



Nederland moet zich blijven focussen op zowel Legionella pneumophila als Legionella non- pneumophila

een literatuurstudie naar aanleiding van het KWR-rapport

'Met recht naar een doeltreffender Legionellapreventie'

Opdrachtgever : Fenelab Technische Commissie Legionellaregelgeving
Auteur : Monique Bastmeijer
Publicatiedatum : 21 juli 2023

Literatuurstudie *Nederland moet zich blijven focussen op zowel Legionella pneumophila als Legionella non-pneumophila*



Inleiding.....	3
Zorgplicht drinkwaterveiligheid	3
Toekomstbeeld samenleving.....	4
Bespreking KWR rapport.....	4
L. anisa.....	4
Ziekteverwekkende micro-organismen.....	5
Early-warning	5
Detectiemethode	6
Conclusie over loslaten van het testen op Legionella non-pneumophila	6
Bijlage: Niet gebruikte wetenschappelijke onderzoeken en studies.....	9

Inleiding

De Rijksoverheid is voornemens om de legionellaregelgeving zodanig aan te passen dat er alleen nog in ziekenhuizen op zowel *Legionella pneumophila* als *Legionella non-pneumophila* wordt gemonitord en bij alle overige prioritaire instellingen alleen nog gemonitord wordt op *Legionella pneumophila*. Dit voornemen is in belangrijke mate gebaseerd op het onderzoek van KWR / Berenschot met de titel '*Met recht naar een doeltreffende legionellapreventie*' (2021).

De Technische Commissie Legionellaregelgeving van Fenelab heeft Monique Bastmeijer¹, van WeL Inspectie, bereid gevonden een literatuurstudie te doen naar aanleiding van het KWR Berenschotrapport. De bevindingen uit deze literatuurstudie zijn in dit rapport opgenomen. In de bijlage zijn relevante teksten uit de aangehaalde literatuurbronnen opgenomen.

Hieronder worden de uitkomsten van het literatuuronderzoek samengevat.

Zorgplicht drinkwaterveiligheid

In Nederland geldt voor zowel prioritaire installaties als niet-prioritaire installaties voor drinkwater een zorgplicht. Deze zorgplicht geeft aan dat een beheerder in algemene zin - op grond van de Drinkwaterwet - evenals een beheerder van een collectieve drinkwaterinstallatie - op grond van het Drinkwaterbesluit - een zorgplicht voor de levering van deugdelijk drinkwater hebben. Dit betekent dat het water dat men levert geen micro-organismen mag bevatten in hoeveelheden die nadelige effecten kunnen hebben op de volksgezondheid van de gebruikers.

Legionella non-pneumophila blijkt wel degelijk als een ziekmakende bacterie te worden beschouwd, waarover, met name door gebrek aan aanvullend onderzoek, nog veel niet bekend is. De verplichtingen die voortvloeien uit hoofdstuk 4 van het Drinkwaterbesluit, zijn gebaseerd op de zorgplicht dat drinkwater geen bacteriën mag bevatten die mensen ziek kunnen maken. Deze zorgplicht zou niet meer voldoende nagekomen worden wanneer er niet meer wordt geanalyseerd en geacteerd op de *Legionella non-pneumophila*.

In artikel 4, eerste lid, van de Regeling Legionellapreventie in drinkwater en warmtapwater zijn de volgende legionellasoorten aangewezen waarvoor de in artikel 36 van het Drinkwaterbesluit genoemde kwaliteitseis van toepassing is. '*L. anisa*, *L. birminghamensis*, *L. bozemanii*, *L. cincinnatiensis*, *L. dumoffii*, *L. erythra*, *L. feeleii*, *L. gormanii*, *L. hackeliae*, *L. jordanis*, *L. lansingensis*, *L. longbeachae*, *L. maceachernii*, *L. micdadei*, *L. oakridgensis*, *L. parisiensis*, *L. pneumophila*, *L. sainthelensi*, *L. tusconensis*, *L. wadsworthii* en *L. waltersii*'. Hierbij gaat het dus naast *Legionella pneumophila* om andere zogenaamde *Legionella non-pneumophilasoorten* die ook met ziekte bij de mens zijn geassocieerd. Het feit dat de wetgever deze *Legionella non-pneumophilasoorten* bij de

¹ Over de auteur:

Monique Bastmeijer heeft 22 jaar ervaring op het gebied wet- en regelgeving op het gebied van preventie en bestrijding van legionella. Haar ervaring heeft zij opgedaan in verschillende rollen, waaronder: voormalig inspecteur bij de VROM Inspectie, voormalig bestuurslid van Stichting Veteranenziekte en haar huidige rol als projectleider bij een adviesbureau.



ziekmakende soorten opsomt, kan niet los gezien worden van de zorgplicht. Wanneer de zorgplichtbepaling in de Drinkwaterwet blijft bestaan en daar ook de verplichtingen voor prioritair locaties op gebaseerd zijn, zullen deze soorten moeten worden meegenomen in acties om deze bacterie te bestrijden.

