

Ehemaliger Lehrstuhl für Hygiene
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Prof. Dr. med. E. H. Pfeiffer

**Nachweis von Legionellen in Warm-, Brauch- und
Oberflächenwasser mittels Amöben- Kokultur**

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg

vorgelegt von

Kai Florian Mehrländer

aus Hildesheim

Hamburg 2009

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am: 5.11.2009

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg am:

Prüfungsausschuss: der/die Vorsitzende/r: Prof. Dr. E. Pfeiffer

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. K. Püschel

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. J. Westendorf

1. Einleitung.....	6
1.1. Geschichte und Morphologie	6
1.2. Epidemiologie und Klinik	6
1.3. Nachweismethoden für Legionellen.....	11
1.4. Ziel der eigenen Studie	14
2. Material und Methoden.....	16
2.1. Kultur der Amöben.....	16
2.2. Legionellen	18
2.3. Amöben- Legionellen- Kokultur.....	19
2.4. Proben und Probenentnahmestellen	20
2.5. Mikrobiologische Parameter der Oberflächenwasser- Proben	20
2.6. Verarbeitung der Wasserproben für die Proben-Amöben-Kokultur	21
2.7. Proben mit Zusatz von legionellenhaltigem Duschwasser und anschließender Amöben-Kokultivierung	23
2.8. Direkter kultureller Legionellen-Nachweis in Wasserproben ohne Zusatz von Amöben	23
2.9. Quantitative Bestimmung von Legionellen und Begleitflora.....	24
2.10. Bestimmung der Einflussfaktoren auf die Kokultur	25
2.11. Auswertung.....	27
3. Ergebnisse.....	28
3.1. Etablierung der Amöben-Kokultur mit legionellenhaltigem Duschwasser...	28
3.2. Quantitativer Nachweis von Legionellen in Duschwasser mit Amöben-Kokultur mittels der MPN-Methode	33
3.3. Wasserproben mit Zusatz von legionellenhaltigem Duschwasser	34
3.4. Einfluss der physikalischen und mikrobiologischen Eigenschaften von Probenwasser auf den Legionellennachweis	35

Proben- Amöben-Kokultur	37
3.5. <i>Einfluss der zugesetzten Amöbenmenge auf die Vermehrung der heterotrophen Begleitflora.....</i>	39
3.6. <i>Legionellennachweis in Umweltwasserproben nach Proben-Amöben-Kokultur.....</i>	41
4. Diskussion.....	43
4.1. <i>Etablierung der Proben-Amöben-Kokultur mit legionellenhaltigen Duschwasser.....</i>	43
4.2. <i>Quantitativer Nachweis von Legionellen in Duschwasser mit Amöben-Kokultur mittels der MPN-Methode</i>	48
4.3. <i>Legionellennachweis in mit legionellenhaltigem Duschwasser versetzten Wasserproben nach Amöben- Kokultur</i>	49
4.4. <i>Einfluss der physikalischen und mikrobiologischen Eigenschaften von Probenwasser auf den Legionellennachweis</i>	49
4.5. <i>Einfluss der zugesetzten Menge an Amöben auf die Vermehrung der heterotrophen Begleitflora.....</i>	50
4.6. <i>Legionellennachweis in Wasserproben nach Proben-Amöben-Kokultur</i>	50
4.7. <i>Ausblick</i>	52
5. Zusammenfassung.....	53
6. Literatur.....	54
7. Anhang.....	63
Anhang 1: Verwendete Medien	63
Anhang 2: Probenentnahmorte:	65
Anhang 3: Mikrobiologische und physikalische Parameter der Oberflächenwasserproben	66
Anhang 4: Einfluss der Menge der zugegebenen Amöben auf die Vermehrung von Duschwasser-Legionellen in Proben- Amöben- Kokultur	68

Anhang 5: Vermehrung von Legionellen in Duschwasser mit Amöben-Kokultur.....	69
Anhang 6: MPN.....	70
Anhang 7: Nachweis von Legionellen in mit legionellenhaltigem Duschwasser versetztem warmen Trinkwasser, Whirlpoolwasser und Wasser aus Wäscherkammern von Klimaanlagen in Amöben-Kokultur.	71
Anhang 8: Nachweis von Legionellen in mit legionellenhaltigem Duschwasser versetztem Oberflächenwasser	72
Anhang 9: Wachstum der heterotrophen Begleitflora nach primärer Anzucht auf festen Nährmedien.....	73
<i>Danksagung.....</i>	76
<i>Lebenslauf.....</i>	77

1. Einleitung

1.1. Geschichte und Morphologie

Bei dem 58. Jahrestreffen von Veteranen der amerikanischen Legion im Juli 1976, das in einem Hotel in Philadelphia (USA) stattfand, erkrankten 182 der 4400 Teilnehmer an einer bis dahin unbekannten Pneumonieform. 29 der Erkrankten verstarben an der Krankheit, die später nach den betroffenen Personen "Legionärskrankheit" genannt wurde (Fraser et al. 1977). Erst etwa sechs Monate später wurde aus Autopsieproben der Verstorbenen ein Bakterium isoliert (McDade et al. 1977), das zunächst *Legionnaires' Disease Bacterium* und nach eindeutiger taxonomischer Bestimmung *Legionella pneumophila* genannt wurde.

Bakterien der Gattung *Legionella* sind charakterisiert als schlecht anfärbbare, gramnegative, aerobe Stäbchen. Sie sind beweglich, monopolar begeißelt, wachsen fakultativ intrazellulär (Fields 2002) und sind die einzige bekannte Bakterien, die in starkem Maße in Amöben proliferieren (Abu Kwaik et al. 1998).

Inzwischen wurden 39 Spezies der Gattung *Legionella* isoliert, von denen 20 als humanpathogen beschrieben sind und sich erheblich in ihrer Bedeutung als Krankheitserreger und in ihrer Virulenz unterscheiden (Muder u. Yu 2002). *L. pneumophila* ändert seinen Phänotyp in Abhängigkeit vom Nahrungsangebot. So sind Legionellen bei hohem Nährstoffanteil in der Umgebung wenig virulent, natriumresistent und flagellenlos, während sie in nährstoffärmer Umgebung natriumsensibel, flagelliert und beweglich, cytotoxisch, osmotisch resistenter, kompetent zur Makrophagen-Invasion und infektiös sind (Byrne u. Swanson 1998). Der häufigste Erreger von sporadischen Legionellosen ist *Legionella pneumophila*, der in einer weltweiten Studie bei 91,5 % von 508 dokumentierten Fällen nachgewiesen wurde, gefolgt von *L. longbeachae*, das für 3,9 % der Erkrankungen verantwortlich ist. Allein in Neuseeland und Australien nehmen hiervon aber die Infektionen mit *L. longbeachae* einen Anteil von 30,4 % ein (Yu et al. 2002). Von der Spezies *L. pneumophila* sind 16 Serogruppen bekannt, wobei 50 - 80% der Legionellosen durch *L. pneumophila* Serogruppe 1 (SG1) verursacht werden (Marston et al. 1994).

1.2. Epidemiologie und Klinik

2004 wurden in der Bundesrepublik Deutschland 475 Fälle von Legionellose gemeldet (RKI 2005). Die Dunkelziffer wird auf 6000 – 10.000 Erkrankungen pro Jahr geschätzt, und bei 1 - 5 % der in Krankenhäusern behandelten Pneumonien wurde eine Legionellose diagnostiziert

(RKI, 1999). In den USA wurden jährlich rund 2200 Fälle von Legionärskrankheit gemeldet (CDC, 2005), doch die Zahl der Fälle wurde auf bis zu 20.000 geschätzt (Marston et al. 1994). Diese hohe Rate an nicht aufgedeckten Legionellosen ist unter anderem in der gängigen Praxis, Pneumonien ohne Erregerbestimmung antibiotisch zu therapieren und in dem schwierigen Erregernachweis begründet.

Bei stationär behandelten an Pneumonie Erkrankten wurde sowohl serologisch als auch kulturell in 9-25% eine Legionelleninfektion nachgewiesen, womit diese doppelt so häufig wie eine durch Pneumokokken ausgelöste Pneumonie waren. Zwischen 1 und 22,5% (Fang et al. 1990), oder nach neueren epidemiologischen Studien zwischen 3,4 und 7% (RKI, 2003), aller Pneumonien werden durch Legionellen verursacht, sie gehören daher zu den häufigen bakteriellen Erregern ambulant erworber Pneumonien.

Sowohl in den USA als auch in Deutschland wurden in Studien keine signifikanten Unterschiede der Antikörper-Titer bei gesunden und infizierten, beziehungsweise vor kurzem infizierten Menschen gefunden. Dabei sinkt ein erhöhter Antikörperspiegel bei Erkrankten mit einer Halbwertzeit von 3 - 4 Wochen sehr schnell und lässt daher eine Impfung wenig sinnvoll erscheinen (Müller 1983; Nichol et al. 1991).

Die Legionärskrankheit imponiert als Pneumonie und nimmt nach einer Inkubationszeit von 2-10 Tagen einen oft schweren Verlauf mit trockenem, später produktivem Husten und hohem Fieber.

Radiologisch stellt sie sich mit ein- oder beidseitigen kleinfleckigen Verschattungen dar, die im Verlauf auch konfluieren. 30 - 50% der an Legionellose Erkrankten entwickeln zusätzlich auch eine Diarrhöe, die nicht nur auf Nebenwirkungen der eingesetzten Antibiotika zurückzuführen ist. Betroffen von einer Pneumonie sind in erster Linie immunsupprimierte Patienten unter Einnahme von Corticoiden und anderen Immunsuppressiva, beziehungsweise während oder nach einer Chemotherapie. Allgemeine Risikofaktoren sind männliches Geschlecht, Diabetes mellitus, chronische Lungenerkrankungen, die 5. und 6. Lebensdekade, Alkoholabusus und das Rauchen (England et al., 1981; Bhopal, 1995).

Klinisch haben sich Markolid-Antibiotika wie Erythromycin als Therapiemittel der Wahl herausgestellt, aber auch Fluorochinolone wie Ciprofloxacin oder Ofloxacin werden erfolgreich eingesetzt. Die Mortalität beträgt ca. 15 %, unbehandelt bis zu 80 % (RKI, 1999).

Eine andere durch Legionellen verursachte Erkrankung ist das Pontiac-Fieber, benannt nach dem ersten dokumentierten Ausbruch in einem Gesundheitsamt in Pontiac, Michigan. Das Pontiac-Fieber ähnelt einem grippalen Infekt, bei hoher Erkrankungsrate, aber einer Mortalität von 0. Es verläuft selbstlimitierend und zeigt nach einer Inkubationszeit von 36 Stunden Symptome wie Schüttelfrost, Fieber, trockenen Husten, Myalgien, Übelkeit und Kopfschmerzen, aber keine Pneumonie (Götz et al., 2001). Das Pontiac-Fieber wurde nur im Rahmen von Ausbrüchen erkannt. Es wurden Erkrankungen gemeinsam mit Fällen von Legionärskrankheit innerhalb desselben Ausbruchs beobachtet, wobei das Pontiac-Fieber vor

allem jüngere, primär gesunde Menschen betraf (Thomas et al., 1993). Trotz Serokonversion der Patienten wurde der Erreger selbst nie nachgewiesen.

1.2.1. Pathogenese

Die Bedingungen für eine Legionelleninfektion wurden von Lee und West (1991) in Form des folgenden Schemas beschrieben:

- Legionellen müssen in einem Reservoir in der Umwelt vorhanden sein
- die Bedingungen müssen eine Vermehrung der Legionellen von niedriger zu hoher Konzentration erlauben
- es muss eine Möglichkeit der Streuung der Legionellen aus dem Reservoir geben, so dass Menschen ihnen ausgesetzt sind
- sie müssen für Menschen pathogen sein
- die Bakterien müssen auf einem geeigneten Weg vom Menschen aufgenommen werden
- der Wirt muss für eine Infektion durch Legionellen empfänglich sein.

Um einen Menschen zu infizieren, müssen Legionellen, beziehungsweise mit Legionellen kontaminierte Aerosole, aspiriert werden und in die Alveolen gelangen. Die Aerosolgröße muss dabei zwischen 1 und 5 μm betragen (Breiman et al. 1990).

In den Alveolen werden die Bakterien von den Alveolarmakrophagen phagozytiert. Indem sie die Ansäuerung des Phagosoms und auch die Fusion von Phagosom und Lysosom verhindern, überleben sie in den Makrophagen und vermehren sich intrazellulär, bis sie diese zum Platzen bringen (Schöniger 1997). In Makrophagen und Alveolarepithelzellen wird in der Frühphase einer Infektion eine Apoptose induziert, anschließend eine Nekrose (Gao u. Kwaik 2000).

Es wurde bisher nie die Übertragung einer Legionellen-Infektion von Mensch zu Mensch dokumentiert (Abu Kwaik et al. 1998)

1.2.2. Erregerreservoir

In der Umwelt leben Legionellen in eukaryotischen Zellen wie Protozoen und Cyanobakterien und können somit über Jahre hinweg in nährstoffreicher Umgebung überleben (Paszko-Kolva et al. 1992). Sie sind bei Temperaturen zwischen 18 und 60 ° C lebensfähig (Rogers et al. 1994; Tiefenbrunner et al 2001). Dies erklärt auch, warum Legionellen sowohl in Trinkwasser als auch in Oberflächen- und Grundwasser vorkommen.

So wurden sie aus Warm- und Kaltwasserleitungen von Hotels, Krankenhäusern, öffentlichen und Gewerbegebäuden isoliert (Tobin et al. 1981; Yu 1998; Wadowsky et al. 1982; Barbaree et al 1987). Dabei war die Trinkwasserversorgung von Neubauten zum Teil stark mit Legionellen belastet (Bauer et al 1990). Auch in kommunalen Trinkwasserversorgungssystemen und Privathaushalten wurden *Legionella species* isoliert (Heudorf et al. 2001; Frahm u. Obst 1994). Wadowsky et al. (1982) sehen die Heißwassertanks als Ausgangspunkt für die Kontamination der nachgeschalteten Wasserversorgung, Bhopal (1995) hält deshalb komplexe Heißwassersysteme in großen Gebäuden für besonders stark durch Legionellenbesiedlung gefährdet. In der BRD haben Henke et Seidel (1986) Legionellen in 41% der von ihnen untersuchten Grundwasser-, Trinkwasser- und Whirlpoolproben nachgewiesen.

Weiter wurde *L. pneumophila* in Kühltürmen, Luftbefeuchtern und anderen raumluftechnischen Anlagen von Krankenhäusern, Schulen und anderen großen Gebäuden nachgewiesen (Sanden et al. 1992, Dermitzel et al. 1992; Nagorka et al. 1990).

Zannetti et al. (2000) und Walker et al. (2000) fanden *Legionella pneumophila* und species in Zahnbehandlungseinheiten und Eismaschinen (Makin u. Hart 1989). Auch die Trinkwasserversorgung von Kreuzfahrtschiffen war kontaminiert.

In Oberflächengewässern wurden *Legionella pneumophila* und *Legionella* spezies mehrfach nachgewiesen. So wurden sie aus hydrothermalen Quellen in Portugal, auf den Azoren (Verissimo et al. 1991) und Mexiko (Marrao et al. 1993) isoliert (Pastoris et al. 1999).

Fliermans et al (1981) entdeckten *Legionella pneumophila* in Seen und Flüssen der USA, Doleans et al. (2004) wiesen sie in Umweltproben in Frankreich nach.

Palmer et al. (1993) untersuchten Abwasser vor und nach Behandlung verschiedenen Klärstufen einer Kläranlage und entnahmen auch Proben von Ozeanwasser an der Einleitungsstelle dieser Anlage, sowie vom Strandwasser. Sie fanden in allen Proben mittels Direkter Immunfluoreszenz und Polymerase Kettenreaktion (PCR) und in 25 % der Proben durch kulturellen Nachweis *Legionella species*.

Legionellen sind in der Umwelt weit verbreitet, tolerieren hohe und niedrige Temperaturen (Snyder et al. 1990) und sind, wenn sie sich in Amöben befinden, resistent gegen Chlor (States et al. 1987). Zudem können sie sich in Anwesenheit von Protozoen auch in nährstoffreicher Umgebung vermehren, was die Elimination von Legionellen durch Reinigungs- und Desinfektionsmaßnahmen sehr aufwendig gestaltet und weshalb diese meist nur von kurzfristigem Erfolg gekrönt sind (Paszko-Kolva et al., 1992).

1.2.3. Infektionsquellen

Als Quelle von Legionärserkrankungen wurden Whirlpools (Zingeser et al. 1990; Den Boer et al. 2002), Warmwassersysteme in Krankenhäusern (Bornstein et al. 1986) und Privathaushalten (Heudorf et al. 2001), Klimaanlagensysteme von Krankenhäusern (O'Mahony et al. 1990) und von großen öffentlichen und Gewerbegebäuden (Mühlenberg 1988) und Trinkwasserversorgungssysteme von Kreuzfahrtschiffen (Pastoris et al. 1999) sicher identifiziert, was meist nur nach Ausbrüchen der Legionärskrankheit und selten nach sporadischer Legionellose erfolgte.

Bhopal (1995) zeigte, dass ein enger Zusammenhang zwischen der Nähe des Wohnortes zu einem Kühlurm und dem Risiko an der Legionärserkrankung zu erkranken besteht.

Bei der Untersuchung des zweitgrößten dokumentierten Ausbruchs von Legionellose bei der West Frisian Flower Show 1999 in den Niederlanden, bei dem 188 Menschen erkrankten, von denen 21 starben, wurden Legionellen in zwei Whirlpools und einem Sprinkler gefunden. Als Hauptquelle wurde ein Whirlpool identifiziert, der dort erst 4 Tage zuvor fabrikneu installiert worden war. Dieser Ausbruch wurde erst 14 Tage nach der Diagnose der ersten Legionellenpneumonie entdeckt, als bereits 71 Patienten in stationärer Behandlung waren (Den Boer et al. 2002).

1.2.4. Interaktion zwischen Amöben und Legionella species

Rowbotham (1983) zeigte, dass Amöben sich mit Legionellen infizieren lassen und auch deren natürlicher Wirt sind. Er fand, dass Amöben Legionellen Gelegenheit zur intrazellulären Vermehrung geben und sie so vor schädlichen Umwelteinflüssen schützen. Folgestudien bewiesen, dass Amöben häufig in den gleichen Proben mit Legionella species vorkommen (Hoffmann u. Michel 2001) und dort deren Vermehrung unterstützen (Barbaree et al. 1986; Wadowsky et al. 1988; Sanden et al. 1992).

Von 374 untersuchten Wasserproben wiesen Henke und Seidel (1986) in 62% Amöben, in 41% Legionellen und in 27% beide Organismen nach. In 57% der Whirlpool-Proben fanden sie Amöben und in 43% Legionellen. In 42% der Fälle waren die Proben mit beiden Organismen kontaminiert. Auch in 38% der Trinkwasserproben fanden sie Legionellen und Amöben.

Frahm und Obst (1994) zeigten in deutschem Trinkwasser eine hohe Korrelation zwischen dem Vorkommen von Legionellen und der Anwesenheit von Amöben auf.

Die intrazelluläre Vermehrung der Legionellen wurde mittels Immunfluoreszenz mikroskopisch (Anand et al. 1983), aber auch elektronenmikroskopisch nachgewiesen

(Neumeister et al. 1997). Die Legionellen stimulieren die Amöben durch verschiedene Mechanismen zur phagozytären Aufnahme (Abu Kwaik et al. 1998; Harb et al. 1998). Dann wird die lysosomale Fusion mit Phagosomen inhibiert, die Legionellen proliferieren und induzieren dann den nekrotischen Zelltod (Marciano-Cabral u. Cabral 2003) durch Porenbildung in der Zellwand der Amöben (Gao u. Kwaik 2000).

Sanden et al. (1992) inkubierten native, amöbenhaltige Proben, in denen in kultureller Anzucht zunächst keine Legionellen gefunden werden konnten, für 6 Wochen. Nach diesem Zeitraum konnten sie in 30 % dieser Proben Legionelle pneumophila nachweisen.

Koide et al. (2001) verfuhren ebenso mit Blumenerde und fanden in 22 Proben Legionellen nach 6 Wochen Inkubation, während dies nach direktem Ausstrich nur in 5 Proben gelang.

Frahm und Obst (1994) bebrüteten 50 unbehandelte Trinkwasserproben, in denen Amöben nachgewiesen wurden, für 2 – 3 Wochen. Dabei fanden sie in einem Drittel der legionellenpositiven Proben eine Erhöhung der Legionellenanzahl um den Faktor 100 – 1000. Die Zahl der positiven, beziehungsweise negativen Proben blieb dabei gleich.

