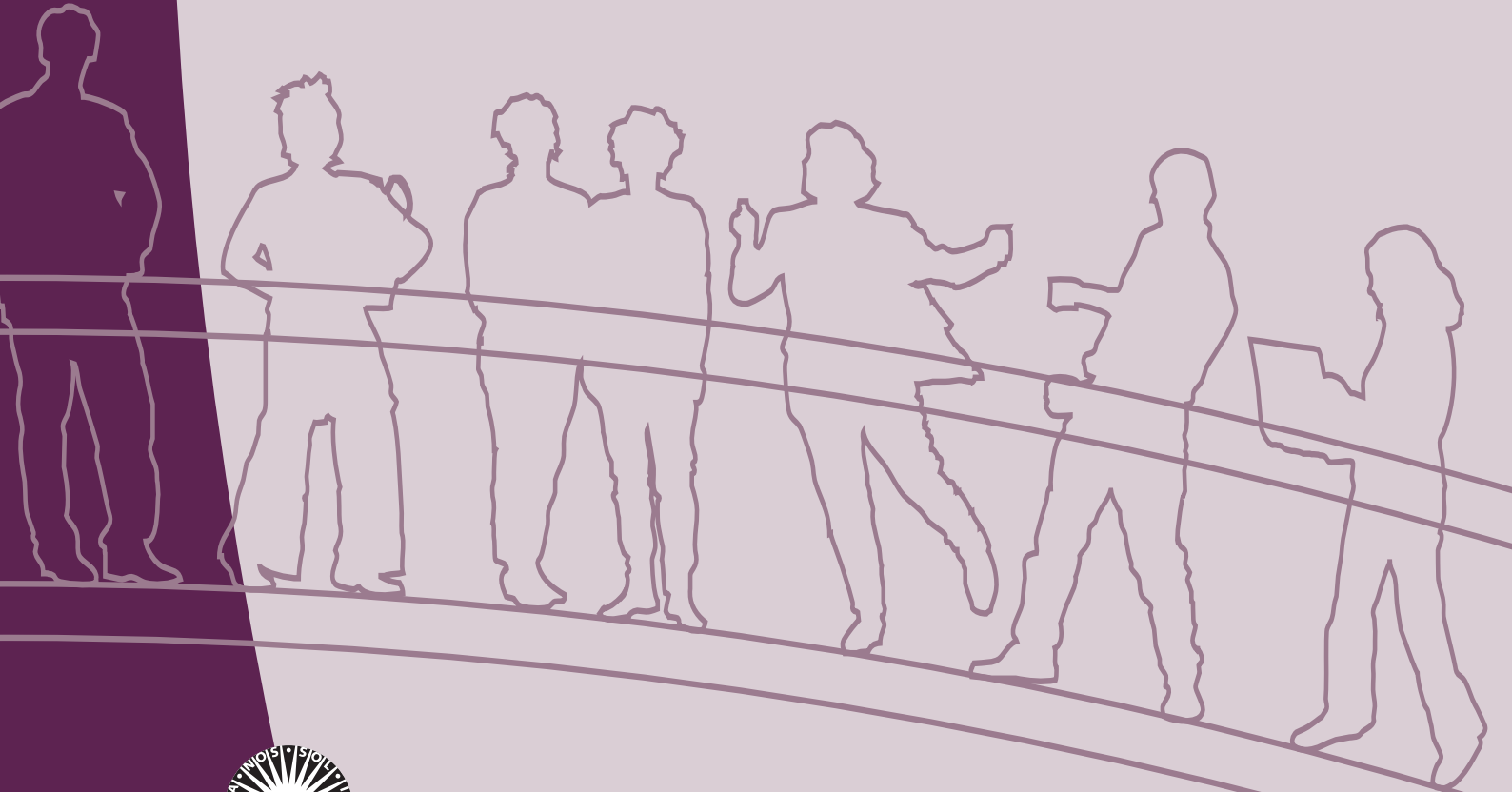


Wetenschapswinkel
Biologie

Biologische mechanismen achter bestrijding van Legionella

Matthijs Westerlaken



Universiteit Utrecht

Biologische mechanismen achter bestrijding van Legionella

*Literatuurstudie naar biologische mechanismen en efficiëntie van
desinfectiemethoden tegen Legionella pneumophila in
waterleidingen*

Matthijs Westerlaken

*Wetenschapswinkel Biologie, Universiteit Utrecht
Leerstoelgroep Microbiologie. Universiteit Utrecht*

September 2006

P-UB-2006-03

Wetenschapswinkels slaan een brug tussen maatschappij en wetenschap. Verbonden aan de universiteit geven zij advies en doen onderzoek.

Colofon

Rapportnummer P-UB-2006-03
ISBN 90-5209-153-6
Prijs € 3,60
Verschenen September 2006
Druk eerste
Titel **Biologische mechanismen achter bestrijding van Legionella**
Literatuurstudie naar biologische mechanismen en efficiëntie van desinfectiemethoden voor *Legionella pneumophila* in waterleidingen
Auteur Matthijs Westerlaken
Begeleider dr. J.J.P.A. de Cock, Leerstoelgroep Microbiologie, Universiteit Utrecht
Projectcoördinator ir. M.L. Zitzen en drs. S. Verheijen (redactie), Wetenschapswinkel Biologie, Universiteit Utrecht
Opdrachtgever LegioFreeWater systems BV, Wijk bij Duurstede
Reproductie Document Diensten Centrum Uithof
Uitgever Wetenschapswinkel Biologie, Universiteit Utrecht
Padualaan 8, 3584 CH Utrecht. tel. 030-253 7363
www.bio.uu.nl/wetenschapswinkel
Copyright Het is niet toegestaan (gedeelten van) deze uitgave te vermenigvuldigen door middel van druk, fotokopie, microfilm of op welke andere wijze dan ook. Overname van gedeelten van de tekst, mits met bronvermelding, is wel toegestaan. Toezending van een bewijsexemplaar wordt zeer op prijs gesteld.

Inhoudsopgave

| | |
|---|-----------|
| Voorwoord | 5 |
| Samenvatting | 7 |
| 1 Inleiding | 9 |
| 1.1 Achtergrond | 9 |
| 1.2 Bestrijding van Legionella | 10 |
| 1.3 Doelstelling van dit onderzoek | 10 |
| 2 Biologische beschrijving van Legionella | 12 |
| 2.1 Celbouw en groei | 12 |
| 2.2 Aanwezigheid in natuur en in leidingwater | 13 |
| 2.3 Infectie van humane cellen | 13 |
| 3 Mechanismen achter thermische desinfectie | 15 |
| 3.1 Decimale reductietijden | 15 |
| 3.2 Moleculaire targets voor thermische desinfectie | 16 |
| 4 Mechanismen achter alternatieve desinfectie methoden | 19 |
| 4.1 UV-straling | 19 |
| 4.2 Koper-zilverionisatie | 20 |
| 4.3 Oxidatieve stoffen | 20 |
| 5 Vergelijking van desinfectiemethoden | 22 |
| 6 Discussie en conclusie | 23 |
| Literatuurlijst | 25 |

Voorwoord

Dit rapport is door mij geschreven als scriptie binnen het bachelorprogramma Biologie. Bij dit literatuuronderzoek ben ik begeleid door dr. Hans de Cock van de leerstoelgroep Microbiologie en ir. Marc Zitzen van de Wetenschapswinkel Biologie.

Hartelijke dank gaat uit naar Hans de Cock, Marc Zitzen, Hans Korstanje, Philip Korff de Gidts en Stefan Mol voor het lezen en aanvullen van eerdere concepten van dit rapport.

Matthijs Westerlaken
Augustus 2006, Utrecht

Samenvatting

De bacterie *Legionella pneumophila* is de veroorzaker van de ziekte 'legionellose', beter bekend als de veteranenziekte. Hoewel de ziekte is te behandelen met de juiste antibiotica, heeft Legionella alleen al in Nederland tientallen doden op zijn naam staan. Legionella gedijt goed in water van 20 tot 50° Celsius, en komt dan ook voor in allerlei (warm)waterinstallaties en -leidingen.

Om Legionellabesmetting te voorkomen zijn verschillende methoden ontwikkeld waarmee de bacterie af te doden is in (leiding)water. De meest gebruikte methode is thermische desinfectie, waarbij door verhitting de bacterie wordt gedood. Andere methoden maken gebruik van andere principes om Legionella af te doden, zoals het gebruik van UV-straling, koper-zilverionisatie of oxidatieve stoffen. In dit literatuuronderzoek is gekeken naar de specifieke biologische mechanismen achter de diverse methoden van Legionellabestrijding. Elke methode heeft voor- en nadelen in effectiviteit. Uiteraard hebben alle methoden ook voor- en nadelen in kosten, gebruiksgemak, veiligheid enzovoorts, maar deze komen in dit onderzoek alleen zijdelings aan de orde.

