



„Legionellen im Trinkwasser – wann ist es gefährlich?“

Fulda, BÄMI, 05.04.2014

Christian Lück

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

TU Dresden

Konsiliarlabor für Legionella des Robert Koch Instituts



Legionellen im Plattenbaugebiet Dresdner MOPO 4.2.2013



Legionellen bei der Gagfah

Sächsische Zeitung 22/23.03.2014

- 2013 bei
- 248 von 964 Anlagen (25,7%) war der technische Maßnahmewert überschritten.
- In einer Anlage
- erst 20 000/100ml
- nach termischer Desinfektion und „Reparaturen“ kurzfristig auf 6000/ 100ml gesunken
- Jetzt erneut 22 000/100ml
- Gagfah:
- „Wir unternehmen alles Nötige und Mögliche, um die Legionellenprobleme abzustellen“.
- „Wir sind auf die Mithilfe der Mieter angewiesen“.
(Wasserhähne benutzen).
„Sonst bleiben die Legionellen in den Leitungen“
- Gagfah hat Duschfilter eingebaut
- Duschverbot aufgehoben

Legionellen im Plattenbaubereich



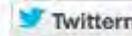
- Legionellen im Wasser
- Keine Erkrankungen
- Mieterin wollte Mietschulden „sparen“
- Durch technische Maßnahmen der Wohnungsgesellschaft Nachweisrate von ca. 30% auf 1% gesenkt
 - Nachweisgrenze 10/ 100ml

Sie sind hier: [Home](#) / [Region](#) / [Biberach/Ulm](#) / [Ulm](#) / Stadtnachrichten Ulm

Stadtnachrichten Ulm

weitere Beiträge

Fehler melden



Donaucenter kämpft noch immer gegen Legionellen



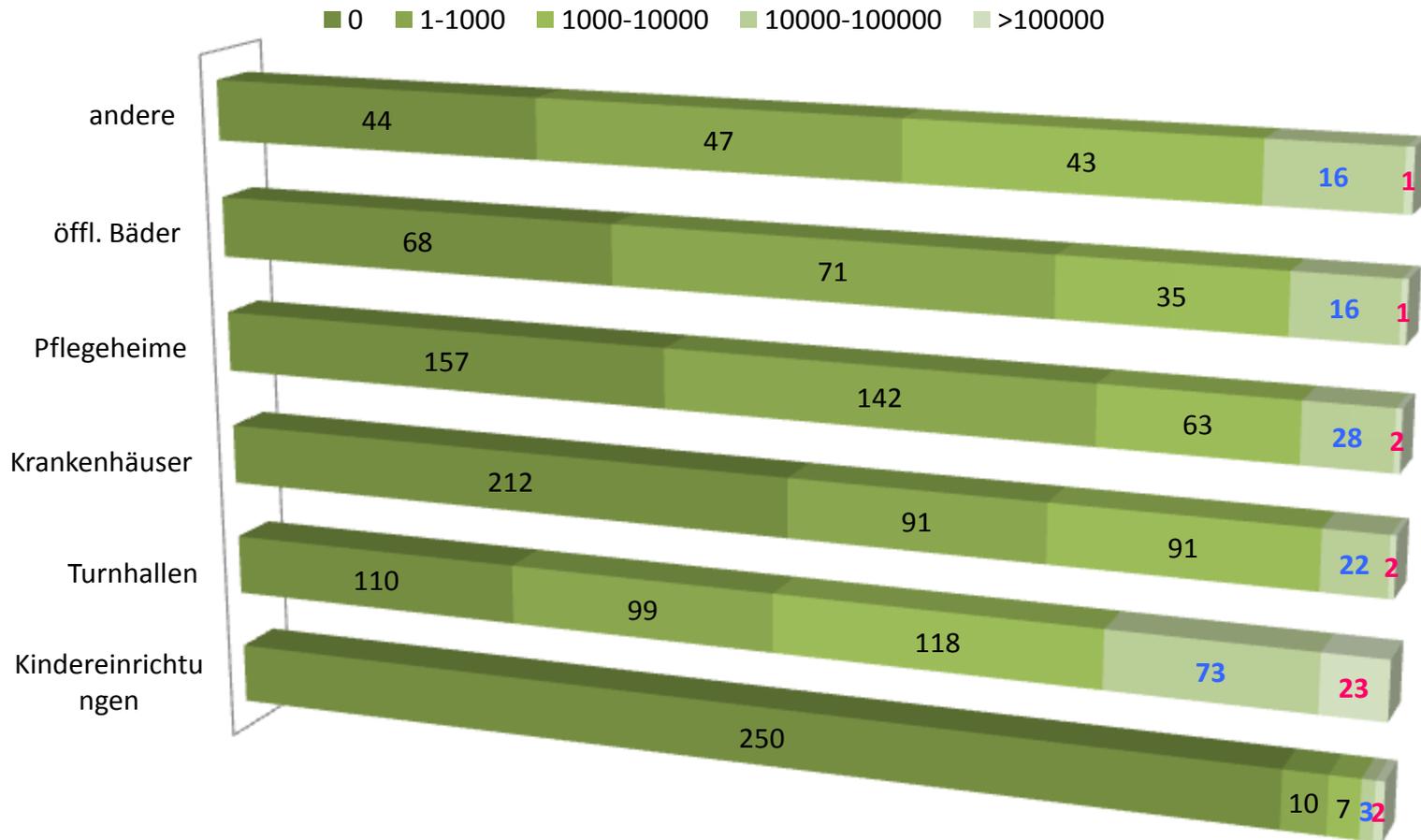
vom Ulmer Münster - Aussicht über Ulm - Donaucenter - Donaucenter Neu-Ulm (Foto: arc)

NEU-ULM / sz - Das Legionellen-Problem im Neu-Ulmer Donaucenter ist noch immer nicht gelöst. Seit Freitag versucht eine Spezialfirma, mit Hilfe eines starken Desinfektionsmittels das Wasserleitungssystem des Wohnkolosses am Donauufer von den gefährlichen Krankheitserregern zu säubern. Die rund 500 Bewohner des Hochhauses dürfen deshalb bis Montag weder duschen, noch sich mit Leitungswasser waschen oder damit kochen. Das Duschverbot besteht bereits seit mehreren Monaten. Die extrem hohe Belastung des Leitungswassers mit Legionellen wurde bereits im November 2012 festgestellt. Seitdem wird

nach einer Lösung für die Bewohner des knapp 40 Jahre alten Wohnkomplexes gesucht. Nach Angaben des Gesundheitsamtes darf das Desinfektionsmittel nicht mit menschlichen Schleimhäuten in Berührung kommen. Deshalb ist für die Bewohner Kochen, Duschen, Körperpflege und Zähneputzen mit Leitungswasser an diesem Wochenende tabu. Wie mehrfach berichtet, können Legionellen, wenn sie mit Wasserbläschen eingeatmet werden, die gefährliche Legionärskrankheit auslösen. Im Donaucenter wurde seit November aber kein solcher Krankheitsfall bekannt.

(Aktualisiert: 01.07.2013 04:09)

Vorkommen von Legionellen in Gebäuden KbE/



Legionella-Befall (retrograde Analyse von 76 000 Proben)

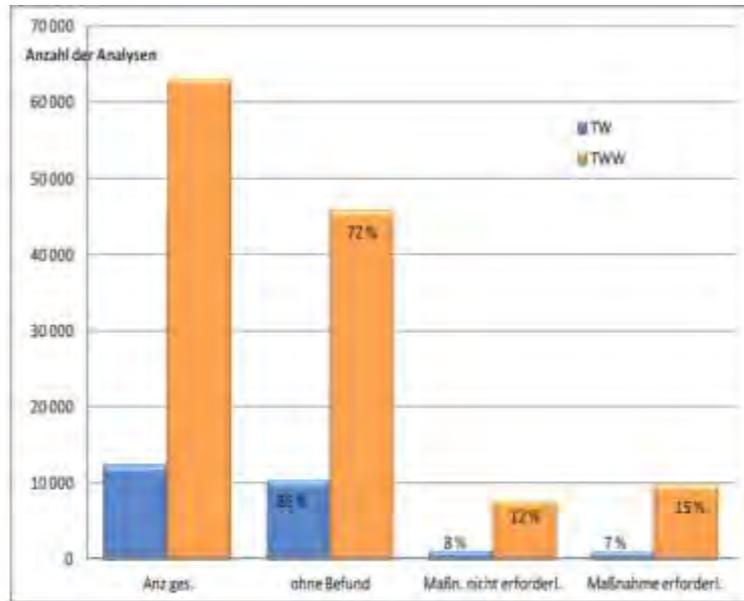


Abbildung 5-3: Statistik Legionellenbefall TW/TWW (Analysen)

Einzubeziehen waren bedingt verwendbare und verwendbare Datensätze, wobei eine Unterscheidung getroffen wurde hinsichtlich

Partner bzw. Institutionen:

IHPH Bonn Dr.Pleischl, Dr.Koch, Prof. Exner

Universität Münster, Prof. Mathys

Niedersächsisches LGA; Hannover Dr. Suchenwirth

Ing.-Büro für Trinkwasserhygiene

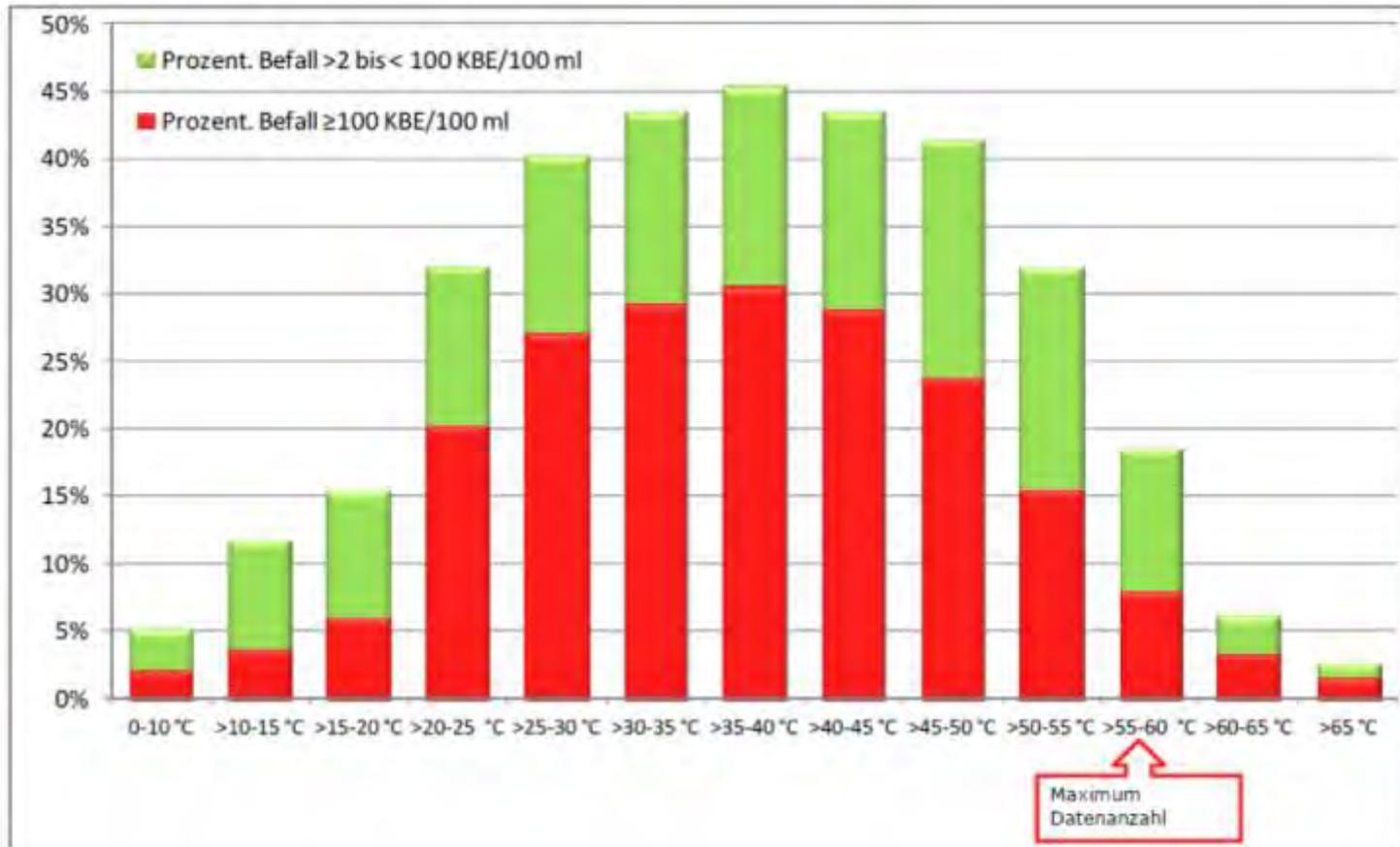
Waldmann, Rödermark, IBW-H –Herr Hentschel; GA Frankfurt, bundesweit agierender Krankenhausbetreibers

Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene Dresden

Hygieneinstitut des Ruhrgebietes Gelsenkirchen (DB Langer)

TUD Dr.-Ing. Rühling Fakultät Maschinenwesen Institut für Energietechnik

Legionella-Befall (retrograde Analyse von 76 000 Proben)



TUD Dr.-Ing. Rühling Fakultät Maschinenwesen Institut für Energietechnik

Legionella-Befall (retrograde Analyse von 76 000 Proben)

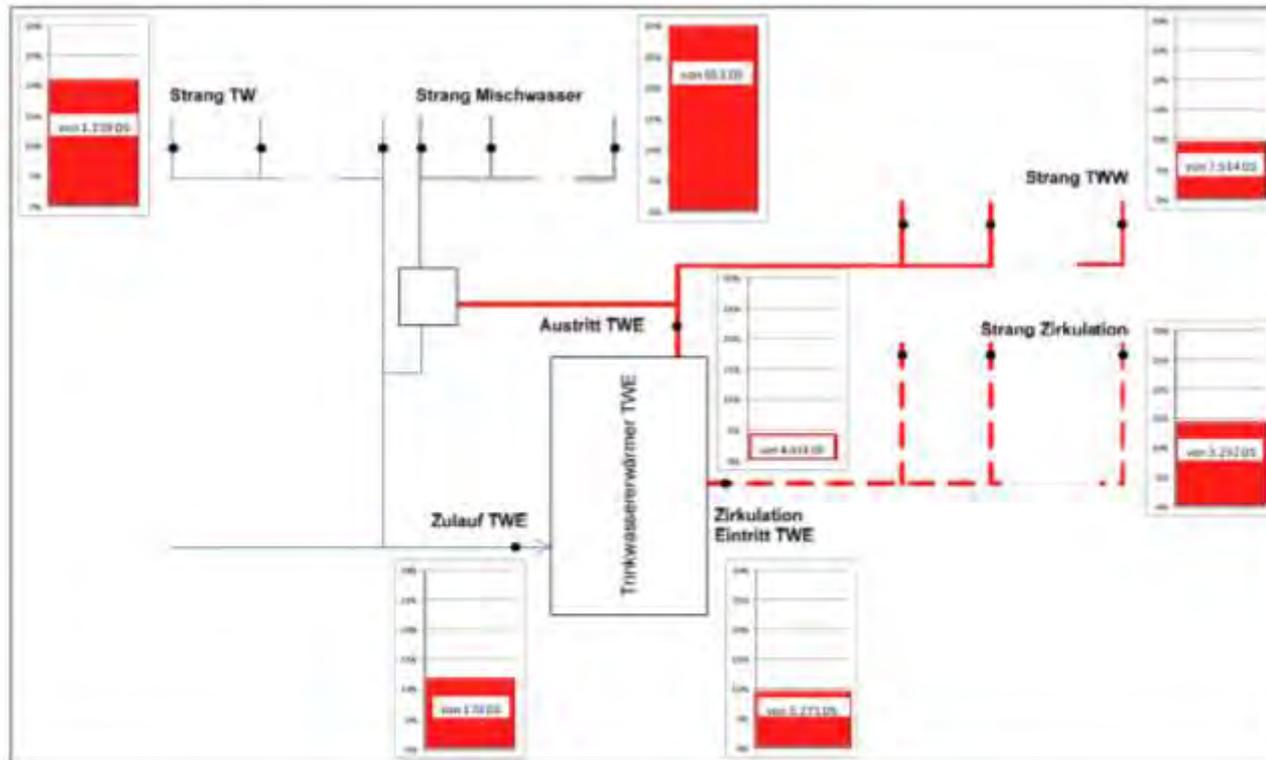


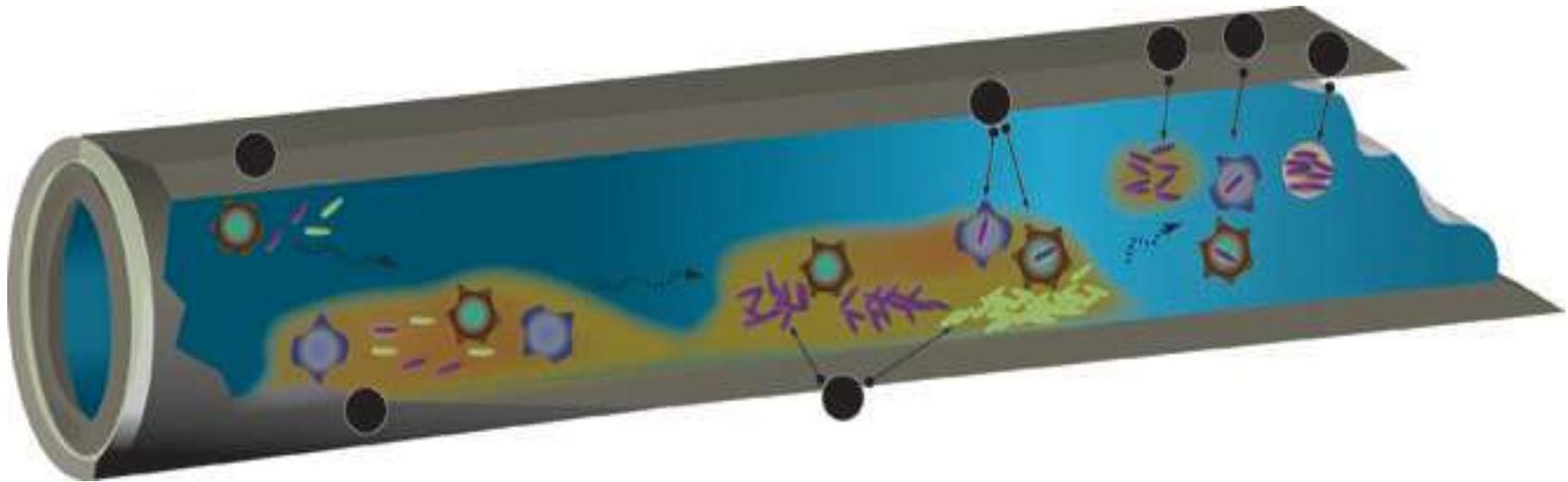
Abbildung 8-1: Übersicht zentrale und teilzentrale Kontamination systemische Kontamination (Gesamtanzahl Datensätze und K100-Anteile)

Dezentrale Kontamination

Environmental follow-up status by setting of infection, EU/EEA, 2011

Setting	n (environmental status known)	% investigation	% Legionella found when site investigated
Community-acquired	1,196	17%	39%
Domestic travel	163	23%	63%
Travel abroad	160	18%	41%
Healthcare associated	134	35%	86%
Other	54	48%	88%
Total	1,707	20%	51%

Biofilm

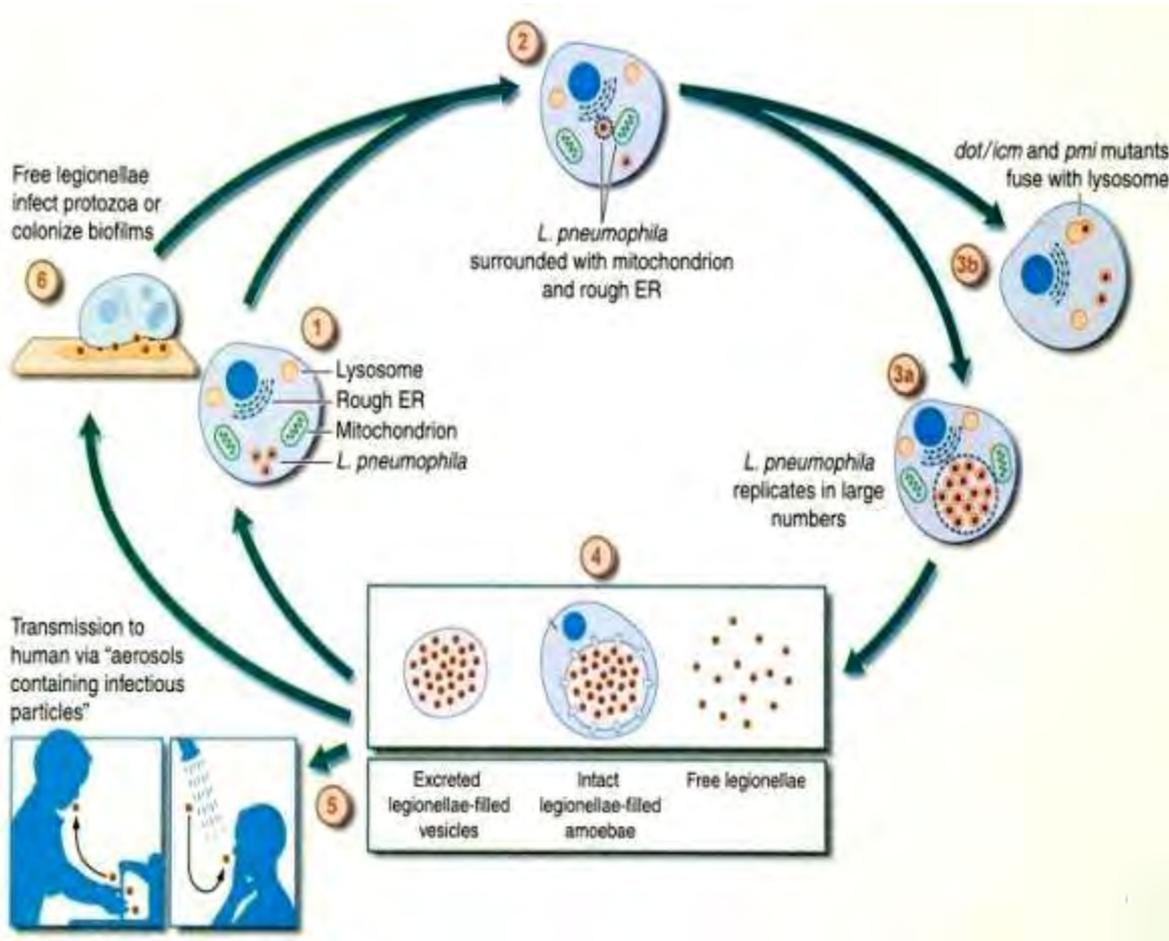


1. Eintrag aus Trinkwasserversorgung
2. Vermehrung auf Biofilm in Protozoen (Komplexes Ökosystem)
3. Freisetzen und mögliche Infektion

Amöben sind heimtückisch



Ökologie von Legionellen



AbuKwaik 2002

- Alle Legionellen müssen sich in der Umwelt vermehren
- Amöben bestimmen die Kolonisierung eines Endstranges
- Umweltresistenz
- 57 beschriebene Spezies
 - *L. pneumophila*
 - Serogruppe 1
 - MAb 3-1 positiv
 - *L. bozemanii*
 - *L. micdadei*
 - *L. longbeachae*

Pathogenität/ Virulenz

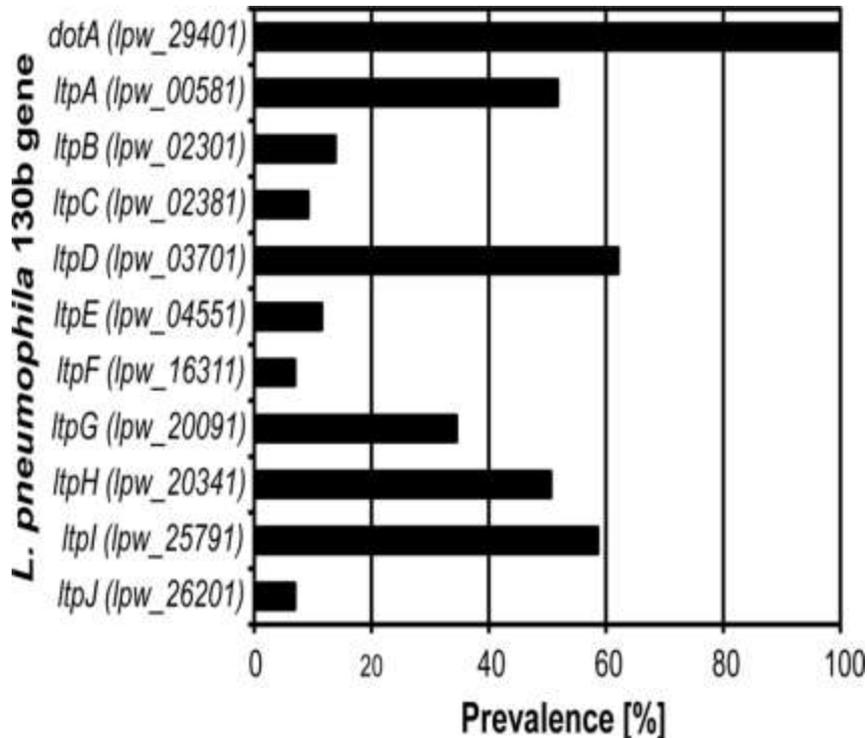
Bei manchen Bakterien ist die Ursache ihrer Pathogenität ganz offensichtlich



Andere haben ihre Virulenzfaktoren noch nicht preisgegeben



Distribution of the 10 novel Dot/Icm T4SS effectors in 87 *L. pneumophila* isolates



- analyzed for the presence of homologues of the novel *L. pneumophila* 130b effectors *ltpA* to *ltpJ* by PCR
- Class 1
 - formed by the rare effectors *ltpB*, *ltpC*, *ltpE*, *ltpF*, and *ltpJ*,
 - detected in <15% of strains
- Class 2
 - contains the more prevalent effectors *ltpA*, *ltpD*, *ltpG*, *ltpH*, and *ltpl*,
 - found in 34% to 62% of isolates

no correlation between the presence of the novel effectors and the clinical or environmental origin of the strains.

Infektionsdosis für Legionella-Pneumonien im Meerschweinchen Tiermodell

Infektionsroute	(KbE)	Ref
Aerogen (Phil) 12/12 Fieber Aerogen LD50 Intraperitoneal LD50	129 140 000 1 000 000	Berendt, 1980
Stamm Corby aerogen Stamm Corby 100% letal, aerogen Stamm Phil keine Letalität, aerogen	220 4 000 1 000 0000	Jepras, 1985
Stamm Corby, intratracheal, LD50 Stamm Corby, intraperitoneal, LD50 Stamm Phil, intratracheal, LD50 Stamm Phil, intraperitoneal, LD50	1000 3000 – 5000 n.t. 5 000 000	Lück, unpubl.

Extrazellulär gewachsene Bakterien KbE = Bakterienzahl

Legionella Diagnostik

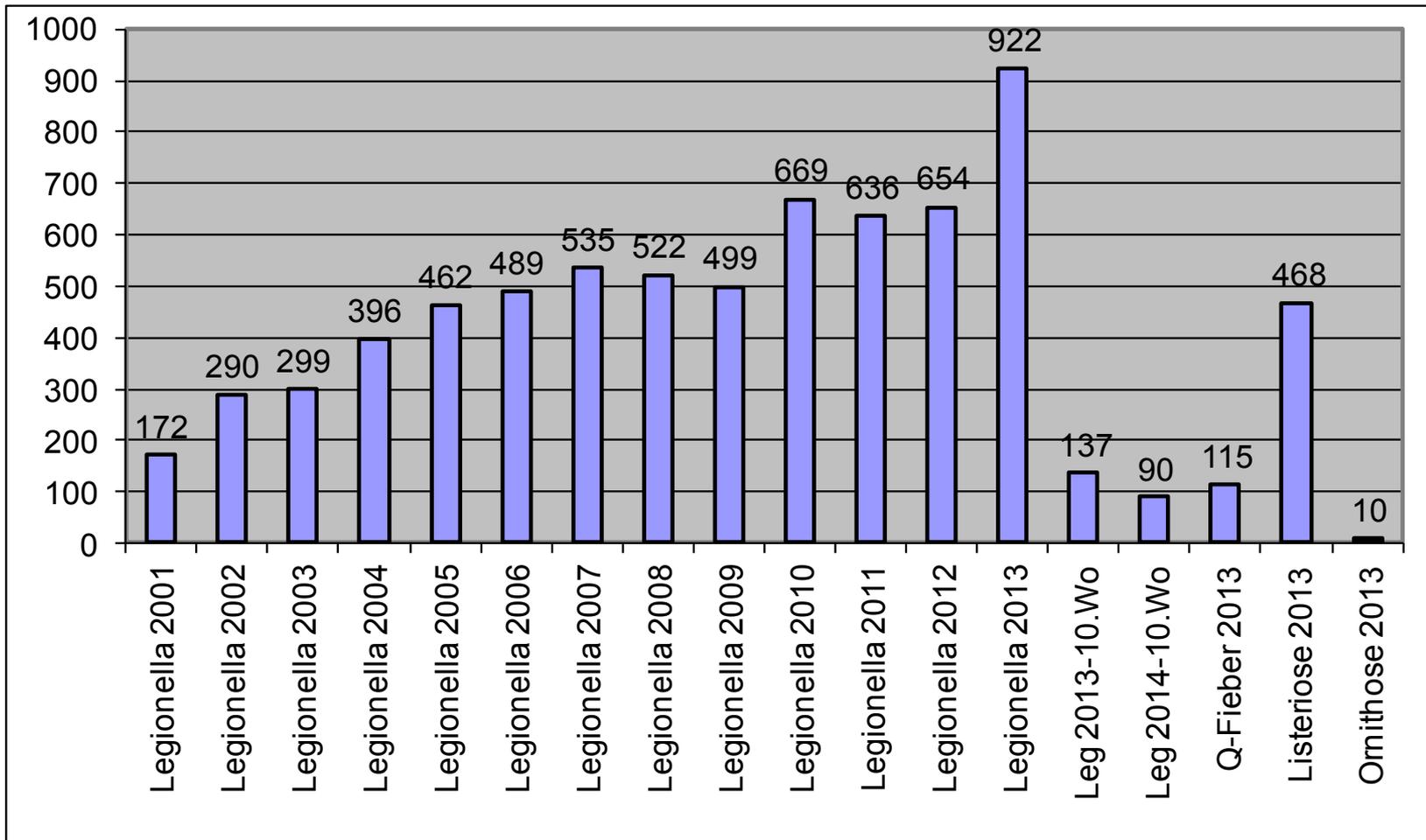
- **Kultur auf Spezialagar ,Sensitivität 10-70%**
- **Urinantigennachweis (nur L. pneumophila Sg 1)**
- **Real-time PCR (in respiratorischen Proben)**
 - alle Legionella species (16s rRNA, 5s rRNA, mip)
 - L. pneumophila 16S rRNA gene, *mip* gene
 - Sg1 LPS gene
 - clone specific Paris clone (IS elements)
- **Direktes Typisieren aus klinischen Proben**
- **SELTEN:**
 - **Antigennachweis im respiratorischen Material**
 - **Antikörpernachweis**

Legionellose Falldefinitionen RKI (Entwurf 2014)

Labordiagnostischer Nachweis

- **Erregerisolierung** nur aus Sekreten des Respirationstrakts (z.B. BAL, Trachealsekret, Sputum), Lungengewebe oder Pleuraflüssigkeit
- **Nukleinsäurenachweis** (z.B. PCR) nur aus resp. Material
- **Antigennachweis** nur im Urin (z.B. ELISA, Immunchromatographie),
- **indirekter (serologischer) Nachweis:**
 - Antikörpernachweis mittels IFT (▶ deutliche Änderung (Titeranstieg) zwischen zwei Proben)
 - Antikörpernachweis mittels IFT (einmalig ▶ **deutlich erhöhter Wert** nur für den Nachweis von *Legionella pneumophila* **Serogruppe 1**).
- Antigennachweis in Sekreten des Respirationstrakts und
- IgM- und IgG-Antikörpernachweise mittels ELISA (auch Kombination) gelten wegen bisher unzureichender Validierung nicht als labordiagnostischer Nachweis.
- **Epidemiologische Bestätigung:** Epidemiologischer Zusammenhang mit labordiagnostisch nachgewiesenen Infektion beim Menschen.
- **Bei Reise –Infektionen:** (Hotel, Campingplatz, Schiff etc.) exakten Reisedaten (Erkrankungsbeginn, Reisezeit, Hotelname mit Adresse etc.) erfassen.
- Daten werden über das RKI an das Europäischen Netzwerk ELDSnet übermittelt.
- Ermittlung von Hotels u. ä. als Infektionsquellen mit nachfolgenden Überwachungs- und ggf. Dekontaminationsmaßnahmen.

