

LOPPURAPORTTI

LEGIONELLAT KASVUALUSTOISSA

LEGIGROW

Ruokavirasto

Liisa Maunuksela¹, Titta Berlin², Mikko Lehtonen³, Marja Lehtolainen², Merja Torniainen²

¹Esikunta

²Kasvintuotannon osasto, Lannoitejaosto

³Kasvianalytiikan yksikkö, Kasvintuhoojajaosto

Helsinki

Terveyden ja hyvinvoinnin laitos

Jaana Kusnetsov, Pia Räsänen, Piia Airaksinen

Terveysturvallisuusosasto,

Asiantuntijamikrobiologiayksikkö,

Vesimikrobiologian laboratorio

Kuopio

10.6.2020



Terveyden ja
hyvinvoinnin laitos



RUOKAVIRASTO
Livsmedelsverket • Finnish Food Authority

Sisällys

1. Hankkeen tausta ja tavoitteet	3
1.1 Legionelloosit eli legionellabakteerien aiheuttamat infektiot.....	3
1.2 Legionellabakteereihin liittyvä lainsäädäntö ja ohjeistus	4
1.3 Legionellat ja muut mikrobit ympäristössä	5
1.4 Tavoitteet	5
2. Osapuolet ja yhteistyö	6
3. Tulokset	6
3.1 Menetelmät ja aineisto.....	6
3.1.1 Kirjallisuusselvitys	6
3.1.2 Tutkimuskohteet	6
3.1.3 Legionellat viljelymenetelmin.....	7
3.1.4 Legionellat geeniosoitusmenetelmin (qPCR).....	7
3.1.5 Heterotrofiset bakteerit	8
3.2 Tulokset	9
3.2.1 Kirjallisuusselvitys julkaistuista muista tutkimuksista kasvualustojen legionelloista.....	9
3.2.2 Legionellat kasvualustoissa, raaka-aineissa ja ympäristössä.....	12
3.2.3 Tilastolliset analyysit.....	16
3.2.4 Spearmanin korrelaatio	16
3.2.5 Ristiintaulukointi, Khiin neliötesti ja Fisherin eksaktitesti.....	16
3.2.6 Mikrobipitoisuuksien vertailu näytetyypeittäin ja eri materiaalien näytteissä esiintymisen mukaan.	17
3.3 Toteutusvaiheen arviointi	21
3.4 Julkaisut	21
4. Tulosten arviointi.....	21
4.1 Tulosten käytännön sovelluskelpoisuus	21
4.2 Tulosten tieteellinen merkitys	22
5. Kiitokset	22
6. Lähteet	23

1. Hankkeen tausta ja tavoitteet

1.1 Legionelloosit eli legionellabakteerien aiheuttamat infektiot

Legionellabakteerit löydettiin vasta 1970-luvun loppupuolella, jolloin niiden todettiin aiheuttaneen useita keuhkokuume-epidemioita. Legionellat ovat yleisesti kosteassa maaperässä ja vesistöissä, mutta myös puhdistetussa verkostovedessä pieninä pitoisuuksina esiintyviä ympäristöbakteereja. Kiinteistövesijärjestelmissä olosuhteet, kuten veden lämpötila ja käyttötavat ratkaisevat, miten suuriksi legionellabakteeripitoisuudet kasvavat ja miten ne pääsevät leviämään hengitettävään ilmaan. Maa-aineksissa, kuten komposteissa ja multatuotteissa, on myös havaittu kohonneita legionellabakteeripitoisuuksia ja niihin on liitetty tautitapauksia.

Joutuessaan aerosolina hengitysteihin legionellat voivat aiheuttaa vakavan, jopa kuolemaan johtavan keuhkokuumeen, legioonalaistaudin. Legionellojen on havaittu aiheuttaneen myös ensimmäisen havaitsemispaikan, Pontiacin kaupungin perusteella Pontiac-kuumeeksi nimettyä flunssan kaltaista tautimuotoa ilman vakavia keuhko-oireita. Legionellat voivat aiheuttaa infektiota myös keuhkojen ulkopuolella, pääsemällä kehoon muun muassa haavojen kautta (Edelstein 1993). Näitä kyseisiä infektiota esiintyy lähinnä henkilöillä, joilla on heikentynyt vastustuskyky.

Nimettyjä *Legionella*-lajeja tunnetaan yli kuusikymmentä, joista noin puolet voi aiheuttaa ihmiselle infektiota. Useimmiten legionellooseja on aiheuttanut *Legionella pneumophila* -laji, ja erityisesti sen seroryhmä 1. Myös *Legionella pneumophila* -lajin seroryhmät 2-15 ja 29 muuta *Legionella*-lajeja voivat aiheuttaa infektiota. Vastustuskyvyltään heikommät ovat herkimpiä sairastumaan legionelloosiin, mutta legionellat ovat sairastuttaneet myös terveitä. Komposteihin ja multatuotteisiin liittyvät tautitapaukset ovat olleet *Legionella longbeachae* -lajin aiheuttamia. Legionellojen aiheuttamat infektiot voidaan selvittää virtsan antigeenitesteillä, veren legionellavasta-ainemittauksin, ja yskös-, huuhtelu- ja kudoksenäytteiden viljely- ja värjäysmenetelmin. Näistä viime aikoina luotettavimmaksi ja yleisimmäksi menetelmäksi on osoittautunut virtsan legionella-antigeenien mittaaminen potilasnäytteistä. Testi kuitenkin tunnistaa vain *Legionella pneumophila*-lajin seroryhmän 1 infektiot, eli muiden taudinaiheuttajalajien ja -seroryhmien aiheuttamia infektiota ei tällä menetelmällä havaita.

Legionellan aiheuttamien keuhkokuumeiden määrät ovat olleet Euroopassa kasvusuunnassa. Viimeisimmän julkaistun tiedon mukaan eurooppalaisilla havaittiin vuonna 2016 yhteensä 7084, vuonna 2017 yhteensä 9259, ja vuonna 2018 yhteensä 11343 legionellojen aiheuttamaa keuhkokuumetapausta (ECDC 2019). Tapausten lisääntymiseen on vaikuttanut diagnostiikan parantuminen, sen lisääntynyt soveltaminen ja mahdollisesti myös ilmastonmuutos, mikä lämmittää kylmää talousvettä aikaisempaa enemmän edistäen legionellabakteerien kasvua. Suomessa on havaittu vuosittain noin 15–30 legionelloosia mutta todennäköinen tapausten määrä on kuitenkin suurempi, arviolta n. 100-200 vuosittain. Erilaisia legionelloositapausryppäitä on Suomessa vuoteen 2019 mennessä havaittu 12, joissa sairastuneiden määrä on ollut yhteensä 50 henkilöä. Tapausrypäiden eli vähintään kahden samasta lähteestä sairastuneiden ryhmien tartuntalähteet ovat olleet vesiperäisiä. Yksittäisiä legionelloositapauksia liittyen maa-aineksiin on havaittu Suomessa vuosina 2016 ja 2019.

Legionellapitoisuudet erilaisissa vesijärjestelmissä epidemioiden yhteydessä ovat olleet suurimmillaan n. 10^6 – 10^{10} pmy/l (pesäkkeitä muodostavia yksiköitä litrassa). Toisaalta vastustuskyvyltään heikompien sairastumiseen saattaa riittää huomattavasti pienemmälle, jopa vain 1000 pmy/l sisältävälle vedelle ja siitä ilmaan muodostuvalle aerosolille altistuminen. Maa-

aineksiin liittyvien tapausten legionellabakteeripitoisuuksista on vähän tietoa, mutta esimerkiksi kompostoinnin jälkeen voi kompostin legionellapitoisuus helposti nousta miljooniin pesäkkeisiin/gramma. Legionelloosin ihmiselle aikaansaavaa legionellabakteeriannosta ei ole vielä pystytty luotettavasti selvittämään, ja voikin olla, että se vaihtelee hyvin paljon muun muassa altistuvan keuhkojen kunnon ja yleisen vastustuskyvyn mukaan. Annosvasteesta kertyy tietoa hitaasti, sillä erityisesti yksittäisten keuhkokuumeetapausten, mutta myös legionelloosin aiheuttanut mikrobityyppi, tartuntalähde tai legionellapitoisuus, jäävät yhä hyvin usein selvittämättä.

1.2 Legionellabakteereihin liittyvä lainsäädäntö ja ohjeistus

Muutamien yleisten veteen liittyvien säädösten, kuten talousvesiasetuksen ja allasvesiasetuksen lisäksi Suomessa on voimassa työpaikkoihin liittyvää legionella-aiheista lainsäädäntöä. Laajaa eurooppalaista teknistä legionellaohjeistoa noudatetaan hotelleihin ja muihin majoitusta tarjoaviin kohteisiin liittyen, sekä muualle kylmää talousvettä, lämmintä käyttövettä, jäähdytysvettä ja poreallasvettä sisältäviin kohteisiin Suomessa. Työturvallisuuslakia sovelletaan työolosuhteissa, joissa käsitellään esimerkiksi jätevesiä.

Työturvallisuuslaki

Työturvallisuuslaissa ([738/2002](#)) käsitellään työn biologisia vaaratekijöitä kohdassa 40§, missä todetaan, että työntekijän altistuminen biologisille tekijöille on rajoitettava niin vähäiseksi, ettei niistä aiheudu haittaa tai vaaraa työntekijän turvallisuudelle, terveydelle tai lisääntymisterveydelle. Myös aikaisemman Työturvallisuuslain nojalla annetut säädökset aiheesta ovat toistaiseksi voimassa. Niitä ovat valtioneuvoston asetus ([933/2017](#)), sosiaali- ja terveysministeriön asetus ([921/2010](#)) ja vastaava EU:n direktiivi ([2000/54](#)) työntekijöiden suojelemiselle vaaroilta, jotka kaikki liittyvät biologisille tekijöille altistumiseen työssä. Näiden mukaan *Legionella*-lajit kuuluvat biologisten tekijöiden ryhmään 2. Luokittelun mukaan ryhmään 2 kuuluva biologinen tekijä voi aiheuttaa ihmiselle sairauden, voi olla vaarallinen työntekijälle, mutta ei kuitenkaan todennäköisesti leviä väestöön ja tekijän aiheuttamaan sairauteen käytettävissä on yleensä tehokas hoito.

Edellä mainittu luokittelu, työntekijöiden työolosuhteiden selvittäminen ja vaarojen vähentäminen myös biologisten tekijöiden kannalta koskee seuraavia toimintoja: Työ elintarviketehtaissa; maataloustyö; työ, jossa joudutaan kosketuksiin eläinten tai eläinperäisten tuotteiden kanssa; terveydenhoitotyö; työ erilaisissa laboratorioissa ja työ jätteidenkäsittelylaitoksissa sekä jätevedenpuhdistamoissa. Oheinen tietopaketti yksityiskohtineen on koottu Sosiaali- ja terveysministeriön asetuksen [921/2010](#) liitteeseen.

Eurooppalainen tekninen legionellaohjeisto

Näytteistä viljelemällä havaittuja legionellabakteeripitoisuuksia voidaan verrata eurooppalaisen teknisen legionellaohjeiston enimmäispitoisuussuosituksiin. Ohjeistossa on suositeltu kylmälle talousvedelle, lämpimälle käyttövedelle, jäähdytysvedelle ja porealtaan vedelle enimmäispitoisuustasoja: [European Guidelines Working Group: European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation of Infections Caused by Legionella species, June 2017](#). Suurimmaksi sallituksi legionellabakteeripitoisuudeksi suositellaan 1000 pmy/l jäähdytysjärjestelmille (sivu 73) sekä 1000 pmy/l kylmävesi- ja lämminvesijärjestelmille (sivu 96). Porealtaissa legionelloja ei saa olla havaittavissa (määritysraja noin 100 pmy/l, sivu 100). Edellä mainittuja suuremmat pitoisuudet edellyttävät uusintanäytteitä, torjuntaohjelman tarkistamista ja mahdollisesti kiireellisiä puhdistustoimia. Ohjeistossa ei ole eroja pitoisuusrajoissa eri *Legionella*-lajien välillä.

Maa ilman terveysjärjestön ohjeisto

WHO:n laajassa legionellaohjeistossa *Legionella and the Prevention of Legionellosis* korostetaan vesijärjestelmien hyvää kunnossapitoa legionelloosien estämiseksi (WHO 2007). Myös kasvualustat ja kompostit ovat ohjeistossa mukana legionelloosien tartuntalähteinä mutta niiden enimmäispitoisuudelle ei ole annettu raja-arvoja tai suosituksia.

1.3 Legionellat ja muut mikrobit ympäristössä

Legionellat saattavat päästä vesijärjestelmistä ilmaan suurina pitoisuuksina esimerkiksi suihkujen, hanojen, porealtaiden, jäähdytystornien, ilmastusaltaiden, bioreaktorien ja ilmankostuttimien käytön aiheuttaman aerosolin mukana sekä puhdistustoimien yhteydessä. Erityisiä riskiryhmiä ovat ikääntyneet, vastasyntyneet ja vastustuskyvyltään heikommat. Legionelloille voivat poikkeuksellisen haitallisesti altistua myös työssään legionelloja sisältäviä materiaaleja käsittelevät työntekijät ja laitteita puhdistavat huolto- ja kunnossapitotyöntekijät. Huomioitavaa on myös se, että aerosolit voivat haitallisesti levitä laajalle, esimerkiksi jäähdytysjärjestelmien legionellat ovat levinneet päästölähteestä jopa 6 km etäisyydelle aiheuttaen infektiota.

