

## Legionellabesmetting en -preventie: de stand van zaken

*Antoine van Hoorn (VonkWater) en Jacob Bruin (Bruin4Legionella)*

**Sinds het uitbreken van veteranenziekte ruim veertig jaar geleden, is er al veel bekend geworden over legionellabacteriën en de door deze bacteriën veroorzaakte ziekte. Er zijn diagnostische methoden ontwikkeld en er is kennis opgedaan over de natuurlijke habitats en andere ecologische bronnen. In veel landen is wetgeving voor preventie geïmplementeerd. Jaarlijks wordt echter in Europa nog steeds bij meer dan 6.000 patiënten veteranenziekte geconstateerd en elk jaar vinden er wereldwijd nieuwe uitbraken plaats. Dit benadrukt dat er nog meer wetenschappelijk onderzoek verricht moet worden naar het voorkomen van besmettingen met legionellabacteriën en de gevolgen hiervan.**

Sinds de eerste bekende uitbraak van *Legionnaires' disease* (LD) of veteranenziekte in 1976 in Philadelphia is er al veel bekend geworden over legionellabacteriën en de door deze bacteriën veroorzaakte ziekte.

Op de conferentie van de *Escmid Study Group for Legionella Infections* (ESGLI) op 22 en 23 september 2016 in Amsterdam zijn de nieuwste wetenschappelijke ontwikkelingen en kennis over legionella gepresenteerd. Bezoekers werden bijgepraat over de stand van zaken op het gebied van ecologie, de diagnose en de toe te passen methoden, de resultaten van onderzoeken naar oorzaken van uitbraken, de ontwikkelingen op het gebied van epidemiologie en surveillance en de onderzoeken naar de bron van legionellabesmetting en -preventie. Een gedeelte van de grote hoeveelheid informatie die tijdens de conferentie aangeboden werd, wordt hieronder samengevat.

Inzicht in de ecologie van legionella, inclusief hoe het reageert op een veranderend klimaat, is essentieel voor het beheer van risico's in watersystemen. Daarnaast is vergrote kennis over de interactie van legionella met protozoa in biofilms, de groeivoorwaarden van legionellabacteriën en de invloed van virulentie van groot belang. Bescherming tegen legionellabesmetting is essentieel voor de beoordeling van het effect van verschillende controlemaatregelen voor de preventie van legionella in bijvoorbeeld sanitaire systemen in ziekenhuizen, hotels, spa-zwembaden en beluchting van vijvers, maar ook bij natte koeltorens en biologische afvalwaterzuiveringsinstallaties.

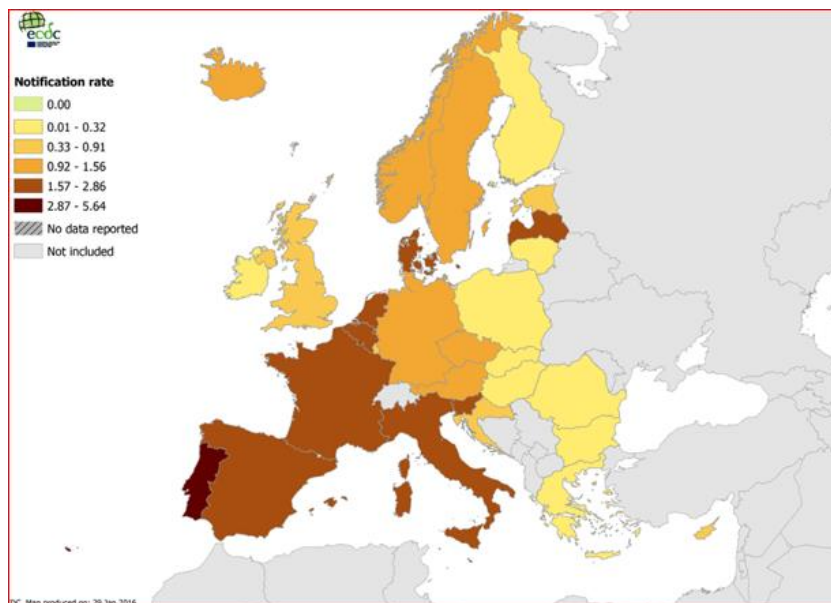
Van belang binnen de diagnostiek is de verbetering van de kweekmethoden en het gebruik van *Polymerase Chain Reaction* (PCR, een manier om uit zeer kleine hoeveelheden DNA specifiek een of meer gedeeltes te vermenigvuldigen tot er genoeg van is om het te analyseren). Ook de nieuwe mogelijkheden van het typeren van isolaten (zie kader) dragen bij aan een verbeterd inzicht in de epidemiologie van de legionellabacterie.