Nach Kilvington und Price (1990) überlebt Legionella pneumophila auch in den Zysten von Acanthamoeba polyphaga, übersteht so Chlorkonzentrationen bis mindestens 50 mg / l und bleibt danach auch noch vermehrungsfähig (De Jonckheere u. van de Voorde 1976). Die Chlorkonzentrationen in Trink- und Swimmingpoolwasser liegen weit unter der für Amöbenzysten toxischen Dosis.

Marciano-Cabral und Cabral (2003) zeigten zudem eine 1000-fache Zunahme der Resistenz von L. pneumophila gegen Rifampicin und Ciprofloxacin nach Vermehrung in Acanthamoeba spp.

1.3. Nachweismethoden für Legionellen

Der kulturelle Nachweis von Legionellen mit Buffered Charcoal Yeast Extract Agar (BCYE-Agar) bei 35°C und 5% CO₂, der eine Sensitivität von 32-80% aufweist, hat sich als Standardmethode etabliert (Edelstein 1981; Feeley et al. 1979). Diesem Agar werden häufig Antibiotika wie Polymyxin, Anisomycin oder Vancomycin, zugesetzt, um die häufig vorhandene und hemmend auf das Legionellenwachstum wirkende Begleitflora zu reduzieren. Den gleichen Effekt erreicht man, indem man Proben mit einem Säurepuffer (pH 2,2) für 3-30 Minuten behandelt (Bopp et al. 1981) oder die Probe für 30 min auf 50°C erhitzt (Dennis 1988), weil Legionellen sowohl Hitze als auch Säure besser tolerieren als die

Begleitkeime.

Häufig wird auch die Filtration mit 0,22 µm Filtern zur Anreicherung eingesetzt (Frahm u. Obst 1994, Dennis 1988). Allerdings variieren die Wiederfindungsraten sehr stark, der quantitative Nachweis schwankt dabei nicht nur zwischen verschiedenen Institutionen sondern auch innerhalb eines Labors erheblich. Zudem reduziert diese Nachweismethode die Legionellen-Anzahl. Wurden Reinkulturen filtriert, wurden 3 - 10-mal weniger Koloniebildende Einheiten Legionellen gefunden als beim der direkten Kultur (Szewzyk et al 1991).

Sanden et al. (1992) inkubierten 144 Proben aus Trinkwassersystemen und Kühltürmen von drei Krankenhäusern bei 35°C für 6 Wochen, die in der Standardkultur negativ auf Legionellen aber positiv auf Amöben getestet wurden.

Daraufhin konnten in 59 Proben Legionellen kulturell nachgewiesen werden. Auch bei einigen bestätigten Fällen von Legionärskrankheit, konnte das Bakterium nur durch Amöbenkokultur aus klinischen Proben isoliert werden.

So gelang es Rowbotham (1983), Legionellen in Sputumproben von einigen an Pneumonie erkrankten Patienten zu gewinnen, bei denen der kulturelle Nachweis nach herkömmlicher Methode nicht möglich war. Er vermehrte die Legionellen in Amöben und konnte sie dann nach Säurebehandlung auf BCYE- Agar kultivieren.

In Stuhlproben von Erkrankten (Rowbotham 1998) konnte er ausschließlich in Kokultur mit *Acanthamoeba polyphaga* Legionellen nachweisen.

Bei einem immunsupprimierten Patienten mit Pneumonie waren Kulturen von Blut und Urin steril, im Sputum wurde nur die normale Mundhöhlenflora gefunden. Die *L. pneumophila*-Serologie war negativ, ebenso wie das *L. pneumophila*-Antigen im Urin. Erst nach sechstägiger Inkubation des Sputums mit *Acanthamoeba polyphaga* gelang es, *L. anisa* zu kultivieren (La Scola et al. 2001).

Es existieren auch nichtkulturelle Nachweise, wie PCR und Direkte Immunfluoreszenz (DFA). Der Nachweis von Legionellen durch DFA ist allerdings limitiert durch die Zahl der zur Verfügung stehenden spezifischen Antisera. So muss für jede Spezies oder Serogruppe ein eigenes Antiserum verwendet werden. Außerdem ist eine Kreuzreaktivität mit *E. Coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Bacteroides fragilis* und *Xanthomonas* spezies (Yamamoto et al. 1993) beschrieben. Die Berichte über Sensitivität und Spezifität variieren stark, wobei die meisten Studien zeigen, dass dieser Nachweis relativ unspezifisch und von geringer Sensitivität ist (Pasculle et al. 1989; Vickers et al. 1990). Diese Methode ist auch nicht in der Lage Legionellen in Amöbenzysten nachzuweisen (Vandenesch et al. 1990). Zudem unterscheidet sie nicht tote von lebenden Zellen. Im Screening gibt diese Untersuchungsmethode jedoch Anhaltspunkte, welche Proben mittels Kultur untersucht werden sollten (Shahamat et al. 1991).

Eine weitere nichtkulturelle Untersuchung ist der Nachweis von bestimmten DNS- oder auch RNS-Sequenzen der Gattung Legionella und der Spezies *L. pneumophila* mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Ein zeitweilig verfügbares kommerzielles PCR- Kit (EnviroAmp kit, Perkin-Elmer) wies eine Sensitivität von 10-100 KBE / ml auf. Andere Studien ergaben differierende Ergebnisse zur Sensitivität. Die Ergebnisse schwankten zwischen einem und 100 Bakterien in 100 ml im Laborexperiment (Mahbubani et al. 1990; Yamamoto et al 1993). Ursache dafür ist unter anderem das in vielen Umweltproben enthaltene Eisenoxid, das die PCR vollständig hemmt (Frahm u. Obst 1994; Maiwald et al 1994), und weitere unbekannte hemmende Faktoren in Proben (Yamamoto et al. 1993).

Zusätzlich zu dieser geringen Sensitivität kann auch hier keine Aussage über das Vorhandensein von lebensfähigen Legionellen getroffen werden, da die PCR auch tote oder verletzte Organismen nachweist (Frahm u. Obst 1994). Bej et al. (1991) entwickelten den PCR-Nachweis über RNA, da diese eine Halbwertszeit von 2 Minuten hat und somit mit hoher Wahrscheinlichkeit nur lebende Legionellen nachgewiesen werden. Diese Methode jedoch ist sehr aufwendig und weniger sensitiv.

DFA und PCR sind somit beide zum Screening durchaus geeignet, können aber den kulturellen Nachweis nicht ersetzen (Pasculle et al. 1989, Shahamat et al. 1991).

Ein Problem beim kulturellen Nachweis von Legionellen zeigten Steinert et al. (1997) und Ohno et al. (2003) auf, als sie postulierten, dass *L. pneumophila* in nährstoffärmer Umgebung in der Lage ist, einen Zustand einzugehen, in dem sie nicht kultivierbar, aber trotzdem noch lebensfähig (viable but nonculturable, VBNC) ist. Diese Zellen sind nicht in der Kultur zu finden, können aber mittels Acridine-Orange direkt angefärbt werden. Auch eine in-situ Hybridisierung ist möglich und es kann metabolische Aktivität nachgewiesen werden. Allerdings gelang es in den Proben nach einem Tag in Cokultur mit *Acanthamoeba castellanii*, kultivierbare und virulente Zellen zu finden.

1.4. Ziel der eigenen Studie

Aus der Epidemiologie der Legionellosen ergibt sich die Notwendigkeit des möglichst spezifischen und sensitiven Nachweises von Legionellen im Trinkwasser und in mikrobiologisch stark kontaminierten Wasserproben.

Trotz PCR und direkter Immunfluoreszenz ist die kulturelle Erfassung noch immer die geeignetste, doch sind hier die Sensitivität vor allem bei einer hohen Belastung der Probe mit Begleitflora enge Grenzen gesetzt.

Bei kulturellen Nachweismethoden überwuchern bei stark mikrobiell belasteten Proben die Begleitkeime trotz einer Säure- und/oder Hitzebehandlung die Nachweismethoden und machen den Nachweis der Legionellen unmöglich. Auch können die Legionellen selbst durch diese Behandlung inaktiviert werden.

Amöben sind ein natürlicher Wirt der Legionellen. Sie wurden daher für eine Vermehrung der Legionellen und damit für einen kulturellen Nachweis benutzt. Dies geschah allerdings bisher nur in klinischen und nicht in Umweltproben.

Weitere Kokulturen erfolgten zu Zellkulturzwecken unter kontrollierten Laborbedingungen und in sterilisierten oder nur sehr gering mikrobiell belasteten Medien. Unter diesen Rahmenbedingungen können allerdings auch mit den herkömmlichen kulturellen Nachweismethoden gute Ergebnisse erbracht werden.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte nun untersucht werden, ob die Dotierung von Acanthamoeba polyphaga Trophozyten in Warm-, Brauch- und Oberflächenwasser einen sensitiveren und schnelleren kulturellen Nachweis von Legionellen bei hoher Begleitfloradichte ermöglicht als die üblichen kulturellen Nachweisverfahren.

Bisher wurden meist Laborlegionellenstämme zur Kokultur eingesetzt, die zum einen an das Überleben in Kultur adaptiert waren und sehr häufig Amöben nicht mehr infizieren bzw. sich in ihnen vermehren konnten. In dieser Arbeit sollte mittels Amöben-Kokultur Legionellen nachgewiesen werden, die nicht zuvor im Labor kulturell gezüchtet worden waren.

Die meisten Versuche mit Kokulturen fanden mit geringen Probenvolumina und einer sehr hohen Legionellenkonzentration statt, die in der Umwelt kaum vorkommt.

Die folgende Arbeit untersucht daher Proben mit einer sehr geringen Legionellenbelastung, wie sie auch in der Umwelt vorkommt.

Vorversuche mit legionellenhaltigem Duschwasser und damit versetzten Proben sollten zunächst folgende für die eigentlichen Hauptversuche relevante Fragen beantworten:

- Welches ist die Mindestlegionellenmenge in einem definierten Wasservolumen, die einen

sicheren Nachweis der Bakterien mittels Proben- Amöben- Kokultur ermöglicht?

- Wie stark vermehren sich wenige KBE von Legionellen in einer Proben- Amöben- Kokultur?
- Wie beeinflusst die Menge der eingesetzten Amöben die Vermehrung und den Nachweis von Legionellen in einer Proben- Amöben- Kokultur?
- Welchen Effekt hat die Zugabe von Amöbenpuffer (PAS) auf den Nachweis und die Vermehrung von Legionellen in einer Proben- Amöben- Kokultur?
- Wie wirkt sich die Wasserbegleitflora auf die Vermehrung von Legionellen aus?
- Ist der quantitative Nachweis der Legionellen mittels der MPN- Methode nach Proben- Amöben- Kokultur reproduzierbar?
- Lassen sich die mit Duschwasser erhaltenen Versuchsergebnisse auf andere Wasserproben, wie z.B. Whirlpool- oder Oberflächenwasser, denen legionellenhaltiges Duschwasser zugegeben wurde, übertragen?

Nach der Auswertung dieser Vorversuche erfolgte im Rahmen der eigentlichen Hauptversuche ein Legionellennachweis mittels Proben- Amöben- Kokultur in Dusch-, Warm-, Tank-, Whirlpool-, Wäschekammer- und Oberflächenwasser nach Zugabe von jeweils 50.000 Amöben / ml und PAS- Puffer. Die Ergebnisse der Proben- Amöben- Kokultur wurden mit denen der etablierten kulturellen Nachweismethoden verglichen.

Des weiteren wurde der Einfluss physikalischer und mikrobiologischer Eigenschaften mehrerer Proben auf den Nachweis von Legionellen mittels Proben- Amöben- Kokultur und etablierten Kulturmethoden untersucht.

Insgesamt war zu zeigen, wie schnell und gut mit einer Amöben- Kokultur Legionellen gerade in mikrobiell verunreinigten Umweltmedien vermehrt und kulturell nachgewiesen werden können und wie sensitiv diese Methode im Vergleich zum herkömmlichen kulturellen Nachweis ist. Besonderer Wert wurde dabei auf die Praxistauglichkeit der Methode gelegt, um einen qualitativen Legionellennachweis mit vergleichsweise wenig Aufwand in großen Wasserprobenvolumina mit hoher mikrobieller Begleitflora zu führen.

2. Material und Methoden

2.1. Kultur der Amöben

2.1.1. Amöben und Amöbenstammhaltung

Für alle Versuche wurde *Acanthamoeba polyphaga* Stamm CCAP 1501/3A benutzt. Der Stamm wurde freundlicherweise als axenische Kultur von der Culture Collection of Algae and Protozoa des Centre for Ecology and Hydrology, Ambleside, Grossbritannien zur Verfügung gestellt.

Die Zusammensetzung der einzelnen Medien und die verwendeten Chemikalien stehen in Anhang 1.

Für die axenische Kultur der Amöben wurde eine modifizierte Proteose-Yeast-Extract Glucose Bouillon (PYG) nach Rowbotham (1983) verwendet.

Zum Waschen der Amöben und zur Pufferung der Proben wurde Page's modified Neff's amoeba saline (PAS) (Rowbotham, 1983) benutzt.

Neben diesem auf Natrium Salzen beruhenden Puffer wurde für die MPN Versuche auch ein gleich molarer, auf Kaliumsalzen basierender PAS Puffer genutzt (K-PAS).

Die Amöben wurden bei 30° C aerob in axenischer Adhäsionskultur in 25 cm² Kulturflaschen (Fa. Greiner) mit jeweils 10 ml PYG kultiviert.

Die Stammkulturen wurden einmal wöchentlich in Kulturflaschen mit je 10 ml frischer PYG-Bouillon mit ca. 100.000 lebenden Amöben überimpft.

Parallel wurden von Beginn an auch Kulturen mit dem Zusatz von anfangs 10 µl/ml und später 50 µg/ml Gentamycin gehalten. Das initial gehemmte Wachstum glich sich nach einer Gewöhnungsphase von 14 Passagen dem Wachstum der Kulturen mit reiner PYG-Lösung an, so dass ständig an Gentamycin gewöhnnte Amöben zur Verfügung standen. Zusätzlich wurde damit eine Unterdrückung von bakteriellem Wachstum in diesen Kulturen gewährleistet.

Zum Ausschluss von mikrobiellen Verunreinigungen der Stammkulturen wurden in regelmäßigen Abständen aus allen Ansätzen Kulturen auf Blut- und Legionellenagar angelegt, die aber kein Wachstum von Bakterien, einschließlich Legionellen oder Pilzen, zeigten.

Alle Arbeiten mit den Amöben fanden unter einer Sicherheitswerkbank der Klasse 2 statt.

2.1.2. Amöbenkultur für Versuchsansätze

Jeweils 300 µl Amöbenstammsuspension wurden für 2-3 Tage in 10 ml PYG bei 30 ° C kultiviert bis der Boden der Kulturflaschen mit einem Monolayer fast vollständig bewachsen war. Es fanden sich dann nur sehr wenige schwimmende Amöben, was für einen sehr niedrigen Anteil von Trophozyten in beginnender Verzystung sprach.

Als geeignetste Methode um die Amöben in Suspension zu bringen hat sich das Klopfen der Kulturflaschen auf einem harten Untergrund erwiesen. Der Erfolg wurde jeweils unter dem Phasenkontrastmikroskop kontrolliert. Der Versuch, die Amöben durch Platzieren der Kulturflaschen auf Eis zu suspendieren erwies sich als ineffizient und langwierig.

Die Amöbensuspension wurde in Einmal- Kulturröhrchen mit Schraubverschlusskappen (Schott AR-GLAS® 16 x 100 12) überführt, bei 200 G für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgegossen und die Pellets dann in 2 ml PAS mit einem Schüttler resuspendiert. Diese Prozedur wurde dreimal wiederholt, so dass am Ende eine hochkonzentrierte und nahezu PYG- freie Amöbensuspension zur Verfügung stand. Die Anzahl der Amöben pro ml wurde mit einer Neubauer improved oder einer einfachen Neubauer Zählekammer unter einem Phasenkontrastmikroskop (Olympus CK 2 Plus mit einhundert- und zweihundertfacher Vergrößerung) bestimmt.

Dazu wurden die Amöben 5 min mit Trypanblau (0,4 % w/v Aqua dest.) angefärbt, um lebende von toten Trophozyten zu differenzieren. Aliquote dieser Suspension wurden zur Kokultur mit Legionellen und den Proben verwendet.

2.2. Legionellen

2.2.1. Legionellenstämme und legionellenhaltige Wässer

Seit 1996 wurde konstant mit *Legionella pneumophila* SG1 belastetes Wasser (1 – 100 KBE / ml) aus einer Dusche als Legionellenquelle benutzt. Während dieser 8 Jahre wurde nie eine andere Serogruppe oder Spezies isoliert. Dabei wurden bei insgesamt über 100 Proben jeweils mindestens 4 und bis zu 60 Isolate mit dem Latex-Agglutinations Kit der Firma Oxoid als *Legionella pneumophila* SG1 identifiziert.

Da in Vorversuchen in Amöben-Kokultur die Vermehrung von Legionellen Referenzstämme (*Legionelle pneumophila* SG 1 bis SG 6, *Fluoribacter bozemanii*, *Legionella micdadei*), die von der ATCC und der DSM bezogen wurden, nicht gelang, wurde für Versuche, in denen eine Reinkultur von Legionellen eingesetzt werden sollte, aus der oben genannten Quelle nach Proben- Amöben- Kokultur ein *Legionella pneumophila* SG 1 Stamm (DM1) isoliert und in Reinkultur gehalten. Nach jeweils 5 Passagen auf festen Nährmedien wurde der Stamm wieder mit Amöben für 5 Tage kokultiviert, um eine Adaption der Legionellen an Laborbedingungen zu vermeiden.

Der Stamm wurde als 3-Ösen-Ausstrich auf BCYE- Agar gehalten und jeweils für 3 Tage bei 35°C und 5% CO₂ bebrütet.

2.2.2. Legionellenkultur

Zur Kultivierung der Legionellen wurde BCYE- (Buffered Charcoal Yeast Extract nach Edelstein) und MWY-Agar (Medium Wadowsky und Yee, modifiziert nach Edelstein) der Firma Oxoid benutzt und nach Herstellerangaben zubereitet.

Für die Versuche, bei denen eine Legionellen- Reinkultur eingesetzt wurde, wurde eine Legionellensuspension mit einem API Densimat 1550 auf McFarland 1 eingestellt und mit PAS in einer 1/10-Verdünnungsreihe verdünnt. Aus der jeweiligen Verdünnung wurden dann 100µl dem Versuchsansatz hinzugefügt. Die Kolonie-Bildenden-Einheiten (KBE) wurden aus den Verdünnungsreihen 4-6 durch ausplattieren von jeweils zweimal 100 µl auf BCYE-Agar-Platten und anschließender dreitägiger Bebrütung bei 35 ° C und 5 % CO₂ bestimmt.

Der Legionellengehalt des Duschwassers wurde durch Ausstreichen von 0,5 ml Duschwasser auf BCYE- und MWY- Agar bestimmt. Es wurden jeweils 3 Agarplatten parallel beimpft.

2.2.3. Identifizierung der Legionellen

Von potentiellen Legionellen- Kolonien wurden Reinkulturen hergestellt und diese durch parallelen Ausstrich auf Blut- und BCYE- Agar auf ihre Abhängigkeit von Cystein geprüft. Keime, die nicht auf Blutagar, aber auf BCYE wuchsen, wurden nach Gram gefärbt und mit der Latex-Agglutination (Oxoid DR800M) identifiziert. Von jeder Platte wurden 4, bei starkem Bewuchs 8 verdächtige Kolonien isoliert. Bei unterschiedlichem Aussehen der Kolonien, Fluoreszenz und unterschiedlichem zeitlichem Auftreten der Kolonien wurden entsprechend mehr Kolonien einer Platte isoliert.

2.3. Amöben- Legionellen- Kokultur

2.3.1. Beimpfen der Proben

Wenn nicht anders beschrieben, wurden immer 50.000 Amöben / ml Gesamtansatz der Amöben- Legionellen- Kokultur oder Proben- Amöben- Kokultur hinzugefügt.

In einigen Vorversuchen wurden 500.000, 50.000, 5000 und 0 Amöben / ml Ansatz eingesetzt.

2.3.2. Quantitative Bestimmung der Legionellen nach Amöben- Kokultur

Für die quantitative Bestimmung des Legionellengehalts in der Amöben- Kokultur wurde eine Verdünnungsreihe der Amöben- Kokultur mit in PAS in jeweils 1:10- Verdünnung hergestellt und aus den Verdünnungen jeweils 2 x 100 µl auf BCYE Agar ausgestrichen. Nach 3 und 5 Tagen Inkubation wurden die Legionellen- KBE von den Platten ermittelt, auf denen zwischen 10 und 150 Legionellen KBE waren. Die KBE/ml wurden gemäß ISO CD 8199 bestimmt.

