



# Onderzoek naar Legionella in de biologiebekkens van mestverwerkingsinstallaties

Studie uitgevoerd in opdracht van: VLM  
Referentie: 2023/REE/R47  
November 2023

# Onderzoek naar Legionella in de biologiebekkens van mestverwerkingsinstallaties

## **VITO**

Boeretang 200

2400 MOL

Belgium

BTW No: BE0244.195.916

[vito@vito.be](mailto:vito@vito.be) – [www.vito.be](http://www.vito.be)

IBAN BE34 3751 1173 5490 BBRUBEBB

## **Sabine Kreps**

Techn. expert microbiology

+32 14 33 69 42

[sabine.kreps@vito.be](mailto:sabine.kreps@vito.be)

## **Siegfried Hofman**

Business Development Manager

+32 14 33 59 15

[siegfried.hofman@vito.be](mailto:siegfried.hofman@vito.be)



Vision on technology  
for a better world

**vito.be**

## AUTEURS

Kreps Sabine VITO  
Hufkens Nady VITO  
Hofman Siegfried VITO  
Karla Dinne Buildwise  
Marilyn Roger Buildwise

# INHOUDSTAFEL

Auteurs .....	I
Inhoudstafel .....	II
1 Inleiding.....	1
2 Situering.....	2
2.1 Doelstelling van het onderzoek.....	2
2.1.1 Wat is Legionella? .....	2
2.1.2 Verspreiding van Legionella uit waterzuiveringsinstallaties .....	3
3 Legionella analyses.....	3
3.1 Monsternames op de verschillende sites .....	3
3.1.1 Planning.....	3
3.1.2 Monstername.....	3
3.1.3 Analyse-methodes bij VITO en Buildwise.....	3
3.2 Analyseresultaten van de verschillende mestverwerkingssites.....	5
3.2.1 Legionella resultaten van de afgeleide WAC/V/A/005 methode van VITO en Buildwise .....	5
3.2.2 Legionella resultaten met de afgeleide WAC/V/A/005 methode .....	5
3.2.3 Legionella resultaten met de Legiolert methode.....	6
3.2.4 <i>Legionella pneumophila</i> resultaten met de qPCR-methode.....	8
3.2.5 Bespreking Legionella resultaten .....	10
4 Besluit .....	11

# 1 INLEIDING

De opzet van deze beknopte studie is het onderzoek of Legionella voorkomt in biologiebekkens van zuiveringsinstallaties bij mestverwerkers in Vlaanderen.

Een studie uitgevoerd in Nederland heeft aangetoond dat verschillende Legionella-soorten, waaronder *Legionella pneumophila* werden geïdentificeerd in (lucht)monsters in biologische zuiveringsinstallaties met behulp van microbiologische en moleculaire methoden. Door de werking van waterzuiveringsinstallaties kan waternevel (aërosolen) vrijgezet worden. Wanneer deze aërosolen legionellabacteriën bevatten, kunnen ze een gevaar vormen voor de gezondheid van werknemers en omwonenden.

## 2 SITUERING

### 2.1 Doelstelling van het onderzoek

Dit onderzoek uitgevoerd in opdracht van VLM kadert in een bredere studie die in 2023 is uitgevoerd voor Departement Zorg.

VITO heeft in samenwerking met Buildwise (vroeger WTCB) een door Departement Zorg gesubsidieerde studie uitgevoerd, nl. een risico-evaluatie van Legionella in waterzuiveringsinstallaties (WZI) in Vlaanderen. Hierbij zijn een vijftigtal gemeentelijke en industriële WZI onderzocht op aanwezigheid van Legionella. Deze studie bevestigt dat bij biologische systemen er een heel sterke correlatie is tussen aanwezigheid van Legionella (optimale groei omgeving) en hoge organische stikstof- en zuurstofconcentraties en ideale temperaturen.

Voor VLM is in dit bijkomend onderzoek de focus gelegd op de biologiebekken bij mestverwerkers.

