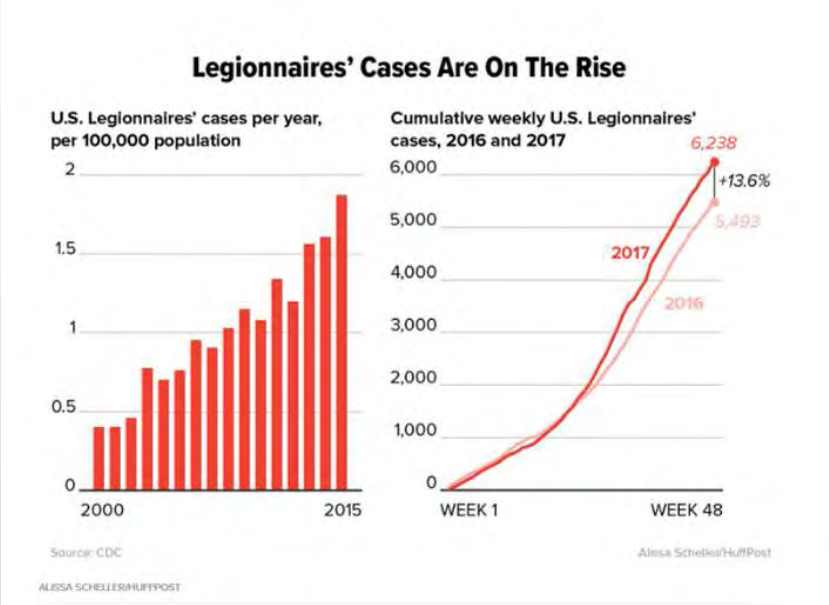
Legionella stand van zaken vanuit wetenschappelijk perspectief

Frank Oesterholt
KWR Watercycle Research Institute

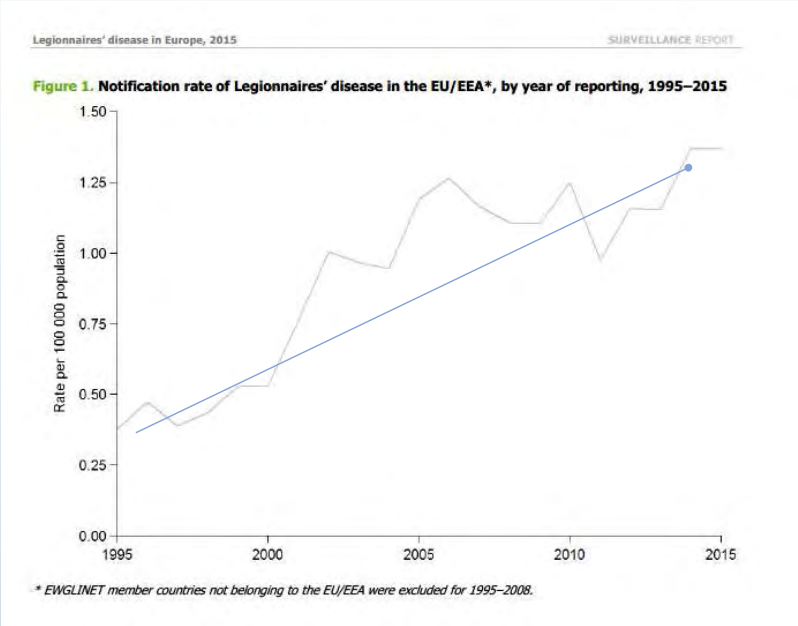
Legionella algemeen

Toename aantal legionellosegevallen

- Aantal geregistreerde gevallen van legionellose neemt toe in VS en West-Europa. In NL > 3.0 cases/100.000 .



Source:https://www.huffingtonpost.com/entry/legionnaires-disease-cases-continue-to-rise-nationally_us



Source:ecdc surveillance report Legionaires'disease in Europe 2015

Legionella algemeen

Verscheidenheid legionella species

- Het geslacht Legionella: 59 soorten beschreven. Waaronder ***Legionella pneumophila***; *L. longbeachae*, *L. micdadei, L. anisa, L. gormanii, L. bozemanii, L. dumoffi, etc.*
- *L. pneumophila* omvat 15 serogroepen en meer dan 23 typen bij verdere differentiatie met monoklonale antilichamen (Mab). Type LP serogroep 1 is meest virulent.
- Met behulp van sequentie-analyse van meerdere genen zijn meer dan 1900 sequentietypen (ST's) van *Legionella pneumophila* geïdentificeerd
- Whole Genome Sequencing (WGS) van *Legionella pneumophila* levert in de toekomst nog meer diversiteit op.

Legionella algemeen

Legionella sequence based typing

- 6 ST's verantwoordelijk voor 41% van de legionellosegevallen in ca. 50 landen (LP sg 1: ST1, ST23, ST37, ST42, ST47 en ST62); vrijwel niet waargenomen in milieumonsters.
- In UK: 25% legionellose door ST47; specifieke qPCR ontwikkeld voor Lp ST47
- WGS duidt op diversiteit binnen ST's (met name ST1, ST37 en ST62). ST47 is nagenoeg homogeen
- WGS wordt goedkoper; toepassing bij diagnose en bronopsporing;
- Onderzoek naar aanwezigheid van virulente STs in het milieu met selectieve qPCR
  (bijvoorbeeld doel van TKI-watertechnologie project van KWR/WMD/WLN in Indonesië.)

