

# Entwicklung eines molekularbiologischen Nachweissystems für *Legionella* spp. in Wasserproben in Korrelation zu dem in der Trinkwasserverordnung festgelegten mikrobiologischen Maßnahmewert

Beutlich, Janine; Geister, Jennifer; Mergemeier, Steffen

CONGEN Biotechnologie GmbH, Robert-Rössle-Str. 10, 13125 Berlin, Germany

## Einleitung

Legionellen sind in der Umwelt in zahlreichen Arten verbreitete Bakterien, die vor allem in Wasser vorkommen. Sie proliferieren bevorzugt in einem Temperaturbereich von 25 – 45°C.

Insbesondere längere Verweilzeiten in technischen Systemen wie Warmwasserverteilungsanlagen, Klimaanlage, Luftbefeuchtern, Badebecken und sonstigen technischen Apparaten (z. B. für die Mundhygiene oder zur Behandlung von Atemwegserkrankungen) bieten Legionellen optimale Wachstumsbedingungen.

Mit einem Anteil von ca. 90% ist *Legionella pneumophila* als Hauptursache der Legionellose (auch Legionärskrankheit) bekannt. Potenziell können jedoch alle derzeit bekannten 57 *Legionella* Spezies Erkrankungen beim Menschen hervorrufen. Das Spektrum der klinischen Symptomatik reicht von asymptomatischen Infektionen bis hin zu schweren Pneumonien, die in 10-15% der Fälle tödlich enden.

**Tabelle 1:** Validierungsdaten zur Spezifität von SureFast® Legionella Screen PLUS

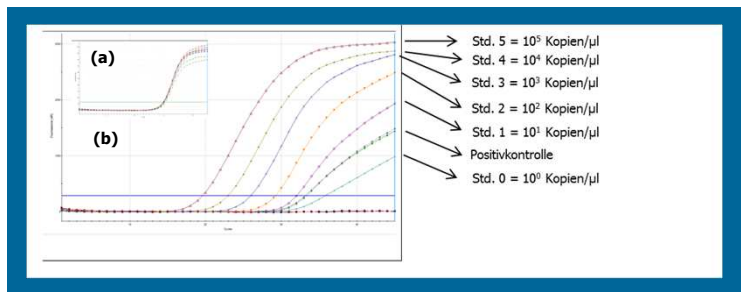


Sample	Real-time PCR
<i>Aeromonas caviae</i>	negativ
<i>Aeromonas hydrophila</i>	negativ
<i>Alcaligenes faecalis</i>	negativ
<i>Bacillus subtilis</i>	negativ
<i>Campylobacter jejuni</i>	negativ
<i>Clostridium perfringens</i>	negativ
<i>Enterobacter aerogenes</i>	negativ
<i>Escherichia coli</i>	negativ
<i>Flavobacterium</i> sp.	negativ
<i>Klebsiella oxytoca</i>	negativ
<i>Legionella anisa</i>	positiv
<i>Legionella bozemanae</i>	positiv
<i>Legionella dumoffii</i>	positiv
<i>Legionella gormanii</i>	positiv
<i>Legionella longbeachae</i>	positiv
<i>Legionella maceachernii</i>	positiv
<i>Legionella micdadei</i>	positiv
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>fraseri</i>	positiv
<i>Legionella pneumophila</i> subsp. <i>pascullei</i>	positiv
<i>Listeria monocytogenes</i>	negativ
<i>Proteus vulgaris</i>	negativ
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	negativ
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	negativ
<i>Pseudomonas putida</i>	negativ
<i>Salmonella</i> Enteritidis	negativ
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	negativ
<i>Yersinia enterocolitica</i>	negativ

## Beschreibung der Methode

In dieser Studie wird die Entwicklung des real-time PCR basierten Nachweissystems SureFast® Legionella Screen PLUS (CONGEN, Berlin) zur Untersuchung von Trinkwasser-, Oberflächenwasser- und Brunnenwasserproben beschrieben.

Nach der DNA-Isolierung mit dem Extraktionskit SureFast® PREP Aqua (CONGEN, Berlin) erfolgt die sequenz-spezifische Amplifikation der *Legionella*-DNA in der PCR. Diese Methode ermöglicht den sensitiven Nachweis von *Legionella* spp. entsprechend DIN EN ISO 20837, DIN EN ISO 20838 und ISO/TS 12869.



**Abbildung 1:** Real-time PCR Daten SureFast® Legionella Screen PLUS:

(a) Interne Amplifikationskontrolle;

(b) Standard-Verdünnungsreihe 10<sup>5</sup> DNA-Kopien/μl – 10<sup>0</sup> DNA-Kopien/μl (Agilent Mx3005P)

Zusätzlich enthält das Kit eine Positivkontrolle, die dem in der Trinkwasserverordnung (TrinkwV) angegebenen technischen Maßnahmewert einer *Legionella*-Konzentration von 100 KBE/100 ml entspricht (Abb. 1).

Dadurch kann die Konzentration von *Legionella* spp. in der Probe bewertet werden:

Cp-Wert [Probe] < Cp-Wert [Positivkontrolle] = die Konzentration der Proben-DNA liegt über dem zulässigen Grenzwert

Cp-Wert [Probe] > Cp-Wert [Positivkontrolle] = die Konzentration der Proben-DNA liegt im zulässigen Bereich.

Das Nachweissystem ist zusätzlich mit einer internen Amplifikationskontrolle (PLUS) ausgestattet und kann auf allen gängigen real-time PCR Cyclern angewendet werden, die gleichzeitig zwei Reporterfarbstoffe im FAM- und VIC/HEX-Kanal detektieren können.

Der Test wurde erfolgreich im Ringversuchsprogramm INSTAND Nr. 536 *Legionella pneumophila* zur externen Qualitätssicherung überprüft.



**Fazit**

Das real-time PCR Testsystem SureFast® Legionella Screen PLUS bietet eine schnelle, zuverlässige Alternative zu den klassischen mikrobiologischen Verfahren in der Überwachung der mikrobiellen Wasser- bzw. Trinkwasserqualität.