Hiervoor zijn op twaalf sites monsternames uitgevoerd van water uit de biologiebekken van mestverwerkingsinstallaties en getest op aanwezigheid van Legionella.

VITO en Buildwise hebben Legionella analyses uitgevoerd aan de hand van verschillende analysetechnieken nl. de klassieke ISO-uitplaatmethode WAC/A/005, Legiolert (een MPN-kweekmethode) en qPCR. Deze laatste twee technieken zijn meegenomen in de studie omdat enerzijds Legiolert uitermate gebruiksvriendelijk is ten opzichte de WAC-methode welke een bijzondere specifieke expertise vereist en anderzijds de qPCR een analysemethode is die een resultaat binnen de 24 uur genereert.

Het doel was om te evalueren of zuiveringsinstallaties bij mestverwerkers tot de risicovolle installaties horen.

#### 2.1.1 Wat is Legionella?

Legionellabacteriën komen zowel in de natuur (in water en onze bodem) als in door de mens gebouwde watersystemen voor (zoals leidingwaterinstallaties, koeltorens en waterzuiveringsinstallaties). Er zijn meer dan 50 legionellasoorten waarvan ongeveer 20 als ziekmakend voor de mens zijn bevestigd. Hiervan is *Legionella pneumophila* (serogroep 1) de belangrijkste ziekteverwekker, maar ook andere *Legionella pneumophila* serogroepen en andere *Legionella* species zijn in verband gebracht met het ziektebeeld en dus als pathoog te beschouwen.

Besmetting vindt uitsluitend plaats door het inademen van met Legionella besmette waternevel. Vooral ouderen en volwassenen met eerdere longklachten of chronische ziekte zijn vatbaar voor een Legionella infectie maar ook mensen zonder voorgeschiedenis of specifieke gevoeligheden kunnen geïnfecteerd worden. De infectieuze dosis (is de hoeveelheid Legionella die men moet inademen om ziek te worden) is voor elk individu verschillend en is functie van de heersende gezondheidstoestand. Deze kan aanleiding geven tot een Pontiac-koortsachtige ziekte of in ergere mate tot Legionellose of Veteranenziekte dat zich uit als een longaandoening met als belangrijkste symptomen een niet productieve hoest met pijn op de borst, koorts en hoofdpijn, en in sommige gevallen kan dit uitmonden in een levensbedreigende longontsteking.

## 2.1.2 Verspreiding van Legionella uit waterzuiveringsinstallaties

Een studie uitgevoerd in Nederland heeft aangetoond dat waterzuiveringsinstallaties aërosolen kunnen vrijzetten. Legionella kan zich dan via deze verneveling naar de omgeving verspreiden. Het type verneveling, de hoeveelheid geproduceerde aërosolen, en eventueel aanwezige barrières die de verspreiding ervan beïnvloeden spelen hierbij een grote rol. Daarnaast bepalen ook de weeromstandigheden mee de mate van instandhouding en verspreiding van de aërosolen in de lucht. Wanneer deze aërosolen legionellabacteriën bevatten, vormen ze een gevaar voor personen die er mee in contact komen, zowel in de onmiddellijke nabijheid maar ook in de verre omgeving afhankelijk van de verspreiding van het waternevel. Bij gunstige omstandigheden kan er gevaar optreden tot meerdere kilometers van de installatie.

## 3 LEGIONELLA ANALYSES

### 3.1 Monsternames op de verschillende sites

#### 3.1.1 Planning

De monsternames werden ingepland tijdens de VLM [campagnes 1069](#)<sup>1</sup> in Regio Oost, zodat geen afzonderlijke bemonsteringen dienden uitgestippeld te worden. In de campagne voor 1069 bemonstering zijn een drietal bedrijven per dag bezocht. Dankzij de aanwezigheid van de VLM en VITO medewerkers en een beknopte introductie en kadering van het onderzoek werd het monsternameteam goed onthaald en kregen ze de medewerking van zo goed als alle uitbaters van de mestverwerkingen.

