



Kanton Zürich
Gesundheitsdirektion
Kantonales Labor Zürich

Dr. Füchslin Hans Peter
Fehrenstrasse 15, Postfach
8032 Zürich

Abschlussbericht: Relevanz von Legionellen im kommunalen Wasser verteilungsnetz Nr. 4.22.02

Verfasser des Berichtes: Dr. Hans Peter Füchslin
Gesamtlaufzeit: 01.06.2022 bis 31.12.2024

Finanzierung:

- BLV und BFE
- Amt für Hochbauten und Immo Stadt Zürich

Projektteam:
Prof. Hubert Hilbi (Projektleiter), Universität Zürich
Dr. Hans Peter Füchslin KLZH
Dr. Valeria Gaia, Referenzlabor Legionellen, NRZL
Prof. Adrian Egli, Universität Zürich

06.01.2025

Zusammenfassung

In den beiden Wasserversorgungen von Lugano und Zürich wurden während zwei Jahren Messungen durchgeführt, um abzuklären, ob kommunale Wasserversorgungsnetze Habitate und Verbreitungswege für klinisch relevante *Legionella* spp. darstellen.

Legionella spp. konnten in beiden Verteilnetzen mittels PCR in Zürich mit durchschnittlich $7.5 \cdot 10^5$ in einem Bereich von $2.1 \cdot 10^4$ bis maximal $3.3 \cdot 10^6$ und in Lugano mit durchschnittlich $1.6 \cdot 10^7$ in einem Bereich von $5.6 \cdot 10^3$ bis $4.8 \cdot 10^8$ Kopien pro Liter nachgewiesen werden.

In Zürich konnten in den Proben aus dem Verteilungsnetz mit der Standardkultivierungsmethode ISO 11731 keine Legionellen nachgewiesen werden.

Vor allem in Lugano, aber auch in einem Fall in Zürich konnte *L. pneumophila* aus Hydranten mittels PCR nachgewiesen werden. In 21 von 94 Hydrantenproben aus Lugano wurden sowohl *L. pneumophila* als auch *L. pneumophila* Serogruppe (SG) 1 mittels PCR nachgewiesen.

L. pneumophila aus einem Hydranten (Nr. 6514) in Lugano konnte in einem Fall mit dem Amöbenplattentest und in zwei Fällen mit der Standardkulturmethode ISO 11731 nachgewiesen, isoliert und mittels Agglutinationstest als *L. pneumophila* SG 1 und 3 identifiziert werden. Die Gensequenzanalyse der *L. pneumophila* SG 1-Isolate aus dem Hydranten 6514 des Verteilungsnetzes von Lugano ergab eine Übereinstimmung mit klinischen Isolaten aus der Region. Dies ist ein starkes Indiz dafür, dass Legionellen aus dem Verteilungsnetz einen Grossteil der Legionellosefälle verursachen.

Hydranten und deren Zuleitungen scheinen potenzielle Reservoirs für Legionellen zu sein. Die Studie zeigt, dass die derzeitigen mikrobiologischen Kontrollparameter für das kommunale Verteilungsnetz keinen ausreichenden Schutz vor umweltbedingten Krankheitserregern wie Legionellen, aber auch *P. aeruginosa*, Mykobakterien etc. bieten.

Der Amöbenplattentest wurde optimiert und erfolgreich für die Identifikation von amöbenresistenten Legionellen und anderen opportunistisch pathogenen Bakterien aus Umwelt-Wasserproben eingesetzt.

Es sollten weitere Risikobewertungsstudien durchgeführt werden, um abschätzen zu können, ob diesbezüglich Massnahmen ergriffen werden müssen.

Inhaltsverzeichnis

Inhalt

Zusammenfassung	1
Inhaltsverzeichnis	2
1. Einführung Projekt	3
2. Generelle Material und Methoden	5
2.1 Beschreibung der beiden Wasserversorger	5
2.1.1 Wasserversorgung Zürich	5
2.1.2 Wasserversorgung Lugano	6
2.2 Probenahme	6
2.2.1 Verteilnetz	6
2.3 Nachweis	7
2.3.1 PCR-Nachweis	7
2.3.2 Bestimmung der Totallzellzahl	7
2.3.3 Kultivierungsnachweis	7
2.3.4 Bestätigung und Differenzierung von verdächtigen Kolonien	8
3. Messkampagnen	9
3.1 Wasserversorgung Zürich	9
3.1.1 Regelmässige Überwachung Hangzone Sonnenberg 2022	9
3.1.2 Risikobasierte Probenahme im Verteilnetz der Stadt Zürich	17
3.1.3 Biofilm aus Wasserversorgung Zürich	19
3.1.4 Regelmässige Überwachung Aussenbereich Stadt Zürich 2023	20
3.2 Wasserversorgung Lugano	24
3.2.1 Probenahmen vom 21.07.2022	24
3.2.2 Probenahme vom 03.10.2022	27
3.2.3 Probenahme vom 06.12.2022	29
3.2.4 Gesamtdarstellung der Resultate 2022 von Lugano	31
3.2.5 Probenahme 2023 in Lugano	33
3.2.6 Geographische Verteilung: Screening von 94 Hydranten	39
3.2.7 Clustering der Isolate aus dem Verteilnetz	53
3.3 Saisonalität der Legionellosefälle in Lugano	56
3.4 Filterbeprobung Hauseingang	56
3.5 16S Amplikonsequenzierung	60
3.6 Optimierung des Amöben-Platten-Tests für die Isolation von Legionellen und anderen opportunistischen Pathogenen aus Umwelt-Wasserproben	68
4. Generelle Diskussion	69
4.1 Trinkwasser-Verteilnetz als Habitat für Legionellen	69

4.2	Vergleich Lugano und Zürich	71
4.3	Risikoeinschätzung der nachgewiesenen Legionellen und anderer Umweltpathogenen	72
4.4	Mögliche Präventionsmassnahmen für die Verkeimung bei Hydranten	74
4.4.1	Regelmässig spülen	75
4.4.2	Vermeidung von Stagnationszonen durch verschlaufte Leitungsführung	75
4.4.3	Leitung tiefer in Boden verlegen	75
4.4.4	Netzschutz (Chlorung)	76
4.4.5	Reduktion von Nährstoffen	76
4.5	Projektfragen und offene Fragen Legionellen im Verteilnetz	76
4.5.1	Projektfragen	76
4.5.2	Offene Fragen	77
5.	Schlussfolgerungen	79
6.	Verdankungen	80
7.	Referenzen	80
8.	Anhang	82

1. Einführung Projekt

Das Projekt «Relevanz von Legionellen im Verteilnetz» startete am 01.06.2022 für zwei Jahre. Es wurden wie im Forschungsantrag vorgesehen Messungen im Verteilnetz von Lugano und Zürich durchgeführt. Die Zuleitungen zu den Hydranten stagnieren und erwärmen sich in den Sommermonaten (Abbildung 1 und 2). In diesen Bereichen können sich im Sommer *L. pneumophila* vermehren, welche mit PCR, ISO 11731 und dem Amöben-Platten-Test von Prof. Hilbi nachgewiesen werden konnte. Im städtischen Bereich müssen zur Bereitstellung von Löschwasser alle 80 bis 130 m ein Hydrant vorhanden sein. Eine rechnerische Abschätzung ergab, dass die Zuleitung zu den Hydranten ca. 1 % des Gesamtvolumens des Verteilnetzes entspricht.

Legionella spp. konnten in beiden Verteilnetzen mit PCR in Zürich im Durchschnitt von $7.5 \cdot 10^5$ in einem Bereich von $2.1 \cdot 10^4$ bis maximal $3.3 \cdot 10^6$ und in Lugano im Durchschnitt von $1.6 \cdot 10^7$ in einem Bereich von $5.6 \cdot 10^3$ bis $4.8 \cdot 10^8$ Kopien pro Liter gemessen werden.

In Zürich konnten in den Proben aus dem Verteilnetz mit der Standardkultivierungsmethode ISO 11731 keine Legionellen nachgewiesen werden.

Vor allem in Lugano aber auch in einem Fall in Zürich konnten in Hydranten *L. pneumophila* mit PCR nachgewiesen werden. In 21 von 94 Hydrantenproben aus Lugano wurden sowohl *L. pneumophila* wie auch auf *L. pneumophila* SG 1 mit PCR nachgewiesen werden.

In einem Fall konnten mit dem Amöben-Platten-Test und in zwei Fällen mit der Standardkultivierungsmethode ISO 11731 *L. pneumophila* aus dem Hydranten (Nr. 6514) in Lugano nachgewiesen, isoliert und durch Agglutinationstest als *L. pneumophila* SG 1 und 3 bestimmt werden. Die Gen-Sequenzanalyse der *L. pneumophila* SG 1 – Isolate aus dem Hydranten 6514 des Verteilnetzes von Lugano ergab eine Übereinstimmung mit klinischen Isolate aus der Region. Dies ist ein starker Hinweis, für die klinische Relevanz der isolierten Legionellen aus dem Hydranten.

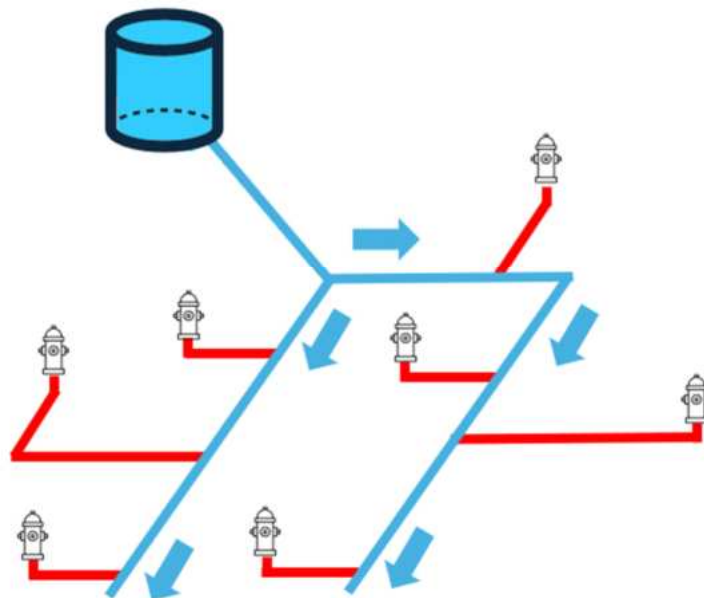


Abbildung 1 Das Verteilnetz kann unterteilt werden in einen Teil der mit frischem, kühlem Wasser, regelmässig durchflossen und ausgetauscht wird wie das Hauptverteilnetz(blau) und einem Teil, der stagniert und im Sommer erwärmt wird wie die Zuleitung zu den Hydranten (rot). Das Volumen der Hydrantenzuleitung entspricht ca. 1 % des Volumens des Gesamtnetzes.

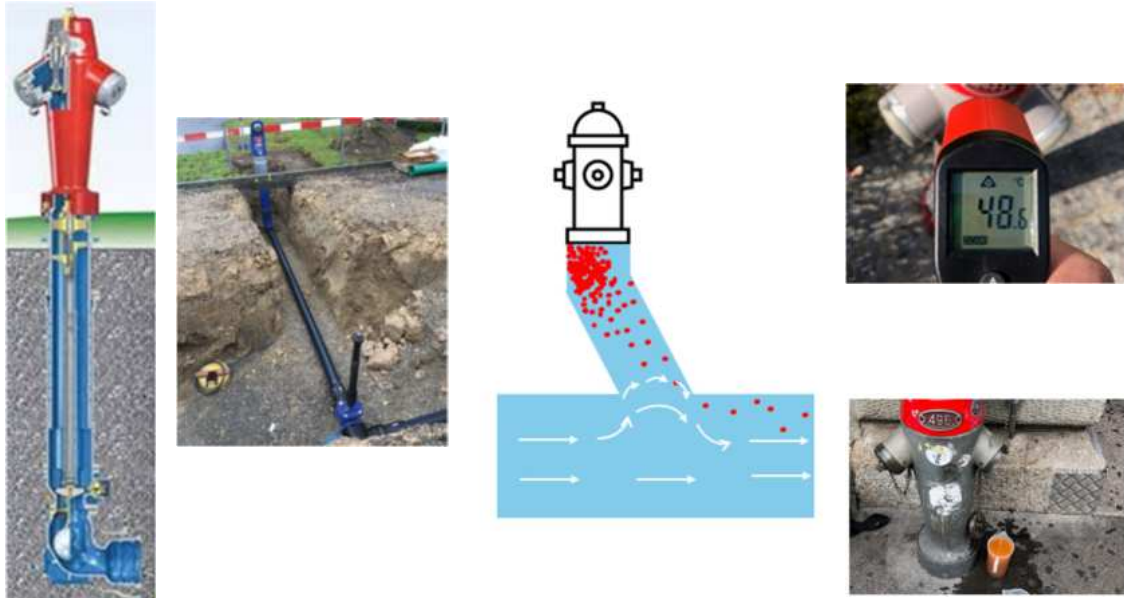


Abbildung 2 Die Hydranten werden ausser Betrieb entleert und sind geschlossen. Sonnenexponierte Hydranten können sich auf 50 bis 65 °C erwärmen. Die Zuleitungen zu den Hydranten bilden eine Stagnationszone, welche sich im Sommer erwärmt und eventuell zur Vermehrung von *L. pneumophila* führen können. Die Zubringerleitung zum Hydranten ist gegenüber der Hauptleitung offen und im Austausch und könnte so stetig Legionellen an das vorbeifliessende Wasser abgeben, welches zu den Duschen in die Haushalte gelangt.

