



Niet-kweekbare, nog niet beschreven *Legionella*-bacteriën algemeen aanwezig in drinkwater

BART WULLINGS, KIWA WATER RESEARCH

GERHARD WUBBELS, WATERLABORATORIUM NOORD

DICK VAN DER KOOIJ, KIWA WATER RESEARCH

Met molecuair-biologische methoden gebaseerd op de polymerase kettingreactie (PCR) is onderzoek uitgevoerd naar de aanwezigheid en identiteit van legionellabacteriën in het drinkwater 'af pompstation'. *Legionella pneumophila*, de veroorzaker van legionellapneumonie, werd niet aangetroffen met deze methoden en evenmin met de kweekmethode. Met de PCR-methode werden in alle monsters (DNA van) legionellabacteriën aangetoond, in concentraties van 1000 tot circa een miljoen cellen per liter. Identificatie van deze bacteriën met behulp van sequentie-analyse wees uit dat ongeveer één derde deel verwant was met soorten als *L. bozemanii* en *L. worthingii*, maar het merendeel behoorde tot nog niet beschreven soorten. Dit betekent dat de genetische diversiteit in het geslacht *Legionella* veel groter is dan het aantal tot nu toe beschreven legionellasoorten. De aangetroffen legionellabacteriën, die niet groeien op de standaard voedingsbodem, vermeerderen zich bij temperaturen beneden 15°C. Er zijn geen aanwijzingen dat deze niet-kweekbare legionellabacteriën een risico vormen voor de volksgezondheid.

Naar aanleiding van de grote uitbraak van legionellose in Bovenkarspel in 1999 is in Nederland wetgeving ontwikkeld die tot doel heeft om de groei van legionellabacteriën in watersystemen zoveel mogelijk te verhinderen. De Tijdelijke Regeling verplichtte de eigenaar/beheerder tot het laten uitvoeren van een risicoanalyse en het treffen van corrigerende maatregelen, indien nodig. Het Besluit van 26 oktober 2004 verplicht beheerders van collectieve waterleidingssystemen tevens tot het laten uitvoeren van periodiek onderzoek naar de aanwezigheid van legionellabacteriën². Deze organismen mogen in het leidingwater niet worden aangetroffen (beneden de 100 kolonievormende eenheden per liter) met de genormaliseerde kweekmethode met Buffered Charcoal Yeast Extract (BCYE) agar¹. Ook de waterbedrijven zijn verplicht periodiek onderzoek uit te voeren naar het voorkomen van *Legionella* in het drinkwater.

Naast de kweekmethode zijn diverse andere technieken beschikbaar voor het detecteren van

*Legionella*⁶. Met fluorescerende antilichamen, die zich hechten aan de wand van de bacteriecel, kunnen legionellabacteriën selectief zichtbaar worden gemaakt en vervolgens geteld met behulp van een microscoop. Een andere microscopische methode is de fluorescente in situ hybridisatie (FISH), waarbij zeer selectieve DNA-'probes' zich hechten aan genetisch materiaal (RNA) in de cel. Met de FISH-methode worden alleen actieve bacteriën waargenomen. En 'last but not least' methoden gebaseerd op de polymerase kettingreactie, waarmee het genetisch materiaal selectief kunstmatig wordt vermenigvuldigd (zie kader). Legionellabacteriën zijn met deze methoden aangetoond in grond-, oppervlakte- en afvalwater én in tal van waterinstallaties, zoals warmwatersystemen, koeltorens en whirlpools³. Bij watertemperaturen beneden 25°C worden met de kweekmethode echter zelden legionellabacteriën waargenomen. Uit meerdere studies met moleculaire technieken komt naar voren dat bepaalde legionellabacteriën zich ook vermeerderen bij relatief lage temperatuur.

Kwantitatieve detectie met real-time PCR

Bij de recent ontwikkelde real-time PCR-methode wordt met behulp van de polymerase kettingreactie (PCR) heel specifiek en zeer snel (binnen vier uur) een karakteristiek DNA-fragment vermenigvuldigd met behulp van 'primers': korte synthetische DNA-moleculen. Met real-time PCR kan deze vermenigvuldiging on-line worden gevolgd en wordt aansluitend met behulp van een ijklijn van een bekende hoeveelheid DNA-kopieën of bacteriën de oorspronkelijke concentratie van in dit geval alle legionellabacteriën of alleen *L. pneumophila* berekend. In de legionellaspécifieke PCR wordt een deel van het 16S rRNA-gen vermenigvuldigd, met de *L. pneumophila* specifieke primers een deel van het (macrophage infectivity potentiator)-gen.