Tijdens vier monsternamedagen werden in totaal 13 sites bezocht. Eén bedrijf weigerde de monstername van de biologie, één installatie was niet operationeel maar werd toch bemonsterd.

#### 3.1.2 Monstername

De monstername gebeurde door het nemen van een schepmonster conform WAC/I/A/003 procedure of monstername aan een kraan conform WAC/I/A/002. De VLM en VITO medewerkers bemonsterden telkens twee maal 1 liter (in steriele flessen aangeleverd door VITO) uit de biologie-tank. VITO zorgde voor gekoeld transport naar Mol en via een koerier werd de levering van de gekoelde monsters de dag van monstername aan Buildwise bezorgd zodat de monsters telkens binnen houdbaarheid konden geanalyseerd worden.

#### 3.1.3 Analyse-methodes bij VITO en Buildwise

VITO analyseerde de parameters Legionella pneumophila en Legionella species (non-pneumophila) op het afvalwater via een methode afgeleid van WAC/V/A/005 enerzijds en analyse van Legionella pneumophila via de Legiolert kweekmethode met een aangepast protocol anderzijds. Buildwise analyseerde de parameters Legionella pneumophila en

---

<sup>1</sup> Conform de Verordening (EG) nr. 1069/2009 wordt een jaarlijkse campagne uitgevoerd bij mestverwerkers voor de microbiologische kwaliteitscontrole van verwerkte mest die moet voldoen aan bepaalde normen om het verwerkingsproces te bewaken of om de verwerkte mest in de handel te brengen.

Legionella species (non-pneumophila) op het afvalwater via een afgeleide WAC/V/A/005 methode alsook via qPCR-techniek voor kwantificatie van Legionella pneumophila (BIORAD®).

De kwantificatie van Legionella is gebaseerd op de conventionele microbiologische kweekmethode WAC/V/A/005. In de loop van 2023 tijdens een studie voor Departement Zorg werd de analysemethode bijgestuurd en geoptimaliseerd, waarbij een aantal bijkomende en alternatieve stappen werden ingevoerd om de moeilijke matrix zoals afvalwater van de biologiebekkens te kunnen analyseren. De bepalingen werden uitgevoerd met de klassieke ISO-uitplaatmethode van WAC/V/A/005 weliswaar met een aantal aanpassingen nodig om behandeling van zwaar beladen monsters toe te laten:

- Naast de rechtstreekse uitplatingen na behandelingen met zuur en gecombineerde behandeling warmte met zuur werden verdunningen van deze fracties in meervoud uitgeplaat.
- De groei werd met tussenliggende aflezingen opgevolgd gedurende 10 dagen, om nadien via opzuivering een serotypering uit te voeren. Serotypering laat toe een opdeling te maken van het aantal Legionella pneumophila serogroep 1, Legionella pneumophila serogroep 2 - 14, en aantal Legionella species non-pneumophila.
- De in de WAC/V/A/005 vermelde membraanfiltratie was met deze matrix heel moeilijk uitvoerbaar en genereerde geen bruikbare resultaten, waardoor in het onderzoek voor kwantificatie van Legionella bacteriën in een zwaar beladen matrix er geen membraanfiltratie meer uitgevoerd werd maar enkel rechtstreekse uitplatingen met inbegrip van voorbehandelingen en verdunningen.
- Als positieve analysecontrole werd er tweemaal (bij eerste en derde reeks monsters) recoverytesten uitgevoerd met Legionella pneumophila serogroep 1 (additie van Legionella pneumophila serogroep 1 aan het bemonsterd afvalwater om aan te tonen dat de gespikte Legionella wel degelijk wordt teruggevonden).

De alternatieve Legionella analysetechnieken Legiolert en qPCR (BIORAD®) zijn voor dit type waters van biologiebekkens niet de gebruikelijke analysemethodes daar ze tot nu toe geoptimaliseerd en gevalideerd zijn voor minder beladen water.

