

LEGIONELLEN-SCHNELLTEST KOMMT IM LABOR DER BERLINER WASSERBETRIEBE ZUM EINSATZ

Die gemeldeten Fälle der Legionärskrankheit nehmen in der Schweiz und in Deutschland seit Jahren zu. Schnelle, kultivierungsunabhängige Methoden für die quantitative Bestimmung von Legionellen in Wasserproben sind unerlässlich, um die Situation in den Griff zu bekommen. Das Labor der Berliner Wasserbetriebe hat deshalb den vom Schweizer ETH-Spin-off *rqmicro* entwickelten Schnelltest intern validiert und in der Praxis getestet.

Anna-Katharina Ehlert*, *rqmicro AG*

Knapp 500 Fälle der Legionärskrankheit registrierte das Bundesamt für Gesundheit (BAG) in der Schweiz im Jahr 2017 – das sind 35% mehr als 2016. Die Medien berichteten Anfang dieses Jahres ausführlich über die Zunahme der Fälle und meldeten, der Bund wolle eine Taskforce einsetzen, um die Lage unter Kontrolle zu bringen. Auch Deutschland hat ein Problem: Gemäss dem Robert-Koch-Institut sterben dort mittlerweile mehr Leute an der Legionärskrankheit als im Strassenverkehr. In ganz Europa ist die Legionärskrankheit seit Jahren auf dem Vormarsch, wie der Europäische Bericht «Surveillance and outbreak report» zur Legionärskrankheit vom Juli 2017 zeigt (Fig. 1). Der Bericht kommt zum Schluss, dass es an schnellen und zuverlässigen Kontrollmassnahmen für Wassersysteme zur Prävention von Ausbrüchen mangelt [1].

Legionellen-Bakterien wurden erst 1976 entdeckt und beschrieben. Damals fand ein Kongress der Amerikanischen Legion, ein Veteranenverein, statt, während dessen zahlreiche Teilnehmer an einer mysteriösen Lungenentzündung erkrankten. Ärzte und Mikrobiologen identifizierten nach fiebrhafter Suche ein Bakterium als Auslöser dieser «Legionärskrankheit» und nannten es *Legionella* [2]. Ausbrüche sind besonders gravierend, wenn



Fig 1 Zunahme der Fälle der Legionärskrankheit in Europa gemäss dem «Surveillance and outbreak report» zur Legionärskrankheit vom Juli 2017 [1].

Augmentation des cas de légionellose en Europe, selon le «Surveillance and outbreak report» relatif à la légionellose, de juillet 2017 [1].

sie in Krankenhäusern, Altersheimen oder Hotels auftreten. Das Risiko besteht jedoch auch in gewöhnlichen Wohnhäusern. In den letzten Jahren ist in Deutschland eine Reihe von Fällen bekannt geworden, bei denen neu errichtete Hausinstallationen mikrobiell kontaminiert waren und sich als schwer sanierbar erwiesen [3, 4].

Die Herausforderung liegt nicht nur in der Bekämpfung der Legionellen, sondern zuerst einmal darin, die Legionellen schnell und zuverlässig nachzuweisen. Die Analyse mit der Standardmethode gemäss ISO 11731 [5] kann gut zwei Wochen in Anspruch nehmen – im Falle eines Ausbruchs der Legionärskrankheit eine lange Zeitspanne. Einer Epidemie zwei Wochen hinterherzuhinken, kann fatale Folgen haben.

STANDARDNACHWEIS DAUERT ZWEI WOCHEN

Die etablierte Standardmethode (ISO 11731) basiert wie fast alle mikrobiologischen Analysen auf der Kultivierung von Bakterien auf Voll- oder Selektivnährmedien. Die Plattierungsmethode ist arbeitsintensiv, dauert zwischen 10 und 15 Tagen und

* Kontakt: ak.ehlert@rqmicro.com

RÉSUMÉ

TEST RAPIDE POUR DÉTECTER LES LÉGIONELLES UTILISÉ DANS LE LABORATOIRE DE LA COMPAGNIE BERLINER WASSERBETRIEBE

Les cas signalés de légionellose augmentent également en Suisse et en Allemagne depuis des années. Des méthodes rapides, sans culture, de dénombrement des légionelles dans des échantillons d'eau sont indispensables pour pouvoir maîtriser la situation. Le laboratoire de la compagnie Berliner Wasserbetriebe a, par conséquent, validé en interne et utilisé sur le terrain le test rapide développé par la spin-off suisse *rqmicro* de l'EPF.