In het voorjaar van 2001 detecteerde Waterlaboratorium Noord legionellabacteriën in het uitgaande drinkwater van pompstation Sellin-gen met een PCR-methode, maar met de kweekmethode werden ze niet aangetoond. Een regionale krant meldde 'Legionella legt watervoorziening O-Groningen lam' en lokaal ontstond veel verwarring. Het ontbreken van informatie over concentraties en identiteit van niet kweekbare legionellabacteriën in drinkwater vormde de aanleiding voor een nader onderzoek naar deze organismen in het drinkwater in Nederland. Bij dit onderzoek, dat is uitgevoerd in het kader van het BTO-programma, zijn PCR-methoden gebruikt naast de kweekmethode.

Watermonsters en analysemethoden

Om een duidelijk beeld te krijgen van de aanwezigheid van legionellabacteriën in het drinkwater direct na de behandeling werd het uitgaande water van in totaal 97 pompstations onderzocht. Dit betrof drinkwater bereid uit oppervlaktewater en uit anaëroob en aëroob grondwater. Bij deze pompstations wordt een grote verscheidenheid aan behandelingsprocessen toegepast. De temperatuur van het uitgaande grondwater varieert vrijwel niet en is het gehele jaar lager dan 15°C. De temperatuur van het behandelde oppervlaktewater varieert tussen waarden onder 3°C tot bijna 23°C in de zomer. Monsters voor onderzoek van drinkwater bereid uit oppervlaktewater zijn genomen in een winterperiode (met een temperatuur onder de 5°C) voor de dosering van de nadesinfectie.

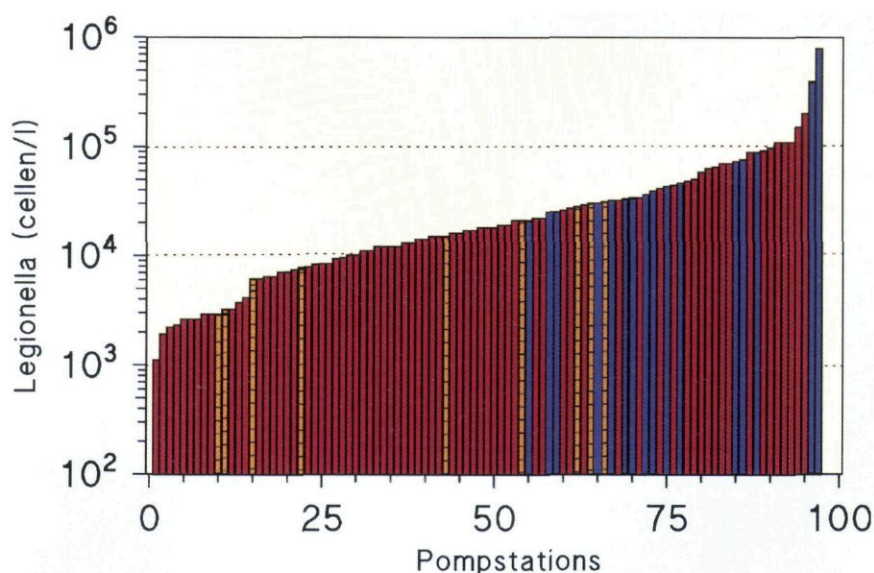
De watermonsters (van een liter) zijn gefilterd door een membraanfilter (poriegrootte

0,45µm). Vervolgens is het DNA van de micro-organismen op het filter geïsoleerd en gezuiverd. Met behulp van twee verschillende kwantitatieve real-time PCR-methoden is vervolgens het totale aantal legionellabacteriën (alle soorten) bepaald en bovendien het aantal bacteriën behorende tot *L. pneumophila* (zie kader). Ook zijn de watermonsters onderzocht met het semi-selectieve BCYE-medium (NEN 6265)¹⁾.