2. Generelle Material und Methoden

2.1 Beschreibung der beiden Wasserversorger

2.1.1 Wasserversorgung Zürich

Neben den beiden Seewasserwerken Lengg und Moos betreibt die Wasserversorgung Zürich das Grundwasserwerk Hardhof. Das Wasser aus den Quellen im Sihl- und Lorzetal wird im Quellwasserwerk Sihlbrugg gesammelt, jenes aus den kleineren Quellen rund um die Stadt fliesst direkt ins Quellwassernetz. Die Zusammensetzung des Zürcher Trinkwassers besteht aus 70% Seewasser, 15% Grundwasser und 15% Quellwasser. Das Seewasser wird in modernsten Aufbereitungsanlagen in den beiden Seewasserwerken Lengg und Moos behandelt. Hier durchläuft das Wasser mehrere Reinigungsstufen, einschliesslich Schnellfiltration, Ozonung, Aktivkohlefiltration und Langsamsandfiltration. Das Grundwasser wird natürlich gefiltert und benötigt oft nur minimale Aufbereitung wie UV-Desinfektion. Quellwasser wird ebenfalls sorgfältig überwacht und nur bei Bedarf aufbereitet [1, 2].

2.1.2 Wasserversorgung Lugano

Die Zusammensetzung des Luganer Trinkwassers besteht aus 39% Seewasser, 30% Grundwasser und 26% Quellwasser und 5% sind zugekauft [1]. Das Seewasser wurde 2023 nach der Ozonung direkt in das Verteilnetz eingespiesen. Es ist geplant die Seewasseraufbereitung mit Langsandsandfiltration in den nächsten Jahren zu ergänzen (persönliche Mitteilung Federica Zanni (Aziende Industriali di Lugano, AIL)).

2.2 Probenahme

2.2.1 Verteilnetz

Die Proben wurden entweder von Laufbrunnen oder von Hydranten entnommen. Vom Laufbrunnen wurden mit 1 Liter-Probenahmegefässe aus Kunststoff mit Natriumthiosulfat Proben entnommen. Beim Hydranten wurden nach 5 Liter Vorlauf eine 1 Liter Proben genommen.

Filterbeprobung

Von Hydranten wurden Filterbeprobungen durchgeführt werden. Dabei wurden speziell angefertigte Filteradapter aus Edelstahl verwendet, welche auf die standardisierten Hydrantenanschlüsse passen (Abbildung 3). An diesen Filteradapter waren Filterhalter angeschlossen. In einem Filterhalter werden zwischen Vorfilter und Stützfilter einen Membranfilter (Porengrösse 0.45 µm, Whatman) eingeschlossen. Durch Membranfiltration können 10 bis 150 Liter Leitungswasser aufkonzentriert werden. Danach verstopfen die Filter.



Abbildung 3 Hydrantenadapter am Hydranten angeschlossen mit Filterhalter für die Membranfiltration von 10 bis 150 Liter.

2.3 Nachweis

2.3.1 PCR-Nachweis

Es wurden verschiedene PCR-Techniken wie digital droplet PCR (ddPCR), quantitative (qPCR) und viability PCR (vPCR) angewendet. Auch wurden verschiedene PCR-Kits von Promega, Diatheva, Hygiena und inhouse KLZH verwendet. Ausserdem beteiligten sich an den PCR-Analysen verschiedene Labore wie Referenzlabor Bellinzona (Diatheva), Universität Zürich (Diatheva, inhouse KLZH und Promega), KLZH (inhouse KLZH und Promega) und IWB (Hygiena). Die angewendete PCR-Technik wird bei der Beschreibung der einzelnen Messkampagnen beschrieben.

2.3.2 Bestimmung der Totalzellzahl

Die Totalzellzahl wurde mit dem Durchflusszytometer Bactosense bestimmt (bNovate Technologies). Die generelle Methode ist in der Methodenbeschreibung SVGW MW102 beschrieben.

Link: <https://www.bnovate.com/bactosense?lang=de>

2.3.3 Kultivierungsnachweis

2.3.3.1 ISO 11731

Proben aus Lugano wurden im Referenzlabor von Bellinzona mit der Standardkultivierungsmethode gemäss ISO 11731 mit dem Filterabwaschverfahren angesetzt und analysiert. Proben aus der Wasserversorgung Zürich wurden im Labor der Wasserversorgung Zürich (Jahr 2022) oder Medizinischen Institut für Mikrobiologie Universität Zürich (Jahr 2023) mit der Standardkultivierungsmethode gemäss ISO 11731 mit dem Filterabwaschverfahren angesetzt und analysiert.

2.3.3.2 Amöbenansatztest von Prof. Hilbi

Acanthamoeba-Amöben werden während zwei Wochen vorkultiviert, bevor eine Suspension von definierter Konzentration auf BCYE-Platten aufgetragen werden. Die vorbereiteten Platten werden innerhalb von 24 Stunden angesetzt.

Proben werden durch Membranfiltration angereichert. Das Resuspensat von 10 ml wird mit zentrifugiert und der Überstand von 9 mL verworfen. Die verbliebenen 1 mL werden direkt auf die BCYE-Platte mit Amöbensuspension plattiert (Abbildung 4). Die Platten werden anschliessend bei 30°C in einer Box mit Wasserschale für 15 Tage inkubiert. Nach 3 Tagen werden die Platten das erste Mal auf verdächtige Kolonien überprüft. Weitere Informationen sind in der Publication von Moreno et. al. (2024) zu finden [3].

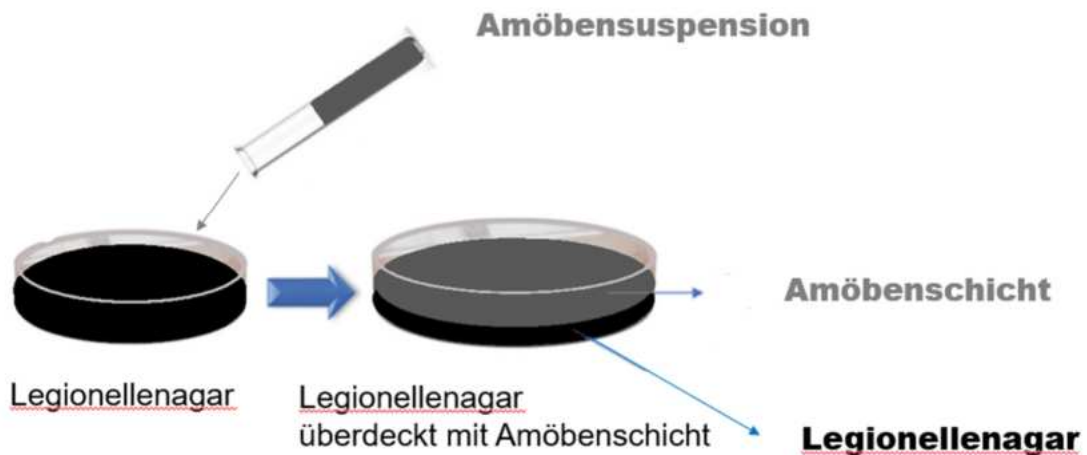


Abbildung 4 Herstellung von Platten mit Amöbensuspension für den Amöbenansatztest.

2.3.4 Bestätigung und Differenzierung von verdächtigen Kolonien

2.3.4.1 Pick and Boil-Methode mit PCR-Analyse

Verdächtige Kolonien für *Legionella* spp. wurden entnommen und in 100-µl DNA-freiem reinem Wasser resuspendiert. Für die DNA-Extraktion wurden die Röhren, die die Proben enthielten, 15 Minuten lang bei 95°C hitzebehandelt. Für die qualitative Analyse wurde eine Real-Time-PCR gemäss Standardprotokoll durchgeführt [4]. Diese selbst entwickelte PCR-Methode liefert keine Informationen über Serogruppen.

2.3.4.2 MALDI-TOF

Als Alternative zur PCR-Bestätigungsmethode wurde am Medizinischen Institut für Mikrobiologie Universität Zürich das MALDI-TOF-Verfahren eingesetzt.

2.3.4.3 Serotypisierung

Zur Serotypisierung konnten Kolonien an das Legionellen-Referenzlabor in Bellinzona geschickt werden. Die entsprechenden Kolonien von den gelagerten Platten wurden zunächst auf BCYE-Agar rekultiviert und dann mit MALDI-TOF analysiert. Das Referenzlabor verwendet das Vitek MS-System von bioMérieux mit einer validierten SARAMIS-Datenbank und eigenen Spektren. *Legionella* spp. und *L. pneumophila* positive Kolonien, wurden mit Agglutinationstests weiter untersucht.

3. Messkampagnen

3.1 Wasserversorgung Zürich

In Zürich wurden nach Absprache mit Dr. Oliver Köster von der Wasserversorgung Zürich (WVZ) mehrere Beprobungen durchgeführt, deren Resultate in den folgenden Kapiteln präsentiert werden.

3.1.1 Regelmässige Überwachung Hangzone Sonnenberg 2022

Die WVZ beteiligte sich am DVGW-Projekt „Untersuchungen zu den Ursachen erhöhter Wassertemperaturen im Trinkwassernetz und Identifizierung von Gegenmassnahmen durch». Im Rahmen dieses Projekts wird der Effekt erhöhter Temperaturen auf mikrobiologische Parameter wie coliforme Bakterien, Enterokokken, *Pseudomonas aeruginosa*, Legionellen, Aeromonaden, Gesamtbakterienzahl und mikrobielle Gemeinschaft untersucht werden. Die WVZ führte eine eigene Messkampagne «Netzüberwachung Hangzone Sonnenberg» Sonnenberg durch. Im Rahmen dieser Messkampagne wurden an 5 Stellen in der Hangzone Sonnenberger regelmässige Probenahmen durchgeführt. Die Proben wurden mit der Standardkultivierungsmethoden ISO 11731 auf Legionellen untersucht. In Ergänzung wurden zu dieser bestehenden WVZ-Messkampagne im Rahmen des Projektes «Relevanz von Legionellen im Verteilnetz» weitere Untersuchungen durchgeführt. An 5 Stellen (Abbildung 5) wurden alle zwei Wochen bis monatlich vom Mai bis November Probenahmen durchgeführt.

Material und Methoden

Nachweis von Legionella spp. und L. pneumophila durch ddPCR

Im Feld wurden bis 50 Liter oder im Labor von 100 bis 1'000 ml Probe membranfiltriert. Die Ablösung der Bakterien von der Membran und die DNA-Extraktion wurde mit dem Aquadien Kit (Bio-Rad, Hercules CA, USA) durchgeführt. Für die Live/Dead PCR wurde der Bio-rad-Kit iQ-Check Free DNA Removal Solution (Artikel Nr. 3594970) angewendet. Die Droplets wurden im QX200 Droplet Generator (Bio-Rad) gebildet, die ddPCR erfolgte auf dem Mastercycler gradient (Vaudaux-Eppendorf), die anschliessende Fluoreszenzmessung mit dem QX200 Droplet Reader (Bio-Rad). Bei den durchgeführten Messungen wurden Negativ- und Positivkontrollen mitgeführt.

Die ddPCR ist eine quantitative DNA-Nachweismethode. Die zu untersuchende DNA und PCR-Reagenzien werden mit einer Öl-Wasser Emulsion zu bis 20'000 Tröpfchen (engl. droplets) verarbeitet, wobei jedes Droplet keine, eine oder mehrere Kopien der Ziel-DNA enthält. Die Droplets durchlaufen eine PCR (Standard PCR-Gerät), wobei in jedem einzelnen Droplet eine Amplifikation stattfindet, sofern Ziel-DNA vorhanden ist. Anschliessend werden die Droplets mittels Durchflussfluoreszenzmessung analysiert. Die Anzahl positiver Droplets verhält sich zur Konzentration der Ziel-DNA entsprechend einer Poisson-Verteilung.

Die ddPCR diente dem Nachweis von *Legionella* spp. und *L. pneumophila*, die Zielsequenzen waren die 23S-5S Spacer Region [5], respektive das «macrophage infectivity potentiator» (mip) Gen [6].

Viability ddPCR

PCR (Polymerase Chain Reaction) ist eine vielversprechende Methode zur Detektion von *Legionella* spp. und bietet eine Alternative zur ISO 11731. Die Live/Dead PCR, unter Verwendung des Biorad-Kits iQ-Check Free DNA Removal Solution (Artikel Nr. 3594970), ermöglicht eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Bakterien. Diese Lösung enthält ein DNA-interkalierendes Reagenz, das selektiv in die DNA toter Zellen eindringt und deren Amplifikation während der PCR verhindert. Dadurch werden nur die DNA-Sequenzen aus lebenden Zellen amplifiziert und detektiert. Diese Methode überwindet eine der Hauptlimitationen der Standard-PCR, nämlich die Unfähigkeit, zwischen lebensfähigen und nicht-lebensfähigen Zellen zu unterscheiden. Der Einsatz dieser Technologie ermöglicht eine genauere Einschätzung der tatsächlichen Kontamination mit lebenden Legionellen und reduziert das Risiko falsch-positiver Ergebnisse durch die Detektion von DNA aus toten Bakterien oder freier DNA in der Umwelt. Dies ist besonders wichtig für die Überwachung von Wassersystemen und die Bewertung der Wirksamkeit von Desinfektionsmassnahmen.

