

LEGIONELLEN-NACHWEIS-METHODEN IM VERGLEICH

FALLABKLÄRUNGEN: RESULTATE ABHÄNGIG VON ANALYSEMETHODE UND BEPROBUNGSTECHNIK

Vier Nachweismethoden für Legionellen in Leitungswasser wurden in Parallelansätzen verglichen. Eingesetzt wurden kulturelle, molekularbiologische und durchflusszytometrische Methoden. Neben der herkömmlichen Probenentnahme wurde erstmals eine 50-l-Filtrationsbeprobung angewandt, hierzu wurde das Wasser vor Ort filtriert. Mit den alternativen Methoden konnten in allen 14 Fällen Legionellen nachgewiesen werden, mit den Standardmethoden nur in sechs Fällen.

*Renate Boss, Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen BLV
Vanessa Gehrig; Hans Peter Fuchsli*, Kantonales Labor Zürich
Anahita Yazdanfar, Tina Stahel, René Köppel, Kantonales Labor Zürich
Frederik Hammes, Eawag*

RÉSUMÉ

COMPARAISON DE DIFFÉRENTES MÉTHODES DE DÉTECTION DE LÉGIONELLES

Quatre méthodes de détection des légionelles dans l'eau courante ont été comparées : la culture standard selon la norme ISO 11731, la PCR après filtration sur membrane, la méthode Legiolert et la rétro-transcription (RT-PCR) spécifique pour *Legionella pneumophila*. Comme paramètre général, le nombre total de cellules présentes a été évalué par cytométrie en flux afin d'en estimer la contamination par des germes.

En parallèle de la méthode standard, un échantillonnage par filtration de 50 l a été fait pour la première fois. Après filtration de l'eau sur place, les bactéries ont été remises en suspension en laboratoire à partir de la membrane de filtration pour la suite des analyses. Au total, 14 évaluations ont été réalisées ; 13 ont été menées sur une base volontaire dans les douches privées de patients atteints de légionellose et 1 dans un complexe de bâtiments.

Pour 9 des 14 cas, au moins une des méthodes employées a permis la détection de légionelles vivantes. Dans 2 de ces 9 cas, seul l'échantillonnage par filtration de 50 l a permis de les détecter. Les méthodes standards ne sont pas parvenues au même résultat. L'analyse par PCR a permis de détecter l'ADN de légionelles, ce qui ne permet cependant pas de tirer de conclusions quant à leur vitalité.

EINLEITUNG

Legionellen können sich in Trinkwasserinstallationen von Gebäuden vermehren und zu Krankheits- und Todesfällen führen. In Industrieländern wie der Schweiz werden die meisten wasserbedingten Krankheits- und Todesfälle durch Legionellen verursacht.

Wasseraufbereitungs- und Duschanlagen müssen nach den anerkannten Regeln der Technik eingerichtet, betrieben oder abgeändert werden. Die entsprechenden Vorgaben finden sich in der Verordnung des EDI über Trinkwasser sowie Wasser in öffentlich zugänglichen Bädern und Duschanlagen (TBDV) [1], in den BLV/BAG-Empfehlungen «Legionellen und Legionellose» [2], im SVGW-Regelwerk W3 [3] und in den SIA-Normen SIA 385/1 und 385/2 sowie D 0244 [4–6]. Verantwortliche von öffentlichen Duschanlagen (z. B. in Alters- und Pflegeheimen, Spitälern, Schulen, Hallenbädern oder Hotels) haben im Rahmen ihrer Selbstkontrolle die einwandfreie Qualität des Wassers zu gewährleisten. Gemäss TBDV liegt der Höchstwert für *Legionella* spp. in Duschwasserproben bei 1000 KBE/l.

An Legionellose erkrankte Personen hatten im Kanton Zürich von 2015 bis 2019 die Möglichkeit, ihr Duschwasser untersu-

* Kontakt: hanspeter.fuechslin@kl.zh.ch

chen zu lassen. Die Patienten waren meist fortgeschrittenen Alters und deren Aktivitätsradius auf die Wohnung beschränkt. Aus diesem Grund wurden die Duschen als mögliche Infektionsquelle in Betracht gezogen. Allerdings wurde nur bei rund der Hälfte der Fälle Legionellen im Duschwasser nachgewiesen (Jahresberichte des Kantonalen Labors Zürich KLZH 2015-2018). Dies wirft Fragen auf: Können die Legionellen mit den Standardmethoden genügend zuverlässig erfasst werden? Müssen neue Verfahren entwickelt werden? Gibt es andere Infektionsquellen [7]?

Legionellen vermehren sich in den Trinkwasserinstallationen vorwiegend in Amöben, die sich im Biofilm an den Innenwänden der Leitungen befinden [8]. Je nach Materialart und Betrieb der Sanitärssysteme entwickeln sich die Biofilme heterogen [9]. Darüber hinaus wird die Ablösung von Zellen aus dem Biofilm durch Stagnation und Fließgeschwindigkeit beeinflusst. Sporadisch gelangen sie in das vorbeifliessende Wasser, was eine Erklärung für stark schwankende Befunde sein kann. Dies kann dazu führen, dass in einer standardmässig gezogenen Probenmenge von einem Liter keine Legionellen oder Konzentrationen unterhalb der Nachweisgrenze vorliegen. Um eine repräsentativere Probenahme sowie eine Senkung der Nachweisgrenze zu ermöglichen, wurde am KLZH eine Filtrationsprobenahme entwickelt: Vor Ort werden mit einer Filtrationseinheit, die anstelle der Duschbrause an den Duschschauch geschraubt wird, 50 l Wasser filtriert und die Bakterien so auf dem Filter aufkonzentriert.