UV-straling heeft alleen effect op het DNA van het micro-organisme: het DNA wordt beschadigd en wordt onbruikbaar, waardoor de Legionellabacteriën afsterven. Bij het gebruik van UV-straling is het van belang dat de dosis en duur van de bestraling voldoende is. Bij een korte blootstellingstijd is namelijk een hogere intensiteit nodig om voldoende energie te leveren. De dosis die wordt afgegeven door de UV-lamp kan bovendien een beperkte hoeveelheid DNA beschadigen. Als de Legionellabacteriën zich bevinden in protozoa die veel DNA hebben (in zowel kern als mitochondriën) zal het effect kunnen zijn dat er minder schade optreedt aan het DNA van de Legionellabacteriën.

Koper-zilver ionisatie is een goedkope methode en effectieve manier om Legionella af te doden. Wel geldt net als bij de UV-straling dat de Legionellabacteriën beschermd kunnen worden door protozoa en / of een biofilm. Een ander nadeel is dat het gebruik van zware metalen in waterleidingen risico's met zich meebrengt voor de volksgezondheid.

Daarnaast zijn er oxidatieve stoffen die Legionella kunnen afdoden. Hiervan is chloor met name geschikt om verdere uitbreiding van Legionella te voorkomen, als aanvulling op andere methoden. Desinfectie met ozon is effectiever, maar heeft als nadeel dat het ozon in water snel wordt geïnactiveerd.

Ook peroxiden worden in de praktijk veelvuldig gebruikt om drinkwaterleidingen te desinfecteren. Net als bij UV-straling en koper-zilverionisatie moeten de oxiderende stoffen voor een goede desinfectie ook door protozoa die Legionella kunnen herbergen, heendringen. Of deze methoden van desinfectie een voldoende effect hebben op de afdoding van Legionella is nog niet bekend.

Bij thermische desinfectie worden ook de Legionellabacteriën bereikt die protozoa geïnfecteerd hebben, alsmede de Legionellabacteriën die in een biofilm zitten. De temperatuur stijgt dan zowel buiten als binnen de protozoa, en leidt tot schade aan de aanwezige Legionellabacteriën. Een tweede punt dat pleit voor thermische desinfectiemethoden is dat door verhitting meerdere celonderdelen kapot worden gemaakt. De kans dat Legionella deze combinatie van factoren overleeft wordt hiermee maximaal gereduceerd.

Hoofdstuk 1

Inleiding

1.1 Achtergrond

De Legionellabacterie werd voor het eerst ontdekt in 1976, tijdens een conventie van oud-strijders in Philadelphia (Verenigde Staten). Een uitbraak van longontsteking onder 200 van de aanwezige veteranen leidde tot 29 doden. Na aanleiding van dit voorval werd de ziekte 'veteranenziekte' gedoopt. Na isolatie van de verantwoordelijke ziekteverwekker bleek dat de longontsteking werd veroorzaakt door een bacterie, die later *Legionella pneumophila* werd genoemd. Het betrof geen nieuwe bacterie: deze *Legionella pneumophila* had al eerder longontstekingen veroorzaakt. De bacterie was zelfs al geïsoleerd uit oud patiëntenmateriaal dat dateerde uit 1943.

In Nederland kwam de Legionellabacterie voor het eerst groot in het nieuws in 1999, toen na een bezoek aan de West-Friese Flora in Bovenkarspel meer dan 200 mensen ernstig ziek werden en minstens 31 mensen overleden. Op deze beurs waren verscheidene waterinstallaties aanwezig zoals stroombekkens en fontein. Na onderzoek bleek dat de besmetting ontstaan was in de buurt van de bijbehorende consumentenbeurs, waar onder andere bubbelbaden werden tentoongesteld.

Legionella komt voor in de natuur, maar zoals uit het bovenstaande duidelijk zal zijn ook in door de mens gecreëerde waterige milieus, zoals koeltorens, bubbelbaden, fontein en (drink)waterleidingen. Juist in zulke kunstmatige, aangelegde omgevingen vormt de Legionellabacterie een gezondheidsrisico omdat mensen er worden blootgesteld aan aërosolen (kleine waterdruppeltjes in de lucht). Via deze druppeltjes kan de bacterie zich verspreiden en uiteindelijk mensen infecteren. Overigens is het belangrijk te beseffen dat de aanwezigheid van Legionella in een leidingwaterinstallatie niet per definitie tot ziekte leidt, maar dat de mogelijkheid voor een gezondheidsrisico aanwezig is.

Tot nog toe is steeds gesproken over 'de' Legionellabacterie. Biologisch gezien valt deze echter in een groep van 48 soorten, de familie van Legionellaceae. De helft van deze 48 soorten wordt in verband gebracht met ziekten bij mensen. *Legionella pneumophila* is de meest virulente (ziekteverwekkende) soort, en is verantwoordelijk voor meer dan 90% van de Legionella-infecties¹. De daarop volgende ziekte legionellose begint met milde symptomen, zoals hoesten, spierpijn, matige koorts en klachten aan het maag-darmstelsel. In een later stadium krijgt de patiënt hogere koorts, treedt er ernstige longontsteking op en kunnen de nieren minder goed gaan functioneren. Dit kan uiteindelijk de dood tot gevolg hebben [Legionella Experts, 2006]. De tijd tussen de infectie en de start van de ziekte is 2 tot 10 dagen, er zijn echter ook gevallen bekend waarbij de ziekte pas na 21 dagen aan het licht komt. Medische behandeling is mogelijk met antibiotica.

¹ Waar in de rest van het rapport gesproken wordt over Legionella of de Legionellabacterie, wordt de bacterie *Legionella pneumophila* bedoeld. Volgens biologische afspraken wordt deze afgekort tot *L. pneumophila*.

Naast legionellose kan *Legionella* wondinfecties en het zogeheten 'Pontiac fever' veroorzaken. Pontiac fever heeft eenzelfde ziektebeeld als legionellose, maar er treedt geen longontsteking op. Ook zijn de klachten milder, vergeleken met legionellose. Bij Pontiac fever geneest de patiënt meestal binnen 2 tot 5 dagen zonder medische behandeling [Vos en Troelstra, 2001; Wikipedia, 2006]. Uit epidemiologische studies blijkt dat *Legionella* een opportunistisch pathogeen is, dat wil zeggen dat met name personen met een verzwakt immuunsysteem gevoelig zijn voor *Legionella*-infectie, zoals bijvoorbeeld ouderen. Zij lopen makkelijker de veteranenziekte op dan personen met een gezond afweersysteem [Steinert et al., 2006].

1.2 Bestrijding van *Legionella*

Wie in een bepaalde omgeving van een micro-organisme af wil komen, kan dat op twee manieren doen: desinfectie of sterilisatie. Bij sterilisatie worden alle organismen gedood of verwijderd. Bij desinfectie streeft men er naar om het organisme zo veel mogelijk af te doden, zodat het gezondheidsrisico wordt beperkt. De concentratie van het betreffende organisme wordt teruggebracht tot deze niet meer in staat is ziekte te veroorzaken, en dus niet meer gevaarlijk is voor de gezondheid.

In het geval van *Legionella* is gebleken dat als de gehele populatie bacteriën lijkt te zijn afgedood, *Legionella* de waterleiding kan herkoloniseren [Saby et al., 2003]. Waarschijnlijk lag bij deze bevinding de hoeveelheid bacteriën onder de detectiegrens. Volledige sterilisatie is bovendien niet zinnig omdat er altijd weer besmet water binnen kan komen. Desinfectie lijkt daarom de beste keuze om *Legionella* te bestrijden.

Er zijn in de loop der jaren verschillende methoden ontwikkeld om *Legionella* te bestrijden. Uitgangspunt hiervan is altijd het verminderen van de bacterieaantallen in waterbronnen. De meest gebruikte bestrijdingsmethode is thermische desinfectie. Deze methode maakt gebruik van verhitting om de bacteriën af te doden. Naast thermische desinfectie zijn er alternatieve methoden op de markt, die op een ander afdodingsmechanisme zijn gebaseerd. Ze maken bijvoorbeeld gebruik van UV-straling, van koper-zilver ionisatie of van oxidatieve stoffen (zoals chloor, ozon, peroxiden).

De Nederlandse overheid heeft verschillende wettelijke regels opgesteld om legionelloseuitbraak te voorkomen en zo de gezondheid van de bevolking te waarborgen. De opgestelde richtlijnen staan in de Waterleidingwet, het Waterleidingbesluit en het Besluit hygiëne en veiligheid badinrichtingen en zwemgelegenheden [Ministerie van Sociale Zaken en Volksgezondheid, 1957; Ministerie van Sociale Zaken en Volksgezondheid, 1960; Ministerie VROM, 1984]. In deze wettelijke richtlijnen staat onder andere dat leidingwater niet meer dan 100 kolonievormende eenheden *Legionella* per liter (kve/l) mag bevatten. Een gebruikte desinfectiemethode moet dus minimaal deze norm halen.