Lors de ce test rapide, les légionelles sont séparées du reste de l'échantillon et concentrées par séparation immunomagnétique (SIM), à l'aide de particules magnétiques enrobées d'anticorps monoclonaux très spécifiques. Les légionelles sont également colorées avec des anticorps marqués par fluorescence et peuvent être quantifiées après la SIM dans un cytomètre en flux (CMF).

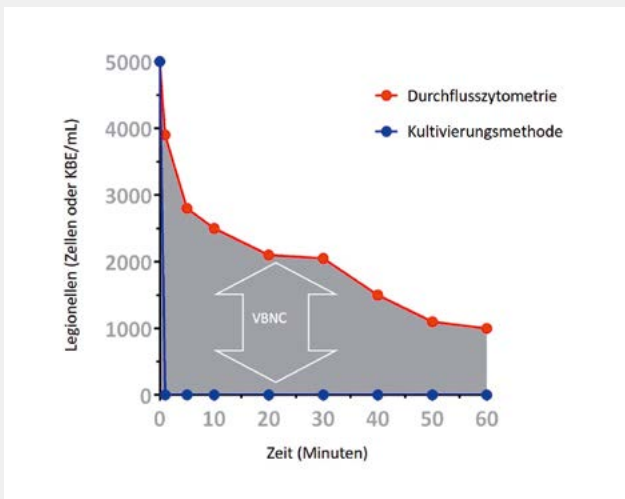


Fig. 2 Echtzeitüberwachung eines Desinfektionsverfahrens bei 70 °C.

Der Schnelltest mittels immunomagnetischer Separation und Durchflusszytometrie zeigt, dass VBNC-Legionellen potenziell auch nach einem 60-minütigen Desinfektionsprozess vorhanden sind. Mit der Kultivierungsmethode werden VBNC-Legionellen nicht detektiert, da sie auf Nährmedien nicht wachsen.

Surveillance en temps réel d'un procédé de désinfection à 70 °C. Le test rapide par séparation immunomagnétique et cytométrie en flux révèle que des légionelles VBNC sont encore potentiellement présentes, même après un processus de désinfection de 60 minutes. La méthode de culture ne permet pas de détecter les légionelles VBNC, car elles ne se développent pas dans des milieux nutritifs.

führt zu variablen Ergebnissen [6–8]. Ein ausgedehnter Ringversuch, an dem verschiedene Laboratorien in den USA teilnahmen, zeigte ausserdem, dass die Legionellen-Konzentration mit Plattierungsmethoden deutlich unterschätzt werden kann [9]. Ein Grund dafür ist, dass die Begleitflora das Nährmedium teilweise oder komplett überwächst, sodass das Wachstum von Legionellen gehemmt oder verhindert wird [10]. Mit steigender Begleitflora sinkt ausserdem die Reproduzierbarkeit der Messergebnisse, z. B. bei Legionellen in Oberflächengewässern. Ein weiterer Grund für falsch-negative Resultate ist, dass ein Anteil

der in einer Probe vorhandenen Legionellen zwar lebendig ist, auf dem Nährmedium aber nicht wächst [11] und damit durch die Standardmethode nicht detektiert wird (Fig. 2). Gerade nach Stagnation und chemischer oder thermischer Desinfektion von Wassersystemen kommen solche Zellen, genannt VBNC-Zellen (englisch für: *viable but non-culturable*), vermehrt vor. Solche lebensfähigen, aber nicht kultivierbaren Zellen sind potenziell immer noch gefährlich für den Menschen [12].