Viime vuosina on huomattu, että kylmän talousveden legionellabakteeripitoisuus voi kasvaa huomattavan suureksi kylmän talousveden lämmitessä selvästi yli 20 °C:n, mitä helposti tapahtuu veden seistessä käyttämättömissä putkiosuuksissa. Monissa legionelloositapauksiin yhdistetyissä kiinteistövesijärjestelmissä on viime vuosina Suomessa käytetty klooriyhdisteitä kylmän talousveden legionellabakteeripitoisuuksien pienentämiseksi. Koko väestön tasolla legionelloille altistumisen pienentämisen kannalta on tärkeää, että lämmin käyttövesi pyritään pitämään tasaisesti vähintään 55 °C lämpötilassa joka kohdassa järjestelmää, kuten on uusimmassa YM:n asetuksessa myös määrätty (1047/2017). Lisäksi lämpimän veden varaajassa/lämmönsiirtimessä tulee veden olla vielä kuumempaa mutta korkeintaan 65 °C. Suurissa kiinteistöissä kuten sairaaloissa näiden lämpötilojen saavuttaminen voi olla vaikeaa. Lisäksi avoimien tornillisten jäähdytysjärjestelmien vesi tulisi käsitellä mikrobien torjuntakemikaalein eli biosidein säännöllisesti, sillä ne ovat legionelloille erityisen helppoja kasvu- ja leviämiskohtia. Jätevedenpuhdistamoilla suurimmat legionellapitoisuudet esiintyvät vedessä ja lietteessä, ja niiden pääsyä ilmaan on vaikea estää. Siellä hengityssuojaimien käyttö on joskus ainoa varma keino estää tartunta.

Ongelmalliseksi legionellojen torjumisen erilaisissa ympäristöissä tekee niiden hyvä kestävyys verkostoveden normaalille pienelle klooripitoisuudelle (n. 0.1 mg/l), laaja kasvun lämpötila-alue (ainakin 20–45°C), yleinen esiintyminen maaperässä, ja suosiolliset kasvuolosuhteet lämmintä vettä sisältävissä vesijärjestelmätyypeissä. Suomalaisissa tutkimuksissa noin 30 % tutkituista lämpimän käyttöveden järjestelmistä ja 50 % jäähdytysvesijärjestelmistä on sisältänyt viljeltäviä legionellabakteereja (Zacheus and Martikainen 1994; Kusnetsov 1997). Erilaisten maa-ainesten sisältämistä legionellapitoisuuksista Suomessa ei ole aikaisempaa tutkimustietoa.

1.4 Tavoitteet

Hallitsemalla kierrätykseen sisältyvät riskit voidaan turvallisesti tehostaa ravinteiden ja orgaanisen aineen kiertoa maa- ja puutarhataloudessa. Hankkeen tavoitteena oli edistää turvallisten kasvualustojen kehittämistä. Hankkeessa koottiin julkaistua tutkimustietoa liittyen legionellabakteerien esiintymiseen maa-aineksissa ja tutkittiin kokeellisesti erityyppisten kasvualustavalmisteiden ja niiden raaka-ainesten legionellapitoisuuksia ja säilytyksen vaikutusta legionellapitoisuuksiin. Pyrkimyksenä oli arvioida erilaisten teollisuuden ja maatalouden sivuvirtojen käyttöä kierrätysravinteina sekä arvioida ja kehittää alaan liittyvää lainsäädäntöä

legionellan osalta hankkeessa saatujen tulosten perusteella. Hankkeen tulosten perusteella ohjeistetaan tuotteiden kuluttajia ja valmistajia tuotteiden turvalliseen käsittelyyn. Parhaimmillaan voidaan ennaltaehkäistä vakavia sairastumisia turvallisella tuotteiden valmistamisella ja tarjota ammattilaisten ja kuluttajien käyttöön turvallisempia tuotteita.

2. Osapuolet ja yhteistyö

Hanke toteutettiin Ruokaviraston koordinoimana yhteistyössä Terveyden ja hyvinvoinnin laitoksen (THL) kanssa. Hankkeen vastuullisena johtajana toimi Ruokaviraston tutkimusjohtaja Liisa Maunuksela ja valvontaan ja näytteenottoon liittyvinä asiantuntijoina ylitarkastajat Titta Berlin, Marja Lehtolainen ja Merja Tornainen. Ruokaviraston tutkija Mikko Lehtonen vastasi hankkeen kirjallisuusselvityksen tekemisestä. Legionellan määritysmenetelmistä ja legionella-asiantuntijuudesta vastasivat THL:n erikoistutkija Jaana Kusnetsov sekä tutkijat Pia Räsänen ja Piia Airaksinen. Tulosten julkaisu, viestintä ja raportointi tehtiin kaikkien osallistujien yhteistyönä. Ruokaviraston ja THL:n tutkijat ovat tehneet vastaavaa yhteistyötä aiemmin, joten roolit olivat selvät eikä vastuiden jakamisessa tai työn toteutuksessa ollut ongelmia.

3. Tulokset

3.1 Menetelmät ja aineisto

3.1.1 Kirjallisuusselvitys

Kirjallisuusselvityksessä haettiin julkaistua tietoa legionellojen esiintymisestä kasvualustoissa ja ympäristössä, sekä multamaisten materiaalien aiheuttamista legionellooseista pois lukien vesiympäristöt. Haku tehtiin huhtikuussa 2019 Web of Science julkaisutietokannan (Clarivate Analytics) avulla. Asetuksina käytettiin perushakua kaikista tietokannoista ilman vuosirajausta hakusanoilla Legionell* tai Legionnair* tai Pontiac* aiheen mukaan, ja saadut hakutulokset tarkennettiin sanoilla Garden tai Soil tai Compost tai Environment. Tulosten otsikot käytiin manuaalisesti läpi, ja otsikon perusteella olennaisten julkaisujen tiivistelmät luettiin. Tiivistelmien perusteella luettujen olennaisten julkaisujen lähteet ja julkaisuun viittaavat uudemmat julkaisut käytiin läpi kuten edellä.

3.1.2 Tutkimuskohteet

Yhteensä 20 kpl näytteitä otettiin vuonna 2019 helmikuun ja syyskuun välisellä ajalla. Suurin osa näytteistä otettiin Ruokaviraston vuosittaisten valvontasuunnitelman mukaisten valvontakäytien yhteydessä, yhteensä 11 paikkakunnalta eri puolelta Suomea. Tutkittavaksi otettiin 11 kappaletta erilaisia kasvualustoja, joita olivat seosmullat, kompostimullat, turveseokset ja kookoskasvualustat. Kompostimullan raaka-aineena oli käytetty lantapohjaista kompostia, turvetta, maa-aineksia sekä puupohjaisia aineksia kuten puunkuorta ja kuitulietettä. Muissa kasvualustoissa oli raaka-aineena erilaisia maa-aineksia, turvetta ja kalkitusaineita.

Lisäksi tutkittiin viittä eri kasvualustan raaka-ainetta: Sammalta, broilerin lantaa, moreenia, maatonutta kuorta ja turvetta. Kontrollina ja legionellataustapitoisuuksien selvittämiseksi analysoitiin myös neljä peltomaanäytettä pelloilta, joilla ei ollut käytetty kierrätyslannoitevalmisteita. Peltomaanäytteet otettiin kahdesta eri kohteesta kyntökerroksen alapuolelta n. 30 cm syvyydestä. Kaikki legionellanäytteet otettiin aseptisesti ja säilytettiin viileässä

analysointiajankohtaan asti. Näytteiden homogenointi ja osanäytteiden jakaminen tehtiin Ruokaviraston laboratoriossa.

Säilytyksen vaikutusta kasvualustojen legionellapitoisuuksiin tutkittiin analysoimalla kahden näytteen legionellapitoisuudet ennen ja jälkeen kolmen kuukauden muhituksen. Tuotteiden varastoinnin vaikutuksia simuloitiin altistamalla näytteet lämpötilavaihteluille. Näytteitä säilytettiin 12.6.-9.9.2019 välisen ajan Ruokaviraston katolla tuotepakkauksissaan ympäristöltä suojattuna.

Näytteiden mikrobiologinen laatu selvitettiin tutkimalla näytteistä legionelat viljellen ja molekyylibiologisilla qPCR-menetelmillä sekä heterotrofiset bakteerit viljelymenetelmillä.

3.1.3 Legionelat viljelymenetelmin

Näytteiden legionellojen viljelyyn perustuvana tutkimusmenetelmänä käytettiin standardiin ISO 11731:1998 perustuvia THL:n TO11-ohjetta ja TO22-ohjetta. Lisäksi otettiin käyttöön SFS-EN ISO 11731-2017-standardin mukaiset lisämalja-alustat. Näytteet kuumennettiin ja happopestiin ennen lisämaljoille viljelyä. Tutkittu näytemäärä oli yleensä 1 gramma, josta näytteiden pienimmäksi havaittavissa olevaksi legionellapitoisuudeksi saatiin laskennallisesti 50 pmy/g. Pmy/g on pesäkkeen muodostavia yksiköitä grammaa kohti. Viljelyalustoina käytettiin GVPC- ja BCYE-alustoja ja näytealustoja inkuboitiin 36°C kasvatuslämpötilassa 10 vuorokautta. THL:n laboratorio osallistuu kansainväliseen vesinäytteiden legionella-analyysien laaduntarkkailuohjelmaan (Public Health England, External Quality Assessment Scheme for Legionella Isolation from Water, Lontoo, UK). Taulukossa 1 on eroteltuna tässä hankkeessa käytetyt erilaisten legionellojen analysointitavat.

3.1.4 Legionelat geeniosoitusmenetelmin (qPCR)

Legionellabakteerien esiintymistä ja pitoisuuksia selvitettiin myös geenimonistukseen perustuvilla menetelmillä (qPCR, kvantitatiivinen polymeraasiketjureaktio). Käytetyt qPCR-analyysit perustuivat aikaisemmin julkaistuihin qPCR-menetelmiin (Cross et al. 2016, Mentasti et al. 2015, Mérault et al. 2011) ja ne muokattiin THL:n vesimikrobiologian laboratorion qPCR-laitekannoille sopiviksi hankkeen aikana. Multa- ja kompostinäytteet punnittiin ja pakastettiin syväjäähän ennen nukleiinihappojen eristämistä näytteistä. Nukleiinihapot (DNA ja RNA) eristettiin kaupallisella eristyskitillä (Inkinen et al. 2019), ja niiden pitoisuus määritettiin Qubit-laitteen avulla. Eristetty nukleiinihapo toimii lähdemateriaalina qPCR-reaktiossa, jossa kohdegeenin osaa monistettiin sykleittäin reaktion aikana. Kohdegeenin monistuminen voitiin havaita fluoresenssisignaalin qPCR-laitteelta.

QPCR-menetelmillä saatiin selville legionellasolujen esiintyvyys ja pitoisuus geenikopiona grammassa (GC/g) erikseen *Legionella*-suvulle ja *L. pneumophila*, *L. longbeachae*-, ja *L. bozemanii*-lajeille ja *Legionella pneumophila*-lajin seroryhmälle 1. Kohdegeenistä voi olla useita geenikopioita bakteerisolun perimässä bakteerisolun aktiivisuudesta ja kohdegeenistä riippuen. QPCR- ja viljelytuloksien kvantitatiivisia arvoja ei voi siten verrata suoraan toisiinsa, eikä qPCR-menetelmille ole vielä olemassa omia toimenpideraja-arvoja legionelloille toisin kuin viljelytuloksille. QPCR-tuloksista voidaan arvioida bakteerisolujen elävyyttä, jos kohteena on RNA-molekyyli.

Taulukko 1. Legionellojen eri määrittämenetelmät.

Merkintä	Analysointitapa	Analysointikohde
Viljelymenetelmät (pmy/g)		
Legionellat, yhteensä	viljely	kaikki elävät kasvukykyiset legionellat yhteensä
<i>Legionella pneumophila</i> seroryhmät 1 ja 2-14	viljely, erotetaan seroryhmät 1 ja 2-4 erikseen	elävät kasvukykyiset <i>Legionella pneumophila</i> -lajin legionellat
<i>Legionella longbeachae</i>	viljely ja tyypitys PCR:llä	elävät <i>Legionella longbeachae</i> -lajin legionellat
<i>Legionella bozemanii</i>	viljely ja tyypitys PCR:llä	elävät <i>Legionella bozemanii</i> -lajin legionellat
<i>Legionella</i> , muut lajit	viljely, erotetaan muut <i>Legionella</i> -lajit <i>Legionella pneumophila</i> -lajista erikseen	elävät kasvukykyiset muut kuin <i>Legionella pneumophila</i> -lajin legionellat
Geeniosoitus (qPCR-menetelmät, GC/g)		
<i>Legionella</i> -suku, 16S-RNA	qPCR-analyysi, sisältää nukleiinihappojen eristämisen, RNA:n käsittelyn ja qPCR-reaktion	<i>Legionella</i> -suku, elävät
<i>Legionella</i> -suku, 23S-DNA	qPCR-analyysi, sisältää nukleiinihappojen eristämisen ja qPCR-reaktion	<i>Legionella</i> -suku, ei elävyyden arviointia
<i>Legionella pneumophila</i> , seroryhmät 1-15	qPCR-analyysi, sisältää nukleiinihappojen eristämisen ja qPCR-reaktion	<i>Legionella pneumophila</i> -laji, ei elävyyden arviointia
<i>Legionella pneumophila</i> , seroryhmä 1	qPCR-analyysi, sisältää nukleiinihappojen eristämisen ja qPCR-reaktion	<i>Legionella pneumophila</i> -lajin seroryhmä 1, ei elävyyden arviointia
<i>Legionella longbeachae</i>	qPCR-analyysi, sisältää nukleiinihappojen eristämisen ja qPCR-reaktion	<i>Legionella longbeachae</i> -lajin legionellat, ei elävyyden arviointia
<i>Legionella bozemanii</i>	qPCR-analyysi, sisältää nukleiinihappojen eristämisen ja qPCR-reaktion	elävät <i>Legionella bozemanii</i> -lajin legionellat, ei elävyyden arviointia

3.1.5 Heterotrofiset bakteerit

Heterotrofibakteereja tutkittiin R2A-alustalla käyttäen 20 °C:n kasvatuslämpötilaa ja 14 vrk:n kasvatusaika. Pienin mahdollinen havaittavissa oleva bakteeripitoisuus oli näytemäärästä laskennallisesti 50 pmy/g. Heterotrofisilla bakteereilla tarkoitetaan kaikkia niitä bakteereja, jotka käyttävät hiililähteenään orgaanisia yhdisteitä. Bakteerien pitoisuuksia määritettäessä tällä yleisalustallakin viljelymenetelmällä saadaan selville vain osa bakteerien pitoisuudesta koska kaikki bakteerit eivät kasva käytetyllä alustalla.