Het is wereldwijd bekend dat er veel kleine en soms grote uitbraken (clusters) van veteranenziekte plaatsvinden. Omgaan met een uitbraak en het vinden van de bron van de epidemie is een belangrijke opgave voor de algemene gezondheidszorg. Vaak gaat het echter om sporadische gevallen van veteranenziekte die zelden kunnen worden gekoppeld aan een uitbraak of aan reizen. De bron van deze infecties blijft hierdoor vaak onbekend.

## Epidemiologie

Epidemiologische trends worden in Europa gemonitord door het Europese Centrum voor ziektepreventie en -bestrijding (ECDC) in Stockholm. Het *European Legionnaires' Disease Surveillance Network* (ELDSNet) doet meldingen van, al dan niet met reizen geassocieerde, gevallen van veteranenziekte. Op basis van deze meldingen vindt bronopsporing plaats om mogelijke clusters en daarmee meer besmettingen te voorkomen.

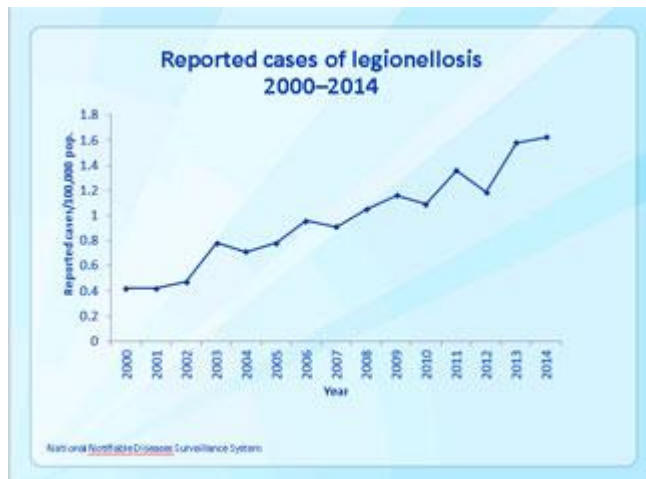
Oorspronkelijk werden besmettingen met legionellabacteriën vooral gerelateerd aan reizen en dan vooral naar Zuid-Europese landen. Daar bestond aanvankelijk geen meldingsplicht voor de door deze bacteriën veroorzaakte ziekte. Pas nadat reisorganisaties toeristische bestemmingen met verdachte, besmette hotels uit hun programma begonnen te schrappen moesten deze landen wel in actie komen. Vooral in Turkije heeft dat geleid tot sterke verbeteringen. Niettemin werden er in 2015 nog steeds ruim 6.000 besmettingen of vermoedelijke besmettingsgevallen gemeld door de 28 bij ELDSNet aangesloten Europese landen. De *overall notification rate* (aantal meldingen van mogelijke besmettingen per 100.000 inwoners) is hiermee 1,4 (zie afbeelding 1) Dit is het hoogste aantal sinds gestart is met de registratie. Een van de mogelijke oorzaken is dat er steeds vaker gereisd wordt, vooral binnen Europa.



Afbeelding 1. Overall notification rate per land, oftewel het aantal besmettingen per 100.000 inwoners