SCHNELLE ANALYSEN ERMÖGLICHEN ECHTZEIT-MONITORING

Aus den genannten Gründen drängen sich schnelle, kultivierungsunabhängige Verfahren immer mehr auf, die die mikrobielle Belastung exakt anzeigen. Auch das Labor der Berliner Wasserbetriebe (BWB), das die Qualität der Aufbereitungsprozesse des Berliner Trink- und Abwassers in allen Prozessschritten überwacht, ist dieser Ansicht. Für eine begleitende Analyse möglicher Dekontaminationsverfahren nach einer Befundstellung sei der Zeitraum zwischen Probenahme und Ergebnisfindung zu lang, findet Uta Böckelmann, Leiterin des akkreditierten Labors der BWB. «Daher wurde nach einer Möglichkeit gesucht, die Legionellen-Konzentration in möglichst kurzer Zeit zu bestimmen.» Da allgemein bekannt ist, dass unterschiedliche Legionellen-Stämme unterschiedliche Infektionspotenziale aufweisen [1], muss ein mögliches neues Verfahren den Stamm mit dem höchsten Gefährdungspotenzial, *Legionella pneumophila* SG1, detektieren und quantifizieren können, forderte das Labor der BWB.

KULTIVIERUNGSUNABHÄNGIGE EINZELZELLZÄHLUNG IN UNTER ZWEI STUNDEN

Mit der vom Schweizer Start-up entwickelten Methode gelingt es, Legionellen aus komplexen Wasserproben in kurzer Zeit zu isolieren, aufzureinigen und zu quantifizieren. Die Basis dafür bildet die immunomagnetische Separation (IMS) der Zielzellen mithilfe magnetischer Partikel, die mit hochspezifischen, monoklonalen Antikörpern beschichtet sind. Die Zielzellen (also die Legionellen-Zellen), die via Antikörper an die magnetischen Partikel gebunden sind, lassen sich mithilfe eines Magneten vom Rest der Probe abtrennen und aufkonzentrieren. Indem die Zielzellen zusätzlich mit fluoreszenzmarkierten

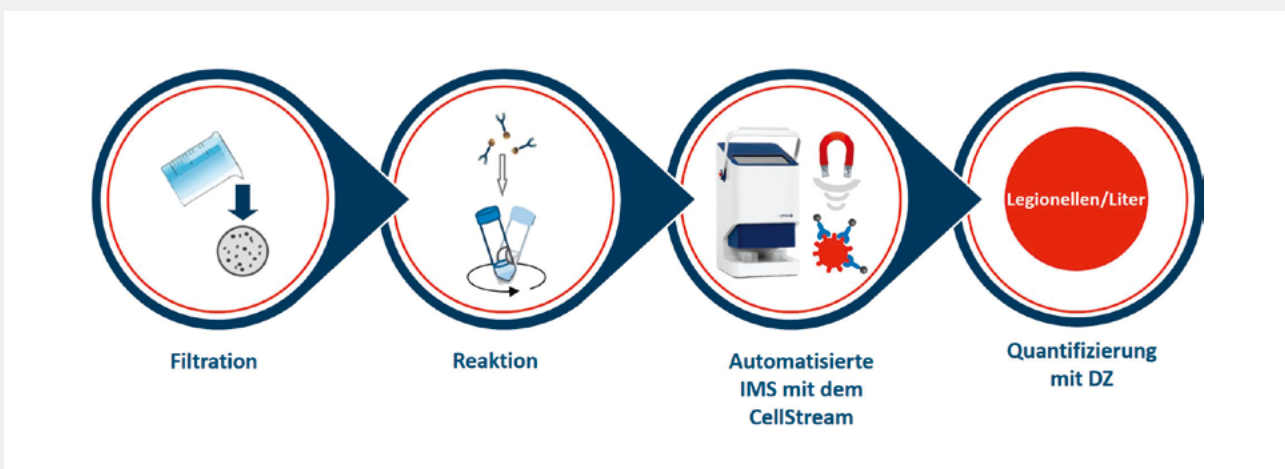


Fig. 3 Legionellen-Schnelltest: quantitative Resultate in unter zwei Stunden mit einem einfachen Arbeitsablauf von der Filtration bis zur Analyse mit dem Durchflusszytometer.