2.4. Proben und Probenentnahmeorthe

Beprobt wurde Dusch-, Warm-, Whirlpool- und Tankwasser aus Schiffen, Warmwasser aus Bürogebäuden (n = 94), Wäschekammerwasser aus Klimaanlagen (n = 9) und Oberflächenwasser Hamburgs (n = 45). 40 Proben wurden zusätzlich mit Legionella pneumophila SG1 haltigem Duschwasser versetzt.

Die untersuchten Proben wurden von den in Anhang 2 näher beschriebenen Orten entnommen, da Wasser mit höherer Keimbelaustung untersucht werden sollte, in denen erfahrungsgemäß der Nachweis von Legionellen mit den etablierten Methoden erheblich erschwert ist.

2.5. Mikrobiologische Parameter der Oberflächenwasser-Proben

2.5.1. Der Nachweis E. coli- und coliformen Bakterien

Der Nachweis von E. coli und coliformen Bakterien in den Proben erfolgte mit dem MPN-Verfahren.

Die Anzucht der Keime erfolgte in DEV- Lactose- Pepton Bouillon (Merck 10690) über 48 h bei 36 ° C und die Auswertung nach der von Garthright WE (2001) verfassten Tabelle.

Zeigten Proberöhrchen Säure- und Gasbildung, wurden Subkulturen daraus auf DEV- Endo Agar (Merck 10684) angelegt und die Keime nach Herstellung von Reinkulturen gemäß der Trinkwasserverordnung (TVO) von 1990 differenziert.

Coliforme Keime waren Lactose- positiv und Oxidase- negativ. Als E. coli wurden die Keime bezeichnet, die Lactose unter Säure- und Gasbildung bei 36 ° C innerhalb 44 +/- 4 h spalteten, Cytochrome- Oxidase negativ waren, auf Citrat- Agar kein Wachstum zeigten, aus Tryptophan Indol bildeten und Glucose bei 44 ° C +/- 1 ° unter Säure und Gasbildung verwerteten.

2.5.2. Gesamtkeimzahl

Die Bestimmung der Gesamtkeimzahl erfolgte gemäß den Bestimmungen der TVO 1990 im Plattenguss- Verfahren mit dem DEV- Nähragar (Merck 11471). Nach 44 +/- 4 h wurden die gewachsenen Kolonien gezählt und nach ISO CD 8199 die Keimzahl errechnet.

2.5.3. pH, Wassertemperatur, O₂-Gehalt, O₂-Sättigung, Leitfähigkeit der Oberflächenwasserproben

Für die genannten Parameter der Wasserproben wurde auf die Daten des Hamburger Wassergüte- Messnetzes zurückgegriffen. Für die Proben aus der Elbe beim Museumshafen wurden die Daten der gegenüberliegenden Messstation Seemannshöft, für die Proben aus der Alster an der Lombardsbrücke, die der Messstation Lombardsbrücke verwendet. Es wurden jeweils der Tagesmittelwert und das gleitende 7-Tages- Mittel verwendet.

2.6. Verarbeitung der Wasserproben für die Proben-Amöben-Kokultur

Die Proben wurden in sterilen Schott Duran- Flaschen mit Schraubverschlüssen entnommen, umgehend in das Labor transportiert und dort sofort verarbeitet.

2.6.1. Pufferung von Proben

Wenn der Anteil der Wasserprobe am Gesamtansatz mehr als 10 % betrug, wurde mit Aqua dest. auf das jeweils gewünschte Gesamtansatzvolumen aufgefüllt.

In 1 % Volumenanteil wurden dann die PAS- Stammlösungen A und B hinzugefügt (z.B. je 1 ml PAS- Stammlösung A und B auf 100 ml Gesamtvolumen).

Bei geringerem Probenanteil fügten wir PAS-Puffer hinzu.

Eine Ausnahme waren die Ansätze mit legionellenhaltigem Duschwasser und 5 ml Gesamtvolumen. Hier lag der Probenanteil bei 20% (1 ml) und der PAS- Puffer- Anteil betrug lediglich 80 %.

2.6.2. Inkubation der Proben- Amöben- Kokultur

Alle Amöben- Kokulturen wurden bei 35 ° C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von > 90 % inkubiert. Die Proben- Amöben- Kokulturen wurden nach 3, 7 und 14 Tagen, wie in 2.6.3. beschrieben, auf feste Nährmedien überimpft. Die Ansätze mit einem Gesamtvolumen von 100 ml wurden in sterilen 500 ml Erlenmeierkolben, die mit 10 ml Gesamtvolumen in Greiner Kulturflaschen mit 25 cm², die mit 5 ml Gesamtvolumen in Nunc Multowell Schalen mit

9,6 cm² Kulturoberfläche bebrütet.

2.6.3. Überimpfen auf feste Nährmedien nach Amöben-Kokultur

2.6.3.1. Qualitativer Legionellen-Nachweis ohne vorherige Säurebehandlung der Amöben-Kokultur

Hierfür wurden 100 µl der Amöben-Kokultur auf einer Hälfte einer Agarplatte verteilt und anschließend auf der anderen Hälfte im Drei-Ösen-Verfahren ausgestrichen.

2.6.3.2. Qualitativer Legionellen-Nachweis mit vorheriger Säurebehandlung der Amöben-Kokultur

Die Ansätze aus der Amöben-Kokultur wurden vor dem Ausplattieren auf Agarplatten einer Säurebehandlung mit einem 0,2 molarem HCl / KCl-Puffer pH 2,2 (siehe Anhang 1) unterzogen.

Dazu wurden 100 µl des Ansatzes in ein steriles 1,8 ml Eppendorf- Reaktionsgefäß überführt und mit 400 µl Säurepuffer auf einem Schüttler vermischt. Nach 5 min wurden je 100 µl auf BCYE- und MWY-Agar-Platten pipettiert, im Drei-Ösen-Ausstrich verteilt und für sieben Tage inkubiert. Zur Kultur ohne vorherige Säurebehandlung wurden je 100 µl auf einer BCYE- und einer MWY-Agar-Platte im Drei-Ösen-Ausstrich verteilt und analog zu den säurebehandelten Ansätzen inkubiert und ausgewertet.

2.6.4. Bewertung des Wachstums von Legionellen und Begleitflora auf festen Nährmedien nach fraktioniertem 3-Ösen-Ausstrich

Die Dichte des Wachstums der Begleitflora wurde nach folgendem Schema bewertet:

Ein Minus (-) wurde bei keinem Wachstum von heterotropher Begleitflora, beziehungsweise Legionellen vergeben.

Ein Plus (+) entsprach vereinzeltem Wachstum der jeweiligen Mikroorganismen nur im ersten Ausstrich.

Zwei Plus (++) bedeuteten zahlreiches, aber nicht konfluierendes Wachstum im ersten Ausstrich und vereinzelte Kolonien im zweiten Ausstrich.

Wurde das Wachstum mit drei Plus (+++) bewertet, so war im ersten Ausstrich konfluierendes Wachstum der Kolonien und gleichzeitig Wachstum im zweiten und dritten Ausstrich zu

finden.

2.7. Proben mit Zusatz von legionellenhaltigem Duschwasser und anschließender Amöben-Kokultivierung

Je 1 ml Dusch-, Whirlpool- und Trinkwassertankwasserproben sowie je 1 ml Wäscherkammerwasser von Klimaanlagen zweier Bürogebäude wurden mit 0,5 ml legionellenhaltigem Duschwasser vermischt und anschließend sowohl die Misch- als auch die unveränderten Proben mit 50.000 /ml Amöben kokultiviert. Mit PAS wurde auf ein Ansatzvolumen von 10 ml aufgefüllt. Die nach Inkubation und Ausstrich auf festen Nährböden nachgewiesenen Legionellen und die Begleitflora wurden wie in 2.6.4 beschrieben ausgewertet.

Nach dem gleichen Prinzip wurden Oberflächenwasserproben mit legionellenhaltigem Duschwasser vermischt. Die Proben mit 50 und 100 ml Volumen wurden in 500 ml Erlenmeyerkolben, die Proben mit 10 ml Volumen in Kulturfläschchen gegeben, Amöben wurden hinzugefügt und die Ansätze wie in 2.6.1. beschrieben gepuffert.

Die Ansätze mit 100 ml Gesamtvolumen wurden mit 10 ml Duschwasser (DM) und die Ansätze mit 10 ml Gesamtvolumen mit 1 ml Duschwasser versetzt.

Nach 3- und 7-tägiger Inkubation wurden die Proben zum Teil auch nach 5-minütiger HCl-KCl-Puffer (pH 2,2) Inkubation auf BCYE- und MWY-Agarplatten im 3-Ösen-Ausstrich verteilt und inkubiert.

2.8. Direkter kultureller Legionellen-Nachweis in Wasserproben ohne Zusatz von Amöben

Zum Nachweis von Legionellen ohne Amöbenzusatz wurde je 1 ml Probe auf eine BCYE- und eine MWY-Agarplatte pipettiert und ausgespaltet. Zusätzlich wurden bei Oberflächenwasser jeweils 100 ml und 10 ml, bei Wäscherkammerwasser 100 ml der jeweiligen Wasserprobe einer Membranfiltration unterzogen. Dazu wurde ein steriler Polycarbonfilter von 47 mm Durchmesser und 0,4 µm Porengröße (Whatman, Bestellnr: 111107) verwendet. Nach der Filtration wurden auf den Filter 10 ml 0,2 mol KCL- HCL-Puffer, pH 2,2 pipettiert. Der Puffer wurde nach 5 min Einwirkzeit abfiltriert und der Filter auf einer BCYE- oder MWY-Agarplatte platziert. Die Inkubation erfolgte analog zur Amöben-Kokultivierung wie in 2.6.2. beschrieben.

2.9. Quantitative Bestimmung von Legionellen und Begleitflora

2.9.1. Quantifizierung des Legionellengehalts von Proben mit dem MPN-Verfahren

Bei dem Versuch, den Legionellengehalt der Proben quantitativ zu bestimmen, wurde das MPN-Verfahren (MPN = Most Probable Number) benutzt.

Dazu werden die Proben in 3 parallelen Ansätzen in drei Stufen (1 ml und 0,1 ml und 0,01 ml Probenanteil) verdünnt. Abhängig von der Ausgangskeimzahl ergibt sich in den verschiedenen Verdünnungsstufen eine bestimmte Verteilung positiver und negativer Ansätze. Daraus lässt sich mittels statistischer Verfahren eine wahrscheinliche Keimzahl ermitteln.

Diese Versuche wurden in Multischalen mit 6 Wells und 9,6 cm² Kulturfläche (Nunclon), die zum zusätzlichen Schutz vor Pilzbefall und Verdunstung in sterilen Stomacherbeuteln transportiert und inkubiert wurden, angesetzt.

Um die Kontaktwahrscheinlichkeit zwischen Amöben und Legionellen zu erhöhen, wurden die Ansätze zentrifugiert. Dazu wurde die gewünschte Menge gewaschene Amöben wie oben beschrieben in einem Kulturröhrchen zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Auf das Pellet wurde nun 1 ml der Probe gegeben und erneut 20 Minuten bei 1000 G zentrifugiert.

2.9.2. Quantifizierung der Begleitflora auf festen Medien nach Amöben- Kokultur

Hierzu wurde eine 1:10 Verdünnungsreihe der Proben-Amöben-Kokultur in PAS erstellt. Aus den jeweiligen Verdünnungen wurden 2 x 100 µl auf Trypton-Soja-Agar ausgespaltet und für mindestens 5 Tage bebrütet. Ausgewertet wurden Platten mit 5 bis 250 Keimen / Platte. Die Berechnung der KBE erfolgte gemäß ISO CD 8199.

2.10. Bestimmung der Einflussfaktoren auf die Kokultur

2.10.1 Einfluss der zugesetzten Amöben auf die Vermehrung der heterotrophen Begleitflora in Probenwässern

Da sich nicht nur die Legionellen, sondern auch die heterotrophe Begleitflora in den Kokulturanträgen vermehrten, stellte sich die Frage, welche Faktoren dieses Wachstum begünstigen.

Hierzu wurden bakteriendichte Filtereinsätze (Porengröße 0,02 µm, Anapore Membrane, Nunc) und 6-Well Multischalen benutzt, die, wie in Tabelle 1 beschrieben, mit Amöben, dem nach 3-maligem Waschen mit PAS gewonnenen Überstand, PAS und Oberflächenwasser versetzt wurden. Alle Ansätze wurden 3-mal parallel angesetzt, für 3 Tage bebrütet und anschließend die Keimzahl bestimmt (Tab. 1, Abb. 1).



Insert: Membraneinsatz. Plate Well: Multischalen-Kulturschälchen.

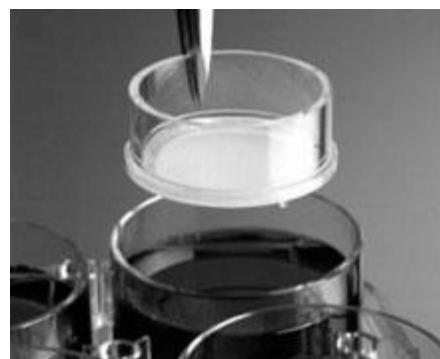


Abb. 1: Ein Kulturschälchen einer Multischale mit Membraneinsatz.

Tab. 1 Beschickung der Kulturschälchen und Membraneinsätze mit Probenwasser (Elbe 4), Amöben und PAS Puffer

Ansätze	Kulturschälchen	Membraneinsatz
ohne Amöben	PAS und 1 ml Elbe 4	PAS
Amöbenüberstand und Probe zusammen im Kulturschälchen	Überstand von 250.000 Amöben und 1 ml	PAS
	Überstand von 2.500.000 Amöben und 1 ml Probe	PAS
Amöben und Probe durch Membraneinsatz getrennt	PAS und 1 ml Elbe 4	250.000 Amöben
	PAS und 1 ml Elbe 4	2.500.000 Amöben
Amöben und Probe zusammen im Kulturschälchen	250.000 Amöben und 1 ml Elbe 4	PAS
	2.500.000 Amöben und 1 ml Elbe 4	PAS

2.10.2. Bestimmung des Einflusses eines aus dem Duschwasser isolierten Keims auf die Vermehrung von *Legionella pneumophila* SG 1 in Amöbenkokultur

Bei Ausstrich der Duschwasserproben nach Amöbenkokultur auf Schafblutagar wurde regelmäßig ein nicht bestimmbarer gramnegatives, nonfermentierendes, oxidase- positives Stäbchen nachgewiesen (Stamm DMX).

Sein Einfluss auf das Wachstum der Legionellen in Kokultur mit *Acanthamoeba polyphaga* wurde in Multischalen (Nunclon) mit 6 Kulturschälchen und Nunc 25 mm Tissue Culture Inserts mit 0,02 µm Anapore Membrane untersucht (Abb. 1) In die Membraneinsätze wurden 3 ml und in die Wells außerhalb der Einsätze 2 ml PAS mit 50.000 Amöben / ml pipettiert.

Von dem aus dem Duschwasser isolierten und auf BCYE-Agar gezüchteten Legionellenstamm (Lp1 DM1), wurde nach Einstellung auf McFarland 1 eine Reihenverdünnung hergestellt und je 100 µl aus Verdünnung 5 in die Einsätze pipettiert. Auch von dem Begleitkeim DMX, der zuvor isoliert und in Reinkultur auf BCYE-Agar gehalten wurde, wurde eine Suspension auf McFarland 1 eingestellt und eine Verdünnungsreihe hergestellt.

250 µl der Suspension mit dem Begleitkeim aus der Verdünnung 1 wurden in die Kulturschälchen außerhalb der Einsätze gegeben. Bei den mit "Innen" bezeichneten Ansätzen, wurden die 250 µl in die Membraneinsätze pipettiert.

Sowohl von den Legionellen als auch vom Begleitkeim wurden aus den Verdünnungen 5 und 6 die KBE auf BCYE-, respektive Schafsbloodagar, bestimmt. Die Ausgangskeimzahl der Legionellen betrug 257 KBE / 100 µl. Die Konzentration des Begleitkeims betrug $1,35 \times 10^5$ KBE / 250 µl nach 5 Tagen Inkubation bei 36 ° C und aeroben Verhältnissen.

2.10.3. Bewertung des Einflusses der MWY-Agar-Zusätze Glycin, Polymyxin und Vancomycin auf das Wachstum der Begleitflora in Duschwasser- und Oberflächenwasserproben in Proben-Amöben-Kokultur

Da sich in der Kokultur auch eine Vermehrung der Begleitflora zeigte, wurde untersucht, wie deren Wachstum durch Antibiotika- und Glycinzusätze im MWY-Agar beeinflusst wird. Dazu wurden diese einzeln und in Kombination in Mengen, die ihrer Konzentration im Agar entsprechen, Proben-Amöben-Kulturen hinzugefügt.

Den 10 ml der jeweiligen Probe wurden PAS-Puffer und Amöben und je nach Ansatz Glycin, Polymyxin und Vancomycin in der gleichen Konzentration wie bei MWY-Agar zugesetzt. Die Ansätze wurden dann für 3 Tage bebrütet und nach 1 und 3 Tagen auf Blutagar, sowie nach 3 Tagen auf BCYE-Agar nach Säurebehandlung überimpft. Die beimpften Agar-Platten wurden für 5 Tage täglich ausgewertet. Dabei wurde das Keimspektrum anhand der morphologisch verschiedenen aussehenden Kolonien abgeschätzt und die Keimdichte gemäß 2.7.4. beurteilt.

2.11. Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm SPSS V4.0. Für den Vergleich der Nachweishäufigkeit wurde der Fisher's Exact Probability Test verwendet, für den Vergleich der Stärke des Wachstums der Begleitflora, den Einfluss der mikrobiellen und physikalischen Parameter auf den Legionellennachweis der Chi²-Test. Als Vermehrung galt eine Zunahme der Bakterienzahl um das mindestens Zehnfache des Ausgangswertes.

3. Ergebnisse

3.1. Etablierung der Amöben-Kokultur mit legionellenhaltigem Duschwasser

3.1.1. Minimale zum Nachweis nach Amöben-Kokultur notwendige Legionellenkonzentration.

In den bisherigen Versuchen mit Legionellen-Amöben-Kokultur wurden in der Regel hohe Legionellenkonzentrationen eingesetzt. Um zu untersuchen, ob die in Umweltwässern üblicherweise auftretenden niedrigeren Legionellenbelastungen ausreichend sind um Amöben zu infizieren und sich in ihnen vermehren, wurde die Legionellenvermehrung in Amöben- Kokultur in Abhängigkeit von der Amöben- und Legionellenausgangskonzentration ermittelt (Tabelle 2).

Als Vermehrung wurde eine Zunahme der Legionellen um mindestens eine 10er Potenz gewertet.

Tabelle 2: Vermehrung von Legionellen in Amöben in Abhängigkeit von der Amöben- und Legionellenkonzentration. (Anzahl der erfolgreichen Vermehrungen nach 3 Tagen Proben-Amöben-Kokultur im Verhältnis zur Anzahl der Versuche.)

Amöben / ml Ansatz	Erfolgreiche Vermehrungen / Anzahl Versuche bei		
	$10^{-2} - 10^{-1}$ Legionellen / ml	$10^{-1} - 10^0$ Legionellen / ml	$10^0 - 10^1$ Legionellen / ml
500.000	3/9	7/9	7/9
50.000	1/14	17/19	20/20
5.000	1/2	2/4	2/2
0	0/1	0/3	0/4

Mit 50.000 Amöben / ml Ansatzvolumen gelang immer eine Vermehrung von 10^0 Legionellen / ml.

Der Einsatz von 500.000 Amöben / ml Ansatz erbrachte kein besseres Ergebnis.

Wurden weniger Amöben eingesetzt, war eine Legionellenvermehrung nicht mehr durchgehend möglich.

Die Infektion und Vermehrung geschah überwiegend innerhalb von 3 Tagen. Bei weniger als 10^0 Legionellen / ml in den Proben konnte nur teilweise eine Vermehrung nachgewiesen werden, wobei dafür eine längere Bebrütungszeit benötigt wurde.

3.1.2. Einfluss der Menge der zugegebenen Amöben auf die Vermehrung von Duschwasser-Legionellen in Proben-Amöben-Kokultur

Um zu ermitteln, welchen Einfluss die eingesetzte Amöbenkonzentration je ml auf die Vermehrung der Legionellen hat, wurde nach 3 und 7 Tagen Kokultur mit verschiedenen Amöbenkonzentrationen die durchschnittliche Legionellenanzahl bestimmt.

Die Anhänge 4 und 5 zeigen die jeweils minimal beziehungsweise maximal nachgewiesenen Legionellenkonzentrationen.