Toekomstbeeld samenleving

De komende decennia zal Nederland verder vergrijzen en te maken krijgen met een toenemend aantal mensen met een verzwakt immuunsysteem. Tevens zal de tendens dat mensen sneller uit het ziekenhuis worden ontslagen en thuis worden behandeld voor allerlei ziekten (o.a. kankerbehandeling) verder toenemen. Mensen op leeftijd gaan niet snel meer naar een verzorgingshuis. Het doel is om mensen zo lang mogelijk in hun eigen omgeving te laten wonen.

Het gevolg hiervan is dat (kwetsbare) mensen dus ook in hun eigen omgeving in aanraking kunnen komen met Legionella (zwembad, sporthal, thuis, afvalwaterzuivering, koeltorens etc. etc.). Kwetsbare groepen binnen een bevolking, zoals ouderen en mensen met een verminderde afweer, door bijvoorbeeld transplantatie, een chronische ziekte of chemotherapie, zijn vatbaarder voor het oplopen van infectieziekten. Ook is het beloop van infectieziekten bij deze mensen vaak ernstiger. Een toename van deze groepen, bijvoorbeeld door vergrijzing, kan een populatie gevoeliger maken voor infectieziekten, zoals Legionellose. Mensen die Legionellose oplopen, worden in 90-95% ziek van Legionella-pneumophila en in 5 tot 10% van de gevallen van Legionella non-pneumophila. Wanneer kwetsbare groepen binnen de bevolking toenemen, zullen deze percentages wellicht veranderen, maar in ieder geval zullen de absolute aantallen veranderen. Er zullen meer mensen ziek worden van Legionella en meer mensen komen te overlijden door deze bacterie.

Bespreking KWR rapport

Het Ministerie van I&W heeft aangegeven dat het verantwoord is om wat betreft het testen op Legionella te focussen op Legionella pneumophila, met uitzondering van ziekenhuizen (en eventueel verzorgingstehuizen). Het ministerie is onder andere op basis van het KWR / Berenschotrapport *'Met recht naar een doeltreffender Legionellapreventie'* van juni 2021 tot deze conclusie gekomen. In hoofdstuk 7 van het betreffende KWR-rapport wordt een aantal conclusies getrokken, waar wetenschappelijk een ander oordeel over gevormd kan worden. Verder zijn er belangrijke wetenschappelijke onderzoeken niet in het rapport verwerkt. Over een aantal conclusies in dit rapport staat in wetenschappelijke artikelen een ander oordeel.

L. anisa

Eén van de conclusies uit het KWR-rapport is dat in Nederland vrijwel geen ziektegevallen beschreven zijn die zijn veroorzaakt door *L. anisa*. *"Het aantal gediagnosticeerde en gemelde ziektegevallen veroorzaakt door L. anisa is dan ook lager dan één per jaar. Onduidelijk is wel hoe groot de onderdiagnostiek is voor L. anisa"*. Vervolgens wordt er in het KWR-rapport melding gemaakt over het volgende: *"In 2006 is wel een wetenschappelijke publicatie verschenen met als titel: 'Legionella anisa,*

a possible indicator of water contamination by Legionella pneumophila' (van der Mee-Marquet et al., 2006), wat suggereert dat L. anisa toch als indicatororganisme voor L. pneumophila kan worden toegepast. In de studie van Van der Mee-Marquet et al. (2006) wordt echter niet onderzocht in hoeverre L. anisa kan worden gebruikt als indicatororganisme voor L. pneumophila, maar is onderzocht in hoeverre de detectie van L. anisa met de selectieve kweekmethode volgens ISO 11731 de aanwezigheid van L. pneumophila kan maskeren."

Wanneer we kijken naar de conclusie in de wetenschappelijke studie: 'Legionella anisa, a possible indicator of water contamination by Legionella pneumophila' dan blijkt daar het volgende staan: "**Conclusion.** We suggest that (i) the thermal shock applied to the whole water system revealed the presence of previously undetected L. pneumophila contamination and (ii) the detection of L. anisa in water samples should be considered an indication that the water system was colonized by Legionella species, including L. pneumophila. Consequently, as recommended by the Centers for Disease Control and Prevention (34), when Legionella is detected in environmental samples, action should be taken to eradicate all Legionella contamination of the water distribution system to prevent L. pneumophila infection in immunocompromised patients.". De conclusie in de wetenschappelijke publicatie lijkt toch een geheel andere conclusie, dan de conclusie uit het KWR-rapport.