An RKI gemeldete Legionellosen (1.4.13)

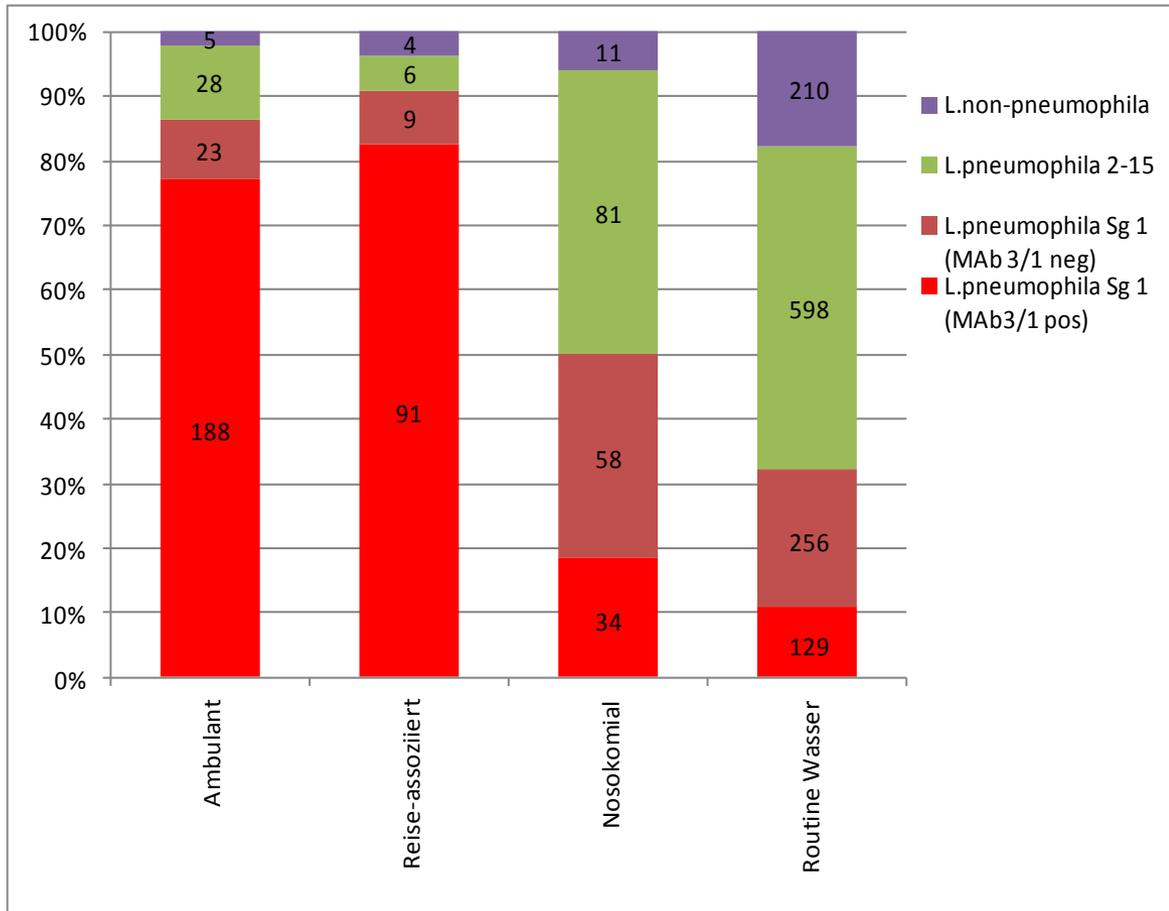


Infektionsquellen Legionella-Pneumonien

Häufig	Warmwassersysteme in der häuslichen Umgebung, in Hotels, Bädern, im Krankenhaus, etc.
	Rückkühlwerke mit „feuchter Kühlung“
	Whirl Pools
Selten	Thermalbäder,
	Befeuchter in Restaurants und Geschäften (Lebensmittel), Inhalatoren
	Zimmer-/ Zierspringbrunnen,
Sehr selten	Geburtswannen
	Magenspülsonde/ Transoesophageale Echo-Sonde (Leitungswasser)
	Wundinfektionen nach Baden, Eismaschinen
	Dentaleinheiten
	Strassenbefeuchtungsmaschinen
	Scheibenwischernanlage ,
	Gartenerde (<i>L. longbeachae</i>) Autowaschanlagen,
(noch) nicht:	Gewächshäuser

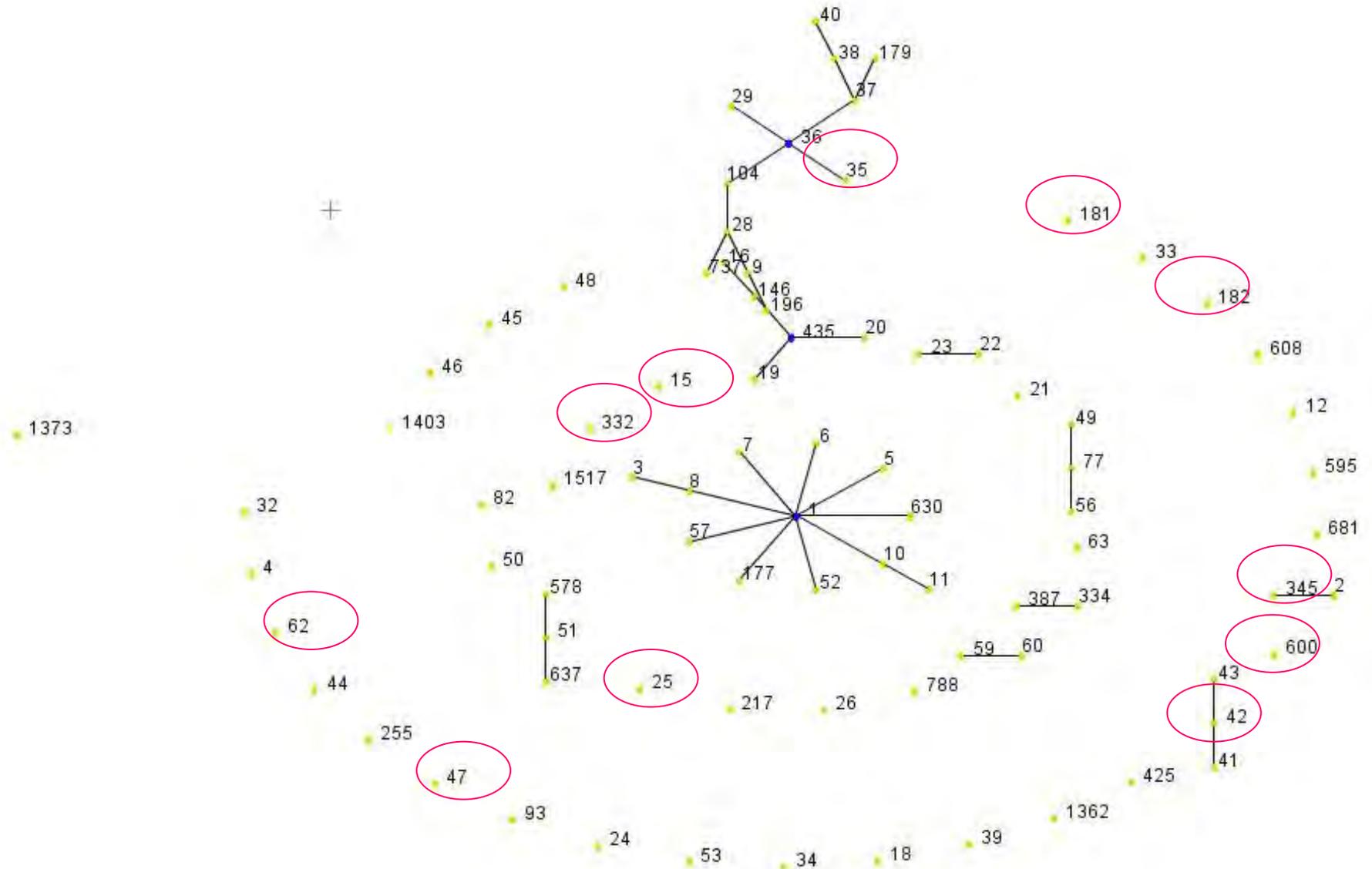


Serologische Typisierung - Legionella-Isolate (nach Ursprung) 1986-2013



- Mab 3-1 positive Stämme sind virulenter
- Molekulare Basis nicht komplett verstanden
- Hydrophobes LPS = bessere Übertragung
- Ausbruchs-Stämme sind MAb2 (3-1) positiv

E-burst Patientenisolate



Verteilung von ST (Klonen)

EWGLI Database

(Stand 3.10.2013)

5071 Klinische/

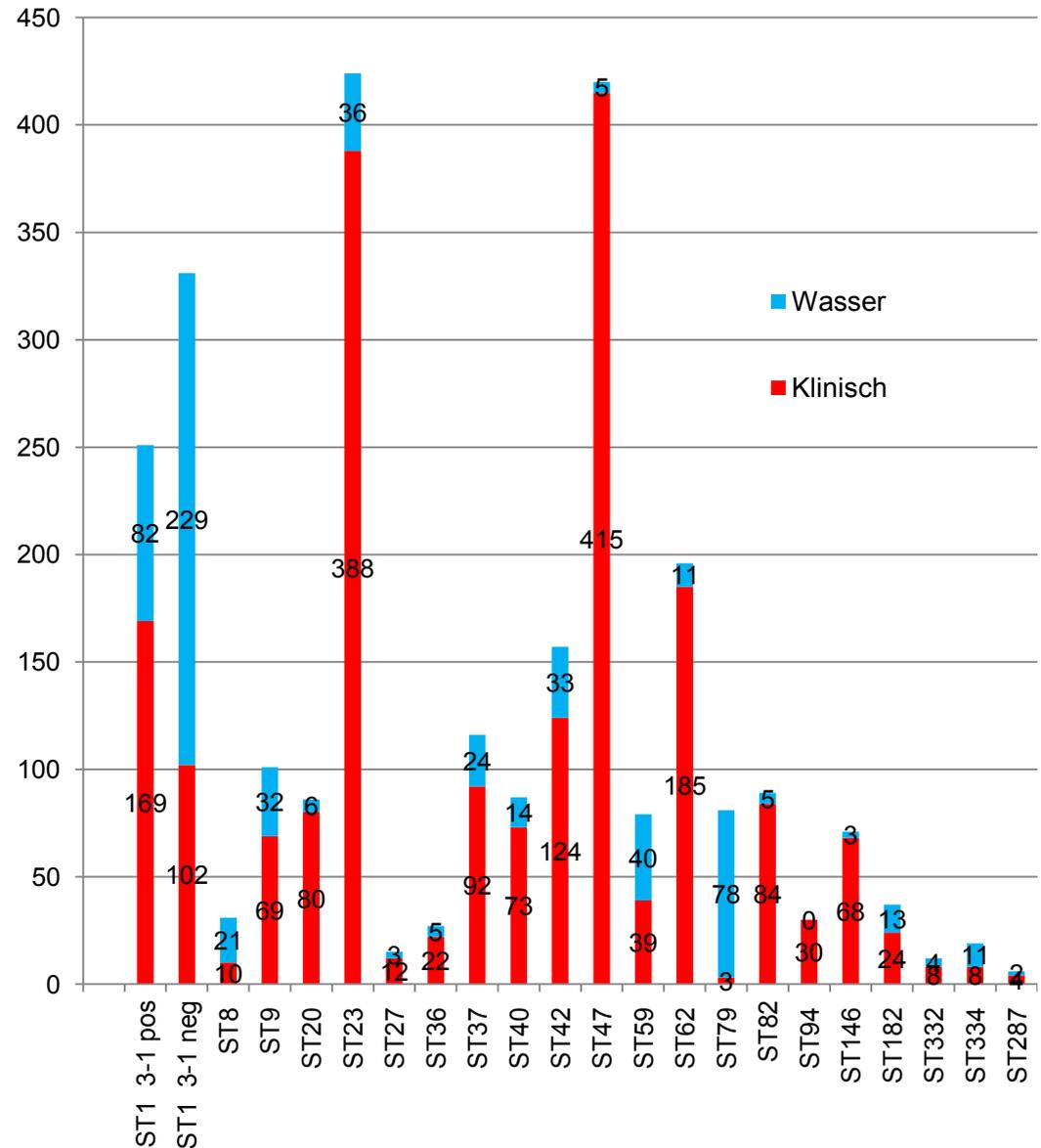
2706 Wasser Isolates

1577 ST

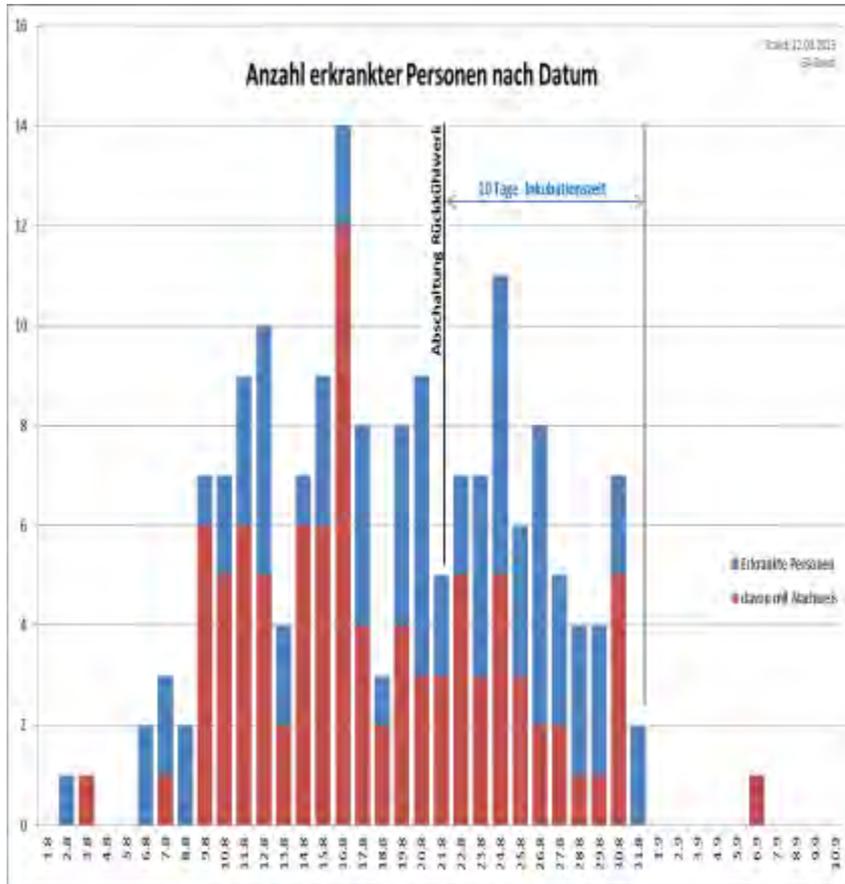
45% der Erkrankungen
durch 6 Klone:

Lokale Klone: ST182, 332,
334

“Unique” Klone können
Erkrankungen /Ausbrüche
verursachen



Ausbruch Warstein GA Soest



- 160 Pneumoniefälle vom 1. August bis 6. September (bestätigt)
- 2 (3) Todesfälle.
- Klinische Isolate von 7 Patienten:
- *L. pneumophila*, Serogruppe 1, Mab Subtyp Knoxville, ST 345 (selten)
- Dieser Epidemiestamm wurde gefunden
 - 2 RKW von 2 Firmen
 - Klärwerk weiteren Umweltquellen.
- Nur ca. 10% der Wasser-Isolate
- **Ein Mitarbeiter** einer Firma erkrankt

(1) Empfehlungen für die Durchführung einer Gefährdungsanalyse gemäß Trinkwasserverordnung (UBA 14.12.2012)

- Mit der Neuregelung durch die „Zweite Verordnung zur Änderung der Trinkwasserverordnung“ werden die Pflichten des UsI („Unternehmer oder sonstiger Inhaber“) bei Überschreitung des technischen **Maßnahmewertes** für Legionellen festgelegt.
- 100KbE Legionellen/ 100ml
- Dabei ist gemäß § 16 Absatz 7 Nummer 2 TrinkwV 2001 die Erstellung einer Gefährdungsanalyse obligatorisch.
- Für besondere Risikogruppen oder spezielle Einrichtungen wie z. B. Krankenhäuser können über die hier beschriebenen Maßnahmen zur Sicherstellung der Trinkwasserhygiene hinausgehende Anforderungen der Krankenhaushygiene notwendig sein.
- Derartige zusätzliche Anforderungen sind nicht Gegenstand dieser Empfehlung.
- Trinkwasserverordnung vom 21. Mai 2001 (BGBl. I S. 959), zuletzt durch die zweite Verordnung zur Änderung der Trinkwasserverordnung vom 5. Dezember 2012 (BGBl. I S. 2562) geändert.

Bewertung orientierende Untersuchung

systemische Untersuchung gemäß § 14 Abs. 3 der TrinkwV 2001

Legionellen (KBE/100 ml) ¹⁾	Bewertung	Maßnahme	Weitergehende Unters. ³⁾	Nachuntersuchung
> 10.000	extrem hohe Kontamination	Direkte Gefahrenabwehr erforderlich, (Desinf. u. Nutzungseinschränkung, z. B. Duschverbot) Sanierung erforderlich	Unverzüglich	1 Woche nach Desinfektion bzw. Sanierung
> 1.000	hohe Kontamination	Sanierungserfordernis ist abhängig vom Ergebnis d. weitergehenden Untersuchungen	Umgehend	-
> 100	mittlere Kontamination	Keine	Innerhalb von 4 Wochen	-
< 100	keine/geringe Kontamination	Keine	Keine	Nach 1 Jahr (nach 3 Jahren) ²⁾

- 1) KBE = koloniebildende Einheit
- 2) Werden bei zwei Nachunters. im jährlichen Abstand weniger als 100 Legionellen in 100 ml nachgewiesen, kann das Untersuchungsintervall auf maximal 3 Jahre ausgedehnt werden.
- 3) Wird die orientierende Untersuchung gleich mit einem Probenumfang durchgeführt, der dem einer weitergehenden Untersuchung entspricht, gelten die in der Tabelle 1 b angegebenen Maßnahmen direkt.

ORIGINAL ARTICLE

Role of Environmental Surveillance in Determining the Risk of Hospital-Acquired Legionellosis: A National Surveillance Study With Clinical Correlations

Janet E. Stout, PhD; Robert R. Muder, MD; Sue Mietzner, MS; Marilyn M. Wagener, MS; Mary Beth Perri, BS;

TABLE A. Results of Environmental and Clinical Testing for *Legionella* Species in 20 Hospitals

Hospital	Hospital characteristics		No. of cases of hospital-acquired legionellosis	<i>L. pneumophila</i> positivity rate, % (proportion) of environmental sites ^a	No. of test cycles	No. of environmental samples positive for <i>Legionella</i>			No. of clinical samples positive for <i>Legionella</i> /no. tested	
	Location	No. of beds				<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	<i>L. pneumophila</i> serogroups 2-14	<i>L. anisa</i>	Urine	Sputum
1	CA	120	1	47 (7/15)	1 ^b	7	0	2	1/1	0
2	PA	199	3	45 (18/40)	3 ^b	12	10	0	3/14	1/8
3	NY	152	1	36 (8/22)	2 ^b	8	0	0	1/15	1/10
4	LA	93	1	35 (19/55)	5	19	0	0	1/11	0/9
5	NE	108	0	83 (58/70)	5	58	0	17	0/4	0/251
6	OH	120	0	25 (11/44)	4	11	0	0	0/27	0/3
7	AZ	274	0	27 (13/49)	5	10	6	8	0/19	0/17
8	MI	975	0	14 (6/44)	4	2	6	3	0/240	0/240
9	FL	192	0	17 (2/12)	1	2	0	1	0/2	0/2
10	WV	80	0	12 (7/58)	5	7	0	7	0	0
11	CA	350	0	7 (3/42)	2	3	0	0	0/1	0/1
12	OH	213	0	67 (38/57)	5	0	38	16	0/19	0/16
13	TN	238	0	7 (2/28)	1	0	2	1	0	0
14	MA	65	0	5 (1/20)	1	0	1	0	0	0
15	KY	168	0	0 (0/10)	1	0	0	0	0	0
16	MI	94	0	0 (0/44)	4	0	0	0	0	0
17	DE	119	0	0 (0/23)	2	0	0	2	0/19	0/17
18	NY	470	0	0 (0/12)	1	0	0	0	0	0
19	NY	731	0	0 (0/13)	1	0	0	0	0	0
20	MI	172	0	0 (0/10)	1	0	0	0	0	0

^a Proportions are given as the number of sites that tested positive / total number of sites tested.

^b The hospital disinfected the water system after identification of cases; only pre-disinfection results are included.

Genotyping results of Strain isolated in the Netherlands

Primary prevention:

Routineuntersuchung

Secondary prevention:

Suche nach IQ nach
Erkrankung

Schlussfolgerung.

„primary prevention efforts do not include the most important reservoir(s) causing the transmission of *L. pneumophila* in the Netherlands“

Euser et al. 2013 Eur JCM

<i>L. pneumophila</i> SG1, ST	Patient isolates (n=179)	Environmental strains		χ^2 test p-value
		Primary prevention strains (n=182)	Secondary prevention strains (n=60)	
47	74	–	–	NA
62	23	1	–	0.565
23	5	–	1	0.081
42	3	–	9	<0.001
46	12	1	–	0.565
1	7	123	25	<0.001
9	6	2	2	0.239
45	10	1	–	0.565
82	8	–	1	0.081
37	4	–	1	0.081
109	4	–	–	NA
48	1	1	–	0.565
146	2	–	1	0.081
207	3	–	–	NA
479	2	–	–	NA
36	1	2	–	0.415
534	1	1	2	0.091
953	1	–	1	0.081
7	–	4	1	0.802
59	–	8	2	0.720
188	–	9	1	0.269
492	–	–	2	0.013
866	–	–	2	0.013
177	–	5	–	0.195
1066	–	2	–	0.415
1120	–	2	1	0.415
Other sequence types	12	20	9	NA

Häusliche Umgebung – Krankenhaus

Wasserproben (Patient: Lp1 Olda, ST1)

Legionella Zahl im häuslichen Umfeld:

- 2/2 Proben positiv:
 - 8 bzw. 100/100ml
- Lp1 MAbtype Olda,
 - ST 1 (1,4,3,1,1,1,1)
- Wasser-Installation technisch veraltet und schlecht gewartet.

Legionella Zahl im KH

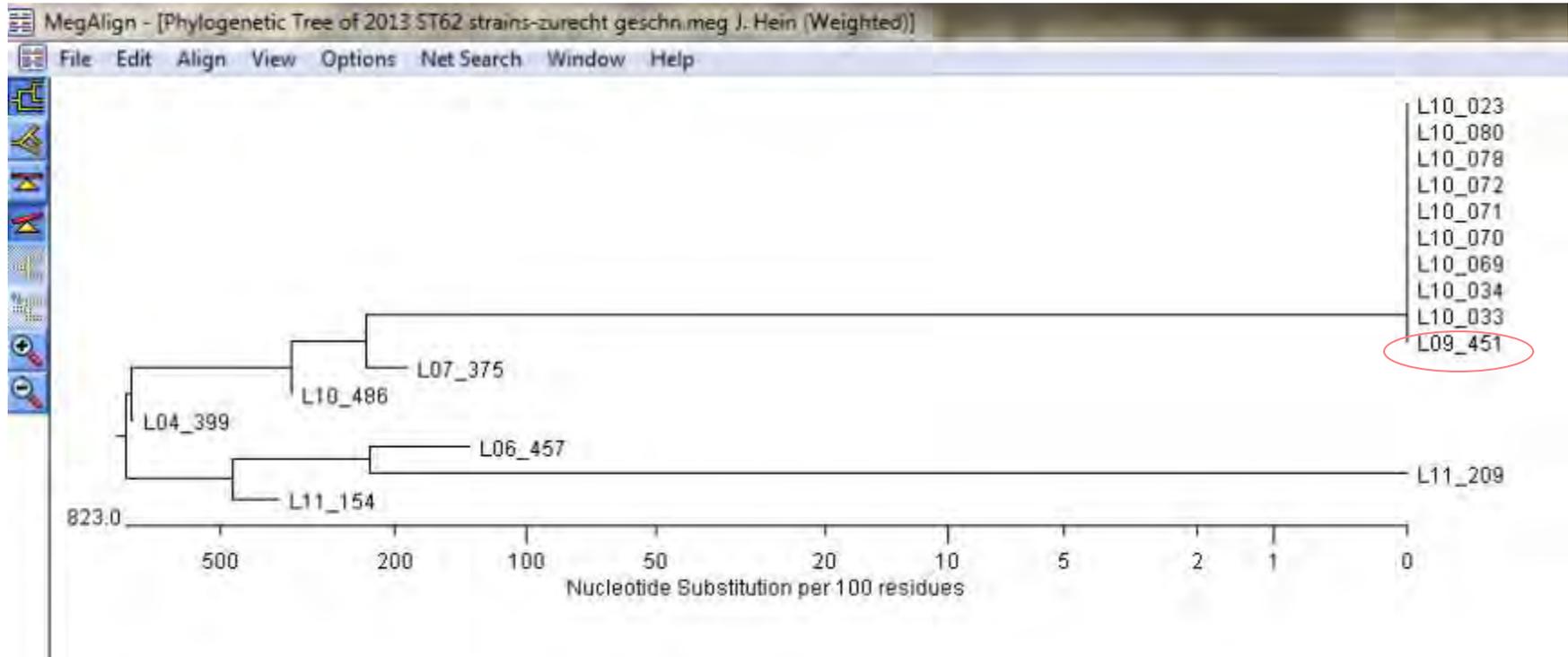
- 1/8 Proben positiv
 - 4/100ml
- **Lp1**
 - Bellingham ST196 (3,10,1,28,14,9,11)
- Lp10
 - ST: nt

In 8/15 Fällen CAP Legionella KbE im „Normbereich“ im häuslichen Umfeld

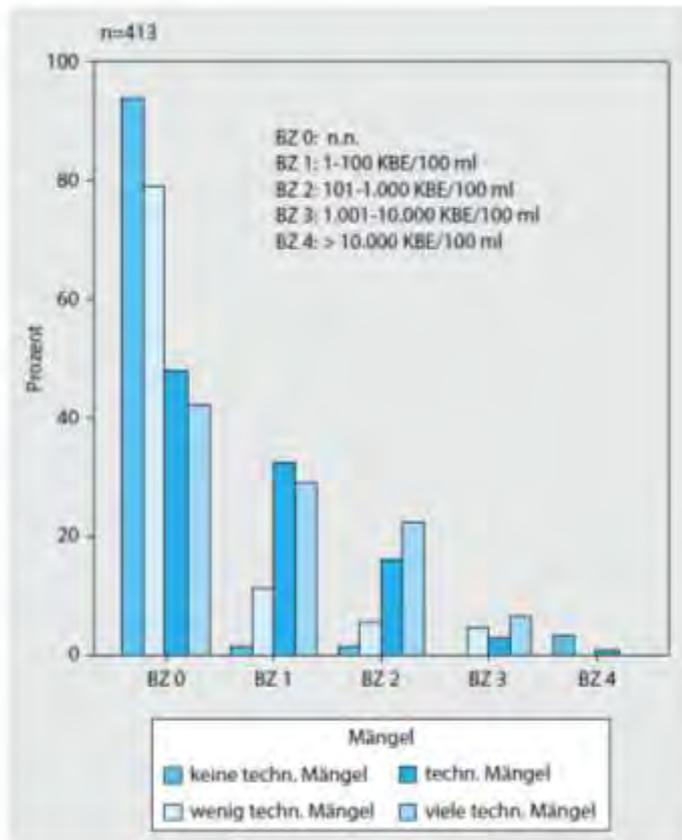
Korrekturzeitpunkt ??

Korrekte Entnahmestelle ??

CRISPR/CAS region Lp1 ST 62 strains ULM L10-023 etc.



Ist der technische Maßnahmewert valide begründet ?



- Kein Nachweis der epidemiologischen Validität des technischen Maßnahmewerts für Legionellen von 100KBE/100ml - Keine epidemiologischen Daten erhoben.
- „Gute“ Technik mit hoher Wahrscheinlichkeit assoziiert mit Nichtnachweis von Legionellen.
- Technische Mängel gehen hingegen mit Legionellenkontaminationen einher. Dabei deutet sich sogar ein „Dosis-Wirkungs-Phänomen“ an – je mehr technische Mängel vorliegen, desto höher sind die Legionellenkontaminationen

Hentschel et al. Bund. Ges Bl. 2011

Legionella in Trinkwassersystemen: Wann müssen wir sie fürchten ?

- Epidemiologie beginnt mit der Diagnose
 - 900 gemeldete versus mind.10 000 geschätzte Fälle
- Diagnostische Methoden sind besser als ihr Ruf
- Aufmerksamkeit
- Legionellen im Wasser
 - Infektion - kann sein – muss aber nicht
 - Ist es wichtiger Infektionen zu detektieren als Legionellen im Wasser ?

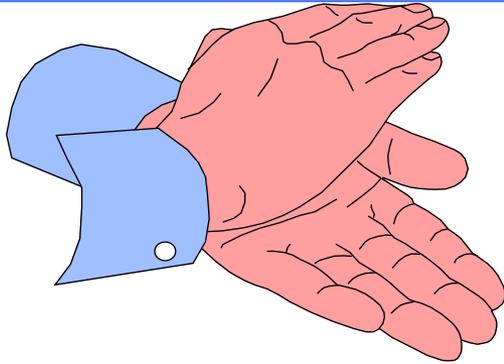
Legionella in Trinkwassersystemen: Wann müssen wir sie fürchten ?

- „Virulente“ Legionellen
 - Kommen auch ohne Erkrankungen vor oder
 - finden wir die Erkrankungen nicht ??
- Keimzahl kann schwanken 10 -100 fach
 - Unterschiedliche “ Virulenz“ ??
 - Prädiktion von „Markern“ ??
- Mab 3-1 gut bei klinischen Stämmen
- Bei Umweltstämmen schlecht
- Im Wasser fokussieren auf „virulente Klone“ ??
 - Mab2, 3-1 positiv
 - Sequenztyp
 - Non-pneumophila Spezies – Sind sie relevant ?

Zusammenfassung

- Legionellen sind weitverbreitete Wasserbakterien
- Vermehrung im 25-46°C warmen Wasser – peripher
- Vorgeschädigte Personen sind besonders empfänglich
- Es gibt keine Dosis- Wirkung – Korrelation
- Keine „exakten“ Grenzwerte für Menge im Wasser
- Virulente Klone für die Mehrzahl der Infektionen verantwortlich
- Viele Legionellen sind harmlos – aber welche ???
- Präventiv: Hoherhitzen, Chlorung, Filter
 - **Kaltes Wasser <20°C**
 - **Warmes Wasser >60°C**
 - **Wasser muß fließen**

Danke für die Aufmerksamkeit



Financial support
BMBF
RKI
DFG
EU

IMMH

Dr. Jürgen Helbig

Sigrid Gäbler

Kerstin Lück

Susann Menzel

Tetyana Koshkolda

Markus Petzold

Prof. Dr. med. Enno Jacobs

RKI:

Klaus Heuner

Health Dept. Soest

Dr. Brockmann

Prof Dr. Martin Exner

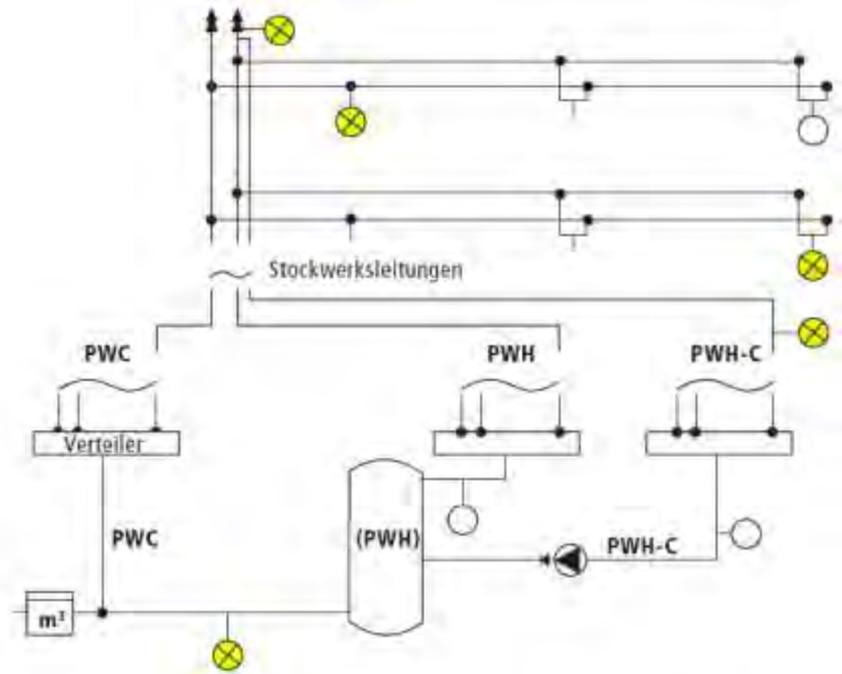
Probennahmestellen nach DVGW 551

Probennahmestellen (Mindestumfang)

- orientierende Untersuchung
- ⊗ zusätzliche Probenahmestellen bei weitergehender Untersuchung

PWC = Trinkwasser, kalt PWH-C = Trinkwasserleitung, warm, Zirkulation
 PWH = Trinkwasser, warm (PWH) = Trinkwassererwärmer

Die Grafik zeigt die im DVGW AB W 551 definierten Orte der Probenahme im Trinkwassersystem. Dabei wird zwischen Probenahmestellen für orientierende und weiterführende Untersuchungen unterschieden.



Technische Mängel

Tab. 3 Beispiele für die Einstufung der technischen Mängel in Hausinstallationen

Beispiele für „viele technische Mängel“	TWK-Temp. 26°C, keine Netztrennung der BS-Anlage, MAG nicht durchströmt, Bypassumgehung Filter vorhanden, Bypassumgehung TWK-Zähler ca. 3 m, TWE-Wartung nicht bekannt
	TWK-Temp. 30°C, SV-Totstrecke 2 m, Umgehungsleitung Filter 3,5 m lang DN 80, TWE-Wartung nicht bekannt
	Keine Netztrennung der BS-Anlage, keine Bewegungsleitung, TWE-Wartung nicht bekannt
Beispiele für „technische Mängel“	TWW-Temp. <55°C, Isolation nicht vorhanden
	TWW-Temp. <55°C, Rückschlagventile am TWE fehlen
	TWK-Temp. 27°C, SV-Totstrecke 2 m, TWE-Wartung nicht bekannt
Beispiele für „wenig technische Mängel“	Partikelfilter defekt, SV-Totstrecke 2 m
	SV-Totstrecke 2 m
	TWK-HEL 22°C]

DN 80 konkrete Nennweite einer Rohrleitung, Beispiel, TWK-HEL Kaltwassertemperatur in der Hauseinführungsleitung, KW-Temp. Kaltwasser, MAG Membranausdehnungsgefäß, BS-Anlage Brandschutzanlage, TWK-Zähler Wasseruhr Kaltwasser, TWE Trinkwassererwärmer, TWE-Temp. Temperatur am Trinkwassererwärmer, TWE-Wartung Wartung des Trinkwassererwärmers, TWK Trinkwasser kalt, TWW Trinkwasser warm, SV-Totstrecke stagnierende Zuführungsleitung zum Sicherheitsventil des TWE.