3.1.6 Tilastolliset analyysit

Tuloksia analysoitiin tilastollisin testein (SPSS, versio 26). Tilastollisissa analyyseissä keskityttiin selvittämään eri näytemateriaalien ja raaka-aineiden vaikutuksia legionellapitoisuuksiin. Koska testattava aineisto on useiden nollatuloksien vuoksi jakaumaltaan vinoutunut, käytettiin ei-parametrisia testejä, jotka perustuvat järjestyslukujen käyttöön ilman oletuksia jakauman muodosta. Tilastollisiin analyyseihin otettiin mukaan vain 20 ensimmäistä näytettä, eli ei 3 kk muhitettuja näytteitä, sillä ne olivat jo kertaalleen aineistossa mukana. Legionella- ja heterotrofibakteerien pitoisuuden yhteyttä selvitettiin Spearmanin korrelaatiotestillä. Viljelypositiivisten ja viljelynegatiivisten legionellatulosten jakautumista eri raaka-aineita sisältäviin ryhmiin ja jakautumisen merkitsevyyttä selvitettiin ristiintaulukoinnin ja Khin neliötestin avulla ja legionellapitoisuuden vaihtelua eri luokissa esimerkiksi ainesosien ja ajankohdan mukaan Kruskal-Wallis testin ja mediaanitestin avulla.

3.2 Tulokset

3.2.1 Kirjallisuusselvitys julkaistuista muista tutkimuksista kasvualustojen legionelloista

Legionella-suvun esiintymisestä kasvualustoissa, kasvualustojen raaka-aineissa ja maaperässä tai näiden käsittelyn aiheuttamista sairastumisista löytyi 52 julkaisua tai raporttia vuosilta 1978–2018. Julkaisujen määrä on kasvanut tasaisesti 1970-luvun lopulta lähtien, mutta multamaisten aineksien legionellojen aiheuttamien infektioiden määrä on todennäköisesti julkaistua määrää suurempi sillä keuhkokuumeiden taudinaiheuttajaa ei aina diagnosoida. Legionelloja esiintyy yleisesti sekä maaperässä että komposteissa ja kasvualustoissa. Yksittäisiä kasvualustojen komponentteja on sen sijaan tutkittu vähän (Taulukko 2). Legionellojen yleisyys ympäristössämme alkaa vasta valjeta uusien tutkimusten ja aiempaa herkempien geenimonistusmenetelmien myötä. Vaikka kattavia ympäristökartoituksia vesiympäristöjä lukuun ottamatta ei suku- tai lajitasolla juurikaan ole, tietokannoista saatavan julkaistun sekvenssidatan meta-analyysissä lähes neljänneksessä 1687 analysoidusta sekvensointiprojektista (87955 näytettä) esiintyi *Legionellales*-lahkoon kuuluvia bakteereja (Graells et al. 2018). On huomattava, että legionellabakteerin havaitsemisraja on noin sata solua grammassa tutkittavaa materiaalia (Conza, Casati, and Gaia 2013), ja tätä pienemmät bakteerimäärät jäävät havaitsematta tutkimuksissa. Kasvualustojen turvallisuutta ajatellen bakteerien yleisyyden lisäksi tarvitaan lisätietoa olosuhteista, joissa bakteeripitoisuus kasvaa haitalliseksi.

Legionellabakteerin viljelyominaisuudet keinotekoisella ravintoalustalla viittaavat siihen, että se ei olisi ympäristössä vapaasti elävä bakteeri. Ensimmäisissä aihetta selvittäneissä laboratorionkokeissa *L. pneumophila* tartutti *Acanthamoeba*- ja *Naegleria*-sukujen ameboja ja lisääntyi fagosytoosirakkuloissa niiden sisällä. Tutkimuksessa esitettiin, että legionella tarttuisi ihmisiin hengitysteitse amebassa muodostuvien bakteereja sisältävien rakkuloiden tai kokonaisten amebojen välityksellä, jolloin annos olisi 50, tai ameban sisäänhengityksessä jopa 1000 bakteeria kerralla. Tämä mekanismi selittäisi miksi legionella ei tartu potilaasta toiseen (Rowbotham 1980). Nykyisin tiedetään, että legionella voi amebojen lisäksi tartuttaa monenlaisia organismeja kuten ripsieläimiä, limasieniä ja sukkulamatoja, ja lisääntyä alkueläinten ulkopuolella biofilmeissä muiden mikro-organismien erittämien ravinteiden avulla (Fields et al. 1984; Hellinga et al. 2015; Boamah et al. 2017; Taylor, Ross, and Bentham 2009). Valtaosassa bakteeri-isäntä-tutkimuksia on käytetty *L. pneumophila* -lajia, mutta muutkin *Legionella*-lajit voivat tartuttaa alkueläimiä (Wadowsky et al. 1991; Neumeister et al. 1997).

Pääosa noin kolmestakymmenestä tunnetusta legionellan isäntälajista kuuluu ameboihin tai ripsieläimiin, jotka ovat orgaanista jätettä hajottavia bakteerinsyöjiä (Boamah et al. 2017; Taylor, Ross, and Bentham 2009). Näitä mikrokooppisia alkueläimiä esiintyy kaikkialla – maassa, merissä, vesistöissä, pohjavedessä ja ilmakehässä, eläinten ja kasvien pinnalla, selkärankaisten sisällä, sekä ääriolosuhteissa syvänmeren sedimenteistä jääjärviin. Bakteerien saalistajina ne vapauttavat ravinteita ja toimivat päälinkkinä mikro- ja makrosysteemien välillä (Rodríguez-Zaragoza 1994; Foissner 1998; Dopheide et al. 2009). Biologista aktiivisuutta lisäävät tekijät kuten kosteus, lämpötila ja ravinnemäärän kasvu lisäävät ensin heterotrofisten bakteerien, ja tämän seurauksena bakteereja syövien alkueläinten määrää ympäristössä (Clarholm 1981; Bonanomi et al. 2019). Legionella pystyy välttämään hajotuksen ravinnoksi alkueläinsolussa ja jakaantumaan alkueläimen sisällä (Rowbotham 1980; Wadowsky et al. 1988), tai joissain tapauksissa kulkemaan alkueläimen läpi jakautumatta (Berk et al. 2008). Alkueläinten sisällä legionellabakteerit erilaistuvat

kestomuodoiksi, jotka kestävät antibiootteja ja ravinnonpuutetta, desinfiointikemikaaleja sekä korkeaa pH:ta ja ovat huomattavasti virulentimpia kuin jakautumisvaiheessa olevat tai ravintoalustalla kasvatetut bakteerit (Cirillo, Falkow, and Tompkins 1994; Garduño et al. 2002; Koubar et al. 2011). Kestomuodot ovat aineenvaihdunnaltaan lähes inaktiivisia ja hyvin ympäristössä säilyviä, suotuisat olosuhteet aktivoivat ne jälleen jakautumaan (Ewann and Hoffman 2006).

Taulukko 2. Ympäristön, kasvualustojen ja kompostien legionelat ja legionelloosit.

Materiaali	Lajit	Pitoisuus	Potilas/ Ympäristö	Viite
Maaperä	<i>Legionella</i> spp.	–	Y	(Addiss et al. 1989)*
Maaperä	<i>L. pneumophila</i>	–	P, Y†	(Amemura-Maekawa et al. 2012)
Maaperä	<i>Legionella</i> spp.	–	Y	(Conwill et al. 1982)*
Maaperä	<i>Legionella</i> spp.	–	Y	(Cordes et al. 1980)*
Maaperä	<i>Legionella</i> spp.	–	Y	(Eng et al. 1984)*
Maaperä	Legionellabakteeri	–	P	(Haley et al. 1979)*
Maaperä (teollisuuden saastuttama)	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. feeleei</i> , <i>L. dumoffii</i> , <i>L. jamestowniensis</i> , <i>L. impletisoli</i> , <i>L. yabuuchiae</i>	–	Y	(Kuroki et al. 2007)
Maaperä	<i>L. longbeachae</i> , <i>L. pneumophila</i> , <i>Legionella</i> spp.	–	P, Y	(Marchand et al. 2018)
Maaperä	<i>Legionella</i> spp.	–	Y	(Morris et al. 1979)*
Maaperä	<i>Legionella</i> sp.	–	Y	(Newsome et al. 1998)
Maaperä	<i>L. bozemanii</i>	–	Y	(Parry et al. 1985)*
Maaperä	<i>L. longbeachae</i> , <i>Legionella</i> spp.	–	P, Y	(Picard-Masson et al. 2016)
Maaperä	Legionellabakteeri	–	Y	(Thacker et al. 1978)*
Maaperä	<i>L. pneumophila</i>	–	P, Y	(Wallis and Robinson 2005)
Maaperä	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. feeleei</i> , <i>L. gormanii</i> , <i>L. gratiana</i> , <i>L. wadsworthii</i> , <i>Legionella</i> spp.	–	P, Y†	(van Heijnsbergen et al. 2014)
Maaperä/seosmulta	<i>L. longbeachae</i> , <i>Legionella</i> spp.	–	P, Y	Jureen et al. 2019
Maaperä/seosmulta §	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>Legionella</i> spp.	10 ³ –10 ⁴ pmy/g	Y	(Steele, Moore, and Sangster 1990)
Seosmulta	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. sainthelensi</i> , <i>L. feeleei</i> , <i>L. birminghamensis</i> , <i>Legionella gratiana</i> , <i>L. jamestowniensis</i> , <i>L. nautarum</i> , <i>L. quinlivanii</i> , <i>L. londiniensis</i> , <i>Legionella</i> spp.	10 ³ –10 ⁵ pmy/g	Y	(Casati, Gioria-Martinoni, and Gaia 2009)
Seosmulta	<i>L. longbeachae</i>	–	P, Y	(Cramp et al. 2010)
Seosmulta	<i>L. longbeachae</i>	–	P, Y	(den Boer et al. 2007)
Seosmulta	<i>L. longbeachae</i>	–	P	(DeWit, Guy, and Foster 1996)*
Seosmulta	<i>L. longbeachae</i>	–	P, Y	(Dhillon, Bastiampillai, and Hong 2009)
Seosmulta	<i>L. longbeachae</i>	–	P	(Hannivoort and Vlaar 2017)
Seosmulta	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. cincinnatiensis</i> , <i>L. birminghamensis</i>	–	P, Y‡	(Koide et al. 1999)
Seosmulta#	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. cincinnatiensis</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. birminghamensis</i> , <i>L. oakridgensis</i>	10 ² –10 ⁴ pmy/ml	Y	(Koide, Arakaki, and Saito 2001)

Taulukko 2 jatkuu. Ympäristön, kasvualustojen ja kompostien legionellat ja legionelloosit.

Materiaali	Lajit	Pitoisuus	Potilas/ Ympäristö	Viite
Seosmulta	<i>L. longbeachae</i>	–	P	(Mentula et al. 2014)
Seosmulta	<i>L. longbeachae</i>	–	P, Y	(Potts et al. 2013)
Seosmulta	<i>L. longbeachae</i>	–	Y	(Ross, Mee, and Riley 1997)
Seosmulta	<i>L. longbeachae</i>	–	P	(Speers and Tribe 1994)*
Seosmulta	<i>L. longbeachae</i>	10 ² –10 ⁵ pmy/g	P, Y	(Steele, Lanser, and Sangster 1990)
Seosmulta	<i>Legionella</i> spp.	–	Y	(Whiley, Taylor, and Bentham 2011)
Seosmulta	<i>L. longbeachae</i>	–	P, Y	THL 2019
Seosmulta/komposti	<i>L. longbeachae</i> , <i>Legionella</i> spp.	–	P, Y	Anonymous 2000
Seosmulta/komposti	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. dumoffii</i> , <i>L. gormanii</i> , <i>L. jordanis</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. anisa</i>	10 ³ –10 ⁵ pmy/g	Y	(Velonakis et al. 2010)
Seosmulta/puutarhamulta	<i>L. pneumophila</i> , <i>Legionella</i> spp.	–	P, Y	(Schalk et al. 2014)
Puutarhamulta/komposti	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. quinlivanii</i> , <i>L. santicrucis</i> , <i>L. anisa</i> , <i>L. spp.</i>	10 ³ –10 ⁵ pmy/g	Y	(Hughes and Steele 1994)
Puutarhamulta/komposti	<i>L. longbeachae</i>	–	P, Y	(Kubota et al. 2007)*
Puutarhamulta	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. sainthelensi</i> , <i>L. cincinnatiensis</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. feeleei</i> , <i>L. wadsworthii</i> , <i>L. anisa</i>	–	P, Y†	(van Heijnsbergen et al. 2016)
Komposti	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. feeleei</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. longbeachae</i>	–	Y	(Conza, Pagani, and Gaia 2013)
Komposti	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. cincinnatiensis</i> , <i>L. feeleei</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. londiniensis</i> and <i>L. oakridgensis</i>	–	Y	(Conza, Casati Pagani, and Gaia 2014)
Komposti	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. sainthelensi</i> , <i>L. feeleei</i> , <i>L. birminghamensis</i> , <i>L. spiritensis</i> , <i>L. quateirensis</i> , <i>L. gormanii</i> , <i>Legionella</i> spp.	10 ⁴ pmy/g	Y	(Currie et al. 2013)
Komposti	<i>L. longbeachae</i>	10 ⁵ pmy/g	P, Y	(Lindsay et al. 2012)
Komposti	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. cincinnatiensis</i>	10 ³ pmy/g	Y	(McCabe et al. 2011)
Komposti	<i>L. longbeachae</i>	–	P	(Patten et al. 2010)
Komposti	<i>L. longbeachae</i>	10 ² –10 ⁵ pmy/g	P, Y	(Pravinkumar et al. 2010)
Kompostoituu puu	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. cincinnatiensis</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. gormanii</i> , <i>Legionella</i> spp.	10 ² –10 ⁵ pmy/ml	Y	(Koide, Arakaki, and Saito 2001)
Kompostoituu puun kuori	<i>Legionella</i> spp.	–	Y	(Steele, Moore, and Sangster 1990)
Kompostointilaitos	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. cincinnatiensis</i> , <i>L. jamestowniensis</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. oakridgensis</i>	10 ³ –10 ⁸ pmy/g	Y	(Casati et al. 2010)
Puu	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. micdadei</i> , <i>L. gormanii</i> , <i>L. longbeachae</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>Legionella</i> sp.	–	P, Y‡	(Koide et al. 1999)
Sahanpuru	<i>Legionella</i> spp.	–	Y	(Steele, Moore, and Sangster 1990)

Taulukko 2 jatkuu. Ympäristön, kasvualustojen ja kompostien legionellat ja legionelloosit.