Betrug die Konzentration der Legionellen in den Proben initial weniger als 5 KBE / ml, so lag sie nach Kokultur mit **50.000** Amöben pro ml nach 3 Tagen durchschnittlich bei $4,5 \times 10^4$ KBE / ml.

Nach 7 d betrug sie im Mittel 3×10^5 KBE / ml.

Lag die Ausgangskonzentration der Legionellen unter 0,5 KBE / ml, so war die Legionellenmenge nach 3 Tagen Kokultur im Vergleich zu höheren Ausgangskonzentrationen um 25 % niedriger.

Nach weiteren 4 Tagen Kokultur bestand kein Unterschied mehr.

Nach Kokultur mit **5000** Amöben / ml konnten bei Legionellaausgangskonzentrationen von <0,5 KBE / ml in 2 von 6 Ansätzen keine Legionellen nachgewiesen werden.

In beiden Proben mit Legionellenkonzentrationen von < 5 KBE / ml gelang deren Nachweis.

Die Vermehrung fiel in den Ansätzen mit 5000 Amöben / ml auch nach 7 Tagen noch deutlich geringer aus. Der nach 3 d nachgewiesene Mittelwert von 1×10^2 KBE / ml, stieg nach 7 Tagen auf 7×10^2 KBE / ml an. Die Anzahl der KBE nach 3 Tagen war allerdings um 50 % niedriger im Vergleich zu den Ansätzen mit 50.000 Amöben / ml.

Ohne Amöbenzusatz hingegen konnten auch Legionellenkonzentrationen von 15 KBE / ml nach 3 Tagen Inkubation nicht nachgewiesen werden.

Nach 7 Tagen wurde hingegen bei mehr als 0,5 Legionellen / ml in allen ohne Amöbenzusatz untersuchten Proben eine Vermehrung nachgewiesen.

Bei weniger als 0,5 Legionellen / ml gelang dies nur bei einer von zwei untersuchten Proben. Bei diesem niedrigen Legionellengehalt waren die Legionellen-KBE nach einer Woche Inkubation auch um den Faktor 5,5 - 8,9 niedriger als in den anderen Proben. Zudem war bei gleicher Legionellenausgangskonzentration die Anzahl der KBE nach Inkubation um 50 % geringer als in den Ansätzen mit 50.000 Amöben / ml.

Das Maximum der Legionellen betrug nach 3 Tagen im Mittel 3,9 KBE / ml und nach einer Woche $5,7 \times 10^3$ KBE / ml.

3.1.3. Einfluss der PAS-Pufferkonzentration auf die Vermehrung der Legionellen in Amöben-Kokultur

Der Einfluss des PAS-Puffers auf die Vermehrung der Legionellen wurde mit der einfachen und der halben Pufferkonzentration untersucht. Dabei zeigte sich bei der 0,5-fachen Puffermenge eine etwas geringere Vermehrung der Legionellen. (Abb.2, Anhänge 4 und 5).

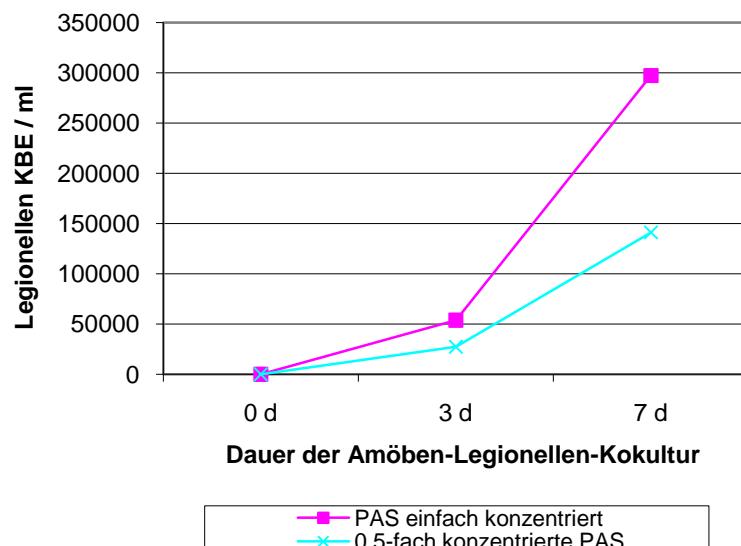


Abb. 2: Einfluss der Pufferkonzentration auf die Vermehrung von 10 KBE Legionellen mit 50.000 Amöben / ml. (Dargestellt ist der Mittelwert von 4 Versuchen.)

Der Mittelwert der Legionellen bei Einsatz von 50.000 Amöben / ml und der halben Pufferkonzentration betrug nach 3 d $2,2 \times 10^4$ KBE / ml, bei der einfachen Pufferkonzentration

$4,5 \times 10^4$ KBE / ml.

Nach 7 d wurden bei 0,5-facher Pufferkonzentration Mittelwerte von $1,4 \times 10^5$ beziehungsweise 3×10^5 KBE / ml gefunden. Dieses entspricht einer Halbierung der nachgewiesenen Legionellen bei Einsatz der halben Puffermenge.

Bei Ansätzen mit 500.000 Amöben / ml hatte die Konzentration des Puffers keinen Einfluss auf die Vermehrung der Legionellen.

Wurden hingegen nur 5000 Amöben / ml eingesetzt, kam es bei der 0,5-fachen Pufferkonzentration nach 3 d auch bei einer Legionellenbelastung von mehr als 5 / ml zu keiner Vermehrung der Bakterien.

Bei der einfachen Pufferkonzentration konnte hingegen in allen Proben mit mehr als 0,5 Legionellen pro ml eine Vermehrung nachgewiesen werden.

Im Mittel lag die Legionellenzahl in den Ansätzen mit einfacher Pufferkonzentration mit 1×10^2 KBE / ml ca. um den Faktor 10 höher als der in den Ansätzen mit halber Pufferkonzentration.

Nach 7 d wurden bei einfacher Pufferkonzentration ein Mittelwert von 7×10^2 KBE / ml und bei Einsatz der halben Pufferkonzentration durchschnittlich 3×10^2 KBE / ml erreicht.

Wurden keine Amöben eingesetzt, so zeigte sich auch kein von der eingesetzten Pufferkonzentration abhängiger Unterschied in der Vermehrungsrate.

Die Mittelwerte der Legionellen betrugen bei der halben Pufferkonzentration 14,5 KBE / ml nach 3 d und $1,2 \times 10^4$ KBE / ml nach 7 d und bei einfacher Pufferkonzentration 3,9 KBE / ml nach 3 Tagen und $5,7 \times 10^3$ KBE / ml nach 7 Tagen. Somit ist in der Kokultur bei allen Amöbenkonzentrationen unterhalb von 500.000 / ml eine Halbierung der eingesetzten Pufferkonzentration gleichbedeutend mit einer geringeren Vermehrung der Legionellen.

3.1.4. Einfluss eines im Duschwasser befindlichen Keimes auf die Vermehrung der Legionellen in der Amöben-Kokultur

Bei Ausstrich von Duschwasserproben nach Amöbenkokultivierung auf Schafblutagar wurde regelmäßig ein nicht bestimmbares gramnegatives, nonfermentierendes Stäbchen nachgewiesen (Stamm DMX). Wir untersuchten seinen Einfluss auf das Wachstum von *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 DM1 (SG1 DM1) in Kokultur mit *Acanthamoeba polyphaga* (siehe Tabelle 3).

Nach 3 Tagen war in allen Ansätzen mit dem Keim DMX eine deutliche Wachstumsverzögerung der Legionellen festzustellen, wobei die Wachstumshemmung in den Ansätzen, in denen der Begleitkeim durch eine 0,02 µm Anopore Membran von den

Legionellen und Amöben getrennt war, mehr als doppelt so stark war.

Nach 7 Tagen war keine Wachstumshemmung mehr in der DMX-Legionellen-Amöben-Kokultur, bei der Legionellen und Begleitkeim gemeinsam innerhalb des Membraneinsatzes waren, mehr erkennbar. Das Wachstum war sogar vergleichbar mit dem in der Kokultur ohne Begleitkeim.

Bei den Ansätzen, in denen der Keim DMX durch die Membran von den Legionellen getrennt war, war nach einer Woche hingegen nur weniger als die Hälfte der Legionellen-KBE / ml im Vergleich zu den anderen Ansätzen nachweisbar (Tabelle 3).

Tabelle 3: Einfluss des Nonfermenters DMX auf die Vermehrung von Legionella pneumophila SG1 Stamm DM1 in Amöben-Kokultur. Dargestellt sind der Mittelwert und in Klammern die Standardabweichung der Legionellen KBE / ml. Die Legionellen befanden sich immer im Membraneinsatz.

¹⁾ *Kulturschälchen: In einem Kulturschälchen, in das der bakteriendichte Membraneinsatz platziert wurde (siehe Abb. 1)*

Keim DMX im	Legionellen Ausgangs-KBE / ml	Legionellen KBE / ml nach 3 d Amöben-Kokultur	Legionellen KBE / ml nach 7 Tagen Amöben-Kokultur
Ø	51	$5,2 \times 10^5$ ($\pm 4,4 \times 10^4$)	$9,3 \times 10^5$ ($\pm 1,7 \times 10^5$)
Membraneinsatz	51	$2,9 \times 10^5$ ($\pm 2,1 \times 10^5$)	$1,1 \times 10^6$ ($\pm 6,7 \times 10^4$)
¹⁾ Kultur-Schälchen	51	$1,3 \times 10^5$ ($\pm 1,2 \times 10^5$)	4×10^5 ($\pm 2,3 \times 10^5$)

3.2. Quantitativer Nachweis von Legionellen in Duschwasser mit Amöben-Kokultur mittels der MPN-Methode

Die Zugabe von Amöben zu Probenwasser und die anschließende Inkubation ermöglichen nur einen qualitativen Nachweis.

Mittels der MPN-Methode wurde nun der Legionellengehalt von Proben quantitativ bestimmt. Diese Ergebnisse wurden mit der Anzahl der KBE nach direkter Kultur der Proben auf festen Nährmedien verglichen.

Dabei wurde auch überprüft, ob ein PAS-Puffer, in dem das Natrium durch die gleiche molare Menge Kalium ersetzt wurde, sich positiv auf die Vermehrung der Legionellen auswirkt. Ebenso wurde versucht, durch Zentrifugieren der Probe auf ein Amöbenpellet den Kontakt zwischen Amöben und Legionellen zu verbessern und somit die Vermehrungsrate der Legionellen zu steigern. Es wurden Amöbenkonzentrationen von 500.000 und 50.000 / ml eingesetzt. Bei der Auswertung der Proben nach der MPN-Methode nach drei, sieben und 14 Tagen ergaben sich differierende Wiederfindungsraten (Abb. 3 und Anhang 6).

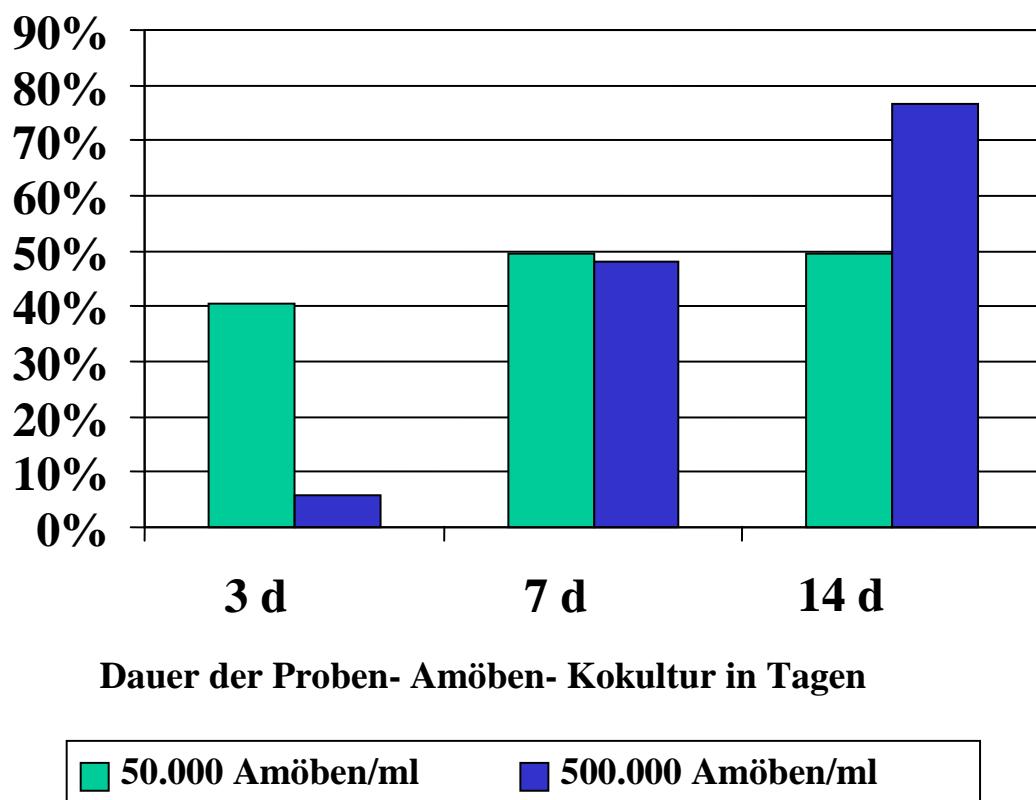


Abb. 3: Vergleich des quantitativen Legionellennachweises aus Duschwasser auf festen Nährböden (BGA-Methode) mit der MPN- Methode. Angegeben ist der Quotient aus KBE / ml / MPN in Prozent

(Mittelwert aus 3 Versuchen. Mit der BGA Methode zur Untersuchung von Duschwasser wurden zwischen 15 und 75 Legionellen KBE/ ml nachgewiesen.)

Im Vergleich zum klassischen Nachweisverfahren auf festen Nährböden konnte mittels der MPN-Methode nach Kokultur von legionellenhaltigen Duschwasserproben mit 50.000 Amöben / ml in PAS nach 3 Tagen nur zwischen 20,8 und 61,61 % und nach 7 und 14 Tagen zwischen 32,15 und 61,61 % der Legionellen nachgewiesen werden.

Auch in den anderen Ansätzen zeigten sich ähnliche Schwankungsbreiten, so dass ein quantitativer Nachweis der Legionellen in den Proben mittels der MPN-Methode nur eingeschränkt möglich war (Anhang 6). Bei allen 12 Proben, außer einem Ansatz mit 500.000 Amöben / ml, wurde nach 7 Tagen das Maximum erreicht.

3.3. Wasserproben mit Zusatz von legionellenhaltigem Duschwasser

Um zu untersuchen, ob sich die Legionellen aus dem Duschwasser auch in anderen Wasserproben vermehren, wurden 40 Proben aus Warmwasser, Whirlpoolwasser und Wasser aus Wäscherkammern von Klimaanlagen und Oberflächenwasser mit legionellenhaltigem Duschwasser versetzt.

In 39 dieser 40 Proben mit Duschwasserzusatz konnten Legionellen nach Amöben-Kokultur und Ausstrich auf feste Nährböden nachgewiesen werden (Tabelle 4, Anhänge 7 und 8). Dabei war die Vermehrung in der Amöben-Legionellen-Kokultur so stark, dass Legionellenkolonien im Drei-Ösen-Ausstrich mindestens bis in den 2. Ausstrich nachweisbar waren.

Tabelle 4: Nachweis von Legionellen nach Amöbenkokultur in verschiedenen Mischproben

Wasser	Anzahl der Proben n = 40	Duschwasser- zusatz (KBE Legionellen / Ansatz)	Ansätze mit nachgewiesenen Legionellen
Dusch-, Warm-, Tank- und Whirlpoolwasser	32	13	31
Wäscherkammer	3	9	3
Oberflächenwasser	5	200	5

Bei der mit Duschwasser versetzten Tankwasserprobe, bei der kein Legionellennachweis möglich war, wuchs nach Ausstrich auf BCYE Agar ohne vorherige Säurebehandlung reichlich *Pseudomonas aeruginosa*.

Zur Kontrolle wurden alle 40 Proben auch ohne Vermischung mit Duschwasser direkt auf festen Nährmedien und zusätzlich mit Amöben kokultiviert.

Dabei konnte auf festen Nährmedien bei einer Warmwasserprobe *Legionella* spp., sowie in 2 Oberflächenwässern *Legionella pneumophila* SG 1 nachgewiesen werden. In der Amöben-Kokultur ließen sich die *Legionella pneumophila* SG 1 aus den Proben ohne Duschwasserzusatz ebenfalls nachweisen. Dabei wurden nach Kokultur aber wesentlich weniger Legionellenkolonien auf den Nährmedien nachgewiesen, als bei den mit legionellenhaltigem Duschwasser versetzten Proben.

3.4. Einfluss der physikalischen und mikrobiologischen Eigenschaften von Probenwasser auf den Legionellennachweis

Am Probenentnahmestandort Elbe/Museumshafen wurden insgesamt 30 Proben über 4 Jahre untersucht. Gleichzeitig wurden die mikrobiologischen Eigenschaften des Wassers bestimmt. Die physikalischen Parameter stammen aus dem Hamburger Wassergüte-Messnetz (Tab. 5 und Anhang 3). Ob diese einen Einfluss auf die Nachweismöglichkeit von Legionellen mit Amöben-Kokultur und unmittelbarer Kultur auf festen Nährböden haben, wurde mit deskriptiven Methoden dargestellt. Für die statistische Auswertung wurde für die Parameter der Median berechnet und die Werte der jeweiligen Probe in die Gruppen < Median und > Median zusammengefasst und mit dem Legionellennachweis nach Proben-Amöben-Kokultur und direkter kultureller Legionellennachweis im Fisher's-Exact-Test verglichen (Tab. 6).

Tabelle 5: Mikrobiologische und physikalische Parameter der untersuchten Elbe- Proben.

Parameter	MITTEL- WERT (STDABW.)	Median	Minimum	Maximum
Wassertemperatur (° C)	11,64 (+/- 7,95)	10,9	0,6	22,8
Sauerstoffgehalt (mg/l)	8,49 (+/- 4,22)	9,10	2	14
Sauerstoffsättigung (%)	73,3 (+/- 27,85)	84,7	26,3	103,9
Leitfähigkeit (µS/cm)	875,43 (+/- 167,49)	850,2	434,7	1175,7
pH-Wert	7,77 (+/- 0,34)	7,81	7,12	8,57
KBE / ml 22 ° C	2601,89 (+/- 3537,31)	1405,5	121	16.900
KBE / ml 36 ° C	1818,04 (+/- 3245,61)	678,50	79	15.300
E. coli in 100 ml (MPN)	562 (+/- 924)	230	10	4.600
Coliforme in 100 ml (MPN)	4701 (+/- 5661)	2400	80	24.000

Tabelle 6: Einfluss der mikrobiologischen und physikalischen Eigenschaften der Probenwässer auf den direkten kulturellen Legionellennachweis sowie den Legionellennachweis nach Proben- Amöben- Kokultivierung.

Parameter	Legionellennachweis mit				
	Proben- Amöben- Kokultur			Direktem kulturellen Nachweis	
	Anzahl	Positiv	Negativ	Positiv	Negativ
Wassertemperatur < Median	14	13	1	4	10
Wassertemperatur > Median	15	12	3	1	14
Sauerstoffgehalt < Median	14	10	4*	0	14*
Sauerstoffgehalt > Median	15	15	0	5	10
Sauerstoffsättigung < Median	14	10	4*	0	14*
Sauerstoffsättigung > Median	14	14	0	4	10
Leitfähigkeit < Median	14	12	2	3	11
Leitfähigkeit > Median	15	13	2	2	13
pH-Wert < Median	14	10	4*	0	14*
pH-Wert > Median	15	15	0	5	10
KBE / ml 22 ° C < Median	14	13	1	2	12

KBE / ml 22 ° C > Median	14	11	3	3	11
KBE / ml 36 ° C < Median	14	13	1	4	10
KBE / ml 36 ° C > Median	14	11	3	1	13
E. coli in 100 ml < Median (15)	15	13	2	2	13
E. coli in 100 ml > Median (14)	14	12	2	3	11
Coliforme in 100 ml < Median (11)	11	10	1	3	8
Coliforme in 100 ml > Median (18)	18	15	3	2	16

* p < 0,05

Ein niedriger Sauerstoffgehalt und eine niedrige Sauerstoffsättigung hemmten den Legionellennachweis aus Elbwasser mittels Amöben-Proben-Kokultur oder direktem kulturellen Nachweis. (Tabelle 6).

Legionellen wurden demnach mit der etablierten Methode auf festen Nährmedien nur bei einem hohen Sauerstoffgehalt, einer hohen Sauerstoffsättigung und einem hohen pH-Wert der Elbe nachgewiesen.

