



KWR 2019.073 | November 2019

Legionellabeheersing in de tropen

TKI-Watertechnologie

Legionellabeheersing in de tropen

KWR 2019.073 | November 2019

Opdrachtnummer

401907

Projectmanager

Ton van Leerdam

Opdrachtgever

TKI Watertechnologie

Auteurs

Frank Oesterholt; Paul van der Wielen

Kwaliteitsborger

Gertjan Medema

Verzonden naar

Participanten TKI-project:

WMD, WLN, Hatendoer Water, Aquacare, HSD

Deze activiteit is mede gefinancierd met PPS-financiering uit de Toeslag voor Topconsortia voor Kennis en Innovatie (TKI's) van het ministerie van Economische Zaken en Klimaat en de resultaten zijn openbaar.

Keywords

Legionella, MLST, beheerstechnieken



HATENBOERWATER
Fresh in water since 1906.



KWR



Jaar van publicatie
2019

Meer informatie

Ir. Frank I.H.M. Oesterholt
T 06215 07 897
E frank.oesterholt@kwrwater.nl

PO Box 1072
3430 BB Nieuwegein
The Netherlands

T +31 (0)30 60 69 511
F +31 (0)30 60 61 165
E info@kwrwater.nl
I www.kwrwater.nl

KWR

November 2019 ©

Alle rechten voorbehouden. Niets uit deze uitgave mag worden veeelvoudigd, opgeslagen in een geautomatiseerd gegevens bestand, of openbaar gemaakt, in enige vorm of op enige wijze, hetzij elektronisch, mechanisch, door fotokopieën, opnamen, of enig andere manier, zonder voorafgaande schriftelijke toestemming van de uitgever.

Samenvatting

Dit TKI-project heeft twee doelen:

- Op basis van isolatie van *Legionella pneumophila*-stammen uit milieumonsters van verschillende ‘man-made’ watersystemen in Indonesië meer inzicht krijgen welke gevaarlijke stammen van *L. pneumophila* in dat land voorkomen en – voor zover de variatie beperkt is - nieuwe detectiemethoden te ontwikkelen die zich specifiek richten op detectie en kwantificatie van die gevaarlijke stammen.
- De effectiviteit van drie alternatieve technieken vaststellen voor legionellapreventie bij toepassing in drinkwater- en/of koelwaterinstallaties in Indonesië: (1) koper/zilverionisatie (2) chloordioxide, in-situ bereid en (3) een techniek die groei van biofilm en bacteriën beperkt door verwijdering van het voor groei noodzakelijke nutriënt orthofosfaat in het voedende water.

De genetische diversiteit van *L. pneumophila* stammen in watermonsters genomen op verschillende locaties en van verschillende bronnen in Indonesië blijkt zeer groot. De 30 verkregen stammen behoorden in ieder geval tot 24 verschillende sequentietypen. De meeste *L. pneumophila* isolaten uit watermonsters in Indonesië die tot een bestaand sequentietype werden geïdentificeerd, behoorden tot sequentietypen, die ook in klinische isolaten zijn aangetroffen en vormen daarmee waarschijnlijk een risico voor de volksgezondheid. In ieder geval elf isolaten van *L. pneumophila* uit drinkwater en koeltorenwater in Indonesië, behoorden tot niet eerder beschreven sequentietypen. Deze elf isolaten behoorden tot tien verschillende sequentietypen. De allelencode van ieder van deze nieuwe sequentietype zijn ingevoerd in de Europese database, zodat ze een sequentietype krijgen toegewezen. Het onderzoek naar de sequentietypen van *L. pneumophila* isolaten uit Indonesië heeft niet geleid tot het detecteren van één of twee dominante en gevaarlijke sequentietypen. Hierdoor is het niet mogelijk om detectiemethoden voor dergelijke sequentietypen te ontwikkelen. Doordat de gevonden sequentietypen van *L. pneumophila* geïsoleerd uit water meestal gerelateerd zijn aan klinische isolaten, lijkt specifieke en kwantitatieve detectie van *L. pneumophila* in het algemeen een goede indicatie te geven voor mogelijk risico voor de volksgezondheid in Indonesië. Specifieke en kwantitatieve detectiemethoden voor *L. pneumophila* in het algemeen (zowel kweek als qPCR) zijn echter al beschikbaar.

Om verschillende redenen is het niet gelukt om geschikte pilotlocaties te vinden in Indonesië voor het testen van de effectiviteit van verschillende legionellabeheerstechnieken. In ieder geval heeft dit project duidelijk gemaakt dat het bestrijden van het risico op legionellose door blootstelling aan aerosolen uit waterinstallaties in Indonesië nog geen grote prioriteit krijgt. Daarvoor kampt het land nog met teveel andere infectieziekten die jaarlijks veel slachtoffers eisen en daarmee (terecht) hoger staan op de prioriteitenlijst.

Inhoud

Samenvatting	4	
Inhoud5		
1	Introductie	6
1.1	Achtergrond	6
1.2	WLN laboratorium Manado	6
1.3	Legionella Beheersmaatregelen	7
1.4	Projectdoel	8
2	Materiaal en Methoden	9
2.1	Monsterneming en <i>Legionellakweek</i>	9
2.2	Genotypering <i>L. pneumophila</i> stammen	9
2.2.1	Directe MLST typeringsmethode	10
2.2.2	MLST typering na whole genome sequencing	11
2.3	Geschikte locaties voor pilotonderzoek	11
3	Resultaten en Discussie	12
3.1	Directe MLST typeringsmethode	12
3.2	MLST typering na whole-genome sequencing	14
3.3	Algemene discussie genotypering legionellastammen	17
3.4	Geen pilotlocaties voor alternatieve technieken	18
4	Conclusies en aanbevelingen	20
4.1	Conclusies	20
4.2	Aanbevelingen	20
5	Referenties	21
I	Voorwaarden pilotdeelname	23
II	Invulformulier pilotdeelname	24

1 Introductie

1.1 Achtergrond

Legionella pneumophila vermenigvuldigt zich voornamelijk in waterige milieus wanneer de temperatuur tussen de 30 en 45°C ligt (NASEM, 2019). In watersystemen met aerosolvorming kan onder die condities *L. pneumophila* in het systeem groeien en vanuit het systeem met de aerosolen worden verspreid naar de omgeving. Door blootstelling aan die aerosolen kunnen mensen geïnfecteerd raken en in sommige gevallen de veteranenziekte (legionellapneumonie) oplopen, een gevaarlijke en soms fatale ziekte (NASEM, 2019). De legionellaproblematiek kenmerkt zich voornamelijk door geïsoleerde gevallen waarbij één enkel persoon besmet raakt en ziek wordt (community-acquired), maar daarnaast treden soms ook geclusterde gevallen op met eenzelfde bron (uitbraak) waarbij tegelijkertijd veel mensen besmet en ziek worden (NASEM, 2019). Dergelijke uitbraken hebben in Nederland (en enkele andere westerse landen) geleid tot specifieke regelgeving voor drinkwater, proceswater en koelwatersystemen (NASEM, 2019). Uitgangspunt daarbij is het uitvoeren van risicoanalyses en het opstellen van een beheersplan. Een deel van de Westerse patiënten lopen hun besmetting echter in het buitenland op waaronder vakantiebestemmingen in de tropen (in Nederland heeft ongeveer 30 % van de geregistreerde gevallen een associatie met reizen). Desondanks is in tropische landen zelf maar weinig bekend over aantallen ziektegevallen. Dit heeft mogelijk te maken met het ontbreken van specifieke op *Legionella* gerichte regelgeving en een lagere attentiewaarde bij artsen.