Alhoewel de resultaten van de Legiolert testen, zeker kwalitatief, goed overeen komen met de klassieke uitplaatmethode, biedt Legiolert een sterke meerwaarde naar bepaling van de aanwezigheid van de verschillende serotypes (Legionella pneumophila serogroep 1 en Legionella pneumophila serogroep 2-14).

De kwantificatie van Legionella pneumophila via qPCR werd uitgevoerd door gebruik te maken van de kit iQcheck Legionella pneumophila (BIORAD®).

De analyse resulteert in een totaal aantal Legionella pneumophila (GU/L<sup>2</sup>) aanwezig in het water (resultaat dat kan beïnvloed worden door aanwezigheid van dode of niet levensvatbare Legionella pneumophila).

Iedere analysemethode heeft zijn voor- en nadelen. Geen van de gestandaardiseerde, gevalideerde methodes zijn kant en klaar bruikbaar voor zwaar beladen waters (die deel uitmaken van deze studie) waardoor bijsturing noodzakelijk is gebleken.

---

<sup>2</sup> genomic units /L



## 3.2 Analyseresultaten van de verschillende mestverwerkingsites

### 3.2.1 Legionella resultaten van de afgeleide WAC/V/A/005 methode van VITO en Buildwise

### 3.2.2 Legionella resultaten met de afgeleide WAC/V/A/005 methode

Bedrijf	bemonsteringswijze schep of kraan	temperatuur afvalwater bij monstername in °C	datum monstername	datum start analyse	resultaat Legionella pneumophila en Legionella species (non-pneumophila)			eenheid
					Leg. pneumophila serogr. 2-14	Leg. pneumophila serogr. 1	Leg. species non- pneumophila	
Bedrijf 1	schep	33,0	05/09/2023	06/09/2023	1,0E+08	<1 E+04	<1 E+04	kve/l
Bedrijf 2 niet operationeel	kraan	27,9	05/09/2023	06/09/2023	<1 E+04	<1 E+04	<1 E+04	kve/l
Bedrijf 3	kraan	29,0	05/09/2023	06/09/2023	1,0E+07	<1 E+04	<1 E+04	kve/l
Bedrijf 4	schep	33,0	05/09/2023	06/09/2023	<1 E+04	<1 E+04	<1 E+04	kve/l
Bedrijf 5	kraan	27,4	11/09/2023	12/09/2023	1,0E+07	<1 E+04	<1 E+04	kve/l
Bedrijf 6	kraan	34,0	11/09/2023	12/09/2023	1,0E+07	<1 E+04	<1 E+04	kve/l
Bedrijf 7	kraan	32,5	11/09/2023	12/09/2023	1,0E+08	<1 E+04	<1 E+04	kve/l
Bedrijf 8	kraan	39,3	12/09/2023	13/09/2023	<1 E+04	<1 E+04	<1 E+04	kve/l
Bedrijf 9	schep	32,9	12/09/2023	13/09/2023	1,0E+09	<1 E+04	<1 E+04	kve/l
Bedrijf 10	schep	31,1	18/09/2023	19/09/2023	<1 E+04	<1 E+04	1,0E+07	kve/l
Bedrijf 11	schep	26,6	18/09/2023	19/09/2023	1,0E+07	<1 E+04	1,0E+07	kve/l
Bedrijf 12	schep	31,9	18/09/2023	19/09/2023	1,0E+08	<1 E+04	<1 E+04	kve/l

Tabel 1 Legionella resultaten via afgeleide WAC/V/A/005 methode van het afvalwater uit een biologiebekken bij 12 bedrijven (waarden lager dan de rapportagegrens worden weergegeven in grijs font)

In tabel 1 worden de hoogste (worst case) waarden weergegeven van beide laboratoria als de grootteorde van de aanwezige hoeveelheid aanwezige bacteriën. Als gevolg van onder andere de grote verdunningen verliest de methode immers aan gevoeligheid.