Die aktuelle Standardmethode gemäss ISO 11731 ist international anerkannt und gilt weltweit als Referenzmethode [10]. Bekanntermassen kann sie aber nicht immer alle Legionellen nachweisen [11]. VBNC (*viable but not culturable*) bezeichnet den Zustand von lebenden Bakterien, die eine sehr geringe Stoffwechselaktivität haben, sich nicht teilen und daher nicht kultivierbar sind. Nach einer Reaktivierung können sie aber wieder kultivierbar und pathogen werden. Die Standardkultivierungsmethode vermag Legionellen im VBNC-Zustand nicht zu erfassen und zeigt deshalb möglicherweise nur die Spitze des Eisbergs [12-14]. In dieser Studie wurden deshalb alternative Probenahme- und Nachweisverfahren für Legionellen geprüft. Sie soll als Vorstudie des vom Bund (BLV, BAG und BFE)

finanzierten Forschungsprojekts *LeCo* verstanden werden, in dem in Zusammenarbeit mit der Eawag, der Hochschule Luzern und dem Schweizerischen Tropen- und Public Health-Institut (Swiss TPH) Probenahme- sowie Nachweismethoden optimiert und weiterentwickelt werden.

METHODEN

PROBENERHEBUNG

Im Kanton Zürich wurden von 2015 bis 2019 bei Legionellosefällen ausserhalb der Stadt Zürich freiwillige Kontrolluntersuchungen im Wohnbereich (Duschen) erkrankter Personen angeboten. In diesem Rahmen wurden zwischen Februar 2019 und August 2019 vom KLZH in 13 Fällen Abklärungen mit Probenahmen an Duschen durchgeführt. Eine weitere Beprobung (Fall 14) fand in einem komplexen

Gebäude mit Personalduschen statt, in dem mittels Legionellenschaltungen und Spülaktionen die Legionellen unter dem Höchstwert gehalten werden können. Bei jeder Beprobung wurden folgende Wasserproben erhoben:

- a) 1 l Warmwasser ohne Vorlauf
- b) 5 l Warmwasser nach Vorlauf bis Temperaturkonstanz oder maximal 2 Min. Vorlaufzeit. Diese Proben wurden nachträglich aliquotiert, um sie parallel mittels den vier verschiedenen Nachweismethoden analysieren zu können. Für den Nachweis mittels RT-PCR (*Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*) und Legiort wurden jeweils ein 1-l- und 100-ml-Aliquot per Nachtexpress verschickt.
- c) Filtration von 50 l Warmwasser vor Ort (*Fig. 1*): Mit der neu entwickelten Filtrationseinheit wurden 50 l Wasser



Fig. 1 Mehr Probenvolumen durch Filtrationsbeprobung vor Ort. Anstelle der Duschbrause wurde eine Membranfiltrationseinheit aufgeschraubt. Das Volumen des filtrierten Wassers wurde mit einem Messeimer bestimmt (angestrebt waren 50 l). Im Anschluss wurde die Filtermembran im Labor weiterverarbeitet.

direkt am Erhebungsort filtriert. Die Filtrationseinheit besteht aus einem wiederverwendbaren Edelstahlgehäuse (*Novamem*, Schlieren, Schweiz) mit einem Normgewinde, das direkt an einen Wasserhahn oder Duschschauch geschraubt werden kann. Im Innern befindet sich eine Stützmembran aus Vlies (wie Löschpapier) und eine *Nucleopore Track-Etched* Membran 90 mm 0,4µm, um Bakterien aus dem Wasser zu filtern. In wenigen Fällen war die Membran verstopft, bevor das angestrebte Volumen von 50l gefiltert worden war. Nach der Filtration wurde im Labor mit einer mit Alkohol desinfizierten Schere ein Viertel der Membran herausgeschnitten und für die dPCR aufgearbeitet, die restlichen drei Viertel wurden für die Standardkultivierung (ISO 11731) verwendet.

NACHSWEISVERFAHREN

Die Nachweisverfahren und die damit untersuchten Wasserproben sind in der *Tabelle 1* aufgelistet.

ISO 11731

Die Standardkultivierungsmethode für Duschwasser wurde gemäss ISO 11731 [10] durchgeführt. Pro Probe wurden drei Ansätze angesetzt:

- Direktplattierung von zweimal je 0,5ml Wasser auf GVPC-Agar
- 10ml Membranfiltration unbehandelt auf BCYE-Agar
- 100ml Membranfiltration mit Säurebehandlung auf GVPC-Agar.

Jeder dieser drei Ansätze liefert einen Wert, das endgültige Resultat entsprach dem Ansatz mit der höchsten Konzentration. Die Serogruppen der Legionellen-Kolonien wurden mit dem Latex-Agglutinations-Test (*Thermo Fisher Diagnostics*,

Pratteln, Schweiz) bestimmt. Das Vorgehen für die Kultivierung aus dem 50-l-Ansatz war vereinfacht: Drei Viertel der Filtermembranen wurden in einen Plastikbeutel mit 10 ml Probe getaucht, mit einer Ultraschall-Zahnbürste wurden die Keime abgelöst, davon wurden 2 × 0,5ml unbehandelt auf GVPC ausplattiert.