Legionella algemeen

Gevaarlijk en ongevaarlijk

Soorten die ziekte veroorzaken:

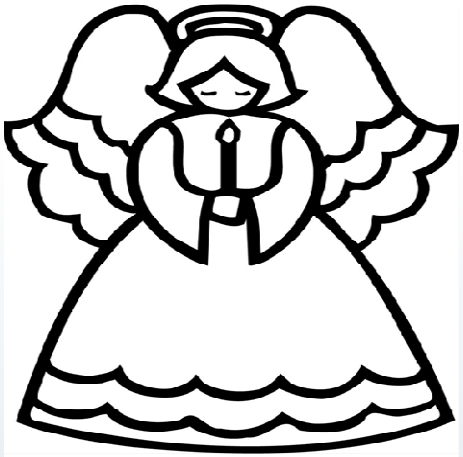
L. pneumophila; L. micdadei, L. bozemanii en L. dumoffii.

L. Longbeachae (Aus/NZl)

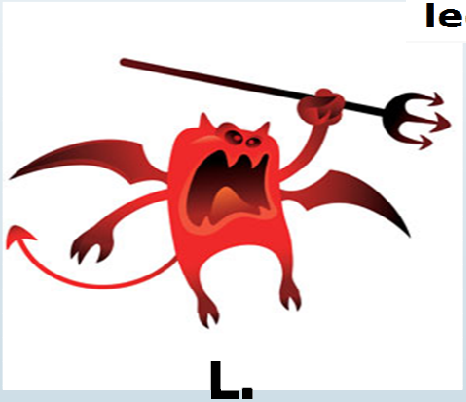
L. pneumophila is veroorzaker van meer dan 95% van gerapporteerde LD in Europa (ECDC)

Moeten we ons niet meer specifiek gaan richten op de risicovolle soorten/stammen?

Afweging tussen maatschappelijke kosten en risico's



Ongevaarlijke legionellasoorten



L. pneumophila

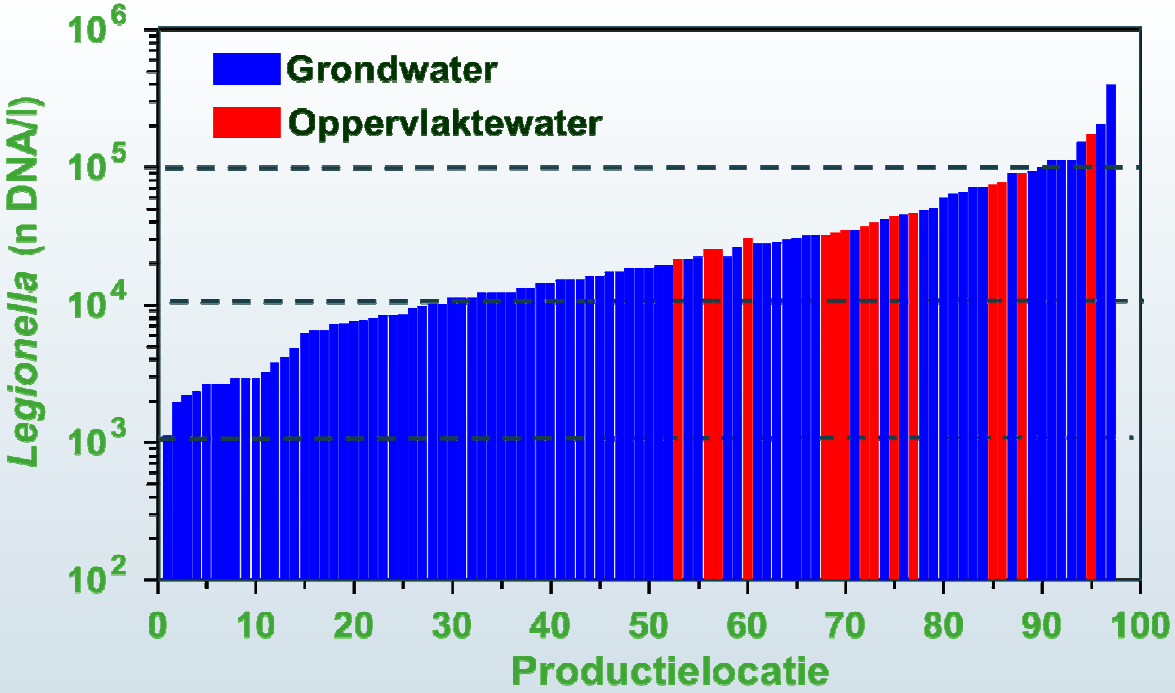
Legionella is overal

Zelfs in drinkwater(bronnen)

Reinwater van alle productielocatie in NL

Met qPCR voor *Legionella*; aantal DNA kopieën per liter

Dus kweekbare en niet-kweekbare *Legionella*'s



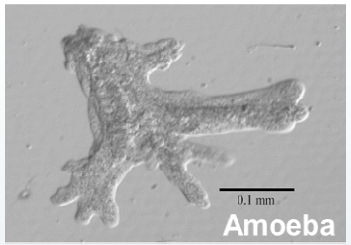
Legionella heeft biofilm nodig om te vermeerderen

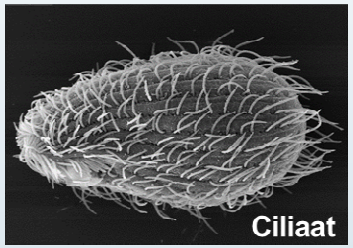
Onderbroken fagocytose

Legionella heeft gastheer nodig om zich te kunnen vermeerderen via onderbroken fagocytose

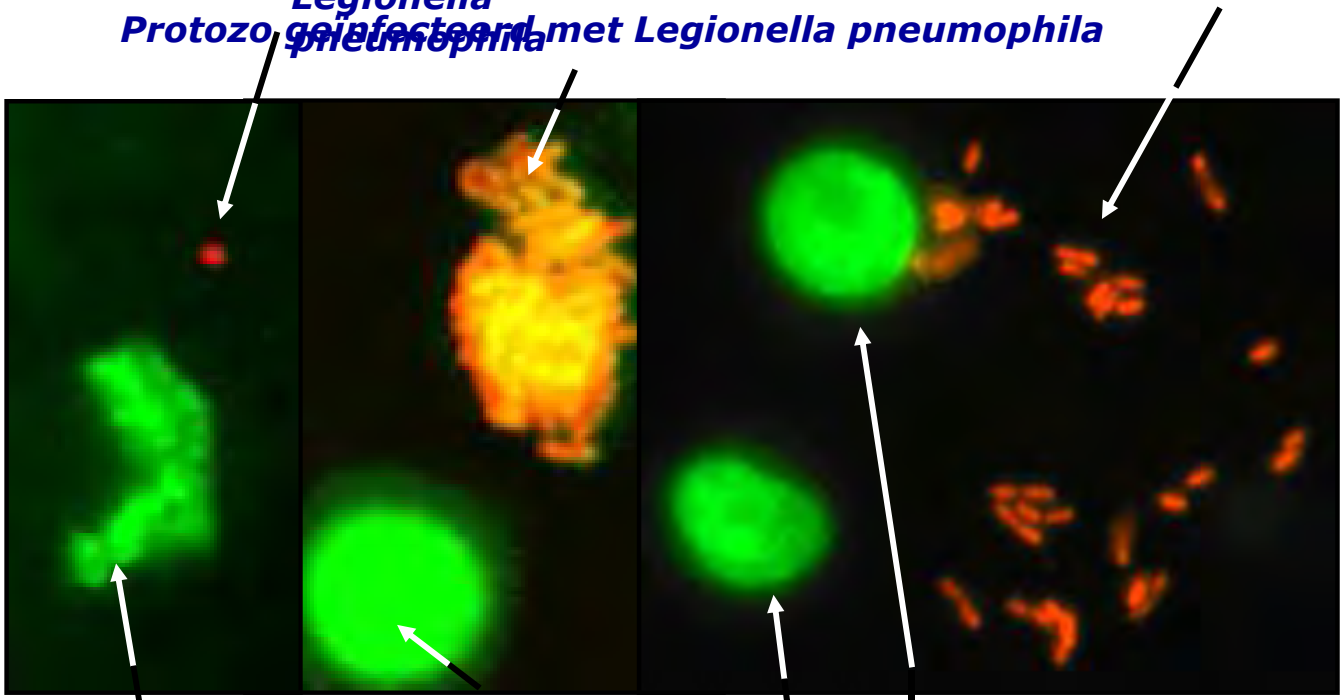
Gastheer zijn protozoa die grazen op de biofilm

Biofilm is een voorwaarde voor vermeerdering van Legionella





Interrupted Fagocytosis



Protozo: eencellig dierlijk organisme

Bron: PHD Research Melanie Kuiper

…en voor die biofilm is niet veel nodig

Legionella en relatie met biofilm

AOC = Assimileerbaar Organisch Koolstof

Ontwikkeling Boiler Biofilm Monitor bij KWR

- Boiler (30 liter): water van 70°C
- Mixen met koud water tot 38°C
- Periodiek flushen biofilm monitors (3 x per uur)
- Monitor enten met *L. pneumophila*

BVS = biofilmvormingssnelheid: pg ATP/cm^2/dag

BFP = Biofilmvormingspotentie: pg ATP/cm^2

LGP = Legionellagroeipotentie KVE/cm^2

…en voor die biofilm is niet veel nodig

Legionella en relatie met biofilm

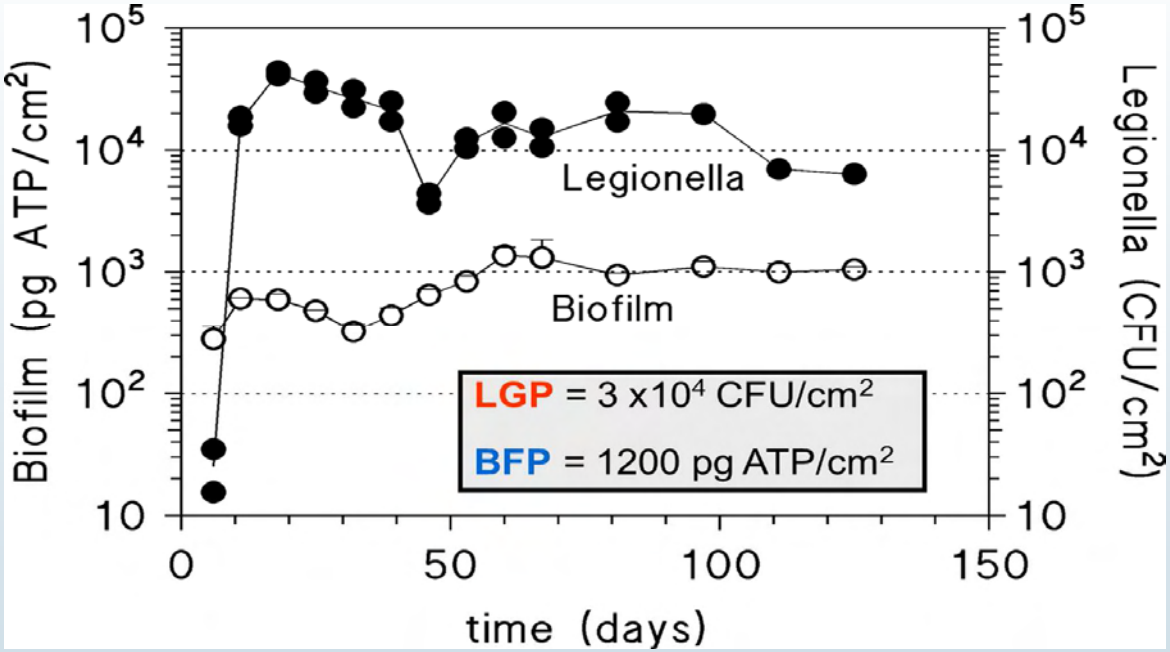
Drinkwater bereid uit zuurstofloos grondwater (veengrond)

AOC ~ 10 µg/l;

BVS > 10 pg ATP/cm2/dag

Legionellagroeipotentie

Biofilmvormingspotentie



…en voor die biofilm is niet veel nodig

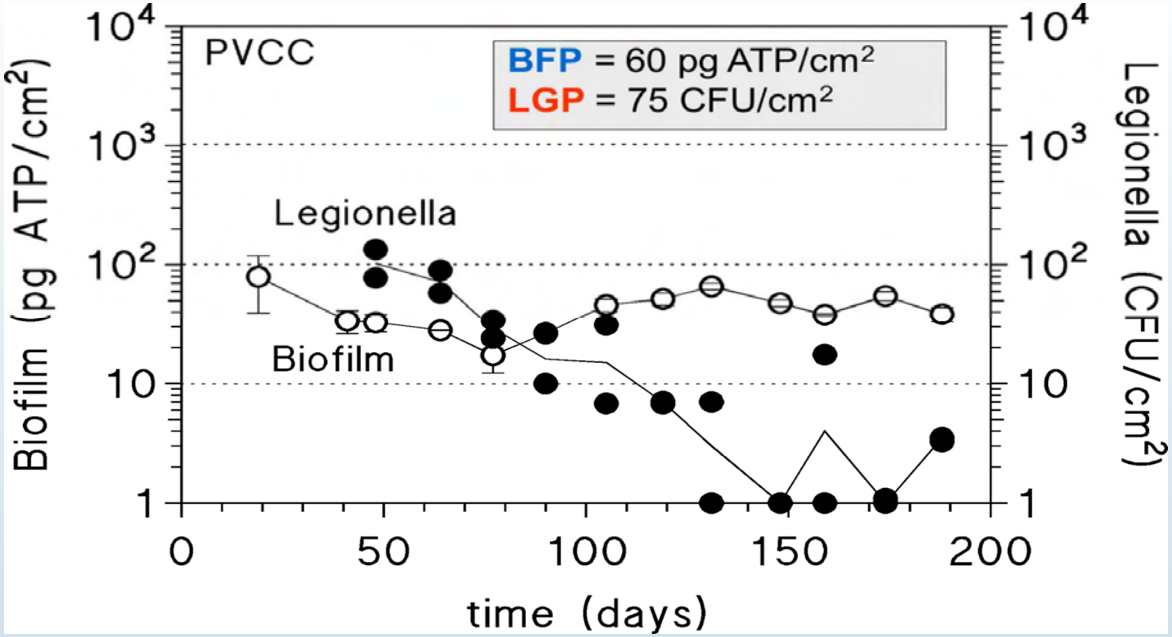
Legionella en relatie met biofilm

Drinkwater bereid uit zuurstofhoudend grondwater (zandgrond)

AOC < 1 µg/l;

BVS < 1 pg ATP/cm2/dag

Legionella pneumophila kan zich nauwelijks handhaven



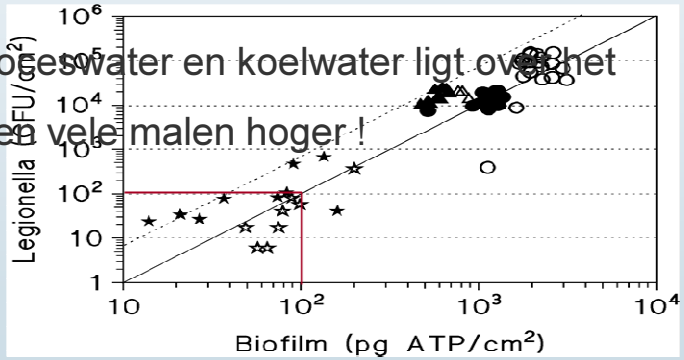
…en voor die biofilm is niet veel nodig

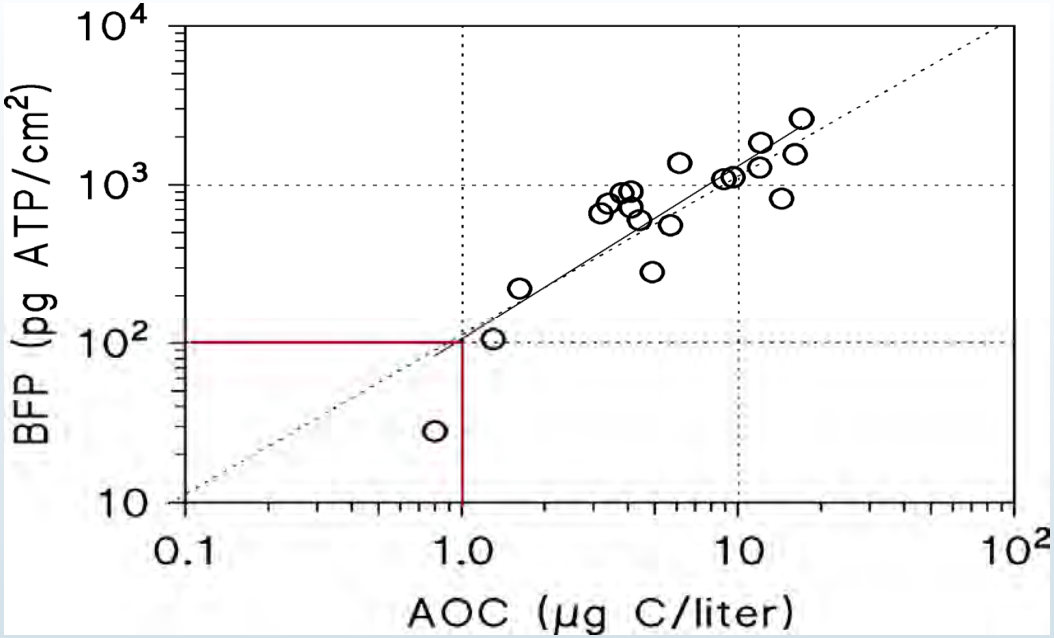
Legionella en relatie met biofilm

Grenswaarde AOC voor drinkwater waar *L. pneumophila* zich niet in vermeerdert: 1 µg C/l

Wordt bij slechts 10 tot 20% productielocaties voor drinkwater in Nederland bereikt!

AOC proceswater en koelwater ligt over het algemeen vele malen hoger !





Elke Legionellasoort vindt niche voor groei

Legionella en relatie met T

- Onderzoek naar voorkomen van Legionella in woningen (KWR, 2002); 400 woningen, in 16 woningen Legionella aangetroffen. In alle gevallen *Legionella anisa*.
- Onderzoek naar Legionella in gebouwgebonden koeltorens (KWR, 2009): in 34 % *Legionella pneumophila* aangetroffen (aselecte steekproef).
- Onderzoek Legionella in industriële koeltorens (KWR; 2009): in 72 % *Legionella pneumophila* aangetroffen (selectie van koeltorens).

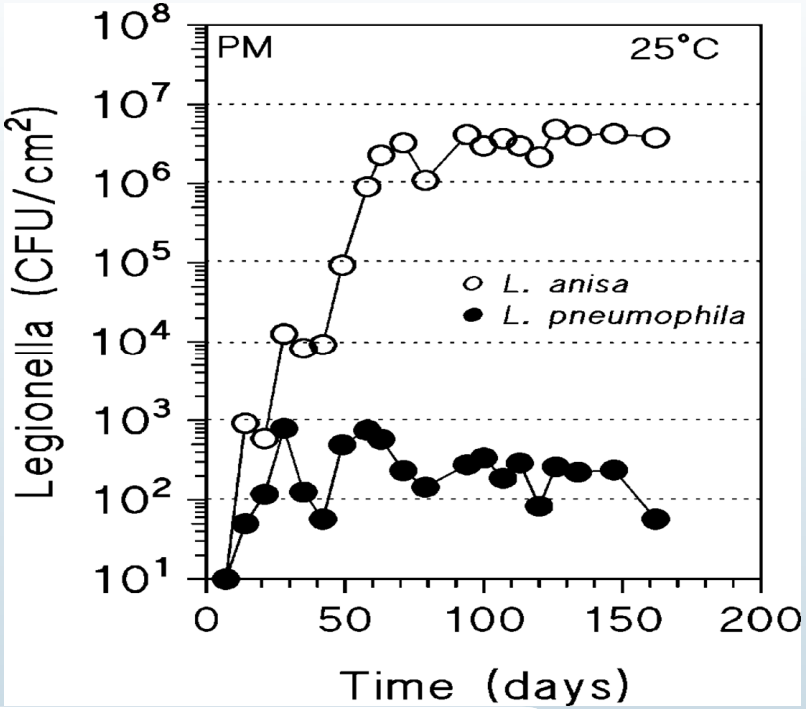
Hypothese op basis van onderzoek KWR met BBFM en PVC-P (zacht PVC ≡ vorming van een flinke biofilm, biofilm is geen beperking)

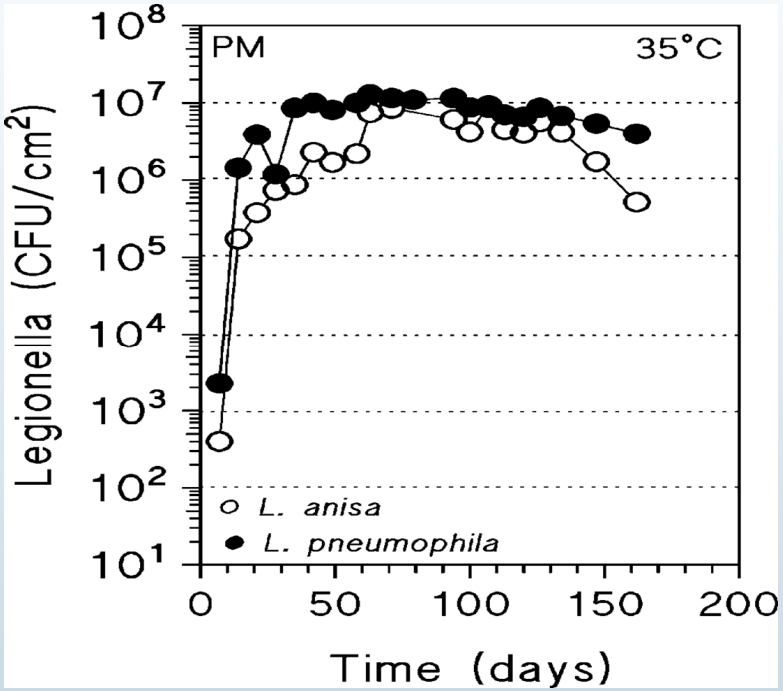
- *Legionella anisa* vooral daar waar koud water opwarmt (tot 25 - 30 °C)
- *Legionella pneumophila* geeft voorkeur aan hoge watertemperaturen (35 – 40 °C)

Elke Legionellasoort vindt niche voor groei

Legionella en relatie met T

Onderzoek: groei van *L. pneumophila* en *L. anisa* in biofilms bij 25 en 35 ºC

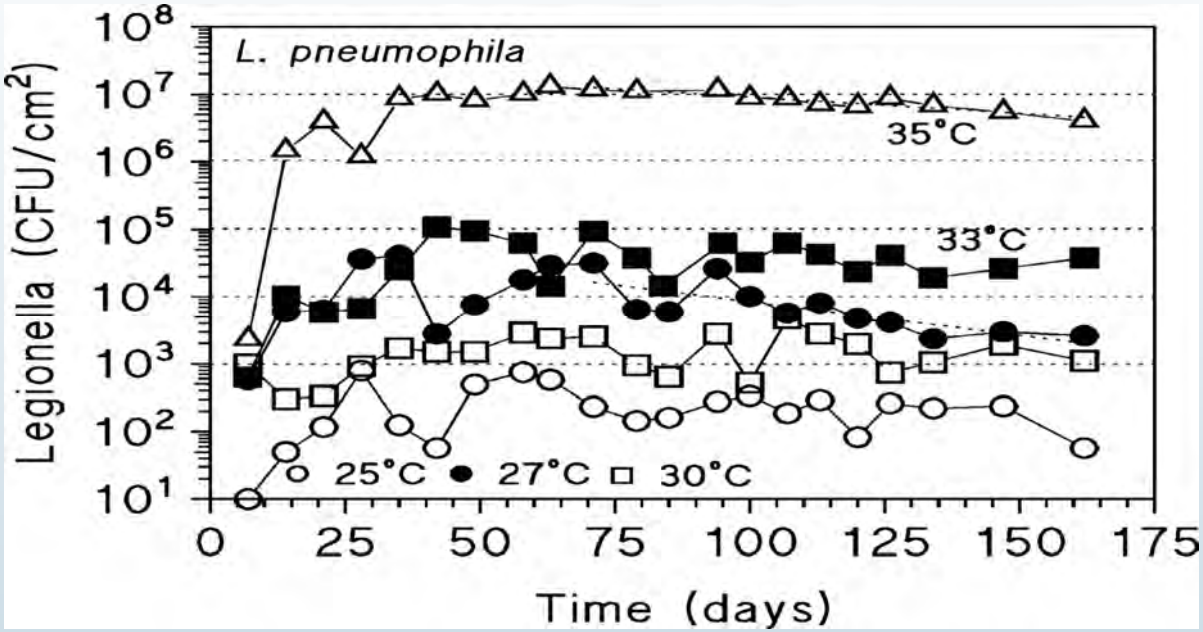




Elke Legionellasoort vindt niche voor groei

Legionella en relatie met T

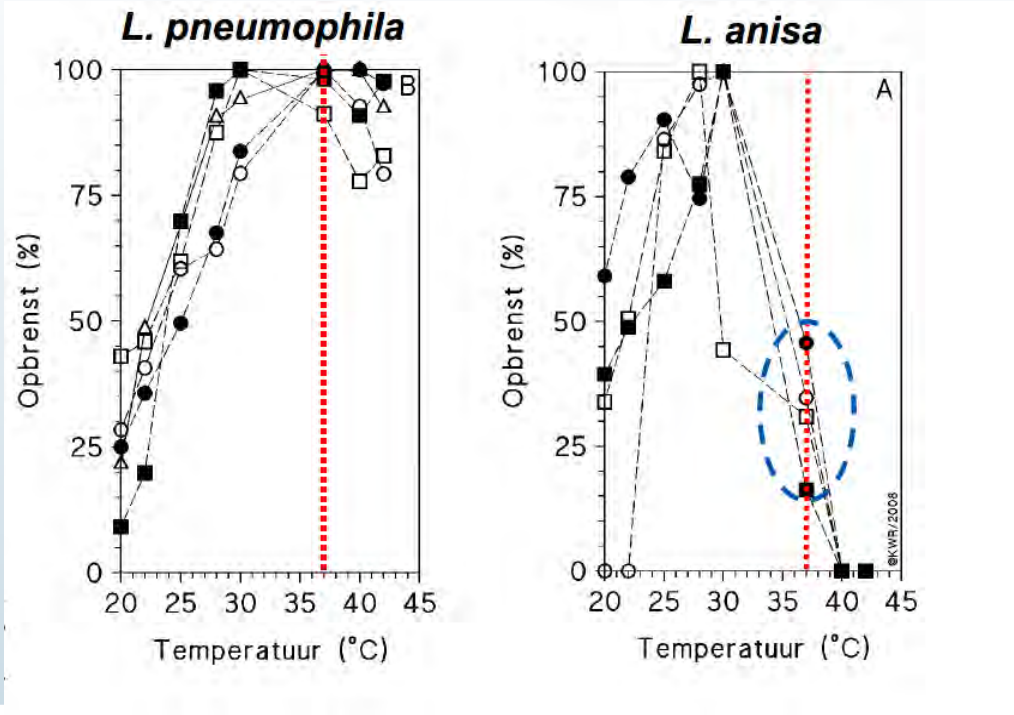
Invloed van temperatuur op groei van *L. pneumophila* in de biofilm op PVC-P



Elke Legionellasoort vindt niche voor groei

Legionella en relatie met T

Invloed van temperatuur op groei van *L. pneumophila en L. anisa* op BCYE-agar



Elke Legionellasoort vindt niche voor groei

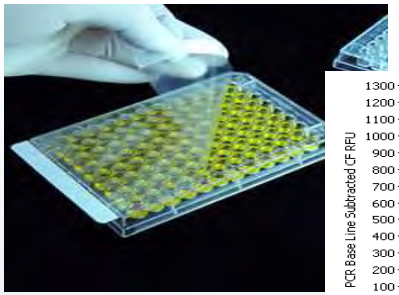
Legionella en relatie met T

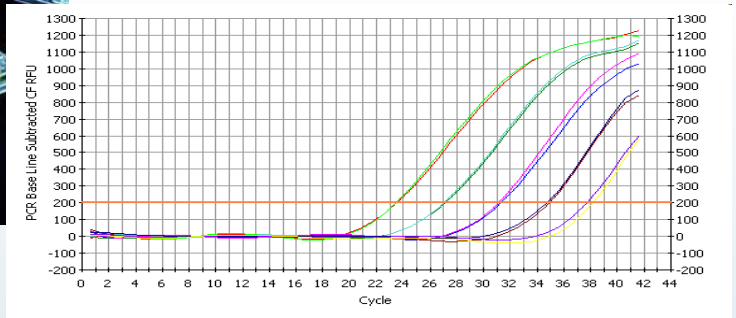
Waar zullen we *L. Pneumophila* vooral in verhoogde concentraties aantreffen?

- Whirlpools
- Mengwatersystemen op 38 ºC
- Koelwatersystemen
- Proceswatersystemen

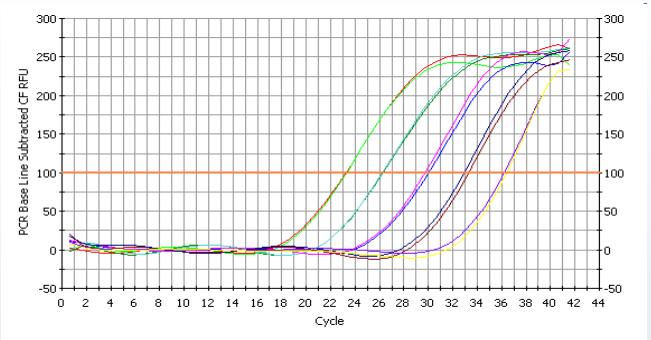
Detectie van Legionella

Real time - Polymerase chain reaction

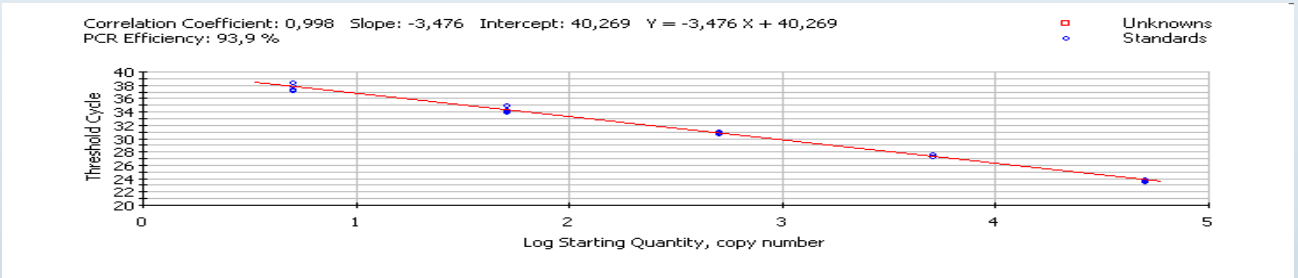




qPCR



Amplification curves *L. pneumophila* and Internal control



calibration line *L. pneumophila*

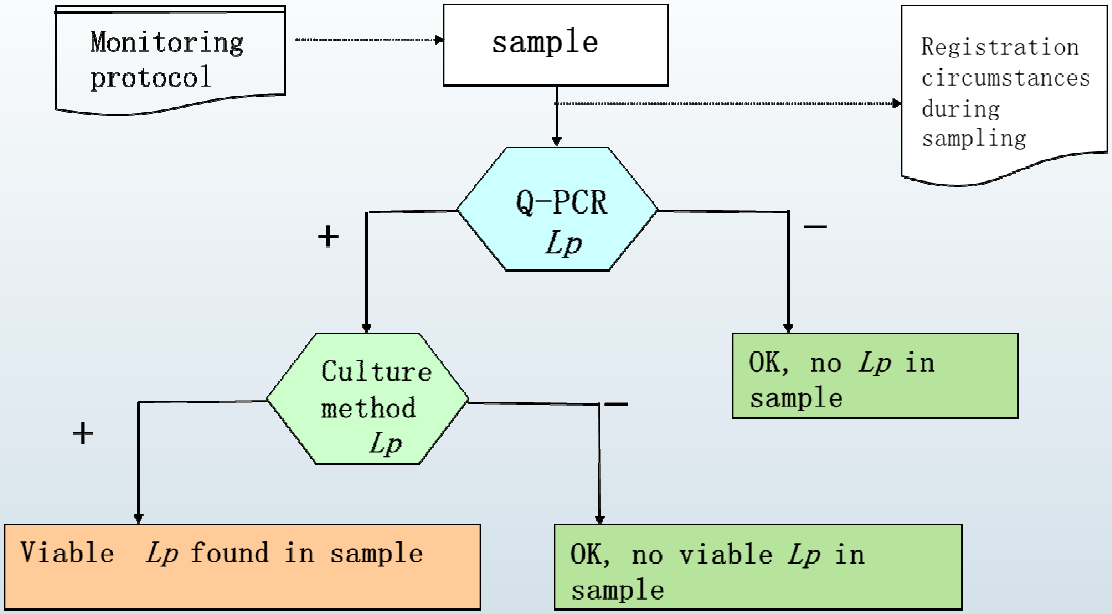
Detectie van Legionella

Nieuwe screening methode met Q-PCR

Methode ontwikkelt samen met de industrie in 2009

Methode beschikbaar bij laboratoria maar wordt nog weinig gebruikt

Methode mag bij koelwatersystemen worden toegepast. De regelgeving schrijft daar geen methode voor.



Conclusies
Stelling

- Toename van aantal legionellosegevallen
- Steeds meer toepassing van moleculaire detectietechnieken (SBT, WGS)
- Legionellabacteriën zijn overal
- Voor vermeerdering is een gastheer en dus biofilm noodzakelijk
- Een biofilm ontstaat al bij zeer lage AOC concentraties in het water
- *Legionella pneumophila* vindt niche voor groei bij hoge temperaturen en systemen waar die temperaturen langere tijd voorkomen
- Er is een specifieke detectiemethode voor *Legionella pneumophila*

Stelling: nu de technologie ons daartoe in staat stelt, zouden we ons meer moeten concentreren op detectie en bestrijding van de gevaarlijke legionellasoorten zodat we de risico's zo kosteneffectief mogelijk beperken.

Dank voor uw aandacht

Vragen ?