Ziekteverwekkende micro-organismen

De onderstaande conclusies uit het KWR rapport zijn niet te volgen:

"Naast ziekteverwekkende legionellasoorten zijn in het Nederlandse drinkwater ook andere ziekteverwekkende micro-organismen aangetroffen die zich in de leidingwaterinstallatie vermeerderen en waar geen regelgeving in het drinkwater voor geldt. De ziekte veroorzaakt door deze andere ziekteverwekkers zijn niet meldingsplichtig, maar schattingen laten zien dat het aantal ziektegevallen waarschijnlijk hoger is dan het aantal ziektegevallen veroorzaakt door ziekteverwekkende L. non-pneumophilasoorten. Voor deze andere ziekteverwekkers geldt net als voor ziekteverwekkende legionellasoorten (inclusief L. pneumophila) dat drinkwater niet de enige bron van infectie is." en "Het richten op regelgeving ten aanzien van ziekteverwekkende L. non-pneumophilasoorten is niet in lijn met de afwezigheid van regelgeving van andere opportunistische ziekteverwekkende micro-organismen in drinkwater die virulenter zijn en waarvan meer ziektegevallen in Nederland worden waargenomen."

De afwezigheid van regelgeving voor andere micro-organismen is immers nog niet een rechtvaardiging voor het verlaten van de Legionella non-pneumophila. Verder is het zo dat in Duitsland en ook op de BES-eilanden al wel normen zijn gesteld voor een aantal van deze micro-organismen (denk aan Pseudomonas Aeruginosa en Aeromonas). Het zou goed zijn wanneer Nederland ook een bredere scope zou aanhouden voor drinkwaterveiligheid en deze micro-organismen zou meenemen in het testbeleid.

Early-warning

De conclusie "L. non-pneumophila voldoet als indicatororganisme voor de pathogeen L. pneumophila niet aan vier van de vijf criteria die door internationale wetenschappelijke studies, inclusief die van de WHO, zijn gesteld aan een ideaal indicatororganisme" is gebaseerd op een stelling vanuit de markt dat "wanneer Legionella (welke soort dan ook) in drinkwater wordt aangetroffen, er ook altijd problemen worden gezien in beheer, aanleg en/of onderhoud van de drinkwaterinstallatie."

Daardoor heeft de markt gezegd dat het aantreffen van Legionella non-pneumophila een indicatorparameter is voor slecht beheer, aanleg of onderhoud en dat er daarmee ook risico is voor het ontstaan van groei van Legionella pneumophila, wanneer de (temperatuur)omstandigheden daar gunstig voor zijn. Het is dus een soort early-warningsysteem, zodat je niet verrast wordt door eventueel ernstiger situaties. (zie het eerder genoemde artikel 'Legionella anisa, a possible indicator of water contamination by Legionella pneumophila').

Detectiemethode

Op pagina 55 van het KWR-rapport staat de conclusie: *“Op basis van de huidige wetenschappelijke kennis ten aanzien van ziekteverwekkende L. nonpneumophila en het gebruik van L. nonpneumophila als indicator voor L. pneumophila of om installaties te identificeren waar het beheer tegen L. pneumophila onvoldoende is, wordt geconcludeerd dat het richten van de wetgeving voor de meeste prioritaire instellingen op alle kweekbare legionellasoorten in plaats van kweekbare L. pneumophila weinig bijdraagt om ziektegevallen met legionellapneumonie te voorkómen, mits gestandaardiseerde specifieke detectiemethoden voor kweekbare L. pneumophila kunnen worden ingezet.”*

Dit verwijst naar specifieke detectiemethoden, zoals Legiolert; een methode die in hoofdstuk 7 van het KWR / Berenschot-rapport 12 keer wordt genoemd. In de literatuurlijst van het rapport worden 2 studies over Legiolert vermeld. In aansluiting op het rapport van KWR heeft RIVM een literatuurstudie uitgevoerd naar de detectie van Legionella in (drink)water. (RIVM-briefrapport 2022-0181 H.H.J.L. van den Berg et al) Het RIVM stelt hierin dat alle studies die naar Legiolert zijn gedaan, in meer of mindere mate zijn gesponsord door de betreffende leverancier.

Verder geeft het RIVM aan geen bepaalde alternatieve detectiemethode voor Legionella pneumophila of Legionella spp. te kunnen aanbevelen: *“Op basis van de literatuurstudie kan geen bepaalde ‘alternatieve’ detectiemethoden voor Legionella pneumophila of Legionella spp. worden aanbevolen. Wel is het aan te bevelen dat in de regelgeving de mogelijkheid blijft bestaan om een andere methode te gebruiken die gelijkwaardig of beter is dan de NEN-EN-ISO 11731, mits deze gevalideerd is. Indien voor sommige prioritaire locaties de monitoring enkel op L. pneumophila gericht is, heeft het de voorkeur dat het water ook alleen hierop wordt onderzocht. Echter wanneer in deze locaties toch Legionella spp. wordt aangetoond anders dan L. pneumophila is het aan te bevelen een handelingsperspectief te bieden over benodigde maatregelen en acties.”*