De condities waaronder *L. pneumophila* zich weet te vermeerderen komen typisch (maar niet uitsluitend) voor in tropische landen, zoals Indonesië, aangezien de drink- en koeltorenwatertemperatuur daar van nature rond de 30°C of daarboven kan zijn. Waterleidingmaatschappij Drenthe (WMD) is daarom in 2017 een initiatief gestart om met hun lokale dochter in Indonesië, WLN Indonesia (in 2019 is deze dochter door WMD verkocht en sindsdien eigendom van SGS), het drinkwater en koelwater te beoordelen op de gevaarlijke variant van de legionellabacterie met als uiteindelijk doel om tot legionellaveilige watersystemen te komen voor tropische landen. Doordat de verwachting is dat, door de relatief hoge drinkwatertemperatuur in Indonesië, *L. pneumophila* van nature voorkomt in het drinkwater- en koeltorensystemen, bestaat er de kans dat monitoring op *L. pneumophila* regelmatig positief zal zijn. Het is echter niet ondenkbaar dat het in veel gevallen gaat om niet gevaarlijke stammen van *L. pneumophila*, aangezien *L. pneumophila* ook regelmatig is aangetroffen in het drinkwater op de Nederlandse Antillen, terwijl het aantal ziektegevallen laag is (Valster et al., 2011). Het zou daarom beter zijn om een detectiemethode te ontwikkelen die gericht ziekteverwekkende stammen van *L. pneumophila* in drinkwater- en koeltorensystemen van Indonesië detecteert. Met dergelijke detectiemethoden kunnen dan vervolgens veel gerichtere beheersmaatregelen worden genomen.

1.2 WLN laboratorium Manado

PT WLN Indonesia is opgericht in 2008 als dochter van WMD. Het laboratorium is gevestigd in Manado, Noord Sulawesi. In 2017/2018 is Waterlaboratorium Noord (WLN) betrokken geweest bij de implementatie en kwaliteitsborging van de kweekmethode voor legionella in het laboratorium (ISO standaard 17331). In 2018 zijn tevens afspraken gemaakt met de firma IDEXX over de toepassing van de Legiolert™ op het lab naast de kweekmethode. Legiolert™ is een nieuwe eenvoudige methode die zich specifiek richt op detectie van *L. pneumophila* (zie kadertekst). Deze methode biedt belangrijke voordelen vanwege de eenvoud van uitvoering. Het laboratorium in Manado is in het voorjaar van 2019 verkocht aan SGS.

Legiolert™

In 2018 is de nieuwe methode Legiolert™ (firma IDEXX) voor de kwantitatieve bepaling van *Legionella pneumophila* in water op de markt geïntroduceerd. De methode is gebaseerd op de most probable number (MPN) benadering. Het bestaat uit een poederreagens dat, na toevoegen aan een 100 ml watermonster, een enzymatische reactie aangaat met de celwand van *L. pneumophila* bacteriën, resulterend in een specifieke kleuring. Voor de bepaling wordt gebruik gemaakt van een Quanti-Tray® systeem. De geïnoculeerde Quanti-Tray® wordt 7 dagen bij 39 °C ± 0.5 °C geïncubeerd. De test wijst op aanwezigheid van *L. pneumophila* als een well in de tray bruin kleurt en troebel wordt. Kwantificatie wordt bereikt met behulp van een referentietabel voor de 'most probable number' (MPN) uitgaande van het aantal positieve wells in de tray. Spies *et al.* hebben in 2018 vastgesteld dat deze methode een goed alternatief kan zijn voor de kweekmethode. De methode is volgens hen minder arbeidsintensief, eenvoudig uit te voeren en is vooral ook betrouwbaar voor de detectie van *L. pneumophila* in drinkwater.

1.3 Legionella Beheersmaatregelen

Bij het formuleren en opzetten van beheersmaatregelen vormt in Nederland het thermisch beheersconcept de basis. In essentie betekent dit dat het koude drinkwater koud moet worden gehouden ($T < 25\text{ °C}$) en het warme water warm ($T > 60\text{ °C}$). Mengwatersystemen met een watertemperatuur rond 40 °C moeten zoveel mogelijk uitgefaseerd worden. Verder moet lange stilstand en stagnatie van het water zoveel mogelijk worden voorkomen. Het voldoen aan deze basisvoorwaarden is in Nederland al lastig maar onder tropische omstandigheden is handhaving van het thermisch beheersconcept met betrekking tot de koudwatertemperatuur vrijwel onmogelijk. Daarom ligt het voor de hand om in de tropen eerder terug te vallen op beheer met fysische en chemische technieken. Ten behoeve van dit onderzoek waren drie Nederlandse leveranciers bereid gevonden om hun technologie op pilotschaal te testen op locatie in Indonesië. Die leveranciers zijn geselecteerd op een verscheidenheid van methoden zoals weergegeven in onderstaande tabel.

Tabel 1.1 Overzicht van de bij dit onderzoek betrokken leveranciers van methoden voor legionellapreventie

leverancier	Technologie	Kwalificatie
Aquacare	BioPhree	Innovatieve technologie
Brightspark, later HSD	Chloordioxide, elektrochemisch in-situ bereid	Innovatieve technologie Bewezen effectief desinfectiemiddel
Hatenboer Water	Cu/Ag ionisatie	Bewezen technologie Bewezen effectieve desinfectiemethode

BioPhree is een innovatieve technologie die preventief groei van biofilm en daarmee indirect van legionellabacteriën voorkomt door alle orthofosfaat uit het voedende water te verwijderen waardoor fosfaat als nutriënt ontbreekt en de groei van micro-organismen wordt beperkt. De fosfaatverwijdering vindt plaats in een

filtersysteem waar het orthofosfaat wordt gebonden. Bij verzadiging moet het filter worden geregenereerd. Praktijktesten in Nederland hebben laten zien dat deze innovatieve methode effectief is om biofilmvorming in membranen (biofouling) en koelsystemen te voorkómen.

Chloordioxide is een in water opgelost gas dat goede desinfecterende eigenschappen heeft, onafhankelijk van de pH zijn werking heeft en dat leidt tot minder ongewenste desinfectiebijproducten. Omdat chloordioxide als gas in water is opgelost en ongeladen is, kan het ook beter in biofilms doordringen en daardoor effectiever legionellabacteriën bestrijden dan bijvoorbeeld vrij chloor. Deze leverancier produceert chloordioxide in-situ op elektrochemische wijze met een nieuwe innovatieve technologie.

Koper/zilverionisatie is een bewezen technologie voor legionellapreventie in Nederland maar bijvoorbeeld ook in de Verenigde Staten, waarbij hardnekkige legionellaproblemen in zeer complexe koudwatersystemen toch kunnen worden beheerst. Via gecontroleerde afgifte van koper- en zilverionen, elektrochemisch vrijgemaakt uit elektroden, worden legionellabacteriën in het water en in de biofilm afgedood. Typische concentraties van de zilver- en koperionen liggen daarbij in de range van 10 – 40 µg/l Ag en 100 – 400 µg/l Cu. Buiten de gedoseerde metaalionen worden geen desinfectiebijproducten gevormd.

1.4 Projectdoel

Het doel van dit TKI-project is om op basis van isolatie van *L. pneumophila*-stammen uit milieumonsters van verschillende 'man-made' watersystemen in Indonesië meer inzicht te krijgen welke gevaarlijke stammen van *L. pneumophila* in dat land voorkomen en – voor zover de variatie beperkt is - nieuwe detectiemethoden te ontwikkelen die zich specifiek richten op detectie en kwantificatie van die stammen.

Tevens is het doel om de effectiviteit van drie alternatieve technieken vast te stellen voor legionellapreventie bij toepassing in drinkwater- en/of koelwaterinstallaties in Indonesië: (1) koper/zilver-ionisatie (2) chloordioxide, in-situ bereid en (3) een techniek die groei van biofilm en bacteriën beperkt door verwijdering van het voor groei noodzakelijke nutriënt orthofosfaat in het voedende water (zie tabel 1.1.).

2 Materiaal en Methoden

2.1 Monsterneming en *Legionellakweek*

WLN Indonesia heeft voor dit project *L. pneumophila* uit 30 verschillende watermonsters weten te kweken, te weten drie zwembadwatermonsters, elf drinkwatermonsters, tien koeltorenmonsters en zes watermonsters waarvan het watertype onbekend is (Tabel 2.1). De zwembadwater- en drinkwatermonsters kwamen voornamelijk uit hotels, terwijl van de koeltorenmonsters onbekend is van welk gebouw ze afkomstig waren. *L. pneumophila* werd met behulp van Legiolert™ (IDEXX) opgehoopt en de Legiolert™ quanti trays werden vervolgens naar WLN in Nederland verstuurd. Daar werden de verschillende stammen opgekweekt en reïncultures werden vervolgens naar KWR Water Research Institute gestuurd.