Als er meer dan 1000 kve/l worden aangetroffen gaat men er vanuit dat er direct gevaar is voor de gezondheid, en moet de desbetreffende leiding worden afgesloten. Deze handelwijze is weergegeven in Handhavingsuitvoeringsmethode Leidingwater [Inspectie Milieuhygiëne, 2006].

1.3 Doelstelling van dit onderzoek

LegioFreeWater Systems BV heeft een nieuwe desinfectiemethode bedacht om waterleidingen vrij van *Legionella* te houden. Deze nieuwe methode (LegioFreeWater system) is te zien als een variant op de conventionele thermische desinfectie, en werkt middels verwarmingslinten in de waterleidingen.

LegioFreeWater BV wil deze methode graag wetenschappelijk laten onderbouwen. Vanuit de Universiteit Utrecht is deze vraag naar de wetenschappelijke achtergrond achter bestrijding van Legionella terechtgekomen bij de Wetenschapswinkel Biologie. Doel van dit literatuuronderzoek is het effect van thermische desinfectie op de afdoding van Legionella te beschrijven en te vergelijken met een aantal alternatieve desinfectiemethoden. Aandachtspunten zijn de achterliggende specifieke biologische mechanismen en de efficiëntie van de verschillende preventietechnieken. Hierbij is met name gekeken naar *L. pneumophila*, aangezien deze soort de belangrijkste bron van besmettingen via leidingwater is. Het LegioFreeWater system wordt in dit rapport niet apart beschreven. In hoofdstuk 5 is het als variant van 'thermische desinfectie' weergegeven.

Hoofdstuk 2

Biologische beschrijving van Legionella

2.1 Celbouw en groei

Bacteriën worden binnen de biologie beschreven aan de hand van hun eigenschappen met betrekking tot celbouw en groei. In het geval van Legionella gelden daarbij de volgende kenmerken.

Vorm: Legionellabacteriën zijn staafvormig en gebruiken een flagel (een soort staart) om zich voort te bewegen. De flagel zit verankerd in het membraan en de celwand [Legionella Experts, 2006; Dietrich et al., 2001].

Celwand: Legionella valt onder de zogeheten proteobacteriën, en is net als alle andere proteobacteriën Gram-negatief [Université de Lausanne].

De term Gram-negatief komt van de kleuringsmethode van Gram, waarmee bacteriën gekarakteriseerd worden op grond van hun celwandeigenschappen. In de Gram-kleuring wordt een kristalviolet-iodium kleuring gebruikt. Gram-negatieve bacteriën laten dit complex weer los na wassen met alcohol. Gram-positieve bacteriën daarentegen houden deze kleurstof vast en kleuren daardoor paars. Dit verschil in kleuring wordt veroorzaakt door een verschillende celwandopbouw bij de Gram-positieve en Gram-negatieve bacteriën [Lawrence, 1996].

Bij Gram-positieve bacteriën is die celwand relatief eenvoudig, en telt slechts een enkele lipidenlaag. Bij Gram-negatieve bacteriën is de celwand complexer van structuur: hij bestaat uit twee lipidemembranen met daartussen een ruimte, het periplasma met daarin een peptidoglycaan-laag.

Veel Gram-negatieve bacteriën zijn pathogeen (ziekteverwekkend). De pathogeniciteit van gram-negatieve bacteriën wordt vaak geassocieerd met bepaalde componenten in de celwand. Hier zal later op worden ingegaan. Belangrijk om op te merken is dat het buitenste membraan van Gram-negatieve bacteriën de bacterie beschermt tegen stoffen zoals zepen en antibiotica, die normaliter schadelijk zijn voor bacteriën.

Metabolisme: Legionella is een aërobe bacterie en heeft dus zuurstof nodig voor metabole processen, zoals het omzetten van voedingsstoffen in energie [Madigan et al., 2003].

Temperatuur: Legionella is mesofiel: de optimale groeitemperatuur ligt rond 35 C, en heeft een groeibereik van 20 C tot 50 C [Rogers et al. 1994]. Daarmee liggen de temperaturen waarbij Legionella groeit relatief laag. Naast mesofiele bacteriën bestaan er namelijk ook thermofiele bacteriën en hyperthermofiele bacteriën, die zowel hun optimum als groeibereik bij hogere hogere temperaturen hebben.

Rond de optimale temperatuur groeit Legionella met de maximale groeisnelheid, oftewel exponentieel, mits er genoeg voedingsstoffen aanwezig zijn. Als de temperatuur oploopt boven 50 C, kan de bacterie niet meer groeien. Hierop berust ook het principe van de thermische desinfectie [Legionella Experts, 2006].

pH: Legionella kan overleven binnen pH-waarden van tussen de 5.0 en 8.5 [Legionella Experts, 2006].

Kweek: De beste manier om Legionella te detecteren in zowel water als patiëntenmateriaal is in een laboratorium Legionella op te kweken op Buffered Charcoal Yeast Extract medium [Schets en de Roda Husman, 2004].

2.2 Aanwezigheid in natuur en in leidingwater

Van nature komt *L. pneumophila* vaak voor in meren en rivieren. De concentratie van bacteriën is op die plekken echter meestal laag. In kunstmatige waterige milieus, zoals (drink)waterleidingen, douche-installaties en zwembaden, kan *L. pneumophila* in veel grotere dichtheden voorkomen. Dit is te verklaren door de gunstige omstandigheden voor de groei van de Legionellabacterie in dit milieu: de temperatuur ligt vaak dicht bij of rond het optimum van 35°C dan in een meer of rivier, er zijn doorgaans protozoa aanwezig die nodig zijn voor groei (zie verder), en ook de organische en anorganische samenstelling van het water is vaak voordeliger voor Legionella. Deze combinatie van nutriënten en groeivoorwaarden komt in de natuur veel minder voor; daar zullen eerder andere (met Legionella concurrerende) bacteriën goed kunnen groeien.

In een kunstmatig waterig milieu treft Legionella dus vaak betere groeiomstandigheden dan in een natuurlijk waterig milieu. Een van deze omstandigheden is de grotere kans op aanwezigheid van protozoa. Protozoa zijn eencellige eukaryote organismen die in zowel waterige milieus als in de grond leven. Van belang voor Legionella is dat deze protozoa zichzelf voeden, of als het ware 'grazen', op zogeheten biofilms.

Een biofilm kan ontstaan als een oppervlak (natuurlijk of kunstmatig) in permanent contact staat met water. Een laag micro-organismen, die omgeven kan zijn door zelfgeproduceerd slijm, hecht zich vast aan het oppervlak. De biofilms verkrijgen nutriënten voor de groei vanuit het water en mogelijk ook uit het leidingmateriaal. Bacteriën in zo'n biofilm kunnen andere eigenschappen hebben dan hun vrij levende soortgenoten. Zo zijn bacteriën in een biofilm beter bestand tegen toxische stoffen [Murga et al., 2001].

In een biofilm zonder protozoa kan *L. pneumophila* zich wel handhaven, maar niet vermenigvuldigen [Fields et al., 1984]. Voor vermenigvuldiging is de aanwezigheid van protozoa essentieel. Deze protozoa worden daarbij geïnfecteerd door de bacteriën. De protozoa zorgen ervoor dat de Legionellabacteriën genoeg nutriënten krijgen om te overleven en zich te vermenigvuldigen. Bovendien is Legionella in de protozoa beter beschermd tegen schadelijke invloeden van buitenaf. Er zijn inmiddels 14 soorten amoeben, 2 protozoa en één slijmschimmel gevonden die als gastheer fungeren voor *L. pneumophila* [Steinert, M. et al., 2002].

Overigens is het interessant om op te merken dat in de literatuur wel veel onderzoeken vermeld worden over de afdoding van Legionella, maar relatief weinig over de afdoding van de protozoa, die als gastheer voor Legionella fungeren.

2.3 Infectie van humane cellen

In de voorgaande paragraaf is beschreven dat Legionella protozoa kunnen infecteren en als gastheer gebruiken. Voor Legionella blijkt het echter een kleine stap van protozoa naar humane cellen. Als het menselijk lichaam een verzwakte afweer heeft, is *L. pneumophila* in staat om de mens te infecteren. Dit heet dan een opportunistische infectie, omdat Legionella vooral die mensen treft met een zwakker immuunsysteem. Mensen die een gezonde afweer hebben, zullen niet snel geïnfecteerd worden.

Doelwit voor *L. pneumophila* in het menselijk lichaam zijn de macrofagen. Macrofagen zijn speciale afweercellen die in zowel bloed als weefsel rond epitheel voorkomen (zoals bijvoorbeeld de alveolaire macrofagen in de kleine longblaasjes). Ze zijn verantwoordelijk voor het opruimen van lichaamsvreemde stoffen en organismen. De wijze waarop Legionellabacteriën macrofagen infecteren, lijkt sterk op de manier waarop Legionella protozoa infecteert.