Conclusie over loslaten van het testen op Legionella non-pneumophila

KWR concludeert in haar rapport op pagina 54: *“Op basis van de geraadpleegde wetenschappelijke literatuur worden de volgende deelconclusies getrokken: Het is aannemelijk dat het richten van regelgeving in drinkwater op de groep van ziekteverwekkende L. non-pneumophilasoorten weinig winst voor de volksgezondheid oplevert.”*

Deze conclusie is niet wetenschappelijk onomstreden zoals blijkt uit 11 wetenschappelijke artikelen die met name een beeld van gebrek aan verder onderzoek, gebrek aan informatie door onderrapportage en onderschatting van het echte risico tonen. Deze onderzoeken worden in deze literatuurstudie besproken. De meest belangrijke passages uit de onderzoeken tonen aan dat Legionella non-pneumophila wel degelijk een belangrijke rol in de volksgezondheid speelt.



De 11 genoemde wetenschappelijke artikelen zijn **niet** gebruikt in het KWR-rapport (waarvan slechts vier van recentere datum dan het KWR-rapport), maar geven aan dat de conclusie dat er weinig winst voor de volksgezondheid is wanneer Nederland zich nog op *Legionella non-pneumophila* richt, een conclusie is, die op basis van de beschikbare wetenschappelijke kennis niet getrokken had mogen worden.

Opvallende elementen uit de wetenschappelijke onderzoeken

- *Verschillen in monsteruitslagen tussen kweekmethode en PCR zijn bij L. non-pneumophila het grootst.*
 - *L. anisa (non-pneumophila) is goed gedocumenteerd in de literatuur als oorzaak van verschillende cases en uitbraken.*
 - *Ook al zou L. non-pneumophila een minder grote rol spelen bij ziektegevallen, dan nog kan het een rol spelen bij het ontwikkelen van nieuwe pathogene patronen.*
 - *Verder onderzoek naar de nu nog moeilijk of weinig gevonden L. non-pneumophila bacteriën zou de kennis over pathogeniteit en ecologie verbeteren. Dit gebrek aan kennis leidt nu nog tot een onderschatting van het risico van Legionella; (er zijn meerdere onderzoeken waaruit dit blijkt).*
 - *Ook al is L. pneumophila in veel gevallen de oorzaak van legionellose, toch blijkt non-pneumophila een rol te hebben bij ziektegevallen die niet worden onderkend door diagnostische bias. Ook wordt meerdere keren het onbekende percentage van infectie en pathogeniteit genoemd.*
 - *Uit een onderzoek waarbij mensen met een longontsteking op legionellose zijn onderzocht in Spanje werd een percentage van 7,% gevonden dat besmet was met legionellose en 1 ziektegeval veroorzaakt door L. anisa, terwijl de standaard methode die in het ziekenhuis werd gebruikt tot een percentage van 1,9% legionellose gevallen kwam en alleen maar pneumo sg1.*
 - *Door het missen van de diagnose legionellose door L. non-pneumophila, omdat deze slecht uit de standaard gebruikte methode bij patiënten naar voren komt, wordt artsen geadviseerd om bij vergelijkbare klinische symptomen, maar een negatieve test, toch door te zoeken naar een non-pneumophila besmetting.*
 - *In een 15-jarige studie bij kankerpatiënten naar Legionellabesmettingen zijn 40 gevallen van legionellose geconstateerd, waarvan 9 door L. non-pneumophila. Deze besmettingen waren niet in de ziekenhuissetting opgelopen.*
 - *Wetenschappelijk onderzoek geeft aan dat het belangrijk is om zowel naar L. pneumophila als L. non-pneumophila te kijken in water distribution networks.*
 - *Steeds terugkomend is dat de nu gebruikte analysemethoden niet goed genoeg zijn om ook L. non-pneumophila goed te kunnen analyseren en de gevolgen daarvan te analyseren.*
-



Bijlage: Niet gebruikte wetenschappelijke onderzoeken en studies

In deze bijlage zijn de 11 genoemde wetenschappelijke artikelen opgenomen die **niet** zijn gebruikt in het KWR-rapport. Vier van deze onderzoeken zijn recentere datum dan het KWR-rapport, dat is bij de betreffende onderzoeken aangegeven.

De grijs gearceerde teksten bij de genoemde onderzoeken zijn de passages die het meest van belang zijn als het gaat om het belang van blijvend testen op zowel *Legionella pneumophila* als *Legionella non-pneumophila*.



How Molecular Typing Can Support *Legionella* Environmental Surveillance in Hot Water Distribution Systems: A Hospital Experience

Published online: 2020 Nov 21.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7700474/>

[Luna Girolamini](#),^{1,†} [Silvano Salaris](#),^{1,†} [Jessica Lizzadro](#),¹ [Marta Mazzotta](#),¹ [Maria Rosaria Pascale](#),¹ [Tiziana Pellati](#),² and [Sandra Cristino](#)^{1,*}

Enkele relevante passages uit bovenstaand artikel:

The culture technique is still considered the gold standard for quantification of *Legionella*, although it has several drawbacks, including long incubation time and poor sensitivity, causing delays in response times, especially during outbreaks of LD. Furthermore, it is unable to detect viable but nonculturable cells (VBNCs) [32], and the discrepant results between the culture method and PCR are most pronounced for non-*pneumophila* *Legionella* species [33].