Test rapide de détection des légionelles: résultats quantitatifs en moins de deux heures avec un cycle de travail simple, de la filtration à l'analyse avec le cytomètre en flux.

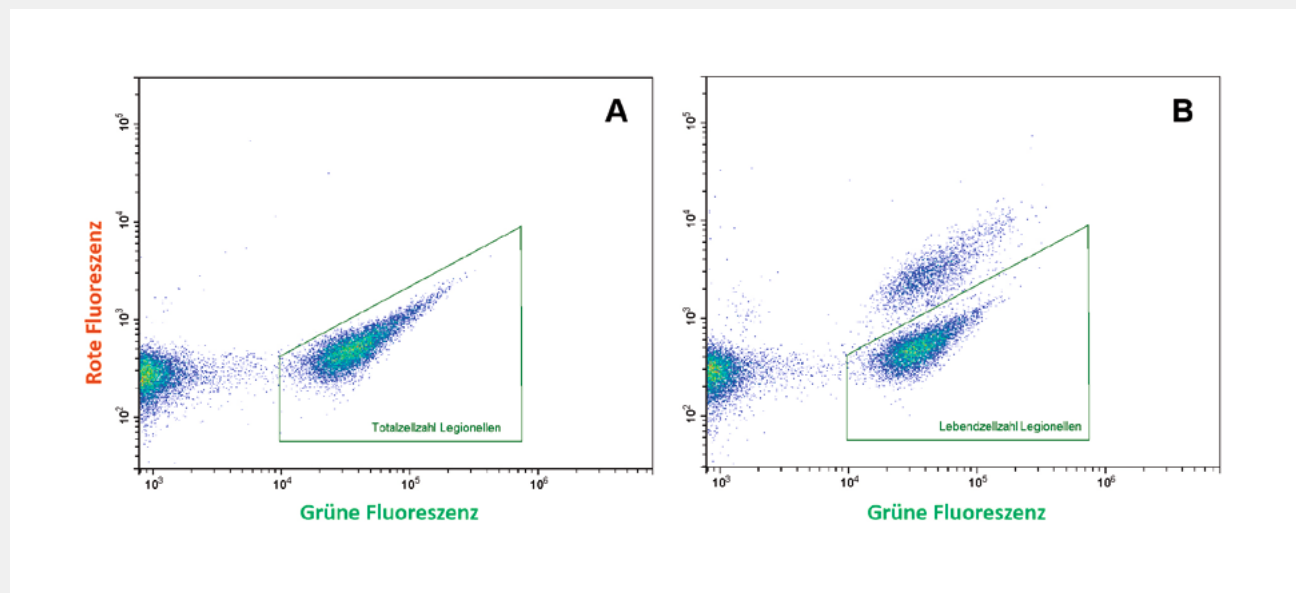


Fig. 4 *Legionella pneumophila* SG1-Zellen in *Evian* gespiked und gemäss Schnelltest-Protokoll prozessiert. (A) Probe mit Farbstoff (grün) angefärbt: *L. pneumophila* SG1-Totalzellzahl im grünen Fenster. (B) Probe mit Farbstoff (grün) und Viabilitätsfarbstoff (rot) angefärbt: *L. pneumophila* SG1-Lebendzellzahl im grünen Fenster. Die tote Zellpopulation ist rot und grün angefärbt und befindet sich ausserhalb des grünen Fensters.

L'eau d'*Evian* enrichie avec des cellules de *Legionella pneumophila* SG1 et soumise au protocole du test rapide. (A) Echantillon coloré avec un colorant (vert): nombre total de cellules de *L. pneumophila* SG1 dans l'encadré vert. (B) Echantillon coloré avec un colorant (vert) et un colorant de viabilité (rouge): nombre total de cellules vivantes de *L. pneumophila* SG1 dans l'encadré vert. La population de cellules mortes est colorée en vert et en rouge et se trouve à l'extérieur de la fenêtre verte.