Mit der Proben-Amöben-Kokultur gelang dies auch bei Werten größeren Abweichungen von Sauerstoffsättigung und -gehalt sowie bei differierenden pH-Werten. Bei allen Proben, aus denen der Legionellennachweis mit Proben-Amöben-Kokultur nicht gelang, lagen der Sauerstoffgehalt und die Sauerstoffsättigung, sowie der pH-Wert unterhalb des Medians. Diese Unterschiede waren im Fisher's Exact Test signifikant.

Die Leitfähigkeit der Elbwasserproben hatte keinen Einfluss auf den Nachweis von Legionellen in der Proben-Amöben-Kokultur.

Sowohl der direkte kulturelle Legionellen Nachweis, als auch der Nachweis mittels Proben-Amöben-Kokultur waren statistisch unabhängig von der KBE und dem E. coli oder Coliformen Gehalt der Proben.

3.5. Einfluss der zugesetzten Amöbenmenge auf die Vermehrung der heterotrophen Begleitflora

In den Ansätzen der Proben-Amöben-Kokultur vermehrten sich nicht nur die Legionellen, sondern auch die heterotrophe Begleitflora. Es wurde untersucht, ob dafür die in der Probe gelösten Nährstoffe, nicht vollständig entfernte Rückstände des Amöbennährmediums (PYG) oder die Amöben selbst verantwortlich waren.

Wurde die Probe Elbe 4 nur mit PAS ohne Zusatz von Amöben bebrütet, zeigte sich nach 3 Tagen eine Zunahme der Begleitflora von 10^2 auf 5×10^4 bis 2×10^5 KBE / ml.

Der nach 3-maligem Waschen der Amöben mit PAS gewonnene amöbenfreie Überstand führte zu keiner stärkeren Aufkeimung.(siehe Tabelle 7), woraus sich schließen lässt, dass die PYG durch das Waschen effektiv entfernt wurde und für das Wachstum der Begleitflora nicht relevant war.

Auch nach Zugabe von 50.000 Amöben / ml vermehrten sich die Bakterien unabhängig davon, ob die Amöben von der Probe durch die bakteriendichte Anopore-Membran getrennt wurden oder nicht, nicht stärker. Eine wesentlich stärkere Aufkeimung fand erst nach Zugabe von 500.000 Amöben/ ml statt. Dabei war die Aufkeimung stärker, wenn die Bakterien der Probe keinen direkten Kontakt zu den Amöben hatten.

Tabelle 7: Einfluss der zugesetzten Menge Amöben, des Waschpuffers, und des Kontaktes der Amöben mit der Begleitflora auf die Vermehrung der heterotrophen Begleitflora des Oberflächenwassers (Elbe 4). Dargestellt sind der Mittelwert und die Standardabweichung aus 3 Versuchen. (Ausgangskeimzahl der Begleitflora: $8,7 \times 10^2$ KBE / ml Ansatz).

Kulturschälchen mit 1ml Probe und	Innerhalb des Membraneinsatzes	Mittelwert (Standardabweichung) der Begleitflora- KBE / ml nach 3 Tagen
PAS	PAS	5×10^4 ($\pm 1,3 \times 10^4$)
PAS	PAS	2×10^5 ($\pm 6 \times 10^4$)
PAS	Überstand von 50.000 /ml Amöben	$2,3 \times 10^5$ ($\pm 8,6 \times 10^4$)
PAS	Überstand von 500.000 Amöben / ml	$7,4 \times 10^4$ ($\pm 3,9 \times 10^4$)
PAS	50.000 Amöben / ml	$6,5 \times 10^4$ ($\pm 8,1 \times 10^3$)
50.000 Amöben /ml	PAS	$1,2 \times 10^5$ ($\pm 7,7 \times 10^4$)
PAS	500. 000 Amöben / ml	$5,8 \times 10^7$ ($\pm 2 \times 10^7$)
500.000 Amöben/ml	PAS	$8,9 \times 10^6$ ($\pm 5,6 \times 10^6$)

3.6. Legionellennachweis in Umweltwasserproben nach Proben-Amöben-Kokultur

Es wurden 94 Warmwasserproben untersucht, von denen in 84 Proben sowohl im direkten Nachweis als auch nach Kokultur mit Acanthamoeba polyphaga keine Legionellen gefunden wurden. In vier Proben wurden mit beiden Verfahren Legionellen nachgewiesen, in jeweils 3 Proben war der Nachweis nur mit einer der beiden Methoden möglich (Tab. 8).

Tabelle 8: Vergleich der Amöben- Kokultur mit dem direkten Nachweis von Legionellen in Wasserproben

Probe	Nachweis nur nach Amöben- Kokultur	Nur direkter Nachweis	Nachweis mit beiden Methoden	Kein Nachweis von Legionellen
Warmwasser- proben (n=94)	3	3	4	84
Wäscherkam- merproben (n=9)	6	0	0	3
Oberflächen- wasserproben (n=45)	24	0	6	15
$\Sigma n = 148$	33	3	10	102

Von neun Proben aus den Wäscherkammern von Klimaanlagen wurden in sechs Proben Legionellen nur nach Amöben-Kokultur gefunden, in den anderen 3 Proben gelang der Nachweis mit beiden Methoden nicht (Tab. 8). Dieser Unterschied zwischen dem Nachweis nach Kokultur und dem direkten Nachweis war im Fisher's Exact Probability Test signifikant ($p > 0,001$).

In den Wasserproben aus einem Trinkwassertank und einem Whirlpool wurden weder im direkten Nachweis noch nach Amöben-Kokultur Legionellen nachgewiesen.

In 24 von 45 untersuchten Oberflächenwasserproben wurden in 100 ml ausschließlich nach Kokultivierung mit Amöben Legionellen nachgewiesen werden. In sechs weiteren Proben waren mit beiden Methoden Legionellen nachweisbar und in den restlichen 15 Proben wurden sowohl nach Amöben-Kokultur als auch im direkten Nachweis keine Legionellen gefunden. Dieser Unterschied war im Fisher's Exact Probability Test signifikant ($p > 0,001$).

Insgesamt wurden in 30 von 45 Oberflächenwasserproben Legionellen nach Amöben-Kokultur nachgewiesen.

Dies gelang in 26 Proben bereits nach dreitägiger und in den anderen 4 Proben nach 7-tägiger Inkubation.

In 2 Proben, in denen nach 3 Tagen Kokultur Legionellen nachweisbar waren, war dies nach 7 und 14 Tagen Inkubation in Kokultur nicht mehr möglich.

4. Diskussion

4.1. Etablierung der Proben-Amöben-Kokultur mit legionellenhaltigen Duschwasser

4.1.1. Minimale zum Nachweis nach Amöben-Kokultur notwendige Legionellenkonzentration.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, wie schnell und gut mit einer Amöben-Kokultur Legionellen in mikrobiell verunreinigten Umweltmedien nachgewiesen werden können und wie sensitiv diese Methode im Vergleich zum herkömmlichen direkten kulturellen Nachweis ist.

Es wurden vor allem große Probenvolumina mit geringen Legionellenkonzentrationen und hoher Begleitkeimbelaastung untersucht.

Dabei wurde Wert darauf gelegt, dass die von der Deutschen Vereinigung des Gas- und Wasserfaches e.V. (DVGW) festgelegten Legionellenkonzentrationen, bei denen Sanierungs- oder Überwachungsmaßnahmen getroffen werden sollen (Arbeitsblatt W551, Anonymus, 2004), mittels der Kokultur sicher nachgewiesen werden können.

In 100 ml Duschwasser, welches zwischen 10 und 100 KBE Legionellen enthielt, konnten nach Zugabe von 50 000 Amöben / ml immer Legionellen nach Ausstrich auf Nährböden nachgewiesen werden.

Teilweise konnten Legionellen im Duschwasser bei einem Legionellengehalt ab 10^1 KBE / 100 ml auch ohne Amöbenzugabe nachgewiesen werden. Dieses gelang aber seltener und die Vermehrung war wesentlich geringer. Nach 3 Tagen waren in keinem der Ansätze Legionellen nachweisbar.

Damit erwies sich die Proben-Amöben-Kokultur dem Bebrüten einer Wasserprobe ohne Amöbenzusatz mit sequentiellem Ausstrich auf feste Nährböden (Edelstein 1981; Feeley et al. 1979, Bopp et al. 1981) als überlegen.

Auch mit einem Legionellengehalt von < 10 KBE / 100 ml gelang der Nachweis nach Kokultur, benötigte aber zum Teil eine Vermehrungsdauer von 7 Tagen.

Bei Versuchen mit kleineren Probenmengen gelang sowohl mit 500.000 als auch mit 50.000 Amöben / ml der sichere Nachweis von 10^0 bis 10^{-1} KBE Legionellen / ml.

Wurden weniger Amöben eingesetzt, gelang dies seltener und dauerte länger. Im Vergleich zu den Ansätzen ohne Amöben gelang der Nachweis der Legionellen in Kokultur aber häufiger, schneller und zeigte eine größere Anzahl von KBE.

Als Legionellenquelle wurde Wasser einer leicht zugänglichen Dusche mit *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 verwendet, das für jeden Versuchsansatz frisch entnommen wurde. Dabei kann nicht ausgeschlossen werden, dass nicht stets der gleiche Stamm, sondern mehrere unterschiedliche Stämme in die Versuche eingingen. Auch bezüglich der Begleitflora

herrschten keine kontrollierten Bedingungen. Der Grund für das von uns gewählte Vorgehen ist, dass ältere Legionellenkulturen die Fähigkeit verlieren Amöben zu infizieren und häufig an Laborbedingungen adaptiert sind. So gelang in Vorversuchen nur bei 2 von 7 getesteten Referenzstämmen überhaupt eine Vermehrung in Kokultur mit Amöben.

Es ist möglich, dass die minimal für die Vermehrung in Amöben-Kokultur erforderliche Legionellenkonzentration in anderen Wasserarten variiert, wenn in diesen andere mikrobiologische und physikalische Bedingungen herrschen.

Zudem könnten die von uns verwendeten Duschwasserproben Legionellen enthalten haben, die an das Überleben in Amöben adaptiert waren (Wadowsky et al. 1988; Barbaree et al. 1986) und somit diese leichter infizieren konnten als Legionellen aus anderen Proben, die eher an das Wachstum in einem Biofilm adaptiert waren (Rogers et al. 1994; Marrao et al. 1993).

4.1.2. Einfluss der Amöbenmenge auf die Vermehrung von in Duschwasser enthaltenen Legionellen in Proben-Amöben-Kokultur

Bereits nach 3 - 7 Tagen wurden nach Amöben-Kokultivierung sicher Legionellen in Wasserproben nachgewiesen.

Dies gelang auch in 6 von 9 Wäscherkammerwasserproben mit extrem hoher Begleitfloradichte, in denen der herkömmliche kulturelle Legionellennachweis nie positiv ausfiel.

In Trinkwasser war keine Zunahme der positiven Legionellennachweise zu erreichen, aber eine deutlich stärkere Vermehrung. Dieses Ergebnis deckt sich mit der Untersuchung von Frahm und Obst (1994), die Proben mit nachgewiesenen autochthonen Amöben inkubierten und ebenfalls eine Vermehrung der Legionellen in den einzelnen Ansätzen ohne Zunahme der insgesamt positiven Nachweise feststellten.

Bei anderen Studien erfolgte die Inkubation jeweils für mehrere Wochen bis Monate und entweder als kontrolliertes Laborexperiment ohne Begleitflora oder mit, zum Teil nur vermuteten, autochthonen Amöben, was die Vergleichbarkeit mit unserer Untersuchung einschränkt.

So zeigten Sanden et al. (1992), dass in mehr als 30 % von Proben, die nach herkömmlicher Kultur negativ für Legionellen waren, jedoch autochthone Amöben enthielten, nach sechswöchiger Inkubation ein kultureller Nachweis von Legionellen möglich war.

Wadowsky et al. (1988) erreichten durch Inkubation von amöbenhaltigen Wässern eine Vermehrung von Legionellen. Shahamat et al. (1991) entwickelten eine Methode der sequentiellen Kultur mit wiederholter Inkubation und Ausstreichen der Proben bei zunächst negativem kulturellem Legionellennachweis.

Dabei waren von insgesamt 27 positiven Proben 18 erst nach mehreren Ansätzen Legionellen-positiv. Diesen Erfolg führten sie auf nachgewiesene autochthone Amöben in den Proben

zurück. In unserer Untersuchung konnten Legionellen bei höherer Begleitfloradichte nach Amöben-Kokultur jedoch besser und in höherer Konzentration nachgewiesen werden.

Die von uns verwendeten Wasserproben wurden nicht auf das Vorhandensein autochthoner Amöben untersucht. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass sie in möglicherweise relevanter Konzentration in den Proben vorhanden waren und die Ergebnisse beeinflusst haben.

Koide et al. (2001) inkubierten ihre Blumenerdeproben ebenfalls, um eine Vermehrung von Legionellen mittels vorhandener autochthoner Amöben zu erreichen. Dabei wurden 46 Legionellenstämme in 22 von 24 untersuchten Proben gefunden, wovon nur 5 direkt und alle 22 nach monatelanger Inkubation positiv auf Legionellen waren.

In der unserer Arbeit wurde bei der Kokultur eine vergleichsweise niedrige Amöbenkonzentration von 50.000 / ml eingesetzt.

In anderen Laborstudien wurden 10^6 - 10^9 Amöben / ml verwendet (Moffat u. Tompkins 1992; Neumeister et al. 1997). Doch zum einen beobachteten wir bei höheren Amöbenkonzentrationen eine sehr viel höhere Verzystierungsrate, was eine niedrigere Vermehrungsrate bedeutet, da Zysten nicht von Legionellen infiziert werden können (Rowbotham 1983).

Zum anderen würden bei den verwendeten Probenvolumina von 100 ml statt 5×10^6 5×10^7 Amöben benötigt. Da in unseren Zellkulturflaschen ca. 100.000 Amöben / cm^2 angezüchtet werden konnten, betrüge die benötigte Zellkulturflaschenfläche für 100 ml Probe und 5×10^7 Amöben / ml 500 cm^2 , was vom Aufwand her kaum praktikabel wäre.

Um nach Ausstrich einer flüssigen Probe mittels 10 μ l-Öse im 3-Ösen-Ausstrich auf einem Nährboden Legionellen sicher nachzuweisen, ist mindestens eine Konzentration von einer KBE je 10 μ l oder 100 KBE je Milliliter erforderlich.

Diese Legionellenkonzentration wurde schon nach einer 3- tägigen Proben-Amöben-Kokultur erreicht, auch wenn die ursprüngliche Wasserprobe weniger als 0,5 Legionellen / ml enthielt. Zu diesem Zeitpunkt war die KBE im Mittel auf 330 / ml angestiegen, so dass die Anzahl theoretisch ausreichend für den kulturellen Nachweis auf festen Nährböden nach Ausstrich war. Im Mittel erfolgte in der Amöben-Kokultur eine 75.000-fache Vermehrung von 10^0 bis 10^1 KBE Legionellen / ml auf 10^4 - 10^5 KBE/ml in 7 Tagen, wobei die Vermehrung überwiegend innerhalb der ersten 3 Tage stattfand.

Dabei ist nicht auszuschließen, dass eine KBE einer größeren Anzahl von Legionellen entspricht, die sich zum Zeitpunkt des Ausstrichs noch innerhalb einer Amöbe befanden.

Da aber mikroskopisch nach 3 - 7 Tagen Kokultur keine Amöben in den Ansätzen mehr sichtbar waren, ist davon auszugehen, dass sehr viele Legionellen sich in freier Suspension befanden.

Dies konnte nur in Kokultur mit Legionellen beobachtet werden, in axenischer Reinkultur waren Trophozyten weitaus länger sichtbar. Auch McNealy et al. (2002) sahen nach maximal 6 Tagen bei einer MOI (Multiplicity of Infection: Anzahl der Bakterien, die pro Amöbe im Versuchsansatz vorhanden sind) von $1/10^3$ Legionellen/Amöben die Lyse der Amöben. Bei steigender Legionellenkonzentration fand die Lyse jeweils früher statt.

Wir fanden für die Amöben-Kokultur keine Literatur mit dokumentiert vergleichbar niedrigen Legionellen-Konzentrationen und hohen Probenvolumina wie in unseren Versuchsansätzen.

McNealy et al. (2002) bestimmten die Vermehrung bei unterschiedlichen MOI, die das Verhältnis von Bakterien zu Amöben beschreibt. Dabei zeigte sich, dass die Vermehrungsrate von 10^3 -fach bei einer MOI von $1/10^2$ Legionellen / Amöben auf 10^0 -fach bei einer MOI von $1/10^{-2}$ abnahm.

Bei uns lag die MOI zwischen $1/10^4$ und $1/10^5$ Bakterie / Amöben, so dass dies eine mögliche Erklärung für unsere hohe Vermehrungsrate sein könnte.

Dodson und Newsome (1999) erreichten bei der Kokultur von Amöben und Legionellen in sterilem Quellwasser nach 6 Tagen einen 7000-fachen Anstieg der Legionellen- KBE. Sie bedienten sich dabei einer MOI von $1/10^3$ Bakterien/Amöben. Moffat und Tompkins (1992) arbeiteten gar mit einer MOI von $1/10^4$. In beiden Studien wurde allerdings mit einer sehr hohen Legionellenkonzentration gearbeitet, so dass die Ergebnisse nicht uneingeschränkt übertragbar sind. In unseren Ansätzen konnten bereits bei einer MOI von $1 / 10^5$ bzw. $1 / 10^6$ Legionellen / Amöben Legionellen zu 100 bzw. 50 % nachgewiesen werden

Bei 50.000 Amöben / ml zeigte sich ohne Berücksichtigung der Lag-Phase eine durchschnittliche Verdoppelungszeit von 6-8 Stunden.

Kilvington und Price (1990) ermittelten in Kokultur mit 5×10^4 A. polyphaga / ml eine 24 Stunden dauernde Lag-Phase und ein logarithmisches Wachstum von initial $9,5 \times 10^5$ KBE Legionellen / ml auf $1,7 \times 10^{11}$ / KBE an Tag 5, was einer durchschnittlichen Verdopplungszeit von 5,5 Stunden entspricht. Nach Tag 6 beobachteten in sie eine abnehmende Zahl der Legionellen bei einer zunehmenden Lyse der Trophozyten. Wenn es zu einer Vermehrung von Legionellen gekommen ist, war sie spätestens, wie auch in unseren MPN-Versuchen gezeigt, nach spätestens 7 Tagen nachweisbar.

Somit erscheint ein Kokulturzeitraum von 7 Tagen nach Infektion der Amöben ausreichend, da dann wieder eine Abnahme der Legionellenzahl möglich ist. Weil der Zeitpunkt der Infektion der Amöben durch eine sehr geringe Anzahl von Legionellen schlecht bestimmbar ist und variabel sein kann, wurden, um sowohl schnell als auch langsam wachsende Legionellen nachweisen zu können, als Auswertungszeitpunkte 3, 7 und 14 Tage nach Versuchsansatz gewählt.

Durch die Zugabe von Amöben wurde stets eine schnellere und stärkere Vermehrung der Legionellen als in Proben ohne Amöbenzusatz erreicht. Wurden den Proben keine Amöben zugesetzt, vermehrten sich die Legionellen innerhalb von 7 Tagen ungefähr 1500-fach, in Amöben-Kokultur mehr als 10^5 -fach.

Grund für die starke Vermehrung ohne Amöbenzusatz könnten autochthone Amöben im Wasser der Legionellenquelle sein, wie sie auch schon mehrfach in mit Legionellen belastetem Trinkwasser in Deutschland und den USA nachgewiesen wurden (Frahm et Obst, 1994; Sanden et al.; 1992).

Die von uns ermittelte Nachweisgrenze von 10^1 bis 10^2 KBE Legionellen / 100 ml bewegt sich im Nachweisbereich anderer Methoden. Boulanger und Edelstein (1995) ermittelten für die Anreicherung mit Filtration oder Zentrifugation in mit Legionellen beimpftem steriles Trinkwasser einen sehr variablen Nachweis von 50 - 500 KBE / 50 ml Probe. Lagen weniger als 50 KBE Legionellen in 50 ml Probe vor, lag die Wiederfindungsrate zwischen 18 und 30 %. Die Wiederfindungsrate war bei der Filtration am höchsten und betrug im Mittel 52,6 % im Bereich von 10^3 - 10^6 KBE / ml. Dabei zeigte sich innerhalb dieser Konzentrationen keine signifikante Korrelation zwischen Wiederfindungsrate und Bakterienkonzentration. Diese Versuche wurden allerdings in steriles Leitungswasser durchgeführt, wo die Legionellenvermehrung keinen hemmenden Einflüssen durch eine Begleitflora ausgesetzt war.

