



Folkhälsomyndigheten

Miljöanalys av legionella

Ett kapitel i kunskapssammanställningen
Legionella i miljön – hantering av smittrisker

Januari 2015

Innehåll

Miljöanalys av legionella	2
Provtagning	2
När ska man ta prov?.....	2
Provtagning av olika vattentyper	2
Provtagning av tappvatten	4
Aktörer	5
Arbetsmiljöaspekter	5
Detektion av legionella.....	5
Odling	5
PCR.....	8
Snabbmetoder	8
Kvalitetssäkring och externa kontrollprogram	9
Typningsmetoder	9
Serologisk typning	9
Subtypning av <i>Legionella pneumophila</i>	10
Artbestämning med PCR och sekvensering av <i>mip</i> -genen.....	12
Sekvensbaserad typning.....	12
Helgenomsekvensering	13
Referenser	16

Miljöanalys av legionella

I detta avsnitt beskrivs provtagning och analys av legionella där hänsyn tas till särskilda aspekter på provtyp (vattentyp) och typ av vatteninstallation. Det allra viktigaste vid provtagning är i vilket syfte den görs och vad resultaten ska användas till. Provtagning och syfte diskuteras även i flera andra kapitel i rapporten.

Provtagning

När ska man ta prov?

Den kartläggning av förekomsten av legionella i svenska vattensystem som utfördes på 90-talet, visade att vart fjärde duschvattenprov innehöll legionellabakterier (1). När man beslutar om att göra en provtagning bör man därför känna till att legionellabakterier är relativt vanliga i tappvattensystemen och där tillväxtpotentialer finns. Den vetskapen kan samtidigt försvåra utvärderingen av analysresultaten. Behovet av att göra jämförande typningar kan öka när flera misstänkta smittkällor provtas. Det är också viktigt att ha en god kännedom om fastighetens vattenberedning och dokumentation om tidigare resultat.

Det kan finnas många olika anledningar till provtagning som gör att den behöver anpassas efter både frågeställningar och förväntningar samt efter hur resultatet ska användas och vem som är uppdragsgivare.

Provtagning kan exempelvis göras med anledning av:

- smittspårning vid misstänkta sjukdomsfall
- kontroll av vidtagna åtgärder
- egenkontroll enligt miljöbalken
- regelbunden kontroll inom sjukvården
- kartläggning av olika fastighetstyper
- klagomål på vattnets temperatur
- ny- och ombyggnation eller
- kontroll av förändrade beredningar och installationer för vatten.

Provtagning av olika vattentyper

Vi ger här förslag på hur provtagningen kan göras för de vanligaste vattenprovtyperna (se tabell 1). Förslagen bygger på vår erfarenhet och på vad som anges i andra handledningar och i litteraturen. Provets karaktär och förväntad halt av legionella påverkar hur mycket vatten som behöver provtas. Vidare kan en uppdragsgivare ställa krav på ett ackrediterat laboratorium att ha uppdaterade instruktioner för provtagningen. Hur provet ska tas och transporteras bör alltid stämmas av med det laboratorium som ska analysera proverna.

Tabell 1. Förslag på provtagning av olika provtyper för analys av legionella

Provtyp	Exempel på indikation	Provtagning
Inkommande kallvatten	Svårt få kallt vatten	Ur närmaste tappkran efter intag, spolat prov ^a 1000 ml. Upp till 10 liter föreslås i andra dokument.
Tappkallvatten ^b	Uppföljning vid smittspårning, efter åtgärd	Tappkran helst utan blandare, spolat prov ^a 500 ml. Nära UC ^c och längst ut på fastighetens ledningssystem.
Tappvarmvatten ^b	Uppföljning vid smittspårning, efter åtgärd	Tappkran helst utan blandare, spolat prov ^a 500ml. Flera provställen, nära UC ^c och längst ut på VVC ^d .
Duschvatten	Smittspårning och efter åtgärd	Ta prov i den sjukas bostad. Ospolat nattståndet vatten med termostaten inställd på medelvärme 37°C enligt brukaren, plus spolat vattena. Provmängd 500 ml.
Varmvattencirkulationen, VVC	Vid felsökning, efter åtgärd, vid ny- och ombyggnation	Prov på den samlade VVC-returen kan kompletteras med prov vid slingor på VVC. Ta 500 ml helst från injusteringsventil (STAD-ventil) med tappställe. Provtagning bör göras av personer med VVS ^e -kunskap och kännedom om systemet.
Kyltorn	Inför säsongstart, kvartalsvis löpande kontroll samt vid utbrott	Ta 500 ml prov från utloppet till den kalla bassängen efter urspolning av provkranen. Flera delar i systemet bör provtas vid utbrott och efter åtgärder.
Bioreningar	Kvartalsvis löpande kontroll	Ta 500 ml prov från luftningsbassängen nära utloppet. Provet kan skopas upp med rengjort kärl. Andra provpunkter som följer vattnets flöde kan tas vid utredningar. Bioslam provtas om risk för exponering finns (se jord och kompost nedan).
Bassänger	Smittspårning	Ta 500 ml prov vid utloppet. Vid utredningar komplettera t.ex. med prov från balanstank, skvalpräna eller backspolat filter.
Bubbelpool, SPA-bad	Smittspårning, regelbunden kontroll	Ta 500 ml prov ur bassängen eller poolen. Komplettera med svabbprov på insidan av luftslangarna och på balanstankens väggar.
Bubbelbadkar	Smittspårning	Fyll på med tappkallvatten till de lägre dysorna och sätt på cirkulationen. Låt gå 5 min och ta 500 ml prov på vattnet. Komplettera med svabbprov på insidan av luftslangarna och i dysorna.
Jord och kompost	Smittspårning	Ta ut delprov i ett större kärl eller på en presenning. Blanda provet och lägg i en fabriksren burk eller dubbla plastpåsar.
Befuktning, dimanläggningar, kondensvatten, sprinklers	Smittspårning	Tejpa fast en plastpåse över största delen av utloppet. Ta även ett prov på vattnet i eventuell behållare.
Fontäner	Smittspårning	Ta 500 ml prov ur fontänens bottenkar.
Tandläkarvatten	Smittspårning	Ta 100 ml prov på blästerstycket eller annat vattenförande instrument.

^a Spolat prov – efter 1–2 minuter eller till jämn vattentemperatur.

^b Provtagning i tappvattensystem beskrivs i mer detalj i texten.

^c UC=undercentral.

^d VVC=varmvattencirkulation.

^e VVS= värme, ventilation och sanitet.

Dokumentationen av hur provtagningen utförts är också viktig för bedömningen av resultatet. Ibland bör provtagningen bara utföras av personer med god kännedom om aktuellt vattensystem, exempelvis när provpunkter på varmvattencirkulationen (VVC) provtas.

Provtagning av tappvatten

Tappvarmvatten och tappkallvatten ska om möjligt tas ur en tappkran utan blandare. Det finns sällan i våra vanliga hus och lägenheter eftersom de flesta VVS-armaturer numera har ett blandarhus. I både badkar och duschblandare och tvättställsblandare finns ett termostaterat blandarhus. Köksblandare är däremot inte termostaterade och endast försedda med ett mindre blandarhus. I tvätt- och städutrymmen installeras även blandare utan termostat och där kan även tappkranar förekomma för enbart kall- eller varmvatten. I blandarhuset blir vattnet ofta stående mellan tappningarna, vilket ger upphov till biofilm och organiska avsättningar. Detta kan försämra ventilernas funktioner och göra att vattnet läcker tillbaka in i ledningarna. Flera tappkranstillverkare har därför utfört tester av ingående material för att minimera legionellatillväxt och göra blandarhusen så små som möjligt.

Var provet bör tas är beroende på om det är en initial provtagning i samband med en smittspårning eller om det är en fortsatt undersökning av var legionellatillväxten sker.

Kompletterande provtagning kan göras på VVC vid felsökning eller som kontroll av åtgärder. I undercentralen kan prov tas på den samlade VVC-returen och ute i ledningsnätet på olika VVC-slingor, med separata cirkulationspumpar. Det blir då en kontroll på om cirkulationen är rätt inställd. Vattentemperaturen bör ligga på 50–55 °C på VVC. Vid lägre temperaturer finns det risk för lokal tillväxt av legionella. Provtagningen bör endast göras av speciella personer med god kännedom om det aktuella vattensystemet.

Även andra provpunkter på vattensystemet kan ge information om varmvattenberedningen vid felsökning, såsom ackumulatortankar, beredare, efter värmeväxlare och i städutrymmen där vattnet sällan används.

Prov på duschvatten tas både som ospolat och spolat vatten för att öka möjligheten att påvisa bakterierna. Man ställer in termostaten på blandaren på medelvärmegraden 37 °C. Det ospolade provet tas direkt ur duschen på ett nattståndet vatten. Därefter får vattnet spola igenom 1–2 minuter eller till en jämn temperatur uppnåtts och sedan tas ett nytt prov. Provvolymen bör vara minst 500 ml.

Övriga vatteninstallationer

En utförlig lista på installationer och industriella processer där man hittat legionella finns i kapitlet *Förekomst i miljö och olika vattensystem*. Provtagning bör ske efter kontakt med laboratoriet.

Aktörer

Se kapitlet *Inledning* för information om laboratorier och provtagare.

Arbetsmiljöaspekter

Vid provtagning av vatten för legionellaanalys kan det finnas risk för inandning av bakterierna. Om riskbedömningen visar att så är fallet kan det finnas anledning att använda ett andningsskydd med filter av klass 3, till exempel FFP3, som är en engångsfiltermask. Denna risk i samband med provtagning har särskilt uppmärksammats för provtagning av kyltorn, som en erfarenhet från utbrottet i Lidköping (se kapitlet *Utbrott och intressanta fall*). Men den kan även vara aktuell under miljökontorets arbete med provtagning i samband med smittspårningar. Bioreningsanläggningar med luftningsbassänger är ett annat exempel där andningsskydd bör användas.

Detektion av legionella

Odling av legionella är fortfarande den metod som anges som förstahandsval. Legionellabakterierna kan även förekomma i ett ”vilande” stadium i miljön men ändå vara infektiösa. Då kan bakterierna detekteras med andra metoder som PCR men inte odlas fram.

Odling

För odling av legionella i vatten- och miljöprov finns två varianter av standardmetoden, nämligen ISO 11731-1:1998 och ISO 11731-2:2004 *Water quality – Detection and enumeration of Legionella*^{1,2}. Den första kan användas för alla provtyper och den andra med direkt membranfiltrering används för vatten med låg halt av andra mikroorganismer. För närvarande (2015) pågår en revision där syftet är att slå ihop de två standarderna till en.

Beskrivningen nedan är huvudsakligen tagen från de nuvarande metoderna:

Förbehandling

I ett vatten- eller miljöprov finns ofta andra mikroorganismer som kan hämma eller genom sin dominans konkurrera ut legionellabakterien. För att minska antalet störande mikroorganismer görs en förbehandling med syrabuffert (HCl-KCl pH 2,2) under 5 minuter eller med värme (50 °C under 30 minuter i vattenbad) eller med en kombination av båda alternativen.

¹ http://www.iso.org/iso/home/store/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=19653

² http://www.iso.org/iso/catalogue/catalogue_tc/catalogue_detail.htm?csnumber=32326

Koncentrering

I de vanligaste provtyperna från tappvatten och bassänger är bakteriehalten låg och en koncentrering behövs. En bestämd volym av vattnet filtreras genom ett membranfilter (0,45 µm) i en filtertratt med applicerat vakuum. En syrabehandling görs direkt i filtertratten under 5 minuter. Börja alltid med den minsta volymen och filtrera varje provtyp med eller utan syrabehandling (S), till exempel 10 ml, 10 ml (S), 100 ml (S) och 250 ml (S).

Utodling

Filtret från de olika volymerna läggs på en agarplatta och inkuberas i 36 ± 2 °C under 7–10 dygn.

Ett basmedium BCYE som innehåller den för legionella nödvändiga aminosyran cystein och järnpyrofosfat togs fram av Edelstein redan 1981 (2). Olika varianter med tillsatser av antibiotika används och tillhandahålls av flera mediatillverkare. GVPC-agar innehåller glycin, vancomycin, polymyxin och cycloheximid medan MWY-agar innehåller anisomycin och bromtymolblått. BMPA-agar används främst inom klinisk mikrobiologi och innehåller cefamandole, polymyxin och anisomycin. Olika arter växer olika bra på substraten. *Legionella longbeachae* är svårödlad, och finns ofta i prov med hög halt av andra mikroorganismer. En färsk preparation av egentillverkad MWY agar är tipset för att påvisa den arten.

Avläsning

Den första avläsningen görs efter 3–5 dagar och sedan efter 7–10 dagar. Antalet typiska kolonier avräknas. Man anger också hur mycket bakgrundsväxt som finns, eftersom den kan verka hämmande på legionellabakterierna. Endast ett fåtal bakteriekolonier kan sprida ämnen ut i agarn och helt hämma utväxt av legionella. Legionellabakterier kan också vara känsliga för syrabehandlingen. Därför behöver man filtrera volymer utan syrabehandling som då kan ge en lägre detektionsgräns.

Verifiering

Renstryk görs av misstänkta kolonier som verifieras på BCYE-agar med och utan cystein. Vissa arter växer sämre vid närvaro av L-cystein som *L. oakridgensis* och *L. spiritensis*. De behöver L-cystein och järn vid primärisolering men har svagare växt vid vidare överföring till andra legionellamedier som innehåller aminosyran och bakterierna växer då bättre utan cystein. De arterna kan då lätt misstolkas för att inte vara en legionella.

Beräkning

Antalet bakterier beräknas och anges som antalet kolonibildande enheter per liter (cfu/l). De agarplattor där hämning eller syrakänslighet konstateras används inte vid beräkningen.

Vidaretypning

Vid odling får man fram bakterieisolat som kan typas vidare till skillnad mot vid PCR eller olika snabbmetoder. Detta är speciellt viktigt i samband med smittspårningar för att kunna jämföra patient- och miljöisolat och fastställa smittkällan. Isolat kan sparas i frys (-70 °C) under flera år.

Typning av legionellabakterierna görs oftast med latexagglutination och metoden MALDI-TOF används mer och mer på laboratorierna. En sekvensbaserad typning görs om det finns ett patientisolat för jämförelse med miljöisolat vid smittspårningar. Se *Typningsmetoder* nedan.

Prov från andra provtyper

Kyltorn och särskilt bioreningsanläggningar innehåller hög halt av organiskt material och höga halter av bakterier och bör istället spädas innan analys. En förbehandling görs av provet med syra eller värmebehandling eller en kombination av båda. Då värmebehandlas provet i vattenbad 50 °C under 30 minuter och provet får svalna. Därefter blandas lika delar av prov och syrabuffert som får verka under 5 min. Provet späds i flera 1/10 spädningar och ytspridning av 0,1 ml per spädning görs därefter direkt på flera agarplattor.

En kombination av membranfiltrering och ytspridning används vid provsättning av exempelvis kyltornsvatten. Sedan analyseras proven på samma sätt som ovan.

ISO 11731

Det reviderade metodförslaget av ISO 11731 består av följande moment. Bakterierna koncentreras genom att man filtrerar en bestämd volym genom ett membranfilter. Tre alternativa metoder anges för vidare utodling:

- Det första alternativet används för prov med förväntat låg halt av störande mikroorganismer. Provet filtreras och därefter görs en syrabehandling direkt i filtertratten och filtret läggs därefter direkt på en agarplatta för utodling.
- Det andra alternativet används för prov med förväntad hög halt av störande mikroorganismer. Provet filtreras och därefter läggs filtret i ett rör med glaskulor och en liten volym med buffert. Bakterierna skakas sedan loss från filtret i en skakapparat för rör. Syrabehandling och/eller värmebehandling kan därefter göras på koncentratet. Koncentraten späds 1/10 och utodling sker efter att 0,1 ml från varje spädning spridits ut på agarplattor från obehandlat, syrabehandlat och värmebehandlat prov. Koncentraten sparas i kyl och kan spädas vidare om primäravläsningen visat på mycket höga halter av legionella.
- I det tredje alternativet som används för prov med förväntat mycket höga halt av legionella görs ingen koncentration utan provet förbehandlas och spädes ut innan spridning på agarplattorna.

PCR

De flesta PCR-metoderna baseras på *mip*-genen för att detektera DNA från *L. pneumophila* och 16S RNA för att detektera DNA från *Legionella* species (spp.). Med PCR detekteras DNA från både levande och döda organismer vilket gör att en direkt jämförelse med odling är svår att göra.

Realtids-PCR är en metod som är vanlig inom klinisk mikrobiologi. Prov från miljön kan ofta innehålla hämmande substanser som gör att resultaten blir osäkra och svårtolkade. Omfattande kontroller behövs därför för att kunna säkerställa resultaten. Utprovning mellan laboratorier av en realtids-PCR för vatten som tagits fram i England är publicerad (3) och en teknisk specifikation som är avsedd för vatten är framtagen 2012, ISO/TS 12869³. Flera kommersiella legionellakit är också framtagna för realtids-PCR och Q-PCR, där Q-PCR gör det möjligt att kvantifiera mängden genetisk material. I kapitlet *Svenska och utländska studier* redogörs för några studier där man använt både PCR och odling.

Snabbmetoder

En kritik som framförts mot odlingsmetoden är att den är tidskrävande och att analyserna är beroende av kompetent personal och ett välutrustat laboratorium. Snabbmetoder utarbetas som komplement för att snabbare nå resultat och för att kunna analysera med mindre resurser. De olika teknikerna utarbetas och används för flera olika mikroorganismer men har även applicerats för detektion av legionella.

Nedan ges några exempel på snabbmetoder, utan att listan är heltäckande.

Se även <http://www.rapidmicrobiology.com> som uppdateras kontinuerligt.

FISH

FISH står för Fluorescent *in situ* hybridisation och innebär att man undersöker om ett specifikt DNA-fragment kan kopplas till eftersökt DNA från den bakterie man vill påvisa. Tester som bygger på hybridiseringstekniken utarbetades under 90-talet för olika agens. Tekniken utvecklades av en tysk forskargrupp (4) och finns nu kommersiellt tillgänglig för både *L. pneumophila* och ett 20-tal övriga arter som satts i samband med sjukdom⁴. Provet koncentreras genom ett 25 mm membranfilter som läggs på ett indränkt filterpapper och odlas under 3 dygn. Därefter görs hybridiseringen med fluorescein-inmärkt oligoprober (FISH) med olika färger för *L. pneumophila* och *L. species*. Kvantitativ avläsning sker två gånger i ett fluorescensmikroskop med ett filter för vardera färgen. En validering av metoden publicerades 2010 där resultatet stämde väl med odlingsmetoden (5).

³ ISO/TS 12869 - Detection and quantification of *Legionella* spp. and/or *Legionella pneumophila* by concentration and genic amplification by quantitative polymerase chain reaction (qPCR)

⁴ Scan VIT Legionella, Vermicon AG Munich. <http://www.vermicon.com/en/en/content/10/legionella-detection.html>

Immunokromotografiska tester

Immunokromotografiska tester detekterar *L. pneumophila* serogrupp (sg) 1 och sg 2–15 genom att en droppe vattenkoncentrat eller några kolonier från en renkultur sätts till en teststicka som ger ett markerat band när bakterierna finns närvarande. Dessa tester är inte utvärderade av Folkhälsomyndigheten, men återfinns på webben⁵.

Micro-array

Micro-array-tekniken uppfanns på 2000-talet och används främst inom klinisk forskning. I Holland har man utarbetat en kommersiell metod som använder micro-array-tekniken och säger sig kunna skilja mellan patogena och icke patogena legionellabakterier. Testen är inte allmänt tillgänglig utan företaget har valt att ha ett laboratorium per land som utför testen. En utvärdering av ett referenslaboratorium vore värdefullt att göra. Det pågår även forskning, framförallt i Holland, för att med hjälp av micro-array-teknik hitta markörer som skulle kunna användas för att visa om legionellaisolat kommer från miljön eller från en patient (6).

Kvalitetssäkring och externa kontrollprogram

För att säkerställa kvalitet i analys av legionella i vatten och miljöprover kan laboratorierna delta i så kallade externa kontrollprogram. ECDC har gett i uppdrag till PHE i England⁶ att ansvara för detta och skicka ut provmaterial till deltagande laboratorier. Efter mars 2015 ansvarar RIVM i Nederländerna för programmet.

Typningsmetoder

För att särskilja olika arter av legionella eller olika varianter av legionella inom en och samma art kan man använda olika metoder för så kallad typning. Typning kan göras med fenotypning som visar hur bakteriens egenskaper uttrycks, eller med genotypning där bakteriens arvs massa, DNA, tas fram och studeras vidare.

Serologisk typning

Vid serologisk typning används antikroppar mot strukturer på bakteriens yta. Serum med antikroppar (typningssera) är framtagna mot de vanligaste legionellaarterna som ger upphov till sjukdom och mot arter där man har påvisat mer än en serogrupp av arten. I de flesta laboratorietesten (färdiga ”kit”) används kommersiellt framtagna antikroppar men några större laboratorier framställer egna.

⁵ Legionella detection Kit, Accepta, Manchester UK; FastPath™, Nalco, Naperville, IL; VIRapid®, Vircell S.L Granada, Spain

⁶ Public Health England (PHE) Legionella isolation scheme for water
<https://www.gov.uk/government/publications/legionella-scheme-sample-schedule>

Bakteriens cellvägg består av lipopolysackarider som repeteras i ett mönster runt hela cellen. Antikropparna fäster till två sockermolekyler (disackarider) eller till ytproteiner som är mer eller mindre specifika. Polyklonala antikroppar framställs genom att immunisera kaniner med hela avdödade legionellabakterier vilket ger typningssera som kan bestå av flera olika antikroppar. Vissa polyklonala sera kan då ge korsreaktioner i flera serogrupper (sg) för ett och samma legionellaisolat, och ge typningssvaret *Legionella pneumophila* sg 1,4,8,10,13 eller en annan kombination som ger *L. pneumophila* sg 3,6. Dessa typningssvar är ovanliga numera, men förekommer i tidigare arbeten. Polyklonala sera kan renas vidare och kallas då faktorsera. Genom att blanda olika sera erhålls gruppsera som används i flera tester.

Med en annan teknik kan monoklonala antikroppar tas fram som endast ger en variant av antikroppar och därmed färre korsreaktioner.

Latexagglutination

Den vanligaste metoden som används vid serotypning av legionella är latexagglutination. Antikropparna har fästs till latexpartiklar och klumpar ihop sig med bakterierna till synliga aggregat (agglutination). Minst tre olika antikroppsblandningar används vid typningen:

- *Legionella pneumophila* serogrupp 1 – vanligast vid sjukdom
- *Legionella pneumophila* serogrupp 2–14 (alternativt 2–15) – vanligast i miljön, men kan också ge upphov till sjukdom
- *Legionella* species – gruppsera mot de 7 vanligaste arterna⁷ förutom *L. pneumophila* som kan ge sjukdom

Latexagglutination typar de vanligaste legionellaarterna, men är inte heltäckande. Om testen blir negativ men legionella ändå misstänks, kan typningen kompletteras med metoden MALDI-TOF eller artbestämning med PCR-typning av *mip*-genen (se nedan).

Subtypning av *Legionella pneumophila*

Dresdenpanelen

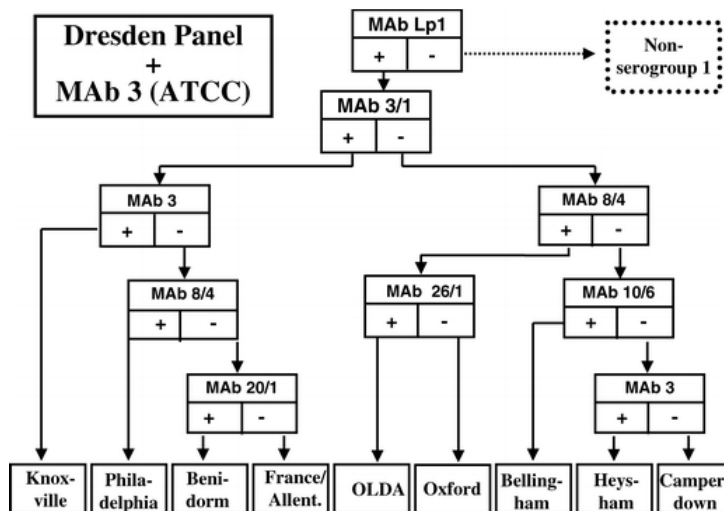
Subtypningen av *L. pneumophila* sg 1 kan göras med monoklonala antikroppar enligt Dresdenpanelen som togs fram 2002 av Helbig med flera (7) för att detektera en markör som kallas MAb 3/1 och som visar på en sjukdomsframkallande förmåga (virulens) hos legionellabakterien. De fyra undergrupperna Knoxville, Philadelphia, Benidorm och Allentown/France kallas Pontiacgruppen och är positiva för MAb 3/1, se figur 1 nedan. Pontiacgruppen, som inte ska förväxlas

⁷ *L. longbeachae* sg 1 och 2, *L. bozemanii* sg 1 och 2, *L. dumoffii*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. micdadei* och *L. anisa*.
<http://www.thermoscientific.com/content/tfs/en/product/oxid-dryspot-legionella-species-latex-test-kit.html#sthash.fisvp4ba.dpuf>

med Pontiacfeber, har förekommit vid de flesta större utbrott. De som saknar MAb 3/1 kan också ge upphov till sjukdom, men återfinns oftare vid sporadiska fall.

I litteraturen ses även en motsvarande markör, MAb 2 som togs fram redan 1986 av Joly med flera (8). MAb 2 förekommer oftare i amerikanska studier.

Figur 1. Flödesschema vid subtypning av *Legionella pneumophila* serogrupp 1 enligt Dresdenpanelen (7).



MALDI-TOF

Matrix-assisted-laser-desorption-ionisation time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS), baseras på en teknik som uppfanns av Hillenkamp och applicerades av Tanaka som belönades med Nobelpriset 2002⁸. Masspektrometri är en teknik som separerar molekyler baserat på deras förhållande mellan massa och laddning. I analysen av mikroorganismer separeras de vanligast förekommande proteinerna och för varje prov bildas ett spektrogram som fungerar som ett unikt fingeravtryck som jämförs i en databas, varvid olika arter kan identifieras.

MALDI-TOF används på nästan alla kliniska laboratorier i landet, för artbestämning av olika bakterier, svampar och i särskilda fall för detektion av antibiotikaresistens.

Folkhälsomyndigheten har en MALDI-TOF MS med en kommersiell databas från Bruker. Tekniken har använts i flera studier och även för artbestämning av *Legionella*. Metoden för artbestämning av *Legionella* är validerad och kvalitetssäkrad, och kan ersätta sekvensering av *mip*-genen för artidentifiering och är ett bra komplement när latexagglutinationen blir negativ. Metoden är väldigt

⁸ http://www.nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2002/

snabb och en artidentifiering är möjlig med endast 20 minuters provpreparation och analys till en låg materialkostnad.

Artbestämning med PCR och sekvensering av *mip*-genen.

Metoden togs ursprungligen fram av Ratcliff med flera 1998 (9). Med ett PCR-test riktat mot den legionellaspecifika *mip*-genen tas ett 700 baspar långt avsnitt av bakteriens DNA fram. En sekvensering görs och sekvenserna jämförs i ett nätbaserat program⁹. Arten anges och man tar fram ett släkttred där likhet med andra arter redovisas. Metoden kan också användas vid smittspårningar för jämförelse mellan patient- och miljöisolat, men MALDI-TOF MS används numera allt oftare för artbestämning.

Sekvensbaserad typning

Sekvensbaserad typning (SBT) används över hela världen för subtypning av isolat av *Legionella pneumophila* från både patient- och miljöprover. Det främsta användningsområdet är vid smittspårning. Isolat från patient och misstänkta källor kan då jämföras och tillsammans med epidemiologiska uppgifter kan smittkällan fastställas.

Metoden som togs fram av Gaia med flera 2005 (10) bygger på att sju olika geners alleler från bakteriens DNA amplifieras med PCR. De olika allelerna är: *flaA*, *piIE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA* och *neuA*. Metoden har kompletterats med en ny variant, *neuAh*, för att typa de *Legionella pneumophila* sg 1–14 som inte fungerar med *neuA*.(11).

De amplifierade allelerna analyseras därefter med sekvensering.

Nukleotidsekvenserna jämförs i en europeisk databas¹⁰ där varje ny sekvens får ett nytt nummer. En SBT-profil erhålls som anges som en sju-siffrig talserie med en siffra per allel, till exempel 1,4,3,1,1,1,1 som motsvarar sekvenstypen ST 1.

Databasen bygger på att olika laboratorier rapporterar in sina typningsresultat, vilket skapar ett register med samlade SBT-profiler. Ibland har inte den SBT-profil man erhållit rapporterats tidigare och efter kontroll av den databasansvarige blir det en ny sekvenstyp. Idag finns drygt 9 000 isolat och mer än 1 800 olika sekvenstyper inrapporterade i databasen från både människor och miljö.

Databasen kan även användas för att se hur pass vanligt förekommande en sekvenstyp är och få en geografisk uppfattning om var stammarna florerar, då man vid rapportering anger i vilket land och i vilken stad stammen har hittats. Antalet

⁹ Legionella species identification by *mip* similarity. http://bioinformatics.phe.org.uk/cgi-bin/legionella/mip/mip_id.cgi

¹⁰ *Legionella pneumophila* Sequence-Based Typing http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/legionella/legionella_sbt/php/sbt_homepage.php

inrapporterade isolat från miljön är dock mycket få jämfört med hur vanligt förekommande legionellabakterien är.

Den sekvensbaserade typningen sattes upp 2009 på dåvarande SMI och erbjuds sedan dess som en nationell typningsfunktion vid smittspårningar och utbrottsutredningar av Folkhälsomyndigheten. I kapitlet *Smittspårning – utredning av legionellafall och utbrott* beskrivs hur vi använt metoden i Sverige.

Helgenomsekvensering

Utvecklingen av analysinstrument sker snabbt och nu kan sekvensering av hela genomet göras på flera isolat samtidigt till en överkomlig kostnad. På Folkhälsomyndigheten finns den nya generationens instrument som är en Ion-Torrent Personal Genome Machine (PGM). Helgenomsekvensering analyserar drygt tre miljoner (3 000 000) baspar (bp)¹¹ medan SBT analyserar högst 3000 bp. Det blir då 1000 gånger högre upplösning med helgenomsekvensering jämfört med SBT.

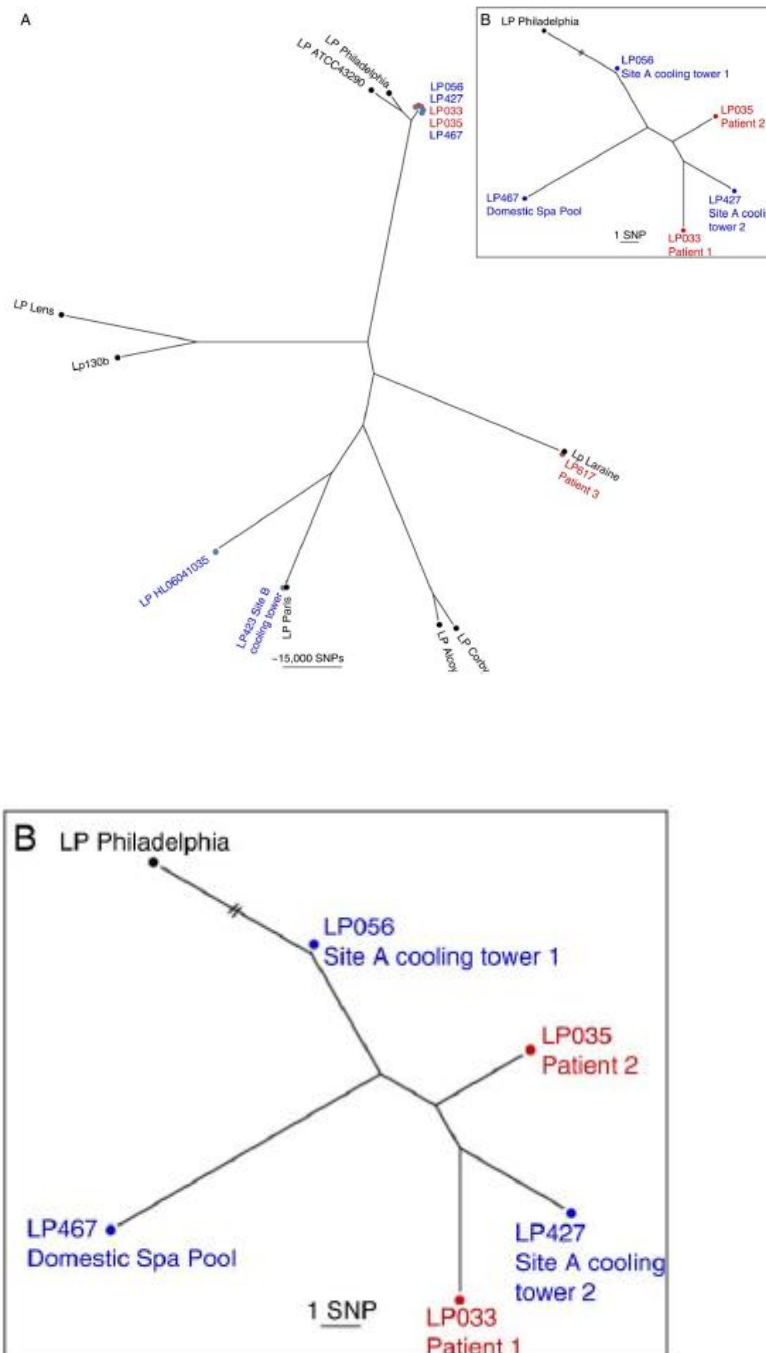
Internationellt används helgenomsekvensering i olika studier och utredningar av utbrott (12, 13).

Tillämpning av helgenomsekvensering

Den första helgenomsekvenseringen som gjordes av legionella i Sverige var av några isolat från Sundsvall. Frågeställningen var om det gick att skilja två misstänkta smittkällor åt. Isolaten från patienten och de två misstänkta smittkällorna hade gett samma sekvenstyp, ST 68. Det något oväntade resultatet blev att inget av isolaten var helt identiska och smittkällan kunde därför inte fastställas ens med denna sofistikerade metod. Den andra helgenomsekvenseringen som gjordes på myndigheten var från en patient som misstänktes vara smittad vid ett tandläkarbesök av vattnet i tandläkarstolen (14). Sekvenstypning hade visat på identitet mellan den bakterie som patienten hade och den som påvisats i vattnet och med helgenomsekvensering var det en total likhet i sekvenserna. Smittkällan kunde därmed fastställas.

¹¹ Ett baspar är hopparade nukleotider i en dubbelsträngad DNA molekyl. Längden på DNA anges i antal baspar (bp).

Figur 2. Fylogenetiskt träd som visar släktskap mellan olika stammar av *Legionella pneumophila* baserat på helgenomskevsenering (WGS). I bild A (överst) visas att stammar från det undersökta utbrottet skiljde sig från andra referensstammar och i bild B visas utbrottsstammarnas relativa likhet där isolat från patient 1 och 2 är närmast besläktade med isolat från kyltorn 2, som då kunde bedömas som den mest sannolika smittkällan (12). Patientisolat är markerade som röda och miljöisolat som blå, SNP = Single Nucleotide Polymorphism.



I England användes helgenomsekvensering (WGS) i en pilotstudie på sju isolat från ett tidigare utbrott för att bestämma om metoden kunde användas i ett skarpt läge i utredning av kommande utbrott. Sekvenserna jämfördes i en databas med en referensstam från Philadelphiautbrottet 1976 och åtta tidigare publicerade *Legionella pneumophila*-genom. Två patientisolat och tre miljöisolat från utbrottet var nära besläktade och skiljde sig från övriga isolat i databasen, se figur 2. Detta konfirmerade tidigare resultat där de hade fått samma sekvenstyp, ST 37. Författarna konkluderade att helgenomsekvensering är användbart under en utbrottsutredning, men säger också att sekvenstypning hade gett samma resultat i deras studie. Författarna påtalar behovet av en utveckling av automatisk dataanalys av sekvenserna och en utvärdering av kostnad och nytta jämfört med nuvarande typningsmetoder (12).

Referenser

1. Szewzyk R, Stenström TA. Kartläggning av förekomsten av legionella i svenska vattensystem: Statens råd för byggnadsforskning; 1993.
2. Edelstein PH. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *Journal of Clinical Microbiology* 1981;14(3):298-303.
3. Lee J, Lai S, Exner M, Lenz J, Gaia V, Casati S, et al. An international trial of quantitative PCR for monitoring Legionella in artificial water systems. *Journal of Applied Microbiology* 2011;110(4):1032-1044.
4. Manz W, Amann R, Szewzyk R, Szewzyk U, Stenström T-A, Hutzler P, et al. In situ identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy. *Microbiology* 1995;141(1):29-39.
5. Bargellini A, Marchesi I, Leoni E, Mansi A, Cristino S, Marcelloni A, et al. Inter-laboratory validation of a rapid assay for the detection and quantification of *Legionella* spp. in water samples. *Letters in Applied Microbiology* 2010;51(4):421-427.
6. Euser SM, Nagelkerke NJ, Schuren F, Jansen R, Den Boer JW. Genome Analysis of *Legionella pneumophila* Strains Using a Mixed-Genome Microarray. *PLoS one* 2012;7(10):e47437.
7. Helbig J, Bernander S, Pastoris MC, Etienne J, Gaia V, Lauwers S, et al. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 2002;21(10):710-716.
8. Joly JR, McKinney RM, Tobin JO, Bibb WF, Watkins ID, Ramsay D. Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies. *Journal of Clinical Microbiology* 1986;23(4):768-771.
9. Ratcliff RM, Lanser JA, Manning PA, Heuzenroeder MW. Sequence-Based Classification Scheme for the Genus *Legionella* Targeting the mip Gene. *Journal of Clinical Microbiology* 1998;36(6):1560-1567.
10. Gaia V, Fry NK, Afshar B, Lück PC, Meugnier H, Etienne J, et al. Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *Journal of Clinical Microbiology* 2005;43(5):2047-2052.
11. Mentasti M, Underwood A, Lück C, Kozak-Muiznieks N, Harrison T, Fry N. Extension of the *Legionella pneumophila* sequence-based typing scheme to include strains carrying a variant of the N-acetylneuraminase cytidyltransferase gene. *Clinical Microbiology and Infection* 2013.
12. Reuter S, Harrison TG, Köser CU, Ellington MJ, Smith GP, Parkhill J, et al. A pilot study of rapid whole-genome sequencing for the investigation of a Legionella outbreak. *BMJ open* 2013;3(1).
13. Underwood AP, Jones G, Mentasti M, Fry NK, Harrison TG. Comparison of the *Legionella pneumophila* population structure as determined by sequence-based typing and whole genome sequencing. *BMC microbiology* 2013;13(1):302.
14. Jernberg C, Schönning C, Löfdahl M, Andersson S, Klingenberg D, Pääjärvi A, et al. Establishment of a link between a patient with legionellosis and a dental unit. In: 2nd ESGLI congress, ESCMID study group for legionella infections; 2014 17-19 September, 2014; Barcelona; 2014.



Folkhälsomyndigheten

Solna Nobels väg 18, SE-171 82 Solna **Östersund** Forskarens väg 3, SE-831 40 Östersund.

www.folkhalsomyndigheten.se