Antikörpern angefärbt werden, können sie nach der IMS im Durchflusszytometer (DZ) quantifiziert werden. Von der Filtration bis zum Resultat vergehen dabei lediglich etwa zwei Stunden (Fig. 3).

Im Gegensatz zu den etablierten Verfahren erfasst der neue Schnelltest sämtliche in einer Probe vorhandenen und potenziell infektiösen Legionellen – eben auch jene Zellen, die auf den Agarplatten nicht wachsen (VBNC-Zellen). Mit einem Viabilitätsfarbstoff kann ausserdem zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden (Fig. 4), wobei die VBNC-Zellen in der Fraktion der lebenden Zellen zu finden sind.

Um hohe Reproduzierbarkeit garantieren zu können und Bedienungsfehler zu eliminieren, entwickelte das interdisziplinäre Team von rqmicro das CellStream-Instrument für eine voll automatisierte IMS. Der standardisierte IMS-Prozess über mikrofluidische Einwegkartuschen liefert gebrauchsfertige Proben für die Quantifizierung mit Durchflusszytometrie oder für andere nachgelagerte Analysemethoden wie PCR.

Einige Wasserversorgungen, z. B. in Basel und Genf, sowie Firmen mit Kühlaggregaten oder Analyselabore verwenden die neue Analyseverfahren bereits. Das Labor der BWB setzt die Methode seit einem halben Jahr erfolgreich ein und möchte künftig damit die Trinkwasserinstallationen in 200 Gebäuden regelmässig testen. Das Unternehmen ist bezüglich seiner Grösse Deutschlands Branchenprimus und kann auf 160 Jahre Tradition zurückblicken. Über 4000 Mitarbeiter liefern jährlich aus neun Wasserwerken über 200 Millionen Kubikmeter bestes Trinkwasser und reinigen in ihren sechs Klärwerken ca. 245 Millionen Kubikmeter Abwasser. Im Labor werden über 20 000 Trinkwasserproben pro Jahr analysiert.

Um die Qualität sicherzustellen und maximale Einsicht in den Zustand ihrer Wässer zu erhalten, setzt das Labor der BWB nicht

nur auf den Legionellen-Schnelltest, sondern auch auf weitere innovative Technologien. Neue Einblicke und Zusammenhänge zwischen räumlich und zeitlich getrennten Ereignissen liefert beispielsweise das in der Branche noch recht unbekannt digitale Visualisierungstool GENOTRIL, das in einer Zusammenarbeit von *Blue Biolabs* mit *Datalyze Solutions* entstanden ist. Laborresultate, in erster Linie mikrobiologische Befunde, werden in Bezug zu Probenahmezeit und -ort sowie zu anderen Parametern gesetzt und auf übersichtliche Weise bildlich dargestellt. «Das erleichtert die Ursachenforschung sehr», erklärt *Uta Böckelmann*.

BWB-LABOR ZEIGT ÄQUIVALENZ DES LEGIONELLEN-SCHNELLTESTS ZUR ISO 11731

Das Labor der BWB bestimmte für die interne Validierung des Legionellen-Schnelltests dessen Wiederfindungsrate und führte einen Vergleich mit der Standardmethode durch. Um die Wiederfindungsrate zu ermitteln, wurden unterschiedliche Zellzahlen von *Legionella pneumophila* SG1 in phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) gegeben und die Zellsuspensionen wurden mit der Kombination von IMS und Durchflusszytometrie analysiert. Die durchschnittliche Wiederfindungsrate betrug dabei 80% (Fig. 5). Für den Vergleich mit der ISO 11731 wurden Proben aus einer frischen Stammsuspension in PBS angesetzt und direkt in dieser Matrix bearbeitet. Dieses Probenmaterial wurde anschliessend mit unterschiedlichen Volumina im Direktansatz nach ISO 11731 ausplattiert, 10 Tage bei 36 °C bebrütet und dann ausgezählt. Ein zweiter Teil des Probenmaterials wurde mit der vorgängig beschriebenen Kombination von IMS und Durchflusszytometrie analysiert. Die Resultate zeigten, dass der neue Schnelltest 10-mal sensitiver ist als das Plattierungsverfahren (Fig. 6).