Tabel 2.1 Aantal *L. pneumophila* isolaten dat werd verkregen per watertype en per gebouw.

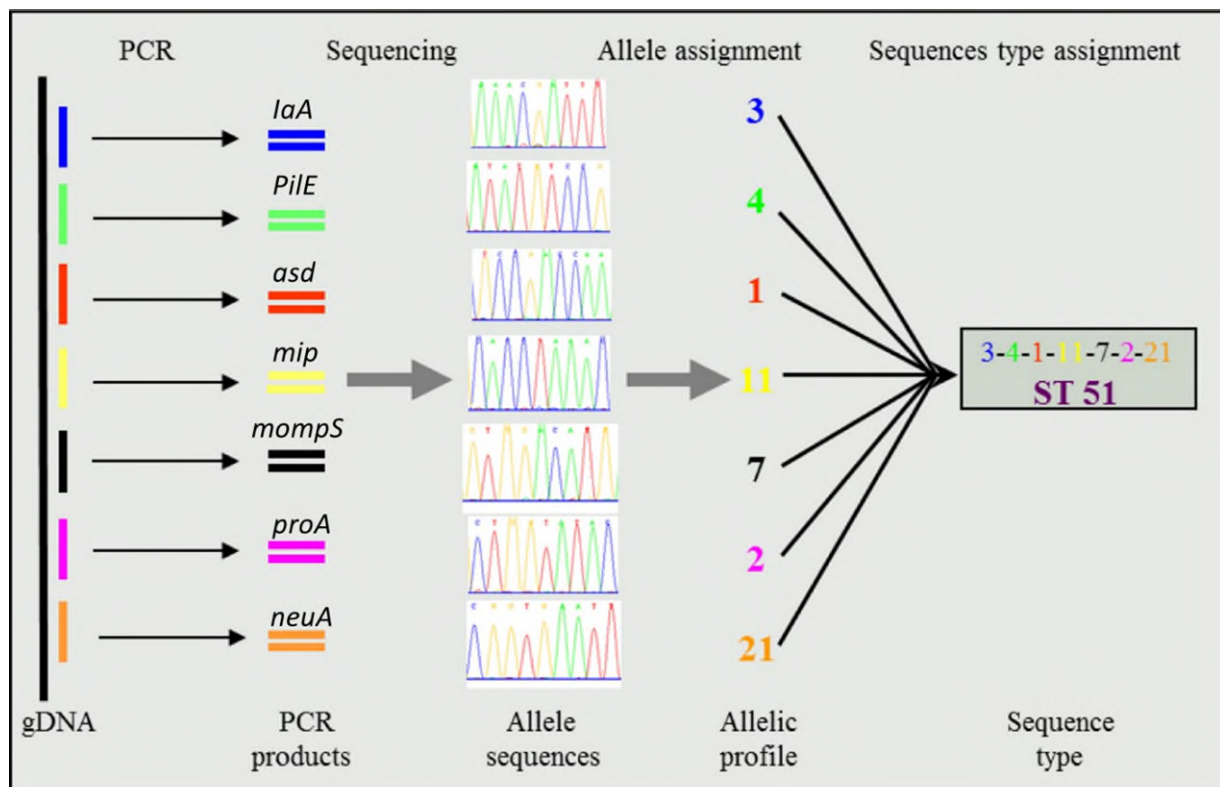
Watertype	<i>L. pneumophila</i> isolaten	Gebouw	<i>L. pneumophila</i> isolaten
Zwembadwater	3	Hotel A	10
Drinkwater uit douche	1	Hotel B	1
Drinkwater uit warmwaterkraan	4	Hotel C	1
Drinkwater uit koudwaterkraan drinkwater	6	Hotel D	1
Koeltoren	10	Hotel E	2
Onbekend	6	Hotel F	3
		Koeltoren G	8
		Koeltoren H	2
		I	1
		J	1
Totaal	30	Totaal	30

2.2 Genotypering *L. pneumophila* stammen

Bij KWR zijn ieder van de afzonderlijke *Legionella* stammen opnieuw opgekweekt, waarna het DNA is geïsoleerd. Daarna is op twee manieren het sequentiotype van iedere stam bepaald: met directe multilocus sequence-based typing (MLST) en met indirecte MLST nadat het hele genoom van de stam was gesequencet.

2.2.1 Directe MLST typeringsmethode

Van de eerste 20 isolaten die werden aangeleverd (monsterdatums 07-11-2018 en 07-02-2019) werd het DNA geïsoleerd met Instant Gene Matrix (Biorad) en is vervolgens het sequentietype bepaald met de directe MLST typeringsmethode. In Figuur 2.1 is een schematische weergave van deze directe MLST-methode voor *L. pneumophila* weergegeven en deze wordt hier ook kort beschreven. Voor de directe MLST typeringmethode werden met PCR op elk DNA-monster de volgende zeven genen geamplificeerd: *flaA*, *pilE*, *asd*, *mip*, *mompS*, *proA*, and *neuA* (Gaia et al., 2005; Ratzow et al., 2007). Drie van deze genen (*asd*, *proA* and *neuA*) zijn house-keeping genen en vier genen (*flaA*, *pilE*, *mip* en *mompS*) zijn virulentiegenen (Mentasti et al., 2014). Na amplificatie van deze zeven genen werd elke PCR-product opgestuurd naar MacroGen Europe (Amsterdam) voor het opschonen van het PCR-product, waarna ieder van de zeven geamplificeerde genen werd gesequencet, waarmee de DNA-volgorde van het PCR-product wordt bepaald. De DNA-volgorde van ieder gen wordt vervolgens vergeleken met de DNA-volgorde van hetzelfde gen van *L. pneumophila* soorten die in een Europese database zit (http://www.hpa-bioinformatics.org.uk/Legionella/Legionella_sbt/php/sbt_homepage.php), die is samengesteld door Public Health England en in samenwerking met European Centre for Disease Prevention and Control wordt beheerd. Deze database bevat momenteel 12.962 isolaten die tot 2802 verschillende sequentietypen behoren. Op basis van de overeenkomst van de DNA volgorde van een geamplificeerd gen met de database wordt een allelnummer toegewezen. Op deze manier wordt aan iedere *L. pneumophila* isolaat zeven allelnummers toegekend en vervolgens wordt de specifieke combinatie van deze zeven allelnummers weer vergeleken met de database en wanneer dezelfde combinatie in de database aanwezig is, wordt het sequentietype behorende tot die combinatie van allelnummers aan het isolaat toegekend. De gevonden sequentietypen en nieuwe sequentietypen zijn vervolgens ingediend bij de Europese database.



Figuur 2.1 Multilocus sequence-based typing (MLST) methode voor genotypering van *L. pneumophila* isolaten (aangepast van Ruppitsch, 2016).

2.2.2 MLST typering na whole genome sequencing

Voor het typeren van de *L. pneumophila* stammen na whole genome sequencing is de genoomsequentie van tien stammen bepaald. Het DNA van deze stammen is geïsoleerd bij KWR met behulp van de DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) en vervolgens heeft het sequentiebedrijf Macrogen Europe (Amsterdam) de genoomsequentie van deze stammen bepaald. Voor het bepalen van de genoomsequenties heeft Macrogen het DNA eerst gefragmenteerd door gebruik te maken van de Truseq Nano Kit van Illumina en vervolgens zijn 2x150 bp sequenties van ca. 5-8 miljoen DNA fragmenten per monster bepaald met de Illumina Novaseq. Dit levert voldoende sequentiedata om de genoomsequentie van elk van de tien stammen circa 300x te bepalen (coverage). Het programma Bionumerics is gebruikt om de sequentiefragmenten te assembleren ("SPAdes assembler") en vervolgens de sequentievariatie binnen 5778 bekende loci/genen te gebruiken voor het typeren van de Legionella stammen (Raphael et al. 2019). De zeven genen die gebruikt worden voor de directe MLST methode maken onderdeel uit van deze 5778 loci en zijn in een aparte analyse gebruikt voor het bepalen van de sequentietypen, waarbij de voorgeschreven primersequenties zijn gebruikt voor de zeven genen die worden geanalyseerd om het MLST type te bepalen.