Materiaali	Lajit	Pitoisuus	Potilas/Ympäristö	Viite
Nurmikkomulta	<i>L. longbeachae</i> , <i>L. bozemanii</i>	10 ⁶ pmy/g	P, Y	Kinnunen et al. 2017
Asuinympäristöt	<i>L. pneumophila</i> , <i>L. bozemanii</i> , <i>L. anisa</i> , <i>L. erythra</i> , <i>L. feeleeii</i> , <i>L. gormanii</i> , <i>L. quateirensis</i> , <i>L. quinlivanii</i> , <i>L. rubrilucens</i> , <i>L. sainthelensi</i> , <i>Legionella</i> spp.	–	P, Y†	(Travis et al. 2012)
(Puutarhatyöt)	<i>L. longbeachae</i>	–	P	(de Bruin et al. 2018)
(Puutarhatyöt)	<i>L. longbeachae</i>	–	P	(Kenagy et al. 2017)
(Puutarhatyöt)	<i>L. longbeachae</i>	–	P	(O’Connor et al. 2007)
(Puutarhatyöt)	<i>L. longbeachae</i>	–	P	(Okazaki et al. 1998)*
(Puutarhatyöt)	<i>L. longbeachae</i>	–	P	(Wei et al. 2014)
(Puutarhatyöt)	<i>L. longbeachae</i>	–	P	(Wright et al. 2012)

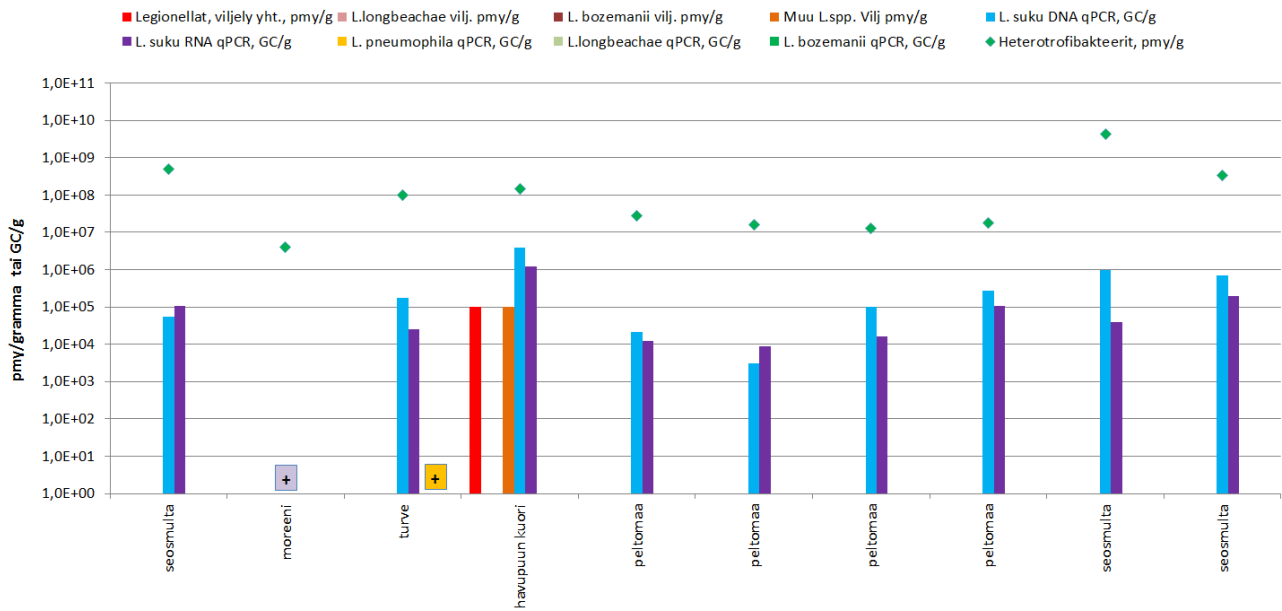
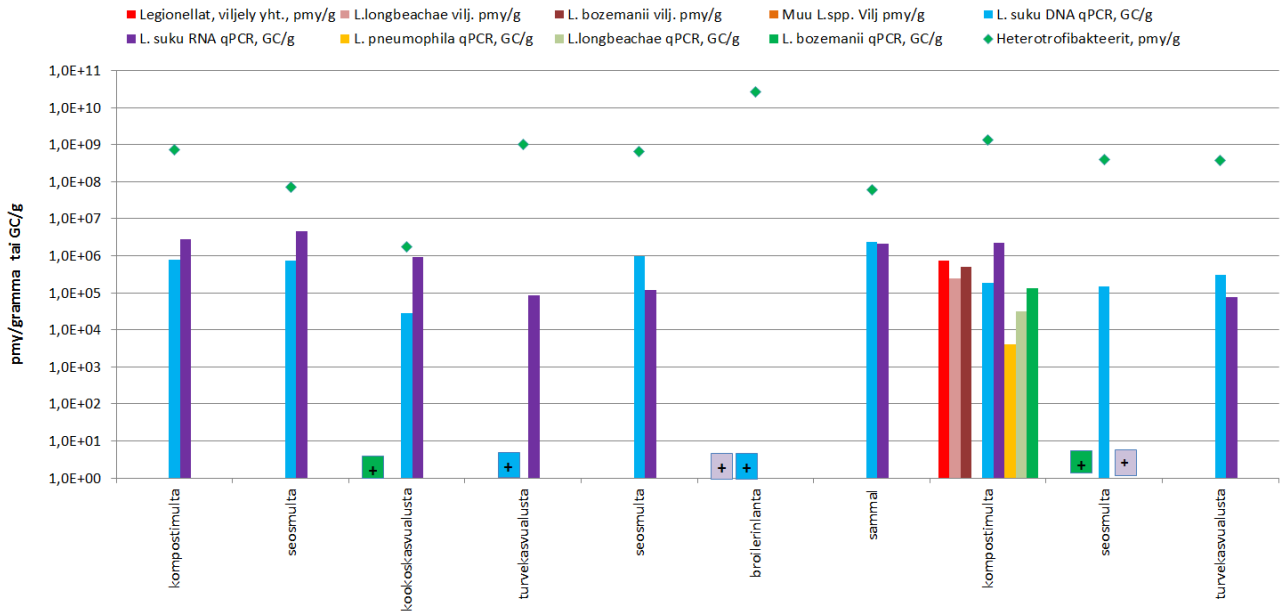
† Ympäristönäyte vastasi aiemmin tyytetyä potilasnäytettä. ‡ Ympäristönäytteen ei vahvistettu vastaavan potilasnäytettä. * *Cit.* (van Heijnsbergen 2017). § Turve, sammal ja hiekka negatiivisia. # Turve ja savi negatiivisia.

3.2.2 Legionellat kasvualustoissa, raaka-aineissa ja ympäristössä

Tutkimushankkeen kokeellisessa työssä havaittiin legionelloja viljellen vain kahdesta näytteestä tutkituista 20 alkuperäisestä näytteestä ja yhdestä toistamiseen tutkitusta säilytetystä näytteestä. Eri qPCR-menetelmillä havaittiin legionelloja jokaisesta näytteestä (Kuva 1).

Taulukkoon 3 on koottu legionellapositiiviset näytteet eri menetelmillä todettuina. Tutkittava kiinteä matriisi osoittautui haastavaksi, koska muuta mikrobikasvustoa kasvoi maljoilla määrällisesti legionelloja huomattavasti enemmän ja nopeammin. Näin ollen osa muista mikrobeista saattoi myös estää legionellojen kasvua tehokkaasti erittämillään aineenvaihduntatuotteilla eli viljelymenetelmällä todennäköisesti saatiin paljon vääriä negatiivisia tuloksia.

Myös qPCR-analyyseissä oli haasteita johtuen näytematriisista. Osassa näytteistä oli havaittavissa näytematriisista johtuvaa inhibitiota. QPCR-menetelmä osoittautui kuitenkin viljelymenetelmää luotettavammaksi, koska sillä saatiin todennäköisemmin kiinni positiiviset legionellatulokset. Kun kaikki qPCR-menetelmät otettiin huomioon, jokaisesta näytteestä havaittiin jollain qPCR-menetelmällä legionelloja. Taulukkoon 3 on koottu myös keskiarvot, hajonnat, minimi- ja maksimi-arvot 20 näytteestä.



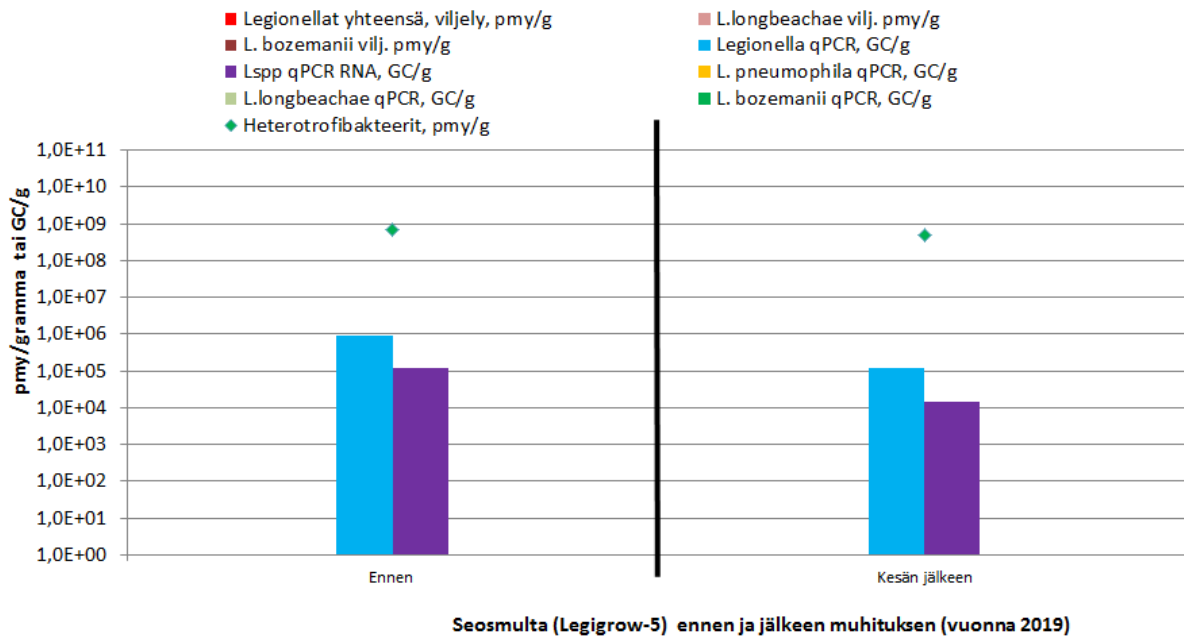
Tutkimuksen näytteet (N=20 näytettä vuonna 2019)

Kuva 1. Tutkittujen näytteiden legionellapitoisuudet ja heterotrofibakteeripitoisuudet. Kuvassa on tulokset menetelmistä, joista saatiin yksikin positiivinen löydös. Osa qPCR-tuloksista oli alle määrittäysrajan, vaikka legionelloja havaittiinkin. Nämä havainnot on merkitty laatikkomuodossa (+) kuvaan.

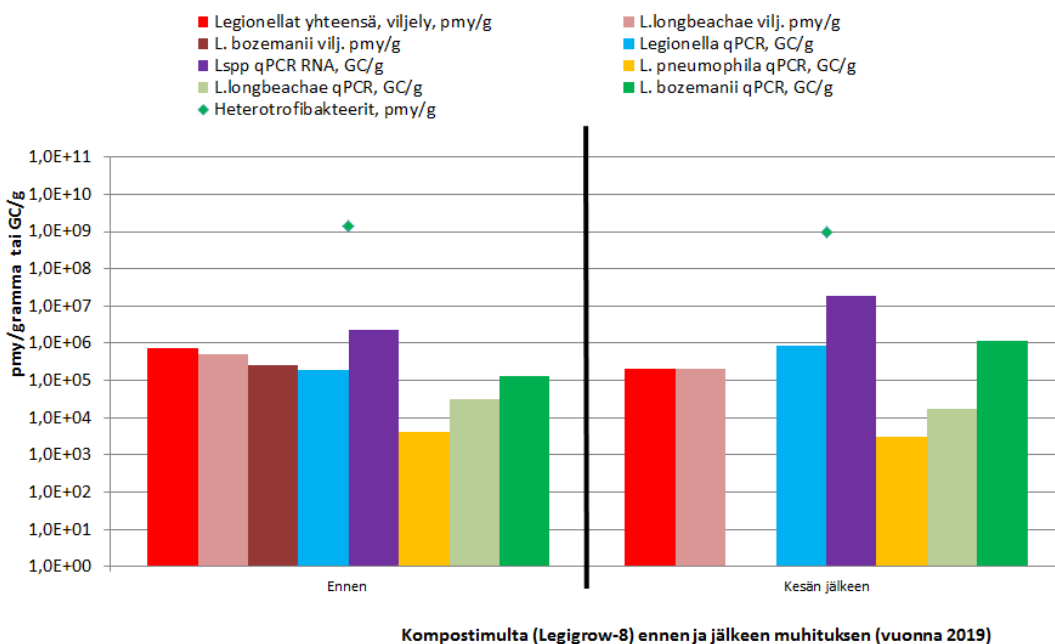
Taulukko 3. Mikrobiologiset tulokset aineistossa, N = 20.

