

Legionella pneumophila på Sjøforsvarets fartøyer

BAKGRUNN Det finnes lite kunnskap om forekomst av *Legionella pneumophila* i vannsystemer om bord i skip. Vårt mål var å kartlegge forekomsten av *L. pneumophila* i vannsystemet om bord på Sjøforsvarets fartøyer som utgangspunkt for forebyggingsstrategier.

MATERIALE OG METODE Vannprøver fra teknisk del og fra distribusjonsnett på 41 fartøyer og ti vannfyllingsstasjoner ble innhentet ved to tidspunkter med ett års mellomrom. Prøvene ble analysert med henblikk på *L. pneumophila*, inklusive serotyping og genotyping, og på frittlevende amøber.

RESULTATER *L. pneumophila* ble påvist i 20 av 41 fartøyer i første prøverunde, og levende *L. pneumophila* serogruppe 1 ble isolert i sju av de 20 fartøyene. Frittlevende amøber ble påvist i vannsystemet i de fleste fartøyene, inklusive samtlige fartøyer med *L. pneumophila*. Samme genotype av *L. pneumophila* ble påvist i vannet i bunkringsstasjoner og i vannet om bord på fartøyene.

FORTOLKNING *L. pneumophila* var ikke til stede i alle fartøyene, men samtlige fartøyer hvor bakterien ble påvist, var også kontaminert med frittlevende amøber. Vi har sannsynliggjort at det er ferskvann fra bunkringsstasjoner som er kontamineringskilden. I forebyggingsstrategier bør man derfor legge vekt på kontamineringskilde og frittlevende amøber, som er en premiss for etablering og oppvekst av *L. pneumophila* i vannsystemene.

Legionellabakterien finnes i ferskvann over hele verden (1). Slekten *Legionella* ble ikke registrert før i 1979 – i forbindelse med det store legionelloseutbruddet blant amerikanske legionærer (krigsveteraner) i 1976, der *Legionella pneumophila* ble påvist som årsaksagens (2, 3). Det første bakterieisolatet som i ettertid er antatt å være *Legionella*, ble gjort i 1943 fra marsvin og liknet den obligat intracellulære bakterien *Rickettsia*. I 1954 ble det beskrevet en liknende bakterie som ble vist å infisere frittlevende amøber. Dette isolatet ble i 1995 klassifisert som *Legionella* (4).

I dag kjenner vi *Legionella* som en liten vannbakterie som kan påvises fritt i vann. Den er kravstor når det gjelder vekstsubstrat, derfor overlever den i og forøker seg i andre organismer, især i frittlevende ferskvannsamøber (5, 6). *Legionella* kan forårsake respiratorisk sykdom hos mennesker gjennom inhalasjon av aerosol av vann som inneholder bakterien. Det kan være en daglig foreteelse gjennom dusjing i forurensede vannsystemer, uten at det nødvendigvis resulterer i sykdom.

Infeksjon med *L. pneumophila* kalles legionellose. Den gir i hovedsak to kliniske bilder: legionærsykdom, som er en alvorlig lungebetennelse med ca. 30 % dødelighet, og Pontiac-feber, som er en influensaliknende sykdom av kort varighet (7). Det er til nå ikke vist at disse sykdommene kan smitte fra person til person (8).

Det er så langt identifisert 53 forskjellige arter av legionellabakterien (9), av disse

er ca. 20 påvist ved infeksjoner. Arten *L. pneumophila* ble påvist fra mer enn 90 % av utbrudd og sporadiske tilfeller av legionellose, og mer enn 80 % av *L. pneumophila*-isolatene tilhørte serogruppe 1 (10).

Legionella ble i 1980- og 90-årene registrert i sykdomsutbrudd med dødsfall i Europa, men det var ikke før i 2001 at man fikk det første utbruddet i Norge. Det skjedde i Stavanger, med sju døde (11), og ble etterfulgt av utbruddet i Fredrikstad/Sarpsborg i 2005, med ti døde (12, 13). Som en konsekvens av det siste utbruddet er de lovpålagte mikrobiologiske kontrollene betydelig innskjerpet, med bl.a. krav til forebygging av legionellaspredning fra boblebad og dusjanlegg (14) samt en ny veileder for forebygging av legionellasmitte (8).