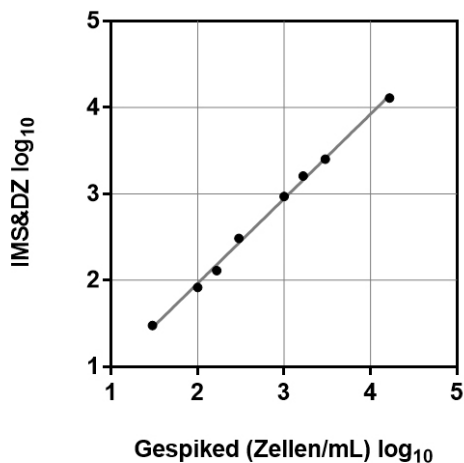


Fig. 5 In Leistungstests wurde eine hohe Wiederfindungsrate von durchschnittlich 80% und eine Korrelation von > 99% in einem breiten Anwendungsbereich von 30 bis 16 667 Zellen/ml gefunden. *L. pneumophila* SG1-Zellen in PBS, durchflusszytometrische Analyse nach IMS mit dem CellStream.

Lors de tests de performance, il a été constaté un taux élevé de récupération de 80% en moyenne et une corrélation de 99% dans un large domaine d'application de 30 à 16 667 cellules/ml. Cellules de *L. pneumophila* SG1 dans tampon phosphate salin, l'analyse cytométrique en flux après la SIM avec le CellStream.

PRAXISBEISPIELE

Das Labor der BWB hat den Schweizer Schnelltest für *Legionella pneumophila* SG1 im Rahmen einer Gebäudebeprobung einem Spezifitätstest unterzogen. Dazu wurde die Legionellen-Konzentration in der Trinkwasserinstallation des Gebäudes A mit dem Verfahren nach ISO 11731 (Plattierungsverfahren) analysiert. Es stellte sich heraus, dass an vier Probenahmestellen eine deutliche Überschreitung des technischen Massnahmenwertes der deutschen Trinkwasserverordnung von 100 KBE/100 ml vorlag. Dieser Massnahmenwert entspricht dem Legionellen-Höchstwert in der Verordnung des EDI über Trinkwasser sowie Wasser in öffentlich zugänglichen Bädern und Duschanlagen (TBDV). Die gleichen Proben wurden mittels CellStream aufgereinigt und anschliessend durchflusszytometrisch analysiert. Die Ergebnisse blieben ohne Befund. Die DNA-Sequenzierung

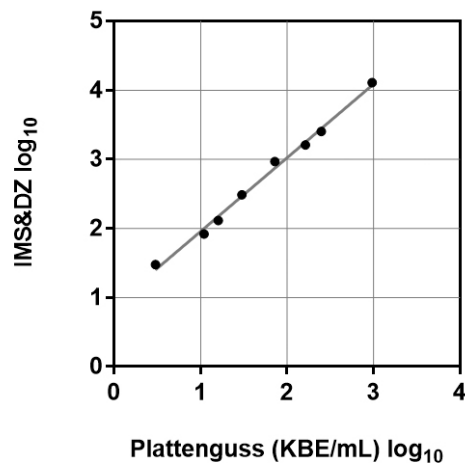


Fig. 6 Die Sensitivität der durchflusszytometrischen Analyse nach IMS mit dem CellStream, verglichen mit der ISO-11731-Methode, ist 10-mal höher. Unter Laborbedingungen, abhängig vom Proben-typus, kann sich dieser Faktor ändern.