Opvallend is dat in negen van elf operationele installaties Legionella aanwezig is in concentraties tussen  $10^7$  tot  $10^9$  kve/l. De twee bedrijven waar geen Legionella werd gedetecteerd zijn in Tabel 1 in het blauw aangeduid. Er werd met deze WAC-analysmethode in acht monsters Legionella pneumophila serogroep 2 – 14 teruggevonden, slechts op twee sites werd Legionella species<sup>3</sup> non-pneumophila gedetecteerd, en in geen enkel monster werd Legionella pneumophila serogroep 1 aangetoond.

Eén installatie (bedrijf 2) die niet operationeel was werd alsnog bemonsterd. De heersende temperatuur (27,9°C) kon mogelijks wijzen op nog resterende biologische activiteit, maar er werd geen Legionella in het watermonster aangetoond met de afgeleide WAC/V/A/005 methode.

<sup>3</sup> Met de kit die voor deze studie is gebruikt ter detectie van Legionella species (non-pneumophila) wordt antilichaam agglutinatie (met de Legionella celwand antigenen) van zeven pathogenen getest nl. Legionella longbeachae 1 & 2, Legionella bozemanii 1 & 2, Legionella dumoffii, Legionella gormanii, Legionella jordanis, Legionella micdadei and Legionella anisa.

### 3.2.3 Legionella resultaten met de Legiolert methode

Legiolert is een analysemethode gebaseerd op selectieve kweek van *Legionella pneumophila* (na 7 dagen incubatie), zie als voorbeeld in Figuur 1 een Legiolert Quanti-Tray van bedrijf 7. Gezien de biologiewatermonsters veel vaste fractie bevat (waterfase en slurry), werd een voorafgaande sonicatie uitgevoerd. Uit de ervaring met analyse van de monsters voor de Departement Zorg studie werd aangetoond dat de Legionella concentratie in de slurry het hoogst is. Door het soniceren wordt het vrijkomen van de Legionella vanuit de slurry in suspensie bevorderd.

Bij een standaard Legiolert analysemethode wordt een deel van watermonster samen met een Legionella bevorderend groeimedium verdeeld over een Quanti Tray en na incubatie van 7 dagen worden (zie Figuur 1) de 'gekleurde' vakjes (waar microbiële groei optreedt) geteld en aan de hand van een MPN (Most Probable Number) tabel wordt een Legionella concentratie berekend.

Nadien worden de gekleurde cupjes van de Quanti Tray doorprikt om op de volgroeide suspensies een serotypering uit te voeren. Tabel 2 geeft de Legionella resultaten weer via Legiolert methode van de biologie bij 12 bedrijven.



*Figuur 1 Legionella pneumophila Quanti tray na een 7 dagen incubatie*

Bedrijf	resultaat Legiolert		eenheid
	Leg. pn. 2-14	Leg. pn. 1	
Bedrijf 1	1,23E+05	2,30E+03	kve/l
Bedrijf 2 niet operationeel	niet uitgevoerd		kve/l
Bedrijf 3	<1E+03		kve/l
Bedrijf 4	1,1E+03		kve/l
Bedrijf 5	≥ 1,26E+05	≥1,10E+03	kve/l
Bedrijf 6	≥ 3,9E+03		kve/l
Bedrijf 7	≥ 2,3E+03		kve/l
Bedrijf 8	≥1,10E+03		kve/l
Bedrijf 9	≥ 1,26E+05	≥1,10E+03	kve/l
Bedrijf 10	≥ 2,3E+03		kve/l
Bedrijf 11	≤ 4+E04		kve/l
Bedrijf 12	≥ 2,3E+03		kve/l

*Tabel 2 Legionella resultaten via Legiolert methode van de biologie bij 12 bedrijven*

Met de Legiolert zijn naast Legionella pneumophila serogroep 2-14 in drie monsters Legionella pneumophila serogroep 1 aangetoond. Door de beperkingen van de Legiolert techniek die in eerste instantie ontworpen is voor analyse van drinkwater, sanitaire waters en koeltorenwater, worden er doorgaans lagere concentraties van Legionella pneumophila aangetoond dan met de WAC-methode. Op een selectie van monsters werd een volledige serotypering uitgevoerd. Opvallend is wel dat met deze techniek de aanwezigheid van Legionella pneumophila serogroep 1 werd aangetoond terwijl dit met de klassieke methode niet het geval was a.g.v. de hogere detectiegrenzen na verdunnen van de monsters.