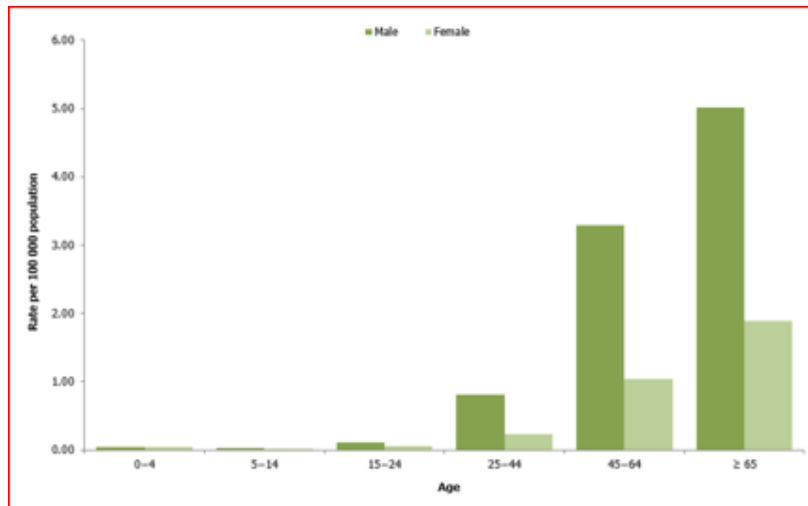
Hierbij dient te worden opgemerkt dat het aantal gemelde besmettingen nog steeds stijgt, mogelijk als gevolg van het beter nakomen van de meldingsplicht. Dit fenomeen wordt ook in de Verenigde Staten waargenomen: het aantal besmettingsgevallen dat wordt gemeld wordt steeds hoger, met het hoogste aantal in 2015, namelijk ruim 5.000 oftewel 1,65 per 100.000 inwoners, met een duidelijke piek in de zomer (zie afbeelding 2).

Ook wordt gedacht aan klimaatveranderingen als (gedeeltelijke) verklaring. De zomers van 2014 en 2015 waren extreem warm en in beide jaren was het aantal besmettingen met legionellabacteriën het hoogst. Hevige regenval na warme, droge perioden blijkt specifiek te leiden tot een piek in het aantal besmettingsgevallen.



Afbeelding 2. Het aantal gerapporteerde legionellabesmettingen in de VS. Bron: National Notifiable Diseases Surveillance Systems, USA, 2015

Het epidemiologische plaatje voor 2015 laat dus, in vergelijking met voorgaande jaren, een toename zien in het aantal gemelde LD-gevallen. De verhouding man – vrouw is 2,5 : 1. Mensen ouder dan 64 jaar vormden 47 % van de besmette groep. De leeftijden van patiënten varieerden echter tussen 10 en 94 jaar, met een gemiddelde leeftijd van 62 jaar (zie afbeelding 3). Ruim 8 % overleed aan de gevolgen van de besmetting, een percentage dat goed overeenkomt met de gemeten mortaliteit in Nederland, die varieert tussen 5 en 10 %.



Afbeelding 3. Aantal besmettingen per 100.000 inwoners naar leeftijd en geslacht. Bron: European Centre for Disease Prevention and Control, 2015

Van de reisgerelateerde LD-gevallen is twee derde gemeld door Groot-Brittannië, Italië, Frankrijk en Nederland. De internationale samenwerking van ELDSNet is een belangrijke factor gebleken in het opsporen van aan reizen geassocieerde clusters (groepen van personen waarbij een legionellabesmetting is vastgesteld en die dezelfde reisbestemmingen hadden). Zonder deze samenwerking zou een groot gedeelte van deze clusters niet gevonden zijn. Voor de onderzoekende epidemiologen heeft ECDC een Geografisch Informatiesysteem (GIS) gebouwd dat als gereedschap bij een uitbraak voor het vinden van een bron kan worden

gebruikt. Voor 60 % van de 144 in 2015 gemelde clusters van besmettingen is echter nog steeds geen oorzaak gevonden.

Dat het vinden van een oorzaak van een besmetting vaak erg moeilijk is, leert het volgende voorbeeld, waarbij de besmettingsbron overigens wel werd vastgesteld. Het betrof een besmetting bij een Nederlandse man die met een reisgezelschap naar Egypte was geweest. Uit onderzoek door het ziekenhuis waar de man na terugkomst was opgenomen bleek dat niemand anders uit het gezelschap besmet was. Uiteindelijk bleek het water in een apparaat dat wordt gebruikt als ondersteuning van de ademhaling bij apneuproblemen (CPAP) de boosdoener.