Regarding *Legionella non-pneumophila* species, the isolates were typed as *L. anisa* and *L. rubrilucens*. *L. anisa* is well documented in the literature as a causative agent of different cases or epidemic events [38,39,40]. *L. rubrilucens* has been less studied, with few clinical cases reported and its pathogenicity has not been fully demonstrated [41].

Based on epidemiological data, the common opinion is that *L. pneumophila* SG1 is the main organism responsible for clinical cases, not non-*pneumophila* *Legionella* species. For this reason, preventive strategies or extraordinary measures are usually only undertaken when microbiological data indicates contamination by *L. pneumophila* [46]. Our approach promotes the study of the role of other *Legionella* species, which are often considered less important in terms of infection, although they may play a minor or unknown pathogenic role. We think that other species of *Legionella* that usually are less often detected than *L. pneumophila* and without clinical evidence could, in some conditions (e.g., absence of competition, changes in disinfectant dosage or water characteristics), develop a new pathogenic pattern, especially given our poor knowledge of all genes and protein effectors involved in *Legionella* pathways.

Knowledge of *Legionella* strains can help health authorities, engineers, and technical staff to implement the correct measures to formulate preventative strategies. Our study confirms the role of the SBT technique and *mip* sequencing in studying the distribution of *Legionella* strains in environmental as well as in clinical surveillance to correctly establish the epidemic sources of infection, plan a long-term prevention strategy, and establish the correlations between isolates.

One of the future goals could be to improve studies and techniques for typing non-*pneumophila* *Legionella* species that are less known and less associated with human disease through a whole genome sequence (WGS) approach. This would improve the knowledge of the pathogenicity, resistance, and ecological status of *Legionella* isolates that are often difficult to isolate and recognize during routine culture techniques, leading to an underestimation of the real risk of *Legionella* infection.



Genomic characterization and assessment of pathogenic potential of *Legionella* spp. isolates from environmental monitoring

Published online: 2023 Jan 12. (*publicatiedatum na publicatie KWR-rapport*)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9879626/>

[Ema Svetlicic](#), ¹ [Daniel Jaén-Luchoro](#), ² [Roberta Sauerborn Klobucar](#), ³ [Carsten Jers](#), ¹ [Snjezana Kazacic](#), ⁴ [Damjan Franjevic](#), ⁵ [Goran Klobucar](#), ⁵ [Brian G. Shelton](#), ³ and [Ivan Mijakovic](#) ^{1, 6, *}

Enkele relevante passages uit bovenstaand artikel:

The study contributes to the knowledge on little-known non-pneumophila species present in man-made water systems and establishes support for future genetic relatedness studies as well as understanding of their pathogenic potential.

The non-pneumophila species in these samples are generally not well studied and therefore, despite their frequent isolation from water systems, not much is known about their pathogenic potential ([Muder and Victor, 2002](#); [Chambers et al., 2021](#)). A major factor for limited availability of epidemiological data of non-pneumophila species is under-diagnosis due to mild symptoms or tests specifically targeting *L. pneumophila* such as frequently used urinary antigen test ([Chambers et al., 2021](#)). For the above-mentioned reasons, it was noted that correct identification and typing of strains isolated from patients and the environment is crucial for understanding the pathogenic role of bacteria belonging to the *Legionella* genus ([Mazzotta et al., 2021](#); [Du et al., 2022](#); [Wroblewski et al., 2022](#)).

Due to increased use of WGS for outbreak investigation, the number of genome sequenced *L. pneumophila* isolates is increasing. By comparison, genome sequences of non-pneumophila species present in the isolates are underrepresented. For example, National Center for Biotechnology Information (NCBI) currently hosts more than 3,800 *L. pneumophila* assemblies, while other *Legionella* species are represented with maximum 16 assemblies. This makes informative genome comparative studies especially difficult.

The results of the search showed the presence of 300–400 putative virulence genes in the isolates identified as *L. pneumophila* and up to 134 putative virulence factors identified in non-pneumophila species as shown in [Figure 2A](#). Even though non-pneumophila species are not found in the VFDB, many virulence factors were discovered to be orthologous to the *L. pneumophila* strains. In total, 59 putative virulence genes were shared among all isolates, although in some case, the gene coverage was decreased in non-pneumophila species ([Figure 2B](#)). The shared virulence genes predominantly belong to the Dot/Icm Type IV secretion system and to flagellar structures. Moreover, a virulence factor known as the macrophage infectivity potentiator (*mip*) which is responsible for intracellular survival was found in both *L. pneumophila* and non-pneumophila species with high coverage of 100 and 98.6%, respectively.