### 3.2.4 Legionella pneumophila resultaten met de qPCR-methode

De BIORAD® iQ-Check Legionella pneumophila zijn kits voor snelle detectie of kwantificering van Legionella pneumophila in watermonsters. Met behulp van een real-time polymerasekettingreactie (PCR) worden specifieke DNA sequenties van Legionella pneumophila geamplificeerd en gedetecteerd met behulp van fluorescerende probes. De kwantificering is mogelijk door het gebruik van de gekalibreerde DNA iQ-Check Legionella kwantificeringsstandaarden in de amplificatiestap. De techniek laat toe resultaten te verkrijgen in minder dan 4 uur na de filtratie van het watermonster en de DNA-extractiestap. De tests zijn gebaseerd op amplificatie en detectie van genomische sequenties met de real-time PCR-methode.

De kits bevatten alle kant-en-klare reagentia die nodig zijn om de analyse van de monsters uit te voeren: PCR-amplificatie oplossingen inclusief Taq DNA-polymerase en interne controle, specifieke fluorescerende probes (FAM-fluorofoor) en primers, negatieve en positieve controles en extra standaarden voor de kwantificering. De reagentia en de methode zijn geoptimaliseerd en gevalideerd voor gebruik met thermocyclersystemen van BIORAD®.

Gezien deze watermonsters veel vaste fractie bevatten werd de filtratie voor de qPCR-methode uitgevoerd op het supernatans. Slechts een beperkt watervolume kon gefiltreerd worden (tussen de 5 en 10 ml). Dergelijke afvalwaters zijn zwaar beladen waters waardoor inhibitie van de qPCR reactie kan optreden en het noodzakelijk was om eveneens verdunningen toe te passen om tot een resultaat te kunnen komen. Dit resulteert wel in hoge kwantificatielimieten.

bedrijf	LOQ copies/ L	resultaat qPCR Legionella pneumophila (levende + dode Legionella pneumophila)	eenheid	evaluatie	conclusie	
Bedrijf 1	480000	positief	3.46E+06	copies/L	v	WAC-methode Leg pn : $10^5 - 10^8$ PCR : $10^6$
Bedrijf 2 niet operationeel	480000	positief lager dan LOQ	7.27E+05	copies/L	!	WAC-methode Leg pn < $10^4$ PCR : $7.2 \cdot 10^5$
Bedrijf 3	480000	positief lager dan LOQ, slechts 1 well gebruikt voor kwantificatie	9.97E+04	copies/L	!	WAC-methode Leg pn : $10^7$ PCR : $9.9 \cdot 10^4$

Bedrijf 4	480000	negatief	N/A geen resultaat	copies/L	X	WAC-methode Leg pn : $10^3$ PCR : negatief
Bedrijf 5	240000	negatief	N/A geen resultaat	copies/L	X	WAC-methode Leg pn : $10^5 - 10^7$ PCR : negatief
Bedrijf 6	480000	inhibitie	N/A geen resultaat	copies/L	X	WAC-methode Leg pn : $10^7$ PCR : geen resultaat inhibitie
Bedrijf 7	480000	inhibitie, resultaat onderschat	<b>2.07E+07</b>	copies/L	!	WAC-methode Leg pn : $10^7 - 10^8$ PCR : $2.0 \cdot 10^7$ (onderschatting)
Bedrijf 8	480000	positief	<b>9.78E+06</b>	copies/L	!	WAC-methode Leg pn : $<10^4$ PCR : $9.7 \cdot 10^6$
Bedrijf 9	240000	positief	<b>5.50E+05</b>	copies/L	V	WAC-methode Leg pn : $10^7 - 10^9$ PCR : $5.5 \cdot 10^5$
Bedrijf 10	240000	inhibitie	N/A geen resultaat	copies/L	X	WAC-methode Leg pn : negatief PCR : geen resultaat inhibitie
Bedrijf 11	480000	negatief	N/A geen resultaat	copies/L	X	WAC-methode Leg pn : $10^7$ en in slurry Leg pn : $10^6$ PCR : negatief
Bedrijf 12	480000	inhibitie, resultaat onderschat	<b>6.98E+07</b>	copies/L	!	WAC-methode Leg pn : $10^7 - 10^8$ PCR : $7.0 \cdot 10^7$ (onderschatting)