Het DNA van de legionellabacteriën dat door toepassing van de PCR is verkregen, is nader geanalyseerd (zie kader). Hierbij is de volgorde (sequentie) bepaald van de basenparen van de DNA-fragmenten uit een serie geselecteerde monsters. Deze zijn vervolgens geïdentificeerd met behulp van on-line sequentiedatabanken, waarin alle bekende DNA-sequenties (van mens tot virus) zijn opgenomen. Met een zogeheten Blast-analyse is hierbij de meest overeenkomende volgorde opgezocht. De verkregen informatie is tevens gebruikt voor het berekenen van een fylogenetische stamboom om de onderlinge verwantschap weer te geven tussen de verkregen sequenties en de bekende legionellasoorten.

Legionella aanwezig in alle typen rein water

In alle geanalyseerde watermonsters 'af pompstation' is met de real-time PCR-methode het DNA van legionellabacteriën aangetoond. Dit bevestigt de waarnemingen bij pompstation Sellingen. DNA van *L. pneumophila* is echter in geen van deze monsters aangetroffen (minder dan 100 cellen/l). Evenmin is *Legionella* waargenomen met de kweekmethode (beneden 50 kve/l). De concentratie van de met real-time PCR gedetecteerde legionellabacteriën varieerde van circa 1000 tot bijna een miljoen cellen per liter (zie afbeelding 1). De concentratie in het behandelde oppervlaktewater bleek significant hoger dan in het drinkwater bereid uit grondwater. Legionellabacteriën vormden slechts een kleine fractie (minder of gelijk aan 0,1%) van de microbiële populatie in de onderzochte watertypen. Gezien de sterke reductie van de aantallen bacteriën door processen die worden toegepast bij de bereiding van drinkwater uit oppervlaktewater, kan worden aangenomen dat de aangetroffen legionellabacteriën zich vermeerderen in diverse stadia van de zuivering, met name bij filtratieprocessen. Dit is eveneens het geval bij de bereiding van drinkwater uit grondwater, ondanks de relatief lage watertemperatuur. Onderzoek van watermonsters genomen na de verschillende zuiveringsstappen bevestigde de eerdere analyses: in alle watermonsters van het aërobe grondwater, het anaërobe grondwater na beluchting en snelle zandfiltratie, het ruwe oppervlaktewater en na alle verschillende



Afb. 1: Concentratie van de legionellabacteriën, bepaald met een real-time PCR-methode in behandeld water van 97 productielocaties. ■ blauwe kolom = drinkwater uit oppervlaktewater; ■ rode kolom = drinkwater uit anaëroob grondwater; ■ gele kolom met arcering = drinkwater uit aëroob grondwater.

Legionellasoorten of typen die meer dan 97% sequentieovereenkomst bezitten met DNA-sequenties afkomstig van behandeld oppervlaktewater en behandeld anaëroob en aëroob grondwater. De volgorde is op basis van frequentie van aantreffen.

soort of type	pathogeniteit**	behandeld oppervlakte water	behandeld anaëroob grondwater	behandeld aëroob grondwater	totaal aantal (%)
<i>L. bozemanæ</i>	+	3	5		8 (6,5 %)
<i>L. worsleiensis</i>	-	1	5	1	7 (5,6 %)
<i>L. waltersii</i>	-	3		1	4 (3,2 %)
<i>L. quateirensis</i>	-		1	3	4 (3,2 %)
<i>L. lytica</i> (LLAP 9)*	+	3			3 (2,4 %)
LLAP 2*	-		1	1	2 (1,6 %)
<i>L. adelaidensis</i>	-		1	1	2 (1,6 %)
<i>L. pneumophila</i>	+		1		1 (0,8 %)
<i>L. donaldsonii</i>	-	1			1 (0,8 %)
<i>L. dumoffii</i>	+		1		1 (0,8 %)
<i>L. londiniensis</i>	-	1			1 (0,8 %)
LLAP 4*	+	1			1 (0,8 %)
<i>L. anisa</i>	+	1			1 (0,8 %)
<i>L. fairfieldensis</i>	-		1		1 (0,8 %)
<i>L. fallonii</i> (LLAP 10)*	+	1			1 (0,8 %)
<i>L. micdadei</i>	+			1	1 (0,8 %)
<i>L. steigerwaltii</i>	-		1		1 (0,8 %)
totaal geïdentificeerd (%)		15 (30 %)	17 (34,7 %)	8 (32 %)	40 (32,2 %)
totaal geïsoleerd		50	49	25	124 (100 %)

* LLAP = Legionella Like Amoebal Pathogen ** soorten geassocieerd met gevallen van legionellose.

behandelingsstappen is *Legionella* aanwezig. In de monsters van het ruwe anaërobe grondwater is geen *Legionella* aangetoond en ozonisatie veroorzaakte een duidelijke reductie van het aantal legionellabacteriën.