A substantial amount of virulence factors were matched to non-pneumophila species (between 72 and 134). It is apparent that both pneumophila and non-pneumophila isolates from this study contain genes belonging to T4SS and T2SS. The T2SS is required for intracellular replication within macrophages and protozoa ([Chauhan and Shames, 2021](#))

The presented study characterized genomes from 39 *Legionella* isolates collected during environmental surveillance of man-made water systems. By employing genome-based typing of strains, four possibly new *Legionella* species were identified among the isolates. In addition, all strains

Literatuurstudie Nederland moet zich blijven focussen op zowel *Legionella pneumophila* als *Legionella non-pneumophila*



were screened for virulence and antimicrobial resistance factors, offering insight into their pathogenic potential. High-quality genome assemblies were generated for the isolates, thus contributing to the limited genome information on non-pneumophila species. The data can be used for further research on pathogenicity of non-pneumophila species, but also for comparison between clinical and environmental isolates of *L. pneumophila*. Genome characterization offers knowledge on the risk of the potential *Legionella* outbreak caused by virulent strains, which could be crucial when implementing control measures.

Intracellular Behaviour of *Legionella non-pneumophila* Strains within Three Amoeba Strains, Including *Willaertia magna* C2c Maky

Published online: 2021 Oct 19 (*publicatiedatum na publicatie KWR-rapport*)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8538512/#B2-pathogens-10-01350>

Enkele relevante passages uit bovenstaand artikel:

In 2019 in Europe, 11,298 cases of legionellosis were detected [33]. A recent study estimated that the actual number of cases of Legionnaires' disease may be 1.8 to 2.7 times higher than that reported [34]. Part of the explanation for this lies in the detection method used and the designation of confirmed cases. A urinary antigen test is often used to diagnose legionellosis, but it is not sensitive enough [35]. Although not time-consuming and easily implemented, this test only detects *Legionella pneumophila* serotype 1 (*Lp1*). Moreover, in the vast majority of cases, the diagnosis is based solely on antigenicity. The result of a positive PCR test will be designated as a probable case, but not as a confirmed case [36]. Many studies demonstrate that legionellosis cases were related to *Legionella non-pneumophila* (Lnp) strains and that these strains are frequently isolated in the environment [2,37,38,39,40,41,42,43]. For example, Steege and Moore detected by means of qPCR on the *mip* gene the presence of *Legionella* in 95% of samples, but *L. pneumophila* was only detected in 1.8% of samples [44]. In Japan from 2008 to 2016, *Lp1* was responsible for 81% of cases, but Lnp species such as *L. bozeman*, *L. dumoffii*, and *L. longbeachae* were also isolated [37]. A recent study, using qPCR on the *mip* gene in hospital and community samples, demonstrated an increased prevalence of the Lnp species (84.1%) compared to *L. pneumophila* (15.9%) in the region of Bologna (Italy) [45].

Even if *L. pneumophila* is responsible for most legionellosis outbreaks, *L. non-pneumophila* (Lnp) strains are also involved in legionellosis cases, and often their responsibility is under-recognized due to diagnostic bias [2,39,46]. Even though it is now well-known that among the approximately 60 species of *Legionella*, 50% are able to infect humans [47], the responsibility for 4% of legionellosis cases can still not be attributed to a known species [39]. An extensive detection of Lnp strains in water distribution systems demonstrated that 16% of the sampled water was contaminated with *Legionella*, and that Lnp strains were prevalent [48]. In the same way, an international survey demonstrated that 43 legionellosis cases among a total of 508 were due to Lnp strains, with the most prevalent being *L. longbeachae* [43]. Tools developed to study the behaviour of *L. pneumon* can be used to study Lnp. A clinical strain of *L. bozeman* transformed with a GFP-expressing plasmid was able to infect and replicate within *A. castellanii* [49]. To increase knowledge of the replication of Lnp strains inside amoeba, we studied seven non *pneumophila* strains, three *anisa* isolates, and one isolate of strains *bozeman*, *dumoffii*, *longbeachae*, and *taurinensis* (Table 1)



First Case of Legionnaire's Disease Caused by *Legionella anisa* in Spain and the Limitations on the Diagnosis of *Legionella non-pneumophila* Infections