2.3 Geschikte locaties voor pilotonderzoek

Om locaties te werven ten behoeve van het pilotonderzoek is op 12 juli 2018 een seminar georganiseerd in Jakarta Indonesia door WLN Indonesia, WLN, WMD en KWR. De titel van het seminar luidde: *International seminar on Legionella: Legionella risk, worldwide regulations & analysis*. Tijdens het seminar is het project geïntroduceerd en is een oproep gedaan aan de aanwezige partijen voor participatie als pilotlocatie. Daarnaast zijn de deelnemers opgeroepen om de projectpartners te informeren over enige kennis op het gebied van bestaande verzamelingen van milieustammen of klinische stammen van *L. pneumophila*. Op voorhand zijn voorwaarden opgesteld waaraan een locatie (bij voorkeur) zou moeten voldoen (bijlage I).

Aanvullend hierop is geprobeerd om via het WLN-laboratorium in Manado locaties te werven voor pilotonderzoek uitgaande van hun lokale contacten voor het uitvoeren van legionella-analyses. Het laboratorium had op het moment van het seminar de legionella-analyse geïmplementeerd en gevalideerd, waardoor het een belangrijke schakel vormt.

3 Resultaten en Discussie

3.1 Directe MLST typeringsmethode

Het sequentietype van de eerste 20 *L. pneumophila* isolaten werd bepaald met de directe MLST typeringsmethode en dat resulteerde in 17 verschillende sequentietypen (Tabel 3.1). De allelencode van 14 isolaten kwamen overeen met een al beschreven sequentietype uit de Europese database. Van de andere zes isolaten kwam de allelencode niet overeen met een sequentietype uit de Europese database en dit zijn dus nieuwe sequentietypen. Opvallend was dat deze nieuwe sequentietypen onderling van elkaar verschilden in de allelencode, zodat in totaal zes nieuwe sequentietypen voor *L. pneumophila* zijn gedetecteerd. Dit resultaat is niet geheel onverwacht, omdat een zoektocht in de database en de wetenschappelijke literatuur heeft geresulteerd in weinig tot geen sequentietypen van *L. pneumophila* isolaten uit Indonesië. Tevens heeft eerder onderzoek laten zien dat sommige sequentietypen van *L. pneumophila* geografisch geïsoleerd lijken (Mentasti et al., 2014). Het is daarom denkbaar dat sommige *L. pneumophila* sequentietypen specifiek zijn voor die regio en nog niet eerder beschreven.

De bevinding dat de 20 isolaten behoren tot 17 verschillende sequentietypen laat zien dat de genetische diversiteit van de geïsoleerde *L. pneumophila* stammen erg hoog is. Een aantal *L. pneumophila* isolaten zijn van dezelfde locatie afkomstig. Zo zijn er zeven isolaten afkomstig van hotel A. Vier van die zeven isolaten behoorden tot ST 337 en drie van deze vier isolaten waren geïsoleerd uit zwembadwater op 7-11-2018. Het is onbekend uit welk watertype de vierde *L. pneumophila* kwam, maar deze werd drie maanden later geïsoleerd dan de andere drie stammen. De drie andere *L. pneumophila* isolaten van deze locatie werden op 7-11-2018 (n=1) of 7-02-2019 (n=2) geïsoleerd uit de warmwaterkraan van de douche of het watertype is onbekend. Ze hadden alle drie een ander sequentietype en ook een ander sequentietype dan ST 337. Ook de drie isolaten van hotel F en koeltoren G en de twee isolaten van koeltoren H behoorden allen tot verschillende sequentietypen. Dit betekent dat de genetische diversiteit van *L. pneumophila* stammen niet alleen hoog is tussen de verschillende locaties in Indonesië, maar ook binnen een locatie.

Tabel 3.1 De sequentietypen van 20 *L. pneumophila* isolaten geïsoleerd uit verschillende watertypen in Indonesië

Datum	Locatie	water	# isolaten	Serogroep	Sequentietype
7-11-2018	Hotel A	Zwembad	3	2-14	337
7-02-2019	Hotel A	Onbekend	1	2-14	337
7-11-2018	Hotel A	Douche - heet	1	2-14	68
7-02-2019	Hotel A	?? - heet	1	1	1095
7-02-2019	Hotel A	?? - heet	1	2-14	1037
7-11-2018	Hotel B	Drinkwater - koud	1	2-14	354
7-11-2018	Hotel C	Drinkwater - koud	1	2-14	927
7-11-2018	J	Onbekend - koud	1	1	36
7-02-2019	Hotel E	Onbekend - koud	1	2-14	191
7-02-2019	H	Koeltoren	1	2-14	2630*
7-02-2019	H	Koeltoren	1	1	1
7-02-2019	Hotel F	Drinkwater - heet	1	1	1464
7-02-2019	Hotel F	Drinkwater - koud	1	Onbekend	Nieuw-1
7-02-2019	Hotel F	Drinkwater - heet	1	Onbekend	Nieuw-2
7-02-2019	G	Koeltoren	1	Onbekend	Nieuw-3
7-02-2019	G	Koeltoren	1	Onbekend	Nieuw-4
7-02-2019	G	Koeltoren	1	Onbekend	Nieuw-5
7-02-2019	Hotel D	Drinkwater	1	Onbekend	Nieuw-6

* Het *neuA* gen gaf geen PCR-product, waardoor dit ST type is bepaald zonder het *neuA* gen

Tabel 3.2 Het aantal isolaten in de Europese database die dezelfde sequentietypen hebben als gevonden in deze studie en informatie uit welke landen en bronnen deze isolaten afkomstig zijn.

Sequentietype	# isolaten	Europese database	
		Landen	Bron
337	8	GBR (2), DEU (1), RUS (1), CAN (1), DNK (3)*	Klinisch (5), milieu (3)
68	78	CAN (20), SWE (14), GB (13), CZE (5), ITA (4), DEU (4), UNK (2), FRA (2), <u>JPN (2)</u> , GRC (2), LVA (1), PRT (1), NLD (1)	Klinisch (40), milieu (30), onbekend (1)
1095	5	<u>CHN (4)</u> , <u>JPN (1)</u>	Milieu (5)
1037	1	ESP (1)	Milieu (1)
354	7	<u>JPN (2)</u> , FRA (1), DEU (1), <u>THA (1)</u> , CAN (1), CZE (1)	Klinisch (6), milieu (1)
927	2	FRA (2)	Klinisch (1), milieu (1)
36	66	USA (30), CAN (12), GBR (6), DEU (5), NLD (4), UNK (2), BEL (2), FRA (1), NOR (1), RUS (1), <u>CHN (1)</u> , <u>JPN (1)</u>	Klinisch (61), milieu (5)
191	27	GBR (18), DEU (3), RUS (2), CZE (1), NLD (1), POL (1), <u>CHN (1)</u>	Klinisch (9), milieu (18)
2630	1	GBR(1)	Klinisch (1)
1	1628	<u>JPN (50)</u> , <u>CHN (39)</u> , <u>SGP (3)</u> , <u>AUS (2)</u> [#]	Beide
1464	1	<u>CHN (1)</u>	Milieu (1)

* De landen worden weergegeven met drieletterige landencodes volgens de Europese MLST database voor *L. pneumophila*. Tussen haakjes staan het aantal isolaten in de database afkomstig uit dat land en onderstreept zijn landen in Zuidoost-Azië.

[#] Het aantal isolaten dat behoort tot sequentietype 1 in de database is dusdanig groot dat het aantal landen te groot is om in de tabel weer te geven. Daarom zijn voor dit sequentietype alleen de landen in Zuidoost-Azië weergegeven.