Een Legionellabacterie komt een macrofaag binnen door middel van fagocytose: de macrofaag herkent de bacterie als vreemde indringer in het lichaam, en het membraan van de macrofaag omsluit de bacterie. In de

macrofaag is dan een holte ontstaan die een fagosoom genoemd wordt. Normaliter zal de macrofaag vervolgens het fagosoom laten fuseren met endosomen en lysosomen (holtes met onder andere afbraakenzymen) en de bacterie zo vernietigen. In het geval van *Legionella* blijft de bacterie in het fagosoom bestaan, er treedt geen fusie op met lysosomen of endosomen. In plaats daarvan trekt *Legionella* vanuit het fagosoom allerlei andere celonderdelen (organellen) aan, zoals mitochondria, zogeheten gladde blaasjes en ruw endoplasmatisch reticulum. Deze organellen zijn essentieel voor het functioneren van de macrofaag, maar worden nu ingezet voor de vermenigvuldiging van nieuwe Legionellabacteriën. De geclaimde organellen omringen het fagosoom en vormen zo een speciale niche in de cel. Als *Legionella* genoeg organellen heeft aangetrokken gaat de bacterie snel delen en komt in de exponentiële groeifase terecht. In deze groeifase vermenigvuldigen de ontstane bacteriën zich met maximale snelheid. Het fagosoom groeit mee met het aantal bacteriën en wordt even groot als de cel. In de laatste fase zetten de bacteriën de macrofaag aan om poriën in het celmembran te maken. Hierdoor gaat de macrofaag uiteindelijk kapot en komen alle bacteriën vrij om een volgende cel te infecteren [Cianciotto, 2001].

In paragraaf 2.1 is kort iets gezegd over de vorm van een Legionellabacterie. Deze vorm (morfologie) kan echter verschillen tijdens de groei. Zo hebben de bacteriën in het fagosoom in de exponentiële groeifase geen flagellen en zien ze er uit als lange filamenteuze staafjes. In de stationaire (post-exponentiële) fase zijn de Legionellabacteriën weer flagellair, zeer beweeglijk en zien ze er uit als korte dikke staafjes. In dit stadium zijn de bacteriën bovendien resistenter tegen biociden en antibiotica, en is de bacterie invasiever en virulenter.

Virulentie is het relatieve pathogene (ziekteverwekkende) vermogen van een organisme [Lawrence, 1996]. Dat *Legionella* in de stationaire (post-exponentiële) groeifase virulenter is dan in de exponentiële groeifase, komt doordat bepaalde genen die coderen voor virulentiefactoren dan actief zijn. *Legionella* heeft verschillende virulentiefactoren: 'surface factors' ('elementen op de oppervlakte van de bacterie') en 'secretion factors' ('stoffen die door de bacterie uitgescheiden worden'). Legionellabacteriën beschikken over verschillende virulentiefactoren om macrofagen te infecteren. Het samenvallen van deze factoren bepaalt de uiteindelijke pathogeniteit.

IJzer speelt hierbij een belangrijke rol; een Legionellabacterie heeft bijvoorbeeld ijzer nodig voor de bouw van bepaalde enzymen die betrokken zijn bij het infectieproces [James et al., 1997], maar ook voor de groei van nieuwe Legionellabacteriën in de macrofaag. In tabel 2.1 zijn de belangrijkste virulentiefactoren verzameld.

Tabel 2.1: Belangrijkste virulentiefactoren van *L. pneumophila*

| Surfacefactors | Rol in virulentie [referentie] |
|-----------------------------------|--|
| Lipopolysaccharide | Vermogen om gastheercellen te infecteren [Cianciotto, 2001] |
| Flagellen | Bevorderen invasie van gastheercellen [Dietrich et al., 2001] |
| Type IV pili | Bevorderen complement onafhankelijke hechting van bacteriën aan gastheercellen [Cianciotto, 2001] |
| Macrofaag inhibitor protein (Mip) | <i>mip</i> gen is nodig voor de eerste stadia van intracellulaire infectie [Wieland, 2002] |
| Outer membrane protein | Zorgt voor hechting aan macrofagen [Cianciotto, 2001] |
| Heat shock protein | Bevordert de invasie van epitheelcellen [Cianciotto, 2001] |
| Secreted factors | |
| Type II eiwit secretie systeem | Transporteert afbraakenzymen; mutaties in type II systeem verminderen de infectiviteit van macrofagen en protozoa [Cianciotto, 2001] |
| Dot/icm secretie systeem | Membran gebonden secretie apparaat; belangrijk voor vorming van de intracellulaire niche, remt de fusie van fagosoom met lysosomen [Zin, et al., 2002] |

Hoofdstuk 3

Mechanismen achter thermische desinfectie

De meest gebruikte methode om Legionella te bestrijden is thermische desinfectie. Daarnaast zijn er alternatieve desinfectiemethoden, waarvan de meest toegepaste methode uitgaat van ultraviolette (UV)-straling. Ook methoden als koper-zilver ionisatie en de toevoeging van oxidatieve stoffen als ozon, chloor en peroxiden worden in de praktijk gebruikt [Miyamoto et al., 2000].

In dit hoofdstuk wordt het biologische mechanisme achter thermische desinfectie beschreven. In het volgende hoofdstuk worden de biologische mechanismen achter alternatieve desinfectiemethoden beschreven.

3.1 Decimale reductietijden

Voor het begrip van de mechanismen achter de methode van thermische desinfectie is het van belang te weten dat een populatie bacteriën niet in één keer afgedood wordt. Er is geen temperatuur waarbij de gehele populatie het leven laat; er is niet één moment dat elke individuele bacterie van de populatie sterft. Net als de groei verloopt de afdoding vanaf een bepaalde temperatuur, en exponentieel. Dit betekent dat bij desinfectie de populatie bacteriën met een constant percentage per tijdseenheid afneemt.

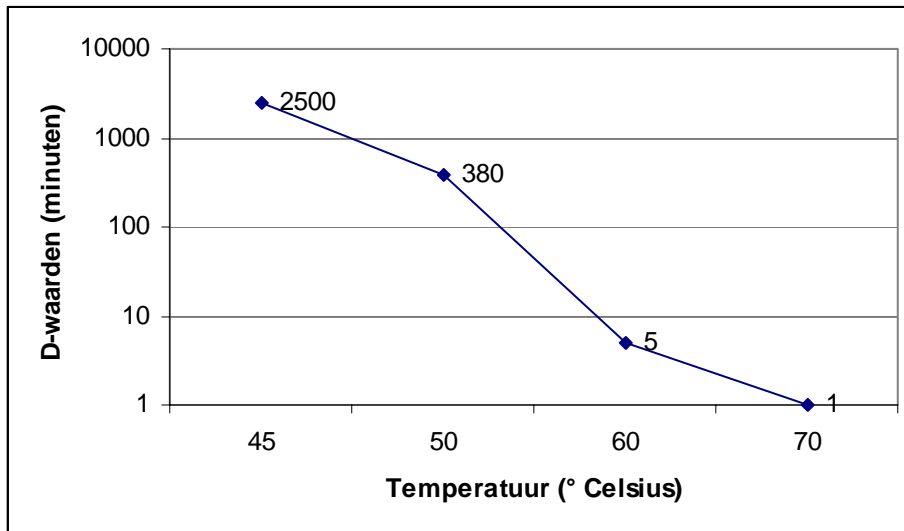
Wanneer een individueel micro-organisme precies sterft is niet te zeggen. De afsterving drukt men daarom uit in decimale reductietijd: de tijd die nodig is om 90% van het totale aantal bacteriën af te doden bij een bepaalde temperatuur. De decimale reductietijd wordt uitgedrukt in de D-waarde [Madigan et al., 2003; Prescott et al., 2002]. Deze D-waarden worden gebruikt om de relatieve resistentie van de bacterie bij verschillende temperaturen weer te geven.

Naast de D-waarde is er ook een Z-waarde. De Z-waarde staat voor de toename in temperatuur die nodig is om de D-waarde naar 1/10 (een tiende deel) te verminderen. In dat geval wordt de temperatuur dus zoveel hoger dat een afdoding die eerder bijvoorbeeld 10 minuten vergde nu in 1 minuut kan plaatsvinden. Elk micro-organisme heeft een specifieke D- en Z-waarde voor een bepaalde methode, zo ook Legionella.