Suche der Infektionsquelle

Patientenmaterial

2- 3 Kolonien



Wasserproben

mind. 10 Kolonien

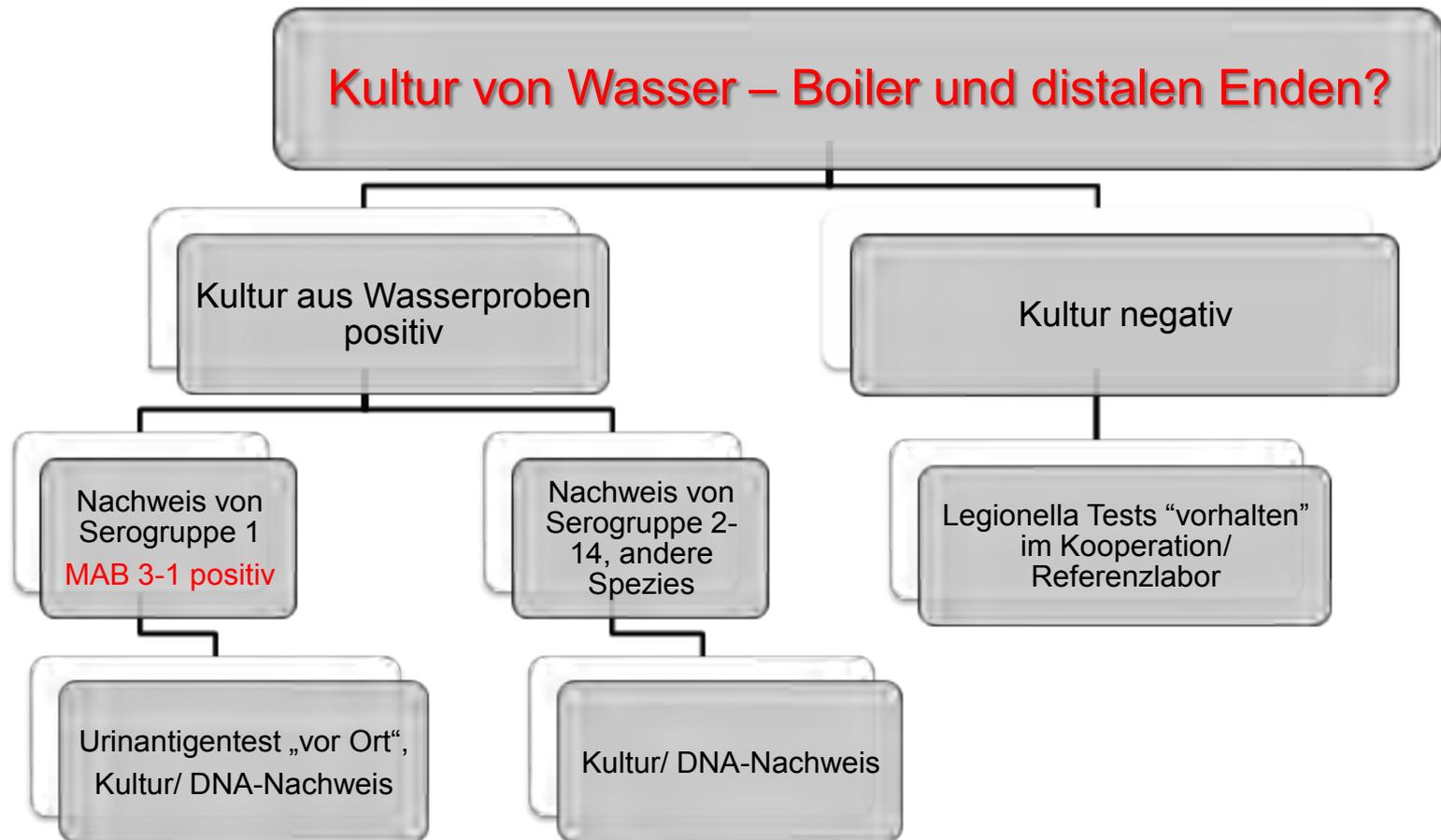


1. Serologische Typisierung bei *L. pneumophila*:
Serogruppe, MAb Subtyp
bzw. Speziesbestimmung:
MALDI-TOF, DNA-Sequenz (mip, 16S rRNA)

2. Genomisches Fingerprint:, SBT, PFGE, AFLP, RAPD-PCR

Identität > Übertragung aus dem Wassersystem

Mikrobiologisches Monitoring zur Überwachung nosokomialer Legionellose



ORIGINAL ARTICLE

Role of Environmental Surveillance in Determining the Risk of Hospital-Acquired Legionellosis: A National Surveillance Study With Clinical Correlations

Janet E. Stout, PhD; Robert R. Muder, MD; Sue Mietzner, MS; Marilyn M. Wagener, MS; Mary Beth Perri, BS;

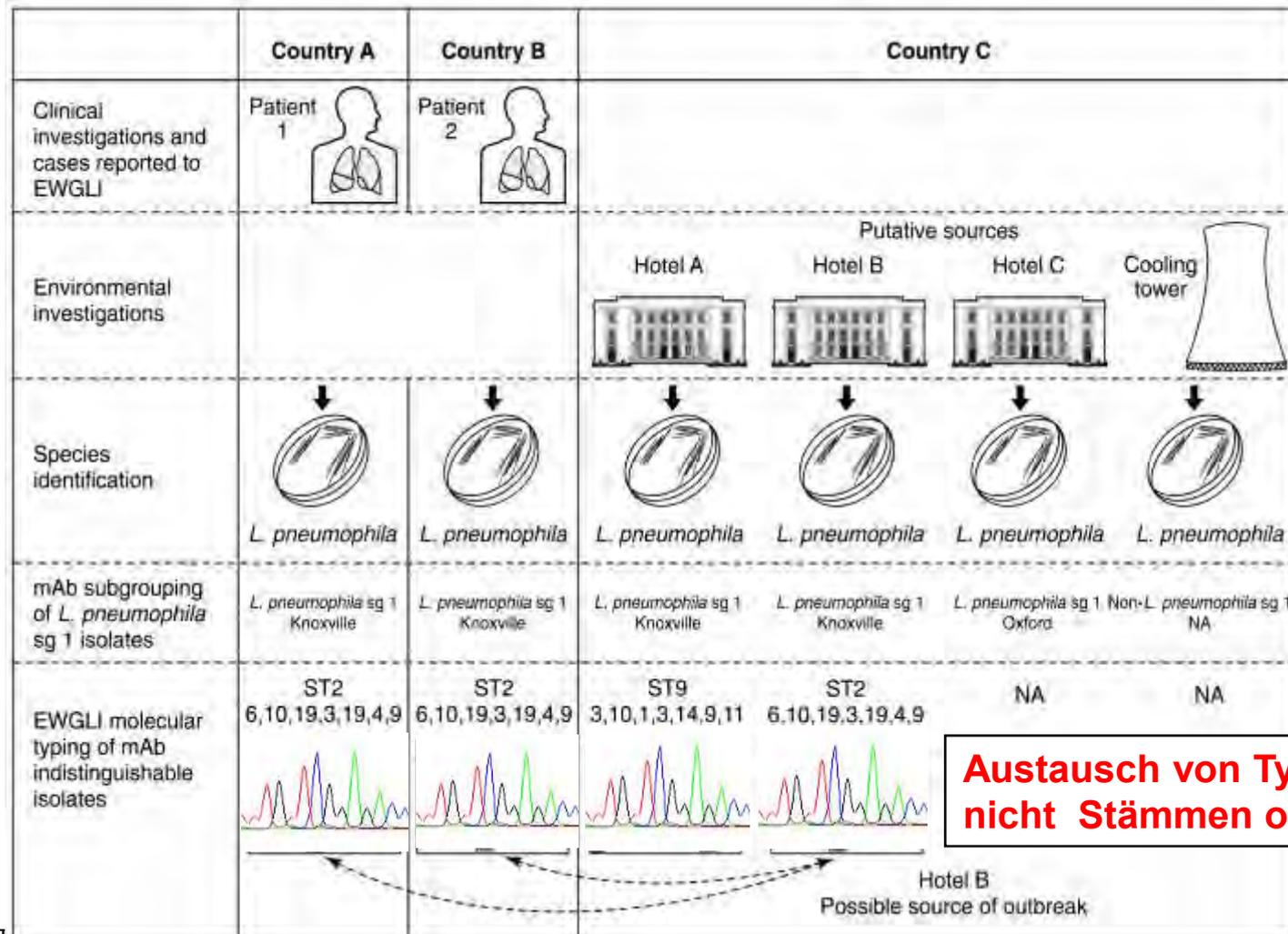
TABLE A. Results of Environmental and Clinical Testing for *Legionella* Species in 20 Hospitals

Hospital	Hospital characteristics		No. of cases of hospital-acquired legionellosis	<i>L. pneumophila</i> positivity rate, % (proportion) of environmental sites ^a	No. of test cycles	No. of environmental samples positive for <i>Legionella</i>			No. of clinical samples positive for <i>Legionella</i> /no. tested	
	Location	No. of beds				<i>L. pneumophila</i> serogroup 1	<i>L. pneumophila</i> serogroups 2-14	<i>L. anisa</i>	Urine	Sputum
1	CA	120	1	47 (7/15)	1 ^b	7	0	2	1/1	0
2	PA	199	3	45 (18/40)	3 ^b	12	10	0	3/14	1/8
3	NY	152	1	36 (8/22)	2 ^b	8	0	0	1/15	1/10
4	IA	93	1	35 (19/55)	5	19	0	0	1/11	0/9
5	NE	108	0	83 (58/70)	5	58	0	17	0/4	0/251
6	OH	120	0	25 (11/44)	4	11	0	0	0/27	0/3
7	AZ	274	0	27 (13/49)	5	10	6	8	0/19	0/17
8	MI	975	0	14 (6/44)	4	2	6	3	0/240	0/240
9	FL	192	0	17 (2/12)	1	2	0	1	0/2	0/2
10	WV	80	0	12 (7/58)	5	7	0	7	0	0
11	CA	350	0	7 (3/42)	2	3	0	0	0/1	0/1
12	OH	213	0	67 (38/57)	5	0	38	16	0/19	0/16
13	TN	238	0	7 (2/28)	1	0	2	1	0	0
14	MA	65	0	5 (1/20)	1	0	1	0	0	0
15	KY	168	0	0 (0/10)	1	0	0	0	0	0
16	MI	94	0	0 (0/44)	4	0	0	0	0	0
17	DE	119	0	0 (0/23)	2	0	0	2	0/19	0/17
18	NY	470	0	0 (0/12)	1	0	0	0	0	0
19	NY	731	0	0 (0/13)	1	0	0	0	0	0
20	MI	172	0	0 (0/10)	1	0	0	0	0	0

^a Proportions are given as the number of sites that tested positive / total number of sites tested.

^b The hospital disinfected the water system after identification of cases; only pre-disinfection results are included.

Molekulare Typisierung Schema

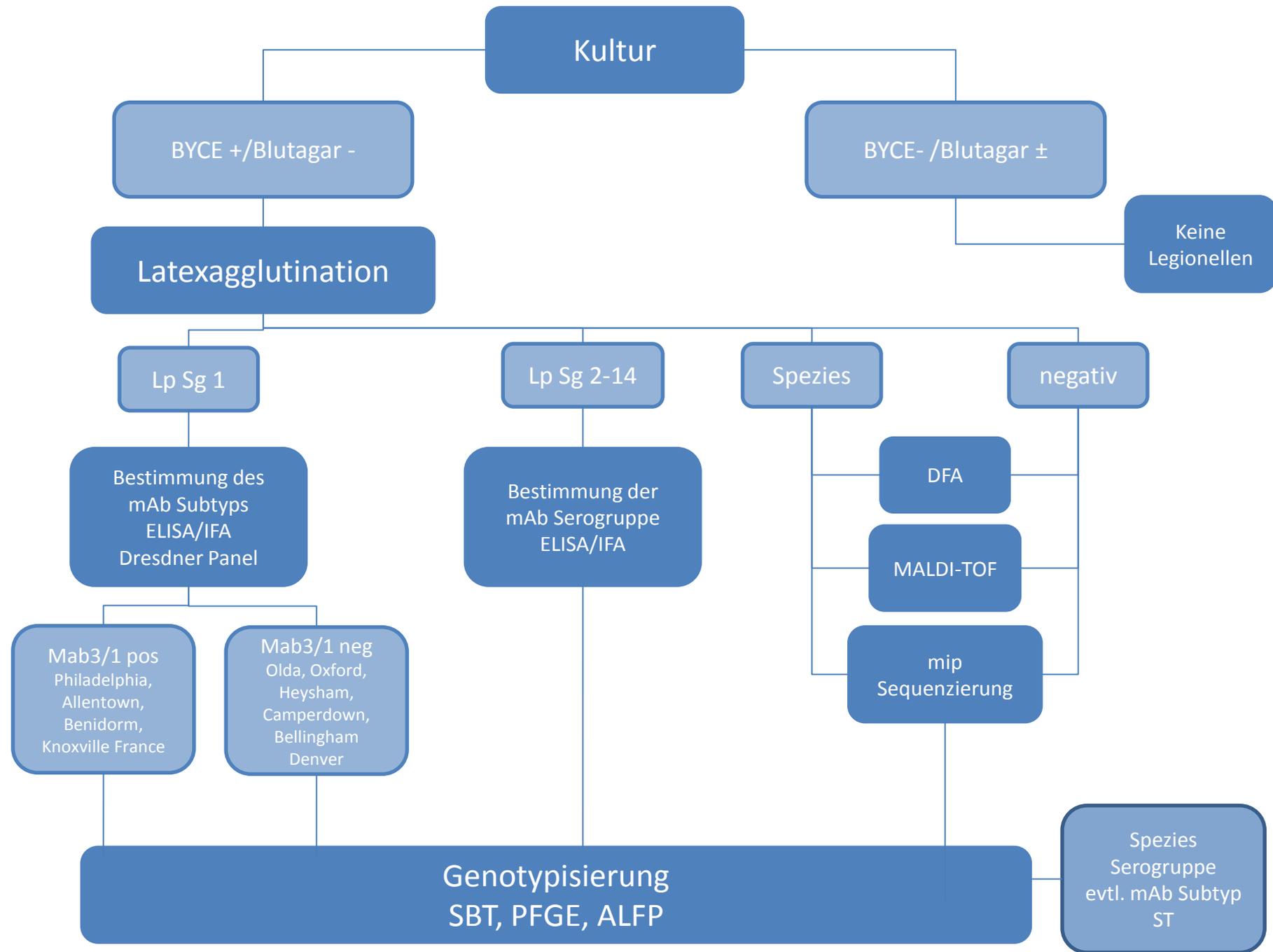


**Austausch von Typen
nicht Stämmen oder DNA**

Typisierung *L. pneumophila*

- **Monoclonal antibody (Mab) typing**
- Sequence Based Typing (SBT)
- Chip Typing
- Spoligotyping

Fast, reproducible, exchangeable, cheap, good discrimination



Was ist eine monoklonaler (MAb) Subtyp ?

- Reaktivität mit einem Panel monoklonaler Antikörper
- Bezeichnung eines Typs nach eine Stamm mit diesem Muster z. B.
 - 1,2,3 für Knoxville
 - 1, 2, 5, 7 für Benidorm

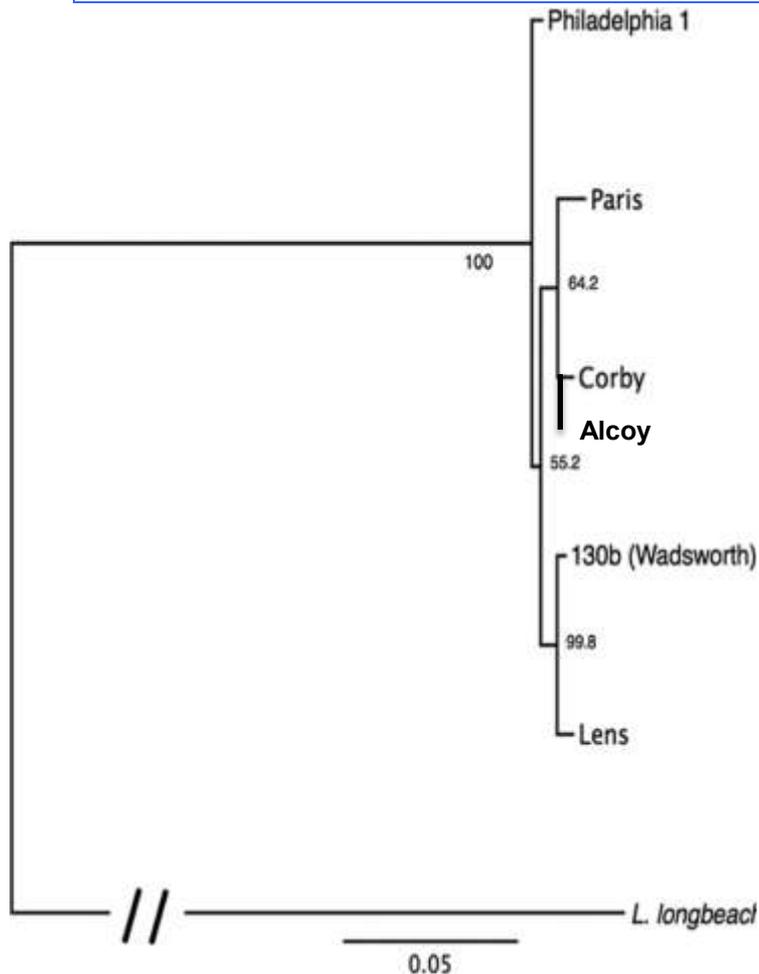
Dresden	8/5	3/1		10/6		8/4	20/1
Standard panel	1	2	3	4	5	6	7
Type strain (ATCC)							
Philadelphia 1 (33152)	+++	+++	0	0	+++	+++	0
Allentown 1 (43016)	+++	+++	0	0	+++	0	0
Benidorm 030E (43108)	+++	+++	0	0	+++	0	+++
Knoxville 1 (33153)	+++	+++	+++	0	0	++	0
France 5811 (43112)	+++	+++	0	0	0	0	0
OLDA (43109)	+++	0	0	0	0	+++	++
Oxford 4032E (43110)	+++	0	0	0	0	+++	0
Heysham 1 (43107)	+++	0	+++	0	0	0	0
Camperdown 1 (43113)	+++	0	0	0	0	0	0
Bellingham 1 (43111)	+++	0	0	+++	0	0	++
Denver (Stout ,1988)	+++	0	+++	0	0	+++	0

Typing methods for *L. pneumophila*

- **Monoclonal antibody (Mab) typing**
- **Sequence Based Typing (SBT)**
- Chip Typing
- Spoligotyping

Fast, reproducible, exchangeable, cheap, good discrimination

Phylogeny of sequenced *L. pneumophila* strains



- built using 26 housekeeping genes
 - *frr, infC, nusA, pgk, rplA, rplB, rplC, rplD, rplE, rplK, rplL, rplM, rplN, rplP, rplS, rplT, rpmA, rpoB, rpsB, rpsC, rpsE, rpsI, rpsK, rpsM, smpB, tsf*

	mAb	ST	flaA	pilE	asd	mip	momp	proA	neuA
Phil	Phil	36	3	4	1	1	14	9	1
Paris	Phil	1	1	4	3	1	1	1	1
Corby	Knox	51	6	10	15	28	9	14	6
Alcoy	Knox	637	6	10	15	3	9	14	6
Wadsw	Beni	42	4	7	11	3	11	12	9
Lens	Beni	15	12	9	26	5	26	17	15

Typing methods for *L. pneumophila*

- Monoclonal antibody (Mab) typing
- Sequence Based Typing (SBT)
- Chip Typing
- Spoligotyping

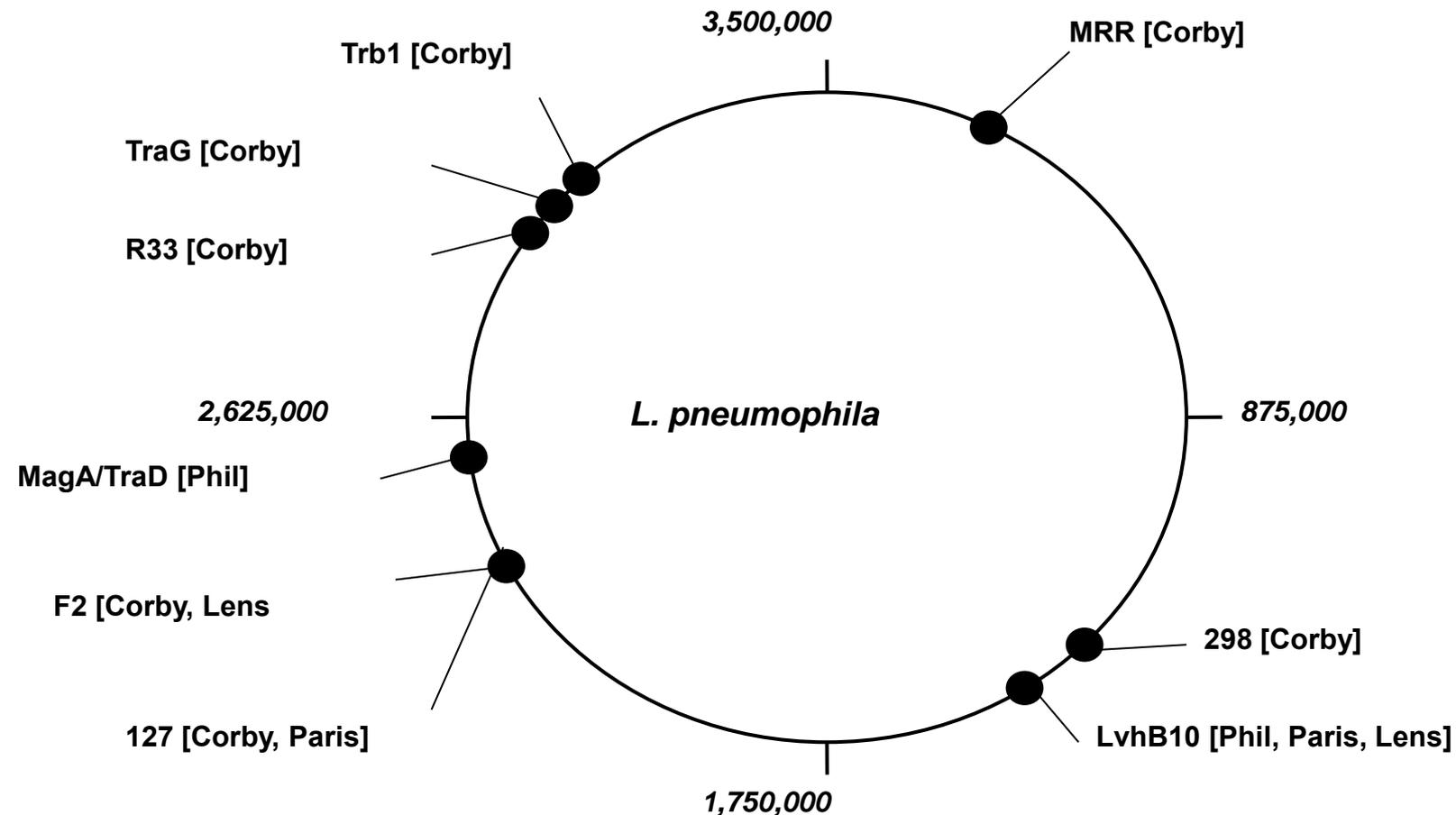
Fast, reproducible, exchangeable, cheap, good discrimination

Chip

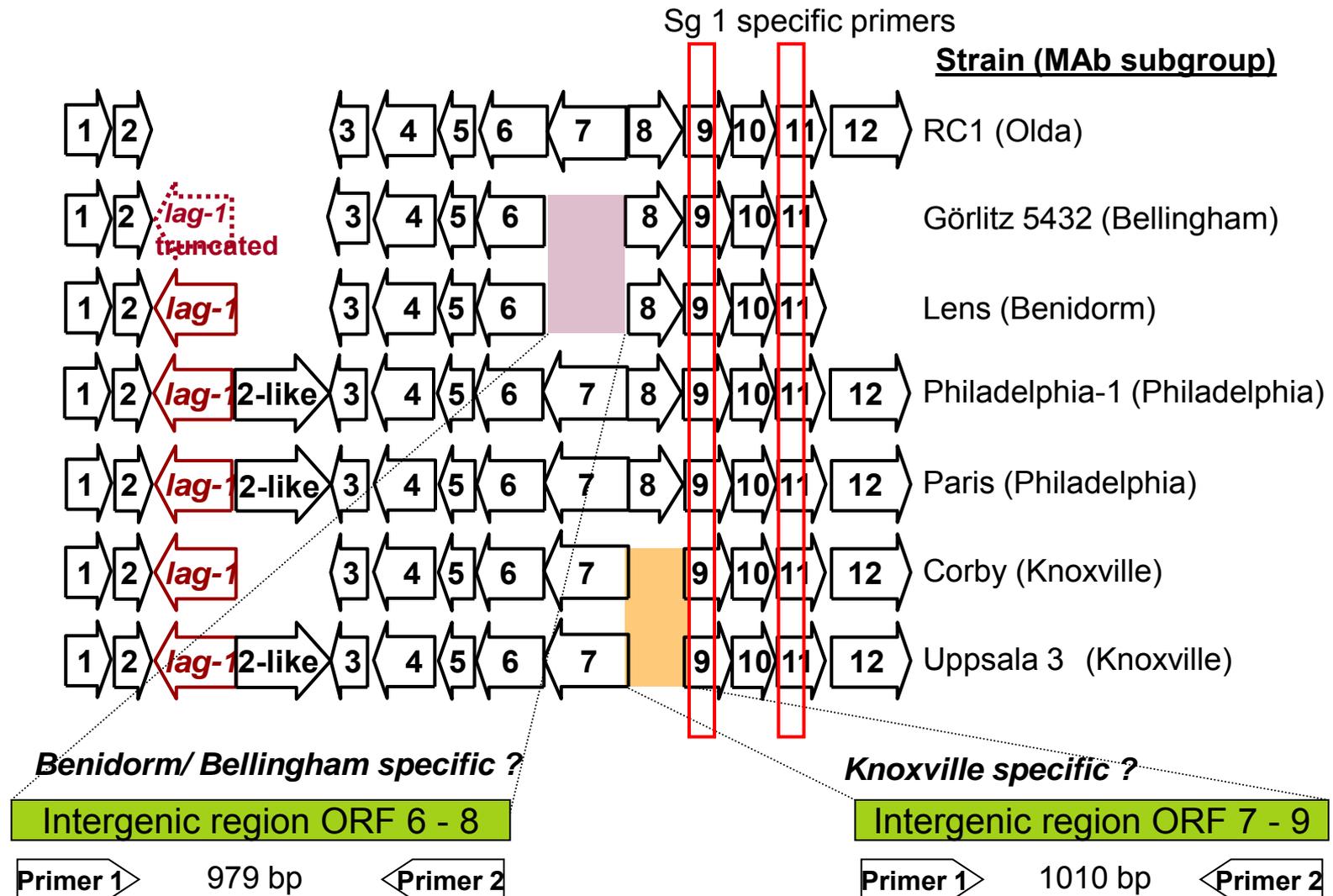
- Diagnostic microarray was developed and used to characterise a collection of *L. pneumophila* isolates.
- Genes used as targets were selected from previous studies.
 - Variable genomic element /islands
 - 8 genes
 - Genes associated with the LPS synthesis (Serogroup / monoclonal subgroup)
 - 12 genes
 - Core genome gens
 - 7 genes
 - No antibiotic resistance genes

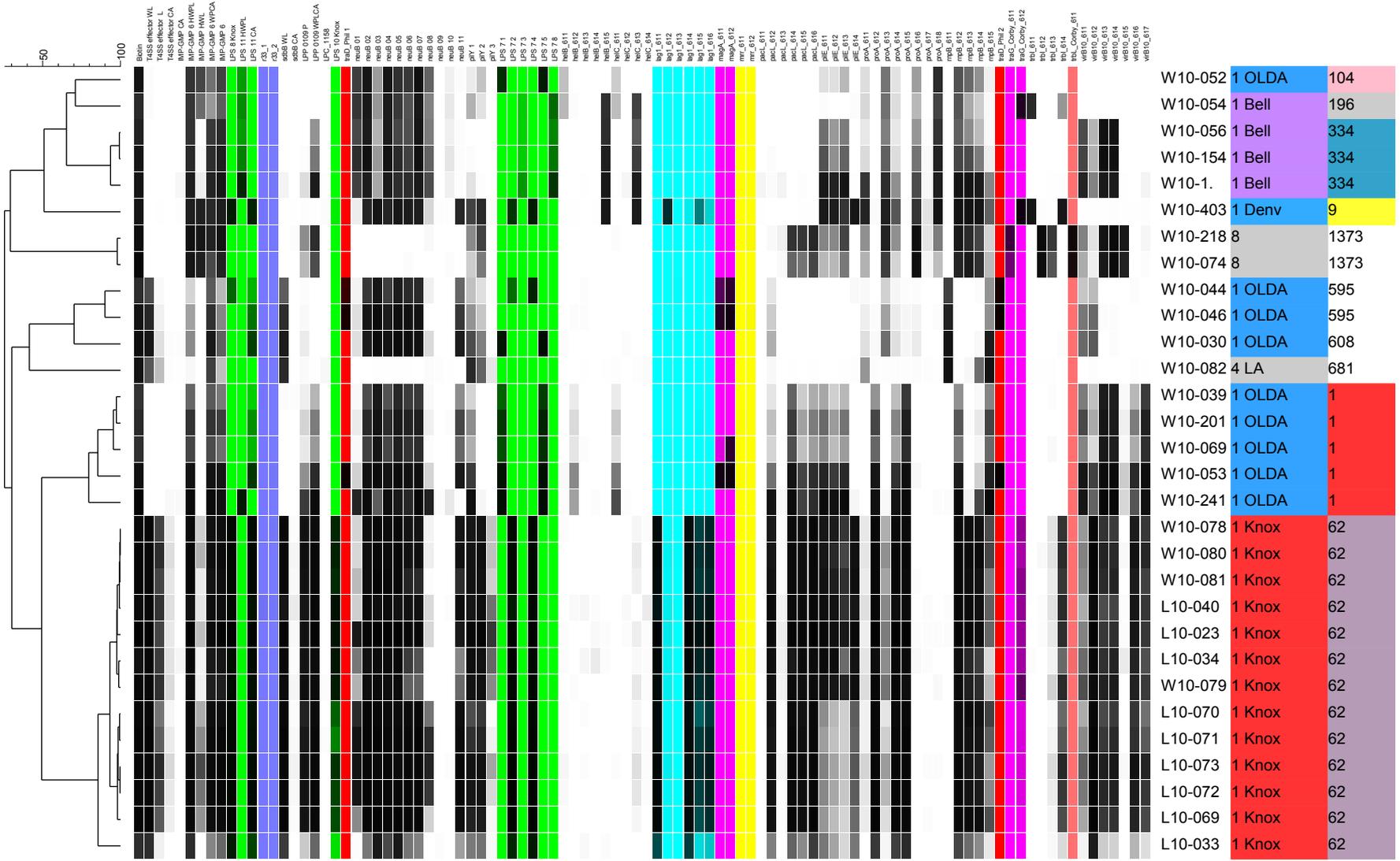
97 “spots” in quadruplicate

Pathogenicity / genetic islands



Constructing and Testing of several PCR-based systems to detect monoclonal (MAb) subgroups



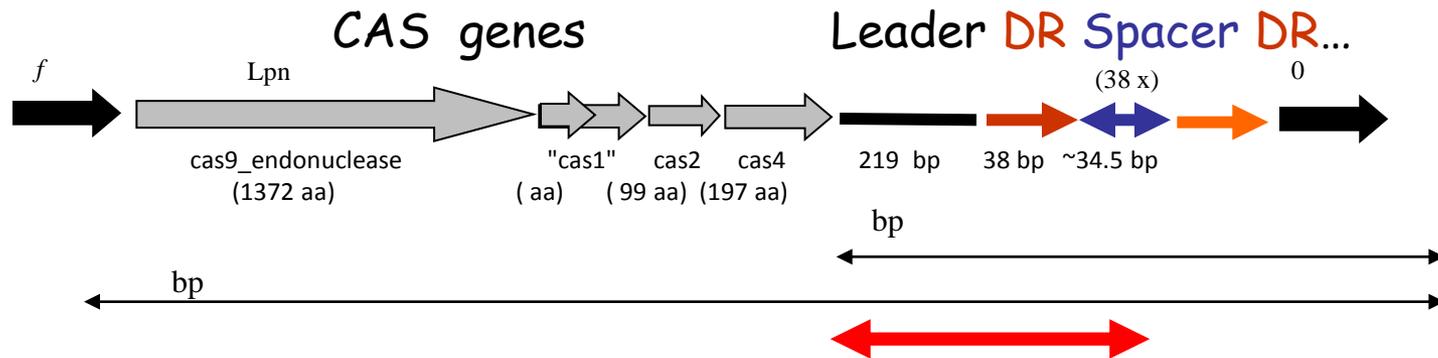


Typing methods for *L. pneumophila*

- Monoclonal antibody (Mab) typing
- Sequence Based Typing (SBT)
- Chip Typing
- Spoligotyping

Fast, reproducible, exchangeable, cheap, good discrimination

Organization of the CRISPR/CAS system (CassII-B type) of Lp1 strain



PCR specific for strain Ulm: Cas4-Repeat 14



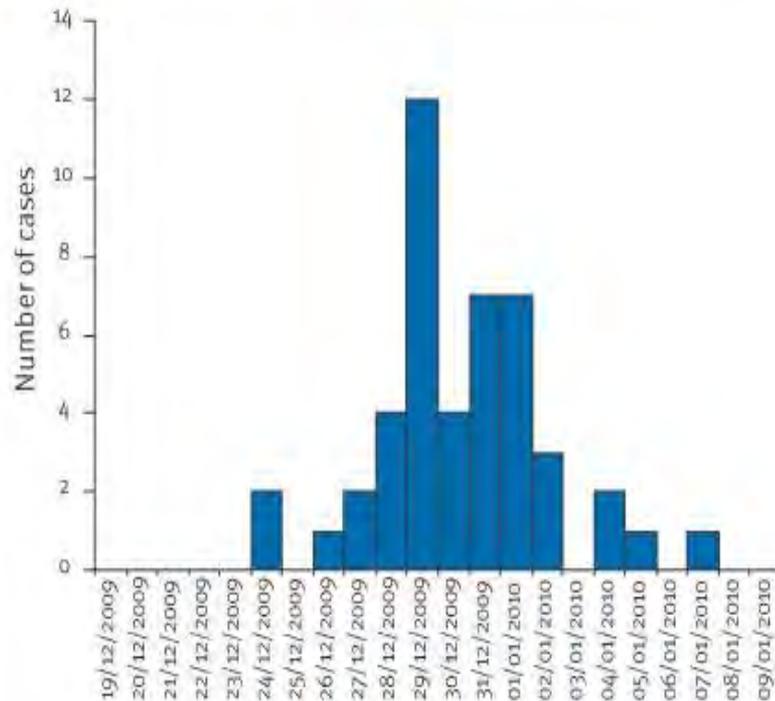
PCR specific for all strains: Cas1-Cas4

strain Paris Lp1 Phil: 42 repeats
strain130b Lp1 Beni: 60 repeats

2010 Ausbruch Ulm

FIGURE 2

Onset of disease in patients with Legionnaires' disease, Ulm/Neu Ulm, Germany, information available as of 22 January 2010, (n=46)



- Infektionsquelle
 - Epidemiologisch keine gemeinsame „Quelle“
 - Schwimmbad
 - Feier
 - Reisen/ Hotel
 - diffus über die Stadt verteilt
 - >>Rückkühlwerk
 - 9/30 Kultur Legionella pos
 - 5x Lp1
 - 1x Mabtyp Knoxville, ST 62
- Intermittierender Betrieb seit Sommer 2009
- Wetterlage:
 - Relativ warm
 - Dichte Wolkenschicht