4.1.3. Einfluss der PAS-Pufferkonzentration auf die Vermehrung der Legionellen in Amöben-Kokultur

In Laborversuchen wurden die Legionellen-Amöben-Kokulturen immer mit PAS- Puffer durchgeführt.

Die Vermehrung von Legionellen in Amöben-Kokultur ist vom pH-Wert abhängig. Dieser wird durch Stoffwechselprodukte der Kokultur und der Begleitflora verändert. Daher wurde untersucht, ob die Halbierung der allgemein gebräuchlichen Puffermenge einen Einfluss auf den Legionellennachweis nach Amöben-Kokultur hat. Dabei zeigte sich, dass die Halbierung der Molarität des Puffers schlechtere Ergebnisse erbrachte. Da die durch Rowbotham (1983) vorgegebene Puffermenge sich auf destilliertes Wasser bezog, ist in unseren Ansätzen von einer höheren Osmolarität auszugehen. Da diese sich ebenfalls hemmend auf das Wachstum sowohl von Legionellen als auch Amöben auswirken kann (Rowbotham 1983), wurde auf Versuche mit einer höheren Pufferkonzentration verzichtet. Zwar wurde in Studien, in denen mittels autochthoner Amöben Legionellen angereichert wurden, kein Puffer verwendet (Frahm u. Obst 1994; Sanden et al. 1992; Wadowsky et al. 1988), jedoch waren unsere Ergebnisse mit Verwendung von Puffer aufgrund der stärkeren und schnelleren Vermehrung deutlich besser. Die Halbierung der Puffermolarität führte allerdings zu einer deutlich niedrigeren Vermehrungsrate. Das ist ein Indiz dafür, dass in Wässern mit hohem Pufferverbrauch die Vermehrung geringer ausfallen könnte.

4.1.4. Einfluss eines im Duschwasser befindlichen Keimes auf die Vermehrung von Legionellen in Amöben-Kokultur

Die Begleitflora in dem von uns verwendetem Duschwasser kann einen wachstumshemmenden Einfluss auf die Kokultur haben. Somit kann die Nachweisgrenze in anderen Wasserproben mit divergierender Begleitflora auch anders ausfallen.

Daher wurde der Einfluss des regelmäßig im Duschwasser nachgewiesenen gramnegativen, nonfermentierenden Stäbchens (Stamm DMX) auf die Legionellenvermehrung in Amöben-Kokultur untersucht.

Der hemmende Einfluss des Begleitkeims zeigte sich dabei in einer geringeren Legionellenvermehrung nach 3 Tagen Amöben-Kokultur in allen Ansätzen.

Dieser Einfluss war jedoch in den Ansätzen, in denen keine Trennung des DMX- Keimes von der Kokultur durch eine Anopore- Membran stattfand, nach 7 d nicht mehr nachweisbar. In den Ansätzen, in denen die Amöben- Legionellen- Kokultur jedoch durch die Membran von dem Begleitkeim getrennt war, war nach 3 und 7 Tagen noch eine deutliche Hemmung des Legionellenwachstums feststellbar. Hieraus lässt sich folgern, dass Stoffwechselprodukte des Begleitkeims das Wachstum der Legionellen in Amöben-Kokultur hemmen. Weiter lässt sich hieraus schließen, dass durch die Anwesenheit der Amöben dieser Effekt nach 3 d vermindert und nach 7 d Inkubation aufgehoben wird. Ursache dafür könnte entweder die Neutralisierung der hemmenden Substanzen oder auch die Phagozytose der Begleitkeime durch die Amöben sein.

4.2. Quantitativer Nachweis von Legionellen in Duschwasser mit Amöben-Kokultur mittels der MPN-Methode

Mittels der MPN-Methode gelang es uns jeweils 50 % der auf Platte anzüchtbaren 15 - 75 KBE Legionellen / Probe nachzuweisen. Ein quantitativer Nachweis ist erstrebenswert, da der Grad der Legionellenbelastung einer Probe maßgeblich für die Indikation oder die Verlaufskontrolle von Sanierungsmaßnahmen zur Reduktion der Legionellenkontamination ist. Da die Wiederfindungsrate zwischen minimal 20,8 und maximal 62,61 % schwankte, wurde auf die Quantifizierung nach der MPN-Methode verzichtet.

4.3. Legionellennachweis in mit legionellenhaltigem Duschwasser versetzten Wasserproben nach Amöben-Kokultur

Um festzustellen, ob die Vermehrung der im Duschwasser enthaltenen Legionellen mittels Amöben- Kokultur auch in Oberflächengewässern und anderen Umweltproben mit hoher Begleitfloradichte gelingt, wurden diese mit geringen Mengen des Duschwassers versetzt.

Beim dem mit Duschwasser vermischt Trink- und Whirlpoolwasser, Wasser aus Wäscherkammern von Klimaanlagen und Oberflächengewässern gelang es in 39 von 40 Proben die Legionellen wieder zu finden. Die Probe, in der das nicht gelang, war stark von *P. aeruginosa* überwuchert. Die Vermehrung der hinzugefügten Legionellen gelang in allen getesteten Wasserarten. Daher scheinen in erster Linie nicht die physikalischen Parameter der Wasserproben, sondern das Wachstum und die Zusammensetzung der Begleitflora für falsch negative Nachweise verantwortlich zu sein

Wurden Legionellen nachgewiesen, wuchsen sie in den Mischproben mindestens bis in den 2. Ausstrich, häufig auch im 3. Ausstrich, was für eine gute Vermehrung spricht.

Selbst bei einer Legionellenausgangskonzentration von 10^0 - 10^1 KBE / Ansatz bei einem Ansatzvolumen von 5 - 10 ml konnten in Trink-, Whirlpoolwasser und Wasser aus Klimaanlagen-Wäscherkammern auf MWY-Agar mit und ohne Säurebehandlung nach Kokultur stets Legionellen nachgewiesen werden.

4.4. Einfluss der physikalischen und mikrobiologischen Eigenschaften von Probenwasser auf den Legionellennachweis

Mit dem herkömmlichen kulturellen Nachweisverfahren wurden Legionellen aus Oberflächenwasser nur bei relativ niedrigen Temperaturen, einem geringen Keimgehalt, einem hohen Sauerstoffgehalt und einer hohen Sauerstoffsättigung erfasst (Wadowsky et al. 1982; Ta et al. 1995; Frahm et Obst 1994; Heudorf et al. 2001; Kusnetsov et al. 1994; Bornstein et al. 1986; Shahamat et al. 1991; Vickers et al. 1990; Makin u. Hart 1989; Bauer et al. 1990; Maiwald et al. 1994).

Mit der Proben-Amöben-Kokultur konnten auch bei höheren Temperaturen, massiver Begleitflora und geringem Sauerstoffgehalt Legionellen vermehrt und nach Ausstrich an festen Nährböden nachgewiesen werden. Bei einer höheren Wassertemperatur um 20° C war der Nachweis sowohl mit der herkömmlichen Methode als auch mittels der Amöben-Kokultur schwieriger. Dies widerspricht den bisher veröffentlichten Ergebnissen, bei denen Legionellen eher in wärmeren Wässern gefunden wurden. (Wadowsky et al. 1985, Verissimo et al. 1991,

Marrao et al. 1993, Ohno et al. 2003). In unseren Oberflächenwasserproben bestand aber eine sehr enge inverse Korrelation zwischen der Wassertemperatur und dem Sauerstoffgehalt. In Leitungswasser führte ein niedriger Sauerstoffgehalt (1,7-2,2 µg/l) zu einer Abnahme der Legionellen, ein höherer von 6 bis 6,7 µg/l hingegen zu einer Zunahme (Wadawsky et al., 1985). Somit ist es eher wahrscheinlich, dass der niedrige Sauerstoffgehalt der wärmeren Elbwasserproben zu einer Abnahme der Legionellen in den Proben und damit zu einem schwierigeren Nachweis geführt hat.

Das Vorhandensein von für Amöben oder Legionellen toxischen Substanzen oder Bedingungen in den Wasserproben wurde von uns nicht überprüft. Da aber in allen Proben die Vermehrung der Legionellen regelmäßig gelang, ist dies eher unwahrscheinlich.

4.5. Einfluss der zugesetzten Menge an Amöben auf die Vermehrung der heterotrophen Begleitflora

Bei einer Erhöhung der Amöbenmenge um den Faktor zehn erfolgte eine 1000fach stärkere Vermehrung der Begleitflora, während der Nachweis von Legionellen davon unbeeinflusst blieb. Diese Vermehrung ist jedoch nicht Folge eines Wachstums der Begleitflora in den Amöben, sondern wird durch deren Stoffwechselprodukte vermittelt.

Deshalb wurde im Verlauf der Untersuchung mit der geringeren Amöbenkonzentration von 50.000 / ml gearbeitet.

4.6. Legionellennachweis in Wasserproben nach Proben-Amöben-Kokultur

In 100 ml Oberflächenwasser gelang in 24 von 45 Proben der Nachweis von Legionellen ausschließlich nach Amöben-Kokultur und in 5 Proben zusätzlich mittels des herkömmlichen kulturellen Nachweises. Damit ist die Vermehrung in Amöben-Kokultur für Oberflächenwasser signifikant besser als der herkömmliche kulturelle Nachweis nach Filtration.

Wurden 100 ml Oberflächenwasserproben nach Filtration und Säurebehandlung direkt auf BCYE zur primären Anzucht ausgestrichen, zeigte sich immer ein dichter heterotropher Begleitflorarasen, so dass der Nachweis von Legionellen nicht möglich war.

Von 94 Dusch- und Warmwasserproben konnten Legionellen in 4 Proben sowohl nach herkömmlicher als auch nach Amöben-Kokultur und in je 3 Proben nur mit einer der beiden Methoden nachgewiesen werden. Damit waren beide Methoden gleichwertig. Mögliche Gründe

für die negativen Nachweise nach Amöben-Kokultur bei positivem Legionellennachweis mit herkömmlicher Kultur könnten ein unterhalb der Nachweisgrenze liegender Legionellen- Gehalt der Probe oder Stämme sein, die sich nicht in Amöben vermehren können, wie zum Beispiel einige *Legionella species*- Stämme (Gao et al. 1999; Neumeister et al. 1997) und avirulente *L. pneumophila* Stämme (Moffat u. Tompkins 1992). Ohno et al. (2003) und Steinert et al. (1997) konnten zeigen, dass Legionellen unter widrigen Bedingungen einen nicht- replikativen lebenden, aber nicht kultivierbaren Zustand annehmen und dann ausschließlich durch Kokultur mit Amöben kulturell nachgewiesen werden können. Vielen Autoren gelang bereits der Nachweis von Legionellen im Warmwasser der Trinkwasserversorgung, wobei sie sich meist des kulturellen Nachweises nach Filtration und Säurebehandlung bedienten (Wadowsky et al. 1982; Ta et al. 1995; Frahm et Obst 1994; Heudorf et al. 2001; Kusnetsov et al. 1994; Bornstein et al. 1986; Shahamat et al. 1991; Vickers et al. 1990; Makin u. Hart 1989; Bauer et al. 1990; Maiwald et al. 1994).

In stark mikrobiell belasteten Wäscherkammerwasserproben konnten in 6 von 9 Fällen Legionellen nur mittels Amöben-Kokultur nachgewiesen werden. Mit der üblichen Nachweismethode gelang dies in keinem Fall. Die Nährböden waren bei dem direkten Nachweis jeweils von der Begleitflora überwuchert. Uerlings et al. (1986) konnten in 4 von 258 Wäscherkammern Legionellen mit $1 \times 10^2 - 6 \times 10^3$ KBE / 100 ml nach Filtration und Säurebehandlung kulturell nachweisen. Dabei betrug die Gesamtkeimbelastung jedoch maximal 10^3 KBE / ml. Bauer et al. (1990) zeigten ebenfalls die Schwierigkeit des kulturellen Legionellennachweises bei hoher Begleitfloradichte. So gelang ihnen die Anzucht in 13 von 14 Fällen bei einer Begleitflora von $10^1 - 10^2$ KBE / ml und nur einmal bei $1,5 \times 10^3$ KBE / ml. Bei höherer Belastung mit Begleitkeimen, maximal $4,2 \times 10^4$ KBE / ml, gelang der Nachweis von Legionellen lediglich mittels Gene-Probe- Assay.

Die von uns untersuchten Klimaanlagen wurden im Umlaufsprühverfahren betrieben und wiesen mit $10^5 - 10^7$ KBE / ml eine sehr hohe Keimbelastung auf. Die Begleitfloradichte, bei der sicher und regelmäßig Legionellen nachgewiesen werden konnten, ist damit um bis zu 5 Zehnerpotenzen höher als bei den Studien von Bauer et al. (1990) und Uerlings et al. (1986). Somit ist unsere Methode der Kokultur dem herkömmlichen kulturellen Nachweis gerade bei mikrobiell stark belasteten Proben deutlich überlegen.

Zusammenfassend unterscheidet sich unsere Untersuchung von den bisherigen Zell-Kokulturm Versuchen zum einen durch die deutlich geringere Menge der eingesetzten Amöben, was einen deutlich geringeren Aufwand bei der Amöbenanzucht bedeutet. Damit ist die von uns angewandte Methode deutlich praxistauglicher.

Zudem wurden von uns weniger Legionellen pro ml Probe eingesetzt, was zeigt, dass die häufig in Proben vorkommenden niedrigen Legionellkonzentrationen suffizient nachgewiesen werden können.

Zum anderen wurden von uns deutlich größere Probenvolumina untersucht.

Des Weiteren wurde die Untersuchung der Amöben-Proben-Kokultur durch den Verzicht auf die

Zentrifugation der Ansätze und die mechanische Lyse der Amöben vereinfacht.

Auch wurde nicht nur wenig kontaminiertes Trinkwasser, sondern auch Umweltproben mit hoher Begleitfloradichte untersucht, die ebenfalls eine Infektionsquelle darstellen können.

4.7. Ausblick

Aufgrund der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit ist es empfehlenswert, für den kulturellen Legionellennachweis in Umweltwasserproben stets eine Proben-Amöben-Kokultur durchzuführen. Die besten Ergebnisse lassen sich dabei mit 50.000 Amöben pro ml Gesamtansatz und Pufferung mit PAS erreichen. Die Bebrütung sollte bei 35 ° C, 5 % CO₂ und einer relativen Luftfeuchtigkeit von > 90 % erfolgen, gefolgt von einer fünfminütigen Behandlung mit einem 0,2 molaren HCl/KCl-Puffer pH 2,2 im Verhältnis 1:4. Nach parallelem 3-Ösen-Ausstrich von Säurebehandelten und nicht Säurebehandelten Ansätzen auf BCYE und MWY Agar und erneuter Inkubation unter den oben genannten Bedingungen empfehlen wir die Auswertung nach 3, 7 und 14 Tagen.

5. Zusammenfassung

Ziel dieser Untersuchung war die Entwicklung einer Methode, die den kulturellen Nachweis der Legionellen in großen Probenvolumina und Wasserproben mit hoher Begleitfloradichte erlaubt. Es gelang nach dreitägiger Kokultur mit *Acanthamoeba polyphaga* in einer Konzentration von 50.000 / ml in allen Proben mit 100 ml Duschwasser 10^1 und 10^2 KBE Legionellen pro 100 ml nachzuweisen, was den Ergebnissen nach direkter Kultur ohne Amöben-Kokultur gleichwertig ist und den Empfehlungen zur Überwachung von Trinkwasseranlagen entspricht.

Ein quantitativer Nachweis mittels der MPN-Methode war wegen stark schwankender Ergebnisse nur sehr eingeschränkt möglich.

In mikrobiell stark verunreinigtem Oberflächenwasser und Klimaanlagenwasser, dem legionellenhaltiges Duschwasser zugesetzt wurde, konnten in 39 von 40 Proben Legionellen nach Amöben-Kokultur auf festen Nährböden nachgewiesen werden.

In 24 von 45 Oberflächenwasserproben ohne Legionellenzusatz wurden nach Amöben-Kokultur Legionellen nachgewiesen. In nur 5 Proben gelang dies auch mit dem herkömmlichen kulturellen Nachweis nach Filtration. In stark mit Begleitflora belasteten Wäscherkammerwasserproben konnten in 6 von 9 Fällen mittels Amöben-Kokultur Legionellen gefunden werden, während dies mit der üblichen kulturellen Nachweismethode nicht einmal gelang, da die Nährböden von der Begleitflora überwuchert wurden. Das beweist eine signifikante Überlegenheit der Amöben-Kokultur-Methode gegenüber dem herkömmlichen kulturellen Nachweis bei mikrobiell stark belasteten Proben.

In 94 Dusch- und Warmwasserproben ohne Legionellenzusatz konnten in 4 Proben mit herkömmlicher und Kokultur-Methode Legionellen gefunden werden. In je 3 Proben gelang dies nur mit einer der Kulturmethoden, so dass sie bei wenig mikrobiell verunreinigten Proben als gleichwertig angesehen werden müssen. Die Zugabe von Amöben führte immer zu einer schnelleren und stärkeren Vermehrung der Legionellen im Vergleich zur direkten Kultur.

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Nachweis mittels Amöben-Kokultur auch in warmen, kalten und sauerstoffarmen Proben gelingt. Zudem stellte sich heraus, dass sich auch sehr wenige Legionellen in großen Probenvolumina in Amöben-Kokultur vermehren können. Eine Erhöhung der Amöbenanzahl / ml um den Faktor 10 führte zu einer um den Faktor 1000 stärkeren Vermehrung der Begleitflora bei unbeeinflusstem Nachweis der Legionellen. Die Ursache für die starke Begleitkeimvermehrung wurde in den wachstumsfördernden Stoffwechselprodukten der Amöben gefunden.

Damit ist die in dieser Arbeit vorgestellte Legionellen-Amöben-Kokultur eine praxistaugliche und dem herkömmlichen kulturellen Nachweis überlegene Methode, geringe Legionellenkonzentrationen in hohen Probenvolumina in Wasserproben mit hoher Begleitfloradichte nachzuweisen.

Gerade unter diesen erschwerten Bedingungen sollte, wenn der Verdacht auf eine Legionellenbesiedlung besteht oder eine relevante Belastung mit Legionellen ausgeschlossen werden muss, ein kultureller Nachweis mittels Amöben-Kokultur durchgeführt werden.