In de Europese database is van de gevonden sequentietypen opgezocht hoeveel isolaten in deze Europese database zitten, in welke landen het sequentietype is gevonden en uit welke bron het sequentietype is geïsoleerd (Tabel 3.2). Overigens bevat deze internationale database maar één klinische *L. pneumophila* isolaat uit Indonesië en deze behoorde tot ST 1112, een sequentietype dat we in onze studie niet hebben aangetroffen. In onze studie is ST 337 het vaakst aangetroffen onder de 20 *L. pneumophila* isolaten uit Indonesië en van dit sequentietype zitten maar acht isolaten in de Europese database. Deze acht isolaten komen allemaal uit Europa, wat niet hoeft te betekenen dat dit sequentietype niet eerder is gevonden in Zuidoost-Azië, aangezien onderzoekers de sequentietypen die ze hebben bepaald van *L. pneumophila* niet altijd doorgeven aan deze database. Van de tien andere in Indonesië aangetroffen sequentietypen hebben zes sequentietypen isolaten in de database die uit Zuidoost-Azië komen. Opvallend is dat sequentietypen 1095 en 1464 alleen maar isolaten kent uit Zuidoost-Azië en niet uit andere regio's op de wereld. Het aantal isolaten in de database van deze twee sequentietypen is echter laag (5 en 1 respectievelijk). Een zoekopdracht in Google met "*Legionella pneumophila*" ST1095 of "*Legionella pneumophila*" ST1464 resulteerde ook niet in het vinden van andere stammen dan die bekend zijn in de database. Deze resultaten laten dus zien dat in Indonesië sequentietypen van *L. pneumophila* zijn aangetroffen waarvan in de Europese database geen isolaten uit Zuidoost-Azië bekend zijn, isolaten uit zowel Zuidoost-Azië als andere regio's bekend zijn en isolaten uit enkel Zuidoost-Azië bekend zijn.

Tevens is onderzocht of de in de Europese database aanwezige sequentietypen van *L. pneumophila* isolaten, die in Indonesië zijn aangetroffen, uit het milieu of klinisch materiaal zijn geïsoleerd. Wanneer ze ook in klinisch materiaal zijn aangetroffen dan is dat een duidelijke aanwijzing dat het betreffende sequentietype ook ziekte veroorzaakt. Zeven van de elf gevonden sequentietypen zijn uit klinisch materiaal en het milieu geïsoleerd, één is alleen uit klinisch materiaal geïsoleerd en drie alleen uit het milieu. We kunnen dus concluderen dat de meeste van de gevonden *L. pneumophila* isolaten uit Indonesië waarschijnlijk een risico vormen voor de volksgezondheid. Van de drie sequentietypen waar alleen milieu-isolaten in de database zitten, is met Google gezocht of er ook klinische isolaten bekend zijn. Uit deze zoekopdracht kwam naar voren dat *L. pneumophila* ST1037 uit sputum is geïsoleerd van een patiënt met longontsteking uit de Westbank in Palestina (Jaber et al., 2018). Voor de andere twee sequentietypen (ST 1095 en ST 1464) leverde de zoekopdracht geen extra informatie op. Deze laatste twee sequentietypen zijn ook de sequentietypen waar alleen isolaten uit Zuidoost-Azië van bekend zijn. Onduidelijk blijft dus of *L. pneumophila* stammen die tot deze twee sequentietypen behoren ook ziekteverwekkend zijn.

Tabel 3.3 Overzicht van het aantal isolaten gevonden in wetenschappelijke literatuur over diversiteit van *L. pneumophila* in Zuidoost-Azië en die dezelfde sequentietypen hebben als gevonden in deze studie en informatie uit welke landen en bronnen deze isolaten afkomstig zijn.

Sequentietype	Literatuur over Zuidoost-Azië			
	# isolaten	Landen	Bron	Referenties
337	NVT*	Geen	NVT	-
68	NVT	Geen	NVT	-
1095	NVT	Geen	NVT	-
1037	NVT	Geen	NVT	-
354	3	China	Drinkwater (1), Spa (2)	Qin et al., 2013; 2014
927	NVT	Geen	NVT	-
36	1	Zuid-Korea	Drinkwater	Lee et al., 2010
191	NVT	Geen	NVT	-
2630	NVT	Geen	NVT	-
1	220	China, Japan, Zuid-Korea	Drinkwater, Koeltorenwater, Zwemwater	Qin et al., 2014; Li et al., 2015; Zhang et al., 2017; Lee et al., 2010; Amemura-Maekawa et al., 2012
1464	1	China	Hete bron	Qin et al., 2014

* NVT is niet van toepassing

Tot slot zijn een aantal wetenschappelijke artikelen gevonden waarin sequentietypen van *L. pneumophila* worden beschreven die zijn geïsoleerd uit (een) Zuidoost-Aziatisch(e) land(en). Sommige van die sequentietypen (ST 354, ST 36, ST 1 en ST 1464) zijn ook door ons aangetroffen onder de *L. pneumophila* isolaten uit Indonesië (Tabel 3.3). De Europese database bevatten voor deze sequentietypen echter ook al matches met isolaten uit Zuidoost-Aziatische landen, dus deze exercitie leverde geen nieuwe informatie op.

Tabel 3.4 De sequentietypen van 10 *L. pneumophila* isolaten geïsoleerd uit verschillende watertypen in Indonesië

Datum	Locatie	water	# isolaten	Serogroep	Sequentietype
10-04-2019	G	Koeltoren	1	Onbekend	Nieuw-7*
10-04-2019	G	Koeltoren	1	Onbekend	Nieuw-8
10-04-2019	G	Koeltoren	1	Onbekend	Nieuw-9
10-04-2019	G	Koeltoren	2	Onbekend	Nieuw-10
10-04-2019	Hotel A	Drinkwater	1	Onbekend	Nieuw-11 [#]
10-04-2019	Hotel A	Onbekend	1	Onbekend	Nieuw-12
10-04-2019	Hotel A	Onbekend	1	Onbekend	- [§]
10-04-2019	Hotel E	Onbekend	1	Onbekend	Nieuw-13*
10-04-2019	I	Onbekend	1	Onbekend	Nieuw-14*

* De sequentie van het *mompS* gen kon niet eenduidig worden teruggevonden in de hele genomsequentie

[#] De sequentie van het *mompS* en *neuA* gen kon niet eenduidig worden teruggevonden in de hele genomsequentie

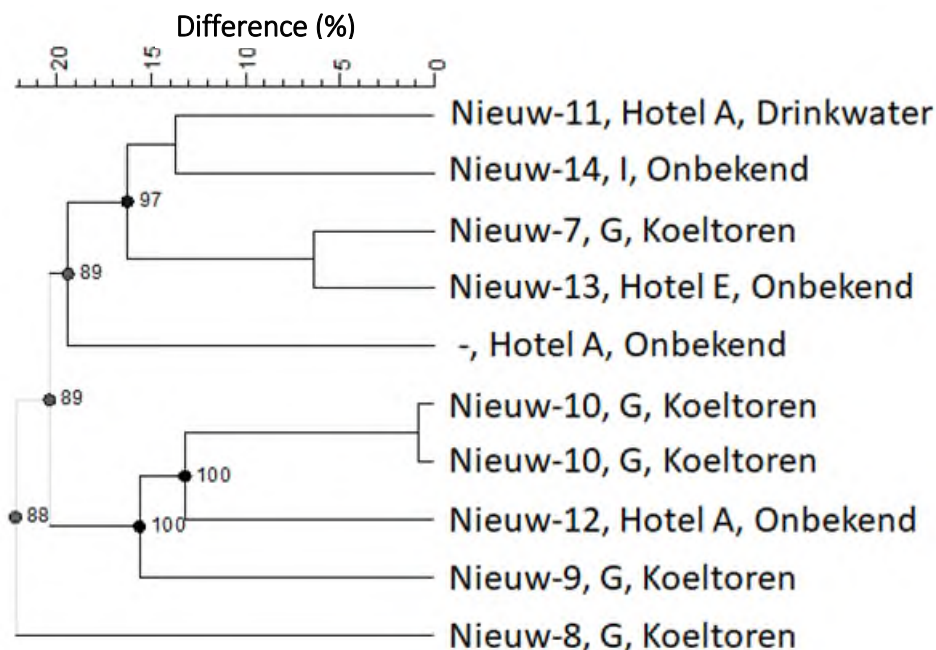
[§] Alleen de sequenties van het *mip* en *neuA* gen konden worden aangetroffen in de hele genomsequentie