Legionellaforskriften/-veilederen legger et stort ansvar på eiere av innretninger som kan spre aerosoler. For å kunne imøtekomme kravene må man ha kunnskap om hvilke faktorer i det aktuelle vannsystemet som vil kunne bidra til oppvekst og spredning av legionellabakterien.

For den nordiske skipsflåten er drikkevannskvalitet satt som krav til alt ferskvann om bord, for både mat og hygiene. Ferskvannsforsyningen om bord på fartøyer gjøres enten ved vannfylling fra land (bunkring) eller ved ferskvannproduksjon via avsalting av sjøvann ved bruk av omvendt osmose (RO) eller evaporering (EVA) (15). For skip vil ferskvannproduksjon fra sjøvann være mest optimalt, siden *L. pneumophila* er en ferskvannsbakterie som ikke finnes naturlig i sjøvann.

Catrine Ahlén
catrine.ahlen@sintef.no

Marianne Aas
SINTEF Materialer og Kjemi
Marin miljøteknologi

Anne Nor
Institutt for laboratoriemedisin,
barne- og kvinnesykdommer
Det medisinske fakultetet
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

Per Inge Wetteland
Hjalmar Johansen
Saniteten i Sjøforsvaret
Sjøforsvarsstaben
Haakonsværn

Trine Sørbø
Forsvarets logistikkorganisasjon
Haakonsværn

Jan Knudtzon Sommerfelt-Pettersen
Saniteten i Sjøforsvaret
Sjøforsvarsstaben
Haakonsværn

Ole-Jan Iversen
Institutt for laboratoriemedisin,
barne- og kvinnesykdommer
Det medisinske fakultetet
Norges teknisk-naturvitenskapelige universitet

 Engelsk oversettelse på www.tidsskriftet.no

> Se også side 1426

HOVEDBUDSKAP

Legionella pneumophila ble påvist i vannsystemet på ca. 50 % av Sjøforsvarets fartøyer

En og samme genotype ble funnet i tre fartøyer

Genotyper funnet på to av fartøyene ble også funnet i vannfyllingsstasjonen som fartøyene hadde benyttet

Frittlevende amøber syntes å være en premiss for vekst av *L. pneumophila* i vannsystemet

Tabell 1 Oversikt over prøvemateriale for analyse av *L. pneumophila* under kartleggingen

Fartøysgruppe	Antall fartøyer per fartøy-gruppe	Antall valgte prøve-punkter
Mineryddere	6	9
Ubåter	4	2
Kystkorvetter	2	6
Fregatter	4	15
Logistikk-våpenet	3	15
Havnefartøyer	5	5
Kystvaktfartøyer	13	15
Fartøyslaget	1	8
Skoleskip	2	17
Spesialfartøyer	1	15
Totalt antall	41	

Sjøforsvaret har en stor fartøysflåte som er underlagt legionellaforskriften. For å få etablert den nødvendige kunnskapen ble prosjektet Legionellakontroll om bord i Sjøforsvarets fartøy startet i 2010. Det omfattet kartlegging og risikovurdering med henblikk på forekomst av *Legionella* i vannsystemet på samtlige fartøyer, i den hensikt å etablere grunnlaget for at Sjøforsvaret kunne gjennomføre nødvendige tiltak for å hindre forekomst, oppvekst og smitte av bakterien.

Materiale og metode

Studien omfatter ti separate fartøysgrupper: mineryddere, ubåter, kystkorvetter, fregatter, logistikkvåpenets fartøyer, havnefartøyer, kystvaktfartøyer med flere, til sammen 41 fartøyer.

Utvelgelse av prøvepunkter

Utvelgelsen av prøvepunkter var basert på befaring om bord i ett referansefartøy fra hver fartøysgruppe og innhenting av tek-

niske og prosedyrerelaterte data. Følgende prinsipper ble benyttet:

- For fartøyer med færre enn ti prøvepunkter ble samtlige punkter analysert
- For fartøyer med flere prøvepunkter ble opptil 17 punkter analysert

Av totalt 3 807 mulige prøvepunkter ble det tatt prøver fra 439 (12 %). Det ble tatt vannprøver til analyse to ganger med ett års mellomrom. Ved andre prøvetakingsrunde var 36 av de 41 fartøyene tilgjengelig for prøvetaking.

Prøvemateriale

I tabell 1 er det en oversikt over vannprøver fra fartøyene som inngår i studien. I tillegg er det tatt prøver fra 45 av de mest benyttede tappepunktene ved de ti vannfyllingspostene, derav 43 militære og to sivile.

Vannprøvetaking

Vannprøver på 11 sterile flasker tilsatt natriumtiosulfat ble tatt både i den tekniske delen av vannsystemet (vanntanker) og i distribusjonsnett (dusjer). Lokalisering av prøvepunktene var de samme på hvert skip innenfor samme fartøysgruppe.

Mikrobiologiske analyser

Påvisning av *L. pneumophila*. Samtlige prøver fra vannsystemene ble analysert med sanntids-PCR, som beskrevet tidligere (16). Positive prøver ble kultivert på legionella-agar (Buffered charcoal yeast extract, BCYE) for påvisning av levende *L. pneumophila*, som er en forutsetning for infeksjon. Ved oppvekst av *L. pneumophila* ble denne serotypet ved hjelp av MONOFLUO anti-*Legionella* Staining Reagent (Bio-Rad). Samtlige isolater av *L. pneumophila* serogruppe 1 ble genotypet ved hjelp av pulsfeltgelelektroforese (PFGE) (17) for å spore mulige felles sprednings- og forurensingsveier.

Påvisning av frittlevende amøbe. Som et ledd i å få en systematisk kunnskap om forekomsten av frittlevende amøber i vannsystemer om bord i skip ble det gjort parallelle amøbeanalyser og *L. pneumophila*-analyser av samtlige prøver fra vannsystemene. Amøbeanalysene ble gjort ved hjelp av kul-

tivering og mikroskopering, i samsvar med metoden beskrevet av Winiecka-Krusnell & Linder i 1999 (18).

Tiltak ved påvisning

av levende *L. pneumophila*

Ved funn av levende *L. pneumophila* serogruppe 1 ble det iverksatt strakstiltak ved introduksjon av dusjhoder med filterinnsats (0,2 µm) for å forhindre bakterieeksponering fra dusjvannet (Pall-dusjer). Videre oppfølging ble gjort i henhold til rutiner beskrevet i legionellaveilederen fra Folkehelseinstituttet (8), dvs. i hovedsak varmtvannsbehandling.

Resultater

L. pneumophila

I første prøvetakingsrunde viste analyser av 439 vannprøver fra 41 av Sjøforsvarets fartøyer tilstedeværelse av *L. pneumophila*-DNA i 12 % av prøvene. Positive prøver ble funnet i 20 av 41 fartøyer. Levende *L. pneumophila* serogruppe 1 ble isolert fra sju av fartøyene.

Ved den gjentatte kartleggingen ett år senere var de respektive analyseresultatene 13 positive fartøyer av 36 undersøkte og levende *L. pneumophila* serogruppe 1 i to av fartøyene. Dette var fartøyer der det i første prøvetakingsrunde ikke ble påvist levende *L. pneumophila* (tab 2).

Av de 41 fartøyene hadde 31 installert trykktank (hydrofortank) i vannsystemet. Åtte av prøvene med levende *L. pneumophila* stammet fra fartøyer med hydrofortank (26 % av fartøyene). Fra de ti fartøyene uten hydrofortank ble det påvist levende *L. pneumophila* i én prøve (10 %).

Fra de 45 undersøkte bunkringspunktene ble *L. pneumophila* påvist i 16 % i første prøvetakingsrunde, hvorav levende *L. pneumophila* serogruppe 1 ble isolert fra to punkter.

Frittlevende amøber

Frittlevende amøber ble påvist i 39 av 41 fartøyer. *Acanthamoeba* og *Hartmannella* var de vanligst forekommende slektene. Frittlevende amøber var til stede i samtlige fartøyer hvor *L. pneumophila* serogruppe 1 ble demonstrert. Ved første prøvetakingsrunde ble frittlevende amøber funnet i prøver fra ti av de 45 undersøkte bunkringspunktene i studien.

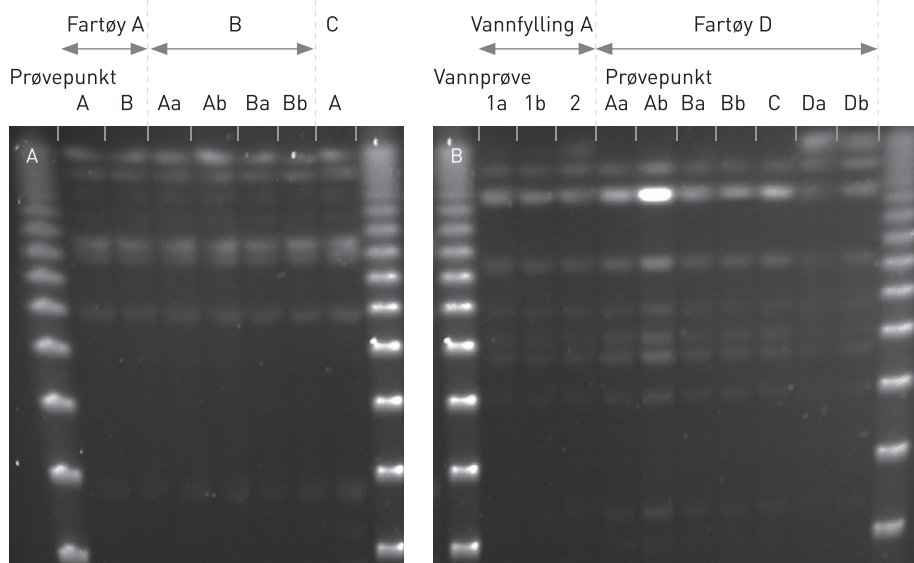
Intracellulære *L. pneumophila* ble isolert fra amøbene og viste samme genotypemønstre som ble funnet i vannprøvene fra det aktuelle fartøyet (data ikke vist).

Genotyping av *L. pneumophila*

Ved genotyping av legionellaisolatene fant vi et svært begrenset antall genotyper, og tre fartøyer var endog kontaminert med samme genotype (fig 1a). I to av fartøyene isolerte

Tabell 2 Forekomst av positiv *Legionella*-PCR, oppvekst av *Legionella* og funn av amøber ved henholdsvis første, andre og begge prøverunder

	Positiv prøve første prøvetakingsrunde (N = 41)	Positiv prøve andre prøvetakingsrunde (n = 36)	Positiv prøve begge prøvetakingsrunder (n = 36)
Legionella-PCR	20	13	9
Legionelladyrking	7	2	0
Funn av amøber	34	30	28



Figur 1 a) Genotypemønster av *L. pneumophila* isolert fra tre forskjellige fartøyer innen samme fartøysklasse. b) Genotypemønster av *L. pneumophila* fra bunkringsstasjon og fra vannsystemet på ett fartøy (fartøy D)

man genotyper som også ble funnet i bunkringsstasjonen som det enkelte fartøyet hadde benyttet, som eksemplifisert i figur 1b.

Diskusjon

L. pneumophila er altså til stede i ferskvannssystemene om bord på Sjøforsvarets fartøyer. *L. pneumophila*-DNA ble påvist i 20 av 41 fartøyer ved første prøvetakingsrunde. I sju av fartøyene ble det isolert levende *L. pneumophila* serogruppe 1, og i disse ble det som strakstiltak satt inn dusjhoder med filterinnsats (0,2 µm) for å forhindre bakterieeksponering fra dusjvannet (Pall-dusjer). Videre oppfølging ble gjort i henhold til rutiner beskrevet i legionella-veilederen fra Folkehelseinstituttet (8).

Ved oppfølgingsstudien etter ett år ble det ikke påvist levende bakterier på disse fartøyene. Derimot ble det påvist smitte på to nye fartøyer – tiltakene synes derfor å være utilstrekkelige. Frittlevende amøber ble påvist i vannsystemet på de fleste fartøyene, inklusive samtlige fartøyer med *L. pneumophila*. Det var også mulig å isolere *L. pneumophila* serogruppe 1 fra amøbene, og disse viste samme genotypemønster som ellers ble funnet i vannprøvene fra det aktuelle vannsystemet. Ettersom det er vist at legionellabakterien kan overleve og formere seg i amøber, vil dette kunne forklare bakteriens langtidsoverlevelse i slike vannsystemer (19).

Det ble tatt prøver fra 12 % av de aktuelle prøvepunkter. Valget var basert på befaringsreferansekartøyer innen hver klasse og representativitet når det gjaldt eksponeringsrisiko. *Legionella* kan være vanskelig å oppdage, siden mikroben koloniserer veggene i

vannsystemet og ofte kun løsner i flak. Analyse av 12 % av mulige prøvepunkter anses imidlertid ut fra erfaring som tilstrekkelig. Oppdagelse av *L. pneumophila* med polymerasekjedereaksjon (PCR) før dyrking og genotyping anses som en hensiktsmessig strategi på bakgrunn av PCR-metodens hurtighet og sensitivitet.

Det at det er en tendens til høyere forekomst av levende *L. pneumophila* i fartøyer med hydrofortank, kan indikere at disse spiller en rolle for veksten. Hydrofortankene er gjerne plassert i varme maskinrom, dette medfører derfor høyere vanntemperatur enn i den øvrige delen av kaldtvannssystemet. I lys av nyere kunnskap om intracellulær vekst av *L. pneumophila* vil vanntemperaturen kunne være avgjørende for legionellabakteriens skjebne. Ved temperaturer over 20 °C vil bakterien kunne overleve og formere seg i amøben (20).

Samme genotype av *L. pneumophila* ble påvist i vann fra bunkringsstasjon og i vannet om bord på fartøyer som hadde fylt vann fra samme bunkringsstasjon. Dette taler for at vannfylling er én mulig kontamineringsskilde.

Til tross for at en rekke legionelloseutbrudd er rapportert fra passasjerskip (21–23), er det i liten grad gjort systematiske studier på legionellakolonisering i disse skipenes vannfordelingssystemer. Gjennomførte studier i cruiseskip og ferger viser betydelig utbredelse av legionellabakterier av ulike spesies i vann på skip (24). Det finnes ingen studier der man har sett på eventuell overføring av *L. pneumophila* fra ferskvannsanlegg. Resultatene fra vår studie antas å ha overføringsverdi til ferskvannssystemer generelt (25).

Vi takker Jadwiga Krusnell ved Smittskyddsinstituttet, som har introdusert oss for og assistert oss ved etableringen av amøbediagnostikk til dette formålet.

Catrine Ahlén (f. 1949)

er dr.philos., prosjektleder og seniorforsker, hovedsakelig på forebygging av miljørelaterte infeksjoner.

Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Marianne Aas (f. 1975)

er senioringeniør innen mikrobiologi og jobber med forebygging av miljørelaterte infeksjoner.

Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Anne Nor (f. 1971)

er overingeniør ved gruppe for mikrobiologi med hovedarbeidsområde innen genteknologiske metoder.

Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Per-Inge Wetteland (f. 1956)

er cand.med.vet. og orlogskaptein/marineveterinær.

Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Hjalmar Johansen (f. 1944)

er pensjonert orlogskaptein.

Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Trine Sørbø (f. 1966)

er merkantil saksbehandler med ansvar for prosjektet Strategier for forebygging av Legionella på Sjøforsvarets fartøy.

Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Jan Knudtzon Sommerfelt-Petersen (f. 1958)

er lege, kommandør og sanitetsinspektør og assisterende fylkeslege i Hordaland.

Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Ole-Jan Iversen (f. 1946)

er professor i medisinsk mikrobiologi.

Forfatter har fylt ut ICMJE-skjemaet og oppgir ingen interessekonflikter.

Litteratur

1. Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH et al. Ecological distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 1981; 41: 9–16.
2. Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W et al. Legionnaires' disease: description of an epidemic of pneumonia. *N Engl J Med* 1977; 297: 1189–97.
3. Brenner DJ, Steigerwalt AG, McDade JE. Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann Intern Med* 1979; 90: 656–8. >>>

4. Hookey JV, Birtles RJ, Saunders NA. Intergenic 16S rRNA gene (rDNA)-23S rDNA sequence length polymorphisms in members of the family Legionellaceae. *J Clin Microbiol* 1995; 33: 2377–81.
5. Fields BS. The molecular ecology of legionellae. *Trends Microbiol* 1996; 4: 286–90.
6. Fields BS, Benson RF, Besser RE. Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. *Clin Microbiol Rev* 2002; 15: 506–26.
7. Garåsen H, Sagvik E, Kvendbø JF et al. Legionella i Trondheim – smitteoppsporing og miljøkartlegging. *Tidsskr Nor Lægeforen* 2005; 125: 1791–3.
8. Folkehelseinstituttet. Vannrapport 118. Forebygging av legionellasmitte – en veiledning. www.fhi.no/dokumenter/e0091dae75.pdf (1.5.2013).
9. Leecsö-Bornet M, Brossier F, Lerat I et al. Legionella wadsworthii pneumonia: gram stain usefulness. *Med Mal Infect* 2011; 41: 669–70.
10. Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC et al. Distribution of Legionella species and serogroups isolated by culture in patients with sporadic community-acquired legionellosis: an international collaborative survey. *J Infect Dis* 2002; 186: 127–8.
11. Lund V, Ormerud K, Blystad H et al. Tiltak mot spredning av legionærsykdom. Oslo: Folkehelseinstituttet, 2001.
12. Nygård K, Werner-Johansen Ø, Rønsen S et al. An outbreak of legionnaires disease caused by long-distance spread from an industrial air scrubber in Sarpsborg, Norway. *Clin Infect Dis* 2008; 46: 61–9.
13. Olsen JS, Aarskaug T, Thrane I et al. Alternative routes for dissemination of Legionella pneumophila causing three outbreaks in Norway. *Environ Sci Technol* 2010; 44: 8712–7.
14. Forskrift for badeanlegg, bassengbad og badstu m.v. www.lovdata.no/for/sf/ho/xo-19960613-0592.html (1.5.2013).
15. Folkehelseinstituttet. Vannrapport 112. Nok, godt og sikkert drikkevann offshore. www.fhi.no/dav/354ce8a614.pdf (1.5.2013).
16. Stølhaug A, Bergh K. Identification and differentiation of Legionella pneumophila and Legionella spp. with real-time PCR targeting the 16S rRNA gene and species identification by mip sequencing. *Appl Environ Microbiol* 2006; 72: 6394–8.
17. Kaufmann ME. Pulsed-field gel electrophoresis. *Methods Mol Med* 1998; 15: 33–50.
18. Winiecka-Krusnell J, Linder E. Free-living amoebae protecting Legionella in water: the tip of an iceberg? *Scand J Infect Dis* 1999; 31: 383–5.
19. Molmeret M, Horn M, Wagner M et al. Amoebae as training grounds for intracellular bacterial pathogens. *Appl Environ Microbiol* 2005; 71: 20–8.
20. Ohno A, Kato N, Sakamoto R et al. Temperature-dependent parasitic relationship between Legionella pneumophila and a free-living amoeba (Acanthamoeba castellanii). *Appl Environ Microbiol* 2008; 74: 4585–8.
21. Castellani Pastoris M, Lo Monaco R, Goldoni P et al. Legionnaires' disease on a cruise ship linked to the water supply system: clinical and public health implications. *Clin Infect Dis* 1999; 28: 33–8.
22. Goutziana G, Mouchtouri VA, Karanika M et al. Legionella species colonization of water distribution systems, pools and air conditioning systems in cruise ships and ferries. *BMC Public Health* 2008; 8: 390.
23. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Cruise-ship-associated Legionnaires disease, November 2003-May 2004. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 2005; 54: 1153–5.
24. Azara A, Piana A, Sotgiu G et al. Prevalence study of Legionella spp. contamination in ferries and cruise ships. *BMC Public Health* 2006; 6: 100.
25. Codony F, Pérez LM, Adrados B et al. Amoeba-related health risk in drinking water systems: could monitoring of amoebae be a complementary approach to current quality control strategies? *Future Microbiol* 2012; 7: 25–31.

Mottatt 14.12. 2013, første revisjon innsendt 4.3. 2013, godkjent 6.5. 2013. Medisinsk redaktør Kristin Viste.