatie nr. 2003/12.
- Gorman G., J. Feeley, A. Steigerwalt, P. Edelstein, C. Moss en D. Brenner (1985). *Legionella anisa*: a new species of *Legionella* isolated from potable waters and a cooling tower. *Appl. Environ. Microbiol.* nr. 2, pag. 305-309.
- In 't Veld S. en J. de Wagt (2002). Snelle herziening van NEN6265, legionella-onderzoek aanbevolen. *H₂O* nr. 9, pag. 15-16.
- Jones T., R. Benson, E. Brown, J. Rowland, S. Crosier en W. Schaffner (2003). Epidemiologic investigation of a restaurant-associated outbreak of Pontiac fever. *Clin Infect Dis.* nr. 10, pag. 1292-1297.
- NEN6265 (1991). Onderzoek naar de aanwezigheid en het aantal kolonievormende eenheden (KVE) van legionella-bacteriën. Nederlandse Norm. Nederlands Normalisatie-Instituut.
- Neumeister B., S. Schoniger, M. Faigle, M. Eichner en K. Dietz (1997). Multiplication of different *Legionella* species in Mono Mac 6 cells and in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol.* nr. 4.
- Oesterholt F. en H. Veenendaal (2002). Onderzoek naar het voorkomen van *Legionella* in woninginstallaties. Fase II: praktijkonderzoek. Rapport KOA 02.067.
- Ricketts K. en C. Joseph (2005). Legionnaires' disease in Europe 2003-2004. *Eurosurveillance* 10 (10-12), pag. 256-259.
- RIVM (2007). Infectieziekten Bulletin nr. 1.
- Scheffer W. (2004). Stadsverwarming jaagt temperatuur leidingwater op. *Intech K&S* 14-17.
- Steele T. en A. McLennan (1996). Infection of *Tetrahymena pyriformis* by *Legionella longbeachae* and other *Legionella* species found in potting mixes. *Appl Environ Microbiol.* nr. 3, pag. 1081-1083.
- Van Kranen H. (1988). De aanwezigheid van *Legionella* species in door drinkwater gevoede watersystemen in Nederland, deel I. RIVM-rapport 840140001.
- Veenendaal H. en D. van der Kooij (2007). Een specifieke kweekmethode voor *Legionella pneumophila*. *H₂O* nr. 5, pag. 36-38.
- VROM (2004). Besluit van 26 oktober 2004 tot wijziging van het Waterleidingbesluit en het Besluit hygiëne en veiligheid badinrichtingen en zwembelangen (preventie van *Legionella* in leidingwater). Staatsblad nr. 576, pag. 1-50.
- Wadowsky R., T. Wilson, N. Kapp, A. West, J. Kuchta, S. States, J. Dowling en R. Yee (1991). Multiplication of *Legionella spp.* in tap water containing *Hartmannella vermiformis*. *Appl. Environ. Microbiol.* nr. 7, pag. 1950-1955.
- Wullings B., G. Wubbels, H. Veenendaal en D. van der Kooij (2007). Snelle en kwantitatieve detectie van *Legionella pneumophila* in water met Q-PCR. *H₂O* nr. 5, pag. 39-41.
- Wullings B., G. Wubbels en D. van der Kooij (2005). Niet-kweekbare, nog niet beschreven *Legionella*-bacteriën algemeen aanwezig in drinkwater. *H₂O* nr. 25/26, pag. 43-46.
- Yu V., J. Plouffe, M. Pastoris, J. Stout, M. Schousboe, A. Widmer, J. Summersgill, T. File, C. Heath, D. Paterson en A. Chereshsky (2002). Distribution of *Legionella* species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis.* nr. 1, pag. 127-128.
- IJzerman E. (2005). Welke typen *Legionella* in water zijn gevaarlijk? Nieuwsbrief nr. 7, pag. 3.