6. Literatur

Abu Kwaik Y, Gao L-Y, Stone BJ, Venkataraman C, Harb OS (1998) Invasion of Protozoa by Legionella pneumophila and Its Role in Bacterial Ecology and Pathogenesis. *Appl Environ Microbiol* 64: 3127 - 3133

Anand CM, Skinner AR, Mailc A, Kurtz JB (1983) Interaction of *L. pneumophila* and a free living amoeba (*Acanthamoeba palestinensis*) *J Hyg Camb* 91: 167 - 178

Anonymous (2004) DVGW-Arbeitsblatt W 551

Barbaree JM, Fields BS, Feeley JC, Gorman GW, Martin WT (1986) Isolation of Protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intercellular multiplication of Legionelle pneumophila. *Appl Environ Microbiol* 51: 422-424

Barbaree JM, Gorman GW, Martin WT, Fields BS, Morrill WE (1987) Protocol for sampling environmental sites for Legionellae. *Appl Environ Microbiol* 53: 1454 - 1458

Bauer R, Hahn T, Botzenhart K (1990) Der Nachweis von Legionellen im Wasserleitungsnetz mittels Gen-Sonden-Technik und Kulturverfahren. *Zbl Hyg* 190: 78 - 83

Bej AK, Mahbubani MH, Atlas RM (1991) Detection of viable *Legionella pneumophila* in water by polymerase chain reaction and gene probe methods. *Appl Environ Microbiol* 1991: 597 - 600

Bhopal R (1995) Source of infection for sporadic legionaires' disease: a review. *J Infect* 30: 9-12

Bopp CA, Sumner JW, Morris GK, Wells JG (1981) Isolation of *Legionella* spp. from Environmental Water Samples by Low-pH Treatment and Use of a Selective Medium. *J Clin Microbiol* 13: 714 - 719

Bornstein N, Vieilly C, Nowicki M, Paucod JC, Fleurette J (1986) Epidemiological evidence of Legionellosis Transmission through domestic hot water supply systems and possibilities of control. *Isr J Med Sci* 22: 655 - 661

Boulanger CA., Edelstein PH (1995) Precision and Accuracy of Recovery of *Legionella pneumophila* from Seeded Tap Water by Filtration and Centrifugation. *Appl Environ Microbiol* 61: 1805 - 1809

Breiman RF, Fields BS, Sanden GN, Barbaree JM (1990) In Reply to "Air Sampling for Legionella". *JAMA*, November 28, 264, No. 20: S. 2626

CDC (2005) Summary of Notifiable Diseases – United States, 2003 Morb Mortal Wkly Rep 52: 16

Byrne B, Swanson MS (1998) Expression of *Legionella pneumophila* Virulence Traits in Response to Growth Conditions. *Infect Immun* 66: 3029 - 3034

De Jonckheere J, van de Voorde H (1976) Differences in Destruction of Cysts of Pathogenic and Nonpathogenic Naegleria and Acanthamoeba by Chlorine. *Appl Environ Microbiol* 31: 294 - 297

Den Boer JW, Yzerman EPF, Schellekens J, Lettinga KD, Boshuizen HC, Van Steenbergen JE, Bosman A, Van den Hof S, Van Vliet HA, Peeters MF, Van Ketel RJ, Speelman P, Kool JL, Conyn-Van-Spaedendonck MAE (2002) A Large Outbreak of Legionnaires' Disease at a Flower Show, the Netherlands. 1999. *Emerg Infect Dis* 8: 37 - 43

Dennis PJL (1988) Isolation of Legionellae from Environmental Specimens. In: Harrison, TG und Taylor AG (ed): A Laboratory Manual for Legionella, John Wiley and Sons limited: 31 - 43

Dermitzel A, Geuenich H-H, Müller HE (1992) Legionellen und andere Bakterien in Umlaufsprühbefeuchtern und Rückkühlwerken von Klimaanlagen - eine Bestandsaufnahme. *Gesundheitswesen* 54: 716 - 719

Dodson T, Newsome A (1999) Legionella Multiplication in Amoebae Suspended in Surface Water with Exogenous Bacteria. *Scientia: The journal of student research*

Doleans A, Aurell H, Reyrolle M, Lina G, Freney J, Vandenesch F, Etienne J, Jarraud S (2004) Clinical and Environmental Distributions of Legionella Strains in France Are Different. *J Clin Microbiol* 42: 458 - 460

Edelstein PH (1981) Improved Semiselective Medium for Isolation of *Legionella pneumophila* from Contaminated Clinical and Environmental Specimens. *J Clin Microbiol* 14: 298 - 303

England III AC, Fraser DW, Plykaytis BD, Tsai TF, Storch G, Broome CV (1981) Sporadic Legionellosis in the United States: The first Thousand Cases. *Ann Intern Med* 94: 164 - 170

Fang G-D, Fine M, Orloff J, Arisumi D, Yu VL, Kapoor W, Grayston JT, Wang SP, Kohler R, Muder RR, Yee YC, Rihs JD, Vickers RM (1990). *Medicine (Baltimore)* 69, 5: 307 - 316

Feeley JC, Gibson RJ, Gorman GW, Langford NC, Rasheed JK, Mackel DC, Baine WB (1979) Charcoal-Yeast Extract Agar: Primary Isolation Medium for *Legionella pneumophila*. *J Clin Microbiol* 10: 437 - 441

Fields BS (2002) Legionellae and Legionnaires' Disease. In Hurst CJ (ed) Manual of environmental microbiology, ASM Press p 860 - 870

Fliermans CB, Cherry WB, Orrison LH, Smith SJ, Tison DL, Pope DH (1981) Ecological Distribution of *Legionella pneumophila*. *Appl Environ Microbiol* 41: 9 - 16

Frahm E, Obst U (1994) Erfahrungen mit optimierten Methoden zum Nachweis von Legionellen im Trinkwasser. *Zbl Hyg* 196: 170 - 180

Fraser DW, Tsai TR, Orenstein W, Parkin WE, Beecham HJ, Sharrar RG, Harris J, Mallison GF, Martin SM, McDade JE, Shepard CC, Brachman PS and the Field Investigation Team (1977) Legionnaires' Disease - Description of an Epidemic of Pneumonia. *New Engl Journ of Med* 297: 1189 - 1203

Gao L-Y, Susa M, Ticac B, Abu Kwaik Y (1999) Heterogeneity in intracellular replication and cytopathogenicity of *Legionella pneumophila* and *Legionella micdadei* in mammalian and protozoan cells. *Microb Pathog* 27: 273 - 287

Gao LY, Abu Kwaik Y (2000) The mechanism of killing and exiting the protozoan host *Acanthamoeba polyphaga* by *Legionella pneumophila*. *Env Microbiol* 2: 79-90

Götz HM, Tegnell A, De Jong B, Broholm KA, Kuusi M, Kallings I, Ekdahl K (2001) A whirlpool associated outbreak of Pontiac fever at a hotel in Northern Sweden. *Epidemiol Infect* 126: 241 - 247

Harb OS, Venkataraman C, Haack BJ, Gao L-Y, Abu Kwaik Y (1998) Heterogeneity in the Attachment and Uptake Mechanisms of the Legionnaires' Disease Bacterium, *Legionella pneumophila*, by Protozoan Hosts. *Appl Environ Microbiol* 64: 126 - 132

Henke M, Seidel KM (1986) Association between *Legionella pneumophila* and amoebae in water. *Isr J Med Sci* 22: 690-695

Heudorf U., Hentschel W, Hoffmann M, Lück C, Schubert R (2001) Legionellen im hauseigenen Warmwasser - Auswirkungen auf die Gesundheit der Bewohner. *Gesundheitswesen* 62: 326 - 334

Hoffmann R, Michel R (2001) Distribution of free-living amoebae (FLA) during preparation and supply of drinking water. *Int J Hyg Environ Health* 203: 215 - 219

Kilvington S, Price J (1990) Survival of *Legionella pneumophila* within cysts of *Acanthamoeba polyphaga* following chlorine exposure. *J Appl Bacteriol* 68: 519 - 525

Koide M., Arakaki N, Atushi S (2001) Distribution of *Legionella longbeachae* and other legionellae in Japanese potting soils. *J Infect Chemother* 7: 224 - 227

Kusnetsov JM, Jousimies-Somer HR, Nevalainen AI, Martikainen PJ (1994) Isolation of *Legionella* from water samples using various culture methods. *J Appl Bacteriol* 76: 155 - 162

La Scola B, Mezi L, Weiller P J, Raoult D (2001) Isolation of *Legionella anisa* Using an Amoebic Coculture Procedure. *J Clin Microbiol* 39: 365 - 366

Lee JV, West AA(1991) Survival and growth of *Legionella* species in the environment. *J Appl Bacteriol Symposium Supplement* 70: 121 - 129

Lee TC, Vickers RM, Yu VL, Wagener MM (1993) Growth of 28 *Legionella* Species on Selective Culture Media: a comparative study. *J Clin Microbiol* 31: 2764 - 2786

Mahbubani MH, Bej AK, Miller R, Haff L, DiCesare J, Atlas RM (1990) Detection of *Legionella* with polymerase chain reaction and gene probe methods. *Mol Cell Probes* 4: 175 -187

Maiwald M, Kissel K, Srimuang S, Von Knebel Doeberitz M, Sonntag H-G (1994) Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of legionellas in hospital water samples. *J Appl Bacteriol* 76: 216 - 225

Makin T, Hart CA (1989) Detection of *Legionella pneumophila* in environmental water samples using a fluorescein conjugated antibody. *Epidem Inf* 103: 105-112

Marciano-Cabral F, Cabral G (2003) *Acanthamoeba* spp. as Agents of disease in Humans. *Clin Microbiol Rev* 16: 273 - 307

Marrao G, Verissimo A, Bowker RG, da Costa MS (1993) Biofilms as major sources of *Legionelle* spp. in hydrothermal areas and their dispersion into stream water. *FEMS Microbiol Ecol* 12: 25 - 33

Marston BJ, Lipman HB, Breiman RF (1994) Surveillance for Legionnaires' Disease. *Arch Intern Med* 154: 2417 - 2422

McDade JE, Shepard CC, Fraser DW, Tsai TR, Redus MA, Dowdle WR, Laboratory Investigation Team (1977) Legionnaires' disease: Isolation of a Bacterium and Demonstration of its role in other respiratory disease. *New Engl J Med* 297: 1197 - 1203

McNealy T, Newsome AL, Johnson RA, Berk SG (2002) Impact of Amoebae, Bacteria and Tetrahymena on Legionella Pneumophila Multiplication and Distribution in an Aquatic Environment. In: Marre et al. (ed) *Legionella*, ASM Press: 170 - 175

Moffat JF, Tompkins LS (1992) A Quantitative Model of Intracellular Growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect Immun* 60: 296 - 301

Muder RR, Yu VL (2002) Infection Due to *Legionella* Species other than *L. pneumophila*. *Clin Infect Dis* 35: 990 - 998

Mühlenberg W (1988) Vorkommen und Bedeutung von Legionellen in raumluftechnischen Anlagen. *Öffentl Gesundheitswes* 50: 89 - 95

Müller HE (1983) Antibodies against Legionellaceae in the population of West Germany and their methodical determination. *Zbl Bakt Hyg A* 255: 84 - 90

Nagorka R, Roßkamp E, Seidel K (1990) Zur Bewertung von Befeuchteranlagen im Rahmen der Raumklimatisierung. *Öffentl Gesundheitswes* 52: 168 - 173

Neff RJ, Ray SA, Benton WF, Wilborn M (1964) Induction of synchronous Encystment (differentiation) in *Acanthamoeba* spp.. In: Prescott DM (Hrsg) , Academic Press, London, *Methods in Cell Physiology* 1: 55 – 83

Neumeister B, Schöniger S, Faigle M, Eichner M, Dietz K (1997) Multiplication of Different *Legionella* Species in Mono Mac 6 Cells and in *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 63: 1219 - 1224

Nichol KL, Parenti CM, Johnson JE (1991) High prevalence of positive antibodies to *Legionella pneumophila* among outpatients. *Chest* 100: 663 - 666

O'Mahony MC, Stanwell-Smith RE, Tillett HE, Harper D, Hutchinson JGP, Farrell ID, Hutchinson DN, Lee JV, Dennis PJ, Duggal HV, Scully JA, Denne C (1990) The Stafford outbreak of Legionnaires' disease. *Epidemiol Infect* 104: 361 - 380

Ohno A, Kato N, Yamada K, Yamaguchi K (2003) Factors influencing survival of *Legionella pneumophila* Serotype 1 in Hot Spring Water and Tap Water. *Appl Environ Microbiol* 69: 2540 - 2547

Palmer CJ, Tsai Y-L, Paszko-Kolva C, Mayer C, Sangermano LR (1993) Detection of Legionella species in Sewage and Ocean water by Polymerase Chain Reaction, Direct Fluorescent-Antibody and Plate Culture Methods. *Appl Environ Microbiol* 59: 3618 - 3624

Pasculle AW, Veto GE, Krystofiak S, McKelvey K, Vrsalovic K (1989) Laboratory and clinical Evaluation of a commercial DNA Probe for the detection of Legionella spp. *J Clin Microbiol* 27: 2350 - 2358

Pastoris MC, Lo Monaco R, Goldoni P, Mentore B, Balestra G, Ciceroni L, Visca P (1999) Legionnaires' Disease on a Cruise Ship Linked to the Water Supply System: Clinical and Public Health Implications. *Clin Infect Dis* 28: 33 - 38

Paszko-Kolva C, Shahamat M, Colwell RR (1992) Long-term survival of Legionella pneumophila serogroup 1 under low-nutritient conditions and associated morphological changes. *FEMS Microbiol Ecol* 102: 45 - 55

RKI (1999) Legionellose. *Epid Bull*, Berlin 49: 730.

RKI (2005) Infektionsepidemiologisches Jahrbuch für 2004: 111.

Rogers J, Dowset AB, Dennis PJ, Lee JV, Keevil CW (1994) Influence of Temperature and Plumbing Material Selection on Biofilm Formation and Growth of Legionella pneumophila in a Model Potable Water System Containing Complex Microbial Flora. *Appl Environ Microbiol* 60: 1585 - 1592

Rowbotham TJ (1983) Isolation of Legionella pneumophila from clinical specimens via amoebae, and the interaction of those and other isolates with amoebae. *J Clin Path* 36: 978 - 986

Rowbotham TJ (1998) Isolation of Legionella pneumophila Serogroup 1 from Human Feces with Use of Amebic Cocultures. *Clin Infect Dis* 26: 502-503

Sanden GN, Morrill WE, Fields BS, Breiman RF, Barbaree JM (1992) Incubation of Water Samples Containing Amoebae Improves Detection of Legionellae by Culture Method. *Appl Environ Microbiol* 58: 2001 - 2004

Schöninger S (1997) Untersuchung zur intrazellulären Vermehrungsfähigkeit verschiedener Legionellenspezies und -subtypen in Mono Mac 6-Zellen und Acanthamoeba castellanii. Med. Dissertation, Universität Ulm

Shahamat M, Paszko-Kolva C, Keiser J, Colwell RR (1991) Sequential Culturing Method Improves Recovery of Legionella spp. from Contaminated Samples. *Zbl Bakt* 275: 312 -319

Snyder MB, Siwicki M, Wireman J, Pohlod D, Grimes M, Bowman-Riney S, Saravolatz LD (1990) Reduction in *Legionella pneumophila* through Heat Flushing followed by continuous Chlorination of Hospital Hot Water. *J Infect Dis* 162: 127 - 132

States SJ, Conley LF, Kuchta JM, Oleck BM, Lipovich MJ, Wolford RS, Wadowsky RM, McNamara AM, Sykora JL, KeletiG, Yee RB (1987) Survival and multiplication of *Legionella pneumophila* in municipal Drinking Water Systems. *Appl Environ Microbiol* 53 : 979 - 986

Steinert M, Emödy L, Amann R, Hacker J (1997) Resuscitation of Viable but Nonculturable *Legionella pneumophila* Philadelphia JR32 by *Acanthamoeba castellanii*. *Appl Environ Microbiol* 63: 2047 - 2053

Srikanth S, Berk SG (1993) Stimulatory Effect of Cooling Tower Biocides on Amoebae. *Appl Environ Microbiol* 59: 3245 - 3249

Szewzyk R, Allestam G, Stenström T-A (1991) Improved Recovery of *Legionella* from Water Samples by Use of Black Membrane Filters. *Zbl Hyg* 192: 258 - 263

Ta AC, Stout JE, Yu VL, Wagener MM (1995) Comparison of Culture Methods for Monitoring *Legionella* Species in Hospital Potable Water Systems and Recommendations for Standardization of Such Methods. *J Clin Microbiol* 33: 2118 - 2123 1995

Tiefenbrunner FH, Starlinger R, Hinterberger G, Spoden G (2001) Proliferation of *Legionella pneumophila* in Stagnant Potable Water Systems at Medium and Low Temperatures. Kongreßabstract, Medizinische Fakultät der Universität Innsbruck, Österreich

Thomas DL, Mundy LM, Tucker PC (1993) Hot Tub Legionellosis: Legionnaires' Disease and Pontiac Fever after a Point-Source Exposure of *Legionella pneumophila*. *Arch Intern Med* 153: 2597 - 2599

Tobin JO'H, Swann RA, Bartlett CLR (1981) Isolation of *Legionella pneumophila* from water systems : methods and preliminary results. *BMJ* 282: 515 - 517

Turner NA, Russel AD, Furr JR, Lloyd D (2000) Emergence of resistance to biocides during differentiation of *Acanthamoeba castellanii*. *J Antimicrob Chemother* 46: 27 - 34

Uerlings A, Lütticken R, Höffler U (1986) Vorkommen von Legionellen in Wässern von Klimaanlagen und Naßzellen im Bereich Nordrhein. *Öffentl Gesundheitswes* 48: 325 - 328

Vandenesch F, Surgot M, Bornstein N, Paucod JC, Marmet D, Isoard P, Fleurette J (1990) Relationship Between Free Amoebae and Legionella: Studies in vitro and in vivo. *Zbl Bakt* 272: 265 - 275

Verissimo A, Marrao G, da Silva FG, da Costa MS (1991) Distribution of Legionella spp. in Hydrothermal Areas in continental Portugal and the Island of Sao Miguel, Azores. *Appl Environ Microbiol* 57: 2921 - 2927

Vickers RM, Stout JE, Yu VL (1990) Failure of a Diagnostic Monoclonal Immunofluorescent Reagent to detect Legionella pneumophila in environmental samples. *Appl Environ Microbiol* 56: 2912 - 2914

Wadowsky RM, Yee RB, Mezmar L, Wing EJ, Dowling JN (1982) Hot Water Systems as Sources of Legionella pneumophila in Hospital and Nonhospital Plumbing Fixtures. *Appl Environ Microbiol* 43: 1104 - 1110

Wadowsky RM, Wolford R, McNamara M, Yee R (1985) Effect of Temperature, pH, and Oxygen Level on the Multiplication of Naturally Occurring Legionella pneumophila in Potable Water. *Appl Environ Microbiol* 49: 1197 - 1205

Wadowsky RM, Butler LJ, Cook MK, Verma SM, Paul MA, Fields BS, Keleti G, Sykora JL, Yee RB (1988) Growth-Supporting Activity for Legionella pneumophila in Tap Water Cultures and Implication of Hartmannellid Amoebae as Growth Factors. *Appl Environ Microbiol* 54: 2677 - 2682

Walker JT, Bradshaw DJ, Bennett AM, Fulford MR, Martin MV, Marsh PD (2000) Microbial Biofilm Formation and Contamination of Dental-Unit Water Systems in General Dental Practice. *Appl Environ Microbiol* 66: 3363 - 3367

Yamamoto H, Hashimoto Y, Ezaki T (1993) Comparison of Detection Methods for Legionella Species in Environmental Water by Colony Isolation, Fluorescent Antibody Staining und Polymerase Chain Reaction. *Microbiol Immunol* 37: 617 - 622

Yu VL (1998) Resolving the Controversy on Environmental Cultures for Legionella: A Modest Proposal. *Infect Control Hosp Epidemiol*, 19: 893 - 897

Yu VL, Plouffe JF, Pastoris MC, Stout JE, Schousboe M, Widmer A, Summersgill J, File T, Heath CM, Paterson DL, Chereshsky A (2002) Distribution of Legionella Species and Serogroups isolated by Culture in Patients with Sporadic Community-Acquired Legionellosis: An International Collaborative Survey. *J Infect Dis* 186: 127 - 128

Zanetti F, Stami S, De Luca G, Fateh-Moghadam P, Bucci Sabattini MA, Checchi L (2000)
Water characteristics associated with the occurrence of Legionella pneumophila in dental units.
Eur J Oral Sci

Zingeser JA, Birkhead GS, Mamolen M, Vogt RL (1990) Air Sampling for Legionella. JAMA 264:
2625 - 2626

7. Anhang

Anhang 1: Verwendete Medien

PYG (Proteose Yeast Extract Glucose nach Rowbotham)

Proteose peptone	15,0 g
D-Glucose	10,0 g
Yeast extrakt powder	5,0 g
FeSO ₄	3 mg
Aqua dest.	980 ml
PAS-Stammlösung A	10 ml
PAS-Stammlösung B	10 ml

Die Lösung wurde mittels molarer KOH auf einen pH-Wert von 7,3 eingestellt und 15 min bei 115° durch Autoklavieren sterilisiert. Nach Autoklavieren betrug der pH-Wert 6,9 anstatt wie in der originalen PYG-Bouillon pH 6,6. In Vorversuchen zeigte sich innerhalb dieses pH-Bereiches keine signifikante Wachstumsveränderung der Amöben.

PAS (Page's modified Neff's amoeba saline)

<u>Stammlösung A:</u>	NaCl	1,20 g
	MgSO ₄ x 7 H ₂ O	0,04 g
	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	1,42 g
	KH ₂ PO ₄	1,36 g
	Aqua dest ad	100 ml
<u>Stammlösung B:</u>	CaCl ₂ x 2 H ₂ O	0,04 g
	Aqua dest	100 ml

Je 10 ml von Stammlösung A und Stammlösung B werden mit Aqua dest auf einen Liter aufgefüllt. Der mittels molarer KOH auf 7,3 eingestellte pH-Wert betrug nach Autoklavieren der PAS 6,9.