3.2 MLST typering na whole-genome sequencing

De laatste tien isolaten zijn geanalyseerd met whole-genome sequencing. De zeven genen die worden gebruikt voor het bepalen van het sequentietype met MLST, zijn geïdentificeerd uit de hele genomsequentie van ieder van deze tien isolaten (Tabel 3.4). Deze tien isolaten behoorden tot negen verschillende sequentietypen, dat wederom laat zien dat de genetische diversiteit van de *L. pneumophila* isolaten uit Indonesische watertypen hoog is. Geen van de verkregen allelencombinatie kon worden toegekend aan een bestaand sequentietype. Dit kwam omdat de allelencombinatie niet voorkomt in de database (vijf isolaten) of omdat voor sommige genen geen eenduidige sequentie kon worden verkregen, waardoor geen volledige allelencode verkregen kon worden (vijf isolaten). Voor met name het *mompS* gen kon geen eenduidige sequentie worden verkregen uit de hele genomsequenties van deze vijf isolaten. Dit probleem trad ook op in eerdere studies waar whole-genome sequencing werd gebruikt om

het sequentietype van *L. pneumophila* te bepalen en wordt veroorzaakt door de aanwezigheid van meerdere niet-identieke kopieën van het *mompS* gen in het genoom (Moran-Gilad et al., 2015; Raphael et al., 2016).

De genetische verwantschap tussen de tien isolaten is ook vergeleken op basis van de sequentieovereenkomst van circa 5778 allelen (Figuur 3.1). Uit deze verwantschapsboom volgt dat de twee isolaten met hetzelfde sequentietype (Nieuw-10) ook genetisch zeer vergelijkbaar zijn op basis van 5778 allelen. De overige isolaten zijn genotypisch verschillend van elkaar, zoals ook werd waargenomen met de traditionele MLST-analyse. Deze resultaten laten ook zien dat de *L. pneumophila* isolaten die werden geïsoleerd uit dezelfde bron (bv koeltoren op locatie G) genotypisch behoorlijk verschillend van elkaar kunnen zijn.



Figuur 3.1 Verwantschapsboom van tien *L. pneumophila* isolaten die zijn geïsoleerd uit verschillende bronnen in Indonesië en die is gebaseerd op sequentieovereenkomst van circa 5778 allelen.

De allelencodering van alle isolaten is weergegeven in Tabel 3.5. De 30 isolaten behoorden in ieder geval tot 24 verschillende sequentietypen. Sequentietype 337 was het meest voorkomende sequentietype; in ieder geval vier verschillende isolaten behoorden tot dit sequentietype. Mogelijk dat een vijfde isolaat ook tot dit sequentietype behoorde, maar van dat isolaat gaven maar 2 van de 7 allelen een nummer na whole-genome sequencing. Twee isolaten behoorden tot een nieuw sequentietype (Nieuw-10) en mogelijk dat twee andere isolaten ook tot hetzelfde sequentietype behoorden (Nieuw-2 en Nieuw-11), maar doordat geen allelnummer voor twee genen kon worden toegekend voor Nieuw-11 is dit niet met zekerheid vast te stellen. Alle andere isolaten behoorden tot een uniek sequentietype.

Tabel 3.5 De allelnummering van de zeven MLST-genen van alle *L. pneumophila* isolaten uit Indonesië. In donkerblauw zijn de isolaten weergegeven met identieke allelnummering en in lichtgroen de isolaten met mogelijk dezelfde allelnummering.

Datum	Locatie	Water	ST	<i>flaA</i>	<i>pilE</i>	<i>asd</i>	<i>mip</i>	<i>mompS</i>	<i>proA</i>	<i>neuA</i>
7-02-2019	H	Koeltoren	1	1	4	3	1	1	1	1
7-02-2019	Hotel F	Drinkwater - heet	1464	2	10	15	28	19	4	3
7-02-2019	H	Koeltoren	2630	2	6	21	28	12	8	?
7-11-2018	J	Onbekend - koud	36	3	4	1	1	14	9	1
7-11-2018	Hotel B	Drinkwater - koud	354	3	5	1	7	14	32	8
10-04-2019	G	Koeltoren	Nieuw-9	3	8	3	28	9	4	3
10-04-2019	G	Koeltoren	Nieuw-8	3	10	1	5	1	9	3
7-11-2018	Hotel C	Drinkwater - koud	927	3	13	1	14	14	9	3
7-11-2018	Hotel A	Douche - heet	68	3	13	1	28	14	9	8
7-02-2019	Hotel D	Drinkwater	Nieuw-6	3	13	1	10	14	9	8
7-02-2019	Hotel F	Drinkwater - heet	Nieuw-2	4	8	11	28	34	12	3
10-04-2019	Hotel A	Drinkwater	Nieuw-11	4	8	11	28	?	12	?
7-02-2019	Hotel A	?? – heet	1037	6	10	14	28	21	4	9
10-04-2019	Hotel A	Onbekend	Nieuw-12	6	10	15	10	9	40	9
7-02-2019	Hotel F	Drinkwater - koud	Nieuw-1	6	10	15	28	4	14	?
10-04-2019	Hotel A	Onbekend	1095	6	10	15	28	21	14	11
7-02-2019	G	Koeltoren	Nieuw-4	6	10	17	3	9	4	11
10-04-2019	G	Koeltoren	Nieuw-10	6	10	19	12	19	4	3
10-04-2019	G	Koeltoren	Nieuw-10	6	10	19	12	19	4	3
7-02-2019	Hotel E	Onbekend - koud	191	6	10	19	28	19	4	3
10-04-2019	G	Koeltoren	Nieuw-7	7	6	3	3	?	11	10
7-02-2019	G	Koeltoren	Nieuw-3	7	6	3	6	48	11	?
10-04-2019	Hotel E	Onbekend	Nieuw-13	7	6	17	3	?	11	11
7-02-2019	G	Koeltoren	Nieuw-5	7	6	31	7	48	15	9
10-04-2019	I	Onbekend	Nieuw-14	8	57	17	8	?	11	11
7-11-2018	Hotel A	Zwembad	337	10	22	7	28	16	18	6
7-11-2018	Hotel A	Zwembad	337	10	22	7	28	16	18	6
7-11-2018	Hotel A	Zwembad	337	10	22	7	28	16	18	6
7-11-2018	Hotel A	Onbekend	337	10	22	7	28	16	18	6
10-04-2019	Hotel A	Onbekend	-	?	?	?	28	?	?	6

3.3 Algemene discussie genotypering legionellastammen

Eén van de doelen van dit TKI-onderzoek was het ontwikkelen van nieuwe detectiemethoden die zich specifiek richten op detectie en kwantificatie van één of twee van de dominante en gevaarlijke varianten van *L. pneumophila* in Indonesië. Om aan dit doel te voldoen, was het noodzakelijk om de meest dominante sequentietypen van *L. pneumophila* bij patiënten in Indonesië te achterhalen. Doordat in Indonesische ziekenhuizen niet of nauwelijks wordt gecontroleerd op de veteranenziekte bij patiënten met een longontsteking, ontbreekt een database met sequentietypen van *L. pneumophila* stammen uit patiënten. Daarom is getracht deze dominante sequentietypen indirect te achterhalen door *L. pneumophila* stammen uit verschillende watermonsters te kweken, het sequentietype te bepalen en deze te vergelijken met dezelfde sequentietypen die in de Europese database zitten. Deze analyse leverde echter geen duidelijk dominante sequentietypen van *L. pneumophila* op, aangezien de 30 isolaten in ieder geval behoorden tot 24 verschillende sequentietypen. *L. pneumophila* ST 337 en Nieuw-10 waren de enige sequentietypen die met zekerheid meerdere keren werd aangetroffen (n=4 en n=2, respectievelijk). De vier ST 337 isolaten werden uit hetzelfde hotel geïsoleerd en de twee Nieuw-10 isolaten uit dezelfde koeltoren. Van de sequentietypen van *L. pneumophila* isolaten uit Indonesië die matchten met al beschreven sequentietypen (14 van de 30 isolaten), zijn de meeste sequentietypen ook in patiënten aangetroffen. Uiteindelijk bleken 11 van de 14 stammen die tot een bestaan sequentietype kon worden benoemd met zekerheid te behoren tot negen verschillende sequentietypen die ook in klinisch materiaal zijn waargenomen.