Published: 2016 Jul 21

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4956277/>

Abstract

Legionnaires' disease is a severe form of pneumonia, with worldwide relevance, caused by *Legionella* spp. Approximately 90% of all cases of legionellosis are caused by *Legionella pneumophila*, but other species can also be responsible for this infection. These bacteria are transmitted by inhalation of aerosols or aspiration of contaminated water. In Spain, environmental studies have demonstrated the presence of *Legionella non-pneumophila* species in drinking water treatment plants and water distribution networks. Aware that this evidence indicates a risk factor and the lack of routine assays designed to detect simultaneously diverse *Legionella* species, we analyzed 210 urine samples from patients presenting clinical manifestations of pneumonia using a semi-nested PCR for partial amplification of the 16S rDNA gene of *Legionella* and a diagnostic method used in hospitals for *Legionella* antigen detection. In this study, we detected a total of 15 cases of legionellosis (7.1%) and the first case of Legionnaires' disease caused by *L. anisa* in Spain. While the conventional method used in hospitals could only detect four cases (1.9%) produced by *L. pneumophila* serogroup 1, using PCR, the following species were identified: *Legionella* spp. (10/15), *L. pneumophila* (4/15) and *L. anisa* (1/15). These results suggest the need to change hospital diagnostic strategies regarding the identification of *Legionella* species associated with this disease. Therefore, the detection of *Legionella* DNA by PCR in urine samples seems to be a suitable alternative method for a sensitive, accurate and rapid diagnosis of *Legionella* pneumonia, caused by *L. pneumophila* and also for *L. non-pneumophila* species.



Pathogenicity and Virulence of *Legionella*: Intracellular replication and host response

Published online: 2021 Apr 12

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8043192/>

In comparison to *L. pneumophila*, pneumonia caused by non-*pneumophila* *Legionella* (non-*Lpn*) species are rare and almost exclusively nosocomial^[11]. Interestingly, *L. pneumophila* and non-*Lpn* species are found in similar habitats, including built freshwater environments; however, non-*Lpn* species contribute less to overall disease burden. This can be attributed to various factors such as difficulty in strain recovery from water samples, decreased fitness of some species in the sediment of aquatic systems, lack of serological test validation of non-*Lpn* spp., and high genetic diversity among *Legionella* species, which makes diagnosis difficult ^[11,14].



Severe bilateral pleuropneumonia caused by *Legionella sainthelensi*: a case report

Published online: 2021 Sep 17

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8447505/>

Legionella spp. are ubiquitous freshwater bacteria responsible for rare but potentially severe cases of Legionnaires' disease (LD). *Legionella sainthelensi* is a non-*pneumophila* *Legionella* species that was first isolated in 1980 from water near Mt. St-Helens (USA). Although rare cases of LD caused by *L. sainthelensi* have been reported, very little data is available on this pathogen.

To date, only 14 documented cases of *L. sainthelensi* infection have been described worldwide. This pathogen is difficult to identify because it is not or poorly detected by urinary antigen and molecular methods (like PCR syndromic assays that primarily target *L. pneumophila* and that have only recently been deployed in microbiology laboratories). Pneumonia caused by *L. sainthelensi* is likely underdiagnosed as a result. Clinicians should consider the possibility of non-*pneumophila* *Legionella* infection in patients with a compatible clinical presentation when microbiological diagnostic tools targeted *L. pneumophila* tested negative.



Combining Traditional and Molecular Techniques Supports the Discovery of a Novel *Legionella* Species During Environmental Surveillance in a Healthcare Facility

Published online: 2022 Jun 13 (*publicatiedatum na publicatie KWR-rapport*)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9234573/>

The culture technique, which is essential for the isolation, is not effective in correctly recognizing these novel isolates when combined with the common and rapid identification methods (e.g., agglutination test). Our results clearly showed that the two isolates presented features similar to well-known non-*Lp* species (e.g., *L. anisa*, *L. bozemanii*, and *Legionella gormanii*) and showed a positive agglutination reaction to multiple species latex reagents. Moreover, considering also the MALDI-TOF MS results, they could be misclassified as *L. anisa*.

Therefore, acquiring extensive knowledge of these reservoirs and the events that can promote changes in the ecological niche of bacteria can help to prevent their spread in the man-made environment and contain the occurrence of cases, clusters, or outbreaks. In this context, environmental surveillance is critical, as is a proper risk assessment plan that takes into account changes in *Legionella* contamination over time. The latter will primarily focus on correct isolate identification and characterisation, as well as novel approaches able to recognise non-*Lp* species with unknown rates of infection and pathogenicity other than antibiotic resistance.



Use of Partial 16S rRNA Gene Sequencing for Identification of *Legionella pneumophila* and Non-*pneumophila* *Legionella* spp.

Published online: 2006 Nov 15

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1828979/>

Although *Legionella pneumophila* is the most frequent cause of legionellosis, non-*pneumophila* *Legionella* species may also cause serious or fatal disease (1, 2). Non-*pneumophila* *Legionella* species in respiratory specimens, however, are not detected by the *Legionella pneumophila* direct fluorescent antigen test. Similarly, the *Legionella* urinary antigen test will be negative for urine specimens from patients with infections caused by these bacteria. However, non-*pneumophila* *Legionella* species, like *L. pneumophila*, may be cultured on charcoal-yeast extract (CYE) agar. Unfortunately, fluorescent antibody stains are not commercially available for confirmation/identification of non-*pneumophila* *Legionella* isolates. Isolates suspected to represent non-*pneumophila* *Legionella* species must be sent to state public health laboratories for confirmation. The identification of these bacteria by public health facilities is not timely enough for clinical purposes in our experience.