In figuur 3.1 is te zien hoe het afdoden van een populatie Legionella-bacteriën bij thermische desinfectie verloopt: na 5 minuten verhitting bij 60°C is er circa 90% dood. Bij verhitting bij 70°C gaat de desinfectie veel sneller en is circa 1 minuut nodig om 90% van de populatie af te doden. Te zien is ook dat het effect van thermische desinfectie al inzet bij lagere temperaturen: bij 45°C en 50°C vindt ook al afdoding plaats, zij het niet voldoende binnen een redelijke termijn. De temperatuur bevindt zich dan namelijk binnen het groeibereik van Legionella, en er zullen nog steeds steeds nieuwe bacteriën gevormd worden door de niet-afgedode exemplaren.

Een rekenvoorbeeld geeft het bestrijdingsprincipe verder eenvoudig weer. Stel, 1 liter water bevat bij aanvang van de bestrijding 100 bacteriën. Na 5 minuten verhitting bij 60°C is dan 90% van de bacteriën afgedood, waardoor er nog 10%, oftewel 10 bacteriën over zijn. De normstelling voor Legionella ligt op 100

kolonievormende eenheden (kve) per liter leidingwater (zie paragraaf 1.2), dus 10 bacteriën in 1 liter is dan voldoende veilig. Maar als de populatie bij aanvang groter is, moet meer dan 90% van alle bacteriën worden afgedood. Stel, 1 liter bevat bij aanvang van de bestrijding 10.000 bacteriën. Na 5 minuten verhitting bij 60°C is dan 90 % bacteriën afgedood, waardoor er nog 10%, oftewel in dit geval 1000 bacteriën over zijn. Om die 1000 overgebleven bacteriën verder af te doden, zijn na opnieuw 5 minuten verhitting bij 60°C nog 100 bacteriën over. Een derde sessie van 5 minuten verhitting bij 60°C brengt het aantal bacteriën terug tot 10.



Figuur 3.1 Decimale reductietijden bij thermische desinfectie van *L. pneumophila* [naar Yu-Sen et al., 1996; Kim et al. 2002].

Kortom, er is een lange verhittingstijd nodig om voldoende bacteriën af te doden bij een Legionella-besmetting waarbij grote hoeveelheden bacteriën kunnen voorkomen. Voor preventie is het probleem dat de omvang van de populatie aan het begin van de desinfectieprocedure niet vast staat. Bij Legionella-preventie verdient het daarom aanbeveling om vier tot vijf keer de D-waarden te nemen (D90; de tijd die nodig is om 90% van het totale aantal bacteriën af te doden bij een bepaalde temperatuur) om redelijkerwijs gerust te zijn dat er voldoende afdoding is. Dit komt neer op 20 minuten verhitting bij 60°C en 5 minuten bij 70°C.

3.2 Moleculaire targets voor thermische desinfectie

De bacteriecel telt meerdere onderdelen die essentieel zijn voor het functioneren en eventueel vermenigvuldigen van de cel. Raken deze onderdelen beschadigd, dan sterft de cel. Op moleculair niveau zijn de celonderdelen opgebouwd uit een aantal bouwstenen: DNA, lipiden, eiwitten en polysacchariden.

3.2.1 DNA

Het erfelijk materiaal van een bacteriecel speelt letterlijk een centrale rol in de cel: het geeft richting aan alle andere celactiviteiten. Net als bij andere organismen is het erfelijk materiaal van een bacterie opgebouwd uit een dubbele helix van DNA. De 2 helices zijn met elkaar verbonden door middel van basenparing van de nucleotiden. Als het DNA in een waterige oplossing, zoals het ook in de cel zit, wordt verhit tot 90°C, dan zal het

denatureren [Ririe et al., 1997]. Deze denaturatie houdt in dat de basenparing van de nucleotiden verstoord wordt, waardoor de dubbele helix zal ontvouwen ('smelten') in 2 enkele helices. Het DNA wordt hierdoor inactief en de cel zal afsterven. Bij verhoging van de temperatuur zullen steeds meer delen van het DNA denatureren.

3.2.2 Lipiden

Het celmembraan verzorgt transport van moleculen in en uit de cel. Ook zorgt het voor verschillende enzymactiviteiten. Als het membraan beschadigd raakt, zullen deze functies niet goed meer verlopen, of zelfs helemaal stoppen.

Het celmembraan is opgebouwd uit een lipide bilaag (dubbele laag van lipiden) met daarin membraaneiwitten. Deze lipide bilaag bestaat uit verschillende soorten lipiden, zoals fosfolipiden, glycolipiden en sterolen zoals cholesterol (deze laatste wordt echter niet gevonden bij bacteriën). Deze lipide bilagen zijn normaal gesproken in een zogeheten vloeibare fase. De mate waarin het membraan vloeibaar is bepaalt in hoeverre de membraanprocessen kunnen verlopen. De eiwitten in het membraan functioneren in het algemeen beter als het membraan vloeibaar is.

De vloeibaarheid van het membraan wordt bepaald door de samenstelling van het membraan en de temperatuur in de omgeving. Moleculen als cholesterol zorgen ervoor dat het membraan vloeibaar blijft bij lage temperaturen. Daarnaast is ook belangrijk of de vetzuurstaarten van de lipiden verzadigd of onverzadigd zijn. Onverzadigde vetzuurstaarten zijn 'vloeibaarder' dan verzadigde.

Bij hele lage temperaturen is het membraan star (vaste fase), en kunnen de normale membraanactiviteiten niet goed plaats vinden. Als de temperatuur toeneemt worden de moleculen in het membraan beweeglijker. Hierdoor zal het membraan een faseverandering ondergaan, en gaat het van een vaste fase naar een vloeibare fase. Neemt de temperatuur te veel toe, dan vallen de bilagen uit elkaar. De individuele moleculen blijven nog intact, maar het membraan zal smelten.

Bacteriën hebben mechanismen waarmee ze de samenstelling van het membraan kunnen veranderen, om het effect van een temperatuurwijziging op te vangen. Zo kunnen ze bij hogere temperaturen meer lipiden met verzadigde vetzuurstaarten in het membraan brengen, waardoor het membraan minder snel uit elkaar zal vallen [Madigan, 2003; Prescott, 2002; Alberts, 2002].

3.2.3 Eiwitten

Eiwitten vervullen allerlei functies in de cel, onder meer als enzymen en bij het transport van moleculen. Elk eiwit heeft een optimale temperatuur waarop het zijn functie uitvoert. Bij lage temperaturen, rond de 20°C, hebben enzymen veelal een lage activiteit. Naarmate de temperatuur toeneemt, neemt ook de activiteit toe, totdat het eiwit het optimum heeft bereikt. Het optimum verschilt per eiwit. Als de temperatuur verder stijgt zal de activiteit weer afnemen doordat het eiwit bij te hoge temperatuur denatureert. Bij denaturatie verliest het eiwit zijn ruimtelijke structuur. Deze ruimtelijke structuur is direct verbonden aan de functie en dus ook de activiteit van het eiwit.

Wordt de temperatuur nog verder opgevoerd, dan zullen de eiwitten niet alleen denatureren, maar ook aggregeren. Dit houdt in dat de eiwitten gaan samenklonteren, waardoor ze niet meer functioneel zullen zijn. De activiteit is dan afgenomen naar 0%. De bekendste denaturatie is die van het bakken of koken van een ei. Het ei zal nooit meer in de vloeibare fase komen nadat het gebakken of gekookt is. De eiwitten die gedeneerd en geaggregeerd zijn kunnen hun functie niet meer uitoefenen.

Bij thermische desinfectie zullen eiwitten denatureren door de verhoogde temperatuur. Als voldoende essentiële eiwitten denatureren zal de bacterie afsterven. De bacteriecel heeft echter een bescherming tegen hoge temperaturen. Zogeheten heat shock proteins (HSP) zijn eiwitten die de cel beschermen tegen stress ten

gevolge van warmte, en helpen om eiwitten in hun functionele 3-dimensionale structuur te houden. Overigens zijn deze HSP's altijd in de cel aanwezig, ook als er geen stress is. Buiten stress-bescherming helpen de HSP's bij het knippen van andere eiwitten, het vouwen van eiwitten en het tegengaan van aggregatie [Alberts et al., 2002].

3.3.4 Polysacchariden

Polysacchariden zijn suikers die overal in de cel gevonden worden. Ze kunnen verankerd zijn in het celmembraan, zoals lipopolysacchariden, of opgeslagen in de vorm van glycogeen (de opslagvorm van glucose). Polysacchariden spelen een belangrijke rol bij de energiehuishouding en bij het binden van bepaalde essentiële stoffen.

Bij verhitting van de cel kunnen deze suikers smelten. Een bekend voorbeeld van het smelten van suikers is karamel. Bij de verhitting van suiker tot karamel zijn temperaturen van rond de 100°C nodig. De polysacchariden smelten eveneens bij deze temperaturen.

Bij de traditionele wijze van thermische desinfectie worden deze temperaturen niet altijd gehaald [Korstanje, 2006], waardoor waarschijnlijk niet elk preventiesysteem dat gebaseerd is op verhitting effect heeft op polysacchariden. Bij systemen die de benodigde temperaturen wel halen, mag verwacht worden dat de 3-dimensionale structuur van de polysacchariden, en daarmee de werking, in de bacteriecel wel aangetast kan worden.