Uit deze resultaten volgt dat in watermonsters genomen uit verschillende bronnen en verschillende locaties op Indonesië geen *L. pneumophila* stammen van hetzelfde genotype domineren die ook ziekte bij mensen veroorzaken. Met de nu opgebouwde database is het dus niet gelukt om één of twee dominante en gevaarlijke *L. pneumophila* sequentietypen voor Indonesië te identificeren, waardoor de vervolgstap, het ontwikkelen van specifieke detectiemethoden voor één of twee dominante en gevaarlijke sequentietypen van *L. pneumophila* in Indonesië, (nog) niet kan worden uitgevoerd. Om dergelijke dominante sequentietypen te identificeren is het noodzakelijk om de database met Indonesische stammen uit te breiden. Echter, doordat slechts een kleine database is verkregen met een zeer grote diversiteit, is de verwachting dat bij uitbreiding van de database er alleen maar meer verschillende sequentietypen worden waargenomen. Dit betekent dat naar alle waarschijnlijkheid een zeer grote database moet worden opgebouwd (met het sequentietypen van vele honderden *L. pneumophila* stammen), voordat duidelijk is welk gevaarlijk sequentietype in Indonesië domineert. Daarnaast bestaat er de mogelijkheid dat zelfs met een dergelijke grote database een groot aantal verschillende sequentietypen domineren in Indonesië, waardoor het nog steeds niet mogelijk is om specifieke detectiemethoden voor één of twee gevaarlijke sequentietypen te ontwikkelen.

Daarnaast rijst de vraag of op basis van dit onderzoek het wel nodig is om monitoring en detectie te richten op slechts één of twee gevaarlijke sequentietypen. Doordat de meeste van de tot een bestaand sequentietype geïdentificeerde waterisolaten van *L. pneumophila* behoren tot klinisch relevante sequentietypen, lijkt de aanwezigheid van *L. pneumophila* op zich al een goede indicatie voor mogelijke gezondheidsrisico's te geven. Voor detectie van *L. pneumophila* zijn al specifieke en gevalideerde detectiemethoden voor handen (NASSEM, 2019). Het is daarom aanbevelingswaardig om die methoden toe te passen bij het monitoren van milieumonsters op voor de volksgezondheid relevante *L. pneumophila* in Indonesië. Bij een legionella-uitbraak is het wenselijk om de bron van de infectie te achterhalen. In dat geval is het aanbevelingswaardig om isolaten van Legionella te verkrijgen en deze vervolgens te typeren met MLST en/of whole-genome sequencing en te vergelijken met het genotype van de uitbraakstam.

3.4 Geen pilotlocaties voor alternatieve technieken

Het tweede doel van het project was het vaststellen van de effectiviteit van drie alternatieve technieken voor legionellapreventie bij toepassing in drinkwater- en/of koelwaterinstallaties in Indonesië. Hiervoor is getracht pilotlocaties in Indonesië te vinden onder andere middels het organiseren van een seminar over *Legionella*. Voor het seminar in Jakarta op 12 juli 2018 hebben zich 109 personen aangemeld waarvan uiteindelijk 80 personen hebben deelgenomen. Het betrof een mix van vertegenwoordigers van overheidsinstanties, universiteiten, bedrijven en een aantal hotels. Het programma van het seminar was als volgt:

- Introduction by Mr. Gerrit Veenendaal WMD
- Keynote speech by Ministry of Health Indonesia
- *Legionella* risk in drinking water and cooling water installations by Mr. Frank Oesterholt KWR
- Overview of analysis methods of *Legionella* in drinking and cooling water by Mr. Gerhard Wubbels WLN
- Introduction of the Legiolert™ Program by spokesman IDEXX
- Presentation about lab facilities in Indonesia
- Discussion and possibility to sign up for participation in the project “*Legionella control in tropical countries*” by Mr. Frank Oesterholt KWR
- Closing and certificate distribution

Tijdens het seminar is het voornamelijk Indonesische publiek opgeroepen om de projectpartners te helpen bij de uitvoering van het project. Zowel als het gaat om het aanleveren van bestaande informatie over *L. pneumophila* stammen (sequentietypen) als het aanbieden van geschikte pilotlocaties. Die laatste oproep was vooral gericht op lokale vertegenwoordigers van hotelketens, ziekenhuizen en industrie die zich zorgen maken over aanwezigheid van legionellabacteriën in hun watersystemen.

Tijdens de bijeenkomst is een invulformulier uitgereikt aan alle deelnemers waarmee men zich kon aanmelden voor participatie aan het project door een pilotlocatie beschikbaar te stellen (zie Bijlage II). Uiteindelijk zijn vijf formulieren ingevuld en geretourneerd:

- 2 van vertegenwoordigers van National Standardisation Agency (KAN)
- 1 van een vertegenwoordiger van de University Esa Unggul wants to ‘contribute and participate’.
- 1 van een vertegenwoordiger van BP (LNG) Berau. Drinking water system 100 taps. West Papoea
- 1 van een vertegenwoordiger van PT Petrosa Tangerang.

De vertegenwoordigers van KAN en de Universiteit wilden met het invullen vooral hun belangstelling tonen voor het onderwerp. De andere twee locaties voldeden niet aan de hoofdvoorwaarden.

Uiteindelijk is het niet gelukt om geschikte pilotlocaties te vinden. Hiervoor zijn verschillende oorzaken aan te wijzen:

- Het risico van legionellose wordt in Indonesië nog nauwelijks onderkend. Dat bleek onder andere uit de tegenvallende vraag naar legionella-analyses bij het laboratorium in Manado. Dat bleek indirect ook uit de bijdrage vanuit het Ministerie van Gezondheid in Indonesië aan het seminar. Volgens haar is het risico van groei van de legionellabacterie in watergedragen systemen bekend maar heeft geen prioriteit. Daarvoor zijn er nog andere uitdagingen in het land ook op het gebied van andere watergerelateerde pathogenen (bv Cholera).
- Door de overgang van het laboratorium in Manado naar SGS in het voorjaar van 2019 waren de medewerkers niet in de gelegenheid om een rol te vervullen bij het zoeken naar geschikte pilotlocaties in hun klantenbestand. Daarvoor lagen simpelweg de prioriteiten elders.
- De directe respons vanuit het seminar viel tegen waaruit kan worden opgemaakt dat de beheerders van waterinstallaties nog niet toe zijn aan de implementatie van beheersmaatregelen voor *Legionella*. Bovendien

kan uit de beperkte respons worden opgemaakt dat veel installaties niet beschikken over een legionellarisicoanalyse en/of legionellabeheersplan.

4 Conclusies en aanbevelingen

4.1 Conclusies

De genetische diversiteit van *L. pneumophila* in watermonsters genomen op verschillende locaties en van verschillende bronnen is zeer groot in Indonesië.

De meeste *L. pneumophila* isolaten uit watermonsters in Indonesië die tot een bestaand sequentietype werden geïdentificeerd, behoorden tot sequentietypen waar ook klinische isolaten toe behoren en vormen daarmee waarschijnlijk een risico voor de volksgezondheid.

In ieder geval elf isolaten van *L. pneumophila* uit drinkwater en koeltorenwater in Indonesië, behoorden tot niet eerder beschreven sequentietypen. Deze elf isolaten behoorden tot tien verschillende sequentietypen. De allelencode van ieder van deze nieuwe sequentietype zijn ingevoerd in de Europese database, zodat ze een sequentietype krijgen toegewezen.

Het onderzoek naar de sequentietypen van *L. pneumophila* isolaten uit Indonesië heeft niet geleid tot het detecteren van één of twee dominante en gevaarlijke sequentietypen. Hierdoor is het niet mogelijk om detectiemethoden voor dergelijke sequentietypen te ontwikkelen.