Atypical presentation of *Legionella* pneumonia among patients with underlying cancer: A fifteen-year review

Published online: 2015 Oct 20

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4938150/>

During the study period, 40 cases of *Legionella* infection were identified; nine among these were due to non-pneumophila species. Most cases occurred during the summer. The majority [8/9, (89%)] of patients with non-pneumophila infection had underlying hematologic malignancy, compared to 18/31 (58%) with *Legionella pneumophila* infections. Radiographic findings were varied-nodular infiltrates mimicking invasive fungal infection were seen only among patients with hematologic malignancy and hematopoietic stem cell transplant (SCT) recipients and were frequently associated with non-pneumophila infections (50% vs 16%; $P = 0.0594$). All cases of nodular *Legionella* pneumonia were found incidentally or had an indolent clinical course.

Patients undergoing treatment with cytotoxic chemotherapy are known to be at a higher risk for developing *Legionella* pneumonia.^{1,2} Although *Legionella pneumophila*, specifically serogroup 1, is the most commonly recognized species,³ several non-pneumophila *Legionella* types can cause pulmonary infections in severely immunosuppressed patients.

During the fifteen-year study period, 40 cases of microbiologically confirmed *Legionella* pneumonia were identified at MSKCC. No *Legionella* outbreaks occurred during the study period, and none of the cases were hospital-acquired. *Legionella* infections showed a seasonal pattern with most cases (53%) diagnosed between July and September (Fig. 1).

Interestingly, the majority of cases with an atypical radiographic presentation of *Legionella* (nodular infiltrates) were associated with the more difficult to diagnose non-pneumophila species and had an indolent or asymptomatic clinical presentation. Although clinically milder, this finding is of particular relevance as all cases of nodular infection were encountered in highly immunocompromised patients undergoing treatment for hematologic malignancy or SCT recipients, and were radiographically indistinguishable from invasive fungal infection (IFI) and other opportunistic infections such as *Mycobacterium tuberculosis*, nontuberculous mycobacteria, *Nocardia* species etc (Fig. 2).

Our findings also suggest that infections associated with non-pneumophila *Legionella* affect mostly severely immunocompromised patients. In our study cohort, we found 9 cases of atypical *Legionella* infections, only one case of which occurred in a patient with lung cancer; the remaining patients had underlying hematologic malignancy or had undergone SCT.

Our study has several limitations given its retrospective nature and small number of cases despite inclusion of all microbiologically confirmed cases over a fifteen-year period. Infection due to *Legionella*, especially non-pneumophila types, is likely an underdiagnosed infection in this population due to milder illness and limited clinical suspicion, non-availability of rapid and sensitive testing methods and poor yield on culture based methods. In addition, fluoroquinolones are widely used for neutropenic prophylaxis and empiric treatment of pneumonia, often obviating the need for additional diagnostic testing and decreasing culture yield.

In summary, *Legionella* infections especially due to non-pneumophila species present with several atypical characteristics including asymptomatic or mild clinical illness and radiographic features that are indistinguishable from other commonly encountered opportunistic infections. This clinical entity



should be promptly recognized and considered in the differential diagnosis when evaluating lung nodules in persons with hematologic malignancies to facilitate early and specific diagnosis.



Are pathogenic *Legionella non-pneumophila* a common bacteria in Water Distribution Networks?

Published: 15 May 2021

<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0043135421002116>

Therefore, our study concludes that the presence of *Legionella pneumophila* and *Legionella non-pneumophila* species in these systems can be a potential threat to public health and should be examined thoroughly with complementary techniques, such as molecular techniques as a screen for routine diagnosis.



New Insight regarding *Legionella* Non-*Pneumophila* Species Identification: Comparison between the Traditional *mip* Gene Classification Scheme and a Newly Proposed Scheme Targeting the *rpoB* Gene

Published online: 2021 Dec 15 (*publicatiedatum na publicatie KWR-rapport*)

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8672888/>

Legionella spp. are a widely spread bacteria that cause a fatal form of pneumonia. While traditional laboratory techniques have provided valuable systems for *Legionella pneumophila* identification, the amplification of the *mip* gene has been recognized as the only useful tool for *Legionella* non-*pneumophila* species identification both in clinical and environmental samples. Several studies focused on the *mip* gene classification scheme showed its limitations and the need to improve the classification scheme, including other genes. Our study provides significant advantages on *Legionella* identification, providing a reproducible new *rpoB* gene classification scheme that seems to be more accurate than *mip* gene sequencing, bringing out greater genetic variation on *Legionella* species. In addition, the combined use of both the *mip* and *rpoB* genes allowed us to identify presumed new *Legionella* species, improving epidemiological investigations and acquiring new understanding on *Legionella* fields.