Hoofdstuk 4

Mechanismen achter alternatieve desinfectiemethoden

4.1 UV-straling

UV-straling is door de korte golflengte en de hoge energie geschikt om micro-organismen te doden. De straling heeft een golflengte van 10 tot 400 nm, waarvan 260 nm de meest dodelijke golflengte is. Bij deze golflengte absorbeert DNA optimaal de energie. De absorptie van energie leidt er toe dat de basenparing in het DNA (zie ook paragraaf 3.2.1) verandert, en het thymine dimeren kan vormen. Thymine is een van de 4 bouwstenen waaruit het DNA is opgebouwd. Door de vorming van dimeren, oftewel binding van 2 thymine nucleïne-zuren aan elkaar, kan het DNA niet meer afgelezen worden. Het is dan niet meer mogelijk om het DNA te verdubbelen en eiwitten te produceren.

Naast het ontstaan van thymine-dimeren kunnen er door UV-straling ook breuken ontstaan in het DNA. Als deze dimeren en breuken in het DNA ontstaan in essentiële genen van de bacterie, zal deze snel afsterven.

De bacteriecel beschikt over een tweetal mechanismen om schade door UV-straling te beperken. In aanwezigheid van licht kan de bacterie het blauwe deel van het lichtspectrum gebruiken om een fotoreactief enzym te activeren dat de thymine-dimeren 'knijpt' [Knudson, 1985]. Dit heet photoreactivatie. Bij afwezigheid van licht kan er een zogenoemde 'dark reactivation' optreden. Bij een 'dark reactivation' worden kleine stukjes DNA met thymine-dimeren uit het geheel geknijpt en vervangen, een proces dat 'excision repair' heet.

Als de schade te groot is, is het echter niet meer mogelijk om al het DNA tijdig te repareren. Daarom is het van belang dat de intensiteit van de straling groot genoeg is en ook de bestralingsduur voldoende. Na 20 minuten stralen met een UV-lamp met $30.000 \mu\text{W}\cdot\text{s}/\text{cm}^2$ intensiteit is 99,9 % van de Legionellabacteriën geïnactiveerd. Het effect van bestraling is groter bij een hogere temperatuur [Muraca et al., 1987].

In de praktijk is 20 minuten bestralen van een inlaatpunt lang. Doorgaans passeren micro-organismen dat punt in een fractie van een seconde. Voor een effectieve afdoding verdient het daarom aanbeveling om met zeer hoge dosis UV te werken, omdat afhankelijk van de blootstellingstijd en de gebruikte intensiteit de hoeveelheid ingebrachte energie varieert. Bij een korte blootstellingstijd is dan een hogere intensiteit nodig om voldoende energie te leveren.

Een nadeel van desinfectie van Legionella met UV-straling is dat niet alle delen van het leidingsysteem bereikt worden. Daar kan rekening mee gehouden worden bij de plaatsing van UV-lampen, bijvoorbeeld door deze aan de tappunten van de leiding te bevestigen zodat het water dat uit de leiding komt voldoende gedesinfecteerd is.

4.2 Koper-zilver ionisatie

Zware metalen als koper en zilver worden al jaren gebruikt als effectieve manieren om micro-organismen te doden. Na ongeveer 1 uur behandelen met koper- of zilverionen is ongeveer 99,999% van de Legionellabacteriën afgedood [Yu-Sen et al., 1996]. De zware metalen hebben de eigenschap dat ze binden aan eiwitten in de cel. Ze grijpen aan op de zogeheten sulfhydryl-groepen van eiwitten, waardoor de eiwitten geïnactiveerd worden en hun functie in de cel niet meer kunnen uitvoeren. Een andere eigenschap van zware metalen zoals koper en zilver is dat deze positief geladen zijn, terwijl de celwand van bacteriën negatief geladen is. Hierdoor binden de metalen aan de celwand, tasten de permeabiliteit aan en sterft de bacteriecel af.

Voordeel van koper-zilverionisatie is dat de methode goedkoop is om te installeren en te onderhouden. Afhankelijk van het ontwerp van de installatie kunnen de ionen ook in het gehele leidingsysteem circuleren, zodat alle micro-organismen bereikt worden. Nadeel van de methode van desinfectie is dat zware metalen gebruikt worden die potentieel gevaarlijk zijn voor de volksgezondheid.

4.3 Oxidatieve stoffen

Oxidatieve stoffen kunnen andere stoffen oxideren. Dit gebeurt via zuurstofradicalen; moleculen met een of meerdere ongepaarde elektronen. Radicalen zijn erg reactief, ze nemen snel elektronen van andere stoffen op. In een cel kunnen radicalen reageren met onder andere DNA, met lipiden en met eiwitten. Als er genoeg vrije radicalen zijn, raakt de cel dermate beschadigd dat deze niet meer kan functioneren en afsterft. Om oxidatie in de cel tegen te gaan gebruikt de cel zogeheten anti-oxidanten, zoals vitamine C en bèta-caroteen. Voorbeelden van oxidatieve stoffen die kunnen worden ingezet bij Legionella bestrijding zijn chloor, ozon en peroxide [Domingue et al., 1988].

4.3.1 Chloor

Chloor is een veel gebruikt desinfectiemiddel in water, met name in de Verenigde Staten. In Nederland wordt chloor niet meer toegepast in de productie van drinkwater [Mol, 2006]. In zwembaden is de karakteristieke chloorlucht vaak goed te ruiken. Chloor wordt aan het water toegevoegd in de vorm van chloorgas of hypochloorzouten (natrium of calciumhypochloride). Door het oplossen van chloor krijgt het water tijdelijk een zuur karakter. Bij een pH die lager is dan 7,6 komt hypochloorzuur in zijn normale vorm voor (HOCl) en bij een pH van meer dan 7,6 in ionvorm (H^+ en OCl^-). Uit onderzoek blijkt dat HOCl een grotere invloed heeft op micro-organismen dan H^+ en OCl^- [Kim et al., 2002]. Chloor heeft in micro-organismen invloed op de stofwisselingsprocessen, transportactiviteiten en op erfelijk materiaal [Thompson, 2004].

Aan het gebruik van chloor als desinfectiemethode tegen Legionella zit een tweetal nadelen. Ten eerste de effectiviteit: het blijkt dat Legionella niet volledig wordt afgedood door chloor [Hamilton et al., 1996]. Dit kan te maken hebben met het feit dat Legionella in staat is om in protozoa te overleven. Deze protozoa kunnen resistent zijn tegen chloor. Ook kan het chloor moeilijk door een biofilm komen, zodat de Legionella door de biofilm wordt afgeschermd van de toxische stof.

Het lastige is bovendien dat het bij desinfectie met chloor volgens de norm kan lijken of alle Legionellabacteriën voldoende zijn afgedood, terwijl dit niet het geval hoeft te zijn. Na 10 minuten blootstelling aan 1,2 mg chloor per liter water, zijn er geen kolonievormende kolonievormende eenheden (kve) per liter meer aan te tonen. Toch kunnen daarna nog wel Legionellabacteriën gevonden worden die de behandeling overleefd hebben. Ze zijn dan wel levensvatbaar, maar niet 'kweekbaar' (Viable But Not Cultivable; VBNC). Met DNA-

elektroforese is aangetoond dat er geen breuken ontstaan zijn in het DNA van de bacteriën, zelfs na hoge dosis chloor [Giao, 2006].

Het tweede nadeel van chloor als desinfectiemethode is technisch van aard: de corrosieve werking van chloor kan de waterleidingen beschadigen [Kim et al., 2002].

4.3.2 Ozon

In Europa wordt, in tegenstelling tot de Verenigde Staten, vooral ozon (O₃) gebruikt om water te desinfecteren. Ozon oxideert het erfelijk materiaal, waardoor verschillende vormen van DNA-schade kunnen optreden, zoals het breken van strengen en het veranderen van baseparen. Ozon is in de praktijk effectiever in het afdoden van micro-organismen zoals Legionella dan chloor, omdat het een lagere concentratie nodig heeft om eenzelfde hoeveelheid bacteriën af te doden in dezelfde hoeveelheid tijd [Domingue et al., 19988; Muraca et al, 1987].

Een nadeel van ozon is dat het niet lang in het water intact blijft. Het verdwijnt snel: in water van 25°C is de halfwaardetijd 15 minuten en is dus na een kwartier de helft van alle ingebrachte ozon verdwenen [Lenntech, 2006]. Hierdoor is het mogelijk dat het niet overal in de waterleiding kan komen. Een manier om de effectiviteit te vergroten is door extra chloor toe te voegen zodat het volledige leidingsysteem wordt bereikt.