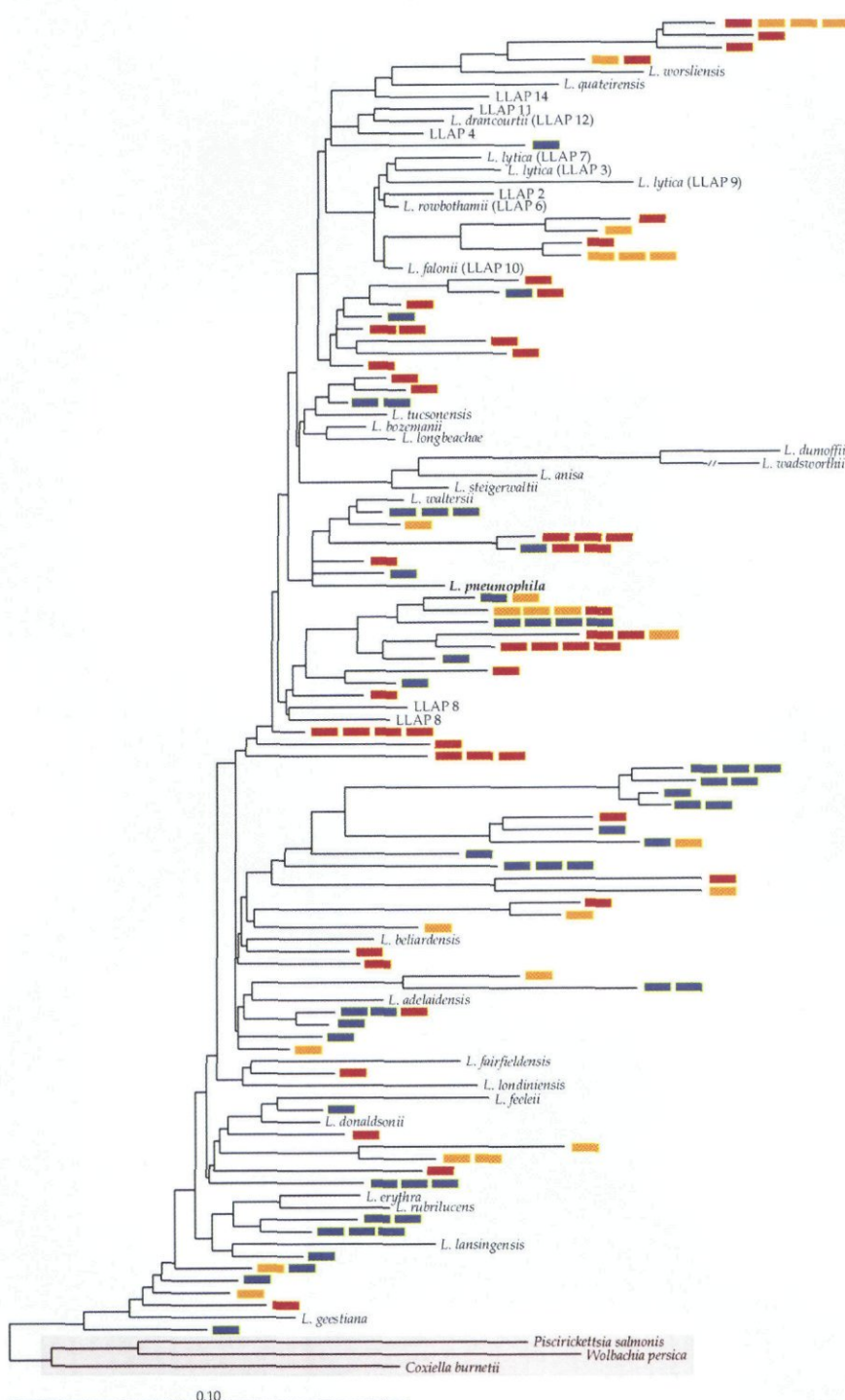
Nog niet beschreven typen legionellabacteriën

De identiteit en de genetische diversiteit van de legionellabacteriën die met de PCR-

methode zijn aangetoond in het uitgaande drinkwater, zijn bepaald door nadere analyse van 123 verschillende DNA-fragmenten uit het drinkwater van 24 pompstations. Alle DNA-sequenties hebben de grootste overeenkomst met sequenties van bekende legionellasoorten, variërend van 92 tot 99 procent. Voor de indeling van bacteriesoorten worden sequenties met minder dan 97 procent sequentieovereenkomst als een aparte soort beschouwd. Eén derde van

Identificatie na PCR-detectie

Het DNA van alle aanwezige legionellabacteriën in een watermonster resulteert na PCR in een verzameling van PCR-fragmenten. Om te achterhalen welke legionellatypen/soorten in het monster aanwezig waren, zijn de DNA-fragmenten gekloond met een recombinant DNA-techniek. Hierbij wordt DNA van *Legionella* ingebracht in een plasmide van een andere bacterie (*E. coli*). Plasmiden zijn korte circulaire DNA-moleculen die vaak resistentiegenen bevatten. Deze plasmiden kunnen worden geïsoleerd, met speciale enzymen worden opgeknijpt en weer aan elkaar gezet met daartussen het 'vreemde' DNA. Elk circulair plasmide kan maar een één DNA-fragment opnemen. Vervolgens wordt elke recombinant plasmide door een speciaal voor dit doel ontwikkelde *E. coli*-cel opgenomen. Met behulp van een antibioticum is mogelijk deze recombinante *E. coli*-cellen, met een 'vreemd' *Legionella* 16S rDNA-fragment, selectief te laten groeien op een agarmedium. Elke *E. coli*-kolonie is een kloon van bacteriën die alle een identiek DNA-fragment bevatten uit de verzameling van oorspronkelijk mogelijk vele verschillende DNA-fragmenten. Van een aantal van deze klonen met een verschillend DNA-fragment is daarna de volgorde van de basen bepaald. Vergelijken van deze sequentie met bekende DNA-sequenties geeft de identiteit van het oorspronkelijk uit het watermonster afkomstige organisme. Sequentie-analyse van meerdere klonen uit elk watermonster geeft informatie over de genetische identiteit en diversiteit van de legionellabacteriën in de onderzochte watertypen.



Afb. 2: Fylogenetische stamboom met daarin de 16S rRNA-gen-sequenties van de beschikbare beschreven legionellasoorten en alle DNA-sequenties afkomstig van uitgaand drinkwater en oppervlaktewater. Ter vergelijking zijn sequenties van verwante bacteriegeslachten, zoals *Coxiella*, opgenomen. Elk gekleurd blokje vertegenwoordigt een DNA-sequentie uit drinkwater. DNA-sequenties met meer dan 99% sequentieovereenkomst zijn gegroepeerd (meerdere blokjes achter elkaar). De schaal (0,1 = 10%) is de gecorrigeerde sequentiediversiteit.

■ Bow = drinkwater uit oppervlaktewater; ■ Bgw-an = drinkwater uit anaëroob grondwater; ■ Bgw-aer = drinkwater uit aëroob grondwater.

de klonen (40) heeft een sequentieovereenkomst van meer dan 97 procent met beschreven legionellasoorten als *L. bozemanii*, *L. worshiensis* en LLAP-typen (zie tabel). Eén kloon kwam meer dan 97 procent overeen met de sequentie van *L. pneumophila*. De overige 83 kloonsequenties

hebben minder dan 97 procent overeenkomst met tot nu toe bekende legionellasoorten. Deze sequenties behoren dus waarschijnlijk tot onbekende en nog niet eerder beschreven legionellatypen. Deze conclusie wordt bevestigd door de fylogenetische stamboom die is gemaakt op

basis van de DNA-sequenties uit de monsters van uitgaand drinkwater, samen met sequenties van de beschreven legionellasoorten (zie afbeelding 2). De meeste nieuwe DNA-sequenties zijn aparte takken (clusters) aan de boom en vallen niet samen met bekende legionellasoorten. Uit de verspreiding van de nieuwe sequenties in de boom blijkt dat de genetische diversiteit van de legionellabacteriën in het uitgaande drinkwater zeer groot is. Ook blijkt de genetische diversiteit binnen het geslacht *Legionella* veel groter dan tot nu toe op basis van de beschreven, gekweekte, legionellasoorten werd aangenomen. Deze beschreven soorten zijn meestal geïsoleerd bij temperaturen boven 25°C, terwijl de legionellabacteriën bij dit onderzoek zich kunnen vermeerderen in water bij temperaturen beneden 15°C.

Betekenis voor de volksgezondheid

De aanwezigheid van *Legionella* in water kan bij aerosolvorming een gevaar opleveren voor de volksgezondheid. De vraag rijst of de in het drinkwater aangetroffen niet-kweekbare legionellabacteriën een risico voor gezondheid vormen. De in Nederland waargenomen ziektegevallen worden vrijwel alle veroorzaakt door *L. pneumophila*⁴⁾. Dit organisme is in dit onderzoek niet waargenomen met de kweekmethode; de PCR voor *L. pneumophila* was negatief voor alle monsters van uitgaand drinkwater. Slechts één DNA-sequentie kwam voor meer dan 97 procent overeen met *L. pneumophila*. Enkele non-*pneumophila*-soorten zijn geassocieerd met ziekte (zie tabel), maar het is niet duidelijk of de aangetoonde legionellatypen ook daadwerkelijk pathogeen zijn. Ook binnen *L. pneumophila* komen grote verschillen in virulentie voor⁵⁾. De dominantie van *L. pneumophila* en *L. anisa* in warmwaterinstallaties vormt bovendien een aanwijzing dat de aangetroffen niet-kweekbare legionellabacteriën zich (vrijwel) niet kunnen vermeerderen bij 37°C, de lichaamstemperatuur van de mens. De resultaten van dit onderzoek geven dan ook

geen aanleiding om te veronderstellen dat deze niet-kweekbare legionellabacteriën een gevaar vormen voor de volksgezondheid.

De groei van legionellabacteriën hangt samen met biofilmvorming. Mogelijk belemmeren de hierboven beschreven niet-kweekbare legionellabacteriën in bepaalde situaties zelfs de groei van ongewenste soorten. Bij opwarming van het water treedt een verschuiving op bij de samenstelling van de legionella-soorten. Dit verklaart dat voornamelijk *L. pneumophila* en ook *L. anisa* worden waargenomen in installaties voor warmtapwater en in koeltorens. 

LITERATUUR

- 1) Nederlands Normalisatie Instituut (1991). Bacteriologisch onderzoek van water. Onderzoek naar de aanwezigheid en aantal kolonievormende eenheden van legionellabacteriën. NEN 6265.
- 2) VROM (2004). Besluit van 26 oktober 2004 tot wijziging van het Waterleidingbesluit en het Besluit hygiëne en veiligheid badinrichtingen en zwemgelegenheden (preventie van *Legionella* in leidingwater). Staatsblad 2004:576.

- 3) Den Boer J., E. Yzerman, J. Schellekens, K. Lettinga, H. Boshuizen, J. van Steenbergen, A. Bosman, S. Van der Hof, H. van Vliet, M. Peeters, R. van Ketel, P. Speelman, J. Kool en M. Conyn-Van Spaendonck (2002). A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999. *Emerging Infectious diseases* nr. 1, pag. 37-43.
- 4) Den Boer J., I. Friesema en J. Hooi (2002). Gemelde legionella-pneumonie in Nederland, 1987-2000. *Ned. Tijdschr. Geneesk.* nr. 7, pag. 315-320.
- 5) Fields B., R. Benson en R. Besser (2002). Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin. Microbiol. Rev.* nr. 15, pag. 506-526.
- 6) Van der Kooij D., H. Veenendaal en B. Wullings (2003). Kwantitatieve bepaling van *Legionella* in water: na 21 jaar nog in de kinderschoenen! *H₂O* nr. 4, pag. 21-23.