Legiolert

Legiolert ist ein *Most-Probable-Number* (MPN-)Verfahren und basiert auf dem kulturellen Nachweis vitaler *L. pneumophila* aller Serogruppen [15, 16]. Mit dieser Methode wurde pro Probe einmalig 100 ml Wasser mit dem Trinkwasserprotokoll gemäss Vorschrift des Herstellers (*IDEXX GmbH*, Ludwigsburg, Deutschland) untersucht. Hierzu wurde die Probe mit einem lyophilisierten Medium versetzt und in einem sogenannten *Quantitray* auf 6 grosse und 90 kleine Kavitäten verteilt. Nach sieben Tagen Inkubation wurde das Wachstum von *L. pneumophila* von Auge beurteilt, wobei Kavitäten mit einer Braunverfärbung und/oder Trübung des Mediums ein positives Resultat (Wachstum) bedeuten und gezählt wurden. Mit Hilfe einer MPN-Tabelle wurde die Anzahl positiver Kavitäten in die Keimzahl der Probe umgerechnet.

Digitale Polymerase-Kettenreaktion (dPCR)

Die dPCR ist eine quantitative DNA-Nachweismethode. Die zu untersuchende DNA und PCR-Reagenzien werden mit einer Öl-Wasser-Emulsion zu bis 20 000 Tröpfchen (engl. *droplets*) verarbeitet, wobei jedes Droplet keine, eine oder mehrere Kopien der Ziel-DNA enthält. Die Droplets durchlaufen eine PCR (Standard PCR-Gerät), wobei in jedem einzelnen Droplet eine Amplifikation stattfindet, sofern Ziel-DNA vorhanden ist. Anschliessend werden die Droplets mittels Durchfluss-

fluoreszenzmessung analysiert. Die Anzahl positiver Droplets verhält sich zur Konzentration der Ziel-DNA entsprechend einer *Poisson*-Verteilung [17, 18].

Die dPCR diente dem Nachweis von *Legionella* spp. und *L. pneumophila*, die Zielsequenzen waren die 23S-5S *spacer region* [19], respektive das *macrophage infectivity potentiator (mip)*-Gen [20]. Mit dieser Methode wurden 200 ml Probe mit und ohne Vorlauf (ganze Membran) sowie der 50-l-Ansatz (¼ Membran) untersucht. Die Ablösung der Bakterien von der Membran und die DNA-Extraktion wurde mit dem *Aquadien Kit* (*Bio-Rad*, Hercules CA, USA) durchgeführt. Die Droplets wurden im *QX200 Droplet-Generator* (*Bio-Rad*) gebildet, die dPCR erfolgte auf dem *Mastercycler gradient* (*Vaudaux-Eppendorf*), die anschliessende Fluoreszenzmessung mit dem *QX200 Droplet Reader* (*Bio-Rad*). Bei den Messungen wurden Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt.

Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

Die Schnellmethode zum Nachweis von *L. pneumophila* wurde nach *Boss et al.* [21] angewendet. Hierzu wurde 1l Probe mit Vorlauf filtriert und die Legionellen in einem kleinen Volumen Flüssigkeit vom Filter abgelöst. Dieses Volumen wurde halbiert und eine Hälfte sofort pelletiert und eingefroren (= ohne Stimulation, 0-Fraktion), während die andere Hälfte mit Medium versetzt und drei Stunden inkubiert wurde. Dies bewirkt eine Anregung des Stoffwechsels in eventuell vorhandenen Legionellen (= mit Stimulation, S-Fraktion). Eine Vermehrung findet in dieser Zeit nicht statt. Von beiden Fraktionen wurde die totale RNA extrahiert und mit einer *L. pneumophila*-spezifischen RT-PCR amplifiziert [21]. Ein RNA-Anstieg zwischen der 0- und der S-Fraktion bedeutet die Existenz lebender *L. pneumophila*. Aus der 0-Fraktion wurde zudem die DNA extrahiert und mit quantitativer PCR (qPCR) anhand einer Standardkurve quantifiziert. Dieselbe DNA-Probe wurde zudem mit einer 23S-PCR [22] qualitativ auf *Legionella* spp. untersucht.

Totalzellkonzentration (TZZ)

Die Bestimmung der TZZ erfolgte gemäss SLMB 333.1 [23]. Die Methode beruht auf der unspezifischen Bindung eines fluoreszierenden Farbstoffs an die DNA der Bakterien und anschliessender automatischer Auszählung mit einem Durchflusszytometer. Dazu wurde *SYBR Green I*

Nachweismethode	Spezies	Einheit	Probenerhebung		
			ohne Vorlauf	mit Vorlauf	50-l-Filtration
ISO Standard-methode	spp / pn	KBE/l	X	X	X
Totalzellzahl	alle Zellen	Zellen/ml	X	X	
digitale PCR	spp / pn	GE/l	X	X	X
Legiolert	pn	KBE/l		X	
RT-PCR	pn	GE/l		X	
23S-PCR	spp	pos / neg		X	

spp = *Legionella* species; pn = *Legionella pneumophila*; KBE = Koloniebildende Einheit; GE = Genomequivalente; l = Liter; pos = positiv; neg = negativ

Tab. 1 Liste der Nachweismethoden, die damit detektierte Spezies, Einheit und angewendete Probenerhebungsmethode.