### Genomica en serotypering

Op dit moment zijn er binnen het geslacht *Legionella* 61 soorten/ondersoorten beschreven. Met *Whole Genome Sequencing* (WGS, zie kader) zijn in Schotland over een periode van 30 jaar 400 stammen, zowel afkomstig van patiënten als uit de omgeving, met elkaar vergeleken. De eerste resultaten geven een inzicht in het pathogeen vermogen van *Legionella*-soorten. Verdere analyse van de beschikbare data vindt nog plaats. Opmerkelijk blijft al jaren het feit dat *L. pneumophila* serogroep 1 ST47 het merendeel van de legionella-infecties bij patiënten voor zijn rekening neemt en slechts zelden in omgevingsmonsters wordt gevonden. Om die reden is tijdens de conferentie de hierboven genoemde PCR-techniek gepresenteerd om bronnen waar ST47 voorkomt systematisch op te kunnen sporen.



Afbeelding 4. Real-time PCR-detectiesystemen

In veel gevallen wordt bij bronopsporing met de standaard kweektechniek geen legionella gevonden. Een verklaring hiervoor kan zijn dat de bacterie in een niet-kweekbare staat is veranderd. Alternatieve, kweek-onafhankelijke methodes worden ontwikkeld, waarbij zowel het aantal in de monsters nagegaan wordt als wat dit betekent voor het infecteren van mensen.

De moleculaire techniek *Sequence-Based Typing* (SBT) is voor het typeren van legionellastammen nog steeds de gouden standaard. Er wordt nu een goedkopere en minder tijdrovende methode ontwikkeld. De eerste resultaten van de vergelijking van MALDI-TOF-massaspectrometrie met SBT zijn zeer hoopvol. Deze kan binnenkort als een eerste screeningsstap gebruikt worden in epidemiologische studies.

### Genomica en serotypering

Genomica is het DNA-onderzoek bij micro-organismen waarbij op genetisch niveau gezocht wordt naar oorzaak en verloop van een ziekte. Hierbij wordt onder andere onderzoek gedaan naar het ziekmakend vermogen (pathogeniciteit) van de bacterie. Bij dit onderzoek wordt gebruik gemaakt van serologische en moleculair-biologische typering.

Serologische typering is het typeren naar serogroep met behulp van commercieel verkrijgbare antisera. De legionellabacterie kan hiermee verdeeld worden in serogroepen 1-15.

Voor de moleculair-biologische typering wordt de nucleïnezuur- of aminozuurvolgorde van het DNA van de bacterie bepaald. Er zijn verschillende moleculaire typering in gebruik. Voor het genotypen wordt de *Sequence Based-Techniek* (SBT) [1] gebruikt en voor het vergelijken van de verschillende stammen de *Whole Genome Sequence-techniek* (WGS) [2]. Met SBT kunnen nu al meer dan 1.400 verschillende *Sequence Types* (STs) worden onderscheiden. Het is daarmee een belangrijke techniek voor het aantonen van de relatie tussen klinische stammen (patiënt) en stammen afkomstig van mogelijke bronnen (omgeving).

### Uitbraken en koeltorens

De afgelopen jaren hebben zich diverse besmettingen voorgedaan waarbij koeltorens de oorzaak waren of daar sterk van verdacht werden. Van de twaalf grootste legionella-uitbraken waren er bij negen ten minste sterke vermoedens dat de oorzaak gezocht moest worden bij besmette koeltorens.

Een zeker niet volledig overzicht:

2002: Groot Brittannië - Barrow in Furness, 172 besmette personen, 7 overleden

2006: Nederland – Amsterdam, 30 besmette personen, 3 overleden

2012: Groot Brittannië – Edinburgh, 61 besmette personen, 1 overleden

2014: Spanje - Sabadell, 41 besmette personen, 6 overleden,

2014: Portugal - Villa Franca, 375 besmette personen, 12 overleden



Afbeelding 5. Industriële koeltorens

Zoals eerder gemeld wordt slechts in incidentele gevallen de oorzaak van een besmetting achterhaald. Veelal lukt dit niet. Dit was ook het geval bij twee sterk op elkaar lijkende uitbraken in Bremen eind 2015 (19 besmettingen) en in februari/maart 2016 (26

besmettingen), waarvoor geen oorzaak is gevonden. Hoogstwaarschijnlijk ging het in beide gevallen om dezelfde, tijdelijk actieve bron. Hoewel van onder meer 55 gebouwen en 115 koeltorens monsters zijn genomen, is met de resultaten geen verband te leggen met de geconstateerde besmettingen. Ook de eventuele effecten van de direct genomen maatregelen, die voor wat betreft de koeltorens neerkwamen op directe desinfectie met chloorbleekloog, konden niet worden vastgesteld. Dit geldt ook voor het in werking stellen van actie- en controleplannen.

In het Verenigd Koninkrijk, waar al 40 jaar, zowel voor ziekenhuizen als voor huishoudelijke en industriële installaties, wetgeving van kracht is op het gebied van legionellabeheer en – preventie zijn de resultaten bij het vaststellen van de bronnen van optredende besmettingen niet veel beter. Tussen 2014 en 2016 zijn de richtlijnen daarom herzien en strenger gemaakt. Het inschatten van het risico en het opstellen van beheersplannen, van oudsher de basis van de wet- en regelgeving, blijven echter de basis.

In 2004 vond een grote besmetting plaats in Lens in Noord-Frankrijk. In twee grote industriële koeltorens, 300 meter verwijderd van een afvalwaterzuiveringsinstallatie, werden al een maand voor de besmetting legionellabacteriën aangetroffen. Van de 1.000 monsters die genomen werden bij bedrijven in de omgeving werden in slechts drie monsters *L. pneumophila* serogroep 1 ST15 aangetroffen, terwijl dit in de monsters van de besmette patiënten veel vaker het geval was. Uiteindelijk kon wel een verband worden gelegd met de afvalwaterzuivering, waar gehalten tot  $10^7$  kolonievormende eenheden per liter (kve/l) werden gemeten. Toen de beluchtingsinstallatie van de zuivering werd gestopt werden geen nieuwe besmettingen geconstateerd en werd geen legionella meer aangetroffen in de betrokken koeltorens. Enkele jaren later, in 2007, werden echter weer besmettingen met serogroep 1 ST15 geconstateerd. In dit geval viel de verdenking echter op een ander bedrijf.

Een andere casus die voor koeltorens in Nederland van groot belang zou kunnen zijn is de uitbraak in 2013 in Beieren, waarbij ongeveer 165 mensen besmet werden en er drie overleden. Vermoedelijk was de damp van besmette industriële koeltorens de oorzaak. De koeltorens werden gevoed met rivierwater waarin extreem hoge legionellagehalten werden gemeten. Het afvalwater van een rioolwaterzuiveringsinstallatie dat op deze rivier wordt geloosd bleek hoge legionellaconcentraties te bevatten, die op hun beurt weer afkomstig waren van een industriële biologische waterzuivering waarvan het effluent naar de rioolwaterzuivering werd afgevoerd. In de rioolwaterzuivering werd een fors deel van de legionellabacteriën verwijderd. Desalniettemin werden nog concentraties oplopend tot  $33 \times 10^6$  kve/l in het gezuiverde afvalwater gevonden. Dit lijkt tot nu toe een onderbelicht thema bij de voortdurende druk op het hergebruiken van gezuiverd afvalwater in koelwatersystemen.

In Finland werden in 2014 zelfs twee ziektegevallen direct aanwijsbaar veroorzaakt door damp van een industriële waterzuiveringsinstallatie. Omdat watermonsters van dergelijke installaties altijd hoge concentraties andere bacteriën, eencellige organismen, organische stoffen en inhibitoren bevatten, is het meestal met de kweekmethode niet goed mogelijk



betrouwbaar legionellaconcentraties te meten. Vaak wordt geen legionella aangetoond, maar blijken er wel niet-kweekbare bacteriën (VBNC, *viable but not culturable*, dus niet aantoonbaar met de traditionele kweektechniek) aanwezig. Deze bleken in dit geval wel goed bepaald te kunnen worden met de combinatie van q-PCR (kwantitatieve PCR-methode) met propidiummonoazide. Bij de twee onderzochte zuiveringsinstallaties in Finland werden in 2012 en 2014 de volgende gehalten gemeten: bij de ene zuivering tot  $2,3 \times 10^6$  kve/l (kweek) en  $31 \times 10^6$  cellen/l (q-PCR) en bij de andere zuivering tot 100.000 kve/l (kweek) en  $32 \times 10^6$  cellen/l (q-PCR).