Muuttuja	Positiiviset näytteet kpl (%)	Yksikkö	Minimi	Maksimi	Keskiarvo (aritmeettinen)	Hajonta
Legionellat, yhteensä, viljely	2 (10%)	pmy/g	0	7,5 x 10 ⁵	4,3 x 10 ⁴	1,7 x 10 ⁵
<i>Legionella pneumophila</i> seroryhmä 1, viljely	0 (0%)	pmy/g	0	0	0	0
<i>Legionella pneumophila</i> seroryhmät 2-14, viljely	0 (0%)	pmy/g	0	0	0	0
<i>Legionella</i> , muut lajit, viljely	1 (5%)	pmy/g	0	1,0 x 10 ⁵	5,0x 10 ³	2,2 x10 ⁴
<i>Legionella longbeachae</i> , viljely	1 (5%)	pmy/g	0	2,5x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁴	5,6 x 10 ⁴
<i>Legionella bozemanii</i> , viljely	1 (5%)	pmy/g	0	5,0 x 10 ⁵	2,5 x 10 ⁴	1,1 x 10 ⁵
<i>Legionella</i> -suku, 16S-RNA, qPCR	19 (95%)	GC/g	4,0 x 10 ³	4,6 x 10 ⁶	7,3 x 10 ⁵	1,3 x 10 ⁶
<i>Legionella</i> -suku, 23S-DNA, qPCR	19 (95%)	GC/g	0	3,8 x 10 ⁶	5,8 x 10 ⁵	9,4 x 10 ⁵
<i>Legionella pneumophila</i> , seroryhmät 1-15, qPCR	2 (10%)	GC/g	0	4,1 x 10 ³	2,7 x 10 ²	9,4 x 10 ²
<i>Legionella pneumophila</i> , seroryhmä 1, qPCR	0 (0%)	GC/g	0	0	0	0
<i>Legionella longbeachae</i> , qPCR	1 (5%)	GC/g	0	3,1 x 10 ⁴	1,6 x 10 ³	6,9 x 10 ³
<i>Legionella bozemanii</i> , qPCR	3 (15%)	GC/g	0	1,3 x 10 ⁵	6,6 x 10 ³	2,9 x 10 ⁴
Heterotrofiset bakteerit, viljely	20 (100%)	pmy/g	1,8 x 10 ⁶	2,8 x 10 ¹⁰	1,9 x 10 ⁹	6,2 x 10 ⁹

Kuvissa 2–3 on kahden muhitetun näytteen legionellapitoisuudet. Muhituksen aikana legionellapitoisuudet sekä pienenivät että suurenivat.



Kuva 2. Säilytyksen vaikutus seosmultanäytteen legionellapitoisuuksiin. Pitoisuuksissa havaittiin alle kertaluokan pienenemistä (-88 %) säilytyksen aikana. Näytteen heterotrofibakteeripitoisuus pieneni (-28 %).



Kuva 3. Säilytyksen vaikutus kompostimultanäytteen legionellapitoisuuksiin. Legionellapitoisuuksissa havaittiin sekä pienenemistä (-28 – -100 %) että suurenemista (+300–+820 %) säilytyksen aikana riippuen analysimenetelmästä ja *Legionella*-lajista. Heterotrofibakteerien pitoisuus pieneni (-29 %).

3.2.3 Tilastolliset analyysit

Tilastoanalyysien avulla selvitettiin eri legionellapitoisuuksien mahdollista riippuvuutta ja jakautumista eri näytetyypeissä.

3.2.4 Spearmanin korrelaatio

Spearmanin korrelaatiotestin tulokset ovat taulukossa 4. Eri legionellamuuttujat (määrittymenetelmät) korreloivat vaihtelevasti keskenään. Heterotrofiset bakteeripitoisuudet eivät korreloineet legionellapitoisuuksien kanssa lainkaan, ja niitä ei ole tässä esitetty.

Taulukko 4. Legionellamäärittysten viljely- ja qPCR-tulosten keskenäiset riippuvuudet eli korrelaatiot. Plusmerkkinen korrelaatiokerroin tarkoittaa samansuuntaista positiivista riippuvuutta, eli lisäävää vaikutusta ja suluissa on tilastollinen merkitsevyys ($p < 0,05^*$, $p < 0,01^{**}$ ja $p < 0,001^{***}$).

Muuttuja	<i>Legionella</i> -suku, 16S-RNA, qPCR	<i>Legionella</i> -suku, 23S-DNA, qPCR	<i>Legionella pneumophila</i> , seroryhmät 1-15, qPCR	<i>Legionella longbeachae</i> , qPCR	<i>Legionella bozemanii</i> , qPCR
Legionellat, yhteensä, viljely	+0,378	+0,276	+0,500 ($p=0,025^*$)	+0,725 ($p < 0,001^{***}$)	+0,397
<i>Legionella longbeachae</i> , viljely	+0,299	+0,020	+0,725 ($p < 0,001^{***}$)	+1,000 ($p < 0,001^{***}$)	+0,608 ($p=0,004^{**}$)
<i>Legionella bozemanii</i> , viljely	+0,299	+0,020	+0,725 ($p < 0,001^{***}$)	+1,000 ($p < 0,001^{***}$)	+0,608 ($p=0,004^{**}$)
<i>Legionella</i> , muut lajit, viljely	+0,219	+0,378	-0,076	-0,053	-0,096

Osa viljelytuloksista korreloi hyvin qPCR-tulosten kanssa, ja osa ei korreloinut lainkaan. Viljelypositiivisia näytteitä oli vähän, johtuen vaikeasta tutkittavasta matriisista, millä on voinut olla myös keskenäisen riippuvuuden selvittämiseen vaikutusta. Kun legionellojen viljelytuloksia testattiin keskenään, positiiviset korrelaatiot havaittiin seuraavien välillä: legionellojen yhteistulos-*L. longbeachae*, yhteistulos-*L. bozemanii*, yhteistulos-muut *Legionella*-lajit ja *L. longbeachae*-*L. bozemanii*. QPCR-tuloksista korreloivat keskenään *Legionella*-suku 23S-DNA-*Legionella*-suku 16S-RNA, *Legionella pneumophila* seroryhmät 1-15-*Legionella longbeachae*, ja *Legionella longbeachae*-*L. bozemanii*.

3.2.5 Ristiintaulukointi, Khiin neliötesti ja Fisherin eksaktitesti

Ristiintaulukoidusta näyttemateriaalista selvitettiin viljeltävien legionellojen ja qPCR-menetelmällä analysoitujen legionellojen esiintymistä ($on=1/ei=2$) eri luokissa ja esiintymiserojen tilastollista merkitsevyyttä Pearsonin khiin neliötestillä (Pearson Chi-Square) ja Fisherin eksaktitestillä (Fisher's Exact Test).

Legionellapositiiviset ja legionellanegetiiviset viljelytulokset ja qPCR-tulokset eivät jakautuneet eri näyttemateriaalityyppien (esim. turve, peltomaa) mukaan merkitsevällä tavalla. Sen sijaan eri raaka-aineiden esiintymisen ja legionellojen esiintymisen välillä havaittiin ristiintaulukoinnin avulla merkitsevää eroa. Puuaineksen esiintyminen materiaalissa saattoi liittyä legionellapositiiviseen

tulokseen (Taulukko 5). Taulukossa 5 1 tarkoittaa materiaalin esiintymistä, 2 sen puuttumista. Muilla legionellatuloksilla samaa jakautumista kuin puuaineksen mukaan ei havaittu, eikä muiden aineiden kanssa systemaattista jakautumista havaittu legionellaposiitivisten ja negatiivisten näytetulosten mukaan ryhmiteltynä.

Taulukko 5. Pearsonin khin neliötesti ($p=0,003$) ja Fisherin eksaktitesti ($p=0,032$) osoittivat että legionellaposiitivisten ja legionellanegatiivisten näytteiden jakautuminen puuaineksen esiintymisen mukaan oli tilastollisesti merkitsevää.

Crosstab

Count

		LEgViljYhtPA		Total
		1	2	
puuaines2	1	2	2	4
	2	0	16	16
Total		2	18	20

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymptotic Significance (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)	Point Probability
Pearson Chi-Square	8,889 ^a	1	,003	,032	,032	
Continuity Correction ^b	4,201	1	,040			
Likelihood Ratio	7,458	1	,006	,032	,032	
Fisher's Exact Test				,032	,032	
Linear-by-Linear Association	8,444 ^c	1	,004	,032	,032	,032
N of Valid Cases	20					

a. 3 cells (75,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is ,40.

b. Computed only for a 2x2 table

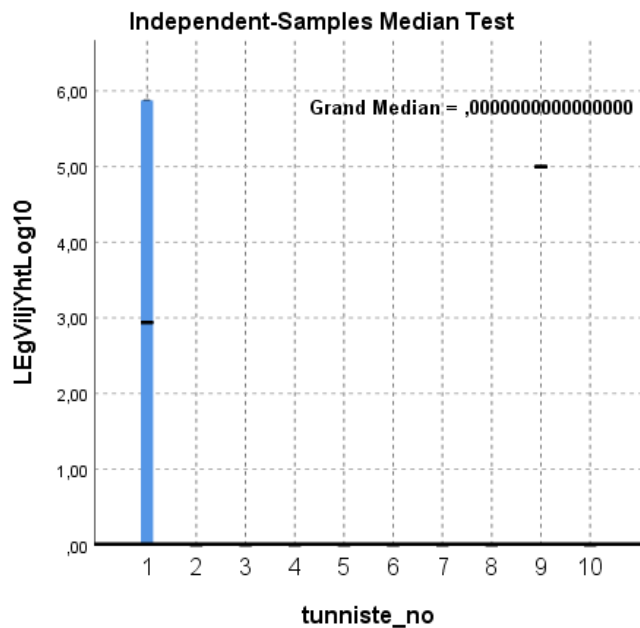
c. The standardized statistic is 2,906.

3.2.6 Mikrobipitoisuuksien vertailu näytetyypeittäin ja eri materiaalien näytteissä esiintymisen mukaan

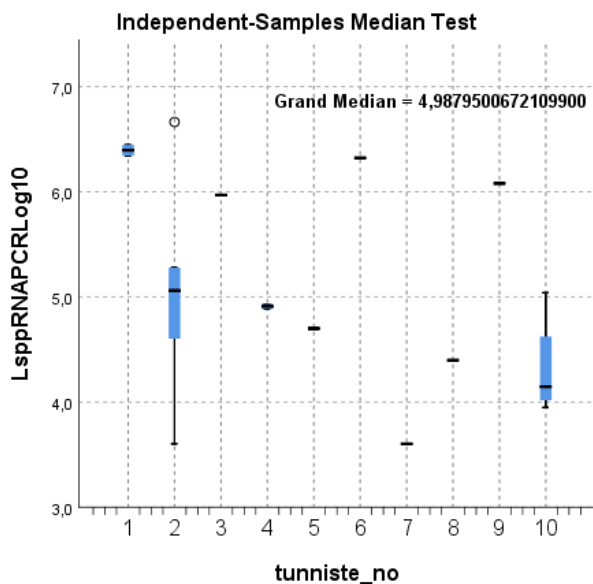
Kruskal-Wallis testillä ja mediaanitestillä testattiin miten mikrobipitoisuuksien mediaanitasot eli keskiluvun tasot vaihtelivat tutkimuksen aineistossa. Pitoisuudet eivät eronneet tilastollisesti merkitsevällä tavalla näytetyypin mukaan. Kuvassa 4 on legionellojen viljelytulokset yhteensä jaoteltuna eri näytetyypeittäin (tunniste_no). Suurimmat viljeltävien legionellojen pitoisuudet havaittiin kompostimullasta ja havupuun kuoresta. Kuvissa 5–6 on qPCR:llä analysoitujen elävien legionellojen (16S-RNA) ja kaikkien legionellojen (23S-DNA) pitoisuustasot näytetyypeittäin. *Legionella*-suvun 16S-RNA:n suurimmat pitoisuudet havaittiin kompostimullasta, havupuun kuoresta, kookoskasvualustasta ja sammaleesta. *Legionella*-suvun 23S-DNA suurimmat pitoisuudet havaittiin kompostimullasta, seosmullasta, havupuun kuoresta ja sammaleesta.

Kuvassa 7 on heterotrofibakteerien pitoisuudet näytetyypeittäin. Heterotrofibakteereja oli eniten broilerin lannassa.

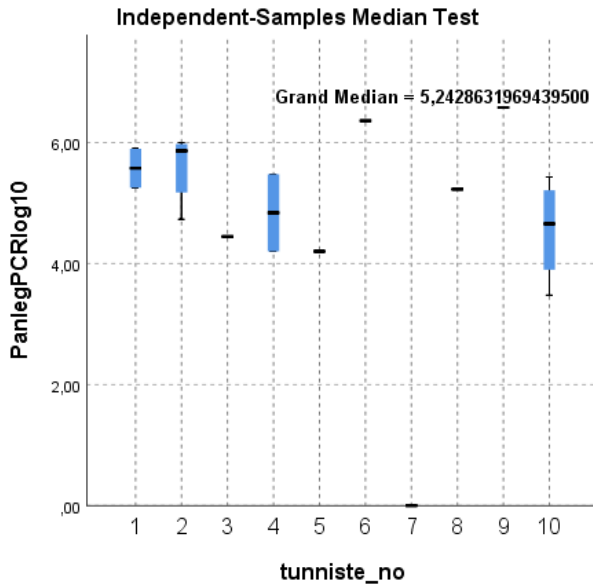
Mediaanitaso tarkoittaa sitä pitoisuutta, jonka alle jää 50% näytteistä (merkitty kuvaan Grand Median).



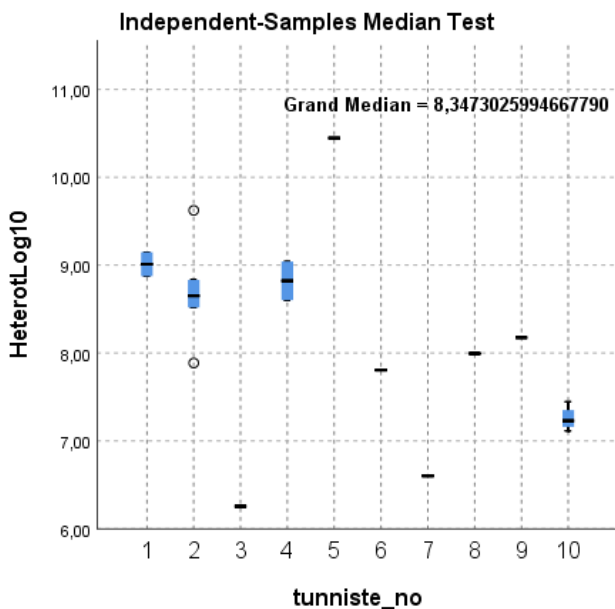
Kuva 4. Viljeltävien legionellojen pitoisuuksista lasketut pitoisuustasot logaritmisella asteikolla näytetyypeittäin (1=kompostimulta, 2=seosmulta, 3=kookoskasvualusta, 4=turvekasvualusta, 5=broilerinlanta, 6=sammal, 7=moreeni, 8=turve, 9=havupuun kuori ja 10=peltomaa). Huom. logaritminen asteikko, pmy/g).



Kuva 5. qPCR:llä määritettyjen elävien legionellojen pitoisuuksista (*Legionella*-suku, 16S-RNA, qPCR) lasketut pitoisuustasot logaritmisella asteikolla eri näytetyypeittäin (1=kompostimulta, 2=seosmulta, 3=kookoskasvualusta, 4=turvekasvualusta, 5=broilerinlanta, 6=sammal, 7=moreeni, 8=turve, 9=havupuun kuori ja 10=peltomaa). Huom. logaritminen asteikko, GC/g).



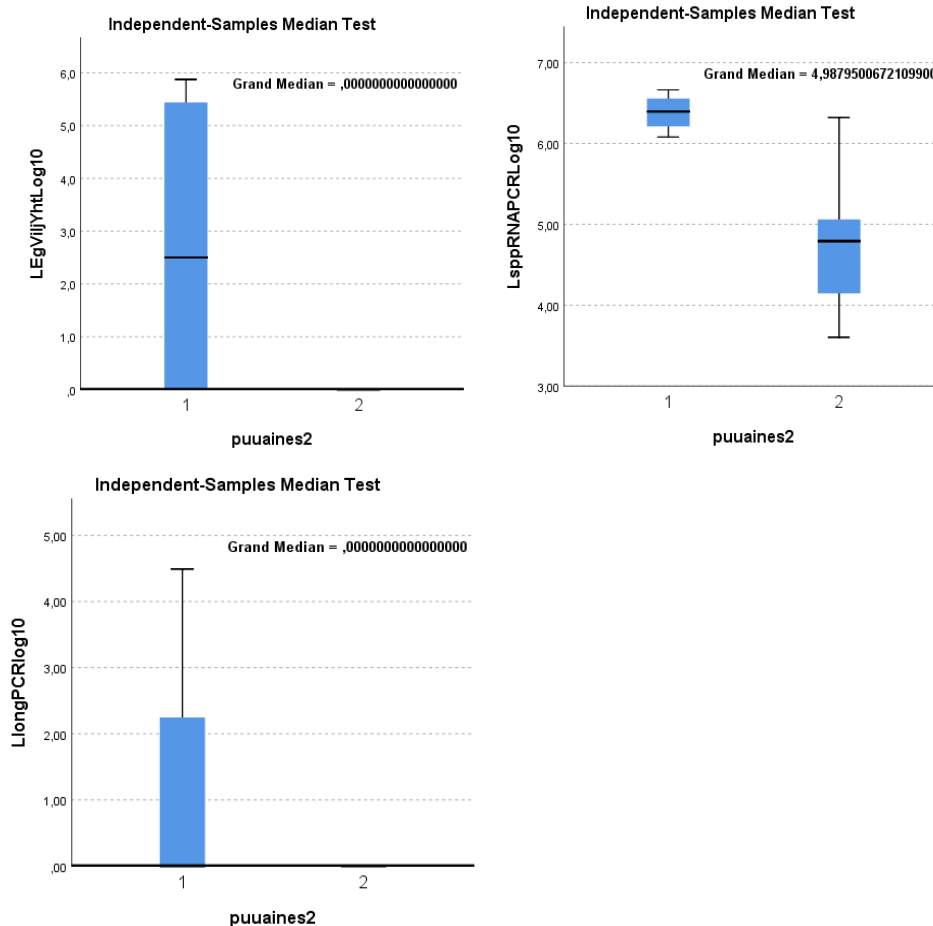
Kuva 6. QPCR:llä määritettyjen legionellojen pitoisuuksista (*Legionella*-suku, 23S-DNA, qPCR) lasketut pitoisuustasot logaritmisella asteikolla eri näytetyypeittäin (1=kompostimulta, 2=seosmulta, 3=kookoskasvualusta, 4=turvekasvualusta, 5=broilerinlanta, 6=sammal, 7=moreeni, 8=turve, 9=havupuun kuori ja 10=peltomaa). Huom. logaritminen asteikko, GC/g).



Kuva 7. Viljelemällä määritettyjen heterotrofibakteerien pitoisuuksista lasketut pitoisuustasot logaritmisella asteikolla eri näytetyypeittäin (1=kompostimulta, 2=seosmulta, 3=kookoskasvualusta, 4=turvekasvualusta, 5=broilerinlanta, 6=sammal, 7=moreeni, 8=turve, 9=havupuun kuori ja 10=peltomaa). Huom. logaritminen asteikko, pmy/g).

Kruskal-Wallis testillä ja mediaanitestillä tarkasteltiin mikrobipitoisuuksien mediaanitasojen eli keskiluvun tasojen vaihtelua tutkimuksessa mukana olevien eri näyttemateriaalien mukaan.

Kuvassa 8 on legionellapitoisuustuloksia jaoteltuna näytteessä olevan puuaineksen mukaan (puuaines2). Pitoisuudet erosivat tilastollisesti merkitsevällä tavalla viljeltävien legionellojen, qPCR:n RNA-tulosten ja *L. longbeachae* tulosten osalta eli legionellapitoisuudet olivat tilastollisesti merkitsevästi suurempia silloin kun puuainesta oli näytteen mukana.



Kuva 8. Viljeltävien legionellojen, elävien qPCR:llä analysoitujen legionellojen (*Legionella*-suku, 16S-RNA, qPCR) ja qPCR:llä analysoitujen *Legionella longbeachae*-lajin legionellojen (*Legionella longbeachae*, qPCR) pitoisuuksista lasketut pitoisuustasot logaritmisella asteikolla sen mukaan onko aineksissa mukana puuainesta (1=on, 2=ei). Huom. logaritminen asteikko, pmy/g. Viljeltävien legionellojen pitoisuudet erosivat tilastollisesti merkitsevällä tavalla siten, että Kruskal-Wallis testillä merkitsevyys p oli 0,004** ja mediaanitestillä $p=0,032^*$. Elävien qPCR:llä analysoitujen legionellojen (*Legionella*-suku, 16S-RNA, qPCR) jakautumisessa ovat erot havaittiin Kruskal-Wallis testillä ($p=0,003^{**}$) samoin kuin erot *Legionella longbeachae* (qPCR) jakautumisessa (Kruskal-Wallis testillä, $p=0,046^*$).

Turvetta sisältävien näytteiden heterotrofibakteeripitoisuus oli suurempi kuin ilman turveta olevissa näytteissä (Kruskal-Wallis testillä, $p=0,010^*$ ja mediaanitestillä, $p=0,020^*$). Peltomaanäytteiden heterotrofibakteeripitoisuus oli pienempi kuin muissa näytteessä (Kruskal-Wallis testillä,

$p=0,023^*$, mediaanitesti, $p=0,087$). Ulosteita sisältävässä materiaalissa oli mukana enemmän heterotrofibakteereja kuin muissa materiaaleissa. (Kruskal-Wallis-testi, $p=0,021^*$ ja mediaanitesti, $p=0,033^*$). Tulosten perusteella voidaan sanoa, että peltomaanäytteissä oli keskimäärin vähemmän, ja turpeessa ja ulostemateriaaleissa enemmän heterotrofibakteereja kuin muissa materiaaleissa.

Sammaleen, epäorgaanisen aineksen kuten kalkin ja kiviaineksen esiintyminen näytteissä ei vaikuttanut näytteiden legionellapitoisuuksiin. Myös vuodenaika ja näytteenottokohde eivät vaikuttaneet mikrobien tuloksiin.

3.3 Toteutusvaiheen arviointi

Tutkimuksen toteutus onnistui hyvin koska pystyimme hyödyntämään hankkeessa jo aikaisemmin saatuja tuloksia (YM rahoittamat esiselvitystyö sekä Legisafe-hanke). Legisafe-hankkeessa oli myös samat laboratoriot ja lähes sama henkilöstö, joten tutkimusyhteistyö sujui hyvin. Näytteiden saatavuus onnistui myös pääasiassa hyvin, vaikka näytevalikoimaa jouduttiin muokkaamaan alkuperäisestä suunnitelmasta tuontikasvualustojen heikon saatavuuden takia. Myönnetty rahoitus määräsi pitkälti analysoitavien näytteiden lukumäärän, vaikuttaen muun muassa tulosten tilastolliseen edustavuuteen.

Tutkimuksessa käytetyn analytiikan osalta työ onnistui hyvin koska tutkimuksen alussa pystyttiin hyödyntämään Legisafe-hankkeesta saatua tietoa liittyen näytteen käsittelyyn ja legionellabakteerin määrittämiseen eri menetelmillä. Näin ollen legionelloja havaittiin lopulta kaikista tässä tutkimuksessa analysoiduista näytteistä. Tällä laajalla analyysivalikoimalla voitiin estää vääriä negatiiviset legionellatulokset ja niistä johtuvat virheet, sillä näytematriisin hankaluuden vuoksi pelkästään viljelymenetelmällä ei päästä riittävään selvyyteen legionellojen esiintymisestä, vaan qPCR-menetelmät ovat välttämättömiä oikeiden tulosten saamisessa.

3.4 Julkaisut

Osa hankkeen julkaisuista on yhteisiä samaan aikaan käynnissä olevan Legisafe-hankkeen kanssa. Hankkeista tiedotettiin [Ruokaviraston](#) ja THL:n verkkosivuilla. Keväällä 2.4.2020 julkaistiin erityisesti kuluttajille suunnattu [Ruokaviraston tiedote](#). Hankkeen tuloksista ja legionellalta suojautumisesta kirjoitettiin artikkeli, joka julkaistiin [biokierto.fi](#) ja [puutarha.net](#) verkkosivuilla 3.6. ja 8.6.2020. Lisäksi kesällä 2020 julkaistaan Ruokaviraston verkkosivuilla työturvallisuusohjeet maanparannusaineiden ja kasvualustojen käsittelijöille legionellabakteerilta suojautumisen varalle. Hankkeen tuloksista kerrotaan myös Ruokaviraston tutkimusseminaarissa syksyllä 2020. Hankkeen pääjulkaisun valmistuminen ajoittuu vuosille 2020-2021 yhdessä Legisafe-hankkeen aineiston kanssa.

4. Tulosten arviointi

4.1 Tulosten käytännön sovelluskelpoisuus

Hankkeen avulla haluttiin tunnistaa raaka-aineita, joita käyttämällä kasvualustojen legionellapitoisuutta voitaisiin hallita. Puuaineksen esiintyminen näytteissä näytti liittyvän erilaisten legionellojen suurempiin pitoisuuksiin ja tätä tulosta pyritään vielä jatkossa varmistamaan Legisafe-projektin isommasta näytemäärästä. Hankkeessa kerätyn kirjallisuuden ja kokeellisten tulosten perusteella legionellabakteerit ovat yleisiä kaikissa materiaaleissa ja ekosysteemeissä. Pienetkin bakteerimäärät voivat kasvaa mikrobiaktiivisuuden lisääntyessä, kuten esimerkiksi kompostoinnin tai mädätyksen yhteydessä tai lämpimissä ja kosteissa olosuhteissa puutarhassa tai kasvihuoneessa.

Orgaanisen aineen hajotus kasveille käyttökelpoiseen muotoon on monimutkainen mikrobiologinen prosessi, jossa olosuhteet, raaka-aineet ja mikrobien keskinäiset vuorovaikutukset määräävät lopputuloksen. Nykyisistä julkaistuista tutkimuksista legionellan esiintymisestä tietyissä raaka-aineissa tai tietyn alkueläinlajin ja legionellan vuorovaikutuksesta yksinkertaistetuissa laboratorio-olosuhteissa ei voi vetää johtopäätöksiä legionellan lisääntymisestä näissä prosesseista. Tutkimusta olisi laajennettava ymmärtämään koko systeemin ekologiaa, jos legionellojen määrää pyritään hallitsemaan. Esimerkiksi lämpötilan tiedetään edistävän legionellamäärän kasvua, mutta hankkeessa tutkittujen kahden erityyppisen näytteen muhutus lämpimässä nosti toisen näytteen legionellapitoisuutta, kun taas toisen näytteen legionellapitoisuus pieneni. Auringonpaisteen aiheuttamaa lämpötilaa kuumempien lämpötilojen vaikutusta legionellapitoisuuksiin selvitetään rinnakkaisessa Legisafe-hankkeessa.

Nykytiedon mukaan legionellat ovat luontainen osa ympäristöä, kasvualustojen raaka-ainetta ja valmistusprosessia. Legionellalle altistuvat työntekijät on huomioitu työturvallisuuslaissa. Legionellamäärien rajoittaminen kasvualustoissa lainsäädännöllisin keinoin on vaikea perustella, koska ympäristön eri materiaalien legionellapitoisuudet ylittävät usein vesijärjestelmille asetut rajat moninkertaisesti, eikä haitallisen annoksen määrää tunneta. Tiedottaminen ja turvallisiin työtapoihin ohjeistaminen on tällä hetkellä todennäköisesti toteuttamiskelpoisin ratkaisu multamaisista tuotteista johtuvien vakavien sairastumisten ennalta ehkäisemiseen.

4.2 Tulosten tieteellinen merkitys

Legionelloja havaittiin poikkeuksetta kaikissa näytteissä ainakin jollain käytetyistä analyysimenetelmistä. Tämä tulos laajentaa aikaisempaa käsitystä legionellojen esiintymisestä. Aikaisemmista julkaistuista tutkimuksista poiketen myös turpeesta, sammaleesta ja hiekasta havaittiin legionelloja. Lisäksi legionelloja todettiin kookoskasvualustassa ja broilerin lannassa, joita ei ole aiemmin legionellojen osalta tutkittu. Tutkitussa näytemateriaalissa oleva legionellapopulaatio, muu mikrobiyhteisö, ravinteet ja ulkoiset olosuhteet kuten tuotteen säilytyslämpötila vaikuttavat siihen, miten ajan kuluessa legionellapitoisuudet muuttuvat materiaalien säilytyksen aikana. Vähäisen näytemäärän vuoksi tulosten uusittavuus pitäisi varmistaa uusintakokeilla.

Mikäli legionellapitoisuuden hallitseminen kasvualustojen valmistuksessa on ylipäänsä mahdollista, olisi ymmärrettävä kuinka raaka-aine, prosessin olosuhteet ja muut mikrobit, joista legionellojen kasvu tai väheneminen loppujen lopuksi riippuvat, vaikuttavat tuotteen legionellapitoisuuteen. Asian selvittämiseksi tulisi keskittyä muutamien yleisimpien raaka-aineiden ja käsittelyprosessien aiheuttamien legionellapitoisuuksien tutkimiseen ja varmistaa tulokset rinnakkaisilla näytteillä. Siihen yhteyteen olisi hyvä kehittää myös molekyylibiologiaan perustuvaa alkueläinanalytiikkaa, sillä alkueläinten esiintymisellä voi olla oleellinen rooli legionellojen selviämisessä ja lisääntymisessä näissä aineksissa.

5. Kiitokset

Kiitämme THL:n Vesimikrobiologian laboratoriosta Marjo Tiittasta, Kati Julinia ja Ulla Usvalinnaa ja Ruokaviraston Kasvianalytiikan yksikön laboratoriosta Leena Kaarlaa ja Salla Pelkosta merkittävästä työpanoksesta tässä tutkimuksessa. Lisäksi kiitämme Kirsi Korhosta ja Tiina Räisästä (THL) ja Sinikka Koivuniemeä (Ruokavirasto) avusta eri vaiheissa hankkeen taloudenpidossa.

6. Lähteet

- Addiss, D. G., J. P. Davis, M. LaVenture, P. J. Wand, M. A. Hutchinson, and R. M. McKinney. 1989. "Community-Acquired Legionnaires' Disease Associated with a Cooling Tower: Evidence for Longer-Distance Transport of *Legionella Pneumophila*." *American Journal of Epidemiology* 130 (3): 557–68. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a115370>.
- Amemura-Maekawa, J., K. Kikukawa, J. H. Helbig, S. Kaneko, A. Suzuki-Hashimoto, K. Furuhashi, B. Chang, et al. 2012. "Distribution of Monoclonal Antibody Subgroups and Sequence-Based Types among *Legionella Pneumophila* Serogroup 1 Isolates Derived from Cooling Tower Water, Bathwater, and Soil in Japan." *Applied and Environmental Microbiology* 78 (12): 4263–70. <https://doi.org/10.1128/AEM.06869-11>.
- Anonymous. 2000. Centers for Disease Control and Prevention. Legionnaires' Disease associated with potting soil - California, Oregon, and Washington, May–June 2000. *Morbidity and Mortality Weekly Report* 49:777–778.
- Berk, S. G., G. Faulkner, E. Garduño, M.C. Joy, M.A. Ortiz-Jimenez, and R. A. Garduño. 2008. "Packaging of Live *Legionella Pneumophila* into Pellets Expelled by *Tetrahymena* Spp. Does Not Require Bacterial Replication and Depends on a Dot/Icm-Mediated Survival Mechanism." *Applied and Environmental Microbiology* 74 (7): 2187–99. <https://doi.org/10.1128/AEM.01214-07>.
- Boamah, D.K., G. Zhou, A.W. Ensminger, and T. J. O'Connor. 2017. "From Many Hosts, One Accidental Pathogen: The Diverse Protozoan Hosts of Legionella." *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* 7. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00477>.
- Boer, J. W. den, E. P. F. Yzerman, R. Jansen, J. P. Bruin, L. P. B. Verhoef, G. Neve, and K. Van der Zwaluw. 2007. "Legionnaires' Disease and Gardening." *Clinical Microbiology and Infection* 13 (1): 88–91. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2006.01562.x>.
- Bonanomi, G., F. De Filippis, G. Cesarano, A. La Stora, M. Zotti, S. Mazzoleni, and G. Incerti. 2019. "Linking Bacterial and Eukaryotic Microbiota to Litter Chemistry: Combining next Generation Sequencing with ¹³C CPMAS NMR Spectroscopy." *Soil Biology and Biochemistry* 129 (February): 110–21. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2018.11.013>.
- Bruin, L. de, C. P. Timmerman, P. M. Huisman, and J. Heidt. 2018. "Legionella Longbeachae; Don't Miss It!" *The Netherlands Journal of Medicine* 76 (6): 294–97.
- Casati, S., L. Conza, J. Bruin, and V. Gaia. 2010. "Compost Facilities as a Reservoir of Legionella Pneumophila and Other Legionella Species." *Clinical Microbiology and Infection* 16 (7): 945–47. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.03009.x>.
- Casati, S., A. Gioria-Martinoni, and V. Gaia. 2009. "Commercial Potting Soils as an Alternative Infection Source of Legionella Pneumophila and Other Legionella Species in Switzerland." *Clinical Microbiology and Infection* 15 (6): 571–75. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02742.x>.
- Cirillo, J. D., S. Falkow, and L. S. Tompkins. 1994. "Growth of Legionella Pneumophila in Acanthamoeba Castellani Enhances Invasion." *Infection and Immunity* 62 (8): 3254–61. <https://doi.org/10.1128/IAI.62.8.3254-3261.1994>.
- Clarholm, M. 1981. "Protozoan Grazing of Bacteria in Soil—Impact and Importance." *Microbial Ecology* 7 (4): 343–50. <https://doi.org/10.1007/BF02341429>.
- Conwill, D.E., S. B. Werner, S.K. Dritz, M. Bissett, E. Coffey, G. Nygaard, L. Bradford, F.R. Morrison, and M. W. Knight. 1982. "Legionellosis - The 1980 San Francisco Outbreak." *American Review of Respiratory Disease* 126 (4): 666–69. <https://doi.org/10.1164/arrd.1982.126.4.666>.
- Conza, L., S. Casati Pagani, and V. Gaia. 2014. "Influence of Climate and Geography on the Occurrence of Legionella and Amoebae in Composting Facilities." *BMC Research Notes* 7 (1): 831. <https://doi.org/10.1186/1756-0500-7-831>.

- Conza, L., S. Casati, and V. Gaia. 2013. "Detection Limits of *Legionella Pneumophila* in Environmental Samples after Co-Culture with *Acanthamoeba Polyphaga*." *Bmc Microbiology* 13 (February): 49. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-13-49>.
- Conza, L., S. Casati Pagani, and V. Gaia. 2013. "Presence of Legionella and Free-Living Amoebae in Composts and Bioaerosols from Composting Facilities." *PLOS ONE* 8 (7): e68244. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0068244>.
- Cordes, L.G., D.W. Fraser, P. Skaliy, C.A. Perlino, W.R. Elsea, G.F. Mallison, and P.S. Hayes. 1980. "Legionnaires' Disease Outbreak at an Atlanta, Georgia, Country Club: Evidence For Spread from an Evaporative Condenser." *American Journal of Epidemiology* 111 (4): 425–31. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a112917>.
- Cramp, G. J., D. Harte, N. M. Douglas, F. Graham, M. Schousboe, and K. Sykes. 2010. "An Outbreak of Pontiac Fever Due to *Legionella Longbeachae* Serogroup 2 Found in Potting Mix in a Horticultural Nursery in New Zealand." *Epidemiology & Infection* 138 (1): 15–20. <https://doi.org/10.1017/S0950268809990835>.
- Cross, K.E., J.W. Mercante, A. J. Benitez, E. W. Brown, M. H. Diaz, and J. M. Winchell. 2016. "Simultaneous detection of *Legionella* species and *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae* and *L. micdadei* using conserved primers and multiple probes in a multiplex real-time PCR assay." *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 85(3): 295–301. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2016.03.022>.
- Currie, S. L., T. K. Beattie, C. W. Knapp, and D. S. J. Lindsay. 2013. "*Legionella* Spp. in UK Composts—a Potential Public Health Issue?" *Clinical Microbiology and Infection* 20 (4): O224–29. <https://doi.org/10.1111/1469-0691.12381>.
- DeWit, D., D. Guy, and K. Foster. 1996. "Recurrent *Legionella Longbeachae* Pneumonia Associated with Re-Exposure to Potting Soil?" *Australian and New Zealand Journal of Medicine* 26 (6): 856–57. <https://doi.org/10.1111/j.1445-5994.1996.tb00644.x>.
- Dhillon, R., T. Bastiampillai, and S. Hong. 2009. "An Unusual Case of Hospital-Acquired Infection: *Legionella Longbeachae*." *Australasian Psychiatry* 17 (4): 337–38. <https://doi.org/10.1080/10398560802673022>.
- Dopheide, A., G. Lear, R. Stott, and G. Lewis. 2009. "Relative Diversity and Community Structure of Ciliates in Stream Biofilms According to Molecular and Microscopy Methods." *Applied and Environmental Microbiology* 75 (16): 5261–72. <https://doi.org/10.1128/AEM.00412-09>.
- Edelstein, P.H. 1993. "Legionnaires' Disease." *Clinical Infectious Diseases* 16 (6): 741–49. <https://doi.org/10.1093/clind/16.6.741>.
- Eng, R. H., M. Rothkopf, S. M. Smith, Y. Shah, E. Perez, and S. C. McDearman. 1984. "Legionnaires' Disease in a Gravedigger. An Epidemiologic Study." *New York State Journal of Medicine* 84 (5): 238–40.
- European Guidelines Working Group: Lee S, S. Crespi, J. Kusnetsov, J. Lee, B. de Jong, M.L. Ricci, W. van der Lugt, E. Veschetti, and J. Walker. 2017. European Technical Guidelines for the Prevention, Control and Investigation of Infections Caused by *Legionella* species. https://www.escmid.org/fileadmin/src/media/PDFs/3Research_Projects/ESGLI/ESGLI_European_Technical_Guidelines_for_the_Prevention_Control_and_Investigation_of_Infections_Caused_by_Legionella_species_June_2017.pdf
- Ewann, F., and P.S. Hoffman. 2006. "Cysteine Metabolism in *Legionella Pneumophila*: Characterization of an l-Cystine-Utilizing Mutant." *Applied and Environmental Microbiology* 72 (6): 3993–4000. <https://doi.org/10.1128/AEM.00684-06>.
- Fields, B S, E. B. Shotts, J. C. Feeley, G. W. Gorman, and W. T. Martin. 1984. "Proliferation of *Legionella Pneumophila* as an Intracellular Parasite of the Ciliated Protozoan *Tetrahymena Pyriformis*." *Applied and Environmental Microbiology* 47 (3): 467–71.

- Foissner, W. 1998. "An Updated Compilation of World Soil Ciliates (Protozoa, Ciliophora), with Ecological Notes, New Records, and Descriptions of New Species." *European Journal of Protistology* 34 (2): 195–235. [https://doi.org/10.1016/S0932-4739\(98\)80028-X](https://doi.org/10.1016/S0932-4739(98)80028-X).
- Garduño, R.A., E. Garduño, M. Hiltz, and P. S. Hoffman. 2002. "Intracellular Growth of *Legionella Pneumophila* Gives Rise to a Differentiated Form Dissimilar to Stationary-Phase Forms." *Infection and Immunity* 70 (11): 6273–83. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.11.6273-6283.2002>.
- Graells, T., H. Ishak, M. Larsson, and L. Guy. 2018. "The All-Intracellular Order Legionellales Is Unexpectedly Diverse, Globally Distributed and Lowly Abundant." *FEMS Microbiology Ecology* 94 (12). <https://doi.org/10.1093/femsec/fiy185>.
- Haley, C. E., M. L. Cohen, J. Halter, and R. D. Meyer. 1979. "Nosocomial Legionnaires' Disease: A Continuing Common-Source Epidemic at Wadsworth Medical Center." *Annals of Internal Medicine* 90 (4): 583–86. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-90-4-583>.
- Hannivoort, R. A., and A. P. J. Vlaar. 2017. "Do You Harvest What You Sow?" *Netherlands Journal of Critical Care* 25 (4): 128+.
- Heijnsbergen, E van. 2017. "Alternative Sources of *Legionella* Bacteria." Dissertation. <http://dspace.library.uu.nl/handle/1874/357828>.
- Heijnsbergen, E. van, A. van Deursen, M. Bouwknecht, J. P. Bruin, A. M. de Roda Husman, and J. A. C. Schalk. 2016. "Presence and Persistence of Viable, Clinically Relevant *Legionella Pneumophila* Bacteria in Garden Soil in the Netherlands." *Applied and Environmental Microbiology* 82 (17): 5125–31. <https://doi.org/10.1128/AEM.00595-16>.
- Heijnsbergen, E. van, A. M. de Roda Husman, W. J. Lodder, M. Bouwknecht, A. E. Docters van Leeuwen, J. P. Bruin, S. M. Euser, J. W. den Boer, and J. a. C. Schalk. 2014. "Viable *Legionella Pneumophila* Bacteria in Natural Soil and Rainwater Puddles." *Journal of Applied Microbiology* 117 (3): 882–90. <https://doi.org/10.1111/jam.12559>.
- Hellinga, J.R., R.A. Garduño, J.D. Kormish, J. R. Tanner, D. Khan, K. Buchko, C. Jimenez, M. M. Pinette, and A.K.C. Brassinga. 2015. "Identification of Vacuoles Containing Extraintestinal Differentiated Forms of *Legionella Pneumophila* in Colonized Caenorhabditis Elegans Soil Nematodes." *Microbiology Open* 4 (4): 660–81. <https://doi.org/10.1002/mbo3.271>.
- Hughes, M. S., and T. W. Steele. 1994. "Occurrence and Distribution of *Legionella* Species in Composted Plant Materials." *Applied and Environmental Microbiology* 60 (6): 2003–5.
- Inkinen, J., B. Jayaprakash, S. Siponen, A.-M. Hokajärvi, A. Pursiainen, J. Ikonen, I. Ryzhikov, M. Täubel, A. Kauppinen, J. Paananen, I. T. Miettinen, E. Torvinen, M. Kolehmainen, and T. Pitkänen. 2019. "Active eukaryotes in drinking water distribution systems of ground and surface waterworks". *Microbiome*. 7:99. <https://doi.org/10.1186/s40168-019-0715-5>
- Jureen, P., E. Löf, F. Chereau, K. Rizzardi, C. Schönning, S. Kühlmann-Berenzon, I Galanis and S. Andersson. 2019. Outbreak of *Legionella longbeachae* in Sweden 2018. 6th meeting of the ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI), 10-12 September 2019, Athens, Greece
- Kenagy, E., P. C. Priest, C. M. Cameron, D. Smith, P. Scott, V. Cho, P. Mitchell, and D. R. Murdoch. 2017. "Risk Factors for *Legionella Longbeachae* Legionnaires' Disease, New Zealand." *Emerging Infectious Diseases* 23 (7): 1148–54. <https://doi.org/10.3201/eid2307.161429>.
- Kinnunen M., S. Jaakola, J. Kusnetsov, S. Mentula, P. Räsänen, and O. Lyytikäinen. 2017. Tartuntataudit Suomessa 2016, sivu 14. Toimittaneet Jaakola S. ym. Terveysten ja hyvinvoinnin laitos, Raportti 5/2017. <http://www.julkari.fi/handle/10024/135229>
- Koide, M., N. Arakaki, and A. Saito. 2001. "Distribution of *Legionella Longbeachae* and Other *Legionellae* in Japanese Potting Soils." *Journal of Infection and Chemotherapy* 7 (4): 224–27. <https://doi.org/10.1007/s101560170017>.

- Koide, M., A. Saito, M. Okazaki, B. Umeda, and R. F. Benson. 1999. "Isolation of *Legionella Longbeachae* Serogroup 1 from Potting Soils in Japan." *Clinical Infectious Diseases* 29 (4): 943–44. <https://doi.org/10.1086/520470>.
- Koubar, M., M.-H. Rodier, R. A. Garduño, and J. Frère. 2011. "Passage through *Tetrahymena Tropicalis* Enhances the Resistance to Stress and the Infectivity of *Legionella Pneumophila*." *FEMS Microbiology Letters* 325 (1): 10–15. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02402.x>.
- Kubota, M., K. Tomii, R. Tachikawa, Y. Harada, R. Seo, R. Kaji, Y. Takeshima, M. Hayashi, T. Nishimura, and K. Ishihara. 2007. "[*Legionella longbeachae* pneumonia infection from home garden soil]." *Nihon Kokyuki Gakkai zasshi = the journal of the Japanese Respiratory Society* 45 (9): 698–703.
- Kuroki, H., H. Miyamoto, K. Fukuda, H. Iihara, Y. Kawamura, M. Ogawa, Y. Wang, T. Ezaki, and H. Taniguchi. 2007. "*Legionella Impletisoli* Sp. Nov. and *Legionella Yabuuchiae* Sp. Nov., Isolated from Soils Contaminated with Industrial Wastes in Japan." *Systematic and Applied Microbiology* 30 (4): 273–79. <https://doi.org/10.1016/j.syapm.2006.11.005>.
- Kusnetsov, J. 1997. "Isolation, Occurrence and Prevention of *Legionella* in Finnish Cooling Water Systems." *Kansanterveyslaitoksen julkaisu A5*. <http://www.julkari.fi/handle/10024/78139>.
- Lindsay, D. S. J., A. W. Brown, D. J. Brown, S. J. Pravinkumar, E. Anderson, and G. F. S. Edwards. 2012. "*Legionella Longbeachae* Serogroup 1 Infections Linked to Potting Compost." *Journal of Medical Microbiology* 61 (2): 218–22. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.035857-0>.
- Marchand, G., J. Lord, C. Pépin, and N. Lacombe. 2018. "Combining Environmental Investigation and a Dual-Analytical Strategy to Isolate the *Legionella Longbeachae* Strain Linked to Two Occupational Cases of Legionellosis." *Annals of Work Exposures and Health* 62 (3): 321–27. <https://doi.org/10.1093/annweh/wxx109>.
- McCabe, S., A. Brown, G. F. S. Edwards, and D. Lindsay. 2011. "Enhanced Isolation of *Legionella* Species from Composted Material." *Clinical Microbiology and Infection* 17 (10): 1517–20. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03582.x>.
- Mentasti, M., D. Kese, F. Echahidi, S. A. Uldum, B. Afshar, S. David, J. Mrazek, R. De Mendonça, T. G. Harrison, and V. J. Chalker. 2015. "Design and validation of a qPCR assay for accurate detection and initial serogrouping of *Legionella pneumophila* in clinical specimens by the ESCMID Study Group for Legionella Infections (ESGLI)." *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 34:1387–1393. DOI 10.1007/s10096-015-2363-4.
- Mentula, S., J. Pentikäinen, O. Perola, and E. Ruotsalainen. 2014. "*Legionella longbeachae* Infection in a Persistent Hand-Wound after a Gardening Accident." *JMM Case Reports* 1 (4). <https://doi.org/10.1099/jmmcr.0.004374>.
- Mérault, N., C. Rusniok, S. Jarraud, L. Gomez-Valero, C. Cazalet, M. Marin, E. Brachet, P. Aegerter, J. L. Gaillard, J. Etienne, J. L. Herrmann, the DELPH-I Study Group, C. Lawrence and C. Buchrieser. 2011. "Specific Real-Time PCR for Simultaneous Detection and Identification of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 in Water and Clinical Samples." *Applied and Environmental Microbiology*, Mar. 2011, 77 (5): 1708–1717. doi:10.1128/AEM.02261-10
- Morris, G. K., C. M. Patton, J. C. Feeley, S. E. Johnson, G. Gorman, W. T. Martin, P. Skaliy, G. F. Mallison, B. D. Politi, and D. C. Mackel. 1979. "Isolation of the Legionnaires' Disease Bacterium from Environmental Samples." *Annals of Internal Medicine* 90 (4): 664–66. <https://doi.org/10.7326/0003-4819-90-4-664>.
- Neumeister, B., S. Schoniger, M. Faigle, M. Eichner, and K. Dietz. 1997. "Multiplication of Different *Legionella* Species in Mono Mac 6 Cells and in *Acanthamoeba Castellanii*."

- Applied and Environmental Microbiology* 63 (4): 1219–24.
<https://doi.org/10.1128/AEM.63.4.1219-1224.1997>.
- Newsome, A.L., T.M. Scott, R. F. Benson, and B. S. Fields. 1998. “Isolation of an Amoeba Naturally Harboring a Distinctive *Legionella* Species.” *Applied and Environmental Microbiology* 64 (5): 1688–93.
- O’Connor, B. A., J. Carman, K. Eckert, G. Tucker, R. Givney, and S. Cameron. 2007. “Does Using Potting Mix Make You Sick? Results from a *Legionella Longbeachae* Case-Control Study in South Australia.” *Epidemiology and Infection; Cambridge* 135 (1): 34–39.
- Okazaki, M., B. Umeda, M. Koide, and A. Saito. 1998. “[*Legionella Longbeachae* Pneumonia in a Gardener].” *Kansenshogaku Zasshi. The Journal of the Japanese Association for Infectious Diseases* 72 (10): 1076–79.
- Parry, M. F., L. Stampleman, J. H. Hutchinson, D. Folta, M. G. Steinberg, and L. J. Krasnogor. 1985. “Waterborne *Legionella Bozemanii* and Nosocomial Pneumonia in Immunosuppressed Patients.” *Annals of Internal Medicine* 103 (2): 205–10.
<https://doi.org/10.7326/0003-4819-103-2-205>.
- Patten, S.M, E. Sur, R. Sundaram, and B. Weinhardt. 2010. “Dangers in the Garden.” *The Lancet* 376 (9743): 844. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)60890-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)60890-2).
- Picard-Masson, M., É. Lajoie, J. Lord, C. Lalancette, G. Marchand, É. Levac, M.-A. Lemieux, P. Hudson, and L.Lajoie. 2016. “Two Related Occupational Cases of *Legionella Longbeachae* Infection, Quebec, Canada.” *Emerging Infectious Diseases* 22 (7): 1289–91.
<https://doi.org/10.3201/eid2207.160184>.
- Potts, A., M. Donaghy, M. Marley, R. Othieno, J. Stevenson, J. Hyland, K. G. Pollock, et al. 2013. “Cluster of Legionnaires’ Disease Cases Caused by *Legionella Longbeachae* Serogroup 1, Scotland, August to September 2013.” *Eurosurveillance* 18 (50): 9–13.
<https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES2013.18.50.20656>.
- Pravinkumar, S. J., G. Edwards, D. Lindsay, S. Redmond, J. Stirling, R. House, J. Kerr, et al. 2010. “A Cluster of Legionnaires’ Disease Caused by *Legionella Longbeachae* Linked to Potting Compost in Scotland, 2008-2009.” *Eurosurveillance* 15 (8): 4–6.
- Rodríguez-Zaragoza, S.. 1994. “Ecology of Free-Living Amoebae.” *Critical Reviews in Microbiology* 20 (3): 225–41. <https://doi.org/10.3109/10408419409114556>.
- Ross, I. S., B. J. Mee, and T. V. Riley. 1997. “*Legionella Longbeachae* in Western Australian Potting Mix.” *The Medical Journal of Australia* 166 (7): 387.
- Rowbotham, T. J. 1980. “Preliminary Report on the Pathogenicity of *Legionella Pneumophila* for Freshwater and Soil Amoebae.” *Journal of Clinical Pathology* 33 (12): 1179–83.
- Schalk, J.A. C., S. M. Euser, E.van Heijnsbergen, J. P. Bruin, J.W. den Boer, and A.M. de Roda Husman. 2014. “Soil as a Source of *Legionella Pneumophila* Sequence Type 47.” *International Journal of Infectious Diseases* 27 (October): 18–19.
<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2014.05.009>.
- Speers, D. J., and A. E. Tribe. 1994. “*Legionella Longbeachae* Pneumonia Associated with Potting Mix.” *The Medical Journal of Australia* 161 (8): 509.
- Steele, T. W., J. Lanser, and N. Sangster. 1990. “Isolation of *Legionella Longbeachae* Serogroup 1 from Potting Mixes.” *Applied and Environmental Microbiology* 56 (1): 49–53.
- Steele, T. W., C. V. Moore, and N. Sangster. 1990. “Distribution of *Legionella Longbeachae* Serogroup 1 and Other Legionellae in Potting Soils in Australia.” *Applied and Environmental Microbiology* 56 (10): 2984–88.
- Taylor, M., K. Ross, and R. Bentham. 2009. “*Legionella*, Protozoa, and Biofilms: Interactions within Complex Microbial Systems.” *Microbial Ecology* 58 (3): 538–47.
<https://doi.org/10.1007/s00248-009-9514-z>.
- Thacker, S. B., J. V. Bennett, T. F. Tsai, D. W. Fraser, J. E. McDade, C. C. Shepard, K. H. Williams, W. H. Stuart, H. B. Dull, and T. C. Eickhoff. 1978. “An Outbreak in 1965 of

- Severe Respiratory Illness Caused by the Legionnaires' Disease Bacterium." *The Journal of Infectious Diseases* 138 (4): 512–19. <https://doi.org/10.1093/infdis/138.4.512>.
- Terveyden ja hyvinvoinnin laitos 2019: Tartuntataudit Suomessa 2018. https://thl.fi/documents/533963/1449651/Vuosiraportti+2018_lopullinen.pdf/fb68139d-0662-4785-a217-000a51cd4a30.
- Travis, T., C., E.W. Brown, L. F. Peruski, D. Siludjai, P. Jorakate, P. Salika, G. Yang, et al. 2012. "Survey of *Legionella* Species Found in Thai Soil." *International Journal of Microbiology* 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/218791>.
- Velonakis, E. N., I. M. Kiouisi, C. Koutis, E. Papadogiannakis, F. Babatsikou, and A. Vatopoulos. 2010. "First Isolation of *Legionella* Species, Including *L. Pneumophila* Serogroup 1, in Greek Potting Soils: Possible Importance for Public Health." *Clinical Microbiology and Infection* 16 (6): 763–65. <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2009.02957.x>.
- Wadowsky, R. M., L. J. Butler, M. K. Cook, S. M. Verma, M. A. Paul, B. S. Fields, G. Keleti, J. L. Sykora, and R. B. Yee. 1988. "Growth-Supporting Activity for *Legionella Pneumophila* in Tap Water Cultures and Implication of Hartmannellid Amoebae as Growth Factors." *Applied and Environmental Microbiology* 54 (11): 2677–82. <https://doi.org/10.1128/AEM.54.11.2677-2682.1988>.
- Wadowsky, R. M., T. M. Wilson, N. J. Kapp, A. J. West, J. M. Kuchta, S. J. States, J. N. Dowling, and R. B. Yee. 1991. "Multiplication of *Legionella* Spp. in Tap Water Containing Hartmannella Vermiformis." *Applied and Environmental Microbiology* 57 (7): 1950–55. <https://doi.org/10.1128/AEM.57.7.1950-1955.1991>.
- Wallis, L., and P. Robinson. 2005. "Soil as a Source of *Legionella Pneumophila* Serogroup 1 (Lp1)." *Australian and New Zealand Journal of Public Health* 29 (6): 518–20. <https://doi.org/10.1111/j.1467-842X.2005.tb00242.x>.
- Wei, S.-H., L.-R. Tseng, J.-K. Tan, C.-Y. Cheng, Y.-T. Hsu, E.-T. Cheng, C.-S. Lu, et al. 2014. "Legionnaires' Disease Caused by *Legionella Longbeachae* in Taiwan, 2006–2010." *International Journal of Infectious Diseases* 19 (February): 95–97. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2013.10.004>.
- Whiley, H., M. Taylor, and R. Bentham. 2011. "Detection of *Legionella* Species in Potting Mixes Using Fluorescent in Situ Hybridisation (FISH)." *Journal of Microbiological Methods* 86 (3): 304–9. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.05.023>.
- WHO 2007. Legionella and prevention of legionellosis. http://www.who.int/water_sanitation_health/emerging/legionella.pdf
- Wright, A. J., A. Humar, S. Gourishankar, K. Bernard, and D. Kumar. 2012. "Severe Legionnaire's Disease Caused by *Legionella Longbeachae* in a Long-Term Renal Transplant Patient: The Importance of Safe Living Strategies after Transplantation." *Transplant Infectious Disease* 14 (4): E30–33. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3062.2012.00755.x>.
- Ympäristöministeriö 2017. Ympäristöministeriön asetus rakennusten vesi- ja viemärlaitteistoista (1047/2017). <http://www.finlex.fi/fi/laki/alkup/2017/20171047>
- Zacheus, O. M., and P. J. Martikainen. 1994. "Occurrence of *Legionellae* in Hot Water Distribution Systems of Finnish Apartment Buildings." *Canadian Journal of Microbiology* 40 (12): 993–99. <https://doi.org/10.1139/m94-159>.