(Life Technologies, Eugene OR, USA) im Verhältnis 1:10 000 verwendet und für mindestens 13 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Messungen erfolgten mit einem NovoCyte-Durchflusszytometer (ACEA Biosciences Inc., San Diego, USA). Mit dieser Methode wurden Wasserproben mit und ohne Vorlauf untersucht.

RESULTATE

MESSRESULTATE

Die Resultate der 14 Fälle sind in *Tabelle 2* zusammengefasst. Bei allen untersuchten Duschen wurden mit mindestens einem Nachweisverfahren *Legionella* spp. nachgewiesen, in 11/14 Fällen wurden auch *L. pneumophila* nachgewiesen. In 8/14 Fällen (Fälle 2, 3, 4, 5, 8, 10, 11, 12) wurden mit der Standardmethode, das heisst mit Doppelbeprobung und Nachweis durch ISO 11731, keine Legionellen nachgewiesen, jedoch mit den alternativen Methoden. In 5/14 Fällen (Fälle 5, 8, 10, 11, 12) wurden mit den alternativen Methoden auch *L. pneumophila* nachgewiesen ohne Nachweis durch die Standardmethode. Nachfolgend wird auf die Resultate der einzelnen Nachweismethoden eingegangen:

ISO-Methode

Mit der ISO-Methode und der üblichen Probennahme (mit/ohne Vorlauf) konnten in 6/14 Fällen *L. pneumophila* nachgewiesen werden, im Fall 7 wurde neben *L. pneumophila* andere *Legionella* spp.-Stämme nachgewiesen. Mit dem 50-l-Ansatz waren 7/14 Fälle positiv, wobei zwei davon mit der üblichen Probennahme negativ waren. In einem Fall, der mit dem 50-l-Ansatz negativ war, wurde mit der üblichen Probennahme (mit/ohne Vorlauf) ein positives Resultat beobachtet. In vier Fällen wurden im 1-l-Ansatz eine höhere Konzentration an Legionellen nachgewiesen als im 50-l-Filtrationsansatz. In 6/14 Fällen konnten kulturell keine Legionellen nachgewiesen werden, weder im üblichen noch im 50-l-Ansatz.

Legiolert-Methode

Mit der Legiolert-Methode konnte in 3/14 Fällen *L. pneumophila* nachgewiesen werden. Diese drei positiven Resultate deckten sich mit den Resultaten der ISO-Methode im 1-l-Ansatz, während in drei weiteren Fällen, die mit der ISO-Methode positiv waren, mit Legiolert in den un-

Methode	ISO [KBE/l]						dPCR [GE/l]						LL [KBE/l]		RT [GE/l]		TZZ [Zellen/ml]			
	ohne VL			mit VL			Filtrationsbeprobung			ohne VL			mit VL			mit VL		total		
Spezies	spp	pn	spp	pn	spp	pn	spp	pn	spp	pn	spp	pn	spp	pn	spp ^c	pn	spp	pn	spp	pn
Fall 1	2000	2000 ^b	1000	1000 ^b	66	66 ^a	29920	616	6600	506	2080	123	0	0	+	300 ^{ic}	854763	182710	854763	182710
Fall 2	0	0	0	0	0	0	72600	0	3960	0	16434	0	0	0	+	0	1641816	21740	1641816	21740
Fall 3	0	0	0	0	0	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.	0	0	+	0	184541	39574	184541	39574
Fall 4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	55	0	0	0	+	0	834513	59446	834513	59446
Fall 5	0	0	0	0	0	0	10560	0	10125	0	7480	6	0	0	+	0	114736	135811	114736	135811
Fall 6	470	470 ^b	20	20 ^b	20	20 ^b	23540	0	19580	176	10956	28	0	0	+	0	157120	166500	157120	166500
Fall 7	10000	10000 ^b	1960	880 ^b	227	105 ^b	7260	484	3740	176	1654	246	3614	500 ^{ic}	+	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Fall 8	0	0	0	0	0	0	176	12	295	132	4	2	0	<100 ^{ic}	+	370540	281260	370540	281260	
Fall 9	3000	3000 ^b	1000	1000 ^b	5	5 ^b	13420	506	5940	152	100	5	159	200 ^{ic}	+	331300	254500	331300	254500	
Fall 10	0	0	0	0	4	4 ^a	521400	144	9680	57	7484	11	0	0	+	0	230980	390200	230980	390200
Fall 11	0	0	0	0	4	4 ^a	2046	0	31	0	360	0	0	0	+	0	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.
Fall 12	0	0	0	0	0	0	44099	9	3091	0	1077	0	0	0	+	0	347120	380600	347120	380600
Fall 13	35	35 ^a	15	15 ^a	124	124 ^a	1550	0	7260	10	8089	69	0	0	+	0	105760	115680	105760	115680
Fall 14	50	50 ^a	20	20 ^b	0	0	4400	43	7040	187	1755	22	23	100 ⁱ	+	438740	159100	438740	159100	

VL = Vorlauf; spp = *Legionella* species; pn = *Legionella pneumophila*; GE = Genomäquivalente; KBE = koloniebildende Einheiten; n.a. = nicht analysiert
^a = *L. pneumophila* Serogruppe 1
^b = *L. pneumophila* Serogruppen 2-14
^c = *Legionella* species-Nachweis mit 23S-PCR aus den DNA-Proben der RT-PCR-Methode
ⁱ = lebende und tote *L. pneumophila*
^l = tote *L. pneumophila*

Tab. 2 Zusammenfassung der Resultate aller 14 Fälle und aller Methoden: ISO 11731-Standardmethode (ISO), digitale PCR (dPCR), Legiolert (LL), RT-PCR-Methode (RT) und Totalzellzahl (TZZ). Die Fälle 1-13 sind Legionellosefallabklärungen im Kanton Zürich, Fall 14 ist eine Beprobung eines komplexen Gebäudes mit bekannter tiefer Legionellen-Kontamination.

DANKSAGUNG

Die Autoren danken der Firma *Novamem AG*, Schlieren, für die fachliche Unterstützung bei der Planung und Herstellung der Filtrationseinheit.

tersuchten 100 ml Wasser keine *L. pneumophila* nachgewiesen werden konnten.

dPCR-Methode

Mit dPCR wurden 13/14 Fälle untersucht. DNA von *Legionella* spp. konnten in fast allen Fällen nachgewiesen werden, sowohl in Proben mit/ohne Vorlauf wie auch im 50-l-Ansatz. In 9/13 Fällen konnte in den üblichen Proben (mit/ohne Vorlauf) DNA von *L. pneumophila* nachgewiesen werden, in einem Fall nur mit dem 50-l-Ansatz. In drei Fällen (2 × ohne Vorlauf, 1 × 50-l-Ansatz) ergab die dPCR ein negatives Resultat, obschon *L. pneumophila* kultiviert werden konnte. Die Methode lässt keine Rückschlüsse auf die Lebendigkeit der Legionellen.

RT-PCR-Methode

Mit der RT-PCR-Methode wurden in 5/14 Fällen *L. pneumophila* nachgewiesen, jedoch war beim Fall 14 kein RNA-Anstieg zu sehen und wurde deswegen als tote *L. pneumophila* interpretiert. Die positiven Resultate decken sich mit den Resultaten der ISO-Methode. Unter den neun negativen Proben waren vier mit der ISO-Methode positiv (2 × nur im 50-l-Ansatz, 2 × im 1-l-Ansatz).

23S-PCR-Methode

Mit 23S-PCR konnte in allen 14 Fällen DNA von *Legionella* spp. gefunden werden. Diese Resultate decken sich mit denen der dPCR-Resultate, im Fall 4 allerdings nur mit dem 50-l-Ansatz.

TZZ-Methode

Die TZZ wurde in 12/14 Fällen bestimmt und ergab Resultate zwischen $2,1 \times 10^4$ und $1,6 \times 10^6$ Zellen/ml. Die TZZ war in der Regel höher in der Probe ohne Vorlauf (Mittelwert $4,7 \times 10^5$ Zellen/ml) als in der Probe mit Vorlauf (Mittelwert $1,8 \times 10^5$ Zellen/ml). Die Probe ohne Vorlauf ist eine Stagnationsbeprobung der peripheren lokalen Gebäude-Trinkwasserinstallation, während Proben mit Vorlauf das Innere der Gebäude-Trinkwasserinstallation repräsentieren.

VERGLEICH DER METHODEN

Hohe Legionellen-Konzentrationen, durch die Standardkultivierungsmethode ISO 11731 gemessen, führen generell auch zu hohen Messresultaten bei den alternativen Methoden. In verschiedenen Fällen wurde aber mit den neuen Methoden *Legionella* spp. in höheren Konzentrationen gemessen, die mit der Standardkultivierungsmethode nicht nachgewiesen werden konnten. Bei den verschiedenen Methoden konnten ähnliche Muster bei den Resultaten erkannt werden. So wurden in den Proben ohne Vorlauf sowohl mit der ISO-Methode als auch mit dPCR tendenziell mehr Legionellen nachgewiesen als in Proben mit Vorlauf. Dieser Trend wurde auch bei der TZZ festgestellt. Dies kann ein Hinweis auf Verkeimung in der Peripherie der Trinkwasserinstallationen sein. Übermässige Biofilmbildung in Kombination mit Stagnation führen zu erhöhten TZZ- und Legionellen-Konzentrationen in den Proben ohne Vorlauf.

DISKUSSION

Die Fälle 1 bis 13 sind Abklärungen von Legionellosefällen aus dem Kanton Zürich, die einzeln und sporadisch auftraten, und zeitlich sowie örtlich zufällig verteilt waren. Die Mehrheit der Erkrankten waren ältere Personen, die sich mehrheitlich zu Hause aufhielten und zum Teil an Vorerkrankungen litten. Bei den Befragungen durch den kantonsärztlichen Dienst wurden, mit wenigen Ausnahmen, keine anderen möglichen Infektionsquellen erwähnt. Mit der Standardmethode wurde in 10/13 Fällen keine Höchstwertüberschreitung und in 8/13 Fällen keine Legionellen festgestellt. In diesen acht Fällen konnten nur mit den Alternativmethoden Legionellen in tiefer Konzentration nachgewiesen werden. Die Frage ist offen, ob die durch dPCR nachgewiesenen Legionellen tot oder in einem VBNC-Zustand waren.

Die heterogene Verteilung der Legionellen in einer Trinkwasser-Installation führt dazu, dass die Resultate wesentlich von Art der Probenahme wie auch vom Probenvolumen abhängen. Ein grösseres Probenvolumen führt zu einer repräsentativeren Probe. Beim Vergleich der verschiedenen Nachweismethoden muss deshalb das Probenvolumen berücksichtigt werden. So könnte das kleine Probenvolumen von 100 ml die Erklärung sein, dass durch die Legiolert-Methode nur in 3/14 Fällen *L. pneumophila* nachgewiesen wurde. Die Messungen zeigen, dass die 50-l-Filtrationsbeprobung mit anschliessendem Nachweis von Legionellen durch die Standardkultivierungsmethode ISO 11731 oder PCR das Potenzial hat, Legionellen mit einer weit tieferen Nachweisgrenze als bisher nachzuweisen. Auffällig sind aber die höheren Legionellen-Konzentrationen in den 1-l-Ansätzen verglichen mit den 50-l-Filterproben. Dies weist auf eine höhere Legionellen-Kontamination im stagnierten Leitungswasser der Peripherie hin im Vergleich zum Wasser aus den inneren Teilen der Anlage wie dem Boiler. Der längere Filtrationsprozess beim 50-l-Ansatz bei hohen Wassertemperaturen könnte aber auch einen negativen Einfluss auf die Kultivierbarkeit der Zellen haben. Ein weiterer Grund für tiefere Resultate beim 50-l-Ansatz könnte der relativ hohe Verlust von Legionellen beim Ablösen von der Membran sein. Diese offenen Fragen zeigen, dass die Testphase der neuen Methoden nicht abgeschlossen ist. Die neuen Prüfmethode müssen weiterentwickelt und mit Validierungsmessungen die Nachweisgrenzen sowie die Wiederfindungsraten bestimmt werden.

Es stellt sich die Frage, ob die Legionellen-Konzentrationen deutlich unterhalb des Höchstwertes von 1000 KBE/l zu Infektionen führen können. Bei sporadischen Fällen und Personen mit Vorerkrankungen ist dies denkbar. Da bei den untersuchten Fällen keine klinischen Isolate vorhanden waren, konnte kein genetischer Vergleich mit den Legionellen aus den Duschen durchgeführt werden. Somit fehlt der Beweis, dass sich die Legionellose-Patienten durch die Dusche in ihrer Wohnung angesteckt haben, und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie sich durch eine andere, unbekannte Infektionsquelle infiziert haben. Diese Frage müsste in weiteren Studien geklärt werden, bei denen die Infektionsquelle durch Genotypisierung des klinischen und des Umwelt-Isolates gesichert wird. Sollte sich dabei zeigen, dass sich bei sporadischen Fällen Menschen mit geschwächtem Immunsystem auch mit Legionellen-Konzentration weit unterhalb des gesetzlichen Höchstwertes anstecken, müssten die Präventionsmassnahmen für Risikogruppen geändert werden.

Sehr interessant sind die zwei Fälle, die mit der ISO-Methode im 50-l-Ansatz positiv für *L. pneumophila* waren, mit dem 1-l-Ansatz aber negativ. Diese beiden hätte man mit dem bisherigen Standardvorgehen verpasst. In der RT-PCR, die auf 1-l-Probe beruht, zeigten diese beiden Proben einen RNA-Anstieg, was auf lebende *L. pneumophila* hinweist. Da aber keine DNA quantifiziert wurde, wurde dieses Resultat definitionsgemäss als negativ beurteilt. Diese Diskrepanz kommt durch die unterschiedliche Sensitivität des RNA-Nachweises (zur lebend/tot-Unterscheidung) und des DNA-Nachweises (zur Quantifizierung) zustande, und weil mengenmässig mehr RNA als DNA vorkommt. Zwei weitere Proben, die mit der RT-PCR-Methode negativ beurteilt wurden, waren in der ISO-Methode im vergleichbaren 1-l-Ansatz positiv (15 resp. 20 KBE/l). Bei beiden Proben war ebenfalls RNA (aber keine DNA) gemessen worden, allerdings äusserst wenig. Auch dies ist ein Hinweis auf das Vorhandensein von Legionellen. Die Kombination der RT-PCR mit der 50-l-Filtrationsbeprobung könnte einerseits die Sensitivität des Legionellen-Nachweises erhöhen, da die angereicherte DNA direkt von der Membran extrahiert werden könnte. Andererseits würde es erlauben, die Lebendigkeit der *L. pneumophila* zu beurteilen.

Der Vergleich der Methoden zeigt das Potenzial der molekularbiologischen Methoden. Diese sind schneller und liefern in der Regel innerhalb eines Arbeitstages erste Resultate, während die Kultivierung bis zu zehn Tage dauern kann. Zudem ist der Nachweis mit PCR unabhängig vom VBNC-Status der Bakterien. Das heisst, auch gestresste oder physiologisch inaktive Legionellen aus dem Biofilm können nachgewiesen werden. Ein optimierter Nachweis von Legionellen könnte zu grösserer Betriebssicherheit führen, wenn zukünftig vermehrt alternative Methoden der Trinkwassererwärmung bei tieferen Betriebstemperaturen eingesetzt werden sollen. Bei einem übermässig hohen positiven PCR-Befund und gleichzeitig negativer Kultur sollte eine Ursachenabklärung durchgeführt werden. Automatisierte Systeme sind von Interesse, um das zukünftig erhöhte Probenaufkommen aufgrund der geforderten Selbstkontrolle von öffentlichen Duschanlagen zu bewältigen. Schwellenwerte in GE/l, die das Einhalten der gesetzlichen Höchstwerte gewährleisten, wären zu-

sätzlich von grossem Nutzen. In anderen Ländern sind entsprechende Alarm- und Massnahmenwerte für PCR definiert [24, 25]. Unter den PCR-Methoden bietet sich insbesondere die in dieser Studie getestete dPCR an, da sie gegenüber Inhibition robuster als die herkömmliche *real-time* PCR ist. Der Hauptgrund liegt darin, dass eine zeitliche Verzögerung der PCR-Reaktion keinen Einfluss hat, da nur das Endresultat für die Auswertung relevant ist. Für die Selbstkontrollen könnte so zuerst ein PCR-Screening durchgeführt werden und, nur wenn der Schwellenwert überschritten wird, ein kultureller Nachweis gemäss ISO 11731 folgen.

SCHLUSSFOLGERUNG

Für die Erfassung und Beurteilung von Legionellen-Kontaminationen in Gebäude-Trinkwasserinstallationen wird die kombinierte Anwendung konventioneller Kulturverfahren und kultivierungsunabhängiger molekularbiologischer Methoden wie PCR für die Zukunft wichtig werden. Die Filtrationsbeprobung wie auch die PCR-Nachweismethoden werden im Rahmen des *LeCo*-Projektes weiterentwickelt, optimiert und validiert.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] BLV (2018): Verordnung des EDI über Trinkwasser sowie Wasser in öffentlich zugänglichen Bädern und Duschanlagen (TBDV): <https://www.admin.ch/opc/de/classified-compilation/20143396/index.html>
- [2] BAG/BLV (2018): Legionellen und Legionellose BAG-/BLV-Empfehlungen: www.bag.admin.ch
- [3] SVGW (2013): W3 d: Richtlinie für Trinkwasserinstallationen
- [4] SIA (2015): D 0244. Anlagen für Trinkwarmwasser in Gebäuden – Erläuterung zu den Normen SIA 385/1 und SIA 385/2
- [5] SIA (2015): SIA 385/2. Anlagen für Trinkwarmwasser in Gebäuden – Warmwasserbedarf, Gesamtanforderungen und Auslegung
- [6] SIA (2011): SIA 385/1. Anlagen für Trinkwarmwasser

- in Gebäuden – Grundlagen und Anforderungen
- [7] Proctor, C.R.; Reimann, M.; Vriens, B.; Hammes, F. (2018): Biofilms in shower hoses. *Water Res*
- [8] Swart, A.L.; Harrison, C.F.; Eichinger, L.; Steinert, M.; Hilbi, H. (2018): *Acanthamoeba* and *Dictyostelium* as Cellular Models for *Legionella* Infection. *Front Cell Infect Microbiol*
- [9] Neu, L.; Proctor, C.R.; Walser, J.C.; Hammes, F. (2019): Small-Scale Heterogeneity in Drinking Water Biofilms. *Front Microbiol*
- [10] ISO (2017): *Water quality – Detection and enumeration of Legionella (ISO standard 11731-2:2017)*. ISO, Geneva, Switzerland
- [11] Delaporte, E.; Hugonnet, S.; Marquet, F.; Sudre, P. (2006): Sporadische Fälle von im Alltag erworbener Legionellose, Genf 2003-04: Wasserproben aus Wohnungen bringen wenig. *BAG Bulletin* 30/06
- [12] Kirschner, A.K.T. (2016): Determination of viable legionellae in engineered water systems: Do we find what we are looking for? *Water Res*
- [13] Dietersdorfer, E.; Kirschner, A.; Schrammel, B.; Ohradnova-Repic, A.; Stockinger, H.; Sommer, R.; Walochnik, J.; Cervero-Arago, S. (2018): Starved viable but non-culturable (VBNC) *Legionella* strains can infect and replicate in amoebae and human macrophages. *Water Res*
- [14] Bürschgens, A. *Legionellen in Trinkwasser-Installationen. Gefährdungsanalyse und Sanierung*. 2018: Beuth-Verlag. S. 39
- [15] Sartory, D.P.; Spies, K.; Lange, B.; Schneider, S.; Langer, B. (2017): Evaluation of a most probable number method for the enumeration of *Legionella pneumophila* from potable and related water samples. *Lett Appl Microbiol*
- [16] Rech, M.M.; Swalla, B.M.; Dobranic, J.K. (2018): Evaluation of *Legiolert* for Quantification of *Legionella pneumophila* from Non-potable Water. *Curr Microbiol*
- [17] Pinheiro, L.B.; Coleman, V.A.; Hindson, C.M.; Herrmann, J.; Hindson, B.J.; Bhat, S.; Emslie, K.R. (2012): Evaluation of a droplet digital polymerase chain reaction format for DNA copy number quantification. *Anal Chem*
- [18] Deprez, L.; Corbisier, P.; Kortekaas, A.M.; Mazoua, S.; Beaz Hidalgo, R.; Trapmann, S.; Emons, H. (2016): Validation of a digital PCR method for quantification of DNA copy number concentra-

> SUITE DU RÉSUMÉ

La détection et l'évaluation de la contamination aux légionelles dans l'eau potable en combinant la culture bactérienne conventionnelle et les méthodes de biologie moléculaire gagnera de plus en plus d'importance dans l'avenir.

Les études sont à considérer comme une étude préliminaire du projet «Lutter contre les légionelles dans les bâtiments» (*LeCo*) financé par la Confédération, dans le cadre duquel l'échantillonnage par filtration ainsi que les méthodes de détection de biologie moléculaire doivent être développés et optimisés.

tions by using a certified reference material. *Biomol Detect Quantif*

- [19] Herpers, B.L.; de Jongh, B.M.; van der Zwaluw, K.; van Hannen, E.J. (2003): Real-time PCR assay targets the 23S-5S spacer for direct detection and differentiation of *Legionella* spp. and *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol*
- [20] Wilson, D.A.; Yen-Lieberman, B.; Reischl, U.; Gordon, S.M.; Procop, G.W. (2003): Detection of *Legionella pneumophila* by real-time PCR for the *mip* gene. *J Clin Microbiol*
- [21] Boss, R.; Baumgartner, A.; Kroos, S.; Blattner, M.; Fretz, R.; Moor, D. (2018): Rapid detection of viable *Legionella pneumophila* in tap water by a qPCR and RT-PCR-based method. *J Appl Microbiol*
- [22] Nazarian, E.J.; Bopp, D.J.; Saylor, A.; Limberger, R.J.; Musser, K.A. (2008): Design and implementation of a protocol for the detection of *Legionella* in clinical and environmental samples. *Diagn Microbiol Infect Dis*
- [23] SLMB (2012): Methode 333.1: Bestimmung der Totalzellzahl und des quantitativen Verhältnisses der Zellen niedrigen bzw. hohen Nukleinsäuregehaltes in Süßwasser mittels Durchflusszytometrie. BAG
- [24] Lee, J.V.; Lai, S.; Exner, M.; Lenz, J.; Gaia, V.; Casati, S.; Hartemann, P.; Luck, C.; Pangon, B.; Ricci, M.L.; Scaturro, M.; Fontana, S.; Sabria, M.; Sanchez, I.; Assaf, S.; Surman-Lee, S. (2011): An international trial of quantitative PCR for monitoring *Legionella* in artificial water systems. *J Appl Microbiol*
- [25] Diaz-Flores, A.; Montero, J.C.; Castro, F.J.; Alejandres, E.M.; Bayon, C.; Solis, I.; Fernandez-La Fuente, R.; Rodriguez, G. (2015): Comparing methods of determining *Legionella* spp. in complex water matrices. *BMC Microbiol*

Schweizer Leistungen für den Schweizer Markt

Die Firmen der Industrie- und Ingenieurgruppen I+IG verkörpern höchste Fachkompetenz und breite Erfahrung in Ihrer Nähe.

Les entreprises du GI+I incarnent le plus haut degré de compétence technique ainsi qu'une large expérience dans votre région

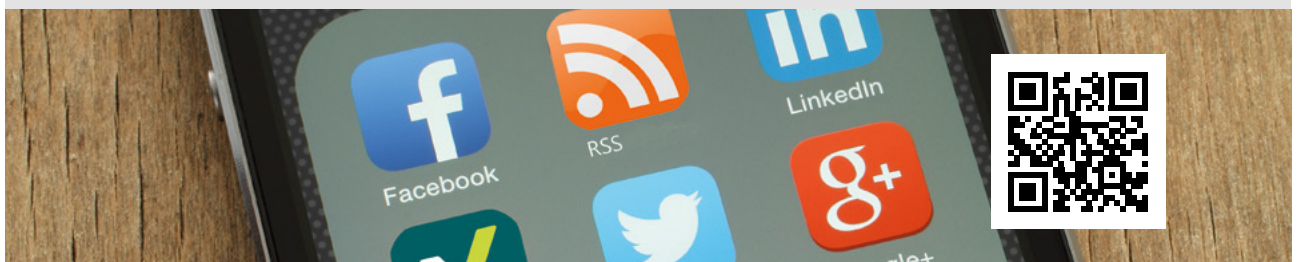
www.svgw.ch/I-IG



I+IG Industrie- und Ingenieurgruppe
Mitglied des SVGW
GI+I Groupement de l'Industrie et des Ingenieurs
Membre de la SSIGE

Folgen Sie uns...

Suivez-nous...



AQUA & GAS

aquaetgas.ch/scan

hawle

Hawle Armaturen AG
www.hawle.ch



etertub

Etertub AG
www.ertub.com

hawido

Hawido AG
www.hawido.ch

WOHLGROTH

Wohlgroth AG
www.wohlgroth.ch

Pietro Fiorentini®

Pietro Fiorentini AG
www.fiorentini-ag.ch

Unternehmen der hawlesuisse+^{CH}



WASSER IST UNSER ELEMENT

Immer und überall frisches und sauberes Wasser

Unsere Spezialisten entwickeln individuelle
und massgeschneiderte Lösungen.

HÄNY

Pumpen, Turbinen und Systeme

Häny AG • CH-8645 Jona • www.haeny.com

WIEDEMANN
RESERVOIRSCHUTZ AG

Instandsetzung und Schutz von Betonbauwerken



TRINKWASSERANLAGEN
Instandsetzung



Wiedemann Reservoirschutz AG
www.wiedemann-reservoirschutz.ch