Om verschillende redenen is het niet gelukt om geschikte pilotlocaties te vinden in Indonesië voor het testen van de effectiviteit van verschillende legionellabeheerstechnieken. In ieder geval heeft dit project duidelijk gemaakt dat het bestrijden van het risico op legionellose door blootstelling aan aerosolen uit waterinstallaties in Indonesië nog geen grote prioriteit krijgt. Daarvoor kampt het land nog met teveel andere infectieziekten die jaarlijks veel slachtoffers eisen.

4.2 Aanbevelingen

Doordat de genetische diversiteit van *L. pneumophila* isolaten uit verschillende watermonsters en locaties in Indonesië erg hoog is en de meeste van deze isolaten gerelateerd zijn aan klinisch relevante stammen, is het niet mogelijk om specifieke detectiemethoden te ontwikkelen voor één of twee dominante en gevaarlijke sequentietypen in Indonesië. In de plaats daarvan wordt aanbevolen om *L. pneumophila* specifiek te monitoren in Indonesische watermonsters, omdat *L. pneumophila* in het algemeen een goede indicatie lijkt te zijn voor eventuele gezondheidsrisico's.

5 Referenties

Amemura-Maekawa J, *et al.* (2012) Distribution of monoclonal antibody subgroups and sequence-based types among *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates derived from cooling tower water, bathwater, and soil in Japan. *Appl Environ Microbiol* 78(12):4263-4270.

Gaia V, *et al.* (2005) Consensus sequence-based scheme for epidemiological typing of clinical and environmental isolates of *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 43(5):2047-2052.

Jaber L, *et al.* (2018) Comparison of in situ sequence type analysis of *Legionella pneumophila* in respiratory tract secretions and environmental samples of a hospital in East Jerusalem. *Epidemiol Infect* 146(16):2116-2121.

Lee HK, Shim JI, Kim HE, Yu JY, & Kang YH (2010) Distribution of *Legionella* species from environmental water sources of public facilities and genetic diversity of *L. pneumophila* serogroup 1 in South Korea. *Appl Environ Microbiol* 76(19):6547-6554.

Li L, *et al.* (2015) Prevalence and molecular characteristics of waterborne pathogen *Legionella* in industrial cooling tower environments. *Int J Environ Res Public Health* 12(10):12605-12617.

Mentasti M, *et al.* (2017) Rapid detection and evolutionary analysis of *Legionella pneumophila* serogroup 1 sequence type 47. *Clinical Microbiology and Infection* 23(4):264.e261-264.e269.

Moran-Gilad J, *et al.* (2015) Design and application of a core genome multilocus sequence typing scheme for investigation of Legionnaires' disease incidents. *Eurosurveillance* 20(28):21186.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. 2019. *Management of Legionella in Water Systems*. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/25474>.

Qin T, *et al.* (2013) High prevalence, genetic diversity and intracellular growth ability of *Legionella* in hot spring environments. *PLoS One* 8(3):e59018.

Qin T, *et al.* (2014) Distribution of sequence-based types of *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains isolated from cooling towers, hot springs, and potable water systems in China. *Appl Environ Microbiol* 80(7):2150-2157.

Raphael BH, Baker DJ, Nazarian E, *et al.* Genomic resolution of outbreak-associated *Legionella pneumophila* serogroup 1 isolates from New York State. *Appl Environ Microbiol*. 2016;82(12):3582-3590.

Raphael, B.H., Huynh, T., Brown, E., Smith, J.C., Ruberto, I., Getsinger, L., White, S. and Winchell, J.M. (2019) Culture of Clinical Specimens Reveals Extensive Diversity of *Legionella pneumophila* Strains in Arizona. *mSphere* 4(1), e00649-00618.

Ratzow S, Gaia V, Helbig JH, Fry NK, & Lück PC (2007) Addition of *neuA*, the gene encoding N-acylneuraminyl transferase, increases the discriminatory ability of the consensus sequence-based scheme for typing *Legionella pneumophila* serogroup 1 strains. *J Clin Microbiol* 45(6):1965-1968.

Ruppitsch, W. (2016). Molecular typing of bacteria for epidemiological surveillance and outbreak investigation, *Die Bodenkultur: Journal of Land Management, Food and Environment*, 67(4), 199-224.

Spies K., S. Pleischl, B. Lange, B. Langer, I. Hübner, L. Jurzik, K. Luden, M. Exner, Comparison of the Legiolert™/Quanti-Tray® MPN test for the enumeration of *Legionella pneumophila* from potable water samples with the German regulatory requirements methods ISO 11731-2 and ISO 11731, International Journal of Hygiene and Environmental Health, Volume 221, Issue 7, 2018,

Valster RM, Wullings BA, van den Berg R, & van der Kooij D (2011) Relationships between free-living protozoa, cultivable *Legionella* spp., and water quality characteristics in three drinking water supplies in the Caribbean. *Appl Environ Microbiol* 77(20):7321-7328.

Zhang L, *et al.* (2017) High prevalence and genetic polymorphisms of *Legionella* in natural and man-made aquatic environments in Wenzhou, China. *Int J Environ Res Public Health* 14(3), 222.

I Voorwaarden pilotdeelname

Terms and conditions for participation in the TKI-project “*Legionella control in the Tropic.*”

Basis terms and conditions for selection of a water system as potential pilot location:

- The water system is preferably located in Jakarta or Bali (hotel, hospital, nursing center, industry, ..)
- *Legionella* or *Legionella pneumophila* has been detected in the water system at several monitoring points in the system. There should be a significant Legionella problem in the water system, so it is possible to show a positive effect of applying one of the treatment technologies.
- The water system should be good documented, i.e. detailed, accurate drawings should be available. Preferably a risk assessment and control plan for Legionella are available.
- The owner of the water system must be willing to accommodate a pilot plant in the water system for a period of 12 months. Technology suppliers will install their technology on location (no costs). Including instructions for members of the technical staff (no costs). The staff will be asked to perform some activities such as supervising the equipment, registering data, replenishing chemicals or taking samples.
- The technology suppliers has more detailed demands for connection of the pilot and monitoring parameters (see appendix).
- The owner of the water system must pay for the analysis of Legionella and other relevant parameters. As part of the project KWR will provide with a monitoring plan based on earlier research in the Netherlands. The number of monitoring points will depend on the complexity of the water system/the number of taps (see table below). Maximum number of monitoring points is 14, one sampling point is directly located behind the installed technology. KWR will evaluate the pilot results together with the project partners (no costs). The list of parameters will partly depend on the technology (see appendix) but total Bacteria Count (CFU/ml), total Legionella Count (CFU/l) (or IDEXX-method) are general parameters.
- The owner of the water system will have to sign a contract with the technology supplier to arrange responsibilities and liabilities.

Total number of taps in the drinking water system	Minimum number of monitoring points
0 - 50	2
51-100	4
101-200	6
201-400	8
401-800	10
801-1600	12
More than 1600	14

II Invulformulier pilotdeelnemer

Are you responsible for a water system in Jakarta or Bali (hotel, hospital, nursing center, industry, ..) and are you concerned about the presence of Legionella in your cooling water system or your tap water system?
Are you willing to participate in and contribute to our research project “*Legionella control in tropical countries*”

Then, please fill out this form, scan it and send it to Mrs. Julita Malomba (WLN Indonesia[#]) jmalomba@wln.co.id and/or Mr. Frank Oosterholt (KWR) frank.oosterholt@kwrwater.nl

your contact data		
Form of address		e.g. Mr, Mrs, Dr, Prof, etc
Full name	<i>last</i>	<i>first</i>
Email address		
Phone number		
your company data		
Company Name		
Type of company		e.g. hotel, hospital, etcetera
Street Address		
Postal Code		
City		
Country		
water installation data		
type of installation		e.g. drinking water, cooling water, other
water consumption per year (approx..)		[m ³]
maximum hourly flow		[m ³ /h]
for drinking water installations		
number of water taps / or number of rooms (hotel)		approx. number
do you have your own pumping cellar for drinking water?		yes or no

Postal address: WLN Indonesia; Jl. Yos Sudarso No. 65, Paal 2, Manado 95129, Sulawesi Utara, Indonesia