### **Preventie en controle**

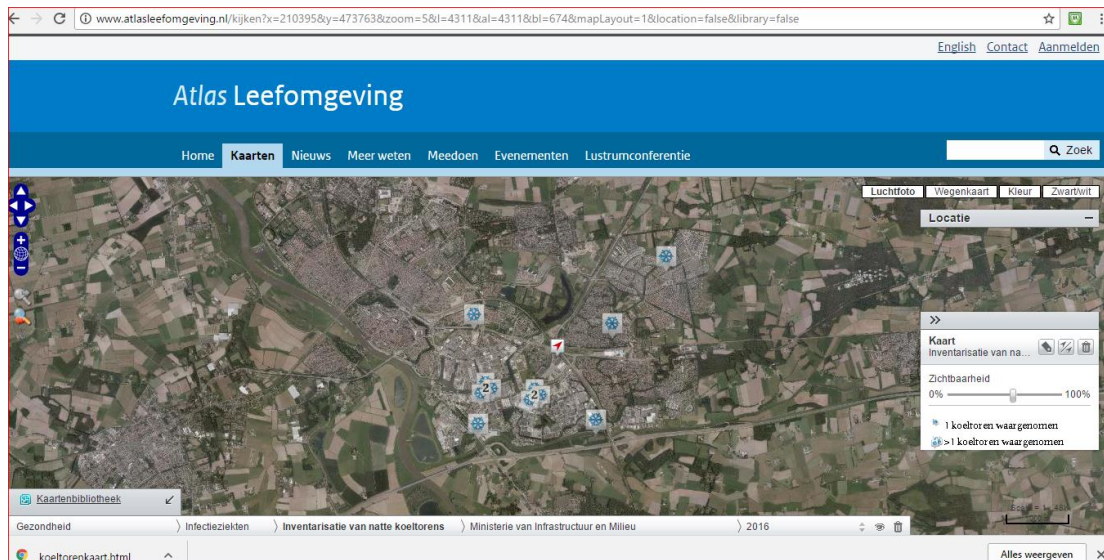
Natte koeltorens maken een groot deel uit van de sinds 1976 bekende legionella-uitbraken met veel slachtoffers. Het is daarom, zowel uit epidemiologisch oogpunt als voor de algemene gezondheidszorg, van belang dat er een goede registratie beschikbaar is waar deze natte koeltorens zich bevinden.

In Nederland bevinden zich naar schatting ongeveer 4.000 koeltorens, waarvan de meeste gebruikt worden voor klimaatbeheersing in gebouwen, zogeheten *comfort cooling*. Als gevolg van de klimaatverandering zal dit aantal naar verwachting alleen maar toenemen. Over het algemeen zijn dit kleine koeltorens van verschillende vorm, capaciteit en type. Van in totaal ongeveer 1.200 koeltorens is bekend waar ze zich bevinden. Dit zijn voornamelijk de koeltorens die in de industrie gebruikt worden, die veel groter zijn en beter onderhouden worden. Bij het onderzoek naar de mogelijke oorzaken van geconstateerde besmettingen zijn dus niet alle koeltorens als mogelijke bronnen direct bekend.

Deze installaties worden gebruikt voor het afvoeren van overtollige warmte uit gebouwen en productieprocessen door middel van het vernevelen van water. Bij verkeerd ontwerp en onjuist of onvoldoende beheer en onderhoud ontstaat vaak microbiologische groei in dit soort installaties, die daardoor een bron kunnen zijn voor de groei van legionellabacteriën.

Om het risico op veteranenziekte te beperken, snelle bronopsporing bij een uitbraak mogelijk te maken en snel gepaste maatregelen te kunnen nemen is het dus van belang dat zoveel mogelijk natte koeltorens geïdentificeerd kunnen worden.

Sinds enige jaren is het dan ook wettelijk verplicht de locatie van nieuwe koeltorens door te geven aan de vergunningverlenende overheid (notificatieplicht). Sinds april 2016 staan van ruim 700 koeltorens de locaties op de koeltorencarta, een onderdeel van de Atlas Leefomgeving van het RIVM: <https://www.atlasleefomgeving.nl/nattekoeltorens>). Op deze kaart kunnen ingelogde gebruikers ook meldingen doen van koeltorens die nog niet op de kaart staan. [3]



Afbeelding 6. De koeltorenkaart als onderdeel van de Atlas Leefomgeving van het ministerie van Infrastructuur en Milieu

### Conclusies en aanbevelingen

Zoals bekend geven watermonsters niet altijd een representatief beeld van de aanwezigheid van legionellabacteriën. Dit is vaak het gevolg van het feit dat deze bacteriën zich vooral ophouden in de biofilm die altijd, in meer of mindere mate, aanwezig is in bijvoorbeeld koeltorens en (drink-) waterleidingen. Een beter inzicht in het potentiële risico dat dit soort installaties oplevert, zou door het continu volgen van biofilmvorming kunnen worden verkregen. Een nieuwe, veelbelovende ontwikkeling op dit gebied is het zogenoemde DSS-systeem (*Diveil Surface Sensor*) als alternatief voor strips waarmee microbiologische groei tot nu toe eigenlijk altijd wordt gemeten. Met het DSS-systeem kunnen hoeveelheden afzettingen worden gedetecteerd en kan worden vastgesteld uit welke materialen de afzettingen bestaan. De DSS bevat een actuator die de sensorbuis laat trillen. De adhesie, groei en verwijdering van afzettingen veroorzaken variaties in de trillingen van het oppervlak die door een sensor gemeten worden. Het laten trillen en het meten gebeuren automatisch met in te stellen, constante tijdsintervallen. Hiermee kunnen ook de effecten van het toevoegen van bijvoorbeeld biodispergeermiddelen (chemische producten waarmee de effectiviteit van bijvoorbeeld chloorbleekloog wordt verhoogd) worden vastgesteld en zou de dosering van dit soort middelen kunnen worden geoptimaliseerd. [4]

De ervaringen met de bestrijding van legionella in industriële koelwatersystemen in Oostenrijk zijn interessant voor de praktijk in Nederland. Toen in het voorjaar bij koeltorens concentraties van meer dan  $10^6$  kve/l werden gemeten, is direct als corrigerende maatregel tweemaal zoveel biocide gedoseerd als normaal. Dit resulteerde in niet-detecteerbare legionellagehalten gedurende de gehele daaropvolgende zomer. Wel werden er in die tijd nog steeds legionellabacteriën gemeten met PCR. Het lijkt er dus op dat een gedeelte van de legionellabacteriën niet of minder reageert op het gebruikte biocide. Mogelijk bevindt zich dus niet-kweekbare legionella in het koelwater, die wel detecteerbaar is met andere methoden (VNBC, *viable but not culturable*).



De vraag komt dan direct naar boven of dit deel van de legionellabacteriën schadelijk is voor de gezondheid van de mens. Tot nu toe is het niet aangetoond dat deze VBNC-bacteriën veel schade kunnen aanrichten. Waarschijnlijk is dit het gevolg van hun lagere virulentie. Nader onderzoek naar het effect van verschillende soorten biociden op deze groep bacteriën lijkt niettemin zeer nuttig.

Zeker het overwegen waard is de suggestie die niet alleen bij dit onderzoek maar ook al op andere plaatsen werd geopperd, om voor koelwatersystemen niet langer eisen te stellen aan legionellaconcentraties, maar aan de aanwezige hoeveelheden biofilms.

### Referenties

1. Gaia, V. et al. (2005) Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J. Clin Microbiol*; 43: 2047-2052 .
2. Reuter, S, et al. (2013) A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a *Legionella* outbreak. *BMJ*. 3(1):1-19.
3. Wilfred Reinhold, *Development of a public map of wet cooling towers in the Netherlands*, 4th ESGLI Conference, 22-23 September 2016, Amsterdam
4. Ana Pereira, *DSS: Monitoring Biofouling Tendency on the way to Legionella Prevention*, 4th ESGLI Conference, 22-23 September 2016, Amsterdam