Een ander nadeel van ozon is dat het erg reactief is. Het reageert heel snel met allerlei moleculen (niet alleen Legionellabacteriën), en kan zo ongewenste reacties geven. Bovendien is ozon, als het uit het water ontsnapt, toxisch [Mol, 2006]

4.3.3 Peroxide

Minder reactief dan ozon is waterstofperoxide. De werking van waterstofperoxide (H₂O₂) berust op het ontstaan van hydroxyl-radicalen (OH•). Deze radicalen zijn verantwoordelijk voor de desinfectie: ze leiden tot oxidatie van andere moleculen en kunnen zo Legionellabacteriën beschadigen. Na oxidatie gaan de hydroxyl-radicalen over in water en zuurstof [Mol, 2006].

Waterstofperoxide heeft hogere concentraties en een langere incubatietijd nodig om hetzelfde effect als chloor of ozon te krijgen. [Wolfe et al., 1989]. Bekend is dat de effectiviteit van peroxide wordt beïnvloed, omdat Legionella een speciaal enzym (katalase) heeft dat peroxide neutraliseert [Domigue et al., 1988].

Waterstofperoxide is met enige chemische toevoegingen redelijk stabiel te maken, waardoor de toepassing in de praktijk relatief eenvoudig is. Zo wordt het in combinatie met UV-straling op grote schaal gebruikt bij drinkwaterproductie. Ook zijn er diverse desinfectiemiddelen op de markt waarin waterstofperoxide verwerkt zit, zoals Herlisil. Deze middelen worden vooral gebruikt om bijvoorbeeld waterleidingen te ontsmetten [Mol, 2006].

Hoofdstuk 5

Vergelijking van desinfectiemethoden

Tabel 5.1 geeft de voor en nadelen van de besproken desinfectiemethoden weer. Aangezien de vraag naar de biologische mechanismen achter het LegioFreeWater system en andere desinfectiemethoden aanleiding is voor dit onderzoek, zijn in de tabel zowel bestaande methoden als het LegioFreeWater system opgenomen.

Tabel 5.1 Vergelijking van desinfectiemethoden voor *L. pneumophila*

| Methode | Voordelen | Nadelen |
|---|--|--|
| Thermische desinfectie type 1: Conventioneel (Gasgestookt) | <ul style="list-style-type: none"> - denaturatie eiwitten - smelten lipiden - bereikt het gehele leidingsysteem - doodt ook Legionella in protozoa / biofilm | <ul style="list-style-type: none"> - relatief hoge energiekosten door verhitting water |
| Thermische desinfectie type 2: LegioFreeWater system (Verwarmingslint in waterleiding) | <ul style="list-style-type: none"> - denaturatie eiwitten - smelten lipiden - bereikt het gehele leidingsysteem - doodt ook Legionella in protozoa biofilm - relatief lage kosten van energie en water - regelmatige automatische spoeling | <ul style="list-style-type: none"> - installatiekosten |
| UV-straling | <ul style="list-style-type: none"> - veroorzaakt breuken in het DNA - veroorzaakt dimerisatie van thymine | <ul style="list-style-type: none"> - installatiekosten - veroudering lamp - komt niet goed door protozoa / biofilm heen - bereikt niet het gehele leidingsysteem - bacterie kan DNA schade repareren - voldoende hoge dosis nodig om DNA-schade te veroorzaken |
| Koper-zilver ionisatie | <ul style="list-style-type: none"> - maakt de celwand kapot - inactieveert eiwitten - goedkoop toepasbaar en in onderhoud - bereikt het gehele leidingsysteem | <ul style="list-style-type: none"> - komt niet goed door protozoa / biofilm heen - zware metalen, maar werkzaam binnen de norm [Yu-Sen et al., 1996] |
| Chloor | <ul style="list-style-type: none"> - invloed op stofwisseling, transportactiviteiten en erfelijk materiaal - goedkoop | <ul style="list-style-type: none"> - komt niet goed door protozoa / biofilm heen - corrosief - kans op overlevende cellen |
| Ozon | <ul style="list-style-type: none"> - sterk reactief: effectievere methode dan chloor of peroxide - goedkoop | <ul style="list-style-type: none"> - komt niet goed door protozoa / biofilm heen - verdwijnt snel in het water - instabiel, korte halfwaardetijd |
| Peroxide | <ul style="list-style-type: none"> - reactief, maar stabiel met toevoegingen - leidt tot oxidatie-reactie | <ul style="list-style-type: none"> - komt niet goed door protozoa / biofilm heen - hoge concentraties en lange incubatietijd nodig |

Hoofdstuk 6

Discussie en conclusie

In dit literatuuronderzoek is gekeken naar de biologische mechanismen achter desinfectiemethoden gericht op de bacterie *Legionella pneumophila*. Elke methode heeft voor- en nadelen in effectiviteit. Uiteraard hebben alle methoden ook voor- en nadelen in kosten, gebruiksgemak, veiligheid enzovoorts, maar deze komen in dit onderzoek alleen zijdelings aan de orde. Experimentele studies en praktijkonderzoeken zullen de onderbouwing van verschillende methoden kunnen uitbreiden.

UV-straling heeft alleen effect op het DNA van het micro-organisme: het DNA wordt beschadigd en wordt onbruikbaar, waardoor de Legionellabacteriën afsterven. Bij het gebruik van UV-straling is het van belang dat de dosis en duur van de bestraling voldoende is. Bij een korte blootstellingstijd is namelijk een hogere intensiteit nodig om voldoende energie te leveren. De dosis die wordt afgegeven door de UV-lamp kan bovendien een beperkte hoeveelheid DNA beschadigen. Als de Legionellabacteriën zich bevinden in protozoa die veel DNA hebben (in zowel kern als mitochondriën) zal het effect kunnen zijn dat er minder schade optreedt aan het DNA van de Legionellabacteriën. Een technische bijkomstigheid is dat de UV-lamp maar een bepaalde levensduur heeft. De maximale straling die de lamp kan geven neemt af naarmate de lamp verouderd.

Koper-zilver ionisatie is een goedkope methode en effectieve manier om Legionella af te doden. De metaalionen komen, bij een geschikt leidingontwerp, op alle plekken binnen het leidingnet. Wel geldt net als bij de UV-straling dat de Legionellabacteriën beschermd kunnen worden door protozoa en / of een biofilm. Het is namelijk niet helemaal zeker dat de metaalionen Legionellabacteriën in protozoa voldoende bereiken. Een ander nadeel is dat het gebruik van zware metalen in waterleidingen risico's met zich meebrengt voor de volksgezondheid. Relatief hoge concentraties zware metalen in drinkwater zijn niet acceptabel.

De oxidatieve stof chloor is geschikt om Legionella af te doden. De toepassing ervan in waterleidingen kent echter een belangrijke beperking: chloor kan moeilijk door biofilms en protozoa doordringen en zal daardoor minder bacteriën afdoden. De Legionellabacteriën die protozoa en / of een biofilm hebben geïnfecteerd kunnen zich dan blijven vermenigvuldigen. Chloor is daarom met name geschikt om verdere uitbreiding van Legionella te voorkomen, als aanvulling op andere methoden.

Een andere oxidatieve stof is ozon. Desinfectie met ozon is zelfs effectiever dan desinfectie met chloor. Het nadeel van toepassing van ozon is daarentegen dat het ozon in water snel wordt geïnactiveerd. Hierdoor heeft het wel een korte periode effect op de aanwezigheid van Legionellabacteriën, maar zal het voor een algemene desinfectie niet voldoende zijn. Dit nadeel wat betreft de toepasbaarheid van sterk reactieve stoffen (denk bijvoorbeeld aan hydroxylradicalen) bij Legionellapreventie geldt in het algemeen.

Ook peroxiden worden in de praktijk veelvuldig gebruikt om drinkwaterleidingen te desinfecteren. Net als bij UV-straling en koper-zilverionisatie moeten deze oxiderende stoffen voor een goede desinfectie ook door protozoa die Legionella kunnen herbergen, heendringen. Of deze methoden van desinfectie een voldoende effect hebben op de afdoding van Legionella is nog niet bekend.

Alle hierboven besproken methoden hebben een effect op *Legionella pneumophila*. Essentieel punt bij de bestrijding van Legionellabacteriën is echter de aanwezigheid van protozoa. Om desinfectie effectief te laten zijn, moet bestrijding zich dus niet alleen richten op Legionella, maar ook op de protozoa. Er is echter nog weinig bekend over het afdoden van protozoa.

In theorie zou het plaatsen van filters aan het begin van de leiding ervoor kunnen zorgen dat protozoa niet in het leidingnet kunnen komen. Zonder protozoa die als gastheer kunnen fungeren kunnen Legionellabacteriën zich niet vermenigvuldigen, en zou de aanwezigheid van Legionella behoorlijk ingeperkt kunnen worden.

Maar de praktijk blijkt echter weerbarstiger. Doordat elke kraan een besmettingsbron is, is het leidingnet nooit echt schoon te houden, zelfs niet met een bacteriefilter bij de watermeter. Na verloop van tijd zal het net altijd opnieuw een biofilm² hebben [Mol, 2006].

Bij thermische desinfectie worden ook de Legionellabacteriën bereikt die protozoa geïnfecteerd hebben, alsmede de Legionellabacteriën die in een biofilm zitten. De temperatuur stijgt dan zowel buiten als binnen de protozoa, en leidt tot schade aan de aanwezige Legionellabacteriën. Een tweede punt dat pleit voor thermische desinfectiemethoden is dat door verhitting meerdere celonderdelen kapot worden gemaakt. De kans dat Legionella deze combinatie van factoren overleeft wordt hiermee maximaal gereduceerd.

² Zie bladzijde 13 voor een beschrijving van het begrip biofilm.

Literatuurlijst

Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts and P. Walters (2002)

Molecular Biology of The Cell. 4th ed. Garland Science, USA.

Cianciotto, N.P. (2001)

Pathogenicity of *Legionella pneumophila*. Int J Med Microbiol. 291(5): 331-43.

Dietrich, C., K. Heuner, B.C. Brand, J. Hacker and M. Steinert (2001)

Flagellum of *Legionella pneumophila* positively affects the early phase of infection of eukaryotic host cells. Infect Immun. 69(4): 2116-2122.

Domingue, E.L., R.L. Tyndall, W.R. Mayberry and O.C. Pancorbo (1988)

Effects of three oxidizing biocides on *Legionella pneumophila* serogroup 1. Appl Environ Microbiol. 54(3): 741-747.

Fields, B.S., E.B. Shotts Jr, J.C. Feeley, G.W. Gorman and W.T. Martin (1984)

Proliferation of *Legionella pneumophila* as an intracellular parasite of the ciliated protozoan *Tetrahymena pyriformis*. Appl Environ Microbiol. 47(3): 467-471.

Giao, M.S., N.F. Azevedo, S.A. Wilks, M.J. Vieira and C.W. Keevil (2006)

Survival of VBNC *Legionella pneumophila* in drinking water following chlorine disinfection. Conference poster. FEMS Congress of European Microbiologists. Spain, Madrid, July 4-8, 2006.

Hamilton E, Seal D, Hay J. (1996)

Comparison of chlorine and chlorine dioxide disinfection or control of Legionella in a hospital water supply. J. Hosp. Infect. 32: 156.

Inspectie Milieuhygiëne (2001)

Handhavingssuitvoeringsmethode (HUM) Leidingwater, R.O.e.M. Ministerie van Volkshuisvesting, Editor.

James, B.W., W. S. Mauchline, P.J. Dennis and C.W. Keevil (1997)

A study of iron acquisition mechanisms of *Legionella pneumophila* grown in chemostat culture. Curr Microbiol. 34(4): 238-243.

Kim, B.R., J.E. Anderson, S.A. Mueller, W.A. Gaines and A.M. Kendall (2002)

Literature review - efficacy of various disinfectants against Legionella in water systems. Water Research 36(18): 4433-4444.

Knudson, G.B. (1985)

Photoreactivation of UV-irradiated *Legionella pneumophila* and other Legionella species. Appl Environ Microbiol. 49(4): 975-980.

Korstanje, H. (2006)

LegioFreeWater Systems BV. Persoonlijke mededeling.

Lawrence, E. (ed.) (1996)

Henderson's Dictionary of Biological Terms. 11th ed. Longman Group Limited, Harlow, England.

Legionella Experts (2006)

The most complete Legionella website on the internet. www.legionella.org, juni 2006

Lenntech (2006)

Ozon: decompositie. Lenntech Watertreatment en Luchtbehandeling. Delft. <http://www.lenntech.com/ozon-decomp-temperatuur.htm>, juni 2006

Madigan M.T., J.M. Martinko and J. Parker (2003)

Brock Biology of Microorganisms. 10th ed. Prentice Hall, New Jersey, USA.

Ministerie van Sociale Zaken en Volksgezondheid (1957)

Waterleidingwet. Wet van 6 april 1957, houdende regelen met betrekking tot het toezicht op waterleidingbedrijven en tot de organisatie van de openbare drinkwatervoorziening. Ministerie van Sociale Zaken en Volksgezondheid, Den Haag.

Ministerie van Sociale Zaken en Volksgezondheid (1960)

Waterleidingbesluit. (hoofdstuk IIIC) Besluit van 7 juni 1960, houdende technische, hygiënische, geneeskundige en administratieve uitvoeringsmaatregelen van de Waterleidingwet. Ministerie van Sociale zaken en Volksgezondheid, Den Haag.

Ministerie VROM (1984)

Besluit hygiëne en veiligheid badinrichtingen en zwemgelegenheden. Besluit van 6 oktober 1984, tot uitvoering van de artikelen 3, 4, 10a, derde en vierde lid jo eerste lid, 11 en 28 van de Wet hygiëne en veiligheid zwemgelegenheden (Stb. 1982, 494). Ministerie VROM, Den Haag.

Ministerie VROM (1991)

Dossier Legionella, Wetten en regels. NEN 6265, 1e druk. Ministerie VROM, Den Haag.
Digitaal beschikbaar via <http://www.vrom.nl/pagina.html?id=7754>, juni 2006

Miyamoto, M., Y. Yamaguchi, and M. Sasatsu (2000)

Disinfectant effects of hot water, ultraviolet light, silver ions and chlorine on strains of Legionella and nontuberculous mycobacteria. Microbios. 101(398): 7-13.

Mol, S. (2006)

Accountmanager Bedrijven, Hydron Midden-Nederland. Persoonlijke mededeling.

Muraca, P., J.E. Stout, and V.L. Yu (1987)

Comparative assessment of chlorine, heat, ozone, and UV light for killing *Legionella pneumophila* within a model plumbing system. Appl Environ Microbiol. 53(2): 447-453.

Murga, R., T.S. Forster, E. Brown, J.M. Pruckler and B.S. Fields (2001)

Role of biofilms in the survival of *Legionella pneumophila* in a model potable-water system. Microbiology 147(Pt 11): 3121-3126.

Prescott L.M., D.A. Klein and J.P.H. Harley (2002)

Microbiology. 5th ed. McGraw Hill, New Jersey, USA.

Ririe, K.M., R.P. Rasmussen, and C.T. Wittwer (1997)

Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. Anal Biochem. 245(2): 154-160.

Rogers J., A.B. Dowsett, P.J. Dennis, J.V. Lee, and CW. Keevil (1994)

Influence of temperature and plumbing material selection on biofilm formation and growth of *Legionella pneumophila* in a model potable water system containing complex microbial flora. Appl Environ Microbiol. 60: 1585–1592.

Saby S, V.A., J. Kittel, S. Giloupe, and M. Lotierzo (2003)

Control of Legionella in biofilms: evidence for disinfection inefficiencies in a pilot hot water distribution system, in International Symposium on Health-related water microbiology. Cape Town, South-Africa.

Schets F.M. en A.M. de Roda Husman (2004)

Gezondheidsaspecten van Legionella in water. RIVM, De Bilt.

Steinert, M., U. Hentschel and J. Hacker (2002)

Legionella pneumophila: an aquatic microbe goes astray. FEMS Microbiol Rev., 26(2): 149-162.

Thompson, H.J. (2004)

DNA oxidation products, antioxidant status, and cancer prevention. J. Nutr, 2004. 134(11): 3186S-3187S.

Université de Lausanne (2006)

Phylogenetic tree of organisms. www2.unil.ch/comparativegenometrics/phylo.html, juni 2006

Vos, M.T. en A. Troelstra (2001)

Legionella, diagnose en preventie. Infectieziekten Bulletin 12(12): 431-436.

Wieland, H., M. Faigle, F. Lang, H. Northoff and B. Nuemeister (2002)

Regulation of the Legionella mip-promotor during infection of human monocytes. FEMS Microbiology Letters 212(1): 127-132.

Wikipedia (2006)

The free encyclopedia. http://en.wikipedia.org/wiki/Main_Page, juni 2006

Wolfe, R.L., M.H. Stewart, S. Liang and M.J. McGuire (1989)

Disinfection of model indicator organisms in a drinking water pilot plant by using peroxone. Appl. Environ. Microbiol. 55(9): 2230-2241.

Yu-Sen, E.L, R.D. Vidic, J.E. Stout and V.L. Yu (1996)

Individual and combined effects of copper and silver ions on inactivation of *Legionella pneumophila*. Water Research. 30(8): 1905-1913.

Zink, S.D., L. Pedersen, N.P. Cianciotto and Y.A. Kwaik (2002)

The Dot/Icm type IV secretion system of *Legionella pneumophila* is essential for the induction of apoptosis in human macrophages. Infect Immun. 70(3): p. 1657-1663.