La sensibilité de l'analyse cytométrique en flux après la SIM avec le CellStream, comparée à la méthode ISO 11731, est 10 fois supérieure. Dans des conditions de laboratoire, ce facteur peut se modifier en fonction du type d'échantillon.

der nach ISO 11731 ermittelten Legionellen-Kolonien zeigte dann, dass es sich bei keiner der Kolonien um Legionellen des Typs *Legionella pneumophila* SG1 handelte (Tab. 1). Dies unterstreicht die hohe Spezifität der Antikörper, die für das neue Aufreinigungs- und Analyseverfahren verwendet werden.

Ein weiteres Beispiel einer Gebäudebeprobung dokumentiert die kurze Zeitspanne von der Probenahme bis zum Erhalt eines quantitativen, aussagekräftigen Resultats mit dem Schnelltest im Vergleich zur Standardmethode. Das Gebäude B wurde im Zuge der Routineanalyse auf Legionellen in der Trinkwasserinstallation beprobt. Die Proben wurden anschliessend nach ISO 11731 analysiert. An drei Probenahmestellen wurden Legionellen-Konzentrationen oberhalb bzw. im Bereich des Massnahmenwertes von 100 KBE/100 ml bestimmt. Nach thermischer Desinfektion wurde eine parallele Untersuchung der betreffenden Probenahmestellen mittels ISO-Verfahren und dem neuen Verfahren durchgeführt. Mit dem Schnelltest

Messstelle	Leitungsart	<i>L. spp.</i> nach ISO 11731 (KBE/100 ml)	<i>L. p. SG1</i> mittels CellStream/DZ (Zellen/100 ml)	Identifizierung mittels qPCR	
				MIP-Gen (GU) spezifisch für <i>L. spp.</i>	SG1-Gen (GU) spezifisch für <i>L. p. SG1</i>
1	kalt	2100	0	11	0
2	warm	300	0	0,5	0
3	kalt	400	0	0,5	0
4	kalt	2200	0	1,5	0

Tab. 1 Die Legionellen-Konzentration in der Trinkwasserinstallation des Gebäudes A wurde gemäss ISO 11731 und mit dem Schnelltest ermittelt. Die nach ISO 11731 gefundenen Kolonien konnten mittels qPCR als *Legionella spp.* identifiziert werden. Die negativen Resultate des Schnelltests zeigen dessen Spezifität für *L. pneumophila* SG1.

La concentration de légionelles dans l'installation d'eau potable du bâtiment A a été déterminée avec la méthode ISO 11731 et avec le test rapide. Les colonies détectées avec la méthode ISO 11731 ont pu être identifiées comme *Legionella spp.* à l'aide de la qPCR. Les résultats négatifs du test rapide témoignent de la spécificité de celui-ci pour *L. pneumophila* SG1.

Messstelle	Leitungsart	L. spp. nach ISO 11731 (KBE/100 ml)	L. p. SG1 mittels CellStream/DZ (Zellen/100 ml)		
			total	lebend	% tote L. p. SG1
x	warm	0	186 560	350	99,81%
y	warm	0	249 660	150	99,94%
z	warm	0	134 340	30	99,98%

Tab. 2 In der Trinkwasserinstallation des Gebäudes B wurde der Massnahmenwert gemäss ISO 11731 überschritten. Nach der Hitzebehandlung wurde das Gebäude erneut beprobt und die Legionellen-Analyse sowohl nach ISO 11731 als auch mit dem neuen Schnelltest durchgeführt. Die Wirksamkeit der Hitzebehandlung konnte mit dem Schnelltest innert 3 Stunden nachgewiesen werden, während mit der Standardmethode erst nach 10 Tagen ein negativer Befund vorlag.

Dans l'installation d'eau potable du bâtiment B, la valeur de mesure selon ISO 11731 a été dépassée. Après le traitement thermique, le bâtiment a été de nouveau testé et l'analyse de détection de légionelles a été effectuée avec la méthode ISO 11731 et également avec le nouveau test rapide. L'efficacité du traitement thermique a pu être établie en 3 heures avec le test rapide, alors que la méthode standard n'a abouti à un résultat négatif qu'au bout de 10 jours.

wurden nach einer Bearbeitungszeit von rund drei Stunden für alle Proben Konzentrationen von *Legionella pneumophila* SG1 im Bereich von 1×10^5 – $2,5 \times 10^5$ Zellen/100 ml ermittelt. Die Differenzierung mittels Viabilitätsfarbstoff zeigte aber, dass es sich bei den detektierten Zellen zu über 99% um Totmaterial handelte. Dies wurde 10 Tage später durch die befundlose Auswertung der kultivierten Proben bestätigt (Tab. 2). Dass mit dem Schnelltest noch eine geringe Anzahl lebender Zellen detektiert wurde, obwohl mit der ISO-Methode keine Legionellen in 100 ml gefunden wurden, liegt daran, dass mittels IMS/DZ auch lebensfähige, aber nicht kultivierbare Legionellen nachgewiesen werden können (Fig. 2). Die Zeiteinsparung dank der neuen Methode kann im Ernstfall, beispielsweise nach einer Überschreitung des Massnahmenwertes in einem Rückkühlwerk einer grossen industriellen Produktionsstätte, beträchtliche finanzielle Einsparungen bedeuten.

AKKREDITIERUNG UND SCHNELLTESTS FÜR WEITERE PATHOGENE

Das Labor der BWB plant, die Schnelltest-Methode Ende dieses Jahres für *Legionella pneumophila* SG1-15 akkre-

ditieren zu lassen. Die Vorbereitungen dazu laufen. Das ETH-Start-up rqmicro ist indes damit beschäftigt, die Produktpalette auszubauen und das Verfahren auf weitere Pathogene aus dem Wasser- und Lebensmittelbereich anzuwenden wie beispielsweise auf Giardien und Kryptosporidien, Salmonellen, Kolibakterien sowie Pseudomonaden. Die neue Analyse-methode befindet sich zurzeit im Prozess der ISO-Akkreditierung. Die erste Validierungsstufe sollte noch in diesem Jahr erreicht werden.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Beauté, J.; on behalf of the European Legionnaires' Disease Surveillance Network (2017): Legionnaires' Disease in Europe, 2011 to 2015. *Eurosurveillance* 22: <http://www.eurosurveillance.org/content/10.2807/1560-7917.ES.2017.22.27.30566>
- [2] Brenner, D.J.; Steigerwalt, A.G.; McDade, J.E (1979): Classification of the Legionnaires' disease bacterium: *Legionella pneumophila*, genus novum, species nova, of the family Legionellaceae, familia nova. *Ann. Intern. Med.* 90: 656–658
- [3] Kistemann, T. (2005): Hygienisch mikrobiologische Risiken von Grossgebäude-Wasserinstallationen. *IKZ Haustechnik* 8: 66–68

- [4] Völker, S.; Schreiber, C.; Kistemann, T. (2010): Drinking water quality in household supply infrastructure – A survey of the current situation in Germany. *Int. J. Hyg. Environ. Health* 213: 204–209
- [5] ISO (2004): ISO 11731: Water quality – detection and enumeration of *Legionella*
- [6] Boulanger, C.A.; Edelstein, P.H. (1995): Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1805–1809
- [7] Bentham, R.H. (2000): Routine sampling and the control of *Legionella* spp. in cooling tower water systems. *Curr. Microbiol.* 41: 271–275
- [8] Napoli, C. et al. (2009): Variable bacterial load of *Legionella* spp. in a hospital water system. *Sci. Total Environ.* 408: 242–244
- [9] Lucas, C.E.; Taylor Jr., T.H.; Fields, B.S. (2011): Accuracy and precision of *Legionella* isolation by US laboratories in the ELITE program pilot study. *Water Res.* 45: 4428–4436
- [10] Edelstein, P.H. (1982): Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *J. Clin. Microbiol.* 16: 697–699
- [11] Oliver, J.D. (2010): Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 34: 415–425
- [12] Kirschner, A.K.T. (2016): Determination of viable legionellae in engineered water systems: Do we find what we are looking for? *Water Res.* 93: 276–288