

## NACHWEISMETHODEN

# Legionellen im Wasser aufspüren



Bild: Kokoa/Fotolia.com

In weniger als zwei Monaten infizieren sich 165 Anwohner, drei Patienten sterben an den Folgen einer Lungenentzündung. Ende 2013 mussten die Einwohner Warsteins lange auf die Diagnose „Legionellen“ warten. Das unsichtbare Bakterium konnte letztlich in einem Rückkühlwerk der Esser-Werke im Wesertal entdeckt werden. Dieses Szenario zeigt: Die routinemäßige Legionellen-Untersuchung von Wasser ist wichtig. Der Krankheitserreger versteckt sich in Warmwasserleitungen mit nicht ausreichend erhitztem Wasser (< 70°C), in Klimaanlage und Kühltürmen. Das Trinken von Legionellen-haltigem Wasser ist für Personen mit intaktem Immunsystem in der Regel ungefährlich. Ursache einer Infektion ist meist das Einatmen von bakterienhaltigem Wasser als Aerosol. Solche Aerosole entstehen beim Duschen oder in Whirlpools, werden durch Klimaanlage oder von Rasensprengern verbreitet.

Den Legionellen-Nachweis gemäß § 15 Absatz 4 der Trinkwasserverordnung dürfen nur akkreditierte und von den zuständigen deutschen Landesbehörden gelistete Laboratorien durchführen. Für diese entwickeln die Life-Science-Research (LSR)-Unternehmen Instrumente, Reagenzien und Testsysteme, die es ermöglichen, Legionellen schnell und sicher nachzuweisen.

### Klassisch – Zellen kultivieren

Gemäß internationalen Normen werden Legionellen auf Selektionsmedien kultiviert und nachgewiesen (Referenzmethoden ISO 11731 und DIN EN ISO 11731-2). Vor dem eigentlichen Nachweis werden die Bakterien durch Membranfiltration oder Zentrifugation aus Wasserproben ankonzentriert. Durch die Zugabe von Säurepuffer kann das Wachstum von

Begleitorganismen verringert werden. Die Membranfilter werden auf Legionellen-selektive Nährböden (GVPC Agar) übertragen. Nach zehn Tagen Inkubation bei 36°C werden die Nährböden auf morphologisch charakteristische Kolonien untersucht. Bestätigt sich der Legionellen-Verdacht, sind weitere biochemische Untersuchungen nötig, um die menschenpathogene Spezies *L. pneumophila* zu identifizieren. Sie ist für 90% der menschlichen Infektionen verantwortlich – weltweit sind 52 Spezies bekannt. Trotz standardisierter Testsysteme dauert die endgültige Bestätigung weitere zwei Tage.

### Modern – DNA amplifizieren

Eine molekularbiologische Nachweismethode ist die Real Time-PCR (Polymerasekettenreaktion). Für den Legionellen-Nachweis ist diese bislang nur in Frankreich als Standard (AFNOR T90-471) anerkannt.

Während der Real Time-PCR werden spezifische Abschnitte der Legionellen-DNA vermehrt. Gleichzeitig werden fluoreszierende Sonden an die DNA angelagert und als Detektionssignal genutzt. Die PCR ist schnell, sensitiv, komplett automatisierbar und im 96-Well-Format im Hochdurchsatz durchführbar. Von der Analyse bis zum Ergebnis vergehen nur wenige Stunden. Die Legionellen-Konzentration kann automatisiert über interne Quantifizierungsstandards festgestellt werden, gemessen wird in genomischen Einheiten (GE).

LSR-Firmen bieten Real Time-PCR-Geräte und Kits sowie für den Legionellen-Nachweis optimierte DNA-Extraktions-Kits an. Mit speziell entwickelten Luftkeimsammlern können diese Krankheitserreger unter realen Bedin-



### Termine für LSR-Firmen

**5. Juni 2014, Dreieich**  
Ausschuss Kundenkommunikation

**11. Juni 2014, Darmstadt**  
Ausschuss Wissenschaftsdialog

gungen „im Sprühnebel“ von Aerosolen gesammelt und untersucht werden.

### Welche Methode wann?

Der Nachweis auf Legionellen-spezifischen Nährböden ist der „Goldstandard“. Die geringen Kosten kompensieren den hohen manuellen Arbeitsaufwand und die langen Inkubationszeiten. Nachteil des Klassikers: Nicht kultivierbare Legionellen-Stämme, die sich in Amöben oder Biofilmen verstecken, sind nicht oder nur schwer nachweisbar.

Mit der Real Time-PCR lassen sich auch diese Legionellen erwischen. Der hohe Automatisierungsgrad und der Zeitfaktor sprechen für die PCR. Über die vervielfältigten DNA-Abschnitte wird bestimmt, ob es sich um *L. pneumophila* oder eine ungefährliche Legionellen-Spezies handelt. Allerdings kann nicht zweifelsfrei festgestellt werden, ob die gefundene Legionellen-DNA aus lebendigen oder toten Zellen stammt, also eine akute Infektionsquelle vorliegt. Um dies abzuklären, sind weitere molekularbiologische und biochemische Analysen notwendig.

Ob die molekularbiologische Real Time-PCR als Standard auch in Deutschland zugelassen werden soll, prüft das Bundesumweltamt. Grund: Für den Nachweis auf Selektionsmedien gibt es einen „technischen Maßnahmenwert“. Er liegt bei mehr als 1.000 Legionellen-Kolonien pro Liter Wasser. Wird dieser Wert überschritten, müssen Sofortmaßnahmen ergriffen werden wie eine Desinfektion des Leitungsnetzes oder das Verhängen eines öffentlichen Duschverbotes. Für die PCR-Untersuchung fehlt dieser Maßnahmenwert bislang. Im Hinblick auf den bei Krankheitsausbruch drängenden Faktor Zeit, wäre es eine Erleichterung, wenn Labor-Mitarbeiter auch die PCR routinemäßig einsetzen dürften. ▶

**Susanne Hanke, Arbeitsausschuss Wissenschaftsdialog**