Tabel 3 Legionella pneumophila resultaten via qPCR methode van de biologie bij 12 bedrijven en evaluatie t.o.v. afgeleide WAC-methode

In bovenstaande Tabel 3 worden in de vierde kolom de resultaten weergegeven van qPCR voor *Legionella pneumophila*.

De resultaten van bedrijf 1, 8 en 9 zijn bruikbaar voor interpretatie (resultaat boven de LOQ = limit of quantification). Noemenswaardig is dat het resultaat van het niet-operationeel bedrijf 2 negatief is voor de WAC-methode maar wel positief voor qPCR. Voor de andere bedrijven - zie derde kolom - zijn de resultaten niet bruikbaar omwille van of positief lager dan LOQ, of negatief of inhibitie.

In de voorlaatste kolom wordt een evaluatie gegeven voor de resultaten met de technieken afgeleide WAC-methode en qPCR, met volgende codering

✓ : overeenstemming tussen de resultaten

✗ : geen overeenstemming tussen de resultaten

! : voorzichtigheid bij interpretatie daar bij de qPCR-analyse één van de comments van toepassing is: 'inhibitie / onderschat resultaat / resultaat onder kwantificatielimiet'.

Voor bedrijf 8 is er een positief qPCR resultaat terwijl er voor dat bedrijf een negatief resultaat via WAC-methode werd vastgesteld (detectielimiet) weliswaar wel een positieve waarde via Legiolert ( $\geq 10^3$  kve/l). Dit geeft aan dat het PCR-resultaat mogelijks deels beïnvloed wordt door aanrijking van DNA van dode of niet-kweekbare *Legionella pneumophila*.

Van de 12 bedrijven is er enkel voor bedrijf 1 en voor bedrijf 9 een positief resultaat voor WAC-methode en een positief qPCR resultaat gegenereerd.

Algemeen kan besloten worden dat qPCR voor *Legionella pneumophila* een methode is die geen eenduidige meerwaarde biedt, en gezien de aanzienlijke analysekost is qPCR eigenlijk niet van toepassing voor zware beladen waterstalen zoals deze van de biologiebekken.

### 3.2.5 Bespreking Legionella resultaten

Hoewel het om een beperkte studie gaat wordt uit de Legionella analyseresultaten met de afgeleide WAC-methode vastgesteld dat er in negen bedrijven Legionella in hoge concentraties<sup>4</sup> werd bepaald, nl.  $10^7$  tot  $10^9$  kve/l waardoor deze sites toch als risicovol dienen aanzien te worden. Bij drie bedrijven werd geen Legionella aangetoond, waarvan één biologiebekken niet operationeel was.

Opvallend is dat via de WAC-methode enkel *Legionella pneumophila* serogroep 2-14 en Legionella species (non-pneumophila) werd aangetoond. Met de Legiolert werd op drie sites Legionella pneumophila serogroep 1 gedetecteerd, wat zeker een toegevoegde waarde is.

Alhoewel Legionella pneumophila serogroep 1 als de meest frequente ziekteverwekker wordt benoemd zijn zeker ook andere serogroepvarianten virulent. Bijkomend dient ook benadrukt te worden dat één van de courante aangewende tests (urine) bij patiënten enkel gebaseerd is op aantoonbaarheid van *Legionella pneumophila* serogroep 1, waardoor de virulentie van dit serotype 1 sterk wordt uitvergroot ten opzichte van andere serogroepen en andere Legionella species<sup>5</sup>.