HCl-KCl-Puffer:

HCl-Lösung 0,2 M	3,9 ml
KCl-Lösung 0,2 M	2,5 ml

Schafsbloodagar

Blood-Base-Agar	40 g
(Oxoid CM 271)	
Schafsblood	50 ml
(Oxoid 1055)	
Aqua dest. ad	1000 ml

Chemikalien und andere Materialien

D-Glucose-Monohydrate, D.A.B., Fa. Merck
Eisensulfat Heptahydrat, 99+ %, Fa. Sigma
Kaliumhydrogenphosphat, p.a., Fa. Fluka
Kaliumhydrochlorid, p.a., Fa. Merck
Puffertabletten pH 7,2 nach Weise, Fa. Merck
Trypanblau, Fa. Serva
Natriumhydrochlorid, p.a., Fa. Fluka
Dinatriumhydrogenphosphat Dihydrat, p.a., Fa. Fluka
Gramfärbeset, Fa. Difco
Yeast Extract L 21, Fa. Oxoid
Proteose Peptone L 85, Fa. Oxoid
Glycin, >99%, Fa. Fluka
Gentamycinsulfat, Zelkultur getestet, Fa. Sigma
Vancomycin Hydrochlorid, Fa. Sigma
Polymyxin B Sulfat, Fa. Sigma

Anhang 2: Probenentnahmorte:

Warm- Dusch- Whirlpool, Tankwasser

2 Kreuzfahrtschiffe: Warm- Dusch- Whirlpool, Tankwasser

Duschwasser aus einem Hamburger Bürogebäude, der Universität Hamburg, Campus Stellingen

Wäscherkammerwasser aus Klimaanlagen:

9 Wäscherkammerproben aus 2 Hamburger Bürogebäuden

Oberflächenwasser:

Elbe: Elbe Museumshafen

Alster: Binnenalster Lombardsbrücke

KFU: Kaiser-Friedrich-Ufer Bootsanleger des Kaiser Friedrich Gymnasiums

Mühlenteich: Elbe Mühlenteich

PB: Planten und Bloomen: Teich

Teich: Regenwasserteich Campus Stellingen

Anhang 3: Mikrobiologische und physikalische Parameter der Oberflächenwasserproben

Ort	Nummer	KBE / ml 22°C	KBE / ml 36°C	E. Coli 100 ml	Coliforme 100 ml	Wasser-temperatur	Leitfähig- keit µs/cm	pH Wert	Sauer-stoff- gehalt (mg/l)	Sauer- stoff- sättigung (%)
Alster	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	6,4	434,4	7,88	10,9	91,5
Alster	2	262	115	n.d.	n.d.	12,4	526,1	7,9	9,8	94,8
Alster	3	918	559	430	460	21,9	343,6	7,4	4,6	53,6
Alster	4	n.d.	n.d.	92	92	22,6	440	8,19	8,8	103,8
Alster	5	49	62	92	230	10,6	492,7	7,9	9,6	89,3
Alster	7	886	177	230	230	11,8	483,1	8,17	11	104,6
Alster	8	3055	2895	150	150	15,1	513,4	8,74	10,2	104,6
Elbe	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	9,2	715	8,34	11,4	102,2
Elbe	2	435	210	10	80	12,8	750,8	8,05	9,1	89,2
Elbe	3	6800	6300	430	2400	19,7	865,1	7,67	4,1	45,7
Elbe	4	2291	1295	93	24000	22,5	434,7	7,12	3,9	46,6
Elbe	5	1386	700	240	460	10,8	876,5	8,57	11,1	103,9
Elbe	6	n.d.	n.d.	36	92	21,5	1131,8	7,31	2,4	27,5
Elbe	7	121	159	92	2400	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Elbe	8	359	250	930	2400	8,3	1154	7,69	8,8	77,3
Elbe	9	882	473	4600	4600	7,1	1175,7	7,76	9,7	83
Elbe	10	1510	836	930	4600	2,5	1027,5	7,82	12,7	96
Elbe	11	1777	1195	930	11000	2,7	1030,9	7,88	12,6	95,5
Elbe	12	1727	682	430	11000	2,6	795,3	7,81	13	98,2
Elbe	13	686	145	430	2400	10,9	771,9	8,24	10,7	100
Elbe	14	1191	418	2400	2400	15,5	776,8	7,91	6,5	67,6
Elbe	15	627	79	36	230	15,3	832,8	8,18	8,4	86,4
Elbe	16	1168	1250	230	4600	19,7	850,2	7,5	3,5	39,7
Elbe	17	1425	1400	36	930	17,9	770,9	7,45	5,2	56,7
Elbe	18	1035 0	8150	36	11000	21,3	905,4	7,31	2,3	26,3
Elbe	19	1690 0	1530 0	36	> 11000	22,6	966,9	7,38	3,1	36,9
Elbe	20	1123	1555	930	11000	19	1047,1	7,37	3	33,7
Elbe	21	1059	1055	150	2400	14,7	1012,7	7,43	4,8	48,9
Elbe	22	1168	427	230	930	4,9	778,5	7,79	11,9	96,1
Elbe	23	2250	641	92	750	2	704,9	7,86	13,5	100,6
Elbe	24	3373	564	230	230	1,7	798,7	7,92	13,7	101

Elbe	25	3950	675	430	2400	2,1	673,1	7,82	13,3	99,6
Elbe	26	2314	450	36	430	1,4	747	7,99	14	102,5
Elbe	27	4350	4450	36	4600	22,8	1034,6	7,44	3,6	43,2
Elbe	28	2123	1673	750	11000	20,2	763,7	7,73	4,5	51,5
Elbe	29	345	118	750	1500	5,2	1027,4	7,94	12	101
Elbe	30	1163	455	750	1500	0,6	967,6	8,06	13,5	96,7
KFU	1	520	220	2400	2400	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KFU	2	n.d.	n.d.	40	150	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KFU	3	832	636	4600	11000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
KFU	4	7050	1582	930	11000	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Mühlenberg	1	832	180	230	750	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
PB	1	2563	2263	44	1100	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Teich	1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Teich	2	930	260	43	240	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Anhang 4: Einfluss der Menge der zugegebenen Amöben auf die Vermehrung von Duschwasser-Legionellen in Proben- Amöben- Kokultur

Amöben / ml und Legionellenkon- zentration	Puffer- konzentrat- ion bezogen auf das Endvolum- en des Ansatzes	Anzahl Proben, die 3 d kokultiviert wurden / davon Proben mit Legionellen- vermehrung	Anzahl Proben, die 7 d kokultiviert wurden / davon Proben mit Legionellen- vermehrung	Legionellen Ausgangs- konzentration in KBE / ml	Legionellen Konzentration nach 3 Tagen Kokultur in KBE / ml	Vermeh- rungsrate	Legionellen Konzentration nach 7 Tagen Kokultur in KBE / ml	Vermehrungsrate	MOI
50.000 Amöben / ml									
< 0,5 Lp / ml	1-fach	6/4	4/3	0,22	3,31E+02	10,58	23889,00	16,75	4,3 x 10 ⁻⁶
< 5 Lp / ml	1-fach	7/7	5/5	1,82	3,54E+04	14,25	444350,00	17,90	3,64 x 10 ⁻⁵
< 15 Lp / ml	1-fach	4/4	4/4	10,75	1,28E+05	13,54	386937,50	15,14	21,5 x 10 ⁻⁵
< 5 Lp / ml	0,5-fach	4/4	4/4	1,85	2,88E+04	13,93	180812,50	16,58	3,7 x 10 ⁻⁵
> 5 Lp / ml	0,5-fach	6/6	4/4	19,67	1,76E+04	9,81	101625,00	12,34	39,3 x 10 ⁻⁵
5000 Amöben / ml									
< 0,5 Lp / ml	1-fach	6/4	4/2	0,22	8,19E+01	8,56	715,25	11,69	4,33 x 10 ⁻⁵
< 5 Lp / ml	1-fach	2/2	n.d.	3,75	0,00E+00	5,42	n.b.	n.b.	7,5 x 10 ⁻⁴
< 5 Lp / ml	0,5-fach	2/0	2/1	2,50	4,00E+00	0,68	3394,00	10,41	5 x 10 ⁻⁴
> 5 Lp / ml	0,5-fach	2/0	n.d.	37,50	1,70E+01	-1,14	n.b.	n.b.	75 x 10 ⁻⁴
0 Amöben / ml									
< 0,5 Lp / ml	1-fach	3/0	2/1	0,22	0,00E+00	n.b.	0,50	1,21	n.b.
< 5 Lp / ml	1-fach	3/0	2/2	1,97	2,67E+00	0,44	941,00	8,90	n.b.
< 15 Lp / ml	1-fach	2/0	2/2	10,75	1,15E+01	0,10	470,75	5,45	n.b.
> 1 Lp / ml	0,5-fach	4/0	3/3	4,31	4,72E+00	0,13	470,75	6,77	n.b.

Anhang 5: Vermehrung von Legionellen in Duschwasser mit Amöben-Kokultur

Puffermenge	Amöben x 1000 / ml	Anzahl der Versuche	Legionellen Ausgangskonzentration (KBE / ml)	Legionellen Konzentration nach 3 d Kokultur (KBE / ml)	Vermehrungsrate	Verdopplungszeit	MOI	Minimaler Legionellengehalt nach 3 d Amöben-Kokultur (KBE / ml)	Maximaler Legionellengehalt nach 3 d Amöben-Kokultur (KBE / ml)
<i>3 d</i>									
1-fach	50	17	3,36	44805,76	13,70	315,22	$7,5 \times 10^{-5}$	n.n.	238000
0,5-fach	50	10	12,54	22111,40	10,78	400,59	$12,6 \times 10^{-5}$	409	81450
1-fach	5	8	1,10	101,44	6,53	661,87	$2,75 \times 10^{-5}$	n.n.	259
0,5-fach	5	4	20,00	10,50	n.b.	n.b.	5×10^{-4}	4	22
1-fach	0	9	3,51	3,88	0,14	29944,39	n.b.	n.n.	14
0,5-fach	0	4	15,38	14,50	n.b.	n.b.	n.b.	6	34
<i>1 Woche</i>									
1-fach	50	13	3,75	297312,00	16,27	619,42	$7,5 \times 10^{-5}$	n.n.	690000
0,5-fach	50	8	6,30	141218,75	14,45	697,47	$12,6 \times 10^{-5}$	20,5	370000
1-fach	5	4	0,14	715,25	12,34	816,54	$2,75 \times 10^{-5}$	n.n.	240000
0,5-fach	5	2	2,50	3394,00	10,41	968,59	5×10^{-4}	8	6780
1-fach	0	6	3,99	5673,83	10,47	962,33	n.b.	n.n.	19360
0,5-fach	0	3	8,00	11486,67	10,49	961,13	n.b.	10	24000

Anhang 6: MPN

Amöben / ml (Mittelwert aus x Proben)	Puffer	Legio- nellen- KBE / 1 ml	MPN 3 d	MPN 7 d	MPN 14 d	WFR 3 d %	WFR 7 d %	WFR 14 d %
50.000	PAS	15,67	7,5	9,3	9,3	47,86	59,35	59,35
50.000	PAS	20,67	4,3	9,3	9,3	20,8	44,99	44,99
50.000	PAS	74,66	46	46	46	61,61	61,61	61,61
50.000	PAS	74,66	24	24	24	32,15	32,15	32,15
50.000 (MW aus 4)	PAS	46,42	20,45	22,15	22,15	40,61	49,53	49,53
500.000	PAS	20,67	2,3	4,3	4,3	11,13	20,80	20,80
500.000	PAS	74,66	2,3	46	46	3,08	61,61	61,61
500.000	PAS	74,66	2,3	46	110	3,08	61,61	147,33
500.000 (MW aus 3)	PAS	56,66	2,30	32,10	53,43	5,78	48,01	76,58
50.000	K-PAS ¹	74,66	9,3	46	46	12,46	61,61	61,61
50.000	K-PAS	56	4,3	4,3	4,3	7,68	7,68	7,68
50.000	K-PAS	56	15	15	15	26,79	26,79	26,79
50.000 (MW aus 3)	K-PAS	62,22	9,53	21,77	21,77	15,64	32,03	32,03
50.000	PAS-Z ²	15,67	2,3	2,3	2,3	14,68	14,68	14,68
50.000	PAS-Z	15,67	2,3	2,3	2,3	14,68	14,68	14,68
50.000 (MW aus 2)	PAS- Zent	15,67	2,3	2,3	2,3	14,68	14,68	14,68

¹ PAS mit Kalium, ² PAS und Zentrifugation.

Anhang 7: Nachweis von Legionellen in mit legionellenhaltigem Duschwasser versetztem warmen Trinkwasser, Whirlpoolwasser und Wasser aus Wäscherkammern von Klimaanlagen in Amöben-Kokultur.

Wasserprobe	Ursprung, ml Probenmenge / Ansatz	Probenanzahl	Nachweis von Legionellen ohne Duschwasser	Nachweis von Legionellen mit Duschwasser und L.p.1	Legionellen aus Duschwasser KBE / ml Ansatz	Legionellen aus Duschwasser- zusatz KBE / Ansatz	Agartyp + Säurebehandlung (mit Säure = +S)
Duschwasser	Schiff, 1 ml	8	0/8	7/8, 1 Probe mit P.aeruginosa überwuchert, 7 (++)	1,8	9	BCYE
Duschwasser	Schiff, 1 ml	21	1/21, Legionella species 2 KBE	21/21 19 (+++), 2(++)	3,0	15	MWY, MWY + S
Trinkwassertank	Schiff, 1 ml	2	0/2	2/2 (++)	1,8	9	BCYW
Whirlpoolwasser	Schiff, 1 ml	1	0/1	1 (+++)	3,0	15	MWY, MYW + S
Wäscherkammer- wasser	Klimaanlage, Bürogebäude, 1 ml	3	0/3	3/3 (+++)	0,9	9	MWY

Anhang 8: Nachweis von Legionellen in mit legionellenhaltigem Duschwasser versetztem Oberflächenwasser

Probe	Menge	Duschwas- ser im Ansatz	Lp 1 / ml Ansatz	BCYE	BCYES	MWY	MWYS
Teich + Duschwas- ser	50 ml	157	1,57	++	++	++	++
Teich + AP	50 ml	0	0	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Teich Direkt	50 ml						
Alster + Duschwas- ser	100 ml	560	5,6	-	++	+++ (nur 3. Ausstrich)	+++
Alster + AP	100 ml	0	0	-	-	-	+ Lp1
Alster Direkt	100 ml	0	0	n.d.	n.d.	1 KBE Lp1 in 1 ml	n.n.
Elbe + Duschwas- ser	100 ml	160	1,6	-	+++	+++	+++
Elbe + AP	100 ml	0	0	-	-	-	+ L spp und Lp 1
Elbe Direkt	100 ml	0	0	-	n.d.	-	3 KBE Lp1
Elbe + Duschwas- ser	10 ml	16	1,6	+++	+++	+++	+++
Elbe + AP	10 ml	0	0	-	-	-	-
Elbe Direkt	10 ml n.d.						
Elbe 8 + Duschwas- ser 6 x	10 ml	105	10,5	n.d.	6 x ++	n.d.	6 x ++
Elbe 8 + AP	10 ml	0	0	n.d.	-	n.d.	-
Elbe 15 Grünalgen, Duschwas- ser	100 ml	3350	33,5	n.d.	n.d.	n.d.	+++
Elbe 15 Grünalgen + AP	100 ml	0	0	n.d.	n.d.	n.d.	-

Anhang 9: Wachstum der heterotrophen Begleitflora nach primärer Anzucht auf festen Nährmedien

Probe	1 ml BCYE		1 ml MWY		100 ml BCYE nach 5 min Säurebehandlung	100 ml MWY nach 5 min Säurebehandlung
	¹⁾ - S	²⁾ + S	-S	+S		
Elbe 1	Rasen	15	9	1	Rasen	100
Elbe 2	Rasen	6	2	0	Rasen	100
Elbe 3	Rasen	Rasen	>1500	0	Rasen	250
Elbe 4	95	28	93	3	Rasen	>1500
Elbe 5	Rasen	Rasen	31	4	Rasen	80
Alster 1			8			
Alster 2	Rasen	15	15	0	Rasen	50
Alster 3	250	25	100	5	Rasen	500
Teich 1	> 500		24			
Teich 2	300	4	200	1	Rasen	300
Kaiser-Friedrich Ufer	Rasen	5	38	1	Rasen	200
Planten und Bloomen	500	5	38	1	Rasen	500

¹⁾-S: ohne vorherige Säurebehandlung ²⁾+S: mit vorheriger Säurebehandlung

Anhang 10: Kultureller Nachweis von Legionellen mit Proben- Amöben-Kokultur im Vergleich zur direkten Kultur auf Nährböden

Probenort	Proben- nummer	Proben- Amöben- Kokultur		Direkter Nachweis	
		Legionellen in Proben- volumen (ml)	Legionellen	Legionellen in Proben- volumen (ml)	Legionellen
Alster	1	100	Lp 1	1	1 KBE Lp 1
Alster	2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Alster	3	10	Lp 1, Lp 2-14	n.n.	n.n.
Alster	4	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Alster	5	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Alster	7	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Alster	8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Elbe	1	100	Lp 1, L spp	n.n.	n.n.
Elbe	2	100	Lp 1, Lp 2-14	100	2 KBE Lp 1, 1 KBE Lp 2-14
Elbe	3	100	Lp 2-14	n.n.	n.n.
Elbe	4	100	Lp 1	n.n.	n.n.
Elbe	5	100	Lp 2-14	n.n.	n.n.
Elbe	6	10	Lp 2-14	n.n.	n.n.
Elbe	7	100	Lp 2-14	n.n.	n.n.
Elbe	8	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Elbe	9	100	Lp 2-14	n.n.	n.n.
Elbe	10	10	Lp1, Lp 2-14, L spp	10	1 KBE 2 - 14
Elbe	11	100	Lp 2-14	n.n.	n.n.
Elbe	12	1	Lp 1, Lp 2-14, L spp	n.n.	n.n.
Elbe	13	100	Lp 2-14	n.n.	n.n.
Elbe	14	100	Lp1, Lp 2-14	n.n.	n.n.
Elbe	15	100	Lp 2-14	n.n.	n.n.
Elbe	16	100	Lp 2-14	n.n.	n.n.
Elbe	17	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Elbe	18	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Elbe	19	10	Lp 2-14	n.n.	n.n.

Elbe	20	10	Lp 1, L spp	n.n.	n.n.
Elbe	21	10	Lp 1, Lp 2-14	n.n.	n.n.
Elbe	22	100	Lp 1, Lp 2-14, L spp	n.n.	n.n.
Elbe	23	10	Lp 1, Lp 2-14	n.n.	n.n.
Elbe	24	100	L spp	n.n.	n.n.
Elbe	25	100	Lp 2-14, L spp	1	1 ml: 1 KBE Lp1, 1 KBE Lp 2-14, 10 ml: 1 KBE Lp 2-14, 100 ml 2 KBE L spp
Elbe	26	1	Lp 1, Lp 2-14	1	1 KBE Lp 2-14
Elbe	27	100	Lp 2-14	n.n.	n.n.
Elbe	28	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Elbe	29	10	Lp 1, Lp 2-14	10	1 KBE Lp 2-14
Probenort	Proben-nummer	Proben-Amöben-Kokultur		Direkter Nachweis	
		Legionellen in Proben-volumen (ml)	Legionellen	Legionellen in Proben-volumen (ml)	Legionellen
Elbe	30	100	Lp 1	n.n.	n.n.
KFU	1	100	Lp1, Lp 2-14	n.n.	n.n.
KFU	2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
KFU	3	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
KFU	4	10	Lp 1, Lp 2-14	n.n.	n.n.
Mühlen-berg	1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
PB	1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Teich	1	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.
Teich	2	n.n.	n.n.	n.n.	n.n.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. E. H. Pfeiffer bin ich für seine freundliche und wohlwollende Unterstützung und großzügige Förderung, ohne die diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre, zu besonderer Dankbarkeit verpflichtet.

Aussergewöhnlicher Dank gebührt Herrn Dr. med. G. Nordholt für seine exzellente Betreuung und seine aussergewöhnliche Einsatzbereitschaft bei der Unterstützung der Durchführung der Versuche, der Durchsicht dieses Schriftwerkes und für die zahllosen wertvollen kreativen Anregungen.

Desweiteren danke ich natürlich meinen Eltern, die mir das Studium erst ermöglichten und mich unterstützten.

Der größte Dank aber geht an meine Frau Nadine, die mich auch bei diesem Projekt liebevoll unterstützt hat ohne zu drängen. Ihr widme ich diese Arbeit.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Mehrländer
Vorname: Kai Florian
Geburtsdatum/-ort: 07.06.1974, Hildesheim
Familienstand verheiratet

Schulbildung:

1984 - 1986: Orientierungsstufe Ost in Hildesheim
1986 - 1994: Scharnhorstgymnasium Hildesheim, Abschluss: Abitur

Zivildienst:

1994 - 1995 Arbeiter Samariter Bund Hildesheim

Hochschulbildung:

1996 - 2003 Studium der Medizin, Universität Hamburg
03/1998: Ärztliche Vorprüfung
08/1999: Erstes Staatsexamen
08/2001: Zweites Staatsexamen
05/2003: Drittes Staatsexamen
05/2003: Approbation als Arzt in Hamburg

Berufl. Werdegang:

2003 – 2005 Tätigkeit als Arzt im Praktikum und Assistenzarzt in der Inneren Medizin des Krankenhaus St. Adolf-Stift Reinbek, Schleswig-Holstein

Seit 2005 Tätigkeit als Assistenzarzt in der Inneren Medizin des Schlei- Klinikum Schleswig MLK

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: