# Påvisning av *Legionella* spp. i luft ved Borregaard


| Forsvarets forskningsinstitutt | Nasjonalt folkehelseinstitutt | Telelab AS | Borregaard |
|---|---|---|---|
| Janet Martha Blatny | Dominique A. Caugant | Eirik Ask | Dag Aanonsen |
| Gunnar Skogan | E. Arne Høiby | Tone Wierød | Viggo Waagen |
| Bjørn Anders P. Reif | Ingeborg S. Aaberge | | |
| Øyvind Andreassen | | | |


Forsvarets forskningsinstitutt (FFI)

7. mai 2007

FFI-rapport 2007/00560

344601

ISBN 978-82-464-1166-8

## Emneord

*Legionella pneumophila*

luft

matematisk modellering

påvisning

spredning

## Godkjent av

| | |
|---|---|
| Janet M .Blatny | Prosjektleder |
| Jan Ivar Botnan | Avdelingssjef |

# Sammendrag

Rapporten beskriver et samarbeidsprosjekt mellom Forsvarets forskningsinstitutt (FFI), Folkehelseinstituttet, Telelab AS og Borregaard for å undersøke om

- ✓ legionellabakterier kan påvises i luft
- ✓ legionellabakterier kan spres i luft
- ✓ legionellabakterier kan spres fra luftebassenger ved Borregaard til luft

Tidligere analyser har påvist legionellabakterier i luftebassengene ved biorenseanlegget til Borregaard.

Oppgavene er fordelt mellom deltagende institusjoner og detaljerte resultater er utgitt i egne rapporter. Denne rapporten er en helhetlig fremstilling av alle resultatene fra perioden 11.09.2006 – 05.12.2006.

Studien viser at bruken av Computational Fluid Dynamics-modeller (CFD-modeller) og de benyttede metodene for luftprøvetaking og analyse av luftprøvene er velegnet til å identifisere *Legionella* spp. i luft. Ulike legionellaarter, inklusiv *L. pneumophila*, er blitt identifisert i luft nær luftebassengene ved Borregaards biorenseanlegg. Analysene viser at de påviste *L. pneumophila*–isolatene tilhører samme genetiske klon, men hverken serogruppe 1 eller 2-14. Resultatene indikerer at legionellabakterier kan spres fra luftebassengene til luft nær biorenseanlegget til Borregaard, da *Legionella* spp. ble påvist opp til 200 m fra luftebassengene i løpet av undersøkelsesperioden. Konsentrasjonen av legionellabakterier er høyest over luftebassengene og avtar som funksjon av avstand fra disse.

Prosjektet eies av Borregaard. FFI har ledet og koordinert prosjektet i sin helhet. Det ble opprettet en styringskomité med representanter fra Borregaard, Sarpsborg kommune v/Helsesjefen, FFI og Folkehelseinstituttet. Styringskomitéen har til enhver tid vært informert om prosjektets virksomhet og resultater.

Viggo Waagen, Borregaard, er kontaktpersonen for nærmere opplysninger vedrørende dette prosjektet.

## English summary

Borregaard Ind. Ltd, the Norwegian Defence Research Establishment (FFI), the Norwegian Institute of Public Health and Telelab AS have tightly cooperated in order to analyze and evaluate

- ✓ the identification of *Legionella* spp. in air
- ✓ the dispersion of *Legionella* spp. in air
- ✓ the dispersion of *Legionella* spp. from the aeration ponds located at Borregaard's biological treatment plant to ambient air

*Legionella* spp. has previously been identified in the liquid suspension of the aeration ponds at Borregaard's biological treatment plant.

This report describes the overall results obtained from the joint project that was performed during the time period 11.09.2006 – 05.12.2006. The collaborating partners have independently published reports describing in detail their contribution to the project. The project owner is Borregaard Ind. Ltd and FFI has been the project coordinator.

Successful identification of *Legionella* spp. in air was obtained at various locations close to the aeration ponds by the use of a Computational Fluid Dynamic (CFD) model for prediction of statistical averaged wind fields, suitable collectors for air sampling, and microbiological and molecular methods for bacterial analysis. Several *Legionella* spp., including *L. pneumophila*, were identified in air at the biological treatment plant. The identified *L. pneumophila* isolates were genotypically identical, but they were not classified into the serogroups 1-14. The results strongly indicate that *Legionella* spp. may be dispersed from the aeration ponds to ambient air close to the biological treatment plant, based on the finding that airborne *Legionella* spp. was identified up to 200 m from the aeration ponds. The highest concentration level of *Legionella* bacterial cells were identified directly above the aeration ponds. This level decreased as the distance from the aeration ponds increased.

The Steering Committee has had the overall responsibility for the work and consisted of representatives from Borregaard Ind. Ltd., the municipality of Sarpsborg (health authorities), FFI, and the Norwegian Institute of Public Health.

Dr. Viggo Waagen, Borregaard Ind. Ltd. is the Point of Contact (POC) for further information regarding this work.

# Innhold


| | | |
|---|---|---|
| **1** | **Innledning** | **7** |
| 1.1 | *Legionella* | 8 |
| 1.2 | Påvisning av *Legionella* spp. | 9 |
| 1.3 | Organisering av prosjektet | 10 |
| **2** | **Formål** | **11** |
| **3** | **Materialer og Metoder** | **12** |
| 3.1 | Luftprøvetakingsutstyr | 12 |
| 3.2 | Plassering av luftprøvetakingsutstyr | 13 |
| 3.3 | Matematisk modellering med CFD | 14 |
| 3.4 | Værforhold | 14 |
| 3.5 | Dyrkingsanalyser og serogruppebestemmelse | 15 |
| 3.6 | Real-time PCR | 15 |
| 3.7 | Artsbestemmelse av *Legionella*-lignende kolonier ved sekvensering av 16S rRNA-genet | 16 |
| 3.8 | Multi-lokus sekvenstyping (MLST) | 16 |
| **4** | **Resultater** | **17** |
| 4.1 | Prøvetaking av luft | 17 |
| 4.2 | Analyse av luftprøver | 27 |
| 4.3 | Spredning av *Legionella* spp. i luft | 30 |
| **5** | **Konklusjon** | **32** |
| **6** | **Diskusjon** | **33** |
| **7** | **Videre arbeid** | **35** |
| **8** | **Referanser** | **36** |
| **9** | **Vedlegg** | **38** |
| 9.1 | Vedlegg 1 | 38 |

# 1 Innledning

Legionellabakterier har blitt påvist ved flere biologiske renseanlegg tilknyttet ulike typer industrianlegg. I den Nordiske treforedlingsindustrien har dette fått stor oppmerksomhet, og det pågår for tiden ulike kartlegginger av problemstillingen i både Finland og Sverige. Borregaard er tilknyttet undersøkelsene som gjøres i regi av Skogindustrierna i Sverige. Ved å undersøke mange biologiske renseanlegg over tid har det vært mulig å studere variasjonen i *Legionella*-nivået på de enkelte anlegg. På bakgrunn av innsamlet informasjon kan det undersøkes om det er spesielle faktorer som påvirker konsentrasjonen av legionellabakterier og sammensetningen av *Legionella*-artene.

I Sarpsborg/Fredrikstad-området i mai 2005 var det et utbrudd av legionærsykdom (alvorlige lungebetennelser forårsaket av legionellabakterier) hvor 56 personer ble syke og 10 døde. Serologiske undersøkelser i etterkant viste at ytterligere 22 pasienter med lungebetennelse på samme tid og fra samme område hadde vært smittet av legionellabakterier. To av disse døde. Utbruddet var forårsaket av bakterien *Legionella pneumophila* serogruppe 1. Ved bruk av både epidemiologiske analyser og DNA-analyser av bakterier isolert fra legionellapasienter og miljø ble scrubberanlegget ved Borregaard i Sarpsborg identifisert som smittekilden. I november 2005 oppstod tre nye tilfeller av lungebetennelse forårsaket av *L. pneumophila* serogruppe 1 i Sarpsborg/Fredrikstad-området. Smittekilden for disse siste tilfellene er ikke avklart.

I et forebyggende helseperspektiv er det viktig å øke kunnskapen vite om forekomst av legionellabakterier i biologiske renseanlegg utgjør en helsemessig risiko ved mulig spredning til nærmiljøet. Dette prosjektet har derfor som formål å kartlegge tilstedeværelsen av *Legionella* spp. i luft ved Borregaard gjennom å studere mulig spredning fra luftebassengene tilhørende det biologiske renseanlegget (figur 1.1). I prosjektet inngår metodeutvikling og kompetanseutvikling for prøvetaking av legionellabakterier i luft, dyrking og isolering av bakterier, samt genetiske undersøkelser av innsamlet materiale.

Figur 1.1. Luftebasseng ved Borregaards biologiske renseanlegg (foto: FFI juni 2006).

## 1.1 *Legionella*

Legionellabakterier er vanlig forekommende i naturen i de fleste våte og fuktige miljøer (unntatt saltvann), men konsentrasjonen er gjennomgående lav. Bakteriene er ofte å finne i biofilm der de opptrer som intracellulære parasitter i amøber og andre protozoer. Legionellabakterier er avhengig av aminosyren L-cystein og jern for dyrking, med en optimal veksttemperatur på mellom 30°C og 40°C. Bakteriens toleranse for relativt høye temperaturer (50°C) gjør at de lett kan kolonisere i kunstige vannsystemer som holder temperaturer over normal romtemperatur[1]. Det er påvist minst 49 legionellaarter (Cianciotto et al., 2006). Mest forbundet med sykdom er *Legionella pneumophila* som inndeles i minst 15 ulike serogrupper (Hurst, 2002). *L. pneumophila* serogruppe 1 er den serogruppen som har vært årsak til *Legionella*-utbruddene vi har hatt i Norge de siste årene.

Legionellose skyldes normalt innånding av luft som inneholder legionellainfiserte aerosolpartikler. Aerosolpartikler kan eksistere som våte eller tørre partikler. Generelt gjelder at når aerosolpartiklene har en diameter på mindre enn 5µm er de respirable og kan nå ned i lungenes alveoler. Dette øker risikoen for sykdom. Det er ikke demonstrert smitteoverføring mellom mennesker. Kjente risikoinstallasjoner er f. eks. kjøletårn, varmtvannssystemer (f. eks. dusjer), befuktningsanlegg, boblebad mm[2]. For videre lesing om *Legionella* se oversiktsartikkel av Cinciotto et al. (2006) og Fields et al. (2002). Helse- og omsorgsdepartementet har sendt ut til

[1] www.hpa-standardmethods.org.uk/documents/water/pdf/W12.pdf.
[2] www.ewgli.org

høring (frist 11. mai 2007) et forslag til et nytt regelverk om regulering av innretninger som kan spre legionellabakterier[3].

## 1.2 Påvisning av *Legionella* spp.

Prøvetaking av luft kan utføres med ulike typer oppsamlere, bl. a. impaktorer og impingere. Med en impaktor føres partiklene i luften direkte ned på en vekstagarskål. Agarskålene kan settes til inkubering for dyrking og verifisering av bakterievekst (i denne studien *Legionella* spp.). Denne metoden krever at de oppsamlede bakteriecellene er levende og kan vokse ved de gitte betingelsene som benyttes på laboratoriet. Ved hjelp av en impinger overføres partiklene direkte til en væske. Det finnes noen impaktorer, virtuelle impaktorer, som oppkonsentrerer partiklene fra luft til luft eller luft til væske. Væskeløsningen kan benyttes videre til både dyrking og genetiske analyser. I denne studien ble instrumentene STA-204, MAS-100 og SASS 2000$^{PLUS}$ valgt til luftprøvetaking (tabell 3.1 og figur 3.1).

Påvisning av *L. pneumophila* i luft ved bruk av impingere og impaktorer har tidligere blitt utført internasjonalt. Etter *Legionella*-utbruddet i Frankrike, november 2003-januar 2004, ble slike studier utført ved et prosessanlegg for produksjon av kjemikalier (Nguyen et al., 2006). Resultater fra dette arbeidet viste at *Legionella* spp. ble påvist i to av tolv luftprøver. Tilsvarende studier i nærheten av kjøletårn ved prosessanlegg er blitt utført av Pascual et al. (2001) og Ishimatsu et al. (2001).

Mengde og type aerosolpartikler som kan inneholde mikroorganismer er avhengig av værforholdene. Overlevelsesevnen til legionellabakterien er trolig avhengig av meteorologiske forhold. Sol (UV-stråling) og lav luftfuktighet kan føre til at aerosolpartiklene raskt tørker slik at bakterier og andre mikroorganismer i luften dør. En optimal lufthøsting er derfor avhengig av værforholdene. Disse faktorene, og optimal plassering av måleinstrumentene i forhold til lokal topografi og vindforhold rundt dammer og bygninger, er viktige for å oppnå gode målinger for påvisning av *Legionella* spp. i luft. Ved å beregne lokale vindfelt ved hjelp av CFD[4]-modeller (Computational Fluid Dynamics) kan grunnlaget dannes for å bestemme den optimale plasseringen av måleinstrumentene for luftprøvetakingen. Slike beregninger krever en detaljert oversikt over lokal topografi.. Tilstedeværelsen av bygninger kan påvirke det lokale vindfeltet og føre til strømning, slik at enkelte områder ikke vil bli eksponert for aerosolpartikler som kan inneholde *Legionella* spp.

Påvisning av *Legionella* spp. og *L. pneumophila* kan gjøres ved både dyrking og bruk av genetiske analysemetoder. Legionellabakterier kan dyrkes på selektive vekstagarskåler, hvor ulik morfologi og fluorescens gjenspeiler ulike legionellaarter. Bakteriene vokser langsomt og

[3] http://www.regjeringen.no/nb/dep/hod/dok/hoeringer/hoeringsdok/2007/Horing-av-tiltak-mot-spredning-av-Legion.html?id=451926

[4] CFD-modeller benyttes for beregning av strømningsfelter

agarskålene skal inkuberes i opptil syv dager. Dyrking er nødvendig for å kunne karakterisere bakteriene f. eks. med bestemmelse av serogruppe, artsbestemmelse og genetisk typing.

Polymerase chain reaction (PCR) er en vanlig benyttet metode innen diagnostikk for å amplifisere spesifikke DNA-fragmenter fra bakteriens genom for påvisning. Real-time PCR med primere for spesifikk amplifisering av utvalgte genfragmenter, bl. a. fra 16S rRNA og *mip*[5], har blitt benyttet tidligere for påvisning av *L. pneumophila* (Rantakokko-Jalava and Jalava, 2001, Wellinghausen et al., 2001). Pasculle (1992), Fields et al. (2002), og Cianciotto et al. (2006) beskriver ulike påvisningsmetoder for *Legionella* spp. og *L. pneumophila*.

Artsbestemmelse av bakterier kan gjøres ved hjelp av DNA-sekvensering av utvalgte 16S rRNA-genfragmenter. 16S rRNA-genet er konservert mellom stammer av samme art. Ved å sammenligne DNA-sekvensene av dette genet med tilsvarende sekvenser fra andre bakteriearter, som finnes tilgjengelige i ulike databaser, kan vanligvis arten (eller den mest beslektede arten) bestemmes. Genotyping, f. eks multi-lokus sekvenstyping (MLST), egner seg bl.a. for å identifisere ulike genetiske stammer innen samme bakterieart. Dette gjøres ved å bestemme DNA-sekvensen til enkelte spesifikke DNA-fragmenter amplifisert fra flere områder i bakteriens genom. DNA-sekvensen fra de ulike spesifikke genfragmentene vil gi informasjon om bakteriens identitet (sekvenstype) (Maiden et al., 1998).

I denne studien har biorenseanlegget ved Borregaard blitt kartlagt med hensyn til topografi og bygninger, og partikkelbanene for luftstrømmen fra prosessanlegget har blitt beregnet for å oppnå optimal plassering av luftprøvetakingsutstyret. Studien danner grunnlag for å kunne utføre risikovurderinger av spredning av legionellabakterier i luft.

## 1.3 Organisering av prosjektet

Prosjektet er organisert med en prosjektgruppe bestående av deltagere fra Sarpsborg kommune, Forsvarets forskningsinstitutt (FFI), Folkehelseinstituttet og Borregaard. I tillegg har Telelab AS bidratt med analysering av prøver og kompetanseutveksling. Rammer for prosjektet og overordnede beslutninger er styrt av prosjektets styringskomité. Styringskomitéen har bestått av deltagere fra Sarpsborg kommune (inklusiv Helsesjefen), FFI, Folkehelseinstituttet og Borregaard. Eier og prosjektansvarlig for prosjektet er Borregaard, mens FFI har vært prosjektkoordinator.

[5] *mip* genet koder for "macrophage infectivity potentiator" og er involvert i virulensen til *L. pneumophila*

# 2 Formål

Formålet med studien var å undersøke tilstedeværelsen av *Legionella* spp. og *L. pneumophila* i luft ved Borregaard. Prosjektets mål bestod i å undersøke

- ✓ om *Legionella* spp. og *L. pneumophila* kan påvises i luft
- ✓ om *Legionella* spp. og *L. pneumophila* kan spres i luft
- ✓ om *Legionella* spp. og *L. pneumophila* kan spres fra luftebassengene til luft

Prosjektet er et viktig ledd i å øke forståelsen av spredning av *Legionella* spp. i luft og bidrar til å øke nasjonal kompetanse innen påvisning av *Legionella* spp. Denne studien bidrar til å gi kunnskap om overlevelsen av legionellabakterien i luft, og danner grunnlag for risikovurderinger av spredning av *Legionella* spp. i luft, noe som kan føre til human sykdom.

# 3 Materialer og Metoder

Alle data vedrørende prøvetakingsdatoer og tidspunkter har blitt journalført ved Borregaard. Denne journalen inneholder også informasjon om vær- og vindforhold, forsendelse av prøver, utførelse av analyser av de ulike samarbeidsaktørene under hele forsøksperioden. Journalen oppbevares ved Borregaard. Det henvises til denne journalen, samt rapporter fra de enkelte samarbeidsaktørene, for utførlig beskrivelse av det eksperimentelle arbeidet.

FFI har bidratt med CFD-modellen for beregning av partikkelbanene og har i hovedsak utført all luftprøvetakingen ved Borregaard. Telelab AS har bidratt til dette ved behov. Alle luftprøver med SASS 2000$^{PLUS}$ ble analysert av FFI med real-time PCR og Telelab AS ved dyrkingsanalyser. Telelab AS og Folkehelseinstituttet har utført dyrking, arts- og serogruppebestemmelse av *Legionella* spp., innsamlet med MAS-100 og STA-204. Folkehelseinstituttet har utført artsbestemmelse og genotyping av et representativt utvalg av fluorescerende og ikke-fluorescerende legionellaisolater.

## 3.1 Luftprøvetakingsutstyr

Prøvetaking av luft i tidsperioden 11.09.2006 – 05.12.2006 ble utført med tre ulike instrumenter; MAS-100, STA-204 og SASS 2000$^{PLUS}$ (tabell 3.1 og figur 3.1). Se Blatny et al. (2007) for detaljert beskrivelse av luftprøvetakingen.

Luftprøvene fra SASS 2000 $^{PLUS}$ ble delt i to alikvoter, hvor Telelab AS og FFI analyserte hver sin alikvot med henholdsvis dyrking og spesifikk real-time PCR. To påfølgende prøvetakingsserier ble utført med MAS-100 og STA-204 hvor hvert sett med agarskåler ble sendt til Telelab AS og Folkehelseinstituttet samme dag for dyrking og analyse. Agarskålene fra MAS-100 og STA-204 ble analysert av både Telelab AS og Folkehelseinstituttet.

Tabell 3.1. Utstyr for luftprøvetaking ved Borregaard i perioden 11.09.2006 – 05.12.2006.

| Luftprøvetakings-utstyr | Type | Luftflow inn (l/min) | Prøvetakings-tid (min) | Tidsperiode i 2006 | Total luftmengde |
|---|---|---|---|---|---|
| MAS-100 | Impaktor (Merck) | 100 | 10 | Alle prøvetakings-datoer, unntatt 21.09 og 27.09 | 10 000 l = 10 $m^3$ |
| STA-204 | Impaktor (New Brunswick Scientific) | 30 | 60 | 11.09, 21.09, 27.09 | 1 800 l = 1.8 $m^3$ |
| SASS $2000^{PLUS}$ | Virtuell impaktor/ syklon (Research International) | 325 | 60<br>120 | 25.10 – 05.12<br>11.09 – 18.10 | 19 500 l = 19.5 m3<br>39 000 l = 39 $m^3$ |

A B C

Figur 3.1. Prøvetakingsutstyr for luft benyttet i denne studien; MAS-100 (A), STA-204 (B) og SASS $2000^{PLUS}$ (C).

## 3.2 Plassering av luftprøvetakingsutstyr

Luftprøvetakingsutstyret ble plassert ved ulike målepunkter (kartreferanser) ved Borregaards biorenseanlegg i henhold til beregnede partikkelbaner fra luftebassengene. En partikkelutbredelsesmodell identifiserte teoretisk de områdene hvor fluksen av partikler med opprinnelse i luftebassengene er forventet høyest. I tillegg må området med forventet høy fluks være nær et mulig målepunkt. Beregningene for partikkelbanene ble utført ved bruk av en CFD-modell (kap. 3.3).

## 3.3 Matematisk modellering med CFD

Basis for CFD-modellen er en RANS-formulering (Reynolds Average Navier Stokes) av strømningsfeltet (Durbin og Pettersson Reif, 2001). RANS-simuleringer, som inneholder turbulensmodeller, ble benyttet til å estimere hastighetsfeltet i biorenseanleggets lokale omgivelser. RANS gir et statistisk midlet bilde av strømningsfeltet, som er velegnet til denne studien siden lufthøstingen skjer over relativt lang tid (1-2 timer per oppsamling). Koden Fluent ble benyttet til RANS-simuleringene hvor beregningsdomenet inkluderer et volum på 1 km (l) x 1 km (b) x 250 m (h) med biorenseanlegget i sentrum. Dette gir en komplett geometrisk beskrivelse av området, inklusiv topografi og bygninger.

Det ble totalt utført 24 simuleringer i "batch" basert på 24 "ytre" vindretninger hver med 15 graders inkrement i retningen til starthastighetsfeltet. Dette resulterte i totalt 24 kart for plassering av prøvetakingsutstyr. Simuleringen er basert på en 2 m/s vindhastighet. Det ble antatt at resultatene ikke ville variere signifikant ved lave vindhastigheter (< 6-7 m/s). Partikkelbaner ("passive tracers") fra luftebassengene ble deretter beregnet med utgangspunkt i hastighetsfeltet fra RANS- simuleringene. En vurdering av partikkelvariasjonen i tetthet og høyde for partikkelbanene tillot en identifisering av punkter/områder i terrenget som har størst sannsynlighet for å bli truffet av partikler fra luftebassengene. Det henvises til Blatny et al. (2007) for en detaljert beskrivelse av simuleringsmodellen. En verifisering av vindretningen ble utført ved hjelp av en røykgenerator, samt en visuell inspeksjon av røyk fra piper på anlegget ved Borregaard.

## 3.4 Værforhold

Tidspunktene for lufthøstingene ble valgt ut fra meteorologiske data hentet fra METOC-varsler[6]. Prøvetakingen av luft ble foretatt så langt som mulig under samme værforhold som under utbruddet i Sarpsborg/Fredrikstad i mai 2005, dvs. tykt skydekke og høy luftfuktighet. Under slike forhold er atmosfæren sannsynligvis meget stabil, og det er trolig ideelle forhold for aerosolspredning. Derfor ble dager med lavt og tykt skydekke, høy luftfuktighet, stabil vindretning og -styrke valgt som velegnede dager for luftprøvetaking. Prøvetakinger ble ikke utført på dager med for lav temperatur (< 1 ºC).

[6] METOC : militær oseanografi og meteorologi, www.metoc.met.no. METOC er et samarbeidsprosjekt mellom Meteorologisk institutt, FFI og Forsvaret.

## 3.5 Dyrkingsanalyser og serogruppebestemmelse

Påvisning og kvantifisering av legionellabakterier i luftprøver ble utført i henhold til ISO 11731:1998[7]. Denne standarden gjelder for påvisning av *Legionella* spp. i vann. Luftprøver innsamlet med SASS 2000$^{PLUS}$ (væskeprøve) ble dyrket på selektivt GVPC vekstagarmedium (Oxoid) for *Legionella* spp. For både STA-204 og MAS-100 ble partiklene samlet direkte på GVPC agarskåler. For prøver tatt med SASS 2000$^{PLUS}$ ble resultatene beregnet i antall legionellabakterier per $m^3$ luft.

For alle luftprøvene ble GVPC-skålene inkubert ved 36°C±2°C i 10 døgn, og det ble undersøkt for vekst av *Legionella* spp. minst tre ganger i løpet av denne perioden. Verifisering av *Legionella* spp. ble gjort ved subkultivering på BCYE-agarmedium og blodagarmedium. BCYE-skålene ble inkubert ved 35ºC i fuktekammer i syv dager og ble daglig inspisert etter de to første dagene. Inspeksjon ble foretatt makroskopisk og med disseksjonsmikroskop med 20-50 X forstørrelse. Koloniene på agarskålene ble også studert med UV-lys 360 nm (”Woods lamp”) siden ulike *Legionella* spp. har ulik fluorescens. Mistenkte legionellakolonier ble rendyrket på nye BCYE agarskåler. Generelt er legionellakolonier avrundede, sirkulære med hel, jevn kant og malt glass-utseende (”ground glass appearance”) og perlemorskinn med blå, grønn eller rosa fargetone – oftest i kanten. Det eksisterer bare et fåtall av andre medisinsk interessante mikrober med et slikt utseende. Eldre kolonier er mer opake, hvitlige, med opalescent ytre omkrets. Mistenkte legionellakolonier, med typisk morfologi makroskopisk og mikroskopisk, som vokste på BCYE men ikke på blodagar, ble identifisert som *Legionella* spp.

Renkulturer som ble identifisert som *L. pneumophila* ved hjelp av 16S rRNA-sekvensering (kap. 3.7) ble undersøkt med latex agglutinasjonstest (drySPOT Legionella Latex test, Oxoid) i henhold til brukermanual[8] for påvisning av tilhørighet til serogruppe 1 eller serogruppe 2-14. Alle legionellastammene ble frosset ned i Folkehelseinstituttets stammearkiv i Greaves’s medium ved - 70°C.

## 3.6 Real-time PCR

DNA ble ekstrahert fra 1,5 ml luftprøve høstet med SASS 2000$^{PLUS}$, og real-time PCR ble utført med LightCycler (Roche) med både generelle (16S rRNA) og spesifikke (*mip*) primere og prober for identifisering av henholdsvis *Legionella* spp. og *L. pneumophila*. Valg av primere og prober er basert på litteraturstudier (Wellinghausen et al., 2001), og betingelsene for real-time PCR er beskrevet i Blatny et al. 2007.

[7] International Standard ISO 11731:1998: Water quality - Detection and enumeration of Legionella.
[8] Oxoid Diagnostic Reagents, Legionella Latex Test, DR0800M, Brukermanual: X5057B January 2005

## 3.7 Artsbestemmelse av *Legionella*-lignende kolonier ved sekvensering av 16S rRNA-genet

PCR med primere PA, 5`-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3`, og PD, 5`-GTA TTA CCG CGG CTG CTG-3`, ble brukt til amplifisering av 16S rRNA-genet (Valheim et al., 2001). PCR-produktet ble påvist med gelelektroforese og påfølgende farging og fotografering. PCR produktet ble renset og DNA-sekvensering av PCR-produktet ble utført med primere PB, 5`-TAA CAC ATG CAA GTC GAA CG-3`, og PC, 5`-CCC ACT GCT GCC TCC CGT AG-3`. Sekvenseringsreaksjonene ble utført med Big Dye ® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) og 48 ABI 3730 DNA Analyzer. Dataene ble analysert ved hjelp av Sequencing analysis 5.2 (ABI) og Sequencher 4.5 (Gene Codes). Databasen BLAST[9] ble brukt for å sammenligne DNA-sekvensen av det amplifiserte 16S rRNA-genet med tilsvarende sekvenser fra andre bakteriearter (% DNA-likhet).

## 3.8 Multi-lokus sekvenstyping (MLST)

MLST analyser av *L. pneumophila* ble utført ved PCR-amplifisering av seks genfragmenter (*asd, flaA, mip, mompS, pilE og proA*) (Gaia et al., 2005). Etter rensing av PCR-produktet ble de samme primerne brukt til DNA-sekvensering. Sekvenseringsreaksjoner ble utført med Big Dye ® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit, (Applied Biosystems) og 48 ABI 3730 DNA Analyzer. De genererte dataene (AB1-filene) ble eksportert til EWGLI databasen[10]. Identifisering av bakterieklonene ble gjort ved å sammenlikne DNA-sekvensene til de seks utvalgte genfragmentene med tilsvarende sekvenser i databasen.

[9] www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST

[10] EWGLI databasen : www.ewgli.org. EWGLI = The European Working Group for Legionella Infections.

# 4 Resultater

I dette avsnittet beskrives prøvetakingen og resultatene for påvisning av *Legionella* spp. i luft ved biorenseanlegget på Borregaard i tidsperioden 11.09.2006 – 05.12.2006. Det henvises til rapportene Blatny et al. (2007), Wierød et al. (2007) og Caugant et al. (2007) for en mer utfyllende beskrivelse av disse resultatene.

En oppsummering av analysene av luftprøvene utført i 11.09.2006 – 05.12.2006 er vist i tabell 4.1.

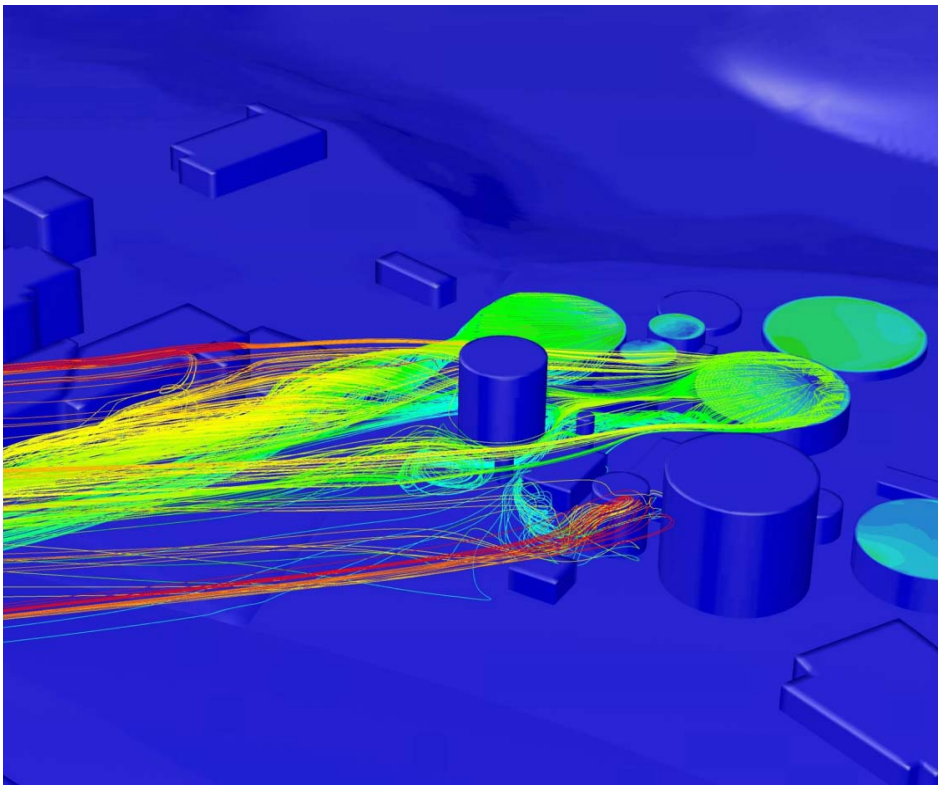
## 4.1 Prøvetaking av luft

Prøvetakingsutstyret for luft ble plassert på anbefalte områder beregnet ved bruk av CFD (kap. 3.3). Ved å teoretisk beregne partikkelbaner med utgangspunkt i partikler som slippes ut fra luftebassengene, kan områdene hvor det er størst sannsynlighet for å oppsamle partikler i luften estimeres (figur 4.1 og 4.2). Figur 4.1 viser et eksempel på en beregning når vinden har retning fra sør mot nord og en hastighet på 2 m/s. Området hvor luftprøvetakingsutstyret bør plasseres under slike vindforhold er vist i figur 4.2.

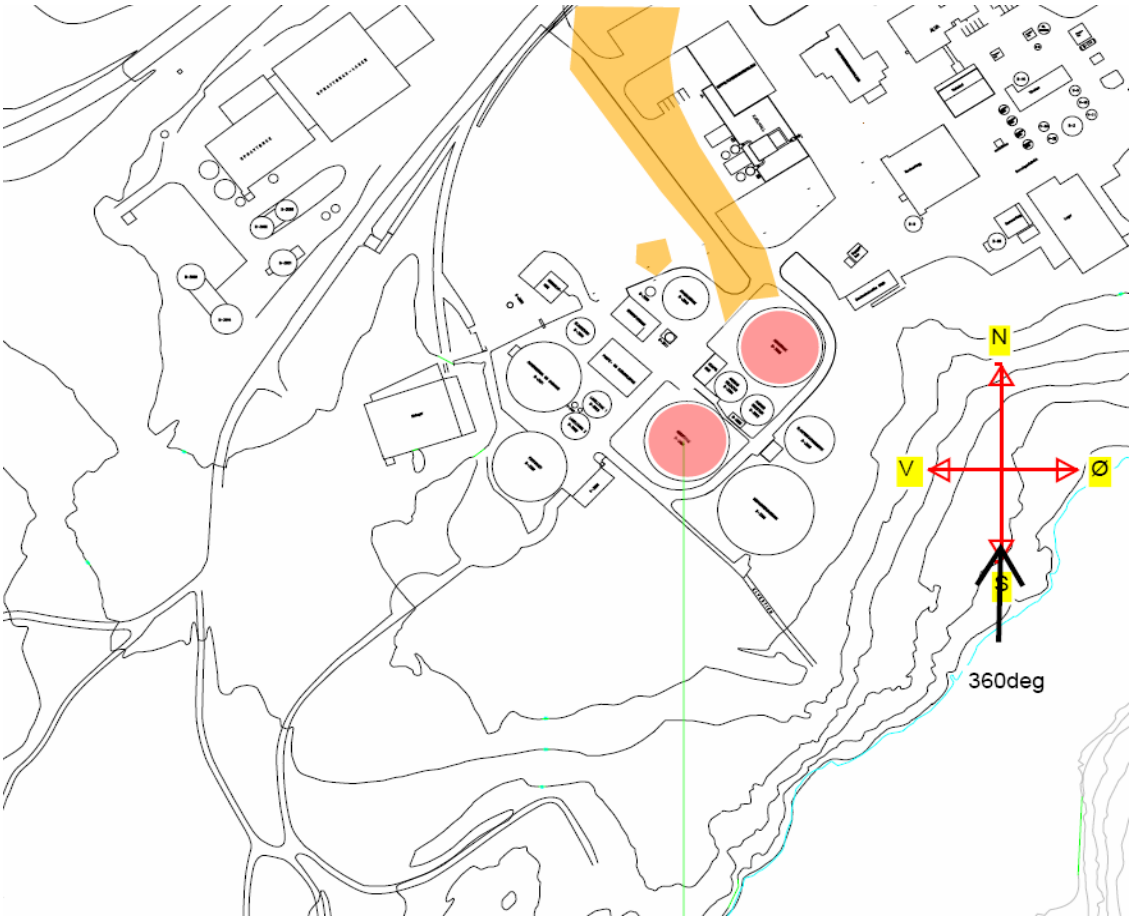
Målepunkter for prøvetaking av luft ved biorenseanlegget på Borregaard er avmerket på kartet i figur 4.3. Prøvetakingen med MAS-100 og STA-204 viste seg å gi tilnærmet like resultater. MAS-100 ble derfor valgt for videre prøvetaking da denne var enklere i bruk enn STA-204.

Tidspunktene for lufthøstingene ble valgt ut fra METOC-varsler. Generelt ble prøvetakingen av luft foretatt oppstrøms og nedstrøms i forhold til vindretningen, samt over luftebassengene. Prøvetakingen av luft oppstrøms ble utført for å utelukke evt. andre *Legionella*-kilder i området. En røykgenerator og røyken fra fabrikkpipene ved Borregaard ble benyttet til å monitorere vindretningen slik at eventuelle "tilbakeslag" av vinden kunne utelukkes. Det ble ikke observert noe "tilbakeslag" av vinden. Dette ble også bekreftet ved at det generelt ikke ble påvist *Legionella* i oppstrømsprøvene (tabell 4.1)[11]. Derfor ble det ikke foretatt oppstrømsmålinger fra og med 18.10.06.

[11] *Legionella* ble kun identifisert i én oppstrøms prøve (prøve 137, 27.09.2006) (tabell 4.1).



Figur 4.1. Partikkelbaner basert på CFD-beregninger med en vindretning på 360 grader (deg), dvs. vind fra sør mot nord, og en vindhastighet på 2 m/s med utgangspunkt i partikler sluppet ut fra luftebassengene. Se figur 4.2 for anbefalt område for prøvetaking av luft under dette vindforholdet. Fargene på partikkelbanene indikerer høyder fra bakkenivå (grønt : lavt; rødt : høyt).




Figur 4.2. Optimal plassering (i gult) av luftprøvetakingsutstyr når vindretning og hastighet er henholdsvis 360 grader (deg), fra sør mot nord og 2 m/s. Plasseringen er estimert ut ifra partikkelbanene vist i figur 4.1.

Neste side:

Figur 4.3. Målepunkter (kartreferanser) for prøvetaking av luft ved biorenseanlegget, Borregaard, i tidsperioden 11.09.2006 – 05.12.2006.

X-14
X-25
X-23
X-26
X-24
X-15
X-18
X-16
X-8
X-7
X-4
X-10
X-19
X-20
X-13
X-1
X-3
X-22
X-21
X-11
X-12
X-2
X-5
N
V
Ø
S

Tabell 4.1. Analyse av luftprøver ved Borregaards biorenseanlegg i tidsperioden 11.09.2006 – 05.12.2006.

| Prøve nummer[a] | Dato | Værforhold Vindretn./ Hastighet | Utstyr | Kartref.[b] | Avstand[c] (m) | Høyde (m.o.h) | PCR[d] | cfu/m$^3$ [e] | | 16S rRNA sekv.[f] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 99<br>102 | 11.09.06 | Overskyet<br>200 / 4 m/s | STA-204 | 3 | 0 | 35 | | 15 | 2 7P + 13 Lspp | *L. bozemanii* |
| 98<br>101 | 11.09.06 | Overskyet<br>200 / 4 m/s | STA-204 | 4 | 75 | 26 | | 1 | Lspp<br>FHI: Lspp=*L.pneumophila* | Ikke påvist |
| 105<br>108 | 11.09.06 | Overskyet<br>200 / 4 m/s | MAS-100 | 3 | 0 | 35 | | 21 | Lspp<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | *L. pneumophila* |
| 104<br>107 | 11.09.06 | Overskyet<br>200 / 4 m/s | MAS-100 | 4 | 75 | 26 | | Ikke påvist | <1 | *L. pneumophila* |
| 111<br>114 | 11.09.06 | Overskyet<br>200 / 4 m/s | SASS 2000 | 3 | 0 | 35 | + | 111 | 1 7P + 110 Lspp<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | |
| 110<br>113 | 11.09.06 | Overskyet<br>200 / 4 m/s | SASS 2000 | 4 | 75 | 26 | + | 7 | Lspp.<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | |
| 120<br>123 | 21.09.06 | Overskyet<br>220 / 4,5 m/s | SASS 2000 | 3 | 0 | 35 | + | Ikke påvist | < 0.3 | |
| 121<br>124 | 21.09.06 | Overskyet<br>220 / 4,5 m/s | SASS 2000 | 7 | 55 | 26 | + | 4 | Lspp | |
| 126<br>129 | 21.09.06 | Overskyet<br>220 / 4,5 m/s | STA-204 | 3 | 0 | 36,5 | | 118 | Lspp<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | *L. pneumophila*<br>*L. bozemanii* |
| 127<br>130 | 21.09.06 | Overskyet<br>220 / 4,5 m/s | STA-204 | 7 | 55 | 26 | | 18 | Lspp.<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | *L. bozemanii* |
| 135<br>138 | 27.09.06 | Regn<br>190 / 3 m/s | STA-204 | 3 | 0 | 35 | | >200 | >150 7P + 43 Lspp<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | *L. bozemanii*<br>*L. pneumophila*[g] |
| 136<br>139 | 27.09.06 | Regn<br>190 / 3 m/s | STA-204 | 8 | 65 | 26 | | 47 | 40 7P + 7 Lspp<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | *L. bozemanii* |
| 137 | 27.09.06 | Regn<br>190 / 3 m/s | STA-204 | 5 | 65<br>oppstrøms | 34 | | 0.4 | Lspp | |
| 141<br>149 | 27.09.06 | Regn<br>190 / 3 m/s | SASS 2000 | 3 | 0 | 35 | + | 52 | Lspp<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | |
| 142<br>150 | 27.09.06 | Regn<br>190 / 3 m/s | SASS 2000 | 8 | 65 | 26 | + | 2 | Lspp<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | |
| 164<br>167 | 11.10.06 | Overskyet<br>50 / 2,5 m/s | SASS 2000 | 3 | 0 | 35 | + | 3300 | Lspp<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | |
| 165<br>168 | 11.10.06 | Overskyet<br>50 / 2,5 m/s | SASS 2000 | 11 | 145 | 27,9 | - | 300 | Lspp<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | |
| 173<br>174 | 11.10.06 | Overskyet<br>50 / 2,5 m/s | MAS-100 | 3 | 0 | 35 | | 14 | 9 7P + 5 Lspp | *L. pneumophila*<br>*L. bozemanii*[h] |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 169<br>170 | 11.10.06 | Overskyet<br>50 / 2,5 m/s | MAS-100 | 11 | 145 | 27,9 | | Ikke påvist | <1 | Ikke påvist |
| 188<br>191 | 18.10.06 | Regn<br>60 / 1,5-3,5 m/s | SASS 2000[i] | 3 | 0 | 35 | + | 40 | 4 7P + 36 Lspp | |
| 190<br>193 | 18.10.06 | Regn<br>60 / 1,5-3,5 m/s | SASS 2000 | 11 | 145 | 27,9 | + | 25 | 2 7P + 23 Lspp | |
| 194<br>197 | 18.10.06 | Regn<br>60 / 1,5-3,5 m/s | MAS-100 | 3 | 0 | 35 | | 66 | 5 7P + 61 Lspp | *L. bozemanii*<br>*L. pneumophila*<br>*L. dumoffii* |
| 195<br>198 | 18.10.06 | Regn<br>60 / 1,5-3,5 m/s | MAS-100 | 12 | 55 | 33,8 | | 94 | Lspp<br>(flere typer) | *L. bozemanni*<br>*L. pneumophila*<br>*L. oakridgensis* |
| 196<br>199 | 18.10.06 | Regn<br>60 / 1,5-3,5 m/s | MAS-100 | 11 | 145 | 27,9 | | Ikke påvist | <1 | *L. bozemanii*<br>*L. oakridgensis* |
| 229<br>231 | 25.10.06[j] | Sol<br>50/ 0 m/s –<br>240/ 0,5 m/s | SASS 2000 | 3 | 0 | 35 | + | 180 | Lspp | |
| 224<br>226 | 25.10.06 | Sol<br>50/ 0 m/s –<br>240/ 0,5 m/s | SASS 2000 | 11 | 145 | 27,9 | - | 0.4 | Lspp | |
| 225<br>227 | 25.10.06 | Sol<br>50/ 0 m/s –<br>240/ 0,5 m/s | SASS 2000 | 13 | 125 | 26 | - | Ikke påvist | <0.1 | |
| 228<br>230 | 25.10.06 | Sol<br>50/ 0 m/s –<br>240/ 0,5 m/s | SASS 2000 | 10 | 65 | 26 | + | 13 | 1 7P + 12 Lspp | |
| 236<br>237 | 25.10.06 | Sol<br>50/ 0 m/s –<br>240/ 0,5 m/s | MAS-100 | 3 | 0 | 35 | | 420 | Lspp | *L. bozemanni*<br>*L. pneumophila*<br>*L. oakridgensis* |
| 232<br>233 | 25.10.06 | Sol<br>50/ 0 m/s –<br>240/ 0,5 m/s | MAS-100 | 11 | 145 | 27,9 | | Ikke påvist | < 1 | Ikke påvist |
| 234<br>235 | 25.10.06 | Sol<br>50/ 0 m/s –<br>240/ 0,5 m/s | MAS-100 | 13 | 125 | 26 | | Ikke påvist | < 1 | Ikke påvist |
| 238<br>239 | 25.10.06 | Sol<br>50/ 0 m/s –<br>240/ 0,5 m/s | MAS-100 | 10 | 65 | 26 | | 26 | Lspp | *L. bozemanni*<br>*L. pneumophila*<br>*L. oakridgensis* |
| 257<br>263 | 16.11.06 | Regn<br>180 / 4 m/s | SASS 2000 | 1 | 0 | 35 | + | 1,7 | Lspp | |
| 256<br>262 | 16.11.06 | Regn<br>180 / 4 m/s | SASS 2000 | 7 | 55 | 26 | + | 1,7 | Lspp | |
| 258<br>264 | 16.11.06 | Regn<br>180 / 4 m/s | SASS 2000 | 16 | 105 | 45 | + | 0,5 | Lspp | |
| 255 | 16.11.06 | Regn | SASS 2000 | 15 | 140 | 28 | - | Ikke påvist | <56 | |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 261 | | 180 / 4 m/s | | | | | | | | |
| 254<br>260 | 16.11.06 | Regn<br>180 / 4 m/s | SASS 2000 | 14 | 180 | 26 | - | Ikke påvist | <56 | |
| 259<br>265 | 16.11.06 | Regn<br>180 / 4 m/s | SASS 2000 | 17 | 300 | 25 | - | Ikke påvist | <440 | |
| 275<br>274 | 16.11.06 | Regn<br>180 / 4 m/s | MAS-100 | 1 | 0 | 35 | | 10 | Lspp | |
| 269<br>268 | 16.11.06 | Regn<br>180 / 4 m/s | MAS-100 | 7 | 55 | 26 | | Ikke påvist | <1 | *L. pneumophila* |
| 273<br>272 | 16.11.06 | Regn<br>180 / 4 m/s | MAS-100 | 16 | 105 | 45 | | Ikke påvist | <1 | Ikke påvist |
| 267<br>266 | 16.11.06 | Regn<br>180 / 4 m/s | MAS-100 | 14 | 180 | 26 | | Ikke påvist | <1 | Ikke påvist |
| 271<br>270 | 16.11.06 | Regn<br>180 / 4 m/s | MAS-100 | 15 | 140 | 28 | | Ikke påvist | <1 | Ikke påvist |
| 277<br>276 | 16.11.06 | Regn<br>180 / 4 m/s | MAS-100 | 17 | 300 | 25 | | Ikke påvist | <1 | Ikke påvist |
| 297<br>303 | 22.11.06 | Skiftende, Regn<br>130 / 2,5 m/s | SASS 2000 | 2 | 0 | 35 | + | 440 | Lspp – 2 ulike | |
| 296<br>300 | 22.11.06 | Skiftende, Regn<br>130 / 2,5 m/s | SASS 2000 | 18 | 150 | 26 | - | 2 | Lspp – 2 ulike | |
| 295<br>301 | 22.11.06 | Skiftende, Regn<br>130 / 2,5 m/s | SASS 2000 | 19 | 45 | 26 | + | 24 | Lspp – 2 ulike | |
| 294<br>302 | 22.11.06 | Skiftende, Regn<br>130 / 2,5 m/s | SASS 2000 | 20 | 50 | 47,5 | - | 30 | Lspp – 2 ulike | |
| 298<br>304 | 22.11.06 | Skiftende, Regn<br>130 / 2,5 m/s | SASS 2000 | 21 | 50 | 33,8 | + | 197 | Lspp – 2 ulike | |
| 299<br>305 | 22.11.06 | Skiftende, Regn<br>130 / 2,5 m/s | SASS 2000 | 22 | 60 | 50 | + | 4 | Lspp – 2 ulike | |
| 312<br>313 | 22.11.06 | Skiftende, Regn<br>130 / 2,5 m/s | MAS-100 | 2 | 0 | 35 | | 45 | Lspp | Ikke påvist |
| 306<br>307 | 22.11.06 | Skiftende, Regn<br>130 / 2,5 m/s | MAS-100 | 18 | 150 | 26 | | 22 | Lspp – 2 ulike | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum*<br>*L. oakridgensis* |
| 310<br>311 | 22.11.06 | Skiftende, Regn<br>130 / 2,5 m/s | MAS-100 | 19 | 45 | 26 | | 70 | Lspp | *L. pneumophila*<br>*L. londiniensis/*<br>*L. nautarum*<br>*L. oakridgensis* |
| 308<br>309 | 22.11.06 | Skiftende, Regn<br>130 / 2,5 m/s | MAS-100 | 20 | 50 | 47,5 | | 34 | Lspp | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum*<br>*L. oakridgensis*[k] |
| 314<br>315 | 22.11.06 | Skiftende, Regn<br>130 / 2,5 m/s | MAS-100 | 21 | 50 | 33,8 | | 48 | Lspp | *L. pneumophila*<br>*L. londiniensis/*<br>*L. nautarum*<br>*L. oakridgensis* |

| | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 316<br>317 | 22.11.06 | Skiftende, Regn<br>130 / 2,5 m/s | MAS-100 | 22 | 60 | 50 | | 10 | Lspp | *L. pneumophila*<br>*L. oakridgensis*[l] |
| 332<br>338 | 29.11.06 | Sol, overskyet<br>230 / 5 m/s | SASS 2000 | 3 | 0 | 36,5 | + | 93 | Lspp – 2 ulike | |
| 333<br>339 | 29.11.06 | Sol, overskyet<br>230 / 5 m/s | SASS 2000 | 25 | 160 | 64 | + | Ikke påvist | <0,8 | |
| 329<br>335 | 29.11.06 | Sol, overskyet<br>230 / 5 m/s | SASS 2000 | 24 | 150 | 40,7 | - | 0,9 | Lspp | |
| 331<br>337 | 29.11.06 | Sol, overskyet<br>230 / 5 m/s | SASS 2000 | 15 | 140 | 28 | - | 2,7 | Lspp | |
| 346<br>347 | 29.11.06 | Sol, overskyet<br>230 / 5 m/s | MAS-100 | 3 | 0 | 36,5 | | 4,6 | Lspp | *L. pneumophila*<br>*L. londiniensis/*<br>*L. nautarum* |
| 340<br>341 | 29.11.06 | Sol, overskyet<br>230 / 5 m/s | MAS-100 | 15 | 140 | 28 | | 2 | Lspp | *L. pneumophila* |
| 348<br>349 | 29.11.06 | Sol, overskyet<br>230 / 5 m/s | MAS-100 | 25 | 160 | 64 | | Ikke påvist | <1 | Ikke påvist |
| 344<br>345 | 29.11.06 | Sol, overskyet<br>230 / 5 m/s | MAS-100 | 24 | 150 | 40,7 | | 2 | Lspp | Ikke påvist |
| 342<br>343 | 29.11.06 | Sol, overskyet<br>230 / 5 m/s | MAS-100 | 23 | 200 | 27 | | Ikke påvist | <1 | *L. pneumophila* |
| 366<br>372 | 05.12.06 | Regn<br>180 / 3,8 m/s | SASS 2000 | 1 | 0 | 35 | + | 79 | Lspp – ≥2 ulike | |
| 367<br>373 | 05.12.06 | Regn<br>180 / 3,8 m/s | SASS 2000 | 20 | 50 | 47,5 | + | 7,2 | Lspp | |
| 363<br>369 | 05.12.06 | Regn<br>180 / 3,8 m/s | SASS 2000 | 14 | 180 | 26 | + | 43 | Lspp – ≥2 ulike | |
| 364<br>370 | 05.12.06 | Regn<br>180 / 3,8 m/s | SASS 2000 | 26 | 145 | 37 | - | 6,3 | Lspp – 2 ulike | |
| 380<br>381 | 05.12.06 | Regn<br>180 / 3,8 m/s | MAS-100 | 1 | 0 | 35 | | 30 | Lspp – 2 ulike | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum* |
| 382<br>383 | 05.12.06 | Regn<br>180 / 3,8 m/s | MAS-100 | 20 | 50 | 47,5 | | 5 | Lspp | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum* |
| 376<br>377 | 05.12.06 | Regn<br>180 / 3,8 m/s | MAS-100 | 14 | 180 | 26 | | 5 | Lspp | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum*[m] |
| 374<br>375 | 05.12.06 | Regn<br>180 / 3,8 m/s | MAS-100 | 26 | 145 | 37 | | 3 | Lspp | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum* |
| 384<br>385 | 05.12.06 | Regn<br>180 / 3,8 m/s | MAS-100 | 7 | 55 | 26 | | 3 | Lspp – 2 ulike | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum* |

[a] Prøvenummer henviser til nummer på prøven gitt i journalen (journalnummer) for prøvetaking ved Borregaard.

[b] Kartreferansen er i henhold til figur 4.3.

[c] Avstand er beregnet fra nærmeste luftebasseng til målepunkt. Luftebassengene er definert som avstand 0 m.

[d] Real-time PCR er utført ved FFI og beskrevet i detalj i Blatny et al. (2007).

[e] Telelab AS har utført dyrking og morfologisk analyse. Dette er beskrevet i Wierød et al. (2007).

cfu; colony forming units

Lspp; *Legionella* spp.

7P; en gruppe på syv patogene *Legionella* arter (*L. longbeachae, L.bozemanii, L. dumoffii, L. germanii, L. jordanis, L. micdadei* og *L. anisa*)

Der hvor Folkehelseinstituttet (FHI) har identifisert Lspp fra Telelab AS som *L. pneumophila* er dette notert som "FHI : Lspp = *L. pneumophila*".

[f] Folkehelseinstituttet har utført DNA-sekvensering av 16S rRNA-genfragmentet fra luftprøver innsamlet med MAS-100 og STA-204. DNA-identiteten er 100% hvor *L. pneumophila* ble identifisert, 98-99% for *L. bozemanii,* 99% for *L. oakridgensis*, 99% for *L. londiniensis/L. nautarum.* 16S rRNA-sekvensering differensierer ikke mellom *L. londiniensis* og *L. nautarum*. Dette er beskrevet i Caugant et al. (2007).

[g] Forhold *L. bozemanii* og *L. pneumophila* 3:1.

[h] Forhold *L. pneumophila* og *L. bozemanii* 1:1.

[i] Feil med utstyr.

[j] For 25.10.2006 var det lite vind/ingen vind og vinden skiftet retning under prøvetaking. Mellom kl 10.30 – 14.00 ble det observert en endring i vindforholdene fra 50 deg / 0 m/s – 70 deg / 0 m/s – 100 deg / 0 m/s – 240 deg / 0 m/s - 240 deg / 0, 5 m/s.

[k] *Kartchner Caverns bacterium PF-H* (99%) ble identifisert i prøve 309 av Folkehelseinstituttet.

[l] *Rahnella aquatilis* (99% ) ble identifisert i prøve 317 av Folkehelseinstituttet.

[m] *Pseudomonas* spp. ble identifisert i prøve 377 av Folkehelseinstituttet.

## 4.2 Analyse av luftprøver

Real-time PCR ble benyttet for å analysere tilstedeværelsen av *L. pneumophila* i luftprøver innsamlet med SASS 2000 PLUS ved hjelp av et spesifikt *mip* primer-probe sett. Det ble også benyttet et 16S RNA-primere/probe sett for påvisning av *Legionella* spp. (kap. 3.6). Alle 16S rRNA real-time PCR-resultatene var positive. Derfor er kun resultatene for *mip* real-time PCR vist i tabell 4.1. Luftprøver innsamlet direkte på agarskål (STA-204 og MAS-100) og som viste vekst av *Legionella*- mistenkte kolonier ble videre analysert ved DNA-sekvensering av en gitt region av 16S rRNA-genet (kap. 3.7) samt ved bruk av MLST på seks genfragmenter, inklusiv *mip*-genet (kap. 3.8). Resultatene fra artsbestemmelsen og genotypingen, samt dyrkingsanalysene fra alle luftprøvene er vist i tabell 4.1.

**Vekst av *Legionella* spp. og real-time PCR**

Fra 1 til ca. 600 legionellakolonier vokste opp på de selektive agarskålene. Det ble observert vekst av muggsopp i enkelte prøver. En eller flere *Legionella* spp. har vært isolert fra alle prøvedatoer hvor følgende arter (nært beslektede bakterier) ble identifisert: *L. bozemanii, L. pneumophila, L. dumoffi, L. oakridgensis,* og *L. londoniensis/L. nautarum*[12] (tabell 4.1). Det er sannsynlig at flere ulike *L. bozemanii*-stammer var tilstede, fordi det ble funnet noe variasjon i 16S rRNA-gensekvensene mellom isolatene.

*mip* ble identifisert i 23 av 34 SASS 2000 PLUS luftprøver (67 %), til og med i en avstand på 180 m fra luftebassengene (tabell 4.1, figur 4.4 og vedlegg 9.1). *mip*-positive luftprøver korrelerte i de fleste tilfellene med observasjon av vekst av *Legionella* spp. (fra tilsvarende parallell-alikvot) på selektive agarskåler. Real-time PCR kan detektere både levende og døde bakterieceller da det er DNA som detekteres. Det er nødvendig med dyrking for å identifisere levende legionellabakterier.

*mip*-positive analyser påviste forekomst av *mip*-holdige *Legionella*-arter (inklusiv *L. pneumophila*) i to prøver (prøvenr. 120 og 333) hvor det ikke ble påvist vekst av *Legionella* spp. (tabell 4.1). Det ble ikke påvist vekst av *Legionella* spp. i den korresponderende MAS-100 prøven (prøvenr. 348/349) til den negative *mip*-luftprøven (prøvenr. 333). Dette kan indikere at real-time PCR, i dette tilfellet, har påvist ikke-dyrkbare eller døde *mip*-holdige legionellabakterier. For prøvenr. 120 med SASS 2000PLUS, viste den korresponderende STA-204-prøven (prøvenr. 126/129, 21.09.2006) vekst av Lspp, *L. pneumophila* og *L. bozemannii*. Prøvetakingen med SASS 2000PLUS, STA-204 og MAS-100 en uke før, dvs. 11.09.2006, ved samme kartreferanse, viste både positive *mip*-resultater og vekst av *L. pneumophila*.

Totalt ble *mip* ikke påvist i fem luftprøver som allikevel viste vekst av *Legionella* spp. (tabell 4.2). *L. pneumophila* ble kun identifisert ved dyrking i én av disse prøvene (prøvenr. 165). Da *L. londiniensis/L. nautarum* og *L. oakridgensis* ikke innholder *mip* DNA, viser resultatene at det er

[12] *L. londoniensis* og *L. nautarum* kan ikke differensieres ved DNA-sekvensering av 16S rRNA-genet.

god korrelasjon mellom bruk av *mip* for spesifikk deteksjon ved real-time PCR av *L. pneumophila*-DNA og dyrkingsanalyser.

Resultatene fra denne studien viser at *mip* real-time PCR er et velegnet analyseverktøy for påvisning av *L. pneumophila* og evt. andre *mip*-holdige *Legionella*-arter i luft, samt at SASS 2000$^{PLUS}$ ikke dreper legionellabakteriene ved prøvetaking.

Tabell 4.2. Korrelasjon mellom *mip*- negative real-time PCR resultater og vekst av ikke-*mip* holdige *Legionella* arter.

| **Prøvenr. (tabell 4.1)** | **cfu/m$^3$** | **Avstand (m)** | **Kart ref. (figur 4.3)** | **PCR *mip*** | ***Legionella*-art SASS 2000$^{PLUS}$** | ***Legionella*-art MAS-100** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| 165/168/169/170 | 300 | 145 | 11 | - | Lspp[a]<br>*L. pneumophila* | Ikke påvist |
| 224/226/232/233 | 0,4 | 145 | 11 | - | Lspp | Ikke påvist |
| 296/300/306/307 | 2 | 150 | 18 | - | Lspp | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum*<br>*L. oakridgensis* |
| 294/302/308/309 | 30 | 50 | 20 | - | Lspp | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum*<br>*L. oakridgensis* |
| 364/370/374/375 | 6,3 | 145 | 26 | - | Lspp | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum* |

[a] Lspp; *Legionella* spp.

**MLST**

MLST-analyse av seks ulike genfragmenter fra 16 representative *L. pneumophila*-isolater ble gjennomført. Analysene viste at alle 16 isolatene, som ble valgt for å dekke hele prøvetakingsperioden, hadde samme sekvenstype. De isolerte *L. pneumophila*-koloniene ble identifisert i luftprøvene innsamlet med MAS-100 og STA-204 i perioden 11.09.2006 – 05.12.2006. Resultatene indikerer foreløpig at en ny (ikke-tidligere identifisert) stamme av *L. pneumophila* er blitt identifisert ved Borregaard. Den tilhører en sekvenstype som ikke har vært identifisert i Norge tidligere.

**Serogruppebestemmelse**

Serogrupping ble utført på alle *L. pneumophila*-kolonier som ble identifisert. Hverken serogruppe 1 eller 2-14 ble identifisert ved den benyttede latex agglutinasjonstest-metoden (kap. 3.6). Dette ble bekreftet ved analyser utført både hos Telelab AS og Folkehelseinstituttet. Resultatene indikerer at den påviste *L. pneumophila*-stammen kan tilhøre en annen serogruppe eller evt. at testen for serogrupping ikke er sensitiv nok.

**Årstidsvariasjon**

Tabell 4.1 tyder på at forekomsten av *Legionella*-arter endres med årstiden. Ulike *Legionella* arter i luft, innsamlet på vekstagarskål med MAS-100 og STA-204, ble identifisert ved DNA-sekvensering av et 16S rRNA-genfragment (kap. 3.7). *L. bozemanii* og *L. pneumophila* ble i hovedsak påvist i første del av prøvetakingsperioden frem til 18.10.2006. I tillegg ble *L. oakridgensis* og *L. dumoffii* påvist i prøvene innsamlet i perioden 18.10.2006 – 22.11.2006, mens *L. londiniensi/L. nautarum* ble påvist i perioden 22.11.2006 – 05.12.2006[13]. Både *L. bozemanii* og *L. dumoffii* er sykdomsfremkallende og tilhører gruppen "de 7 patogene *Legionella*-artene" som Telelab AS benytter i kategoriseringen av analyseresultatene under påvisning av *Legionella* spp. (Wierød et al., 2007).

Observasjonene i denne studien kan tyde på at det har vært en endring i sammensetningen av *Legionella*-arter i luft i denne tidsperioden. Dersom disse *Legionella*-artene er tilstede i luftebassengene, kan observasjonen reflektere en endring i den mikrobielle sammensetningen i luftebassengene i denne tidsperioden. Det kan ikke utelukkes at forholdene for overlevelsesevnen til legionellabakterien i aerosolpartikler endres over tid.

**Værforhold**

*L. pneumophila* ble identifisert under ulike værforhold (overskyet, regn, sol). Prøve 339, 341 og 347, viste positive *mip*-resultater og vekst av *L. pneumophila* på agarskål ved et av målepunktene lengst unna luftebassengene. Dette kan tyde på at sol (UV-stråling) ikke nødvendigvis fører til at legionellabakteriene dør. Det kan ikke utelukkes at en høy konsentrasjon av aerosolpartikler med legionellabakterier reduserer en evt. effekt av UV-stråling. En høy bakteriekonsentrasjon i utgangspunktet kan trolig motvirke dreping av legionellabakterier ved tørking og UV-stråling, slik at sjansen for å finne overlevende bakterieceller er større enn ved lavere bakteriekonsentrasjon under ellers like forhold.

**Konsentrasjon av legionellabakterier i luft**

Resultatene viser at konsentrasjonen av legionellabakterier var høyest over luftebassengene (kartreferanse 1, 2 og 3, figur. 4.3). Den høyeste og laveste konsentrasjonen som ble målt ved denne kartreferansen var henholdsvis 3300 cfu/$m^3$ ved overskyet vær (prøvenr. 164/167) og 1,7 cfu/$m^3$ ved regn (prøvenr. 257/263). Den nest laveste konsentrasjonen (4,6 cfu/$m^3$) ble funnet ved sol/overskyet vær (prøvenr. 346/347). Dette kan indikere at overskyet vær har en positiv effekt på en spredning av aerosolpartikler som inneholder legionellabakterier fra luftebassengene. Resultater som beskriver spredning av legionellabakterier som funksjon av avstand fra luftebassengene er beskrevet i kap. 4.3.

[13] *L. pneumophila, L. londoniensis/L. nautarum* hadde også blitt identifisert i et forprosjekt, 13.6.2006 – 11.09.2006.

**Oppsummering**

Denne studien viser at de benyttede prøvetakings- og analysemetodene er velegnet for oppsamling og påvisning av *Legionella* spp.. *L. pneumophila* har blitt identifisert i luft ved Borregaards biorenseanlegg. Den isolerte *L. pneumophila* klonen tilhører hverken serogruppe 1 eller 2-14, og MLST-studier viser at alle *L. pneumophila* isolatene tilhører samme genetiske klon.

## 4.3 Spredning av *Legionella* spp. i luft

**Spredning som funksjon av avstand**

En grafisk fremstilling av spredningen av legionellabakterier som funksjon av avstand fra luftebassengene er gitt i figur 4.4. De tilhørende måle- og analyseverdiene for påvisning av *Legionella* spp. og *L. pneumophila* i luft som funksjon av avstand fra luftebassengene er i vedlegg 9.1. Avstandsmålingene er delt inn i fem regioner:

| | |
|---|---|
| region I | 0 m |
| region II | 45-75 m |
| region III | 75-105 m |
| region IV | 105-200 m |
| region V | 200-300 m |

*Legionella* spp., inklusiv *L. pneumophila*, ble påvist i alle regionene, unntatt region V.

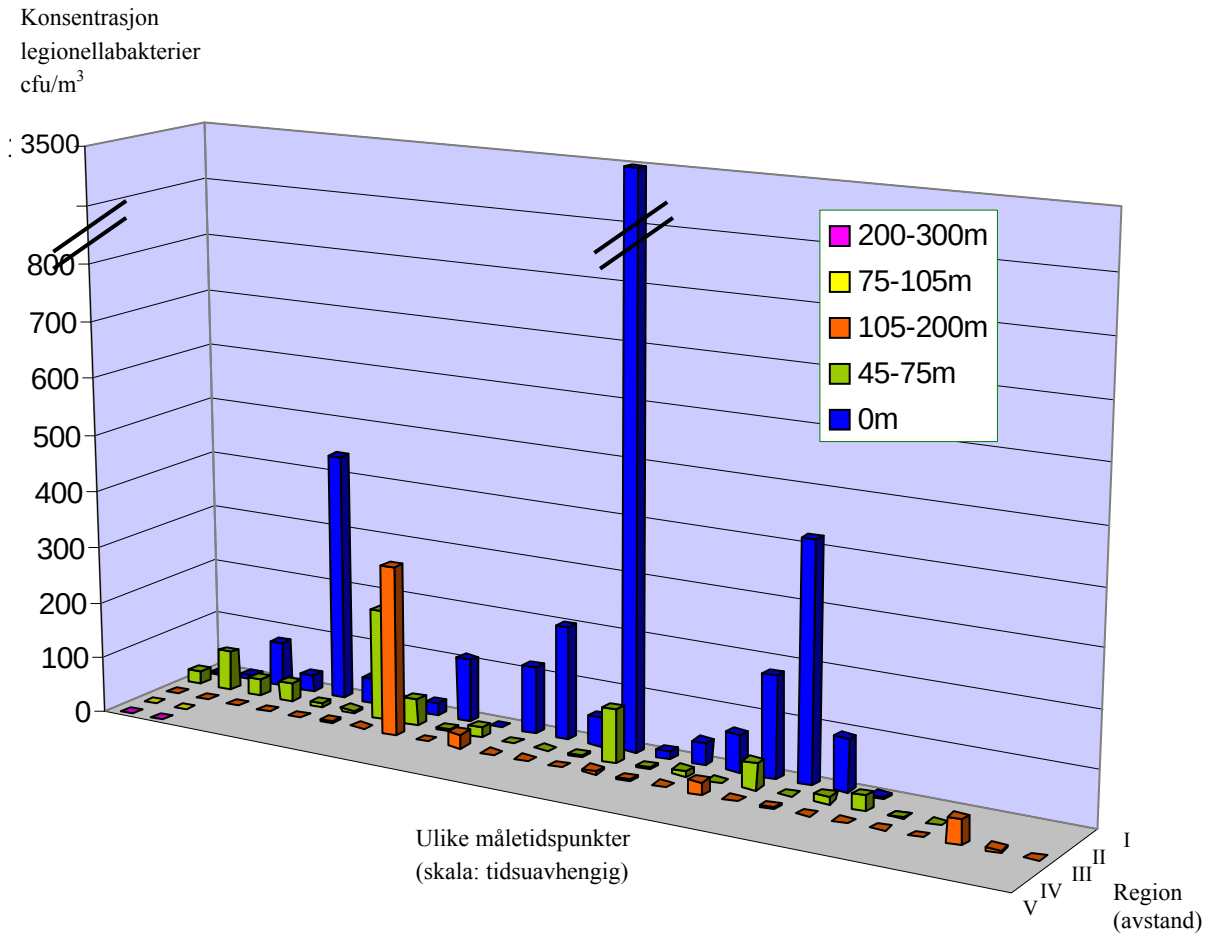
En generell observasjon var en reduksjon av antall dyrkbare legionellabakterier (cfu/$m^3$) med økende avstand fra luftebassengene. Det høyeste antallet av legionellabakterier (3300 cfu/$m^3$) ble observert rett over luftebassengene, som forventet. En generell observasjon var at en konsentrasjon på mer enn 100 cfu/$m^3$ ble funnet rett over luftebassengene (region I, kartreferanse 1, 2 og 3, figur 4.3). Dette inkluderte totalt åtte luftprøver (100 – 3300 cfu/m3). Kun én prøve utenfor denne kartreferansen, (prøvenr. 165/168, kartreferanse 11, region IV) viste en konsentrasjon på mer enn 100 cfu/$m^3$ (300 cfu/$m^3$). Totalt ti prøver viste en konsentrasjon på mellom 40 – 100 cfu/$m^3$. Alle ti prøvene, unntatt luftprøven 363/369 (region IV), tilhørte region I eller II.

*L. pneumophila mip* ble påvist med real-time PCR 180 m fra luftebassengene (prøvenr. 369), samt ved dyrking og artsbestemmelse 200 m fra luftebassengene (prøvenr. 343). Prøvenr. 265, 300 m fra luftebassengene, ble identifisert som *mip*-negativ. Denne, og den korresponderende MAS-100 prøven, viste allikevel vekst av *Legionella* spp., men *L. pneumophila* ble ikke identifisert. Det var totalt ti prøver som ble identifisert som *mip*-negative i en avstand på mindre enn 180 m (prøvenr. 168, 224, 225, 260, 261, 300, 302, 335, 337, 370), og det var kun to av disse prøvene (168 og 337) som viste vekst av henholdsvis *L. pneumophila* og *Legionella* spp.

**Spredning som funksjon av høyden**

Tabell 4.1 viser at *Legionella* spp., inklusiv *L. pneumophila*, *L. bozemanii*, *L.dumoffii*, *L. nautarum*, *L. oakridgensis*, og *L. londiniensis* ble identifisert i alle høydenivåer testet. Prøvetakingene ble utført i ulike høyder mellom 25 og 64 m.o.h (tabell 4.1). *mip* ble også detektert ved det høyeste målepunktet, kartreferanse 25, 64 m.o.h.

Utfordringen ved prøvetakingen i høyden, var tilgjengeligheten til tak/avsatser på enkelte bygninger.




Figur 4.4. Konsentrasjon av legionellabakterier som funksjon av avstand (m) fra luftebassengene ved biorenseanlegget til Borregaard (spredning). Verdiene er hentet fra vedlegg 9.1. Region I : 0 m, region II : 45-75 m, region III : 75-105 m, region IV : 105-200 m og region V : 200-300 m. Merk at den høyeste konsentrasjonen av legionellabakterier målt er 3300 cfu/m$^3$ (tabell 4.3).

# 5 Konklusjon

Resultatene fra denne studien i tidsperioden 11.09.2006-05.12.2006 viser at

- ✓ det benyttede forsøksoppsettet, bruk av CFD-modeller og de metodene for luftprøvetaking og analyse av luftprøvene (dyrking, serogrupping, genotyping og real-time PCR) er velegnet til å identifisere *Legionella* spp., og *L. pneumophil*a, i luft

- ✓ *L. pneumophila* serogruppe 1 er ikke identifisert i luft ved Borregaard

- ✓ en *L. pneumophila*-variant som sannsynligvis ikke tilhører hverken serogruppe 1 eller 2-14 er identifisert ved Borregaard

- ✓ det er identifisert samme genetiske klon av *L. pneumophila* blant samtlige *L-pneumophila*-isolater fra luftprøvene innsamlet med MAS-100 og STA-204 i perioden

- ✓ *Legionella* spp. er identifisert opp til 200 m fra luftebassengene

- ✓ konsentrasjonen av legionellabakterier er høyest over luftebassengene og avtar som funksjon av avstand fra luftebassengene

- ✓ fremskaffelse av enkeltisolater av *Legionella* spp. gir mulighet for artsbestemmelse, serotyping og klonalitetsanalyser som er nødvendig for epidemiologisk kartlegging og risikoanalyser

# 6 Diskusjon

Denne rapporten beskriver et samarbeidsprosjekt mellom FFI, Folkehelseinstituttet, Telelab AS, og Borregaard for å analysere om det er mulig å påvise *Legionella* spp. i luft og om legionellabakterier kan spres i luft. Resultatene fra dette prosjektet har vist at det benyttede forsøksoppsettet og målemetodene har vært velegnet til å identifisere ulike *Legionella*-arter i luft, inklusiv *L. pneumophila*.

Minst 49 *Legionella*-arter (*Legionella* spp.) er kjent fra litteraturen, hvorav 19 arter kan føre til infeksjoner hos mennesker (Cianciotto et al., 2006). Den mest kjente arten er *L. pneumophila*. *L. pneumophila* serogruppe 1, 4 og 6 er de tre serogruppene, av totalt 16, som kan forårsake legionærsykdom.

Smittskyddsinstitutet, Sverige, utførte analyser av innholdet i luftebassengene ved biorenseanlegget til Borregaard i november/desember 2005. Analysene viste tilstedeværelse av *L. pneumophila* serogruppe 1 i sedimenteringstanken ved Borregaard. Dette isolatet er ikke identisk, men nært beslektet, med bakterieisolatene fra pasientene og scrubberanlegget ved Borregaard fra *Legionella*-utbruddet i mai 2005. Flere av de andre serogruppene av *L. pneumophila* ble også påvist i biorenseanlegget. Smittekilden for de tre tilfellene av sykdom forårsaket av *L. pneumophila* serogruppe 1 i Sarpsborg/Fredrikstad-området i november 2005 er ikke avklart. Det kan ikke utelukkes at det finnes andre smittekilder for legionellosetilfellene.

Det er blitt påvist legionellabakterier ved flere biologiske renseanlegg tilknyttet ulike typer industrianlegg i Norden. Det pågår studier i Sverige og Finland for å kartlegge tilstedeværelsen av legionellabakterier i slike anlegg, samt å studere en evt. variasjon i konsentrasjonen av legionellabakterier i luftebassenger. Borregaard deltar i slike analyser som gjøres i regi av Skogindustrierna i Sverige. Dette prosjektet, både fremgangsmetoden og resultatene, er derfor av stor interesse og betydning for pågående studier i Sverige. Det utførte arbeidet beskrevet i denne rapporten er unikt med hensyn til en helhetlig analysemetode ved bruk av en CFD-modell, valg av luftprøvetakingsutstyr og en systematisk identifiseringsmetode med utvalgte dyrkingsbetingelser og genetiske markører for real-time PCR, artsbestemmelse og genotyping (MLST).

I denne studien ble det forutsatt at *Legionella* spp. som påvises i luft reflekterer det som er i luftebassengene. I tillegg til påvisning av *L. pneumophila*, ble andre *Legionella* spp. funnet, bl. a. *L. bozemanii* og *L. dumoffii* (tabell 4.1) som begge kan forårsake infeksjoner hos mennesker. Begge artene tilhører gruppen "de 7 patogene" som Telelab AS benytter under sine analyser (se fotnote [e] tabell 4.1.). Resultatene fra denne studien viste at en *L. pneumophila*-variant som sannsynligvis ikke tilhører serogruppe 1-14 er blitt identifisert fra luftprøvene ved Borregaard. Det er ikke kjent om denne stammen er humanpatogen, men den tilhører sannsynligvis ikke serogruppe 1, 4 eller 6. Isolatene av *L. pneumophila*, som alle tilhører samme klon, kunne ikke serogruppes med reagensene som ble benyttet i denne studien. Dette kan skyldes at stammen ikke

hører til serogruppe 1-14, at den ikke er serogruppbar, eller at den kan tilhøre en ubeskrevet serogruppe. Ett slikt isolat er undersøkt ved Health Protection Agency (HPA)[14], England, og funnet å være serogruppe 4 (Wierød et al., 2007). Videre undersøkelse av stammene er nødvendig og planlagt.

Identifisering av *Legionella* spp. og *L. pneumophila* i denne studien har inkludert flere analysemetoder. Real-time PCR påviser DNA fra både levende og døde bakterieceller, og er velegnet til å gi en rask indikasjon om tilstedeværelsen av en gitt bakterieart. I tillegg er det nødvendig med dyrking for å identifisere tilstedeværelse av levende bakterieceller. I dette arbeidet er det vist at amplifisering av *L. pneumophila mip*-fragmentet ved real-time PCR korrelerte med vekst av *L. pneumophila* i 67 % av luftprøvene innsamlet med SASS 2000$^{PLUS}$ (kap. 4.2, tabell 4.2). Nøyaktig kartlegging av art og stamme innen legionellaslekten i luftprøven krever dyrking av bakteriene.

Resultatene indikerer at det trolig skjedde en endring av *Legionella* spp. i luften, da ulike arter ble påvist i slutten enn ved starten av prøvetakingsperioden (tabell 4.1, kap. 4.2 og 4.3). Dette kan reflektere en endring i den mikrobielle sammensetningen i luftebassengene i dette tidsrommet. Det ble identifisert ikke-patogene *Legionella* spp. (*L. londiniensis/L. nautarum*) i slutten av november og desember. Det kan ikke utelukkes at årsaken til denne observasjonen skyldtes en endring av de kjemiske forholdene i luftbassengene, eller at værforholdene har ført til en forandring i sammensetningen av *Legionella* spp. i luft. Resultatene oppnådd i denne studien kan tyde på at overskyet vær bidrar til en økt spredning av aerosolpartikler over luftebassengene. I denne studien ble forsøkene utført, så langt som mulig, under de samme værforholdene som *Legionella*-utbruddet i mai 2005 dvs. overskyet vær med høy luftfuktighet.

Oppstrømsprøvene viste generelt ingen vekst av legionellaarter på agarskåler og var *mip*-negative. Konsentrasjonen av legionellabakterier var høyest over luftebassengene og avtok som funksjon av avstand fra luftebassengene (figur 4.4, vedlegg 9.1). Dette indikerer at *L. pneumophila* påvist i luften ved Borregaards biorenseanlegg har opphav fra luftebassengene.

Denne studien har vist at bruken av CFD-modeller, luftprøvetaking med SASS 2000$^{PLUS}$ og en kombinasjon av flere analysemetoder inkludert dyrking, serogruppebestemmelse, real-time PCR, artsbestemmelse og genotyping har fungert meget godt til å identifisere ulike legionellarter, samt *L. pneumophila,* i luft nær luftebassengene ved biorenseanlegget til Borregaard.

[14]www.hpa.org.uk

# 7 Videre arbeid

Denne studien har beskrevet luftprøvetaking og analyse av luftprøver for tilstedeværelse av *Legionella* spp. ved hjelp av molekylærbiologiske og mikrobiologiske metoder. Det eksperimentelle arbeidet ble systematisk utført i tidsperioden 11.09.2006 – 05.12.2006. Minst åtte uker ble benyttet før 11.09.06 for å vurdere ulike forsøksoppsett og prøvemålinger. De oppnådde resultatene er derfor basert på forstudier, litteraturstudier og løpende diskusjoner blant samarbeidsaktørene og representantene i styringskomitéen.

Resultatene fra denne studien viser at legionellabakterier kan spres fra luftebassengene til luft og at det har blitt identifisert en *L. pneumophila*-klon som sannsynligvis ikke tilhører serogruppe 1-14. For å kunne verifisere at stammen av *L. pneumophila* identifisert i luft er tilstede i luftebassengene, må legionellabakteriene funnet i luftebassengene types ved bruk av blant annet MLST. Det er av interesse å utføre flere detaljerte analyserer av den identifiserte *L. pneumophila* stammen, som foreløpig representerer en ny bakteriestamme.

For å kunne gjøre en statistisk analyse og systematisk vurdere hvordan værforhold, årstidsvariasjon, målepunkter for prøvetaking etc. kan influere på spredning av legionellabakterier i luft, er det nødvendig å videreføre arbeidet ved å inkludere flere målepunkter med hensyn til både ulik avstand og høyde, bruk av flere prøvetakingsinstrumenter, flere parallelle målinger og prøvetaking over tid.

Folkehelseinstituttet har et pågående studium for å analysere om de ansatte ved Borregaard har et høyere innhold av antistoffer mot *Legionella* i forhold til befolkningen ved Oslo som ikke har vært eksponert for et *Legionella*-utbrudd. Resultatene av dette prosjektet vil foreligge i løpet av 2007.

# 8 Referanser


Blatny, J. M., Skogan, G., Reif, B. A. P., Andreassen, Ø., Thomassen, G. M. B., Aarskaug, T., Fykse, E. M., and Olsen, J. S. 2007. Sampling and identification of *Legionella* spp. at Borregaard. FFI Report 00643.

Boom, R., C. J. A. Sol, E. M. M. Salimans, C. L. Hansen, P. M. E. Wertheim-van Dillen, and J. van der Norordaa. 1990. Rapid and simple method for the purification of nucleic acids. J. Clin. Microbiol. 28:495-503.

Caugant, D. A, Høiby, E. A., Aaberge, I. S, Oseberg Rønning, J., Klem, A. M., Fritzsønn, E. 2007. Rapport fra Nasjonalt folkehelseinstitutt.

Cianciotto, N. P., Kwaik, Y. A., Edelstein, P. H., Fields, B. S., Geary, D. F., Harrison, T. G., Joseph, C. A., Ratcliff, R. M., Stout, J. E., and Swanson, M. S. 2006. *Legionella*: State of the art 30 years after its recognition. ASM Press, Washington, DC.

Durbin P.A., and Pettersson Reif, B. A. 2001. Statistical theory and modeling for turbulent flows. John Wiley and Sons Ltd. ISBN:0471497444

Fields, B. S., Benson, R F., and Besser, R. E. 2002. *Legionella* and Legionnaires' disease: 25 years of investigation. Clin. Microbiol. Rev. 15:506-526.

Gaia, V., Fry, N. K., Afshar, B., Lück, P. C., Meugnier, H., Etienne, J., Peduzzi, R., and Harrison, T.G. Consensus Sequence-Based Scheme for Epidemiological Typing of Clinical and Environmental Isolates of *Legionella pneumophila*. J. Clin. Microbiol. 43:2047-2052.

Hurst, C.J. 2002. Manual of Environmental microbiology, ASM Press, 2nd ed.

Ishimatsu, S., Miyamoto, H., Hori, H., Tanaka, I., and Yoshida, S. 2000. Sampling and detection of *Legionella pneumophila* aerosols generated from an industrial cooling tower. Am. Occup. Hyg. 45:421-427.

Maiden, M. C. J., Bygraves, J.A., Feil, E., Morelli, G., Russel, J. E., Urwin, R., Zhang, Q., Zhou, J., Zurth, K., Caugant, D.A., Feavers, I.M., Achtman, M., and Spratt, B.G. 1998. Multilocus sequence typing: A portable approach to the identification of clones within populations of pathogenic microorganisms. PNAS USA 95:3140-3145.

Nguyen, T. M. N., Ilef, D., Jarraud, S., Rouil, L., Campese, C., Che, D., Haeghebaert, S., Ganiayre, F., Marcel, F., Etienne, J., and Desenclos, J. 2006. A community-wide outbreak of Legionnaaires disease linked to industrial clloing towers – How far can contaminated aerosols spread? J. Infect. Dis. 193:102-111.

Pascual, L., Pérez-Luz, S., Amo, A., Moreno, C., Apraiz, D., and Catalán, V. Detection of *Legionella pneumophila* in bioaerosols by polymerase chain reaction. Can. J. Microbiol. 47:341-347.

Pasculle, A. W. 1992. The genus *Legionella*. *In* The Procaryotes, 2nd edition. A handbook on the biology of bacteria: Ecophysiology, Isololation, Identification, Applications. Vol. IV. (Ed. Balows, A., Trüper, H.G., Dworkin M., Haredr, W., and Schleifer, K. Springer-Verlag, New York.

Rantakokko-Jalava, K., and Jalava, J. 2001. Development of conventional and real-time PCR assays for detection of *Legionella* DNA in respiratory specimens. J. Clin. Microbiol. 39:2904-2910.

Wellinghausen, N., Frost, C., and Marre, R. 2001. Detection of Legionellae in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR. Appl. Environ. Microbiol. 67:3985-3993.

Wierød, T. B., Nysæter, Å., and Ask, E. 2007. Påvisning av *Legionella* spp. i luft ved Borregaard, Oppsummering av resultater av analyser utført ved as Telelab juni-desember 2006. as Telelab.

Valheim, M., Djønne, B., Heiene, R., and Caugant, D. A. 2001. Disseminated *Mycobacterium celatum* (type 3) infection in a domestic ferret (Mustela putorius furo). Vet. Pathol. 38:460-463.

# 9 Vedlegg

## 9.1 Vedlegg 1

Tabell 9.1 viser påvisning av *Legionella* spp. som funksjon av avstand fra luftebassengene. Verdiene i tabell 9.1 er hentet fra tabell 4.1 (kap.4.1). Fargekoding er som følger: blått : region I, 0 m; grønt : region II, 45-75 m; gult : region III, 75-105 m; oransje : region IV, 105-200 m; og rosa : region V, 200-300 m.

Tabell 9.1. Identifisering av *Legionella* spp. som funksjon av avstand fra luftebassengene ved Borregaards biorenseanlegg.

| Prøve nummer[a] | Utstyr | Kartref.[b] | Avstand[c] (m) | Høyde (m.o.h) | PCR[d] | cfu/m$^3$ [e] | | 16S rRNA sekv.[f] |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 257<br>263 | SASS 2000 | 1 | 0 | 35 | + | 1,7 | Lspp | |
| 275<br>274 | MAS-100 | 1 | 0 | 35 | | 10 | Lspp | |
| 366<br>372 | SASS 2000 | 1 | 0 | 35 | + | 79 | Lspp > 2 ulike | |
| 380<br>381 | MAS-100 | 1 | 0 | 35 | | 30 | Lspp – 2 ulike | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum* |
| 297<br>303 | SASS 2000 | 2 | 0 | 35 | + | 440 | Lspp – 2 ulike | |
| 312<br>313 | MAS-100 | 2 | 0 | 35 | | 45 | Lspp | Ikke påvist |
| 99<br>102 | STA-204 | 3 | 0 | 35 | | 15 | 2 7P + 13 Lspp | *L. bozemanii* |
| 105<br>108 | MAS-100 | 3 | 0 | 35 | | 21 | Lspp<br>FHI: Lspp= *L. pneumophila* | *L. pneumophila* |
| 111<br>114 | SASS 2000 | 3 | 0 | 35 | + | 111 | 1 7P + 110 Lspp<br>FHI: Lspp= *L. pneumophila* | |
| 120<br>123 | SASS 2000 | 3 | 0 | 35 | + | Ikke påvist | < 0.3 | |
| 126<br>129 | STA-204 | 3 | 0 | 36,5 | | 118 | Lspp<br>FHI: Lspp= *L. pneumophila* | *L. pneumophila*<br>*L. bozemanii* |
| 135<br>138 | STA-204 | 3 | 0 | 35 | | >200 | 7P + 43 Lspp<br>FHI: Lspp= *L. pneumophila* | *L. bozemanii*<br>*L. pneumophila* |
| 141<br>149 | SASS 2000 | 3 | 0 | 35 | + | 52 | Lspp<br>FHI: Lspp= *L. pneumophila* | |
| 164<br>167 | SASS 2000 | 3 | 0 | 35 | + | 3300 | Lspp<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | |
| 173<br>174 | MAS-100 | 3 | 0 | 35 | | 14 | 9 7P + 5 Lspp | *L. pneumophila*<br>*L. bozemanii* |
| 188<br>191 | SASS 2000 | 3 | 0 | 35 | + | 40 | 4 7P + 36 Lspp | |
| 194<br>197 | MAS-100 | 3 | 0 | 35 | | 66 | 4 7P + 62 Lspp | *L. bozemanii*<br>*L. pneumophila*<br>*L. dumoffii* |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 229<br>231 | SASS 2000 | 3 | 0 | 35 | + | 180 | Lspp | |
| 236<br>237 | MAS-100 | 3 | 0 | 35 | | 420 | Lspp | *L. bozemanni*<br>*L. pneumophila*<br>*L. oakridgensis* |
| 332<br>338 | SASS 2000 | 3 | 0 | 36,5 | + | 93 | Lspp – 2 ulik | |
| 346<br>347 | MAS-100 | 3 | 0 | 36,5 | | 4,6 | Lspp | *L. pneumophila*<br>*L. londiniensis/*<br>*L. nautarum* |
| 295<br>301 | SASS 2000 | 19 | 45 | 26 | + | 24 | Lspp – 2 ulike | |
| 310<br>311 | MAS-100 | 19 | 45 | 26 | | 70 | Lspp | *L. pneumophila*<br>*L. londiniensis/*<br>*L. nautarum*<br>*L. oakridgensis* |
| 294<br>302 | SASS 2000 | 20 | 50 | 47,5 | - | 30 | Lspp – 2 ulike | |
| 308<br>309 | MAS-100 | 20 | 50 | 47,5 | | 34 | Lspp | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum*<br>*L. oakridgensis* |
| 367<br>373 | SASS 2000 | 20 | 50 | 47,5 | + | 7,2 | Lspp | |
| 382<br>383 | MAS-100 | 20 | 50 | 47,5 | | 5 | Lspp | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum* |
| 298<br>304 | SASS 2000 | 21 | 50 | 33,8 | + | 197 | Lspp – 2 ulike | |
| 314<br>315 | MAS-100 | 21 | 50 | 33,8 | | 48 | Lspp | *L. pneumophila*<br>*L. londiniensis/*<br>*L. nautarum*<br>*L. oakridgensis* |
| 121<br>124 | SASS 2000 | 7 | 55 | 26 | + | 4 | Lspp | |
| 127<br>130 | STA-204 | 7 | 55 | 26 | | 18 | Lspp.<br>FHI : Lspp=*L. pneumophila* | *L. bozemanii* |
| 256<br>262 | SASS 2000 | 7 | 55 | 26 | + | 1,7 | Lspp | |
| 269<br>268 | MAS-100 | 7 | 55 | 26 | | Ikke påvist | < 1 | *L. pneumophila* |
| 384<br>385 | MAS-100 | 7 | 55 | 26 | | 3 | Lspp – 2 ulike | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum* |
| 195<br>198 | MAS-100 | 12 | 55 | 33,8 | | 94 | Lspp<br>(flere typer) | *L. bozemanni*<br>*L. pneumophila*<br>*L. oakridgensis* |
| 299 | SASS 2000 | 22 | 60 | 50 | + | 4 | Lspp – 2 ulike | |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 305 | | | | | | | | |
| 316<br>317 | MAS-100 | 22 | 60 | 50 | | 10 | Lspp | *L. pneumophila*<br>*L. oakridgensis* |
| 137 | STA-204 | 5 | 65<br>oppstrøms | 34 | | 0.4 | Lspp | |
| 136<br>139 | STA-204 | 8 | 65 | 26 | | 47 | 40 7P + 7 Lspp<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | *L. bozemanii* |
| 142<br>150 | SASS 2000 | 8 | 65 | 26 | + | 2 | Lspp<br>FHI: Lspp=*L. pneumophila* | |
| 228<br>230 | SASS 2000 | 10 | 65 | 26 | + | 13 | 1 7P + 13 Lspp | |
| 238<br>239 | MAS-100 | 10 | 65 | 26 | | 26 | Lspp | *L. bozemanni*<br>*L. pneumophila*<br>*L. oakridgensis* |
| 98<br>101 | STA-204 | 4 | 75 | 26 | | 1 | Lspp<br>FHI:Lspp=*L. pneumophila* | Ikke påvist |
| 104<br>107 | MAS-100 | 4 | 75 | 26 | | Ikke påvist | <1 | *L. pneumophila* |
| 258<br>264 | SASS 2000 | 16 | 105 | 45 | + | 0,5 | Lspp | |
| 272<br>273 | MAS-100 | 16 | 105 | 45 | | Ikke påvist | < 1 | Ikke påvist |
| 225<br>227 | SASS 2000 | 13 | 125 | 26 | - | Ikke påvist | < 0.1 | |
| 234<br>235 | MAS-100 | 13 | 125 | 26 | | Ikke påvist | < 1 | Ikke påvist |
| 255<br>261 | SASS 2000 | 15 | 140 | 28 | - | Ikke påvist | < 56 | |
| 270<br>271 | MAS-100 | 15 | 140 | 28 | | Ikke påvist | < 1 | Ikke påvist |
| 331<br>337 | SASS 2000 | 15 | 140 | 28 | - | 2,7 | Lspp | |
| 340<br>341 | MAS-100 | 15 | 140 | 28 | | 2 | Lspp | *L. pneumophila* |
| 165<br>168 | SASS 2000 | 11 | 145 | 27,9 | - | 300 | Lspp<br>(*L. pneumophila*) | |
| 169<br>170 | MAS-100 | 11 | 145 | 27,9 | | Ikke påvist | <1 | Ikke påvist |
| 190<br>193 | SASS 2000 | 11 | 145 | 27,9 | + | 25 | 2 7P + 23 Lspp | |
| 196<br>199 | MAS-100 | 11 | 145 | 27,9 | | Ikke påvist | <1 | *L. bozemanii*<br>*L. oakridgensis* |
| 224<br>226 | SASS 2000 | 11 | 145 | 27,9 | - | 0.4 | Lspp | |
| 232 | MAS-100 | 11 | 145 | 27,9 | | Ikke påvist | < 1 | Ikke påvist |

| | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| 233 | | | | | | | | |
| 364<br>370 | SASS 2000 | 26 | 145 | 37 | - | 6,3 | Lspp – 2 ulike | |
| 374<br>375 | MAS-100 | 26 | 145 | 37 | | 3 | Lspp | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum* |
| 296<br>300 | SASS 2000 | 18 | 150 | 26 | - | 2 | Lspp – 2 ulike | |
| 306<br>307 | MAS-100 | 18 | 150 | 26 | | 22 | Lspp – 2 ulike | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum*<br>*L. oakridgensis* |
| 329<br>335 | SASS 2000 | 24 | 150 | 40,7 | - | 0,9 | Lspp | |
| 344<br>345 | MAS-100 | 24 | 150 | 40,7 | | 2 | Lspp | Ikke påvist |
| 333<br>339 | SASS 2000 | 25 | 160 | 64 | + | Ikke påvist | < 0,8 | |
| 348<br>349 | MAS-100 | 25 | 160 | 64 | | Ikke påvist | < 1 | Ikke påvist |
| 254<br>260 | SASS 2000 | 14 | 180 | 26 | - | Ikke påvist | < 56 | |
| 267<br>266 | MAS-100 | 14 | 180 | 26 | | Ikke påvist | < 1 | Ikke påvist |
| 363<br>369 | SASS 2000 | 14 | 180 | 26 | + | 43 | Lspp - > 2 ulike | |
| 376<br>377 | MAS-100 | 14 | 180 | 26 | | 5 | Lspp | *L. londiniensis/*<br>*L. nautarum* |
| 342<br>343 | MAS-100 | 23 | 200 | 27 | | Ikke påvist | < 1 | *L. pneumophila* |
| 259<br>265 | SASS 2000 | 17 | 300 | 25 | - | Ikke påvist | < 440 | |
| 277<br>276 | MAS-100 | 17 | 300 | 25 | | Ikke påvist | < 1 | Ikke påvist |

[a] Prøvenummer henviser til nummer på prøven gitt i journalen (journalnummer) for prøvetaking ved Borregaard.

[b] Kartreferansen er i henhold til figur 4.3.

[c] Avstand er beregnet fra nærmeste luftebasseng til målepunkt. Luftebassengene er definert som avstand 0 m.

[d] Real-time PCR er utført ved FFI og beskrevet i detalj i Blatny et al. (2007).

[e] Telelab AS har utført dyrking og morfologisk analyse. Dette er beskrevet i Wierød et al., (2007).

cfu; colony forming units

Lspp; *Legionella* spp.

7P; en gruppe på syv patogene *Legionella* arter (*L. longbeachae, L.bozemanii, L. dumoffii, L. germanii, L. jordanis, L. micdadei* og *L. anisa*)
Der hvor Folkehelseinstituttet har identifisert Lspp fra Telelab AS som *L. pneumophila* er dette notert som "FHI : Lspp = *L. pneumophila*".

[f] Folkehelseinstituttet har utført DNA-sekvensering av 16S rRNA-genfragmentet fra luftprøver innsamlet med MAS-100 og STA-204. DNA-identiteten er 100% hvor *L. pneumophila* ble identifisert, 98-99% for *L. bozemanii,* 99% for *L. oakridgensis*, 99% for *L. londiniensis/L. nautarum.* 16S rRNA-sekvensering differensierer ikke mellom *L. londiniensis* og *L. nautarum*. Dette er beskrevet i Caugant et al. (2007).