De virulentie van de geïsoleerde Legionella species (non-pneumophila) bij twee bedrijven mag zeker ook niet verwaarloosd worden.

Belangrijk te vermelden is dat in het pathogenen consortium *Legionella pneumophila* serogroep 2-14 ook ziekteverwekkers zijn met variërende virulentie.

<sup>4</sup> Er zijn geen wettelijke normen voor 'biologie-water' van mestverwerkingsinstallaties, maar als referentie: de drempelwaarden voor Legionella spp. van [koeltorenwater](#) en [matigrisico-inrichtingen](#) en [hoogrisico-installaties](#) zijn  $10^4$  tot  $10^5$  kve/l.

<sup>5</sup> <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1341321X1930385X>

## 4 BESLUIT

De opzet van dit onderzoek was om meer inzicht te krijgen betreffende de al dan niet aanwezigheid van Legionella in biologiebekken en de analysemethodiek voor afvalwater. Er werden twaalf biologiebekken van mestverwerkingsinstallaties bemonsterd en geanalyseerd op Legionella. In negen van de bemonsterde bekkens werden door VITO en Buildwise hoge concentraties aan pathogene Legionella vastgesteld.

Aangezien besmetting alleen mogelijk is via het inademen van besmette aërosolen is louter de aanwezigheid van Legionella in een biologiebekken geen eenduidige aanwijzing voor het risico op besmetting. Factoren die invloed hebben op het ontstaan van aërosolen, zoals het type beluchters en de eventuele aanwezigheid van schuimbekers, spelen een grote rol. Daarnaast bepalen ook de meteorologische omstandigheden mee de mate van instandhouding en verspreiding van de aërosolen in de lucht. Die factoren werden echter nog niet onderzocht.

Toch is het aangewezen om, in het kader van een preventief gezondheidsbeleid, rekening te houden met het potentiële risico van de aanwezigheid van de bacterie in biologiebekken. Het is dan ook aangewezen om betreders en werknemers van mestverwerkingsites die werken uitvoeren in de nabijheid van de nevel van het biologiesysteem te adviseren om altijd preventief een adembescherming (FFP3-masker) te (laten) dragen. Dat is een effectieve maatregel, mits het masker volgens de voorschriften wordt gedragen.

De kans op verspreiding en blootstelling via/aan aërosolvorming vanuit de bekkens is momenteel onduidelijk. Dit risico kan verder onderzocht worden door het uitvoeren van luchtmetingen waardoor meer informatie bekomen wordt over de verspreiding van de aërosolen bv. in functie van het type installatie. Gezien het relatief grote risico op een uitbraak door Legionella en de daaraan gekoppelde gevaren voor uitbaters en omwonenden van een installatie kunnen we hier niet anders dan sterk aanbevelen om een vervolgonderzoek uit te laten voeren.

Voor ondersteuning in het zoeken naar potentiële maatregelen tegen legionellagroei in en verspreiding van Legionella uit afvalwaterzuiveringsinstallaties, zijn twee documenten van respectievelijk RIVM en KWR (NL) die opgesteld werden naar aanleiding van het Nederlandse onderzoek.

- [Rapport: Inventarisatie van legionellarisico's bij afvalwaterzuiveringsinstallaties](#)
- [Handreiking legionellapreventie in biologische afvalwaterzuiveringsinstallaties](#)

Voor verdere informatie in verband met de (volks)gezondheidskundige aspecten van Legionella in afvalwaterzuiveringsinstallaties, kunt u terecht bij de afdeling Preventief Gezondheidsbeleid van het Departement Zorg. Dat kan via de website <https://zorg-en-gezondheid.be/afvalwaterzuivering> of via het e-mailadres [legionella@vlaanderen.be](mailto:legionella@vlaanderen.be)

**vision on technology  
for a better world**