Euro Surveill. 2010;15(4):1-2

C Lück IMMh TUD

Legionella-Labor

Infektionsquellen Legionella-Pneumonien

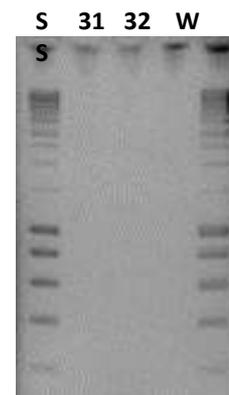
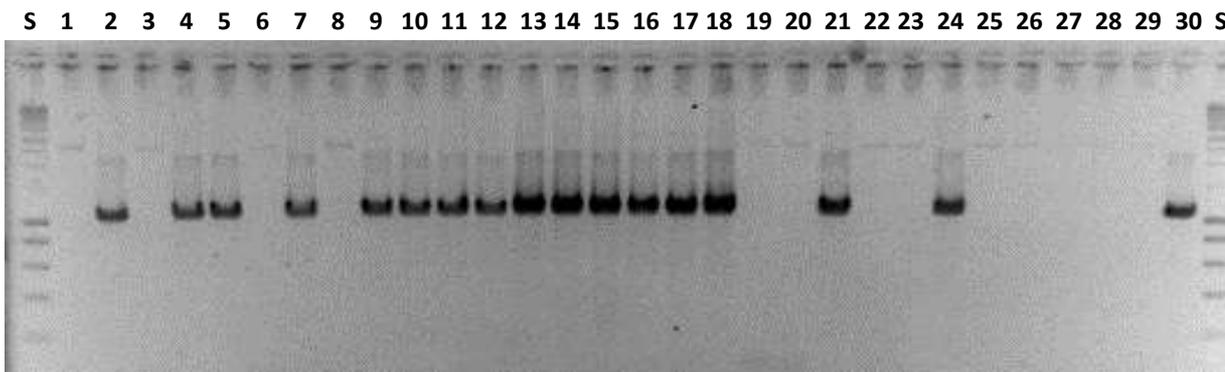


***L. pneumophila* Stämme von 8 Patienten und 10 Kühltürmen (KT) während des Ausbruchs in Ulm, Dezember 2009 /Januar 2010**

Herkunft	Maximale Keimzahl/ 100ml	Serogruppe /Monoklonale Subgruppe (N getestet)	Sequenztyp (ST) (N getestet)	fla	pil	asd	mip	momp	pro	neu	Vorkommen diese Stammes
Patienten (n=8)		1 Knoxville¹	62	8	10	3	15	18	1	6	Fast ausschließlich bei Erkrankten weltweit
1. KT Verursacher	92500	1 Knoxville¹ (n=19)	62 (n=4)	8	10	3	15	18	1	6	Fast ausschließlich bei Erkrankten weltweit
1. KT	92500	1 OLDA ² (n=1)	1 (n=1)	1	4	3	1	1	1	1	Weltweit von Patient und Wasser
1. KT	92500	10 (n=1)	908 (n=1)	1	4	3	5	1	1	6	Einzig
1. KT	92500	8 (n=3)	NA (n=2)	5	2	3	10	6	25	F ⁵	Einzig
1. KT	92500	3 (n=8)	984 (n=1)	12	29	2	20	50	20	15	einzig
1. KT	92500	<i>L. rubrilucens</i> ³ (n=1)	nt								
2. KT	70 000	8 (n=94)	NA (n=2)	5	2	3	10	6	25	F	Einzig
2. KT	70 000	<i>L. rubrilucens</i> ³ (n=2)	nt								
3.KT	300	1 Bellingham ² (n=1)	334 (n=1)	2	6	17	6	13	11	11	Selten bei Patienten und Wasser in D und NL
4.KT	3000	4 (n=1)	681 (n=1)	11	14	16	25	7	13	6	Selten
4.KT	3000	6 (n=1)	956 (n=1)	6	10	3	3	9	1	9	Selten
5.KT	1	1 OLDA ² (n=1)	1 (n=1)	1	4	3	1	1	1	1	Weltweit Patient und Wasser
6.KT	1	Neue <i>L. species</i> (n=1) ⁴									
7.KT	130	1 Bellingham ² (n=1)	334 (n=1)	2	6	17	6	13	11	11	Selten bei Pati. und Wasser in D und NL
8.KT	15 000	1 OLDA ² (n=2)	595 (n=1)	2	14	16	16	15	13	2	Selten
8.KT	6	4 (n=1)	NA (n=1)	8	14	16	25	7	13	F	Weltweit Patient und Wasser
9.KT	5	1 OLDA ² (n=1)	1 (n=1)	1	4	3	1	1	1	1	Selten
10.KT	1	1 OLDA ² (n=1)	104 (n=1)	3	10	1	1	14	9	1	Selten

CAS-PCR

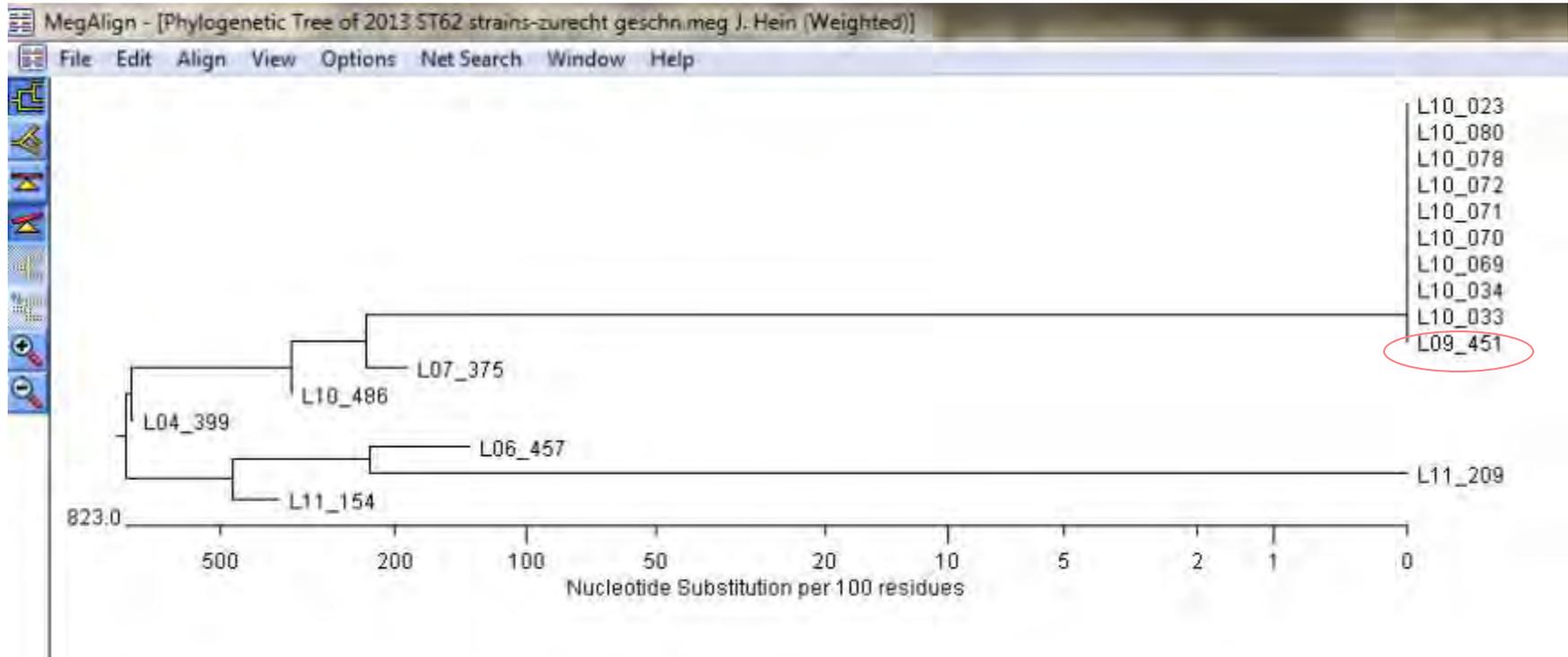
Primer: Lcas4 F2/Lcas4 R2

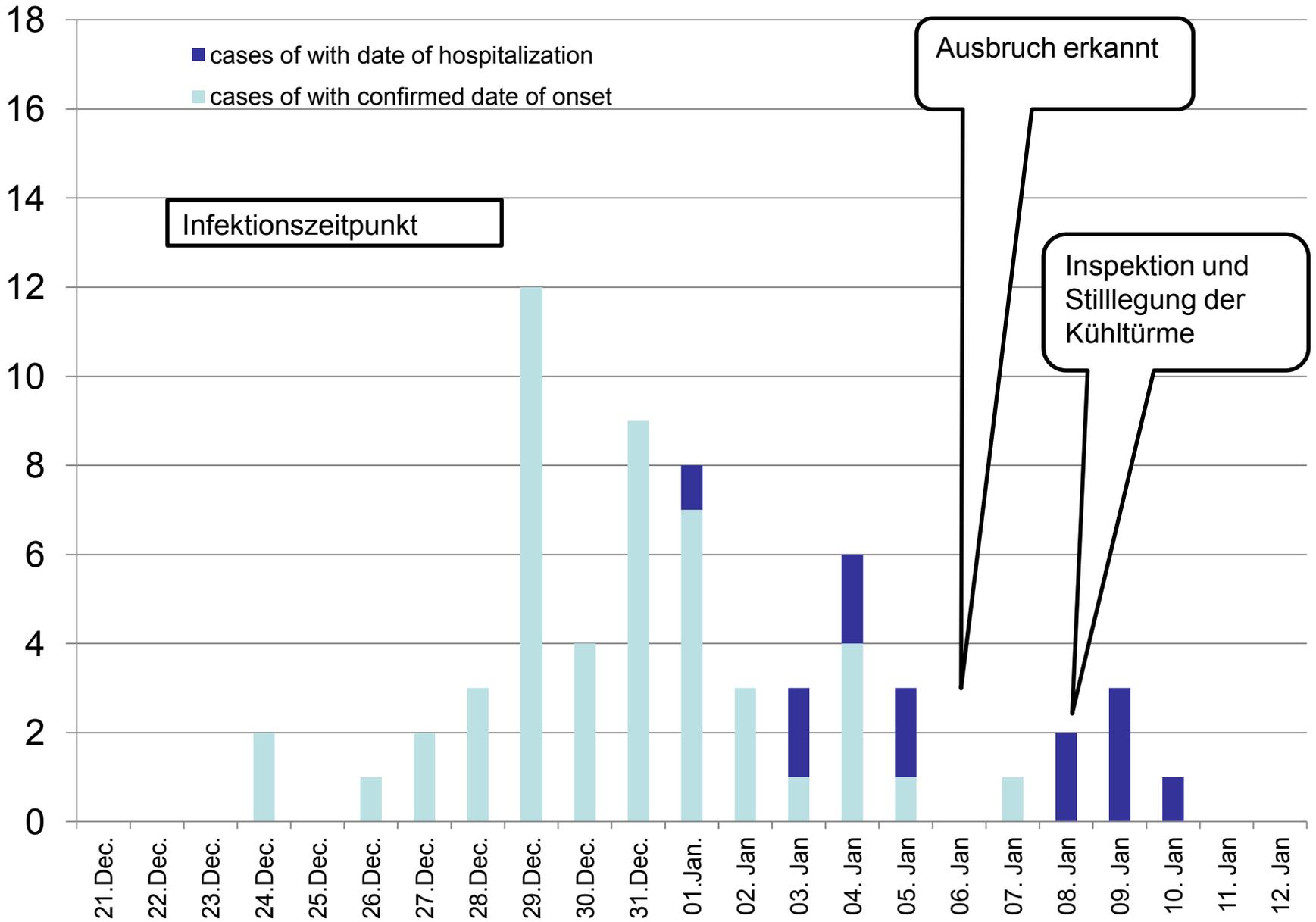


Nr.	Stamm	Herkunft	mAb-Subtyp	Bemerkung
1	L11_007	Ludwigsburg	1Alle-Fran	0
2	L10_486	Heidelberg	1Knox	+
3	L10_571	GA Ulm	1Knox	0
4	L11_154	Viersen	1Alle-Fran	+
5	L11_209	Hannover	1Knox	+
6	W11_1115	Hannover	1Phil	0
7	L04_399	Köln	1Knox	+
8	L03_095	Saarbrücken	1Phil	0
9	L10_033	ULM	1Knox	+
10	L10_034	ULM	1Knox	+
11	L10_070	ULM	1Knox	+
12	L10_071	ULM	1Knox	+
13	L10_072	ULM	1Knox	+
14	W10_078	ULM	1Knox	+
15	W10_080	ULM	1Knox	+
16	W10_081	ULM	1Knox	+
17	L07_375	Dresden	1Knox	+
18	L06_457	Dresden	1Knox	+

Nr.	Stamm	Herkunft	mAb-Subtyp	Bemerkung
19	W09_454	LUA Trier	1Phil	0
20	W09_456	LUA Trier	1Phil	0
21	L09_451	Ulm Uni	1Knox	+
22	L09_329	LUA Trier	1Phil	0
23	L09_103	FF Oder	1Phil	0
24	L10_069	ULM	1Knox	+
25	W10_055	ULM	1Phil	0
26	L02_521	Bad Langensalza	1Phil	0
27	W12_935	Friedrichshafen	1Alle-Fran	0
28	L12_398	Greifswald	1Alle-Fran	0
29	L10_496	GA Marburg-Biedenkopf	1Phil	0
30	L10-023	ULM	1Knox	+
31	L13_207	Stuttgart	1Alle-Fran	0
32	W13_219	Freudenstadt	1Alle-Fran	0

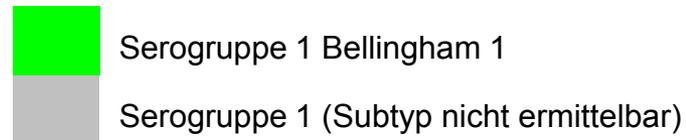
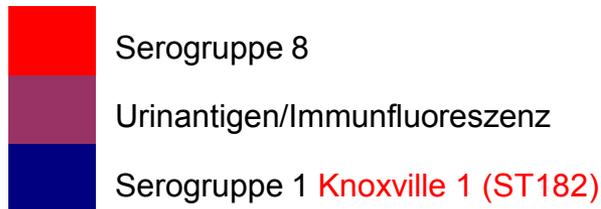
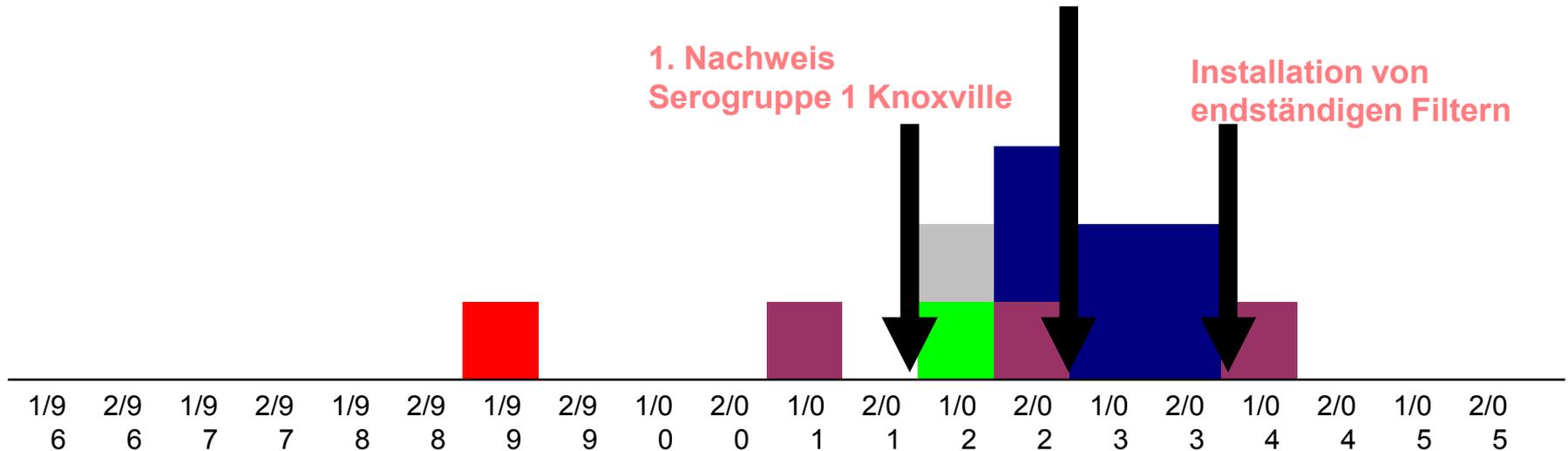
CRISPR/CAS region Lp1 ST 62 strains from ULM L10-023 etc.





Epidemische Kurve ST182

Desinfektion Steigleitung



10 (83%) Patient immunsupprimiert
 (4 Bronchialkarzinome, 1 Lymphom,
 2 Hochdosis Corticosteroide,
 1 Nierentransplantation,
 2 Chemotherapie)

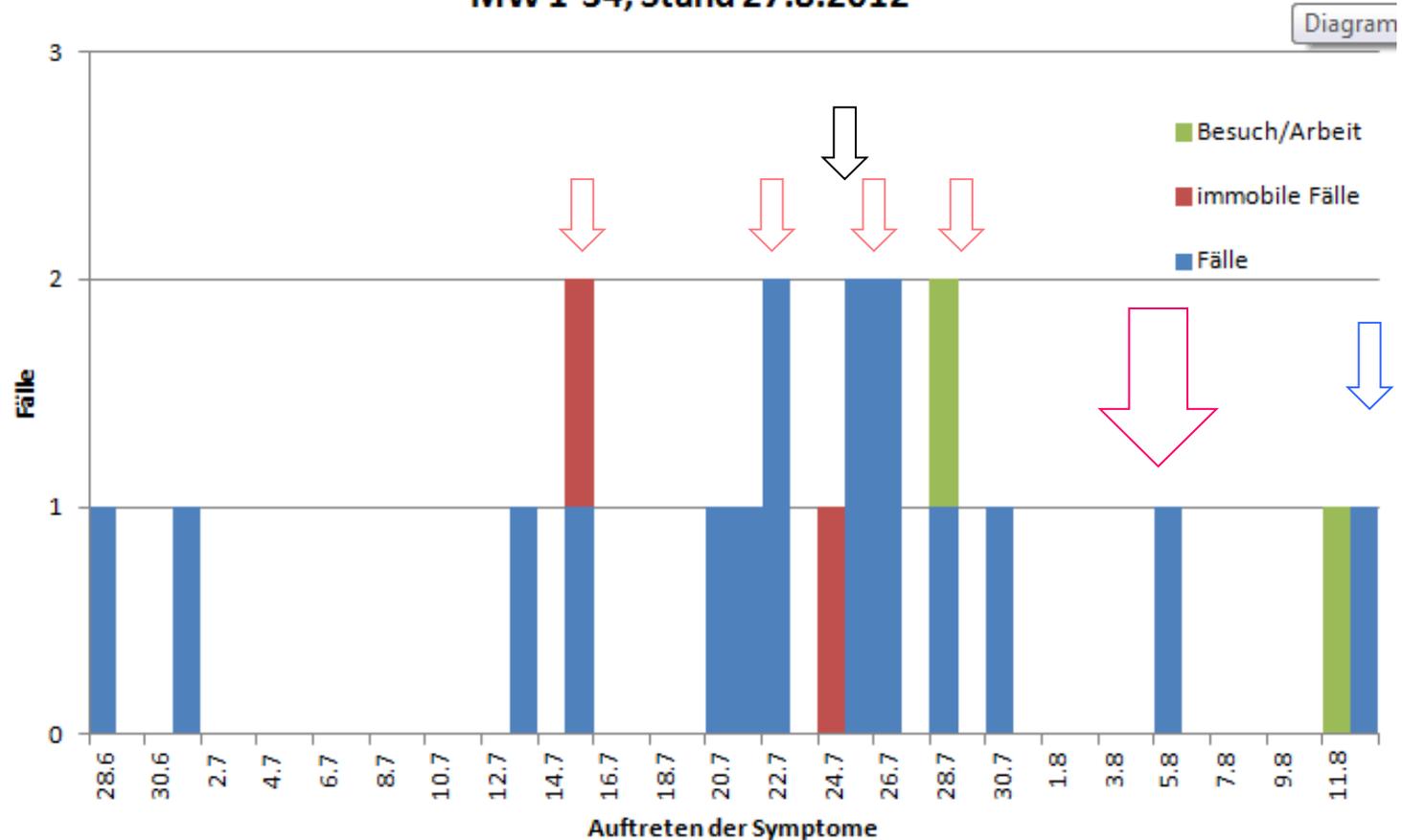
Alter: 44-78 Jahre (Mittelwert 60)

Geschlecht: 4 (33%) weiblich

Gestorben: 7 (58%)

Zweibrücken Ausbruch durch Lp 1 Allentown/France ST82

Legionellenfälle (IfSG) Zweibrücken (n=20)
MW 1-34, Stand 27.8.2012



Legionärskrankheit bei einer Inland-Reisegruppe

M. L'age, I. Horbach, W. Ulmrich, H. Weyer und F.-J. Fehrenbach

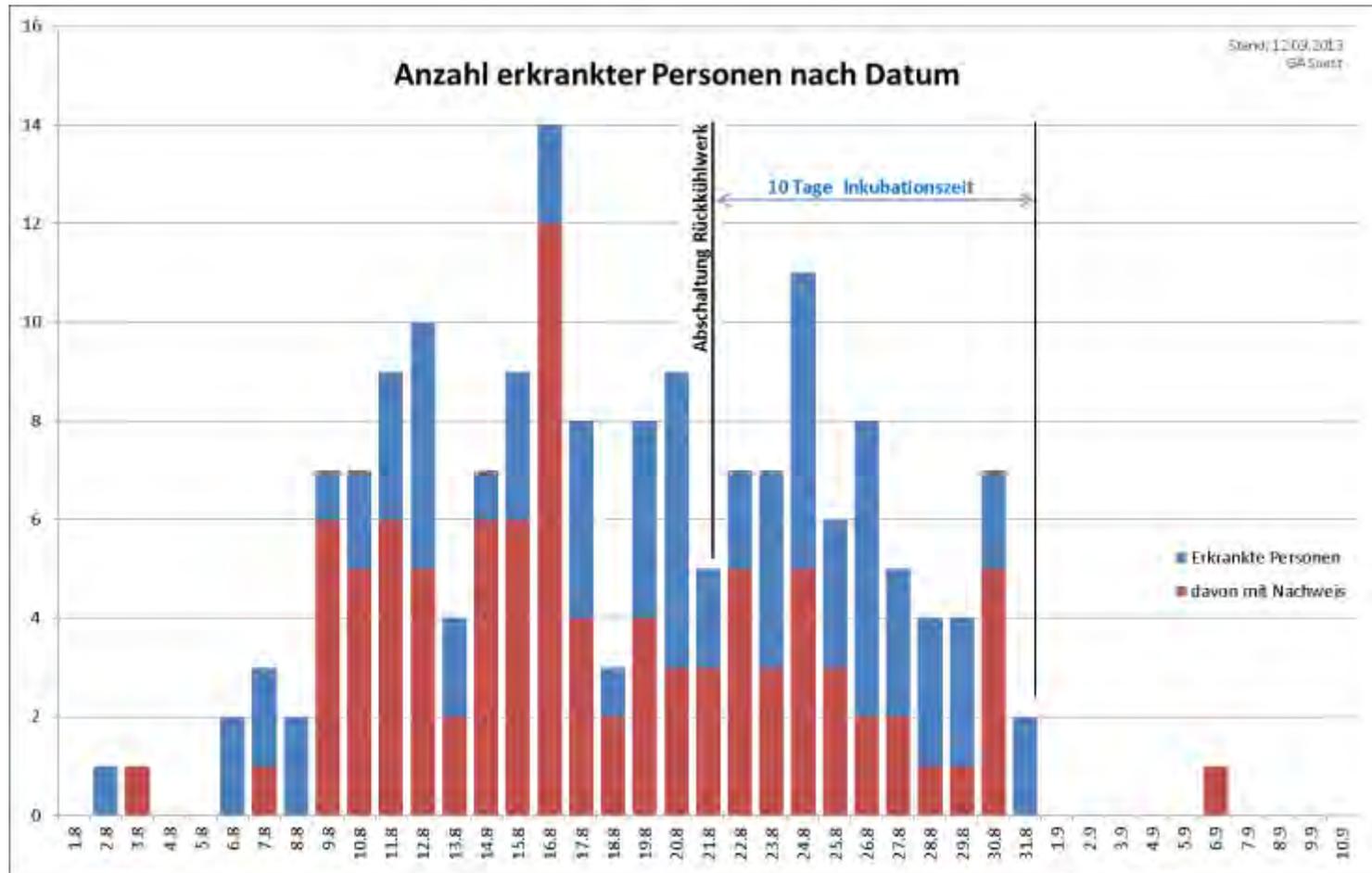
II. Innere Abteilung des Auguste-Viktoria Krankenhauses und Abteilung für Bakteriologie des Robert Koch-Institutes des Bundesgesundheitsamtes, Berlin

- Reisegruppe aus NRW
- Indexfall in Berliner KH verstorben
 - Kultur Lp1, Mabtyp Benidorm (3-1 positiv), ST25 (einmalig)
 - 2 weitere stationäre Patienten serologisch positiv
 - 4 ambulante Patienten serologisch positiv
 - 7 Personen seronegativ
- Alle im Hotel B übernachtet
- keine Umweltuntersuchungen

- ich wende mich mit dieser Email an Sie, da ich gestern von meiner Hausverwaltung erfahren habe, dass die Legionellenprüfung in meinem Wohnhaus eine Legionellenkonzentration von 1700 KBE/100 ml, im Nachbarhaus sogar 2000 KBE/100 ml ergeben hat.
- Als Konsequenz wurde nun die Warmwassertemperatur erhöht, eine "intensive Spülung der Anlagen soll kurzfristig erfolgen" und "in den nächsten Wochen (!)" werden die Trinkwasseranlagen "in hygienischer und technischer Hinsicht überprüft". Bei letzterem Punkt erschreckt mich besonders der zeitliche Rahmen, der angegeben wird.
- Des Weiteren werden wir (hierbei" insbesondere Menschen mit Abwehrschwäche"), aufgefordert, Tätigkeiten, bei denen sich Aerosole bilden (Dampf, Nebel) zu vermeiden, vor dem Duschen das alte Wasser aerosolfrei ablaufen zu lassen, Duschköpfe und Perlatoren zu reinigen oder auszutauschen.
- Ich bin selber Gynäkologin und bin trotz meines Wissens, dass vorwiegend immunsupprimierte Menschen gefährdet sind und eine akute Gefährdung erst ab Werten > 10 000 KBE/100 ml zu befürchten ist, sehr besorgt und hinsichtlich der Verhaltensempfehlungen unsicher.
- Sehen Sie die Empfehlungen als ausreichend und korrekt?
- In meinem Badezimmer, in dem ich selbstverständlich heiss dusche und bade, entstehen bei jedem Duschvorgang Dämpfe. Diese sehe ich zum Beispiel deutlich im Lichtkegel unter den Deckenleuchten. Ich würde somit die Empfehlung, dass alle Vorgänge, bei denen Warmwasser verbraucht und dabei "Aerosole" = Dampf und Nebel entstehen, vermieden werden sollen so interpretieren müssen, dass ich quasi nicht heiss duschen darf.
- Der Hygienebeauftragte meines Krankenhauses hat zudem präzisiert, dass es nicht reicht, das alte Wasser vor dem Duschen kurz ablaufen zu lassen, sondern dass zur Sanierung täglich alle Warmwasserleitungen meiner Wohnung über je 15 Minuten bei Temperaturen > 55 ° laufen sollen.
- Welche konkreten Empfehlungen sprechen Sie bei der Legionellenkonzentration von 1700 KBE/100 ml aus? Sind die Empfehlungen, die meine Hausverwaltung schriftlich verteilt hat, korrekt? Und gelten diese nur für Immunsupprimierte oder auch für mich?
- Ergänzend habe ich noch eine weitere, spezifische Frage:
- Ich habe seit 5 Monaten eine Wundheilungsstörung periurethral unklarer Genese, die weder Gynäkologen noch Dermatologen schlüssig erklären können. Nach einer Probenentnahme im Wundbereich sollte ich täglich Sitzbäder mit Tannolact durchführen und die PE-Stelle "aussduschen". Seither ist die Wunde tendentiell schlechter geworden. Natürlich sind Wundinfekte mit Legionellen selten, dennoch bin ich nun diesbezüglich natürlich auch sehr verunsichert und habe große Sorge, mir durch die mir empfohlenen Massnahmen zur Abheilung Legionellen in die Wundregion gebracht habe, die den Wundheilungsprozess verhindern. Ein mikrobiologischer Abstrich ist erfolgt, gramnegative Stäbchen sind nachgewiesen, allerdings auch E. coli und Enterokokken, das Labor teilte mir jedoch mit, dass nach Legionellen nicht gesucht wird, da diese "nie" Wundinfekte verursachen würden".

Ausbruch Warstein

GA Soest



Urinantigentestung Warstein

Initial ICT-ELISA

- 2/31 positiv ICT
- 21/31 positiv ELISA

Gesamt

- 31/128 positiv ELISA
- 12/128 grenzwertig
(Konzentrierung notwendig)
- Gesamt 96 Urin-Antigen
positiv

OD Binax-Eia	Binax Bewertung	Wert Lab Lokal
4,65	positiv	pos
5,00	positiv	pos
1,00	positiv	neg
0,82	positiv	neg
0,64	positiv	neg
0,55	positiv	neg
0,86	positiv	neg
0,39	positiv	neg
0,42	positiv	neg
0,42	positiv	neg
0,35	positiv	neg
2,9	positiv	neg
1,67	positiv	neg



Typisierung klinischer Proben Warstein

strain	SG-Mab	ST	fla	pil	asd	mip	momp	pro	neu
L13-435	1 Knox	345	6	10	19	3	19	4	11
L13-438	1 Knox	345	6	10	19	3	19	4	11
L13-439	1 Knox	345	6	10	19	3	19	4	11
L13-443	3	93	3	10	0	0	14	9	13
L13-444	1 Knox	345	6	10	19	3	19	4	11
L13-445	1 Knox	345	6	10	19	3	19	4	11
L13-446	1 Knox	345	6	10	19	3	19	4	11
L13-473	1 Knox	345	6	10	19	3	19	4	11
L13-477	1 Knox	345	6	10	19	3	19	4	11
L13-P401	DNA SG1	345?	6	10	0	3	0	4	11
L13-P402	DNA SG1	???	6	10	1m3	5	21	1	1
L13-P436	DNA SG1	345?	6	10	0	3m2	19	0	11
L13-P733	DNA SG1	345?	6	10	0	3	19	4	11



Suche der Infektionsquelle

Patientenmaterial

2- 3 Kolonien



Wasserproben

mind. 10 Kolonien



1. Serologische Typisierung bei *L. pneumophila*:
Serogruppe, MAb Subtyp
bzw. Speziesbestimmung:
MALDI-TOF, DNA-Sequenz (mip, 16S rRNA)

2. Genomisches Fingerprint: SBT, (PFGE, AFLP, RAPD-PCR)

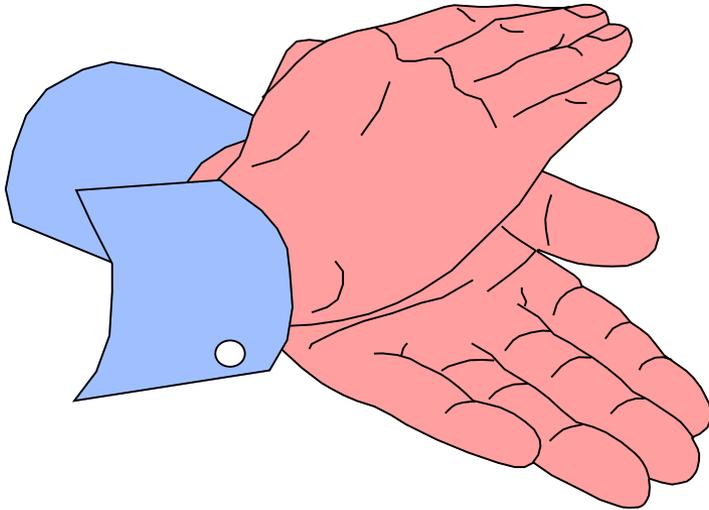
**Identität (Nichtunterscheidbarkeit) > Übertragung aus dem
Wassersystem**

Infektionsdosis für Legionella-Pneumonien im Meerschweinchen Tiermodell

Infektionsroute	(KbE)	Ref
Aerogen (Phil) 12/12 Fieber Aerogen LD50 Intraperitoneal LD50	129 140 000 1 000 000	Berendt, 1980
Stamm Corby aerogen Stamm Corby 100% letal, aerogen Stamm Phil keine Letalität, aerogen	220 4 000 1 000 0000	Jepras, 1985
Stamm Corby, intratracheal, LD50 Stamm Corby, intraperitoneal, LD50 Stamm Phil, intratracheal, LD50 Stamm Phil, intraperitoneal, LD50	1000 3000 – 5000 n.t. 5 000 000	Lück, unpubl.

Extrazellulär gewachsene Bakterien KbE = Bakterienzahl

Thanks to



Finanzielle Untertützung

BMBF

RKI

DFG

EU

Dr. Christine Steudel

Dr. Andrea Steidle

Dr. Jürgen Helbig

Jutta Paasche

Sigrid Gäbler

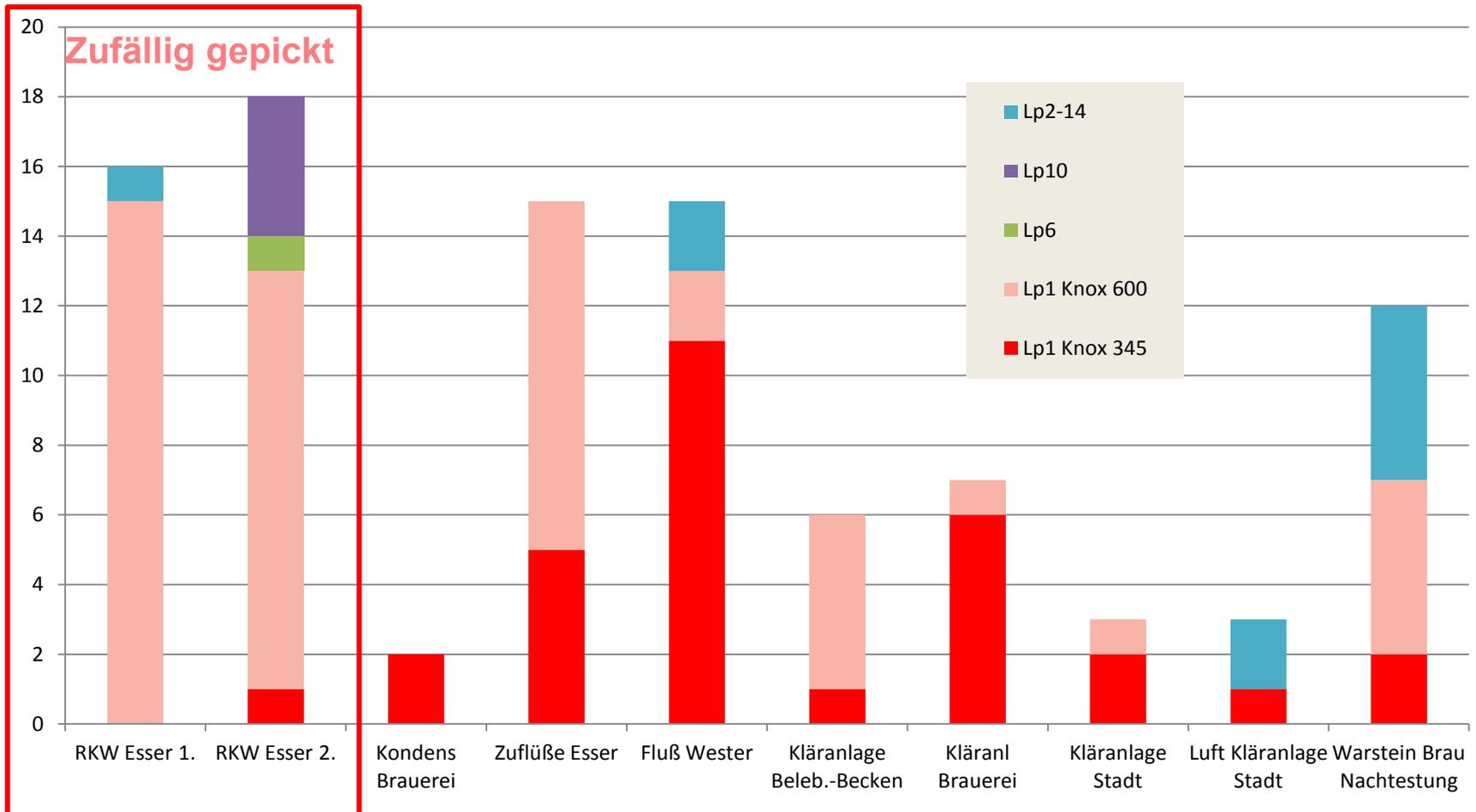
Kerstin Lück

Tetyana Koshkolda

Prof. Dr. med. Enno Jacobs

Typisierung Wasser-Proben Warstein

238 Wasserproben untersucht, 17 positiv



Unterschiedliche Kolonie-Varianten im Wasser



- Lp1 Knox ST 600
- Lp2-14
- Lp1 Knox ST 345

Zeitraum bis zum Nachweis des Epidemiestammes in 2 verdächtigen RKW

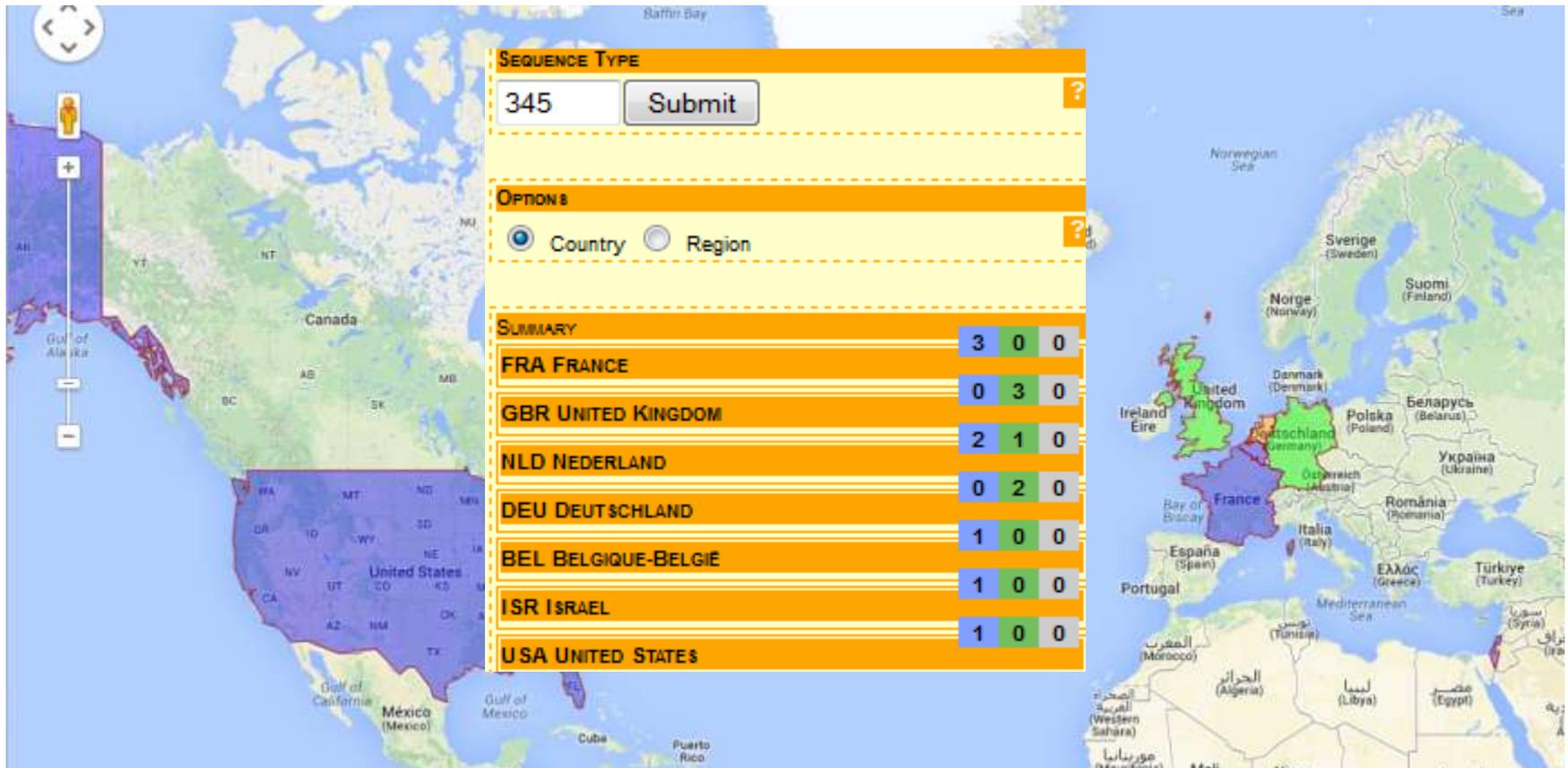
Brauerei

- Probennahme Warsteiner Brauerei und Desinfektion des Rückkühlwerkes: 20.8. 2013
- Ergebnis Feintypisierung mit Nachweis Epidemiestamm:
9.9.2013

Esser

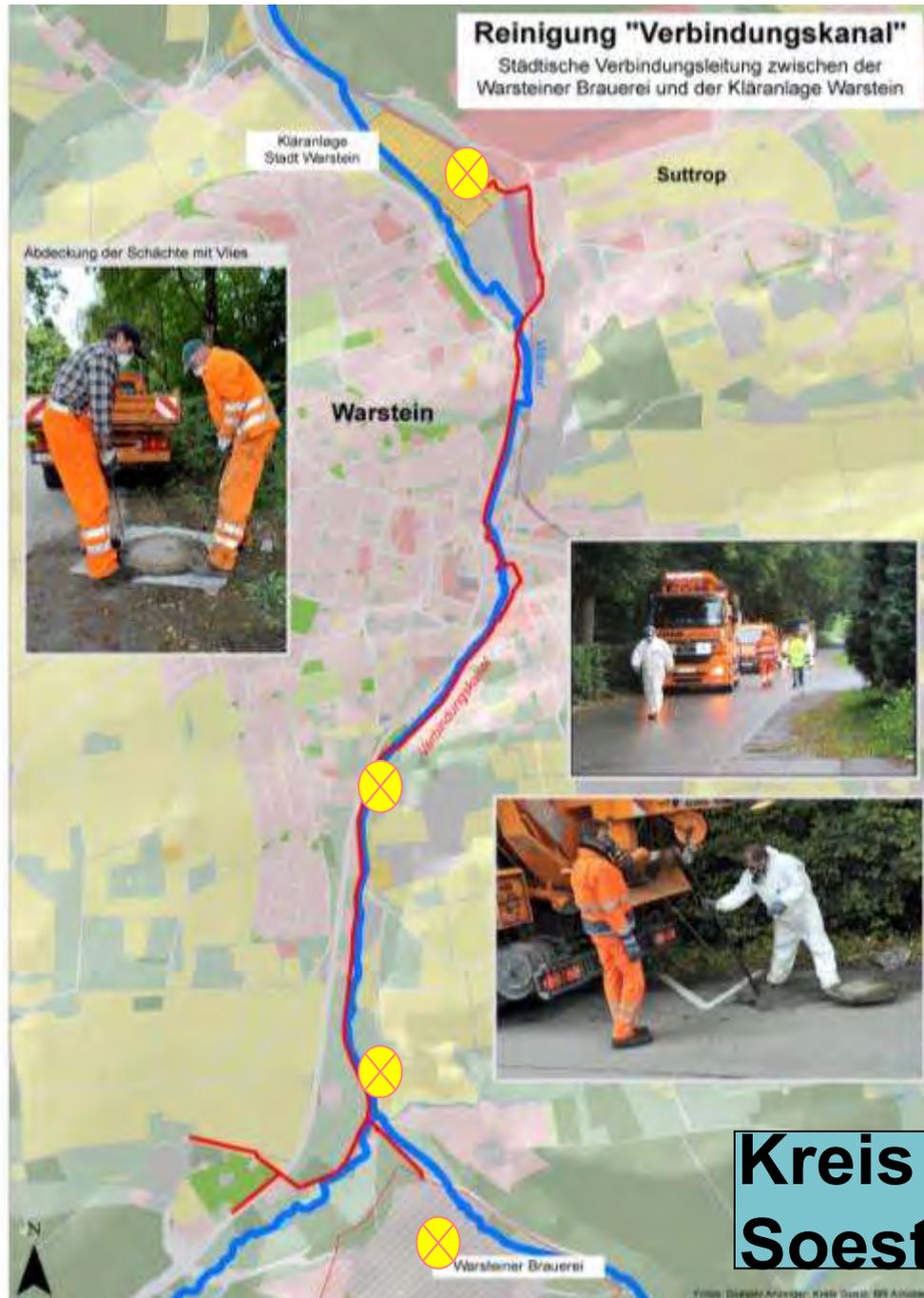
- Probenahme Fa. Esser und Schließung des Rückkühlwerkes 21.8.2013
- Hohe Kontamination:
26.8.2013
- Ergebnis Feintypisierung mit Nachweis Epidemiestamm:
3.9.2013

ST 345 (09.12.2013) EWGLI Data



Reinigung "Verbindungs kanal"

Städtische Verbindungsleitung zwischen der Warsteiner Brauerei und der Kläranlage Warstein

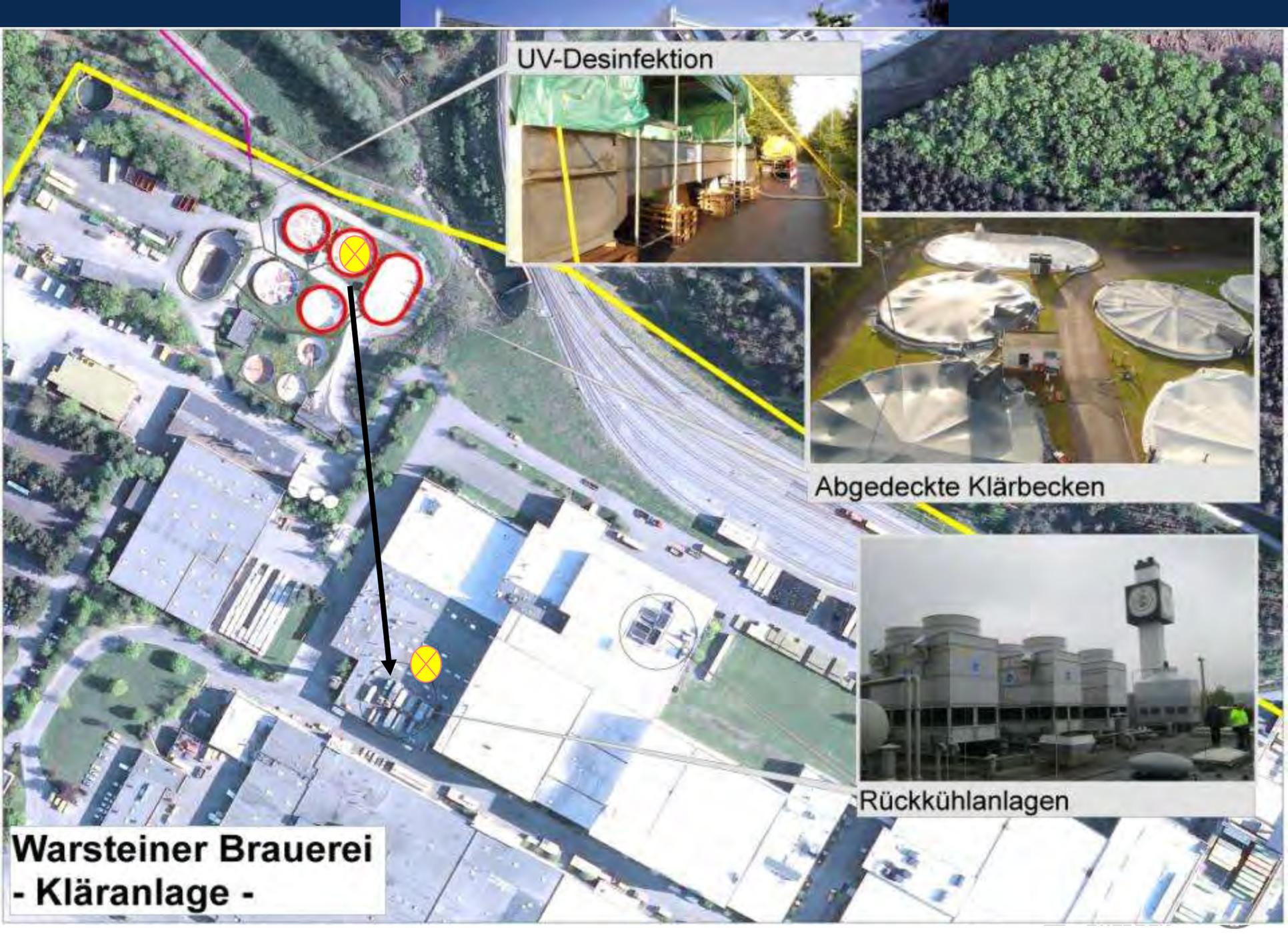


Abdeckung der Schächte mit Vlies



ST345

**Kreis
Soest**



UV-Desinfektion



Abgedeckte Klärbecken



Rückkühlanlagen

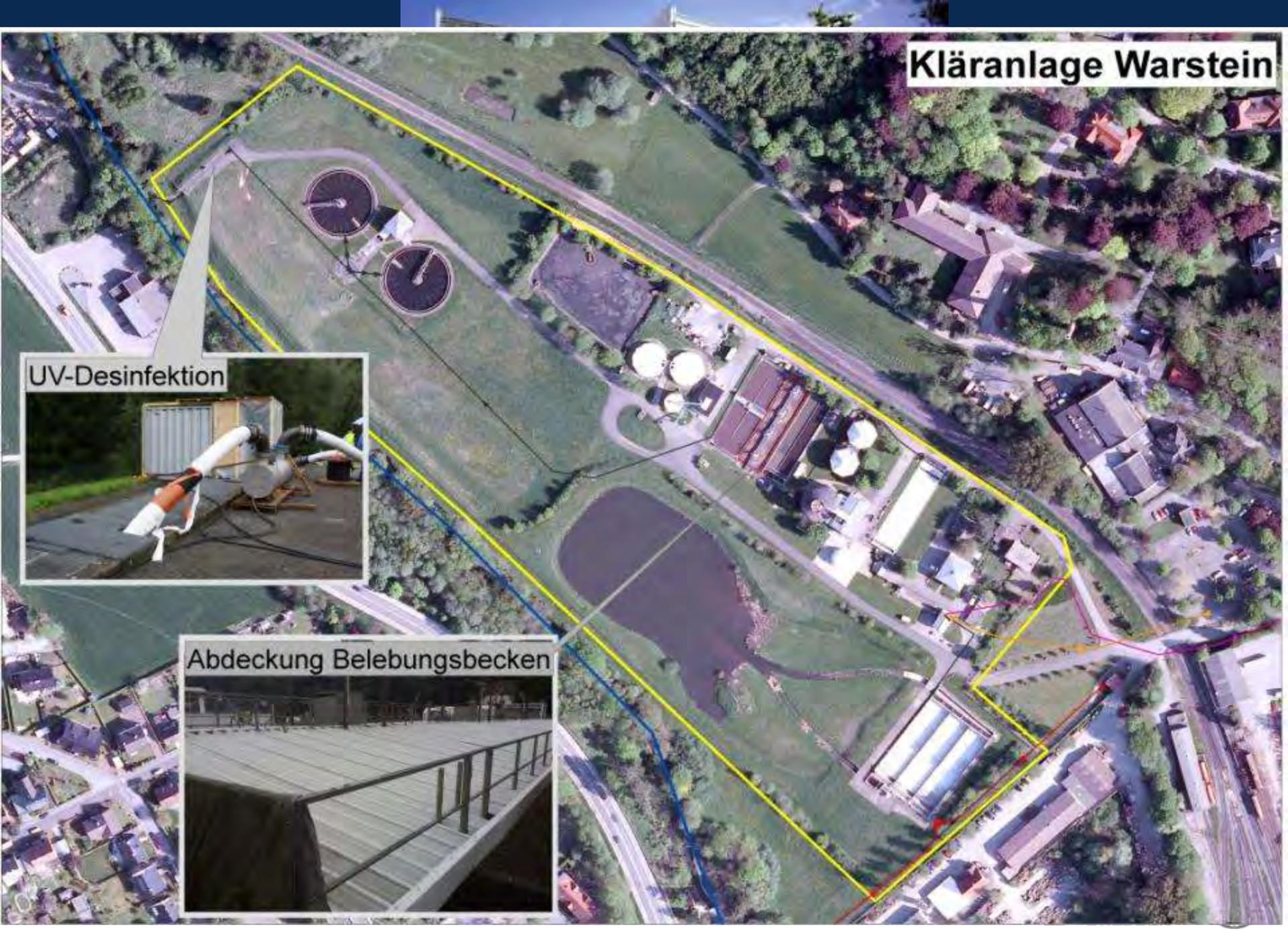
**Warsteiner Brauerei
- Kläranlage -**

Kläranlage Warstein

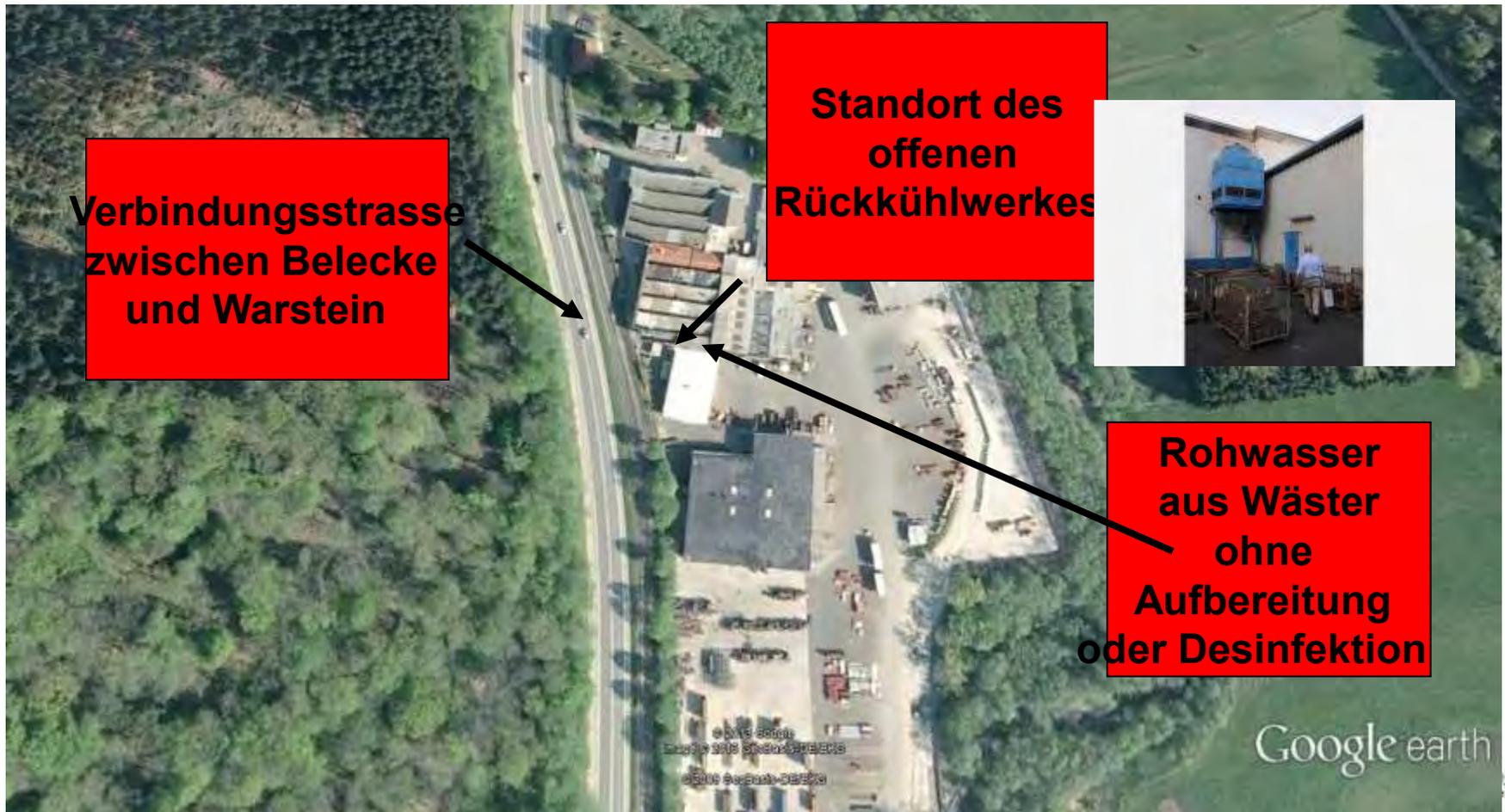
UV-Desinfektion



Abdeckung Belebungsbecken



Standort Fa. Esser



Verlauf der Kanalisation für Mischwasserkanalisation und Brauereiabwasser

**Abwasserkanalisation
Brauerei im
Bereich Bürgersteig**



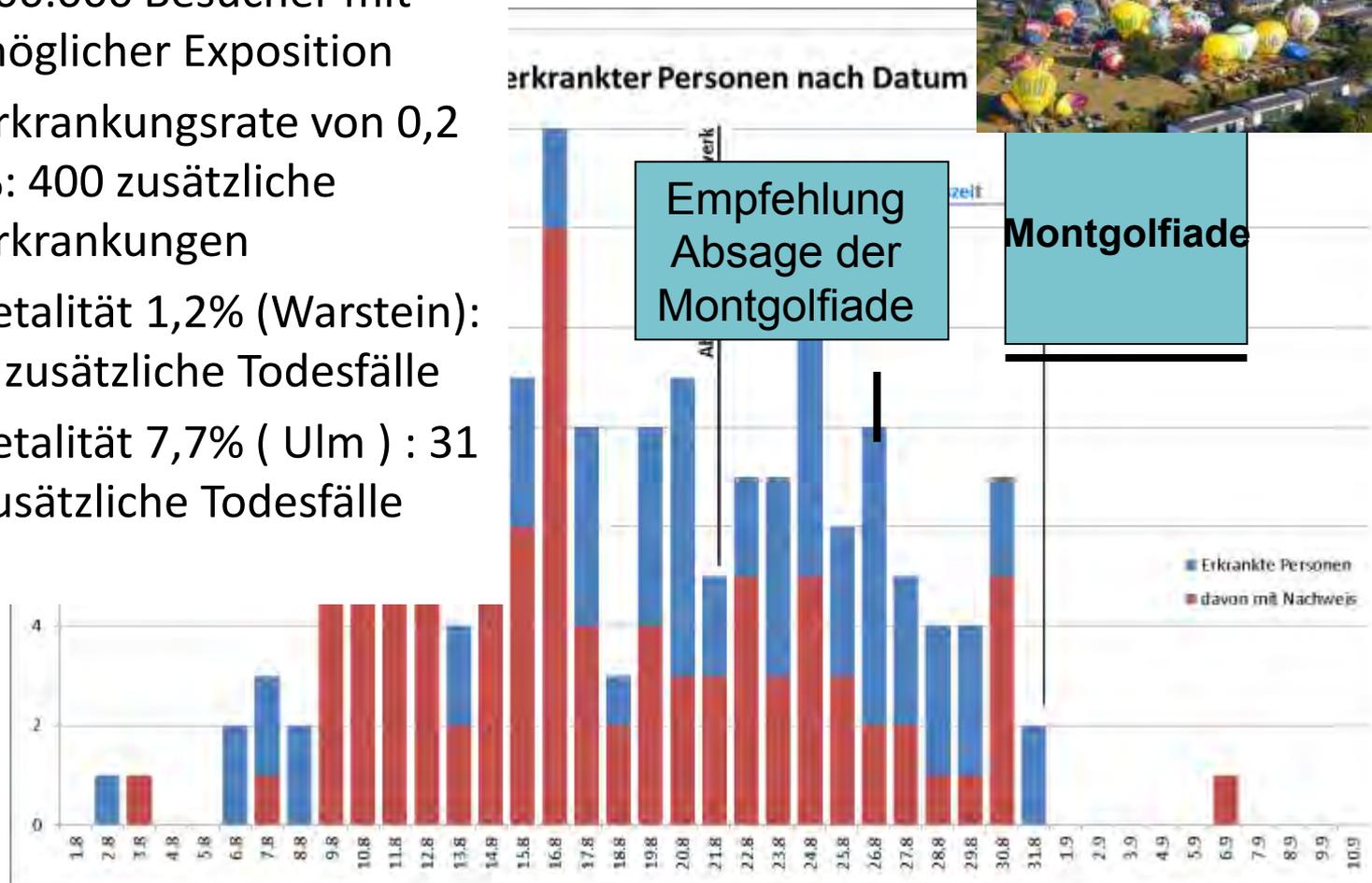
**Mischwasser-
kanalisation in
Strassenmitte**

Reiseverbot ??

- **Warsteiner Bürger:**
 - gute Informationslage der Bevölkerung
 - bei Symptomen direkt zum Arzt,
 - Sicherstellung umgehender Diagnostik und adäquater Therapie
 - ein Krankenhaus „Maria Hilf“
- **Reisende:**
 - Informationslage ?, bei Durchreise und nach Verlassen während Inkubationszeit,
 - Manifestation nach 4 – 10 (20) Tagen,
 - Diagnostik und adäquate Therapie mit Risiko erhöhter Komplikationsrate und Letalität

Zeitlinie der Legionellosen

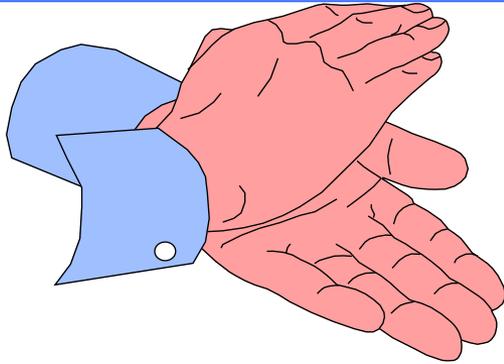
- 200.000 Besucher mit möglicher Exposition
- Erkrankungsrate von 0,2 %: 400 zusätzliche Erkrankungen
- Letalität 1,2% (Warstein): 5 zusätzliche Todesfälle
- Letalität 7,7% (Ulm) : 31 zusätzliche Todesfälle



Zusammenfassung

- Legionellen sind weitverbreitete Wasserbakterien
- Vermehrung im 25-46°C warmen Wasser
- Vorgeschädigte Personen sind besonders empfänglich
 - **„ an Legionellose denken“**
 - **Diagnostik !!**
- Es gibt keine Dosis- Wirkung – Korrelation
- Keine „exakten“ Grenzwerte für Menge im Wasser
- Virulente Klone für die Mehrzahl der Infektionen verantwortlich
- Viele Legionellen sind harmlos – aber welche ???
- Präventiv: Hoherhitzen, Chlorung, Filter
- Wasser:
 - **Kaltes Wasser <20°C**
 - **Warmes Wasser >60°C**
 - **Wasser muß fließen**

**Danke für die
Aufmerksamkeit**



**Financial support
BMBF
RKI
DFG
EU**

IMMH

Dr. Jürgen Helbig

Sigrid Gäbler

Kerstin Lück

Susann Menzel

Tetyana Koshkolda

Markus Petzold

Prof. Dr. med. Enno Jacobs

RKI:

Klaus Heuner

Health Dept. Soest

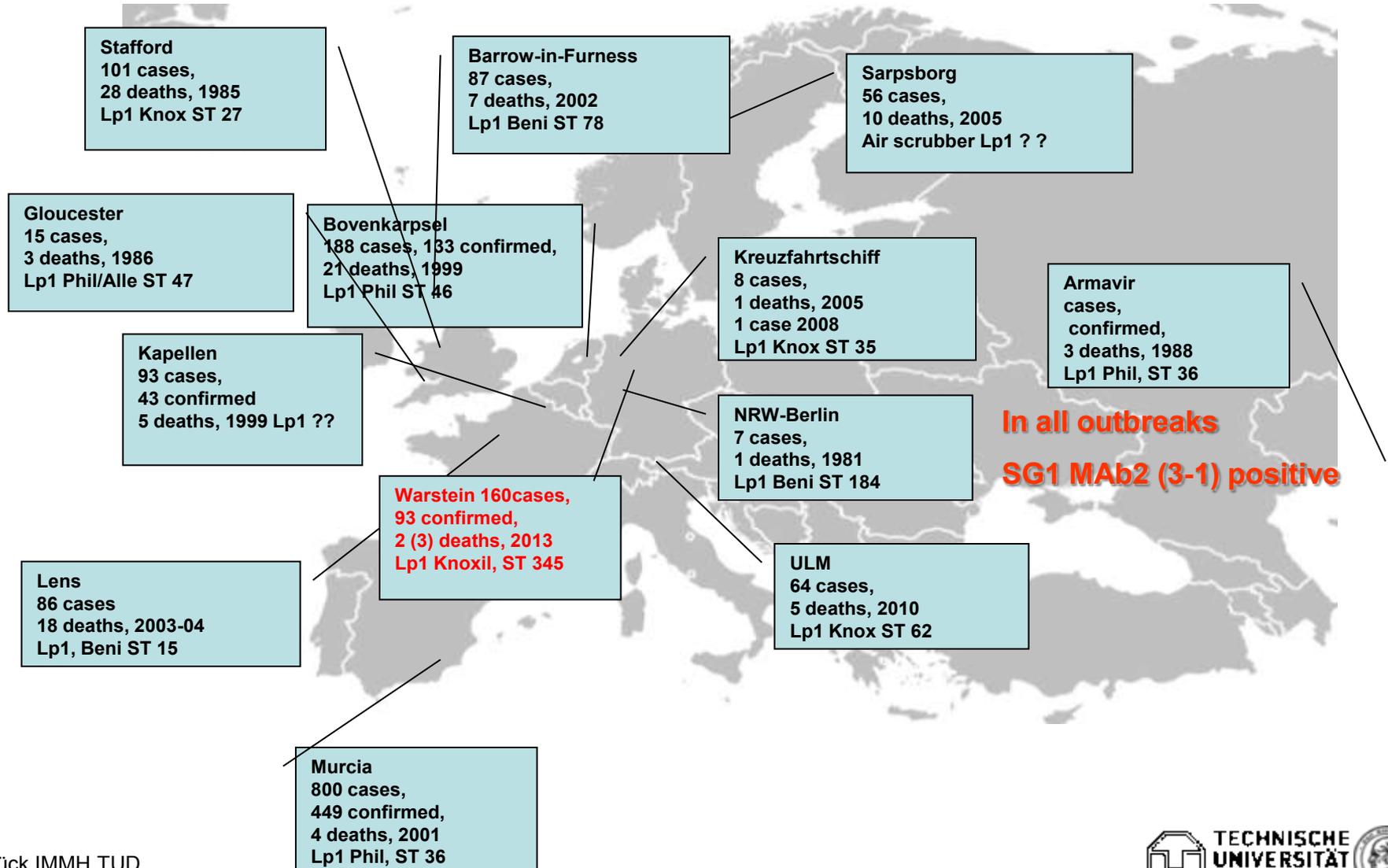
Dr. Brockmann

Prof Dr. Martin Exner

Legionella Ausbruch in Warstein

- 160 Pneumoniefälle vom 1. August bis 6. September
- 89 cases were confirmed as Legionella infection either by urinary antigen detection, culture and /or PCR in respiratory samples.
- 2 patients needed intensive care treatment.
- 2 (3) Todesfälle.
- Klinische Isolate von 7 Patienten: L. pneumophila, Serogruppe 1, Mab Subtyp Knoxville, ST 345.
- nSBT direkt aus klinischen Proben - gleicher Stamm
- Dieser Epidemiestamm wurde gefunden
 - 2 RKW von 2 Firmen
 - Klärwerk weiteren Umweltquellen.
- Nur ca. 10% der Isolate
- Nach dem 6. September keine weiteren Infektionen durch ST345
- 1 Isolat vom November war L. pneumophila, Sg 1, Mab Subtyp Philadelphia, ST 23.

Outbreaks Legionnaires' disease in Europa





Schlussfolgerungen Ausbruch Warstein

- Aufgrund Feintypisierung 2 Emittenten für Epidemiestamm nachgewiesen (Rückkühlwerk Warsteiner Brauerei und Fa. Esser) – beide wurden am 20./ 21.8. entweder desinfiziert bzw. abgestellt und unter Kontrolle gebracht. Andere Emittenten derzeit nicht nachgewiesen
- Über Vorklärbecken der Brauerei (insbeso. Biobecken) Entstehung hoher Legionellenkonzentrationen mit Möglichkeit der Verdriftung in Rückkühlwerk der Brauerei sowie über Abwasserkanal der Brauerei Eintrag in kommunale Kläranlage mit Vermehrungsmöglichkeit in Belebungsbecken und Tropfkörper der kommunalen Kläranlage.
- Abwasserkanal der Brauerei durch Innenstadt Warstein als Emittent derzeit sicher bewertbar – bislang in Literatur nicht behandelt – weiterer Klärungsbedarf.
- Ab Einlauf Kläranlageneinlauf in Wäster nachhaltige Kontamination von Wäster und Möhne mit hohen Legionellenkonzentrationen einschließlich Epidemiestamm bis Möhnesee
- Hierdurch Kontamination von Rückkühlwasser der Fa. Esser und möglicher anderer Nutzer von Wäster und Mohnwasser

Kontrollmaßnahmen Ausbruch Warstein

- - Schließung Rückkühlwerk Fa. Esser
- - Desinfektion der Rückkühlwerke der Brauerei (kontinuierlich mittels Chlordioxid in Kühlwasser)
- - Abdecken der Vorklärbecken der Brauerei zur Minimierung einer Verdriftung zu Rückkühlwerken
- - Desinfektion der Vorklärbecken
- - UV- Desinfektion des Abwassers vor Einleitung in Abwasserkanal
- - Reinigung des Abwasserkanals und Einlegen von Fliesmatten in Kanaldeckel zur Minimierung einer Emission

To do Liste für die nächste Zukunft (Prof. Exner)

Politik:

- - BMU: kurzfristig Bundeseinheitliche Verordnung zur Registrierung, Untersuchung und zum Betrieb von Rückkühlwerken und Luftwäschern – Umsetzung durch die Länder – Schulung des Wartungspersonal muss verpflichtend geregelt werden
- - Initiierung entsprechender Regularien in der EU

Technische Regeln:

- - VDI- Richtlinie 2047 und 2050 kurzfristig fertig stellen – Bedeutung von Füllwasser und Klärbecken in Nähe von Rückkühlwerken

To do Liste für die nächste Zukunft (Prof. Exner)

Desinfektion:

- - Prüfung und Listung von Desinfektionsverfahren zur Desinfektion von Rückkühlwerken und Luftwäschern z.B. in VAH- Desinfektionsmittel- Liste nach DIN EN 13623.
- - nur geprüfte und gelistete Desinfektionsmittel dürfen für Rückkühlwerke und Luftwäscher zukünftig verwendet werden.
- Bedeutung geeigneter Enthemmern bei mikrobiologischer Untersuchung von Rückkühlwerken zur Vermeidung falsch negativer Ergebnisse

To do Liste für die nächste Zukunft (Prof. Exner)

Untersuchungsprogramm:

- - Kläranlagen mit Belastungsprofil in Abhängigkeit von aufzubereitendem Abwasser
- - Einfluss von Brauereiabwasser und anderen Legionellen Wachstum fördernden Abwässern
- - Vermehrungskinetik von Legionellen in unterschiedlichen Abwässern
- - Gewässerprofil und Ursachenabklärung bei erhöhten Legionellenbelastungen

LPS-biosynthesis locus of 12 *L. pneumophila* Sg1 strains

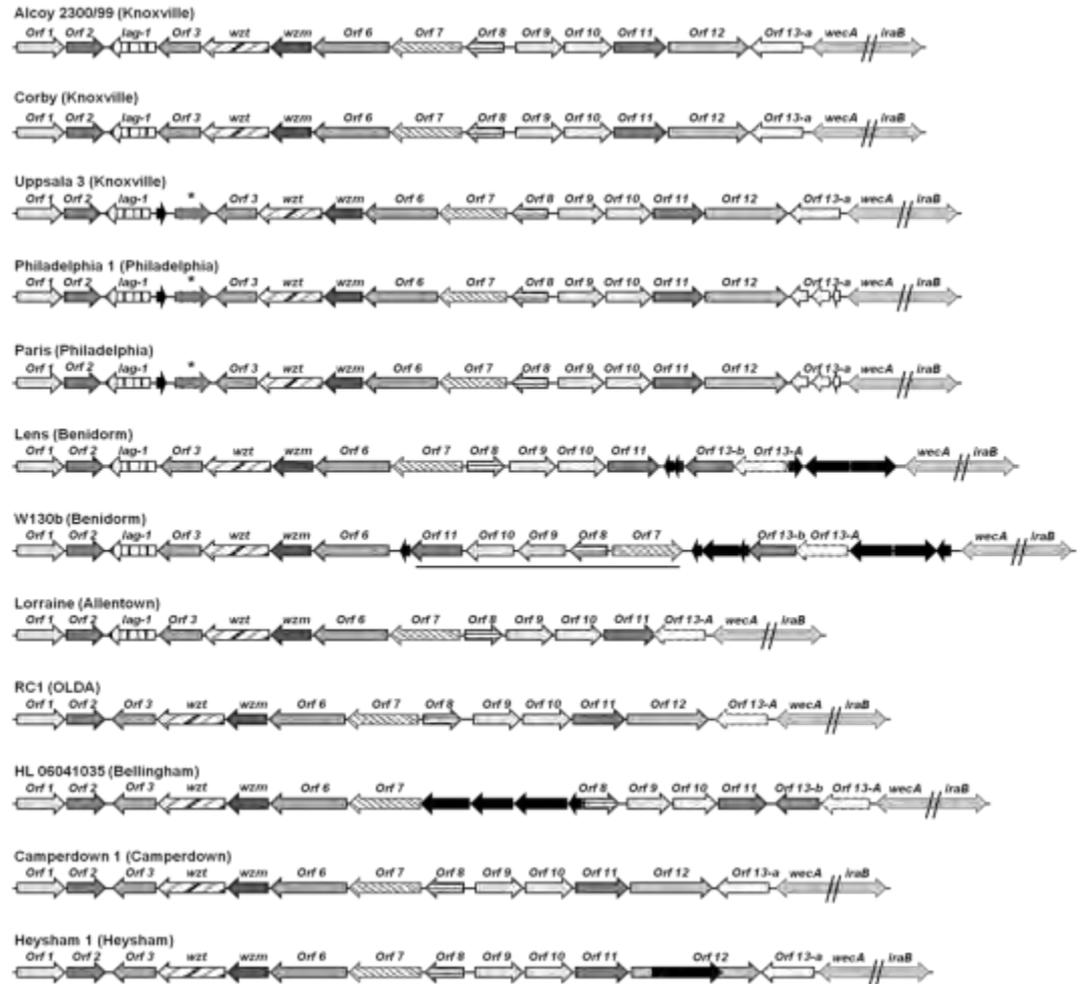
corresponding monoclonal subgroup (in brackets).

direction of transcription is indicated by arrowheads.

filled black arrows indicate transposable elements

Asterisk in Uppsala 3, Philadelphia 1 and Paris indicates a partial ORF 2 duplication (ORF 2 like)

Orfs 7 - 11 of W130b represent an inversion.



CRISPR-Associated Gene *cas2* of *L. pneumophila* Is Required for Intracellular Infection of Amoebae

- clustered regularly interspaced palindromic repeat (CRISPR)
- On *lvh* genomic island
- have been linked to phage and plasmid immunity
- *cas2* mutants, grew typically in macrophages,
- significantly impaired for infection of both *Hartmannella* and *Acanthamoeba* species.
- A complemented *cas2* mutant infected the amoebae at wild-type levels

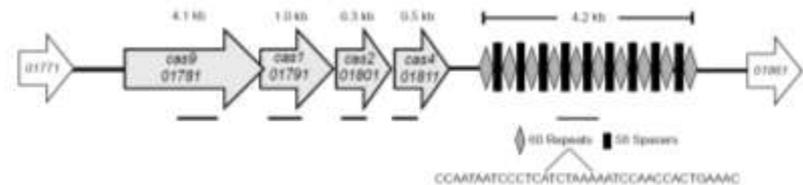
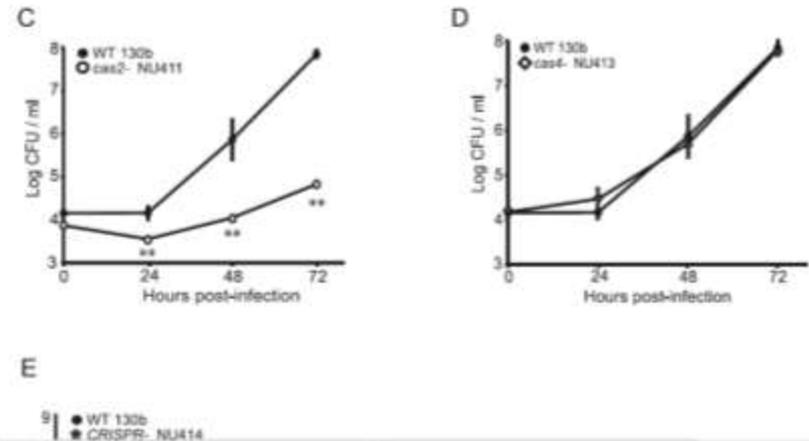


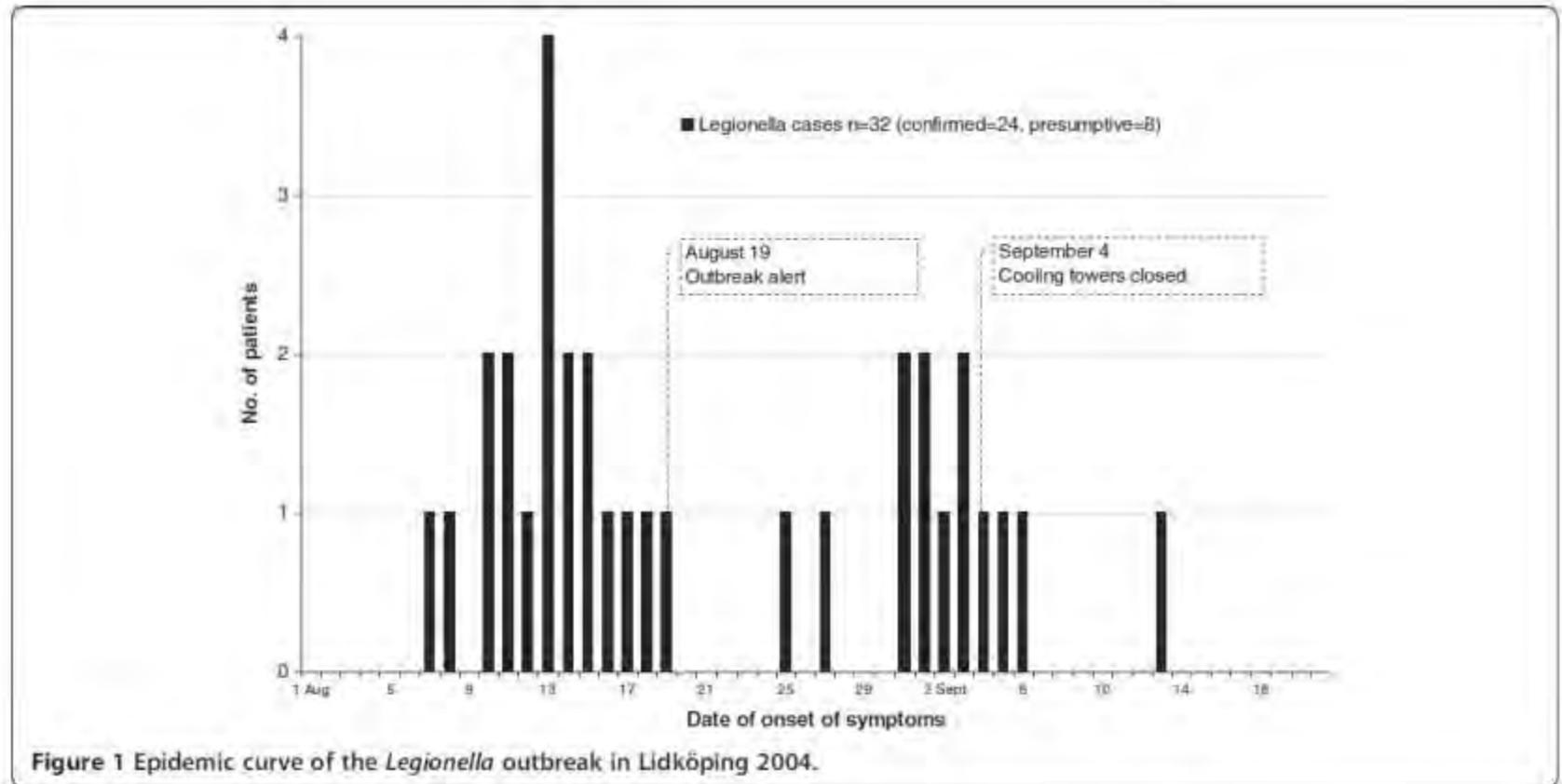
FIG 1. The CRISPR-Cas locus of *L. pneumophila* strain 130b. Horizontal arrows denote the location and orientations of *cas0*, *cas1*, *cas2*, and *cas4*, which are designated in the 130b genome as *lpe_01781*, *lpe_01791*, *lpe_01801*, and *lpe_01811*. Above the arrows, the size of the genes is indicated. There is a 3-bp overlap between *cas0* and *cas1*, a 7-bp gap between *cas1* and *cas2*, and a 60-bp gap between *cas2* and *cas4*. Located 216 bp downstream of the genes is a 4.2-kb CRISPR array which consists of 37 79-bp direct repeats (grey diamonds) separated by 18 spacers that vary in size between 34 and 38 bp (black bars). The sequence of the repeats is indicated below the map. The CRISPR-Cas locus is bounded on one side by *lpe_01771* and on the other by *lpe_01861*. There are 470 bp between the end of *lpe_01771* and the start of *cas0* and 427 bp between the end of the CRISPR array and *lpe_01861*. The thin lines underneath signify the approximate size and location of transcripts identified by RT-PCR.



Conclusions

- Identification of strains was
 - highly reproducible,
 - Discriminating IOD Micro array \geq SBT
 - epidemiologically concordant.
- Facilitated rapid and reliable detection of strain-specific determinants
- Correlation with the current ST scheme
- Some ST can be subdivided further
- Can be used for rapid and high-throughput typing of *L. pneumophila* serogroup 1.

Ulleryd et al. BMC Infectious Diseases 2012, 12:313



Pneumonia ST332 – community acquired or nosocomial ?

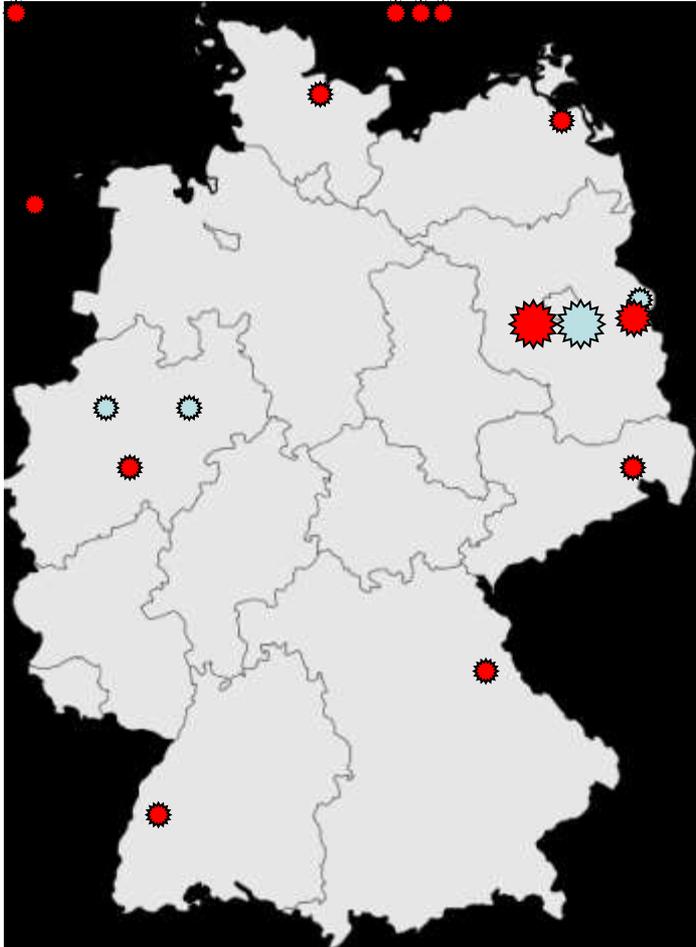
- Nov. 2008 – 73y male patient – hospitalised for pacemaker implantation
- 5 days later cardiac arrest
- ICU of a large hospital - pneumonia
 - culture *L. pneumophila*, Sg1, MAotyp Philadelphia, ST322
- Water in the hospital
 - 2/2 positive, 82-120KbE/100ml,
 - *L. pneumophila*, Sg1, MAotyp Philadelphia, ST322
- Water in the private household
 - 8/9 positive, 150-200KbE/100ml
 - *L. pneumophila*, Sg1, MAotyp Philadelphia, ST322
- Strains were indistinguishable by PFGE, RAPD-PCR, VNTR
 - distance hospital – private house ca. 1km
- Jan 2010 - 64J female - nosocomial
 - Direct SBT from clinical sample - ST 332,
 - private home- no *Legionella* detected

ST 332 nosocomial cluster

December 2003 - April 2004

- 5 nosocomial cases –
- All patients older 77y
- Diagnosed by urinary antigen detection – no clinical isolates
- One patient died
- Water samples from the hospital: Lp1 –
 - no further subtyping
- Water supply was hyperchlorinated

ST 182



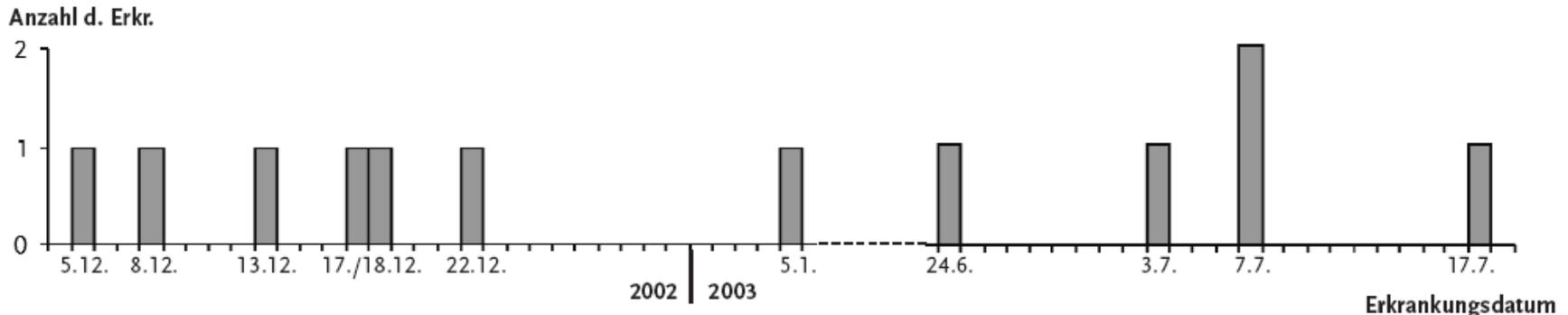
- Only strains of Knoxville and Denver subtypes
- Two of the Denver subtype strains have mutations in the lag -1 gene
- Caused:
 - nosocomial clusters in Berlin and Frankfurt/Oder
 - Single travel associated cases in tourists from Germany, DK and the UK
 - 12/ 22 unrelated CAP cases in Berlin
 - Single cases in Germany
- Environmental strains without relation to clinical cases: Dental units in Berlin and Dresden, warm water supplies Berlin 12/ 26 unrelated strains)
- One strain from the Netherlands

Multigenome Analysis of *Legionella pneumophila*

Cazalet et al., Paris (Genome Research 03/2008)

Genes	<i>L. pneumophila</i>		Other species	Occurrence of the genes in <i>Lp</i>		
	Serogroup 1	Other serogroups		Sg1 (total: 151)	Non-Sg1 (total: 66)	
ORF 28 ORF 27 ORF 26	[Redacted]		[Redacted]	151	65	
<i>hisF</i>				151	52	
<i>hisH</i>				151	35	
ORF 25 ORF 24	[Redacted]		[Redacted]	151	33	
<i>neuA</i>				151	66	
<i>neuB</i>				151	66	
<i>neuC</i>				151	65	
ORF 22 ORF 21				<i>lpp0820</i>	151	66
ORF 20				<i>lpp0821</i>	151	66
ORF 19				<i>rmIC</i>	151	66
ORF 18				<i>rmID</i>	151	65
ORF 17				<i>rmIB</i>	151	66
ORF 16				<i>gpi</i>	151	66
ORF 15	<i>rmIA</i>	151	66			
ORF 14	<i>lpp0827</i>	150	3			
ORF 12	<i>wecA</i>	149	4			
ORF 11	<i>lpp0830</i>	92	1			
ORF 10	<i>lpp0831</i>	150	0			
ORF 9	<i>lpp0832</i>	148	0			
ORF 8	<i>lpp0833</i>	150	1			
ORF 7	<i>lpp0834</i>	123	0			
ORF 6	<i>lpp0835</i>	96	0			
ORF 5	<i>lpp0836</i>	150	1			
ORF 4	<i>wzm</i>	150	0			
ORF 3	<i>wzt</i>	150	0			
ORF 2	<i>lpp0839</i>	128	1			
ORF 1	<i>lag-1</i>	94	0			
	<i>lpp0842</i>	150	3			
	<i>lpp0843</i>	150	3			

Nosocomial outbreak Frankfurt/O



IQ = Warmwater supply

- Legionella count initially up to 200/ml (20 000/100ml),
- After superheating up to 15 /ml
- Warm water pipes close to the cold water supply (up to 28,7°C): >200/ml
- Epidemic strain
 - **Lp1 Knoxville ST182**
 - Lp 1 Philadelphia/OLDA ST1
 - Lp 6
 - L. gormanis, L. anisa
- Since August 2003 no further cases

Conclusion

Strains with defined monoclonal subtype (Mab-type) and sequence type (ST) might be restricted to defined areas

They are responsible for single cases , clusters and outbreaks of community aquired, Travel associated and nosocomila origin

Many thanks to:

Carolin Dix

Kerstin Lück

Susann Menzel

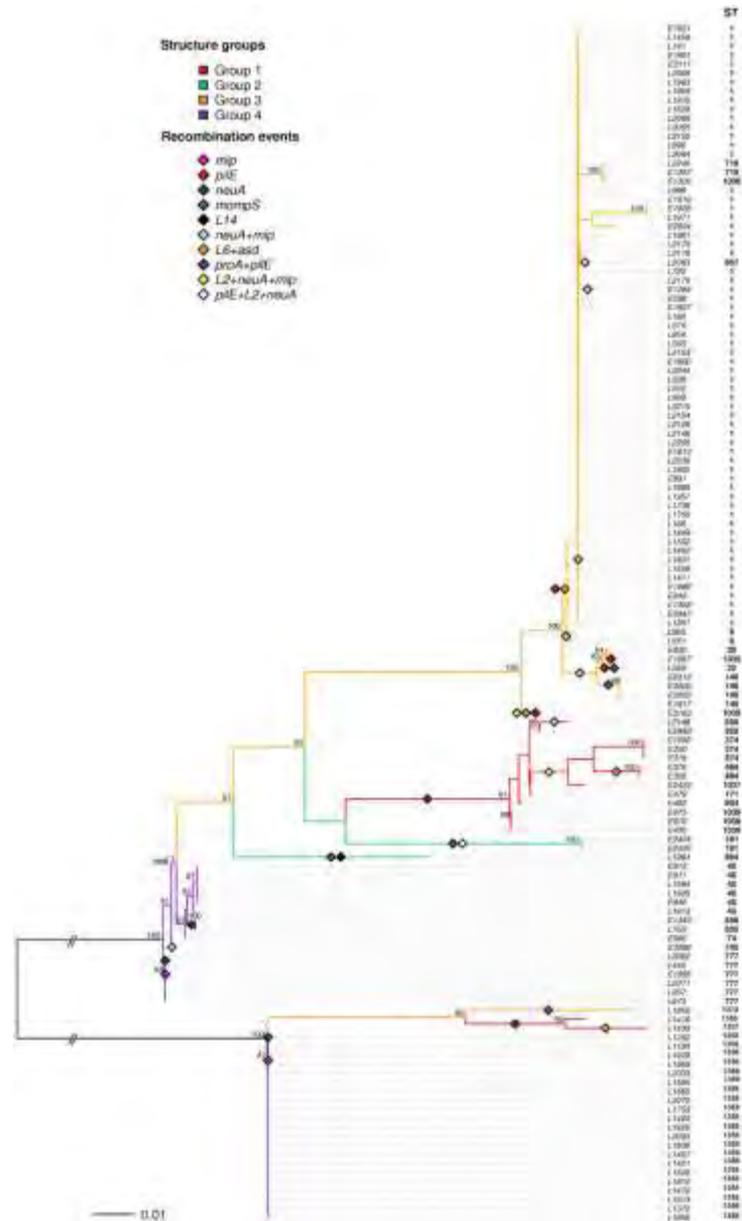
Dr. Jürgen Helbig

Prof. Dr. Enno Jacobs

Genetic Characterization of Legionella pneumophila Isolated from a Common Watershed in Comunidad Valenciana, Spain

the population structure of these environmental samples results from the joint action of a global, widespread ST-1 along with genetic differentiation at shorter geographic distances, which in this case are related to the common watershed for the BV localities

Sances et al. PLOS2013



Legionella Pneumophila Serogroup 1 strains in Saxonian Hospitals

■ **Methods**

- **7-gene sequence based typing: fla, pile, asd, mip, momp, proA, neuA**
- **Assignment of specific allele number by SBT database or online sequence type checker**
- **Allelic profile or SBT: combination of the seven alleles at each of the loci using predetermined order**

DNA-Sequenz
Gen A

GCTATCAGT 1
GCTATAAGT 2
GC**G**ATCAGT 3
GC**G**ATCAGT 3

DNA-Sequenz
Gen B

GTCCGTATG 1
GTCC**G**TATG 2
GTCCGTATG 1
GTCCGTATG 1

DNA-Sequenz
Gen C

GATCGTATGC 1
GATA**A**GTATGC 2
GATA**A**GTATGC 2
GATA**A**GTATGC 2

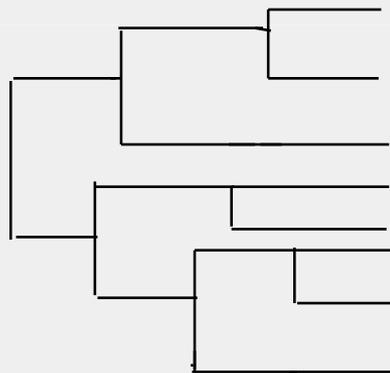
DNA-Sequenz
Gen D

CAGTCCGTA 1
CAGTCCGTA 1
CAGTCC**C**TA 2
CAGTCC**C**TA 2

DNA-Sequenz
Gen E

GGCCGTATG 1
GTCCGTATG 2
GTCCGTATG 2
GTCCGTATG 2

SequenzA--SequenzB--SequenzC--SequenzD--SequenzE



Strain 1	1	1	1	1	1	ST 1
Strain 2	2	2	2	1	2	ST 2
Strain 3	3	1	2	2	2	ST 3
Strain 4	3	1	2	2	2	ST 3

Infektionsquellen Legionella-Pneumonien

Häufig	Warmwassersysteme in der häuslichen Umgebung, in Hotels, Bädern, im Krankenhaus, etc.
	Rückkühlwerke mit „feuchter Kühlung“
	Whirl Pools
Selten	Thermalbäder,
	Befeuchter in Restaurants und Geschäften (Lebensmittel), Inhalatoren
	Zimmer-/ Zierspringbrunnen,
Sehr selten	Geburtswannen
	Magenspülsonde/ Transoesophageale Echo-Sonde (Leitungswasser)
	Wundinfektionen nach Baden, Eismaschinen
	Dentaleinheiten
	Strassenbefeuchtungsmaschinen
	Scheibenwischernanlage ,
	Gartenerde (L. longbeachae)
(noch) nicht:	Gewächshäuser, Autowaschanlagen,

TABLE 3. Comparison of allelic profiles obtained from cultured isolates and the corresponding respiratory samples*

Patient identifier ^a	Sample type	No. of loci	Allelic no.								
			<i>hC</i>	<i>plE</i>	<i>ant</i>	<i>omp</i>	<i>momp5</i>	<i>proA</i>	L2	L6	L14
675	Sputum	9	3	10	1	12	14	9	5	4	2
675	Isolate	9	3	10	1	12	14	9	5	4	2
1864	Sputum	9	1	4	3	1	1	1	3	3	4
1864	Isolate	9	1	4	3	1	1	1	3	3	4
1889	BAS	7	2		9	10	2	1	2		5
1889	Isolate	9	2	3	9	10	2	1	2	2	5
2049	Sputum	5		10	1	12		9	5		
2049	Isolate	9	3	10	1	12	14	9	5	4	32
5532	Sputum	9	6	10	15	28	4	9	5	1	29
5532	Isolate	9	6	10	15	28	4	9	5	1	29
5876	Sputum	5		4		5	18	5		15	
5876	Isolate	9	2	4	5	5	18	5	16	15	5
5876	BAS	8	2	4	5	5	18	5	16		5
8529	Sputum	2	1			1					
8529	Isolate	9	1	4	3	1	1	1	3	3	4
8819	Sputum	8	21	14	28	15	15	29		13	27
8819	Isolate	9	21	14	28	15	15	29	7	13	27
31687	BAS	9	4	7	11	3	11	12	3	1	1
31687	Isolate	9	4	7	11	3	11	12	3	1	1
699*	Sputum	7	6	10	15	13	9	14		1	
699*	Isolate	9	6	10	15	13	9	14	5	1	14
1130*	Sputum	3	6		15					1	
1130*	Isolate	9	6	10	15	3	9	14	5	1	30
1380*	Isolate	9	6	10	15	13	9	14	5	1	14
1380*	Sputum	9	6	10	15	13	9	14	5	1	14
1795*	Sputum	9	6	10	15	3	9	14	5	1	30
1795*	Isolate	4	6	10	15	3	9	14	5	1	30
2039*	Sputum	8	9	10	15	3	9	13	5	1	
2039*	Isolate	9	6	10	15	3	9	14	5	1	30
7758*	Sputum	9	6	10	15	13	9	14	5	1	14
7758*	Isolate	9	6	10	15	13	9	14	5	1	14
7895*	Sputum	9	6	10	15	13	9	14	5	1	14
7895*	Isolate	9	6	10	15	13	9	14	5	1	14
8772*	Isolate	9	6	10	15	13	9	14	5	1	14
8772*	Sputum	9	6	10	15	13	9	14	5	1	14
9083*	Sputum	6	6		15	13	9	14		1	
9083*	Isolate	9	6	10	15	13	9	14	5	1	14
9205*	Sputum	8	6	10	15	13	9	14	5	1	
9205*	Isolate	9	6	10	15	13	9	14	5	1	14

Downloaded from jcm.asm.org by Paul Christ Luck on September 1, 2009



Direct sequencing from patients material

Reviews on Clinical Microbiology, Sept. 2010, p. 281-284
0895-1171/10/090281-04. doi:10.1128/CMR.00264-10
Copyright © 2010, American Society for Microbiology. All Rights Reserved.

Vol. 47, No. 9

Direct Sequencing of *Legionella pneumophila* from Respiratory Samples for Sequence-Based Typing Analysis[†]

Mireia Casanella* and Fernando González-Candelas

Immunology in Biomedical and Biological Sciences and Department of Genetics, University of Valencia, CIBER Epidemiología y Salud Pública (CIBERESP), Area Genómica y Salud, Centro Superior de Investigación en Salud Pública, Valencia, Spain

Received 4 February 2010/Returned for modification 3 April 2010/accepted 16 July 2010

We have developed a procedure to test the efficiency and reliability of sequencing of *Legionella pneumophila* genes directly from respiratory samples and have compared the results with those derived from cultured isolates. We tried to obtain the nucleotide sequences of six protein-coding loci included in the sequence-based typing scheme for *Legionella pneumophila* and three intergenic regions from 132 samples corresponding to 106 patients positive for urine antigen. A streamlined PCR approach was used to amplify and sequence these nine loci directly from respiratory samples. Nucleotide sequences were directly obtained for 22 *Legionella* isolates and also for 66 respiratory secretions from a total of 69 patients. The efficiency of sequencing from respiratory secretions was higher than that of sequencing after the isolation of the *Legionella* isolates. Moreover, the perfect match between the sequences obtained by both approaches when respiratory samples and cultured isolates from the same patient were available corroborates the suitability of the direct sequencing approach for the identification of *Legionella* species and molecular epidemiology studies with *Legionella* species.

Legionella pneumophila is the etiological agent of Legionnaires' disease (LD) and Pontiac fever and is also one of the causes of community-acquired pneumonia (CAP) (1, 12, 16) and severe pneumonia (22). Therefore, the rapid and sensitive diagnosis of infection with *Legionella* species is essential not only for treatment but also for the implementation of prevention procedures. The standard adopted by the European Working Group for *Legionella* Infections (EWGLI) for the typing and characterization of isolates related to outbreaks and sporadic cases of LD is based on the allele profile obtained from the nucleotide sequences of seven protein-coding loci (7, 77). For clinical samples, the profiles are usually derived from spatio-cultures. However, the efficiency of isolation of *Legionella* species from respiratory samples rarely reaches more than 20%, even when highly experienced laboratory personnel perform the isolation procedure. Molecular methods for the diagnosis of LD have focused on the extraction and specific PCR amplification of *Legionella* DNA from respiratory samples (10, 16). However, epidemiological investigations seldom depend only on the confirmation of infections by *Legionella* species, and more detailed characterization is usually necessary (11, 13). Due to the difficulties in obtaining *Legionella* from

from cultures, and to compare the accuracy of traditional sequence typing (direct) from lower respiratory secretions (bronchoalveolar fluid aspirated secretions [BAS]) and spatio-culture to the accuracy of typing with cultured isolates.

A large outbreak of *Legionella* affecting more than 200 people occurred in 1999 and 2000 in Aioia, Comunidad Valenciana (CV), Spain (6). Public health authorities conducted an extensive epidemiological investigation and strict regulations on the cleaning and maintenance of aerosol-producing devices were implemented. However, from 2001 to 2005 other minor outbreaks were detected in that area. The rate of legionellosis in the Aioia area has been higher than that in the rest of Spain since 1995, with the only exception being 2001. The reasons for this high rate in this specific locality, despite public health authorities' efforts to control and prevent further infections with *Legionella* species, remain unknown.

MATERIALS AND METHODS

Respiratory samples and, when possible, the corresponding cultured isolates were obtained from 106 patients from several hospitals in CV diagnosed with LD by a positive result for urine antigen, together from 50 patients with community-acquired pneumonia being treated with a high resolution of sequencing protocol

For J Clin Microbiol Infect Dis (2012) 31:2817-2824
DOI:10.1093/cid/cir311-1225-9

ARTICLE

Application of *Legionella pneumophila*-specific quantitative real-time PCR combined with direct amplification and sequence-based typing in the diagnosis and epidemiological investigation of Legionnaires' disease

M. Menéndez* N. K. Fry • B. Akbar •
C. Pakepo-Forsley • F. C. Naik • E. G. Harrison

Received: 10 November 2011 / Accepted: 18 December 2011 / Published online: 28 January 2012
© Springer Verlag 2012

Abstract The detection of *Legionella pneumophila* DNA in clinical specimens using quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) combined with direct sequence-based typing (SBT) offers rapid confirmation and timely intervention in the investigation of cases of Legionnaires' disease (LD). We assessed the utility of a specific *L. pneumophila* qPCR assay targeting the macrophage infectivity potentiator (*mapA*) gene and internal process control with three clinical specimen types from confirmed LD cases. The assay was completely specific for *L. pneumophila*, as demonstrated by positive results for 39/39 strains from all subspecies and 16 serogroups. No cross-reaction was observed with any of the 44 *Legionella pneumophila* strain groups or 33 non-

negative PCR-positive samples resulting in full 7-allele profiles from 23/46, 5 to 6 alleles from 8/46 and ≥1 allele from 4/46 strains.

Introduction

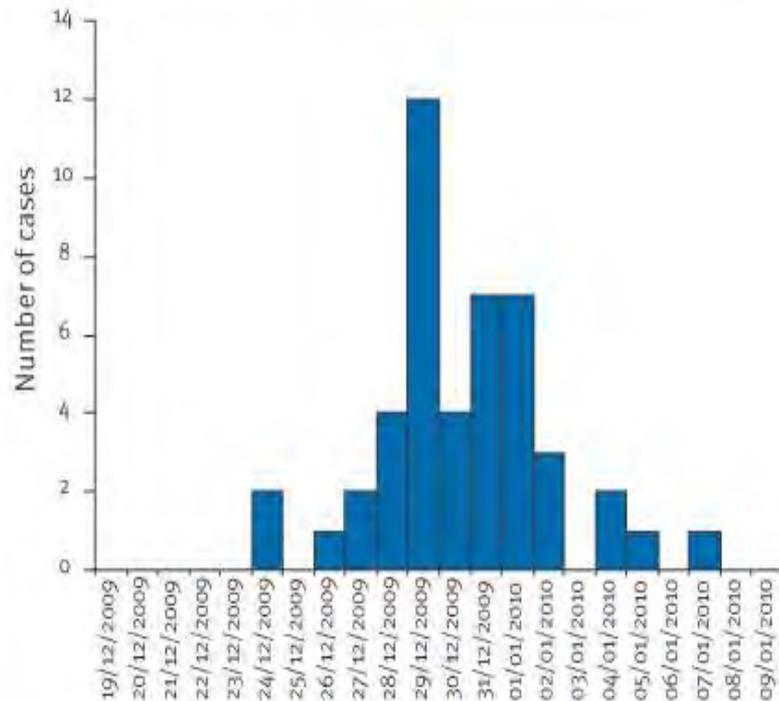
The laboratory diagnosis of Legionnaires' disease (LD) is achieved by the isolation of the aetiological agent or the detection of *Legionella* antigen (or DNA) in clinical specimens. While the isolation of *Legionella* is still considered as the 'gold standard' for diagnosis, since the arrival of conven-



2010 Ausbruch Ulm

FIGURE 2

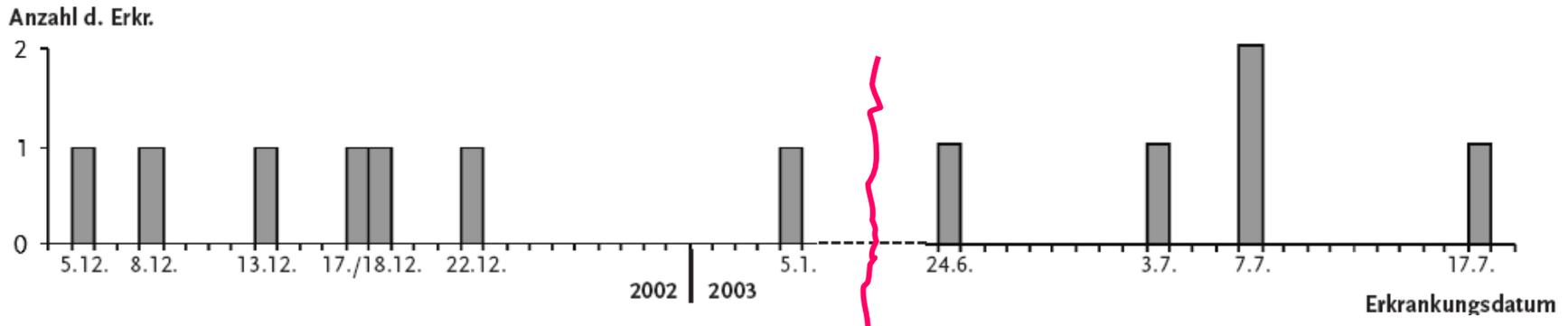
Onset of disease in patients with Legionnaires' disease, Ulm/Neu Ulm, Germany, information available as of 22 January 2010, (n=46)



- Infektionsquelle
 - Epidemiologisch keine gemeinsame „Quelle“
 - Schwimmbad
 - Feier
 - Reisen/ Hotel
 - diffus über die Stadt verteilt
 - >>Rückkühlwerk
 - 9/30 Kultur Legionella pos
 - 5x Lp1
 - 1x Mabtyp Knoxville, ST 62
- Intermittierender Betrieb seit Sommer 2009
- Wetterlage:
 - Relativ warm
 - Dichte Wolkenschicht

Von Baum et al. Euro Surveill. 2010;15(4):1-2

Nosokomialer Ausbruch Frankfurt/O



IQ = (Warm)wasserversorgung

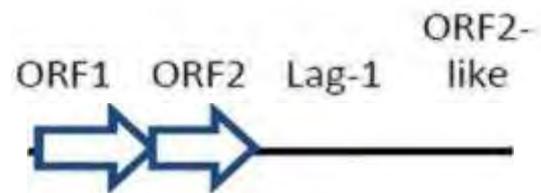
- Legionella Menge initial bis 200/ml (20 000/100ml),
- Danach bis 15 /ml
- Warmwasserinstallation nah am Kaltwasser (bis 28,7°C): >200/ml
- Epidemiestamm selten aber bis 2009 nachweisbar
 - **Lp1 Knoxville ST182**
 - Lp 1 Philadelphia/OLDA ST1
 - Lp 6
 - L. gormanis, L. anisa
- Ab August 2003 keine Erkrankungen mehr

O-Acetyltransferase (Lag-1)

MAb 3/1 pos



MAb 3/1 neg

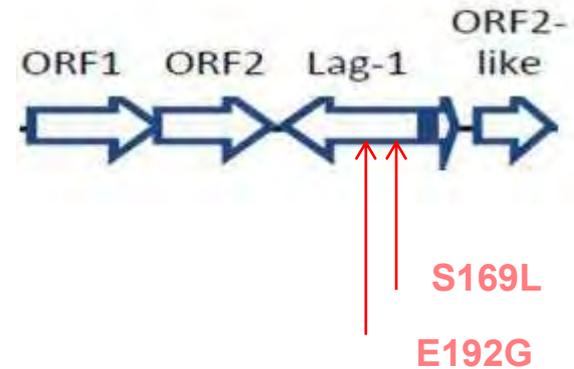


O-Acetyltransferase (Lag-1)

MAb 3/1 pos



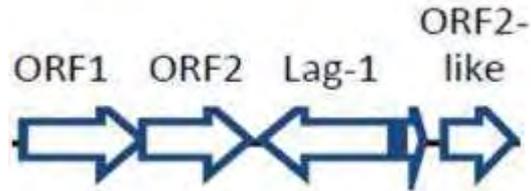
MAb 3/1 neg



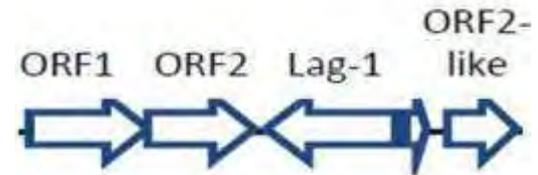
Lück et al. 2001
Kozak et al. 2009

O-Acetyltransferase (Lag-1)

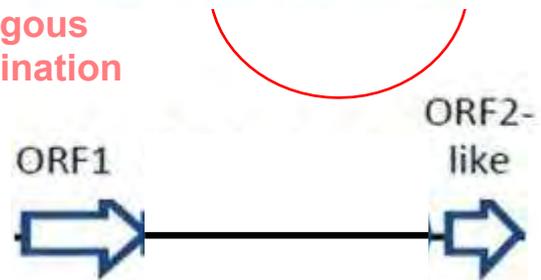
MAb 3/1 pos



MAb 3/1 neg

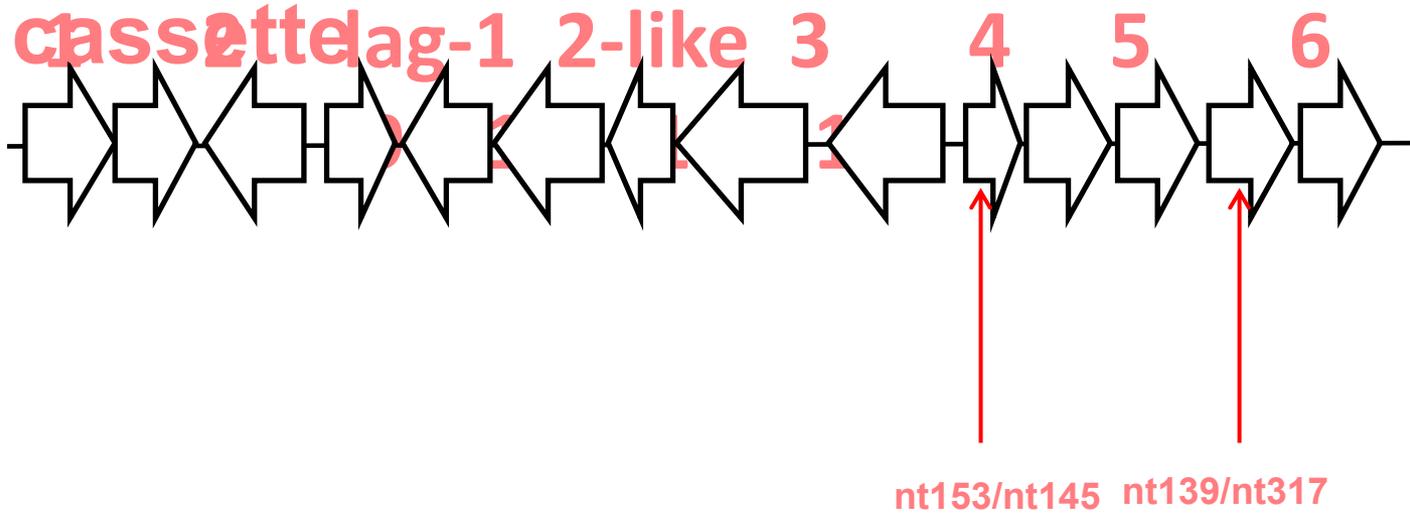


homologous recombination



Tn10 mutants – ORF 8 and ORF 11

~ 1.8 kb insertion with kanamycin resistance

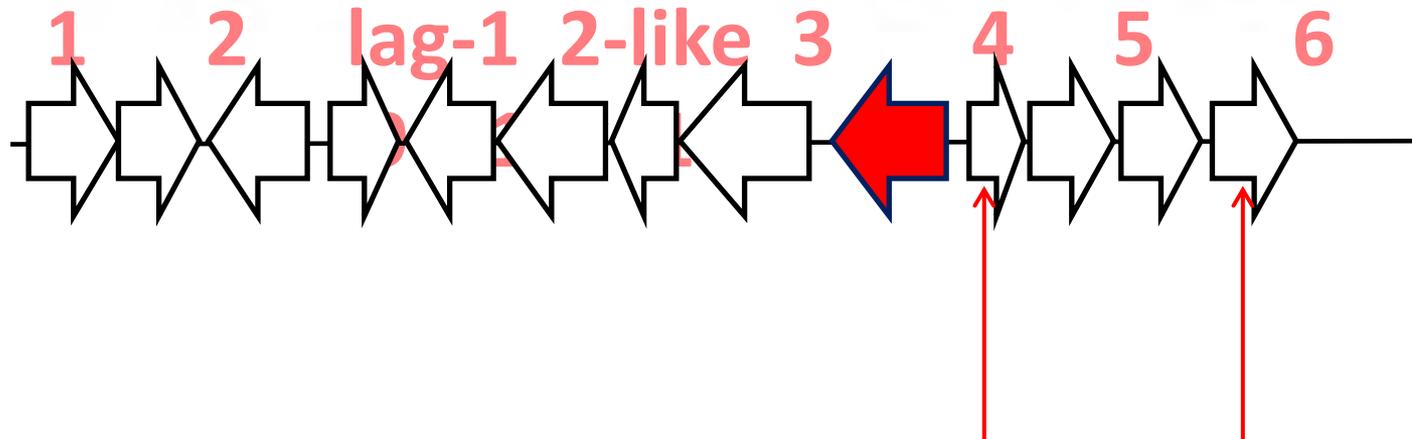
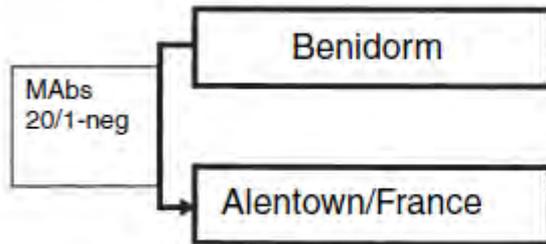


methyltransferase

unkno

wn (maybe glycosyltransferase)

Tn10 mutants – ORF 8 and ORF 11



Monoclonal antibodies – Tn10 mutants

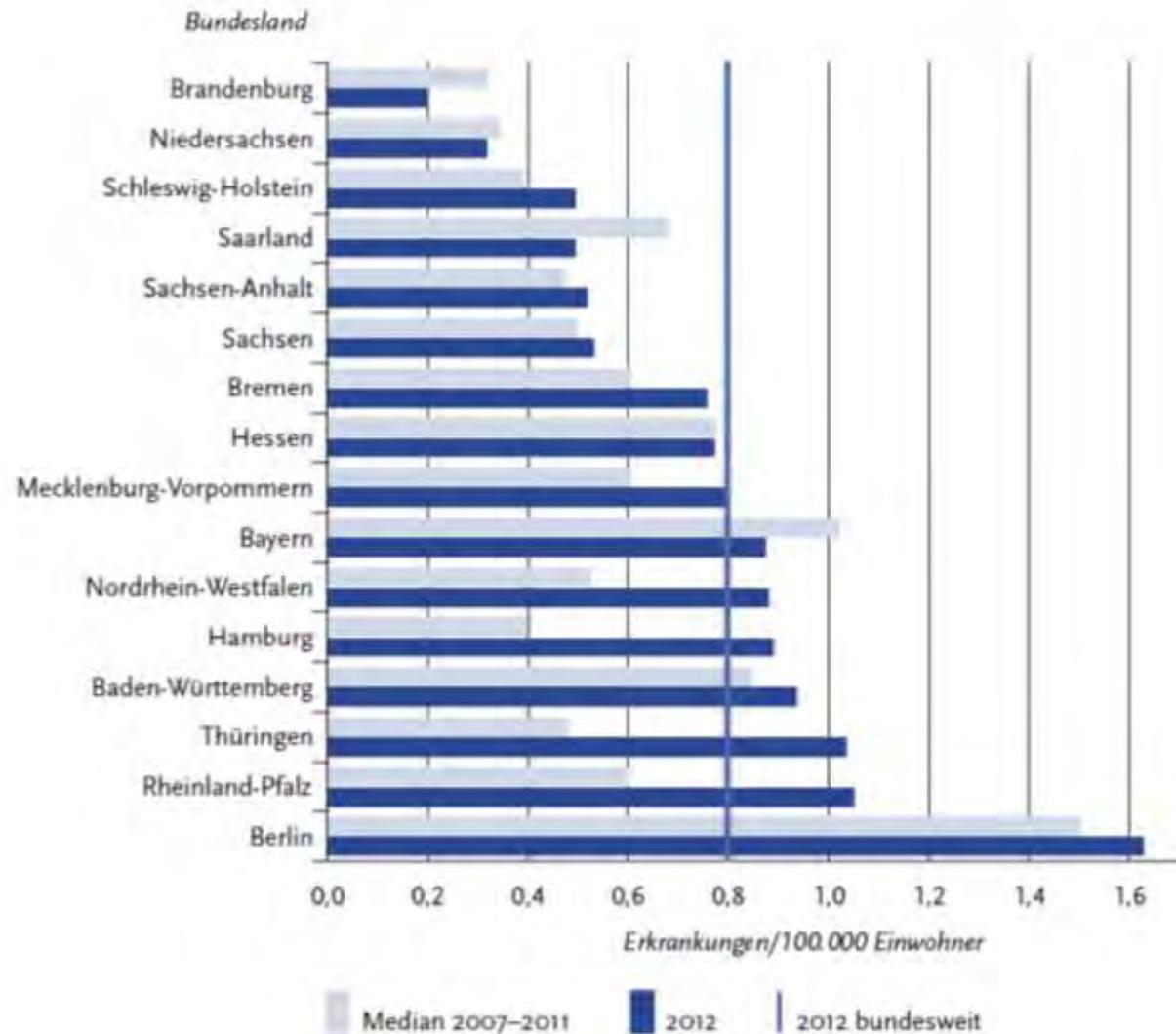
switch from Benidorm to Allentown

	MAB	8/5	3/1	8/4	9/1	10/2	10/6	10/7	10/8	12/2	20/1	26/1	26/2	30/4	39/2
Subgroup	Philadelphia (Phil-1, Paris)	+++	+++	+++	0	0	0	+/0	+/0	++	0	0	0	+/0	0
	Allentown (Lorraine)	+++	+++	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	+/0
	Benidorm (Lens)	+++	+++	0	+	0	0	0	0	0	+++	0	0	+/0	+
	Knoxville (Corby, Alcoy, Upsalla 3)	+++	+++	++	++	++	0	++	++	+++	0	0	0	+/0	++
	OLDA (RC1)	+++	0	+++	0	++	0	+++	+++	+++	0..++	++	++	+	0
	Camperdown	+++	0	0	0	+++	0	++	++	+++	0	0	0	+++	0
	Heysham	+++	0	0	0	++	0	+	++	+++	0	0	0	0	0
	Bellingham (Görlitz, HL)	+++	0	0	0	+++	++	++	++	+++	++	++	0	+++	0

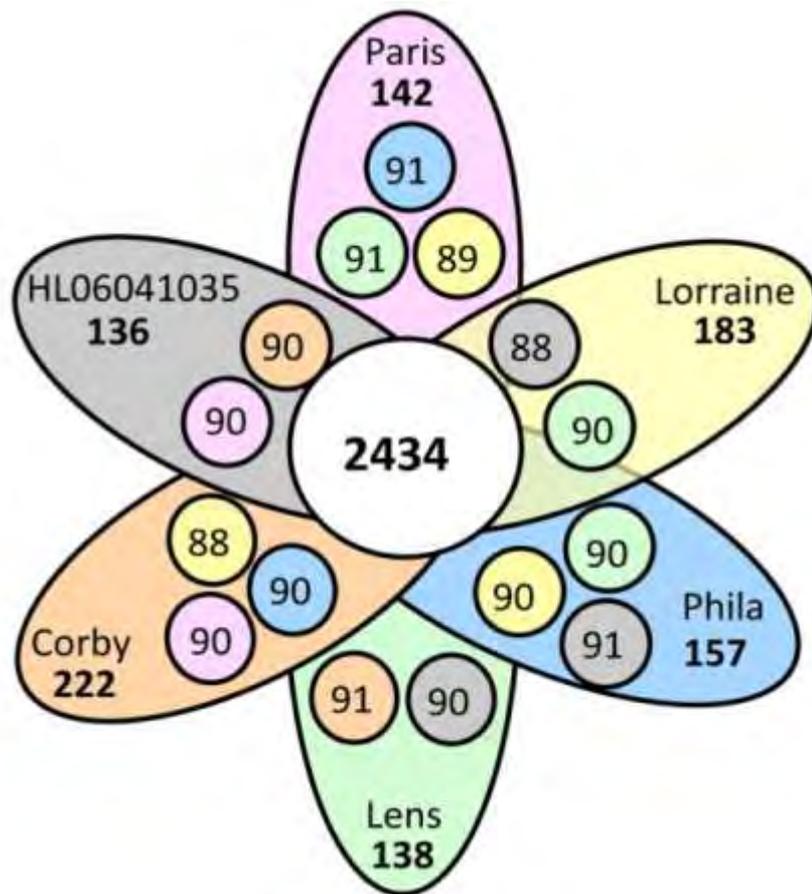
ELISA reactivity

Übermittelte Legionellose pro 100.000 Einwohner nach Bundesland, Deutschland, 2012

(n = 654) im Vergleich mit den letzten 4 Vorjahren



Vergleich der *L. pneumophila* Genome



Alle Stämme Sg1

- Philadelphia,
- Lens,
- Paris
- Corby
- Lorraine
- H 06041035

- Alcoy fehlt
- Wadsworth 130b fehlt

Nur 90 % Core Genom

Rapid whole-genome sequencing of a Legionella outbreak

Rapid whole-genome sequencing of a Legionella outbreak

Table 1 Clinical, environmental and reference *L. pneumophila* strains

Sample number	Accession number	Biological origin	Type of sample	Serogroup	Monoclonal antibody subgroup	Sequence type*
<i>Reference genome</i>						
LP Philadelphia	AE017354.1	USA 1974	Clinical	1	Philadelphia	ST36
<i>Published genomes</i>						
LP ATCC 43290	CP003192.1	USA	Clinical	12	NA	ST187
LP Alcoy	CP001828.1	Spain	Clinical	1	ND	ST578
LP Corby	CP000675.2	UK	Clinical	1	Knoxville	ST51
LP Lens	CR628337.1	France	Clinical	1	Benidorm	ST15
LP 130b	FR687201.1	USA	Clinical	1	Benidorm	ST42
LP Paris	CR628336.1	France	Clinical	1	Philadelphia	ST1
LP Lorraine	FQ958210.1	France	Clinical	1	ND	ST47
LPHL06041035	FQ958211.1	France	Environmental	1	ND	ST734
<i>Outbreak investigation isolates</i>						
LP033	ERS166051	Patient 1	Clinical	1	Philadelphia	ST37
LP035	ERS166045	Patient 2	Clinical	1	Philadelphia	ST37
LP617	ERS166047	Patient 3	Clinical	1	Allentown/France	ST47
LP056	ERS166052	Site A cooling tower 1	Environmental	1	Philadelphia	ST37
LP427	ERS166050	Site A cooling tower 2	Environmental	1	Philadelphia	ST37
LP467	ERS166049	Domestic spa pool	Environmental	1	Philadelphia	ST37
LP423	ERS166048	Site B cooling tower 1	Environmental	1	Oxford/OLDA	ST1

*Sequence type was derived from the genome sequence data and was concordant with the results of the seven-allele sequence-based typing method.

NA, Not applicable; ND, not determined.

Rapid whole-genome sequencing of a Legionella outbreak

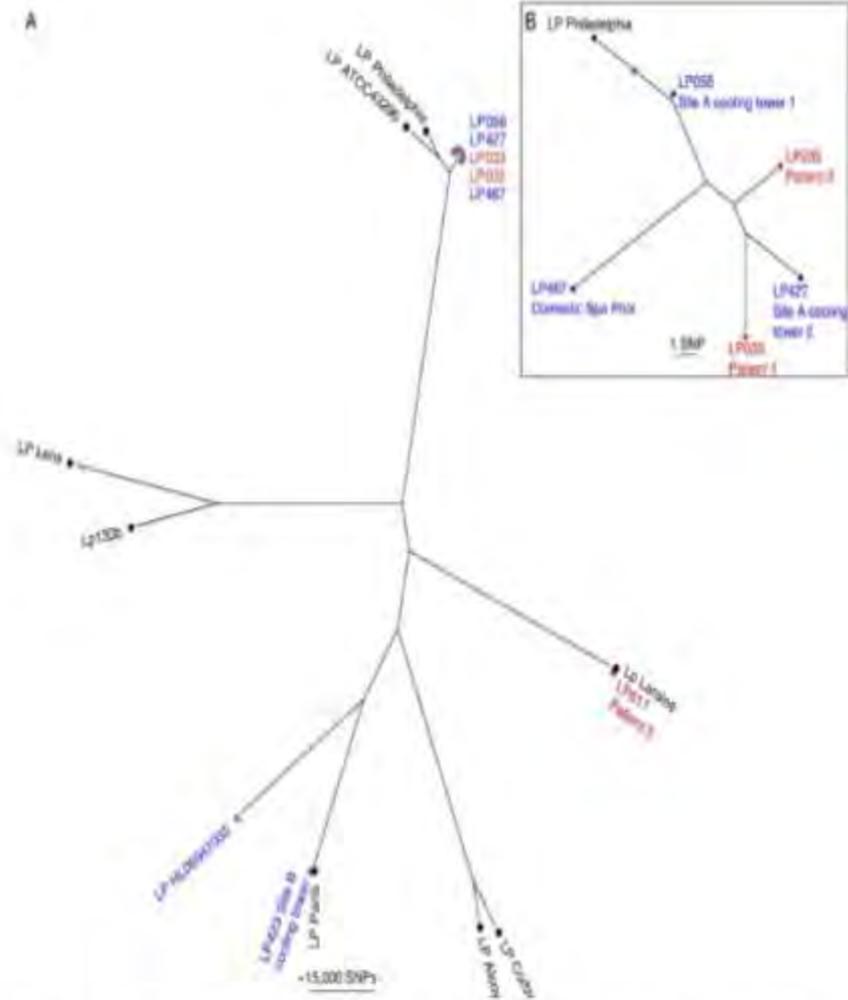
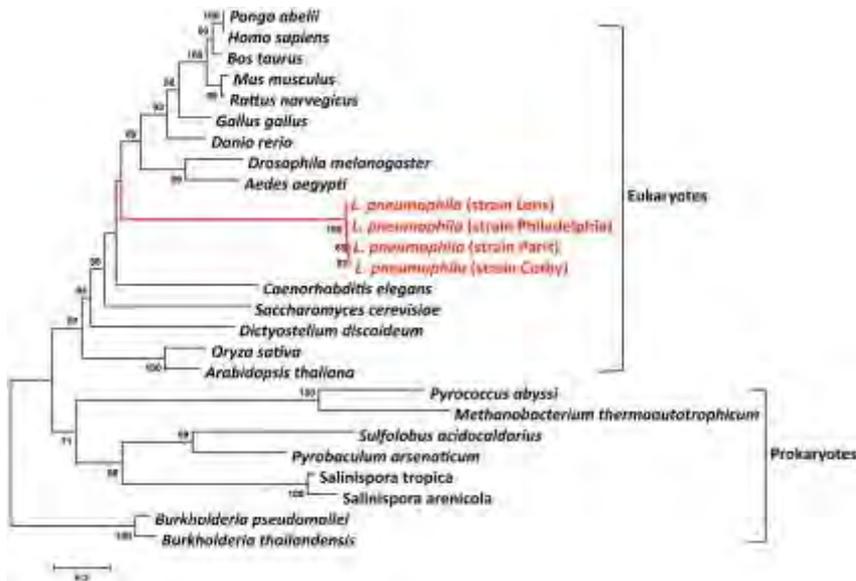


Figure 1 Phylogenetic tree of *Legionella pneumophila* strains. (A) Phylogeny of the species *L. pneumophila*. Clinical, environmental and reference isolates are shown in red, blue and black, respectively. Inset (B) close-up phylogeny of the isolates involved in the outbreak. The branch leading to the reference strain Philadelphia has been truncated for clarity.

Legionellen Genome

- Phylogenetic tree of a multiple sequence comparison of sphingosine-phosphatase proteins present in eukaryotic and prokaryotic genomes. Phylogenetic reconstruction was done with MEGA using the Neighbor-Joining method.

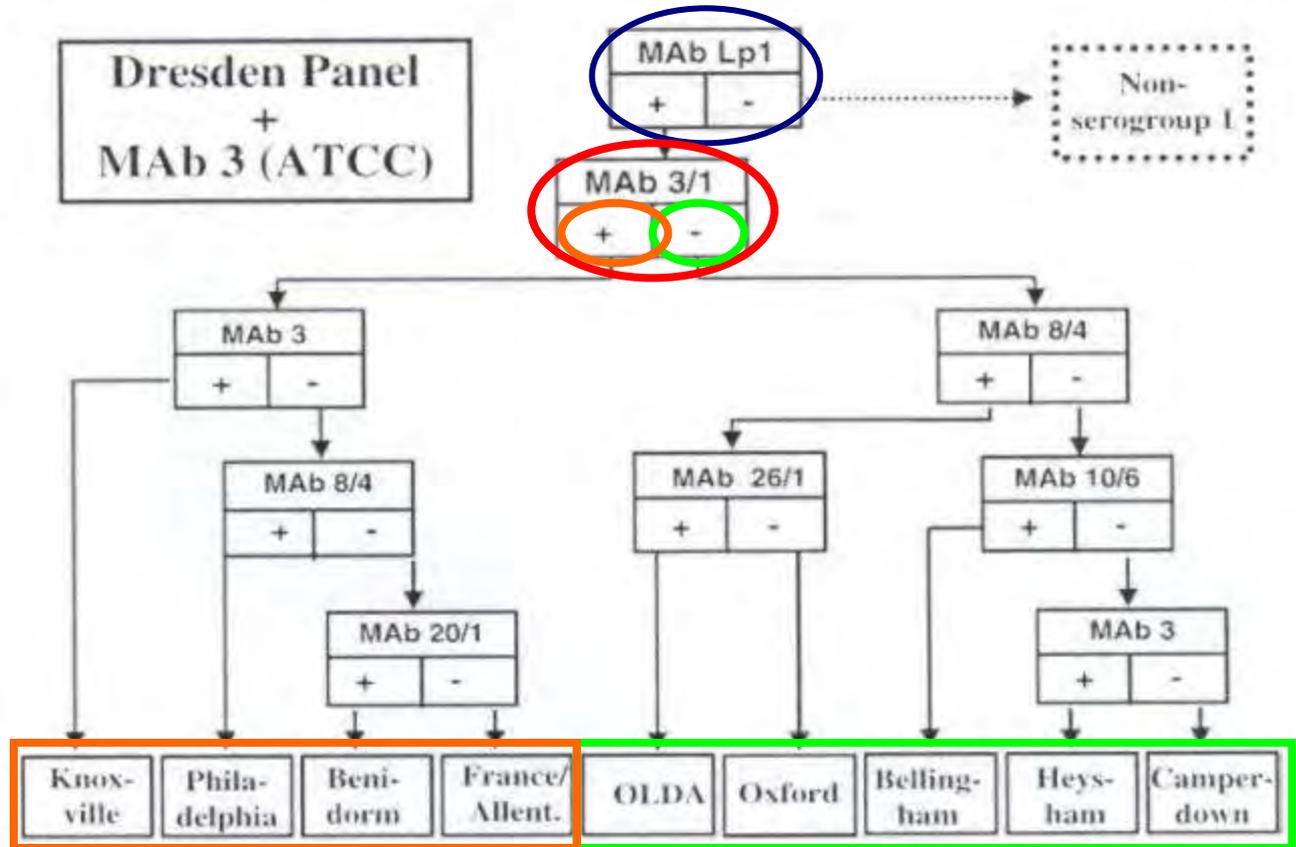


Occurrence and distribution of *Legionella Pneumophila* Serogroup 1 strains in Saxonian Hospitals

- Introduction

- Monoclonal Antibodies (MAb)

- Dresden MAb Panel

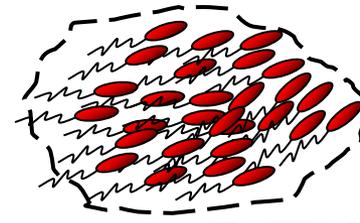
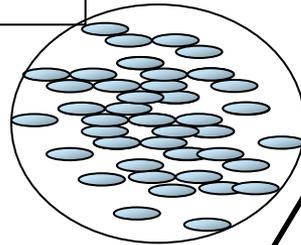


Legionella Wachstumszyklus

OD

Exponentielle Phase

- Elongierte Bakterien
- Keine Flagellen
- NaCl resistent
- Stress empfindlich
- avirulent



Post-exponentielle Phase

- Kleinere Zellgröße
- flagelliert
- NaCl empfindlich
- Stress resistent
- virulent

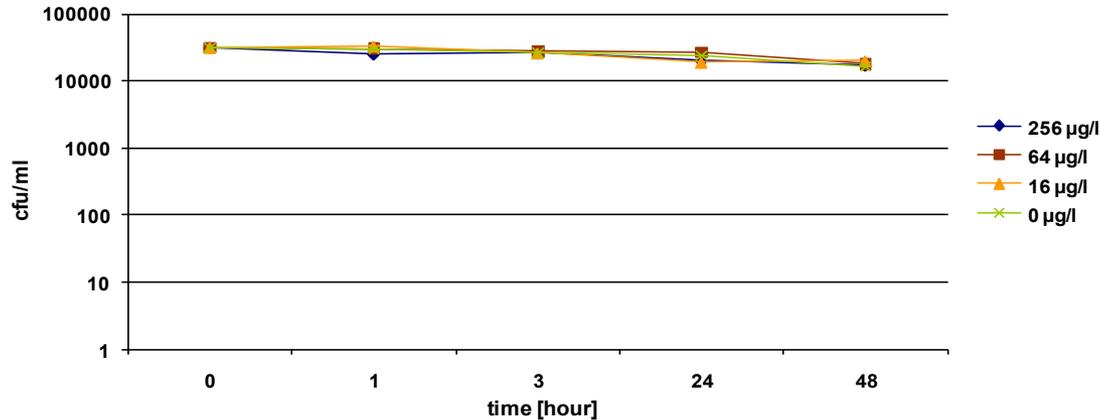
Zeit

Verbreitung von L.pneumophila Sg1 ST 62 in Deutschland

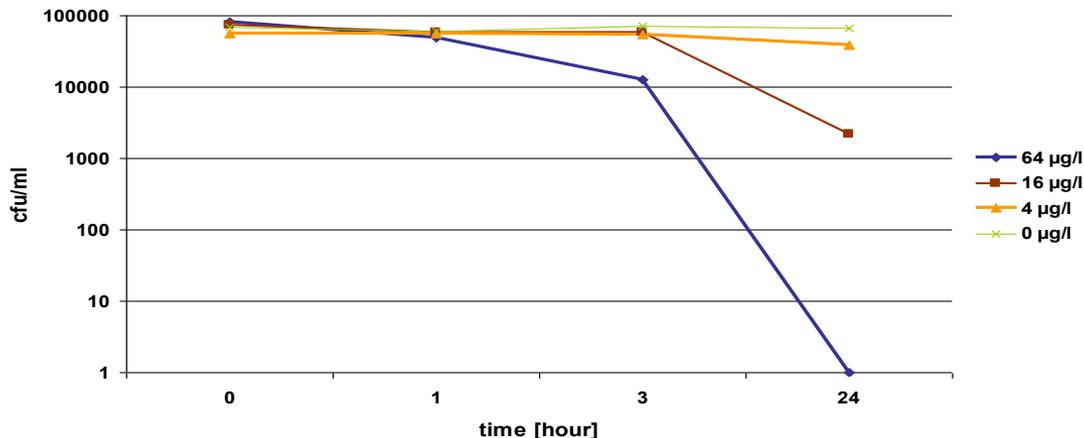
Unsere Nummer	Monoklonaler Subtyp	Infektion	Region/ Zeitpunkt
L99-356	OLDA	CAP	1999 Nordrheinwest.
Mue 6850	Benidorm	Nosocomial	1999 Niedersachsen
L03-95	Philadelphia	CAP	2003 Saarland
L04-399	Knoxville	CAP	2004 Nordrheinwest
L06-457	Knoxville	CAP	2006 Sachsen
L07-375	Knoxville	CAP	09-2006 Sachsen
L09-103	Knoxville	CAP	07-2009 Brandenburg
L09-329	Philadelphia	CAP	07-2009 Schlesw-Hollst
L09-451	Knoxville	CAP	09-2009 Ulm
L10-23	Knoxville	CAP	01-2010 Ulm
7 weitere			

MHK gegen Silber von Legionella: Rolle der Protozoen

MIC_Legionelle pneumophila_intracellular



MIC_Legionella pneumophila_extracellular



- MIC of extracellular *Legionella* related to other strains
- intracellular → less sensitive
- MIC > 256 µg/l AgNO³

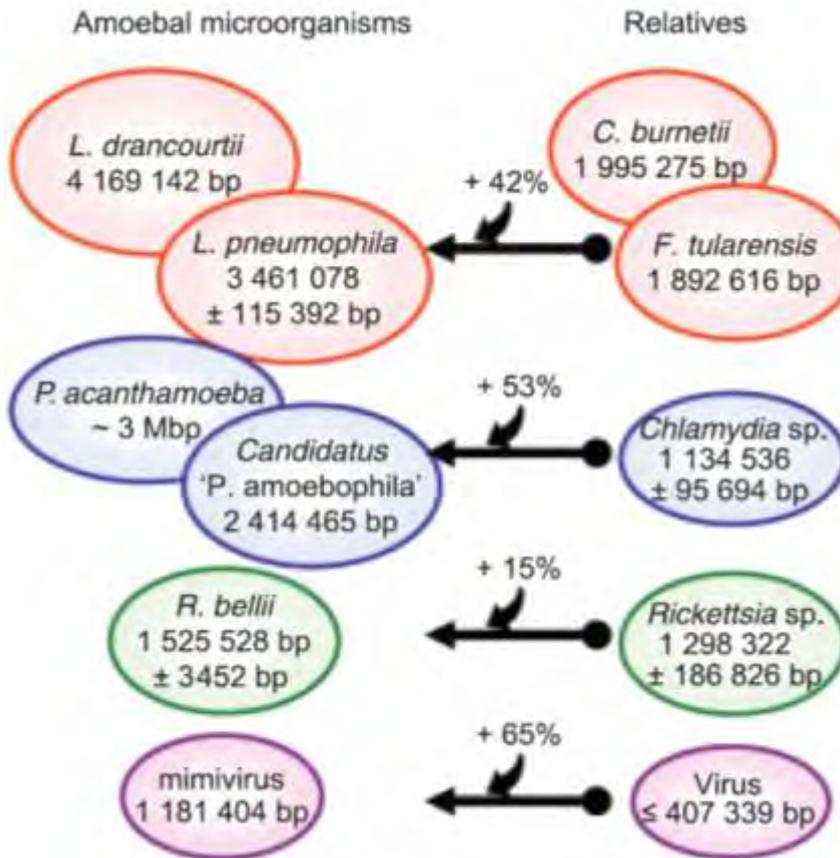
Legionella in Trinkwassersystemen: Wann müssen wir sie fürchten ?

- Epidemiologie beginnt mit der Diagnose
 - 700 gemeldete versus mind.10 000 geschätzte Fälle
- Diagnostische Methoden sind besser als ihr Ruf
- Aufmerksamkeit
- Legionellen im Wasser
 - Infektion - kann sein – muss aber nicht
 - Ist es wichtiger Infektionen zu detektieren als Legionellen im Wasser ?
- Routine Wasserkontrollen sind ein Teil der Prophylaxe

***L. pneumophila* Stämme von 8 Patienten und 10 Kühltürmen (KT) während des Ausbruchs in Ulm, Dezember 2009 /Januar 2010**

Herkunft	Maximale Keimzahl/ 100ml	Serogruppe /Monoklonale Subgruppe (N getestet)	Sequenztyp (ST) (N getestet)	fla	pil	asd	mip	momp	pro	neu	Vorkommen diese Stammes
Patienten (n=8)		1 Knoxville ¹	62	8	10	3	15	18	1	6	Fast ausschließlich bei Erkrankten weltweit
1. KT Verursacher	92500	1 Knoxville ¹ (n=19)	62 (n=4)	8	10	3	15	18	1	6	Fast ausschließlich bei Erkrankten weltweit
1. KT	92500	1 OLDA ² (n=1)	1 (n=1)	1	4	3	1	1	1	1	Weltweit von Patient und Wasser
1. KT	92500	10 (n=1)	908 (n=1)	1	4	3	5	1	1	6	Einzig
1. KT	92500	8 (n=3)	NA (n=2)	5	2	3	10	6	25	F ⁵	Einzig
1. KT	92500	3 (n=8)	984 (n=1)	12	29	2	20	50	20	15	einzig
1. KT	92500	<i>L. rubrilucens</i> ³ (n=1)	nt								
2. KT	70 000	8 (n=94)	NA (n=2)	5	2	3	10	6	25	F	Einzig
2. KT	70 000	<i>L. rubrilucens</i> ³ (n=2)	nt								
3.KT	300	1 Bellingham ² (n=1)	334 (n=1)	2	6	17	6	13	11	11	Selten bei Patienten und Wasser in D und NL
4.KT	3000	4 (n=1)	681 (n=1)	11	14	16	25	7	13	6	Selten
4.KT	3000	6 (n=1)	956 (n=1)	6	10	3	3	9	1	9	Selten
5.KT	1	1 OLDA ² (n=1)	1 (n=1)	1	4	3	1	1	1	1	Weltweit Patient und Wasser
6.KT	1	Neue <i>L. species</i> (n=1) ⁴									
7.KT	130	1 Bellingham ² (n=1)	334 (n=1)	2	6	17	6	13	11	11	Selten bei Pati. und Wasser in D und NL
8.KT	15 000	1 OLDA ² (n=2)	595 (n=1)	2	14	16	16	15	13	2	Selten
8.KT	6	4 (n=1)	NA (n=1)	8	14	16	25	7	13	F	Weltweit Patient und Wasser
9.KT	5	1 OLDA ² (n=1)	1 (n=1)	1	4	3	1	1	1	1	Selten
10.KT	1	1 OLDA ² (n=1)	104 (n=1)	3	10	1	1	14	9	1	Selten

Opposite evolutionary trends in the genomes of amoebal pathogens



- Gene conservation and acquisition
- The specialization of intracellular bacteria is associated with genome reduction, with an extreme reduction for louse-borne human specialists.
- Unlike these intracellular bacteria, nonspecialized intra-amoebal microorganisms exhibit a genome larger than their relatives due to gene conservation and acquisition.

Claire Moliner, Pierre-Edouard Fournier & Didier Raoult
FEMS Microbiology Reviews 2010

Genome Analysis of *L. pneumophila* Strains Using a Mixed-Genome Microarray

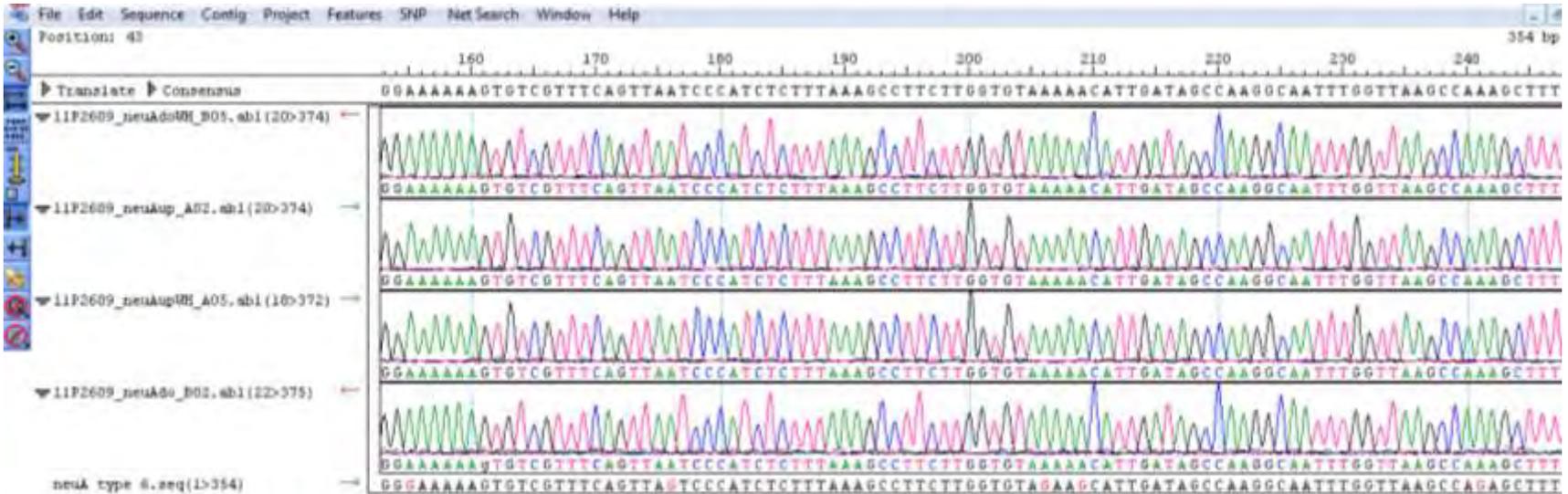
- 222 unique Legionella strains (49 clinical strains and 173 environmental strains)
- no nosocomial isolates
- 4 markers
 - 6E4 is probably related to cell wall synthesis (N-acetylneuraminatesynthase),
 - 33F8 to cellular transport (Xylose symporter).
 - 16E4 in the lipopolysaccharide synthesis (LPS) – wzm
- The final model correctly predicted 100% of the clinical strains and 69% of the environmental strains
- Euser et al. PLOSone 20137(10): e47437. doi:10.1371

Table 2. Prediction results for the 111 strains in the eleventh test dataset.

Test dataset	Origin of strains		Total
	Clinical	Environmental	
Prediction clinical	24	29	53
Prediction environmental	1	57	58
Total	25	86	111
Sensitivity	96%		
Specificity	66%		
PPV	45%		
NPV	98%		

PPV = positive predictive value; NPV = negative predictive value.
doi:10.1371/journal.pone.0047437.t002

Case Hotel Cochem – Pat. Hannover



Direkter Nachweis DNA nSBT aus Patienten:
Vergleich mit Wasserisolaten
Keine Übereinstimmung

Ausbruch London 2005

4 K. Lock and others

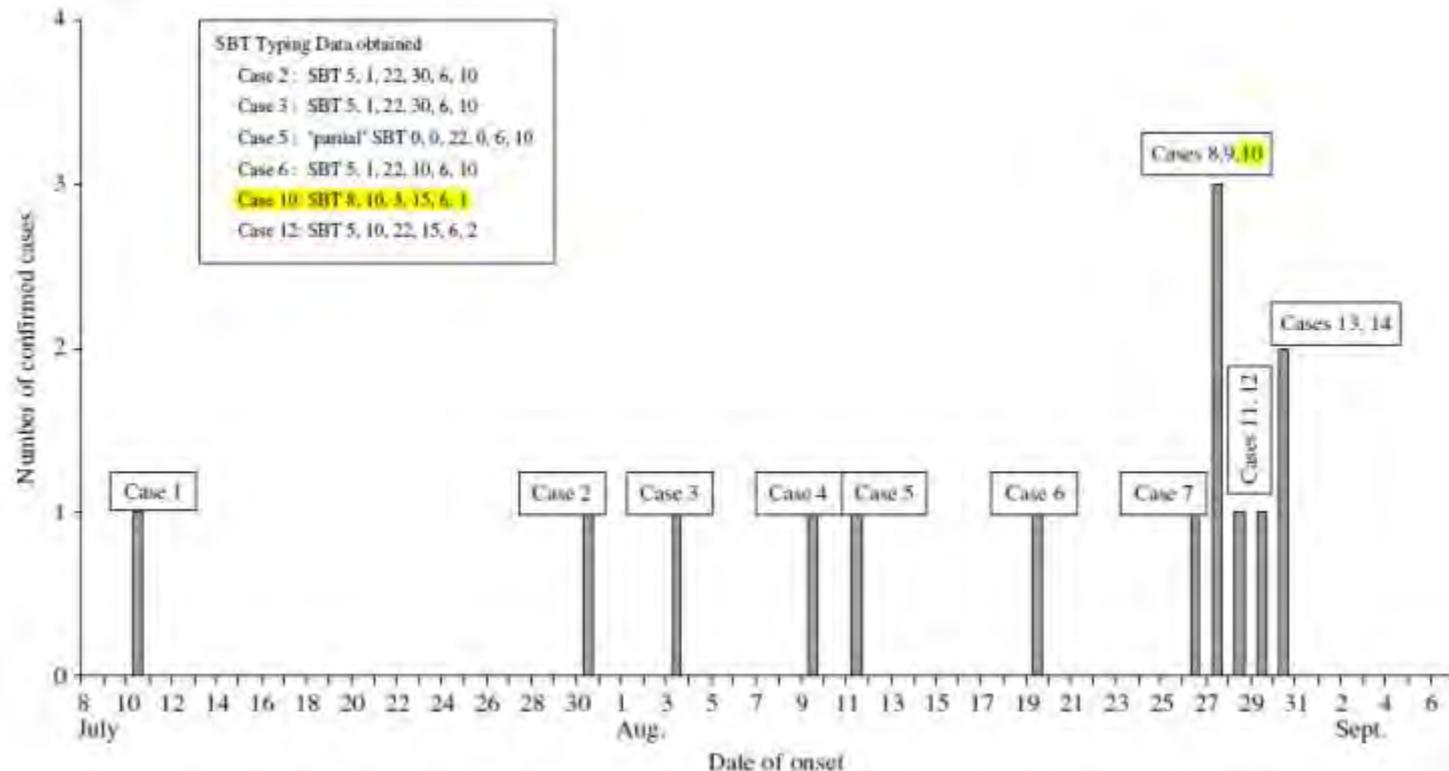
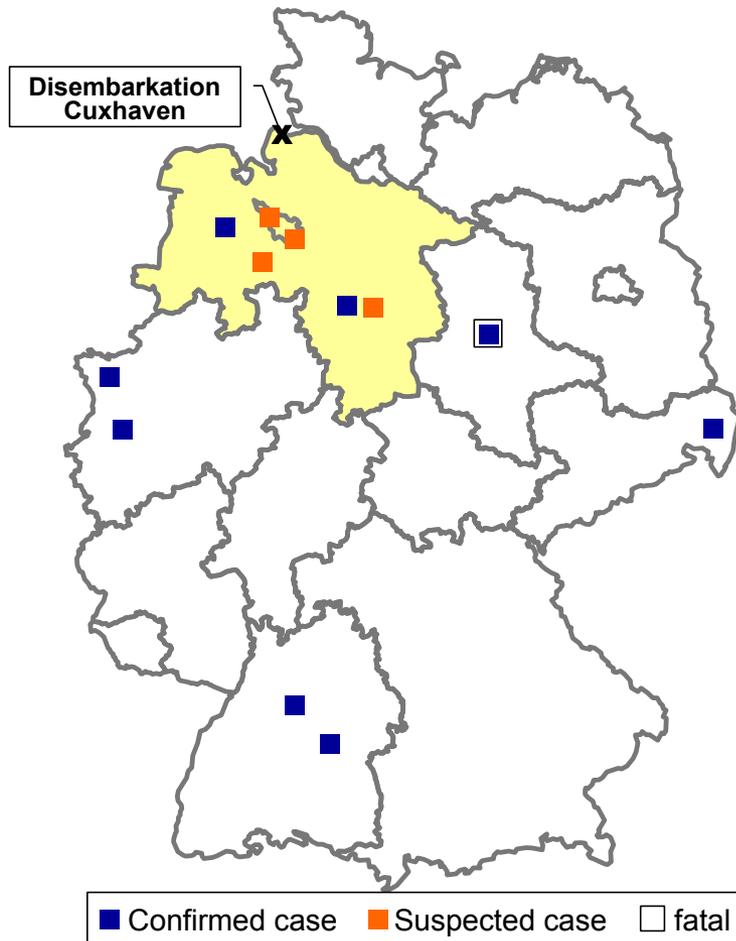


Fig. Confirmed cases of Legionnaires' disease in South East London, July–September 2005.

Ausbruch auf Kreuzfahrtschiff



2003 8 Patienten

- 2x Kultur

– Lp1 Knoxville,
ST35

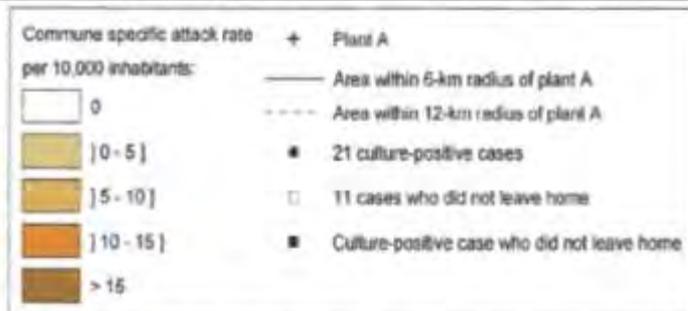
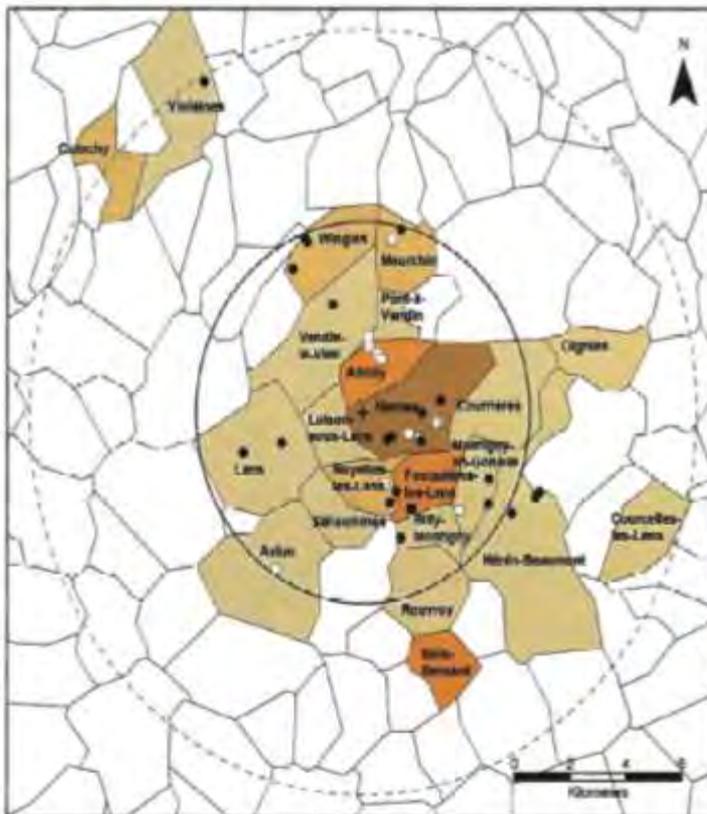
– bisher nur je 1x in
D, NL, Can

- Urin Ag positiv 5x
- Antikörper positiv 3x

39 Personen ohne Symptome waren
nach 6 Wochen Antikörper negativ

2008 erneuter Fall gleicher Stamm

Outbreak Lens, France Nov.2003- Jan.04



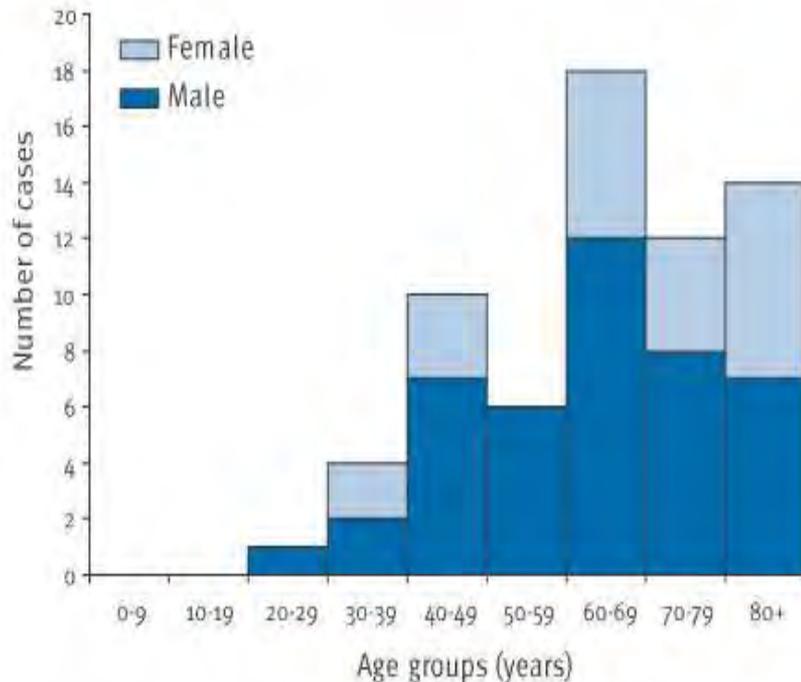
- 86 Fälle
- Letalität 21%
- Winterzeit
- Transmission > 6km
- Strains Lens einmalig: MAb 3-1 positiv, ST 15
 - >2000 Stämme in Frankreich
 - >150 lokal Stämme
- Ein Stamm mit gleichem ST aus Deutschland
- Seit 2008 weitere Fälle aus F

Nguyen et al. JID, 2006

2010 Ausbruch Ulm

FIGURE 1

Age and sex distribution in patients with Legionnaires' disease, Ulm/Neu Ulm, Germany, as of 22 January 2010 (n=65)



- Daran denken !!!
- Schnelle Diagnose durch chromatographischen Schnelltest
- Bestätigung Urin AG-ELISA
- PCR
- Intensive Kulturversuche
 - 8 Isolate von Patienten
 - Alle Lp1, Latex-Agglutination
 - Mabtype Knoxville
 - Sequenztyp 62

Von Baum et al. Euro Surveill. 2010;15(4):1-2

Therapiekosten Legionellose-Fälle

Case no.	Length of hospital stay	Treated in intensive care	Cost (£)
1	117	Yes	201 648
2	21	Yes	37 256
3	8	No	2184
4	26	Yes	35 064
5	6	No	2184
6	39	Yes	45 704
7	10	No	2184
8	8	No	4368
9	6	No	2184
10	13	No	4368
11	5	No	2184
12	29	Yes	36 936
13	8	No	2184
14	8	Yes	13 144
Total		6	39 1592 (~€578 000)

Conclusion

Strains with defined monoclonal subtype (Mab-type) and sequence type (ST) might be restricted to defined areas

They are responsible for single cases , clusters and outbreaks of community aquired, Travel associated and nosocomila origin

Many thanks to:

Carolin Dix

Kerstin Lück

Susann Menzel

Dr. Jürgen Helbig

Prof. Dr. Enno Jacobs

Legionella PCR

- **In-house nested mit Sequencing Bestätigung oder Typisierung**
- **Real-time PCR**
- **Nachweis**
 - alle Legionella species (16s rRNA, 5s rRNA, mip)
 - L. pneumophila 16S rRNA gene, *mip* gene
 - Sg1 LPS gene
 - clone specific Paris clone (IS elements)
- **Nachweisgrenze 10-50 cfu**
- **Hochspezifisch**
- **Quantifizierung nicht notwendig**
- **Direktes Typisieren aus klinischen Proben**

ST332 - Microbiological investigation of a cluster in a military unit 1990

Patient /Clinic	Day	Antibody	Antibody	Antibody	Antibody	Urinary antigen
		Lp 1	Lp6	Lp7	Lp12	
T.V. pneumonia	16 42	1024 1024	64 256	64 128	64 256	Nt
M.D. Pontiac-fever	41 56	1024 512	64 <64	<64 <64	128 128	+ 0 0
J.M. Pontiac-fever	90	512	<64	<64	128	0 + 0
6 exposed person	Ca.90	<64	<64	<64	<64	0 0
18 controls		<64	<64	<64	<64	Nt

IQ = Warmwater: 6/14 samples pos., 100-800/ 100ml, Sg 1, MAb Philadelphia, ST 332

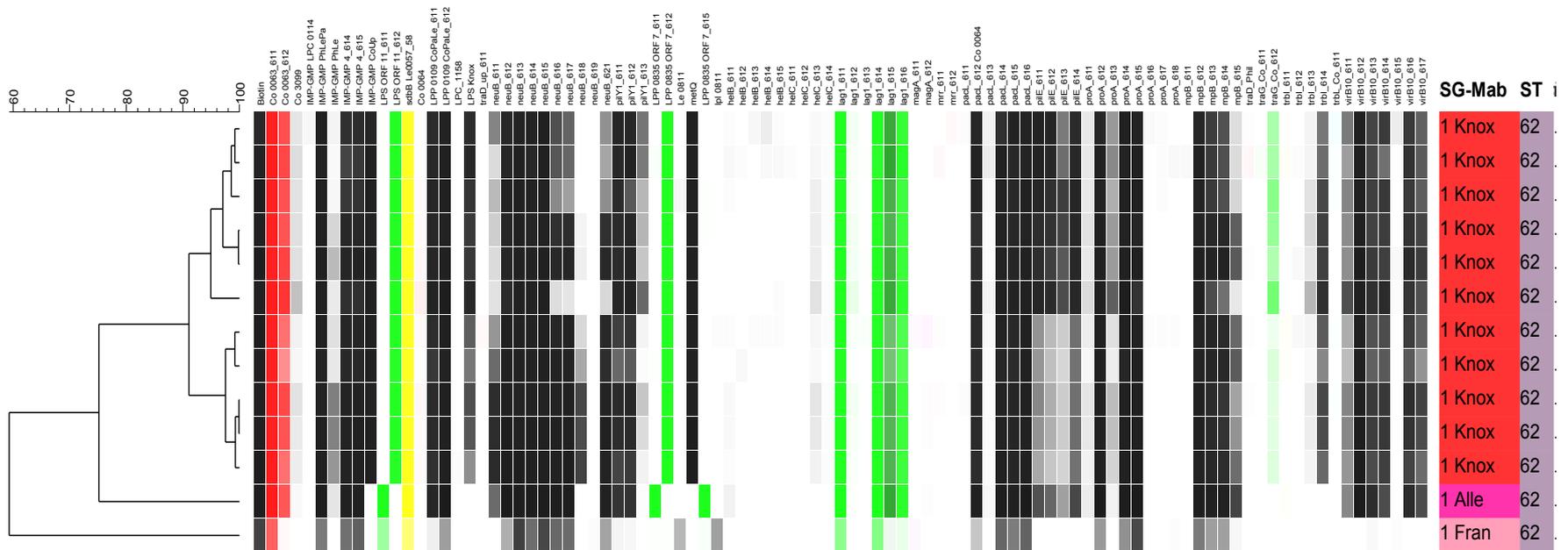
Lück et al. 1992, DMW 117: 460-464

Ulm Outbreak

Outbreak caused by Lp1 Knoxville ST62

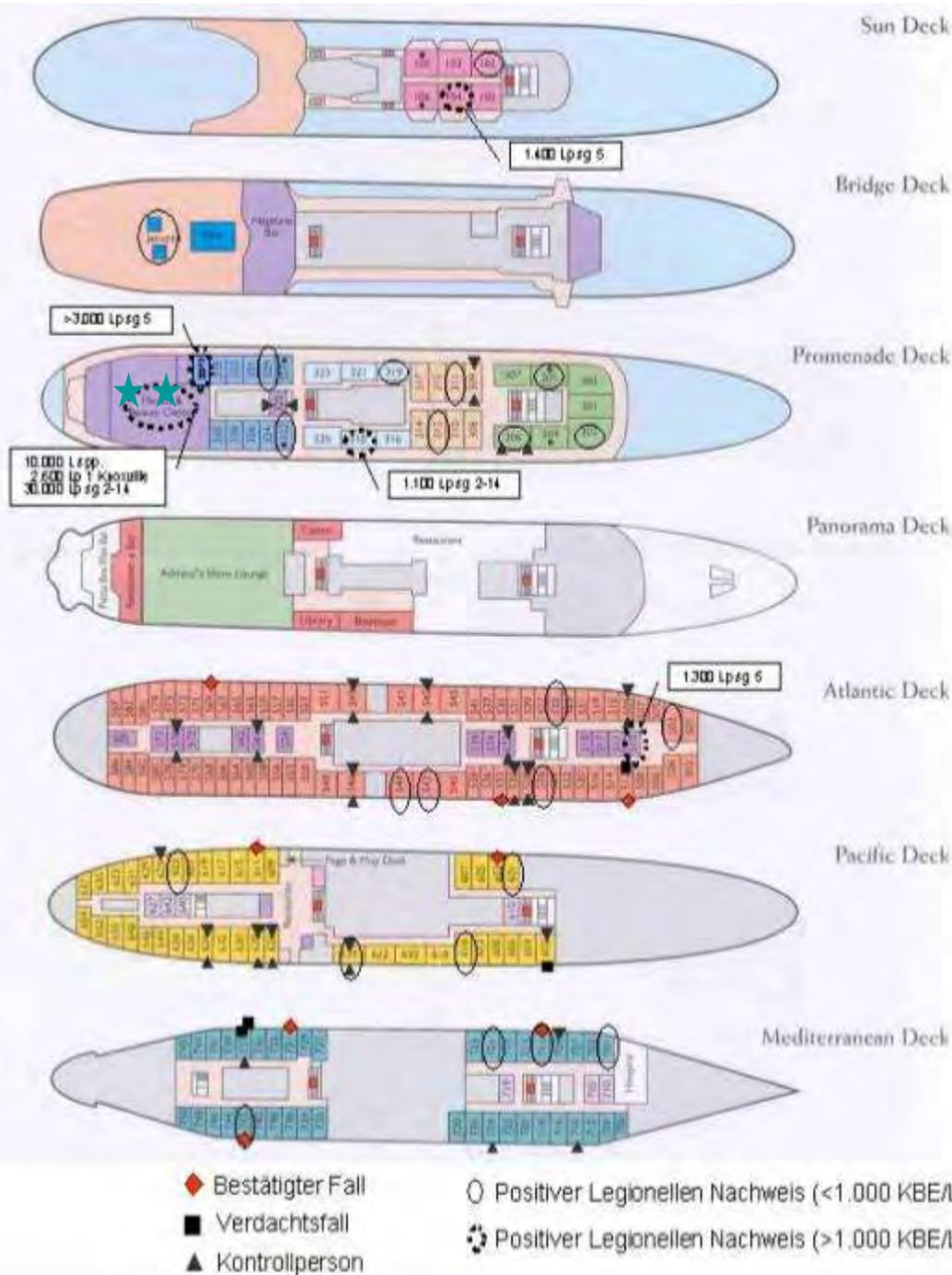
Chip

Chip



Jaccard Index

LD-Ausbruch Kreuzfahrtschiff



Kaltwasserproben: 46% positiv
 Warmwasserproben: 36% positiv
2003

L. Spezies

L. pneumophila

Sg 1 (7x MAbtyp Oxford)

Sg 1 (**2x MAbtyp Knoxville, ST35**)

Whirlpool

Dusche beim Friseur

Sg 3, 5, 10 (54x)

2008

9/10 Wasserproben <100/100ml

Der „Verursacher“ kann selten sein

Legionella-Befall (retrograde Analyse von 76 000 Proben)

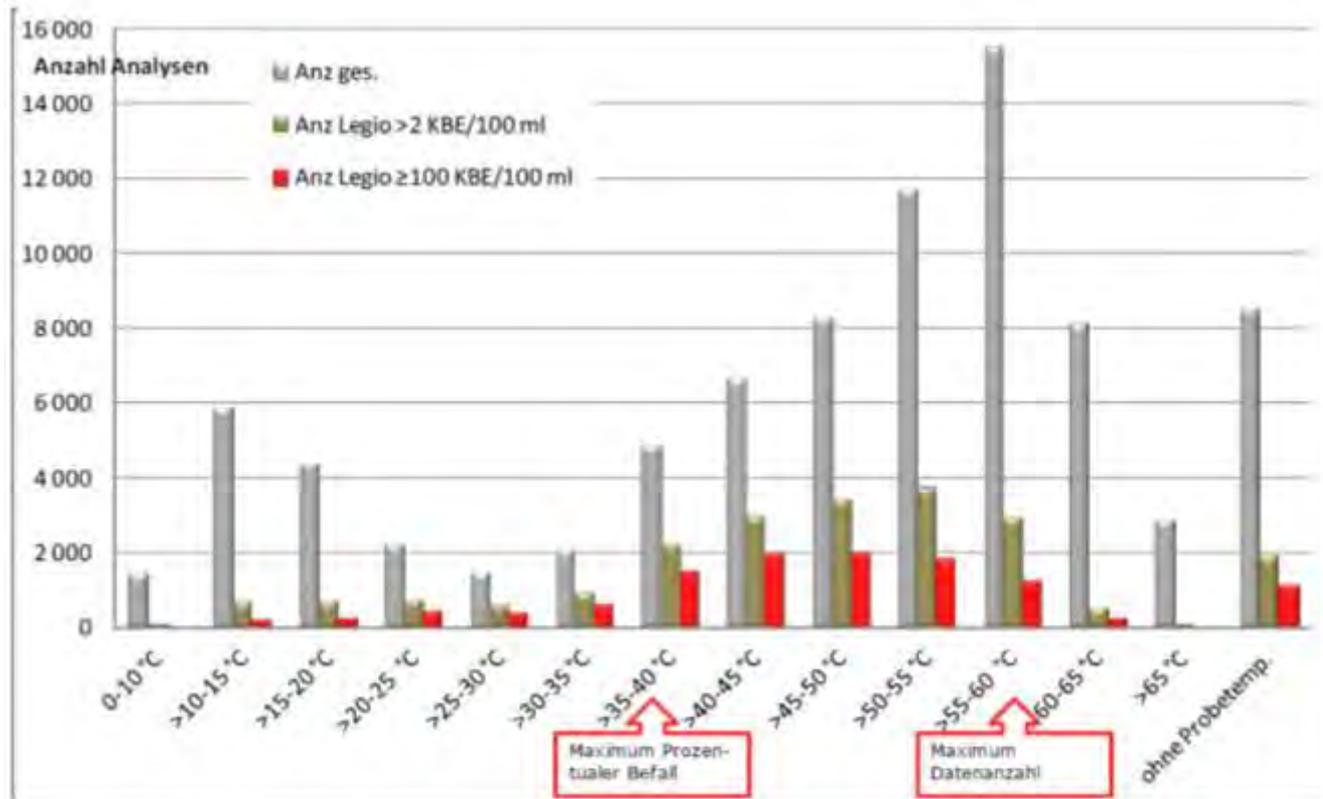


Abbildung 5-5: Gesamtstatistik nach 5-K-Temperaturbereichen (Analysen) mit Eintragung des Maximums an positiven Befunden in Abbildung 5-6