Vorgehensweise:

1. Wasserrampe mit Alkohol "abflammen"
2. Platziere Polycarbonatfilter (Nuclepore Track-Etch Membrane 50mm 0.4 µm) auf Apparatur (mit glänzender Seite nach oben), sterile Trichter drauf
3. Filtrierte 500 ml der kontaminierten Wasser Probe
4. Filter falten und in ein 2 ml Eppendorf Tube gefüllt mit 460 µl Legionella DNA Free Water and 40 µl Free DNA Removal Reagent (FDRS)
5. 2 ml Röhrchen mehrmals drehen nicht vortexen
6. Inkubieren für 30 min in Thermoblock bei 37°C
7. Hinzugabe von 500 µl R1 um FDRS für die DNA-Extraktion zu inaktivieren, für 10 Sekunden vortexen
8. 2 ml Tube mit Filter 15 min in Thermoblock bei 95°C inkubieren und 1'300 rpm
9. Filter mit 1 ml Pinzette herausnehmen (an Wand entlang drücken) und wegwerfen
10. 3 Minuten bei 900g zentrifugieren
11. Eine Säule auf ein spezielles Collection Tube aus Aquadien Kit geben
12. 500 µl Überstand aus Proben tube auf die Säule geben
13. Bei 6000 g für 10 Minuten zentrifugieren (bei 20°C)
14. Flüssigkeit im collection tube wegwerfen
15. 100 µl R2 Lösung auf die Säule geben
16. Tube entfernen – Säule mit Handschuhen halten
17. Ein neues Collection Tube verkehrt rum (Öffnung nach unten) über die Säule stülpen und das ganze vorsichtig drehen
18. Bei 1000 g für 3 Minuten zentrifugieren
19. Säule wegwerfen
20. Es bleiben 100 µl gereinigte DNA in Lösung (kann bei -20°C für mehrere Monate aufbewahrt werden)
21. 5 µl für PCR

Analyse von Biofilm für Legionella spp. und L. pneumophila

Im Rahmen des Projekts «Relevanz von Legionellen im Verteilnetz» lieferte die Wasserversorgung Zürich dem Kantonalen Labor Zürich 6 Rohrsegmente aus zwei Testleitungen, die ein Jahr lang parallel zu Leitungen bei einem Reservoir (DN500) und einem Laufbrunnen (B446) in der Stadt Zürich betrieben wurden. Der Biofilm in den Segmenten wurde beprobt und via ddPCR auf Legionellen untersucht.

Die je 3 Rohrsegmente vom Reservoir DN500 und B446 wurden mit A, B und C bezeichnet und mittels einer grossen Impföse wurde aus jedem Segment jeweils der Biofilm von einem Ende zum anderen auf einer Fläche so breit wie die 10 µL Impföse durch mehrfaches Schaben gesammelt. Die so gesammelte Probe wurde anschliessend direkt in 2 mL Lysing Solution aus dem BioRad Aquadien Legionella Kit resuspendiert und gemäss dem zugehörigen Protokoll weiterverarbeitet. Die DNA-Extrakte wurden mit ddPCR für *L. pneumophila* und *Legionella* spp. analysiert.

Resultate

In den folgenden Abbildungen sind die PCR-Resultate der Legionellenmessungen am Sonnenberg des Jahres 2022 zusammengefasst. Mit der Standardkultivierungsmethode ISO 11731 wurden in allen Proben keine Legionellen nachgewiesen.

Legionella spp. PCR

In der Abbildung 6 werden die gemessenen *Legionella* spp. graphisch dargestellt. Im Mai bis Mitte Juni sind die gemessenen Konzentrationen an allen 5 Entnahmestellen mit durchschnittlich 664 tief und steigen am 29. Juni deutlich auf 3'323 Kopien pro Liter an. In den folgenden Proben schwanken die gemessenen *Legionella* spp.- Konzentrationen auf höherem Niveau. Beim Hydranten OFH 2560 wurden generell höhere aber auch stark schwankende Konzentrationen nachgewiesen. Die mit PCR gemessenen Konzentrationen lagen bei den 65 Proben bei 39 bis maximal 47'872 Kopien pro Liter. Der Durchschnitt lag bei 4'379 Kopien pro Liter.

Live/dead Legionella spp. PCR

Der Verlauf von live/dead *Legionella* spp. PCR ist ähnlich dem Verlauf der normalen PCR (Abbildung 7). Die Werte von live/dead PCR sind im Vergleich zu normalen PCR-Resultate tiefer und liegen von 0 bis 36'890 Kopien pro Liter. Sie sind im Durchschnitt 3'203 Kopien pro Liter und liegen bei 73% des normalen PCR-Wertes. Es gibt aber immer wieder vereinzelt Proben, bei denen die live-dead PCR-Konzentration höher liegt als der Wert der normalen PCR. Dies könnte eventuell mit der Inhomogenität der Proben erklärt werden.

L. pneumophila PCR 50 Liter-Filterbeprobung

In den Wasserproben von Laufbrunnen wurden keine *L. pneumophila* durch PCR nachgewiesen. Beim Hydranten OFH 2560 wurden in der Wasserprobe vom 17.08.2022 knapp über der Nachweisgrenze *L. pneumophila* nachgewiesen. In der folgenden Probe vom 31.08.2022 wurde *L. pneumophila* in einer Konzentration von 500 Kopien pro Liter gemessen. In den nachfolgenden Proben wurden keine *L. pneumophila* mehr durch PCR nachgewiesen.

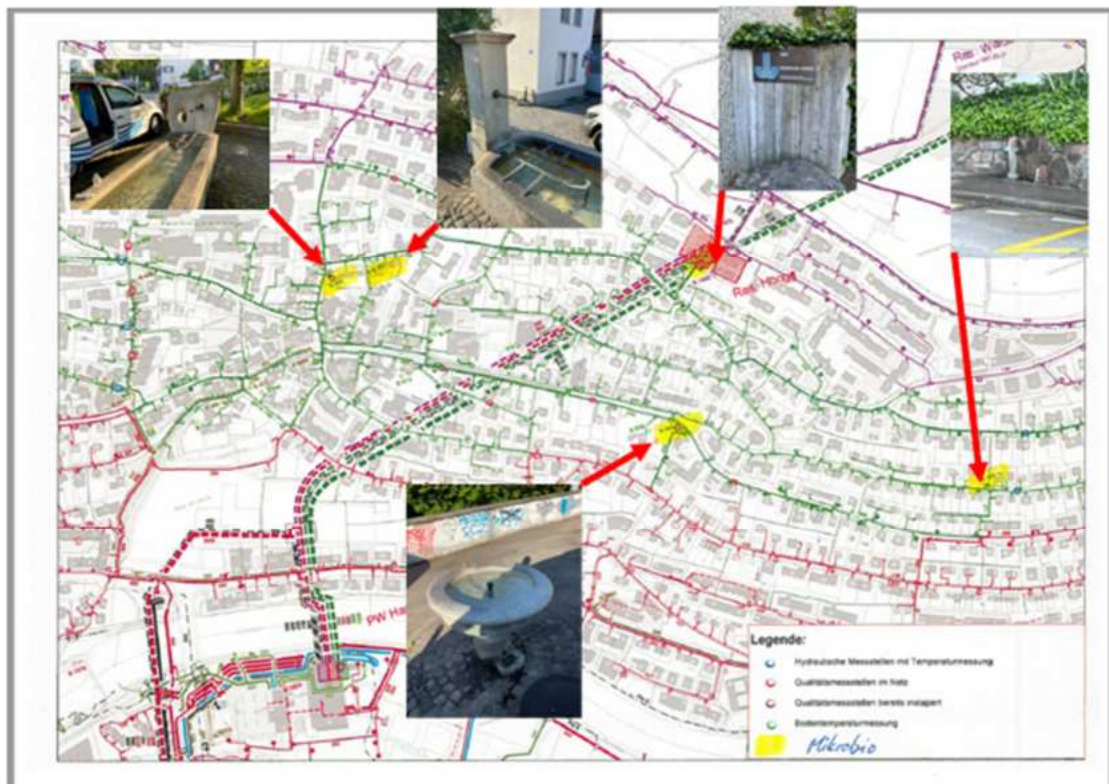


Abbildung 5 Die 5 Probenahmestelle Hangzone Sonnenberg, welche von Mai bis November 2022 regelmässig beprobt wurden.

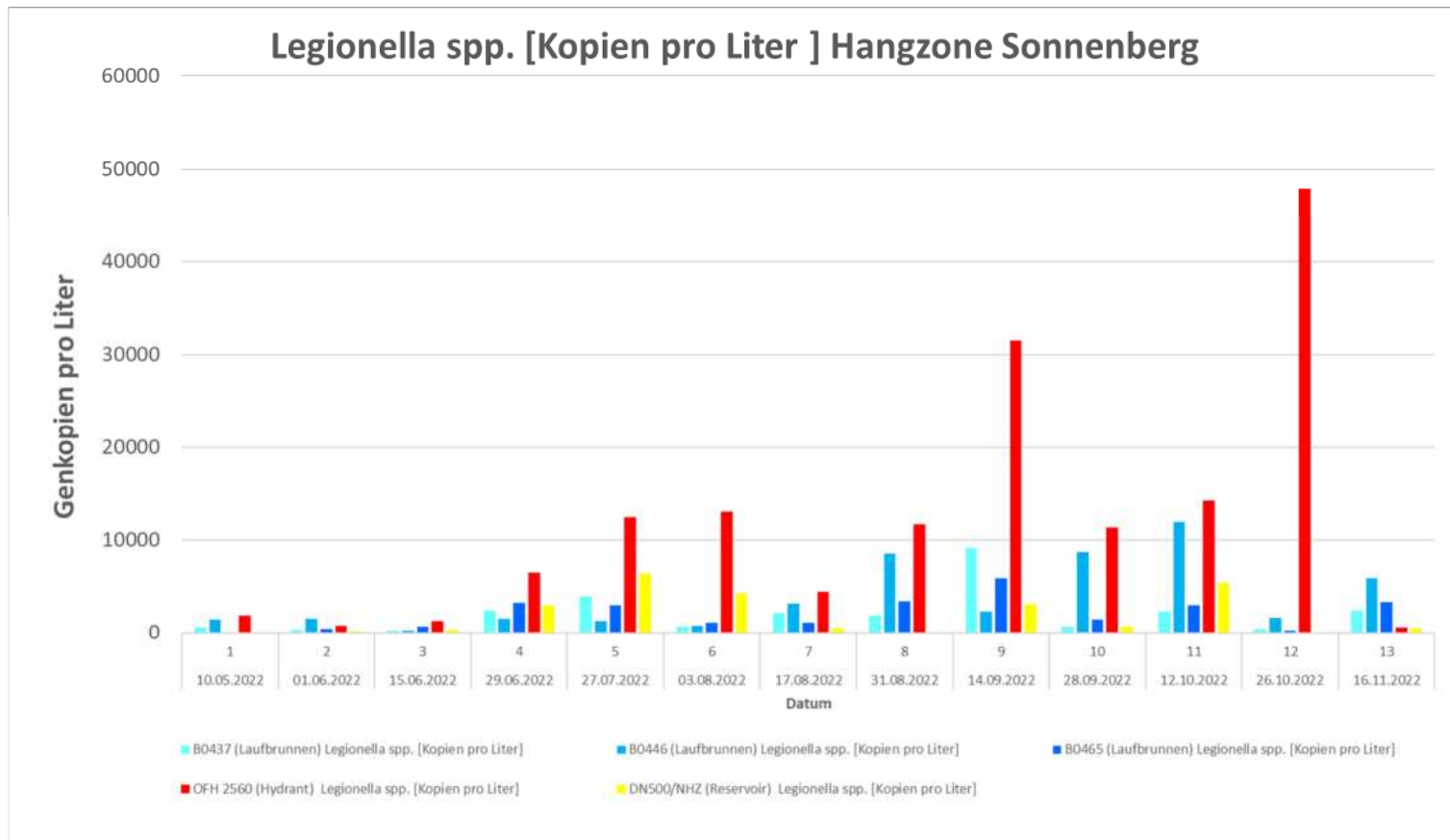


Abbildung 6 Der Verlauf von *Legionella* spp. gemessen durch PCR bei den 5 Probenahmestellen Hangzone Sonnenberg. Die Probenahme erfolgte von Mai bis November 2022.

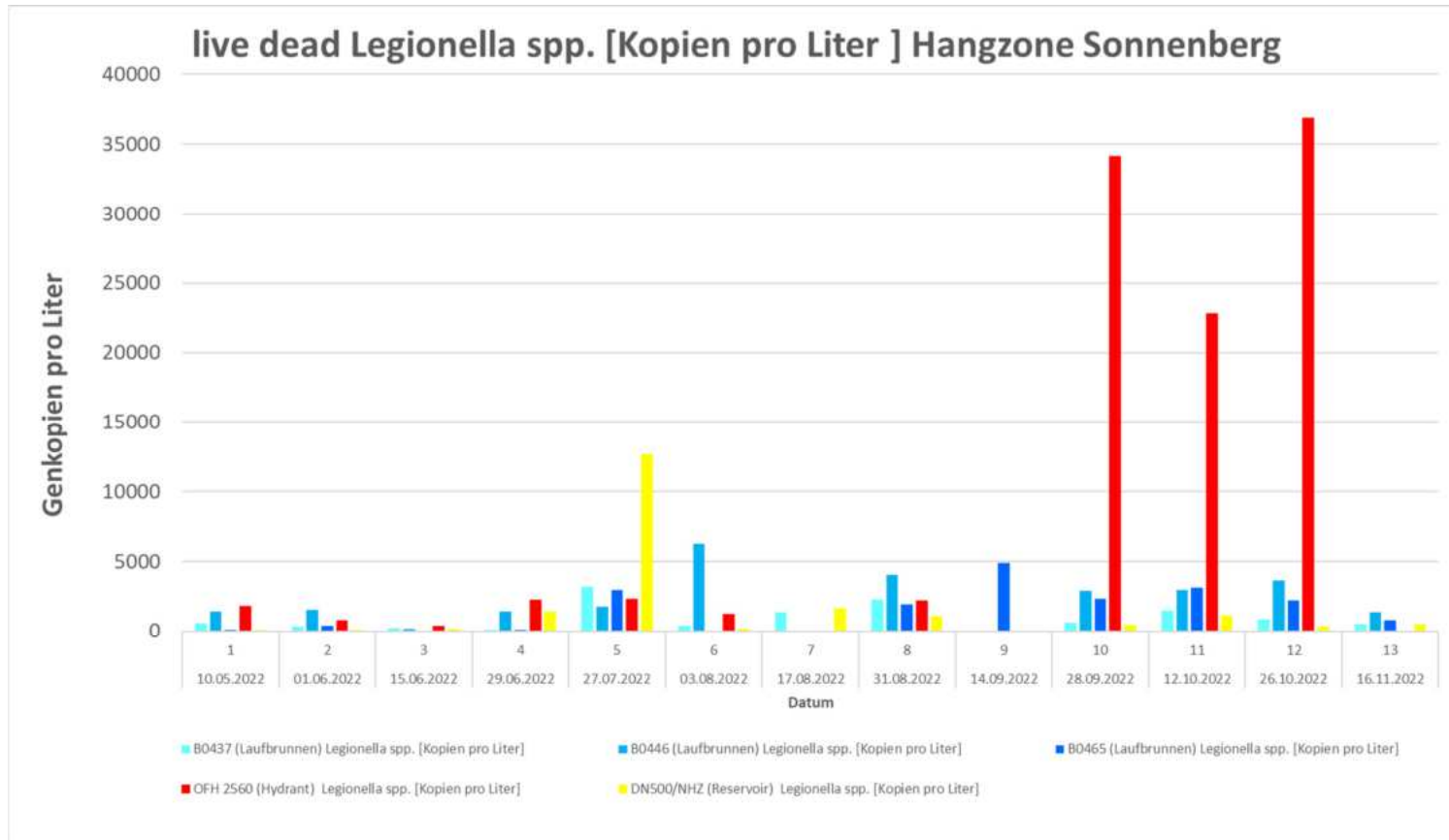


Abbildung 7 Der Verlauf von *Legionella* spp. gemessen durch live/dead-PCR bei den 5 Probenahmestellen Hangzone Sonnenberg. Die Probenahmen erfolgten von Mai bis November 2022.

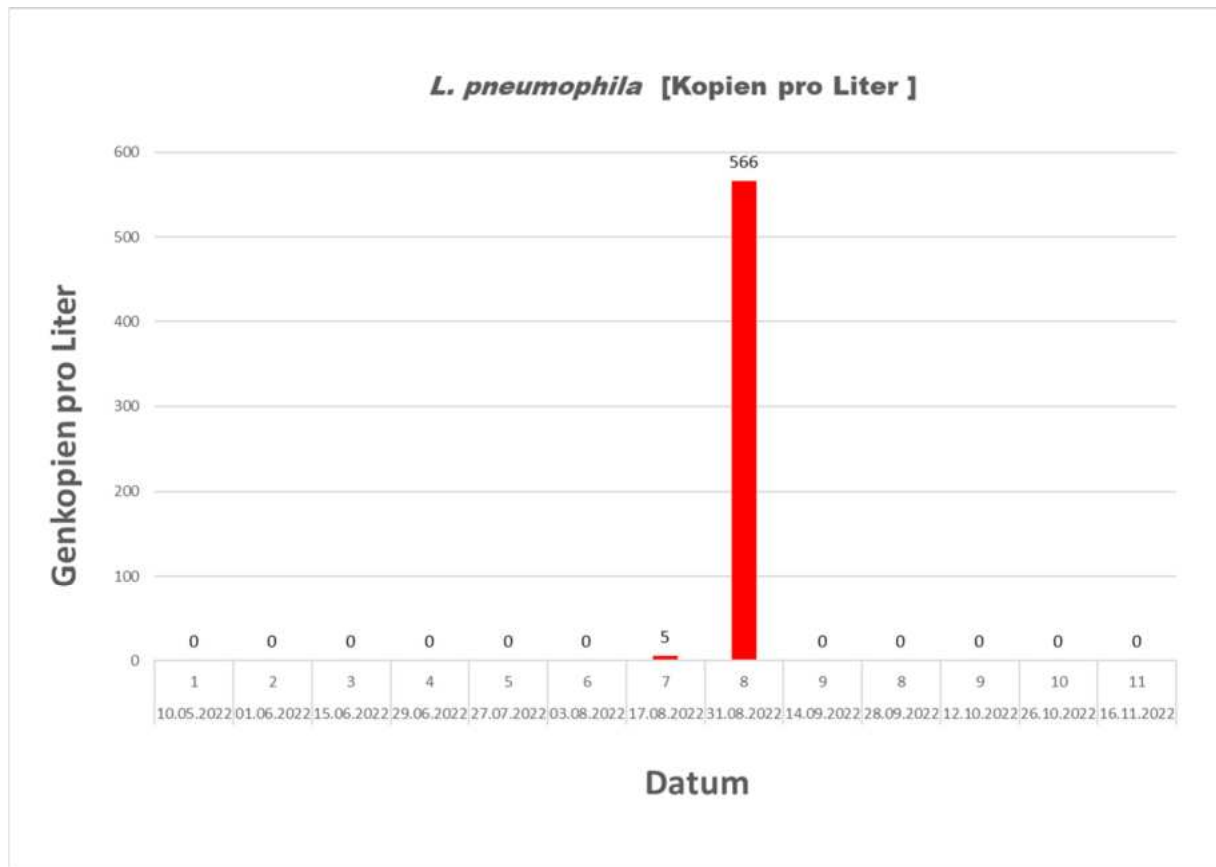


Abbildung 8 *L. pneumophila* in den Proben ab Hydrant OFH 2560 gemessen durch ddPCR. Die Probenahmen erfolgten von Mai bis November 2022.

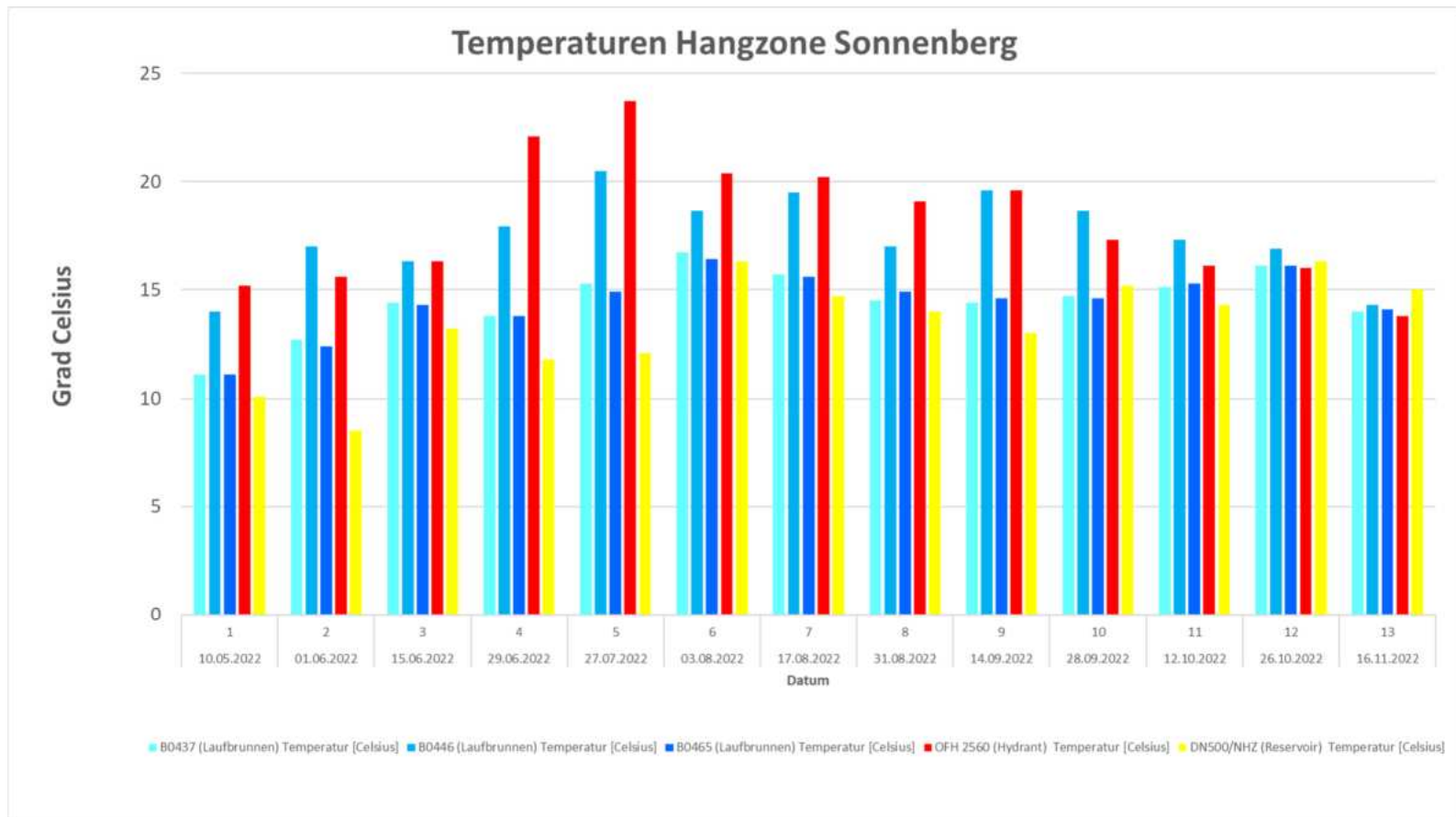


Abbildung 9 Temperatur-Verlauf der 5 Probenahmestellen Hangzone während der Probenahme von Mai bis November 2022. Die höchsten Temperaturen beim Hydranten OFH 2560 gemessen.

3.1.2 Risikobasierte Probenahme im Verteilnetz der Stadt Zürich

Es wurden an Hydranten Proben entnommen, bei denen aus verschiedenen Gründen erhöhte Legionellen-Konzentrationen erwartet wurden. So klärte das Schweizerische Tropeninstitut (STPH) ab, ob bei den Wohnadressen der gemeldeten Legionellosefällen der Stadt Zürich sich Quartiere ergeben mit allgemein erhöhten Fallzahlen. Ausserdem wurde von Dr. Oliver Köster eine Liste von Laufbrunnen zusammengestellt, bei denen im Sommer erhöhte Temperaturen gemessen wurden und die Immo Zürich gab eine Liste von Gebäuden, bei denen beim Gebäude-Eingang Legionellen nachgewiesen wurde. Die Informationen wurden in einer Karte zusammengetragen (Abbildung 10).

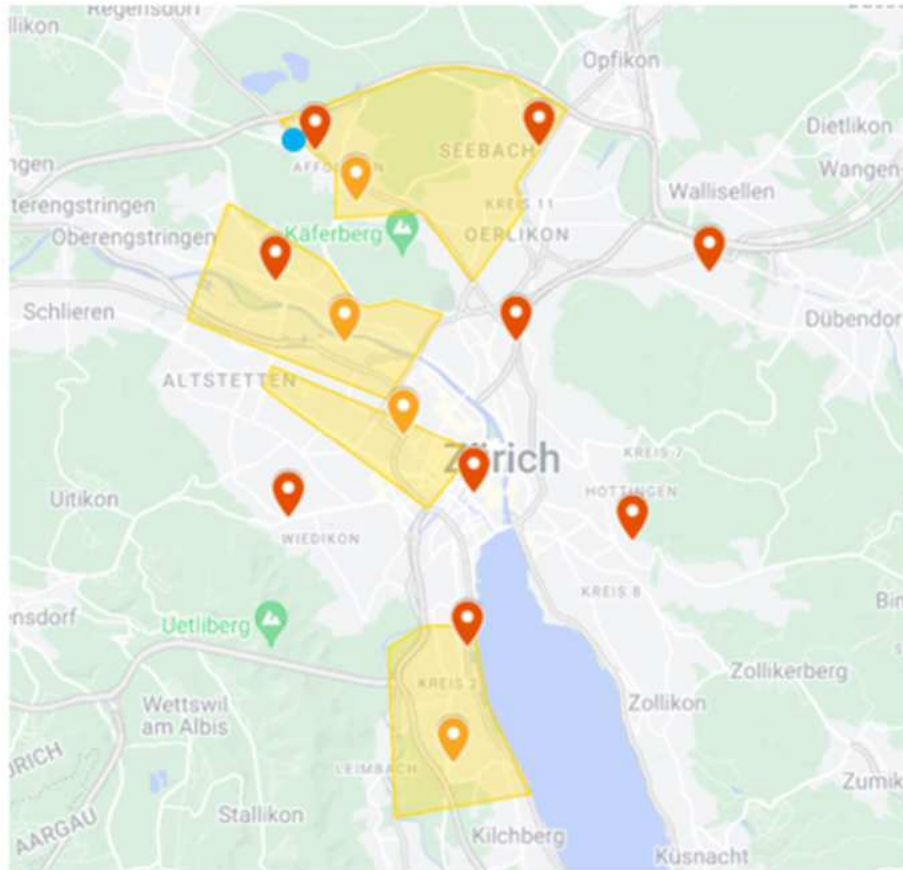


Abbildung 10 Karte mit Zonen gelb mit scheinbar leicht erhöhten Legionellosefallzahlen und Brunnen mit erhöhten Temperaturen (rot) in den Sommermonaten.

Aufgrund der zusammengetragenen Informationen wurden in zwei Quartieren Probenahmen durchgeführt (Schulhaus Ruggächer am Käferberg und Kreis 2). Die Resultate sind in der Tabelle 2 zusammengefasst. Es konnten keine *L. pneumophila* durch PCR nachgewiesen werden. Ausser bei Hydrant Seewasserwerk wurden keine erhöhten Konzentrationen an *Legionella* spp. gemessen.

Tabelle 1 Resultate der Hydrantenbeprobungen in den Proben

Templat/Probennr/Ref.Nr	Stadtbe- zirk	Datum	Temperatur	<i>L. pneu- mophila</i>	<i>Legio- nella</i> spp.
			° C	Kopien/L	Kopien/L
Hydrant Seewasserwerk Moos, Zwängiweg, 8038 Zü- rich	Kreis 2	23.11.2022	11.6	0	109'120
Hydrant Tannenrauchstrasse 60, 8038 Zürich	Kreis 2	23.11.2022	11.5	0	1'070
Hydrant beim Brunnen ge- genüber BP Tankstelle My- thenquai, 8038 Zürich	Kreis 2	23.11.2022	11.6	0	16'037
Mühleackerstrasse 73, 8046 Zürich, Hydrant Nr. OFH 4054	Schule Ruggä- cher	24.10.2022	14.8	0	957
Kreuzung Wehnta- lerstrasse/Furttalerstrasse, 8046 Zürich, Hydrant Nr. OFH 4054	Schule Ruggä- cher	24.10.2022	15.4	0	452
Glaubtenstrasse, 8046 Zü- rich, Hydrant Nr. 3736	Schule Ruggä- cher	24.10.2022	15.8	0	915

3.1.3 Biofilm aus Wasserversorgung Zürich

Im Rahmen des Projekts «Relevanz von Legionellen im Verteilnetz» übergab die Wasserversorgung Zürich dem Kantonalen Labor Zürich 6 Rohrsegmente aus zwei Testleitungen, die ein Jahr lang parallel zu den Leitungen bei dem Reservoir (DN500) und dem Laufbrunnen (B446) in der Stadt Zürich betrieben wurden (Abbildung 11). Der Biofilm in den Leitungen wurde je dreimal beprobt und durch ddPCR auf Legionellen untersucht. Die Resultate sind in der Tabelle 2 zusammengefasst. In allen Abstrichproben konnten keine *L. pneumophila* durch PCR nachgewiesen werden. Es konnten aber in rund einem Drittel der Proben hohe Werte an *Legionella* spp. nachgewiesen werden. Durch live/dead PCR wurde die Konzentration generell reduziert, nicht aber vollständig eliminiert. Es scheint, dass ein Teil des Biofilmes aus intakten Legionellenbakterien besteht. Die Biofilmproben sind sehr heterogen und entsprechend schwanken die Legionellenkonzentrationen von den Abwischproben sehr stark.



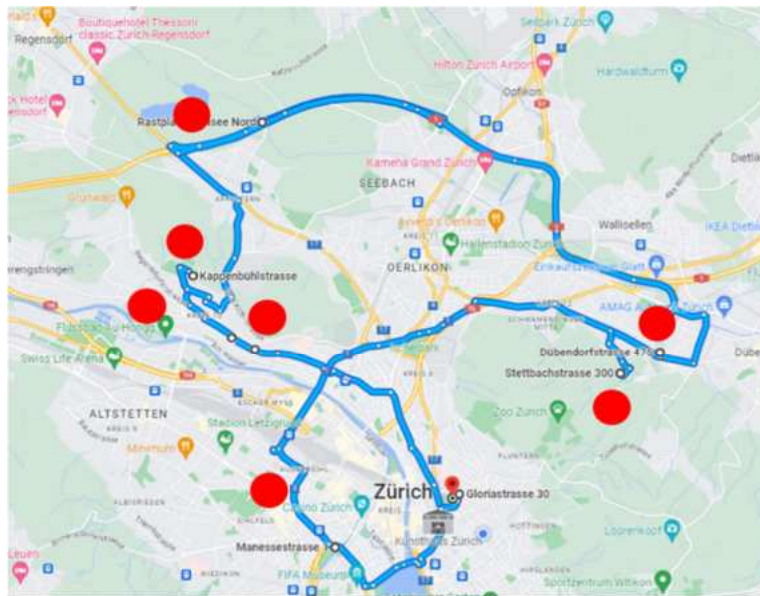
Abbildung 11 Rechts ist der generelle Aufbau der parallel durchflossenen Testleitungen (Aus Powerpointpräsentation «Untersuchung zu den Auswirkungen erhöhter Wassertemperaturen auf die mikrobiologische Situation bei der Trinkwasserverteilung – MibiTemp» von Dr. Andreas Korth, DVGW. Links sind die EPDM-Testrohrstücke, welche mit einem Durchfluss von ca. 20 L/h durchflossen wurden. Diese Rohrstücke wurden nach einem Jahr entnommen und auf Legionellen mit ddPCR untersucht.

Tabelle 2 Resultate ddPCR Legionellen Biofilm-Proben vom 13.12.2022

	<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella</i> spp.	<i>Legionella</i> spp. (live/dead)
Templat/Probennr/Ref.Nr	Kopien/Probe	Kopien/Probe	
PCR negativ	0	0	
PCR positive	3'098	7'885	
Biofilm DN500 A	0	292'864	38'720
Biofilm DN500 B	0	584	29'216
Biofilm DN500 C	0	873	6'336
Biofilm B446 A	0	11'067	29'568
Biofilm B446 B	0	2'689	1'197
Biofilm B446 C	0	141'504	6'829

3.1.4 Regelmässige Überwachung Aussenbereich Stadt Zürich 2023

Für das Jahr 2023 wurde eine Messkampagne im Aussenbereich der Wasserversorgung der Stadt Zürich begonnen. Die 7 Probenahmestellen wurden von Dr. Oliver Köster (WVZ) risikobasiert ausgewählt Abbildung 12. Es wurden Probenahmestellen wie Hydranten und Laufbrunnen in Quartieren ausgewählt, die erfahrungsgemäss stagnieren und sich in den Sommermonaten erwärmen. Als Ergänzung zu den Hydranten und Laufbrunnen wurde Hauseingang für Leitungswasser bei der Sihlsportanlage ausgewählt. Diese Probenahmestellen wurden monatlich mit verschiedenen Methoden auf Legionellen wie Standardkultivierungsmethode ISO 11731, Amöbenplattentest und PCR gemessen. Bei jeder Probenahme wurde die Temperatur gemessen.



Nr.	Entnahmestelle	Bemerkung
1	Laufbrunnen B0446	Messungen 2022 Erhöhte Temperaturen in den Sommermonaten
2	Hydranten OFH 2560	Messungen 2022 Messreihe schon vorhanden
3	Kappenhühlstr. 80 (Unterflurhydrant)	Risikobasiert von Oliver Köster ausgewählt Periphere Endstränge mit erhöhten Temperaturen im Sommer.
4	Rastplatz Büsisee N20 Hydrant Nr. 5096	
5	Dübendorferstr. 441 BHF Stettbach Hydrant Nr. 3979	
6	Stettbachstr. 300, Hydrant Nr. 1958	Nach Absprache mit Immo Zürich wurde ein Objekt ausgewählt.
7	Gut durchflossener Hauseingang, bei der wir eine 50 Liter-Filterbeprobung durchführen können. a) Objekt SPA Sihlhölzli	



Abbildung 12 Die 6 Probenahmestelle nördliche Randzone Stadt Zürich und einen Gebäudeeingang, welche von Januar bis monatlich beprobt wurden.

Material und Methoden

Tabelle 3 Analysen

Methode	Kit	Analyten
qPCR	Diatheva	<i>Legionella</i> spp. <i>L. pneumophila</i>
Amöbenplattentest	Gemäss Hilbi Referenz [7] Gemäss Kapitel 2	Legionellen
Bestimmung der Totalzellzahl	b-Novate SVGW MW 102 gemäss Kapitel 2	Totalzellzahl (TZZ) Verteilung LNA/HNA-Bakterien

Resultate

In den folgenden Abbildungen sind die Temperatur- und Legionellenmessungen in den nördlichen Randzonen des Verteilnetzes von 2023 zusammengefasst.

Temperaturmessung

Die Temperatur wurde im Felde bei der Probenahme gemessen. Bei den Hydranten wurde die Temperatur nach 4 Liter Vorlauf im 5. Liter gemessen. Beim Laufbrunnen direkt ab Wasserstrahl. Beim Hauseintritt Sihlsportanlage wurde die Temperatur nach 10 Minuten Vorlauf gemessen. In der Abbildung 13 sind die Temperaturen über das Jahr 2023 im Verteilnetz der Stadt Zürich dargestellt.

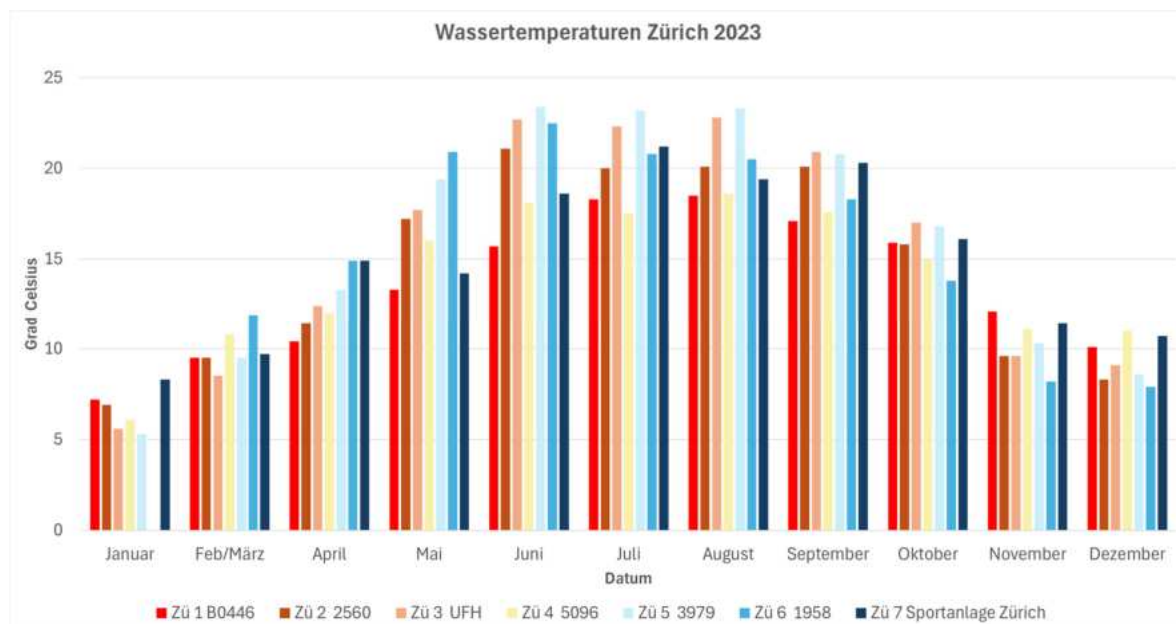


Abbildung 13 Temperatur-Verlauf der 7 Probenahmestellen Hangzone während der Probenahme von Januar bis August 2023. Ab Juni werden im durchflossenen Verteilnetz Temperaturen über 15 Grad gemessen. In den Sommermonaten Juni / Juli / August werden in den Wasserproben von Hydranten Temperaturen über 20 Grad gemessen.

Legionella spp. PCR

In der Abbildung 14 werden die gemessenen *Legionella* spp. in der Randzone Zone Nord des Verteilnetzes der Stadt Zürich im Jahresverlauf graphisch dargestellt. Wie schon 2022 wird ein Sprung der *Legionella* spp. – Konzentration im Monat Mai / Juni festgestellt. In den folgenden Monaten schwanken die gemessenen *Legionella* spp. – Konzentrationen auf höherem Niveau. Die mit PCR gemessenen Konzentrationen lagen bei den 42 untersuchten Proben bei $2.1 \cdot 10^4$ bis maximal $3.3 \cdot 10^6$ Kopien pro Liter. Der Durchschnitt lag bei $7.5 \cdot 10^5$ Kopien pro Liter. Die Konzentration von *Legionella* spp. steigt im Frühjahr mit steigenden Temperaturen an. Ab Juni nimmt sie wieder ab und ist im August und September sehr niedrig. Von Oktober bis Dezember ist ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Es wird vermutet, dass dieser Anstieg nicht durch die Temperatur, sondern durch die Nährstoffverfügbarkeit reguliert wird. Im See findet im Frühjahr und Herbst eine Durchmischung statt. Durch die Durchmischung gelangt nährstoffreicheres Tiefenwasser in die oberen Schichten. Dies kann im Frühjahr und Herbst zu einem erhöhten Nährstoffgehalt im Trinkwasser und damit zu erhöhten Konzentrationen von *Legionella* spp. führen. Interessanterweise wurde dieses Phänomen auch bei der Wasserversorgung Lugano beobachtet (Abbildung 18).

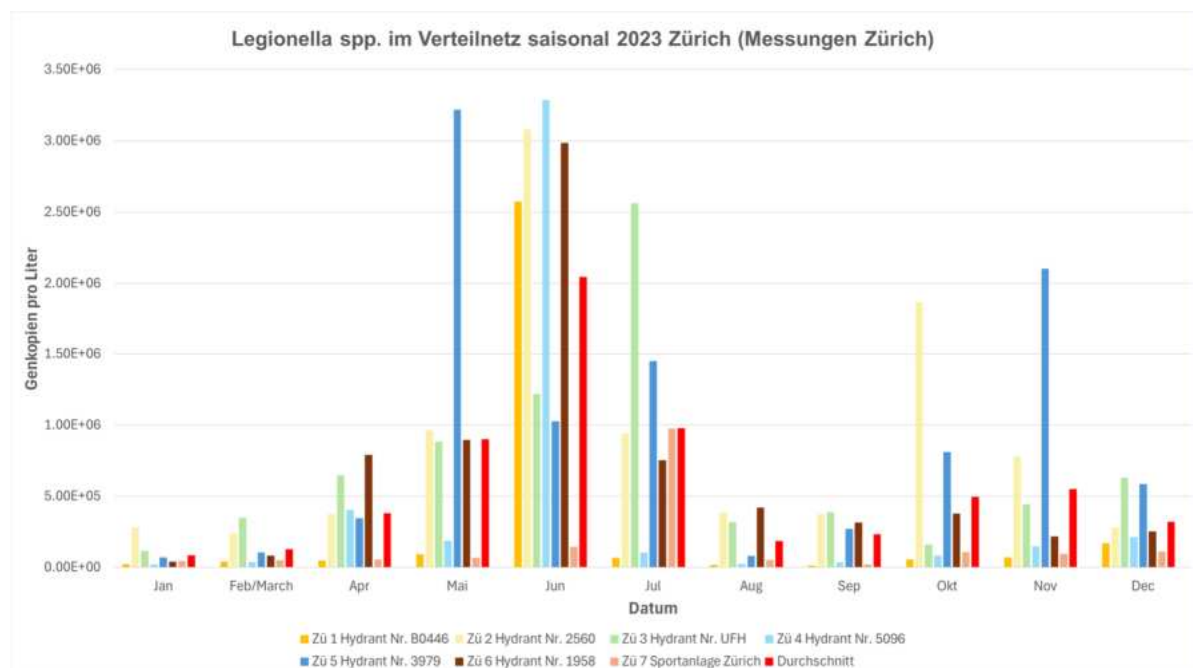


Abbildung 14 Der Verlauf der Konzentration von *Legionella* spp. gemessen durch qPCR bei den 7 Probenahmestellen in der Randzone Nord des Wasserverteilnetzes der Stadt Zürich. Die Probenahme erfolgte von Januar bis Juli 2023.

Legionella pneumophila PCR 50 Liter-Filterbeprobung

Bei der SihlSportanlage wurde beim Hauseingang eine 50 Literbeprobung durchgeführt, um *L. pneumophila* im tiefen Bereich nachweisen zu können. Es konnte aber auch mit der 50 Liter-Filterbeprobung keine *L. pneumophila* oberhalb der für 50 Liter nach unten extrapolierten Nachweisgrenze von 6.4 Genkopien pro Liter in allen Monatsproben nachgewiesen werden.

Standardkultivierung ISO 11731

Mit der Standardkultivierungsmethode ISO 11731 wurden in allen Proben keine Legionellen nachgewiesen.

Amöbenplattentest

Mit dem Amöbenplattentest wurden in allen Proben keine Legionellen nachgewiesen.

Totalzellzahl

Die Totalzellzahl beziehungsweise Bakterienzellkonzentration wurden in den Proben von Juni und August in den Proben des Verteilnetz Zürich gemessen. Sie sind in der Abbildung 15 dargestellt. Die Bakterienzellkonzentration in den Stagnationsproben Hydranten ist deutlich höher als in den Proben von Laufbrunnen. Auch konnte generell eine Erhöhung der Bakterienzellkonzentration vom Monat Juni zum Monat August festgestellt werden. So erhöhte sich beim Hauseingang der Sihlspananlage die TZZ von $9.0 \cdot 10^4$ Zellen pro ml auf $1.8 \cdot 10^5$ Zellen pro ml. Ursache hierfür könnte eine Veränderung des Mischungsverhältnisses oder eine verstärkte Vermehrung durch die Erwärmung des Wassers im Leitungsnetz während der Sommermonate sein.

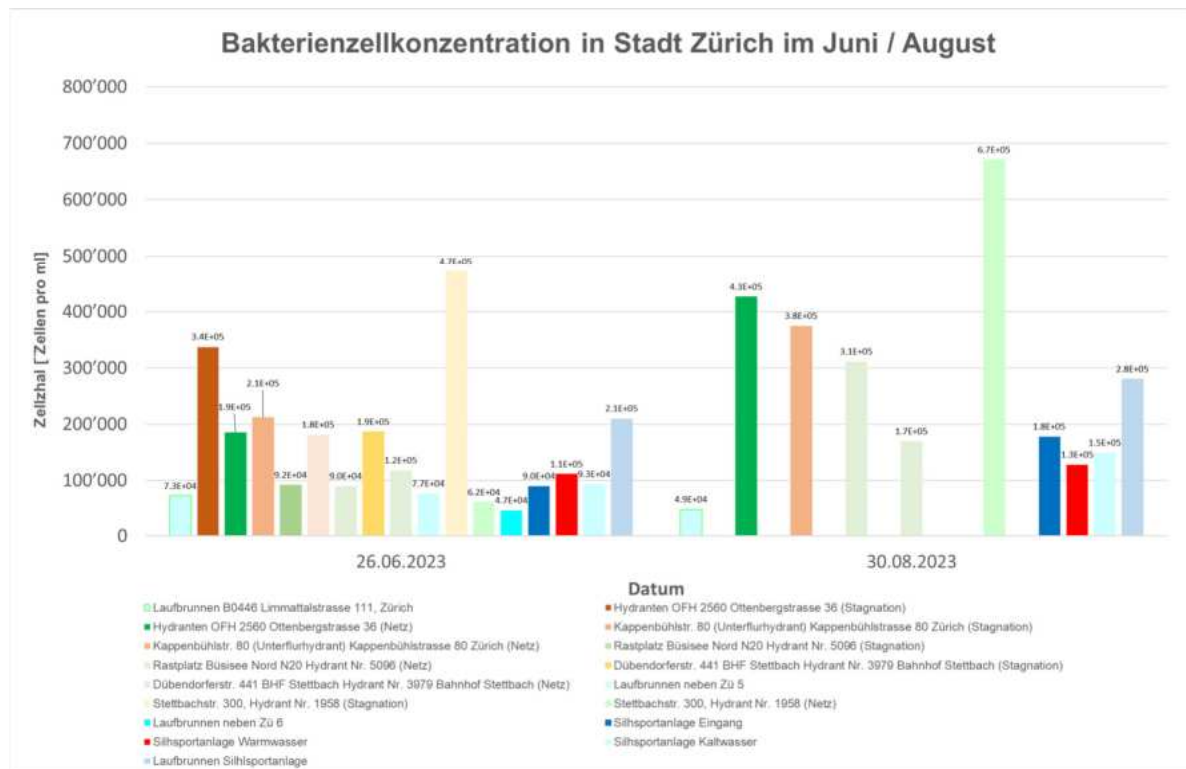


Abbildung 15 Totalzellzahl beziehungsweise Bakterienzellkonzentration der Proben aus dem Verteilnetz der Stadt Zürich der Monat Juni und August 2023.

3.2 Wasserversorgung Lugano

In Lugano wird regelmässig einer der höchsten Legionellose-Inzidenzraten in der Schweiz festgestellt. In Lugano werden wesentlich höhere Umgebungstemperaturen als in Zürich gemessen. In den Quartieren Breganzona und Molino Nuovo wurden deutlich erhöhte Legionellose-Fallzahlen festgestellt. Ein vermuteter Vermehrungsort der Legionellen im Verteilnetz sind die Hydranten. Hydranten mit Sonnenexposition erwärmen sich im Sommer bis 60°C. Das Wasser aus dem Hydranten hatte teilweise bis 20 Liter Vorlauf eine Temperatur von 30°C. Die Zubringerleitung zum Hydranten ist gegenüber der Hauptleitung offen und im Austausch und könnte so stetig Legionellen an das vorbeifliessende Wasser abgeben, welches zu den Duschen in die Haushalte gelangt.

Es wurden an 3 Daten (21.07.2022, 03.10.2022 und 06.12.2022) Proben entnommen und mit verschiedenen Methoden (ISO 11731, Amöben-Platten-Test und PCR) auf Legionellen untersucht. Mit der Standardkultivierungsmethode ISO 11731 wurden wie in Zürich in allen Proben keine Legionellen nachgewiesen. Mit der PCR-Methode (Kit von Diatheva, inhouse-Methode KLZH) wurden in zwei Hydranten (Nr. 5656 und 6514) *L. pneumophila* nachgewiesen. Bei den Wasserproben von Hydrant Nr. 6514 konnten mit dem Amöben-Platten-Test *L. pneumophila* kultiviert und isoliert werden. Der isolierte Stamm wurde vom Referenzlabor Bellinzona durch Serotypisierung als *L. pneumophila* SG 3 bestimmt.

Material und Methoden

qPCR Diatheva

Die Proben aus dem Wasserversorgungsnetz von Lugano wurden 2023 von der Universität Zürich mit dem kommerziellen PCR-KIT von Diatheva auf *Legionella* spp. und *L. pneumophila* analysiert. Ausserdem wurden alle PCR-Analysen des Referenzlabor Bellinzona mit dem kommerziellen Kit von Diatheva ausgeführt.

Link: [DI-Check Legionella pneumophila Kit - Diatheva](#)

Link: [DI-Check Legionella spp. Kit - Diatheva](#)

3.2.1 Probenahmen vom 21.07.2022

Resultate Verteilnetz Lugano

Am 21.07.2022 wurden in Lugano 15 Proben erhoben und mit drei verschiedenen Methoden auf Legionellen untersucht. Am Referenzlabor wurden die Proben einerseits mit der Standardkultivierungsmethode ISO 11731 und andererseits mit dem PCR-Kits von Diatheva Legionellen auf Legionellen untersucht. An der Universität Zürich wurde ausserdem die Proben mit der von der Gruppe Prof. Hilbi entwickelte Amöben-Platten-Test untersucht. Die Resultate werden in der Tabelle 4 präsentiert. Mit der PCR-Methode von Diatheva wurden *Legionella* spp. in einer Konzentration von 2'800 bis 2'700'000 Kopien pro Liter gemessen. In einer Probe wurde *L. pneumophila* in tiefer Konzentration von 1'088 Kopien pro Liter nachgewiesen. Interessant ist es, dass gerade im Quartier Breganzona mit hohen Fallzahlen *L. pneumophila* nachgewiesen werden konnte (Lug 4). Mit den Kultivierungsmethoden (ISO 11731 und Amöbenansatz) konnten in den 15 Proben keine Legionellen nachgewiesen werden.

Erhöhte Wassertemperaturen bei Hydranten

Das Wasser im Verteilnetz der Altstadt von Lugano hat bei den Laufbrunnen eine günstig tiefe Temperatur von 11.1 bis 14.9 °C. Festgestellt wurde, dass das Wasser des Verteilnetzes sich in den Zugangsleitungen zu Hydranten erwärmt. Hydranten mit Sonnenexposition erwärmen sich bis 60°C. Hydranten bestehen aus Gusseisen, ein Material welche sich zur Wärmeübertragung eignet. Die Wärme kann sich vom Hydranten auf die Anschlussleitung übertragen. Beim Hydranten Nr. 6231 (Lug 05) hatte zum Beispiel das austretende Wasser bis 20 Liter Vorlauf eine Temperatur von mehr als 30°C. Die Zubringerleitung zum Hydranten ist gegenüber der Hauptleitung

offen und im Austausch und könnte so stetig Legionellen an das vorbeifliessende Wasser abgeben, welches zu den Duschen in die Haushalte gelangt. Eine vermuteter Vermehrungsort der Legionellen im Verteilnetz sind deshalb die Hydranten. In den kommenden Probenahmen sollten Hydranten in den Quartieren mit erhöhten Fallzahlen überprüft werden.

Tabelle 4 Resultate der Proben von Lugano vom 21.07.2022. Die Proben wurden mit 3 unterschiedlichen Methoden auf Legionellen untersucht: ¹PCR-Kits von Diatheva, ²Standardkultivierungsmethode ISO 11731 (Filterabwaschverfahren) und ³Amöben-Platten-Test von der Arbeitsgruppe von Prof. Hilbi.

Proben Nr.	Probenahmestelle	Bemerkung	¹ Legionelle pneumophila [GU/L]	¹ Legionella pneumophila result	¹ Legionella spp. [GU/L]	¹ Legionella spp. result	² Culture [CFU/l]	³ Amöbenans	Temperatur [Grad Celsius]	Leitfähigkeit [µS/cm]
Lug01 dil-1	Hydrant 5427 Via Lugia 7, 6914 Carona	Temperaturproblem	0	not detected	2.70E+06	detected	<100 ufc/l	n.n.	31.4	
Lug02	Brunnen 266, Sente Brè 3, 6978 Gandria	Temperaturproblem	0	not detected	3.80E+05	detected	<100 ufc/l	n.n.	23.0	231
Lug03	Hydrant 5970, Piazza D'Avra 3, 6968 Sonvico	Rostproblem	0	not detected	2.70E+05	detected	<100 ufc/l	n.n.	21.4	552
Lug04	Hydrant 5656, Via Cresperone 2, Breganzona	Erhöhte Fallzahlen	1088	below LOQ	5.70E+05	detected	<100 ufc/l	n.n.	24.4	149.4
Lug05	Hydrant 6231, Via Bettramina 9	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	1.60E+05	detected	<100 ufc/l	n.n.	30.5	242
Lug06	Brunnen 230, Piazza Dante 1	Altstadt Lugano	0	not detected	1.30E+04	detected	<100 ufc/l	n.n.	14.9	237
Lug07	Brunnen 51 Viale dei Faggi, Lugano	Altstadt Lugano	0	not detected	3.30E+04	detected	<100 ufc/l	n.n.	11.1	
Lug08	Hydrant 5136, Via G. Motta, Lugano	Altstadt Lugano	0	not detected	2.80E+05	detected	<100 ufc/l	n.n.	27.5	247
Lug09	Brunnen 116 Lugano	Altstadt Lugano	0	not detected	9.60E+04	detected	<100 ufc/l	n.n.	28.4	243
Lug10	SE Massagno	Quelle	0	not detected	4.80E+04	detected	<100 ufc/l	n.n.	12.7-12-1	41.6
Lug11	SE Bioggio	Grundwasser	0	not detected	2.80E+03	detected	<100 ufc/l	n.n.	12.9-12.6	172.3
Lug12	SE Gemmo	Reservoir	0	not detected	4.80E+03	detected	<100 ufc/l	n.n.	13.8-13.0	248
Lug13	CL Pian Casoro	See	0	not detected	1.50E+06	detected	<100 ufc/l	n.n.	7.9-7.6	253
Lug14	SE Bassone	Reservoir	0	not detected	3.10E+05	detected	<100 ufc/l	n.n.	20.3-19.4	234
Lug15	ST Cassorate	See	0	not detected	1.80E+06	detected	<100 ufc/l	n.n.	7.7-7.5	258.7
LOQ=Limit of quantification										
GU/L= Genomic Units per Liter										
CFU/L=Colony Forming Units per Liter										
Lp=Legionella pneumophila										
Lsp=Legionella species										
PAGE=Page Saline (sterile)										

3.2.2 Probenahme vom 03.10.2022

Resultate Probenahme Verteilnetz Lugano vom 03.10.2022

Am 03.10.2022 wurden in Lugano in den beiden Quartieren Breganzona und Molino Nuovo 10 Proben erhoben und mit drei verschiedenen Methoden auf Legionellen untersucht. Am Referenzlabor in Bellinzona wurden die Proben einerseits mit der Standardkultivierungsmethode ISO 11731 und andererseits mit dem PCR-Kit von Diatheva auf *Legionella* spp. und *L. pneumophila* untersucht. Ausserdem wurden die Proben mit der digital droplet PCR vom KLZH analysiert. Die Resultate sind in der Tabelle 5 zusammengefasst. Mit der Kultivierungsmethode (ISO 11731) konnten in den 10 Proben keine Legionellen nachgewiesen werden. Mit der PCR-Methode von Diatheva wurden *Legionella* spp. in einer Konzentration von 1'200 bis 170'000 Kopien pro Liter gemessen. Die *Legionella* spp.-Konzentration war diesmal in einem tieferen Bereich als bei der Probenahme vom 21.07.2022. In einer Probe (Lug08b) wurde *L. pneumophila* in einer Konzentration von 7'900 Kopien pro Liter nachgewiesen. Dieser positive Nachweis konnte mit der ddPCR vom KLZH bestätigt werden. Mit der ddPCR-Methode wurde ein etwas tiefere Konzentration von 1800 Kopien pro Liter gemessen. Der Hydrant wurde aber unterschiedlich beprobt: Für das Referenzlabor Bellinzona wurden nach 10 Liter Vorlauf jeweils ein Liter erhoben. Danach wurden mittels Filterbeprobung ab Hydrant 50 Liter für die ddPCR membranfiltriert. Der positive Befund des Hydranten Nr. 6514 konnte somit durch eine separate Beprobung und PCR-Analyse bestätigt werden. Es wird angenommen, dass sich die *L. pneumophila* in der Zuleitung zum Hydranten vermehrt haben. Entsprechend könnte bei der 50 L - Filterbeprobung die Konzentration von *L. pneumophila* verdünnt haben. Wegen der unterschiedlichen Probenahme können die PCR-Resultate des Referenzlabors Bellinzona und des KLZH nicht direkt verglichen werden. Aus der 1 Liter-Wasserprobe Hydrant Nr. 6514 konnten ausserdem mit dem Amöben-Platten-Test von Prof. Hilbi Legionellen kultiviert und isoliert werden. Die anschliessende Serotypisierung im Referenzlabor in Bellinzona ergab, dass der isolierte Stamm *L. pneumophila* SG 3 ist.

Der Hydrant 5656, bei dem am 21.07.2022 *L. pneumophila* nachgewiesen wurde, konnte am 03.10.2022 keine *L. pneumophila* nachgewiesen werden. Hydranten und deren Zuleitung scheinen nicht permanent mit *L. pneumophila* kontaminiert zu sein. Ein Phänomen, welches auch bei der Wasserversorgung Zürich beim Hydranten OFH 2560 beobachtet werden konnte (Abbildung 8).

Tabelle 5 Resultate der Proben von Lugano vom 03.10.2022. Die Proben wurden mit 3 unterschiedlichen Methoden auf Legionellen untersucht: ¹PCR-Kits von Diatheva, ²Standardkultivierungsmethode ISO 11731 (Filterabwaschverfahren) und ⁴digital droplet PCR vom KLZH.

Sample	Probenbezeichnung	¹ Lpn [GU/L]	¹ Lpn result	¹ Lsp [GU/L]	¹ Lsp result	² Culture [CFU/L]	³ Amöbenansatz [CFU/l]	⁴ ddPCR Lpn[GU/L]	⁴ ddPCR Lsp [GU/L]	Temperatur [Grad Celsius]
Lugb01	Via Terzerina 5, Pregassona Hydrant Nr. 6212	0	not detected	1.70E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	not analysed	not analysed	21.0
Lugb02	Via Trevano 86, Molino Nuovo Hydrant Nr. 5691	0	not detected	1.20E+03	detected	<100 ufc/l	not analysed	0	4.89E+03	15.9
Lugb03	Via Sara Frontini 2, Viganello Hydrant Nr. 5672	0	not detected	1.80E+04	detected	<100 ufc/l	not analysed	not analysed	not analysed	13.3
Lugb04	Via Luganetto 4, Viganello Hydrant Nr. 6388	0	not detected	8.30E+03	detected	<100 ufc/l	not analysed	not analysed	not analysed	19.7
Lugb05	Via Giovanni Ferri 2, Molino Nuovo Hydrant Nr. 5491	0	not detected	6.60E+03	detected	<100 ufc/l	not analysed	0	4.10E+04	17.9
Lugb06	Via Trevano 30, Molino Nuovo Hydrant Nr. 929	0	not detected	2.10E+03	detected	<100 ufc/l	not analysed	0	1.48E+03	17.5
Lugb07	Via Gulielmo Canevascini 4, Besso Hydrant Nr. 5091	0	not detected	4.20E+03	detected	<100 ufc/l	not analysed	not analysed	not analysed	17.0
Lugb08	piazza Cinque vie 5, Breganzona Hydrant Nr. 6514	7'900	detected	3.80E+04	detected	<100 ufc/l	10'000	1'760	8.53E+03	22.2
Lugb09	Via Camara 33, Breganzona Hydrant Nr. 5299	0	not detected	4.20E+03	detected	<100 ufc/l	not analysed	0	1.13E+03	17.2
Lugb10	Via Cresperone 2, Breganzona Hydrant Nr. 5656	0	not detected	2.00E+04	detected	<100 ufc/l	not analysed	0	1.83E+03	18.7
	LOQ=Limit of quantification									
	GU/L= Genomic Units per Liter									
	CFU/L=Colony Forming Units per Liter									
	Lp=Legionella pneumophila									
	Lsp=Legionella species									
	PAGE=Page Saline (sterile)									

3.2.3 Probenahme vom 06.12.2022

Am 06.12.2022 wurden in Lugano noch einmal in den beiden Quartieren Breganzona und Molino Nuovo 16 Proben erhoben und mit drei verschiedenen Methoden auf Legionellen untersucht. Am Referenzlabor in Bellinzona wurden die Proben einerseits mit der Standardkultivierungsmethode ISO 11731 und andererseits mit dem PCR-Kit von Diatheva auf *Legionella* spp. und *L. pneumophila* untersucht. Ausserdem wurden bei *L. pneumophila* positiven-Resultat, die Probe mit dem Amöben-Platten-Test an der Universität Zürich angesetzt. Gemäss Angaben von der Wasserversorgung Lugano wurde aufgrund einer Kontamination das Wasser im Verteilnetz temporär gechlort. Die Resultate sind in der Tabelle 3 präsentiert. Mit der Kultivierungsmethode ISO 11731 (Direktplattierung bei allen Proben) und bei der Probe Hydrant Nr. 6514 (Filterabwaschverfahren) konnten in den 16 Proben keine Legionellen nachgewiesen werden. Mit der PCR-Methode von Diatheva wurden *Legionella* spp. in einer Konzentration von 31'800 bis 1'110'000 Kopien pro Liter gemessen. Die *Legionella* spp.-Konzentration war diesmal in einem höheren Bereich als in den beiden vorangegangenen Probenahmen. Eventuell wurde durch die Chlorung Legionellen aus dem Biofilm abgelöst und führte zu den erhöhten Resultaten. In einer Probe (Hydrant Nr. 6514) wurde wie in der Probenahme vom 03.10.2022 *L. pneumophila* nachgewiesen. Die Konzentration von *L. pneumophila* war diesmal mit 18'681 Kopien pro Liter höher als 03.10.2022 mit 7'900 Kopien pro Liter. Dieser positive Nachweis konnte mit Amöben-Platten-Test an der Universität Zürich bestätigt werden.

Der Hydrant 5656, bei dem am 21.07.2022 *L. pneumophila* nachgewiesen wurde, konnte am 03.10.2022 wie auch 06.12.2022 keine *L. pneumophila* nachgewiesen werden. Hydranten und deren Zuleitung können somit auch nur sporadisch mit *L. pneumophila* kontaminiert sein. Das ist ein Phänomen, welches auch bei der Wasserversorgung Zürich beobachtet werden konnte (Abbildung 8).

Tabelle 6 Resultate der Proben von Lugano vom 06.12.2022. Die Proben wurden mit 2 unterschiedlichen Methoden auf Legionellen untersucht: ¹PCR-Kits von Diatheva, ²Standardkultivierungsmethode ISO 11731 (Filterabwaschverfahren). Ausserdem wurde die *L. pneumophila*-positive Proben (Hydrant 6514) auch mit dem Amöbenansatz auf Legionellen untersucht.

Probenbezeichnung	Spalte1	¹ Lpn [GU/L]	¹ Lpn result	¹ Lsp [GU/L]	¹ Lsp result	² Culture [CFU/L]	³ Amöbenansatz	Temperatur [Grad Celsius]
Via Terzerina 5, Pregassona Hydrant Nr. 6212	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	6.54E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	10.6
Hydrant Nr. 5770	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	6.90E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	8.1
Via Sara Frontini 2, Viganello Hydrant Nr. 5672	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	9.35E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	7.0
Via Luganetto 4, Viganello Hydrant Nr. 6388	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	2.25E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	9.4
Via Giovanni Ferri 2, Molino Nuovo Hydrant Nr. 5491	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	1.40E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	12.4
Via Trevano 30, Molino Nuovo Hydrant Nr. 929	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	3.81E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	9.6
Via Gulielmo Canevascini 4, Besso Hydrant Nr. 5091	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	3.18E+04	detected	<100 ufc/l	not analysed	9.4
Piazza Cinque vie 5, Breganzona Hydrant Nr. 6514	Erhöhte Fallzahlen	18681	detected	5.54E+05	detected	<100 ufc/l	Resultat folgt	8.4
Via Cresperone 2, Breganzona Hydrant Nr. 5656	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	2.27E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	8.9
Via G. eF. Ciani 33, Hydrant Nr. 5706	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	3.79E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	8.7
Via Ernesto Pelloni 2, Hydrant Nr. 5659	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	2.64E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	7.9
Piazza Arch. C. Frasca 1, Hydrant Nr. 5607	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	7.24E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	9.8
Via al Poggio 7, Hydrant Nr. 5192	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	1.11E+06	detected	<100 ufc/l	not analysed	6.2
Via Casarico 27A, Hydrant Nr. 5549	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	3.06E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	8.6
Via Avv. B. Leoni 67, Hydrant Nr. 5240	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	2.63E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	10.8
Hydrant Nr. 6252	Erhöhte Fallzahlen	0	not detected	3.25E+05	detected	<100 ufc/l	not analysed	8.2
LOQ=Limit of quantification								
GU/L= Genomic Units per Liter								
CFU/L=Colony Forming Units per Liter								
Lp=Legionella pneumophila								
Lsp=Legionella species								
PAGE=Page Saline (sterile)								

3.2.4 Gesamtdarstellung der Resultate 2022 von Lugano

An den 3 Daten (21.07.22, 03.10.22 und 06.12.2022) wurden insgesamt 41 Proben erhoben. Die PCR-Daten von Bellinzona sind in der Tabelle 4 zusammengefasst. Mit der Standardkultivierungsmethode ISO 11731 wurde wie in Zürich in keiner der Proben Legionellen nachgewiesen. Mit PCR von Diatheva wurde *Legionella* spp. in einem Bereich von 1'200 bis 2'700'000 Kopien pro Liter im Verteilnetz von Lugano gemessen. In zwei Hydranten (Nr. 5656 und 6514) wurden *L. pneumophila* nachgewiesen. Beim Hydranten Nr. 6514 wurden in beiden Probenahmen vom 03.10.22 und 06.12.2022 *L. pneumophila* nachgewiesen. Es konnte mit dem Amöben-Platten-Test *L. pneumophila* kultiviert und isoliert werden. Die Stämme wurden zur Serotypisierung an das Referenzlabor in Bellinzona geschickt. Alle eingeschickten Stämme wurden als *L. pneumophila* SG 3 identifiziert. In einer von drei Beprobungen wurden beim Hydrant Nr. 5656 *L. pneumophila* nachgewiesen. Bei der ersten Probenahme vom 21.07.22 wurden *L. pneumophila* in tiefer Konzentration von 1'088 Kopien pro Liter nachgewiesen. Bei den beiden nachfolgenden Probenahmen vom 03.10.22 und 06.12.2022 wurden keine *L. pneumophila* mehr festgestellt.

Tabelle 7 PCR-Resultate vom Referenzlabor Bellinzona der Proben von Lugano vom 21.07.2022, 03.10.2022 und 06.12.2022. In zwei Hydranten (Nr. 6514 und Nr. 5656) wurden *L. pneumophila* nachgewiesen.

Proben Nr.	Probenahmestelle	Bemerkung	¹ Legionelle pneumophila [GU/L]	¹ Legionella spp. [GU/L]	1Legionelle pneumophila [GU/L]2	1Legionella spp. [GU/L]	1Legionelle pneumophila [GU/L]4	1Legionella spp. [GU/L]
			21.07.2022	21.07.2022	03.10.2022	03.10.2022	06.12.2022	06.12.2022
Luga10	SE Massagno	Quelle	0	4.80E+04				
Luga11	SE Bioggio	Grundwasser	0	2.80E+03				
Luga12	SE Gemmo	Reservoir	0	4.80E+03				
Luga13	CL Pian Casoro	See	0	1.50E+06				
Luga14	SE Bassone	Reservoir	0	3.10E+05				
Luga15	ST Cassorate	See	0	1.80E+06				
Luga01	Hydrant 5427 Via Lugia 7, 6914 Carona	Temperaturproblem	0	2.70E+06				
Luga02	Brunnen 266, Sente Bré 3, 6978 Gandria	Temperaturproblem	0	3.80E+05				
Luga03	Hydrant 5970, Piazza D'Avra 3, 6968 Sonvico	Rostproblem	0	2.70E+05				
Luga05	Hydrant 6231, Via Bettramina 9	Erhöhte Fallzahlen	0	1.60E+05				
Luga06	Brunnen 230, Piazza Dante 1	Altstadt Lugano	0	1.30E+04				
Luga07	Brunnen 51 Viale dei Faggi, Lugano	Altstadt Lugano	0	3.30E+04				
Luga08	Hydrant 5136, Via G. Motta, Lugano	Altstadt Lugano	0	2.80E+05				
Luga09	Brunnen 116 Lugano	Altstadt Lugano	0	9.60E+04				
Lugb01	Via Terzerina 5, Pregassona Hydrant Nr. 6212	Erhöhte Fallzahlen			0	1.70E+05	0	6.54E+05
	Hydrant Nr. 5770	Erhöhte Fallzahlen					0	6.90E+05
Lugb02	Via Trevano 86, Molino Nuovo Hydrant Nr. 5691	Erhöhte Fallzahlen			0	1.20E+03		
Lugb03	Via Sara Frontini 2, Viganello Hydrant Nr. 5672	Erhöhte Fallzahlen			0	1.80E+04	0	9.35E+05
Lugb04	Via Luganetto 4, Viganello Hydrant Nr. 6388	Erhöhte Fallzahlen			0	8.30E+03	0	2.25E+05
Lugb05	Via Giovanni Ferri 2, Molino Nuovo Hydrant Nr. 5491	Erhöhte Fallzahlen			0	6.60E+03	0	1.40E+05
Lugb06	Via Trevano 30, Molino Nuovo Hydrant Nr. 929	Erhöhte Fallzahlen			0	2.10E+03	0	3.81E+05
Lugb07	Via Gulielmo Canevascini 4, Besso Hydrant Nr. 5091	Erhöhte Fallzahlen			0	4.20E+03	0	3.18E+04
Lugb08	Piazza Cinque vie 5, Breganzona Hydrant Nr. 6514	Erhöhte Fallzahlen			7900	3.80E+04	18681	5.54E+05
Lugb09	Via Camara 33, Breganzona Hydrant Nr. 5299	Erhöhte Fallzahlen			0	4.20E+03		
Lugb10	Via Cresperone 2, Breganzona Hydrant Nr. 5656	Erhöhte Fallzahlen	1088	5.70E+05	0	2.00E+04	0	2.27E+05
	Via G. eF. Ciani 33, Hydrant Nr. 5706	Erhöhte Fallzahlen					0	3.79E+05
	Via Ernesto Pelloni 2, Hydrant Nr. 5659	Erhöhte Fallzahlen					0	2.64E+05
	Piazza Arch. C. Frasca 1, Hydrant Nr. 5607	Erhöhte Fallzahlen					0	7.24E+05
	Via al Poggio 7, Hydrant Nr. 5192	Erhöhte Fallzahlen					0	1.11E+06
	Via Casarico 27A, Hydrant Nr. 5549	Erhöhte Fallzahlen					0	3.06E+05
	Via Avv. B. Leoni 67, Hydrant Nr. 5240	Erhöhte Fallzahlen					0	2.63E+05
	Hydrant Nr. 6252	Erhöhte Fallzahlen					0	3.25E+05

3.2.5 Probenahme 2023 in Lugano

In Lugano wird regelmässig einer der höchsten Legionellose-Inzidenzraten in der Schweiz festgestellt. Speziell in den Quartieren von Breganzona und Molino Nuovo wurden deutlich erhöhte Legionellose-Fallzahlen festgestellt. Eine Ursache für diese lokal erhöhten Fallzahlen konnte bisher nicht gefunden werden.

Aufgrund dieser risikobasierten Überlegungen und den Resultaten von 2022 wurde für 2023 eine Legionellen-Messkampagne in den Quartieren von Breganzona und Molina Nuovo durchgeführt. Es wurden von Federica Zanni 5 Hydranten und das Leitungswasser beim Hauseintritt bei der Grundschule Via B. Folettei 16 in Massagno risikobasiert ausgewählt.

Tabelle 8 Die 6 Probenahmestellen von 5 Hydranten und einen Gebäudeeingang im Verteilnetz der Stadt Lugano im Quartier Breganzona und Molina Nuova, welche 2023 monatlich beprobt werden.

Piazza Cinque vie 5, Breganzona Hydrant Nr. 6514
Via Morena 9, Massagno, Hydrant 6381
Via Cresperone 2, Breganzona Hydrant Nr. 5656
Via Cresperone 8, Breganzona, Hydrant Nr. 5660
Via Losanna 8, Molino Nuovo, Hydrant 5162
Grundschule in Via B. Folettei 16 in Massagno Hauseingang

Resultate

In den folgenden Abbildungen sind die Temperatur- und Legionellenmessungen in den nördlichen Randzonen des Verteilnetzes zusammengefasst.

Temperaturmessung

Die Temperatur wurde im Felde bei der Probenahme gemessen. Bei den Hydranten wurde die Temperatur jeweils nach 4 Liter Vorlauf im 5. Liter gemessen. Beim Hauseintritt Grundschule Via B. Folettei im Quartier Massagno wurde die Temperatur nach 10 Minuten Vorlauf gemessen. In der Abbildung 16 sind die gemessenen Temperaturen über das Jahr 2023 im Verteilnetz der Stadt Lugano dargestellt.

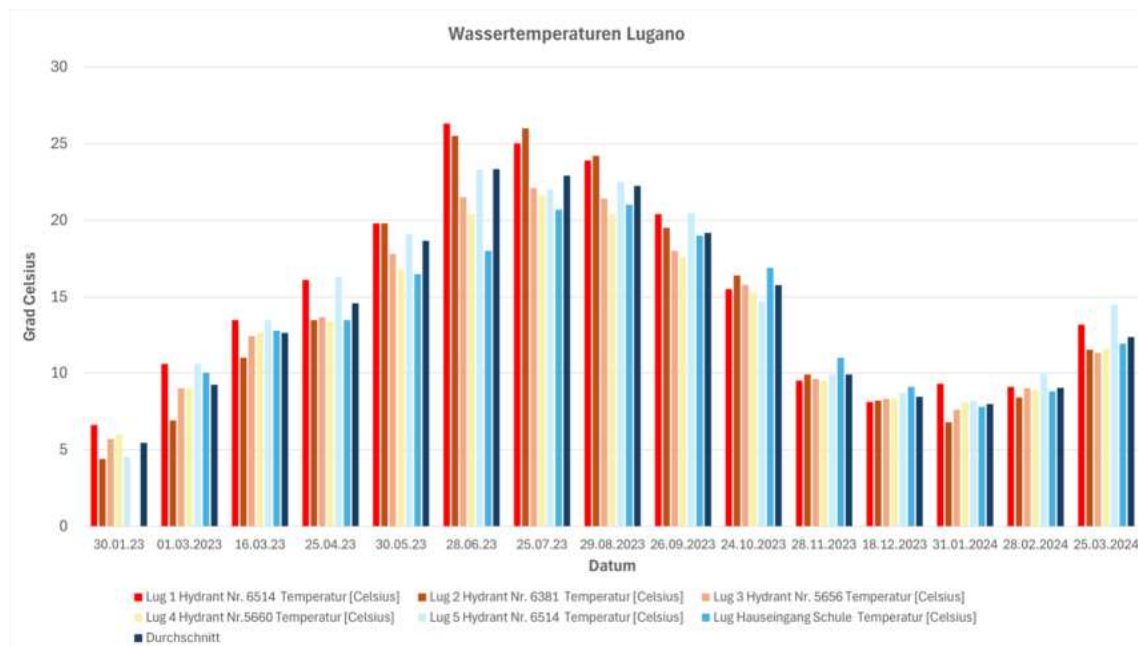


Abbildung 16 Wassertemperaturen der 6 Probenahmestellen in Lugano während der Probenahme von Januar bis August 2023. Ab Mai werden im durchflossenen Verteilnetz Temperaturen über 15°C gemessen. In den Sommermonaten Juni / Juli / August werden bei den Wasserproben von Hydranten Temperaturen über 20°C stellenweise über 25°C gemessen.

Legionella spp. qPCR

In der Abbildung 17 werden die gemessenen *Legionella* spp. in den Quartieren von Brenganzona und Molina Nuovo des Verteilnetzes der Stadt Lugano im Jahresverlauf graphisch dargestellt. Es wird eine Erhöhung der *Legionella* spp. – Konzentration im Monat Mai / Juni festgestellt. In den darauffolgenden Monaten schwankten die gemessenen *Legionella* spp. – Konzentrationen auf höherem Niveau. Die mit PCR gemessenen Konzentrationen lagen bei den 41 doppelt untersuchten Proben bei minimal $5.6 \cdot 10^3$ bis maximal $4.8 \cdot 10^8$ Kopien pro Liter. Der Durchschnitt lag bei $1.6 \cdot 10^7$ Kopien pro Liter.

Die Konzentration von *Legionella* spp. steigt im Frühjahr mit steigenden Temperaturen an. Ab Juni nimmt sie wieder ab und ist im August und September sehr niedrig. Von Oktober bis Dezember ist ein leichter Anstieg zu verzeichnen. Es wird vermutet, dass dieser Anstieg nicht durch die Temperatur, sondern durch die Nährstoffverfügbarkeit reguliert wird. Im See findet im Frühjahr und Herbst eine Durchmischung statt. Durch die Durchmischung gelangt nährstoffreicheres Tiefenwasser in die oberen Schichten. Dies kann im Frühjahr und Herbst zu einem erhöhten Nährstoffgehalt im Trinkwasser und damit zu erhöhten Konzentrationen von *Legionella* spp. führen. Interessanterweise wurde dieses Phänomen auch bei der Wasserversorgung Zürich beobachtet (Abbildung 14).

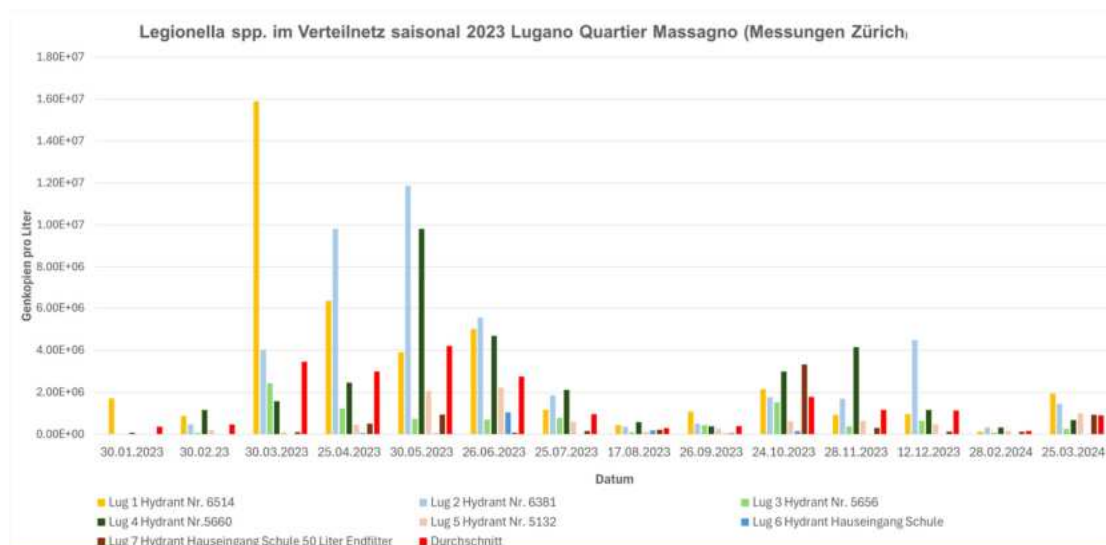


Abbildung 17 Der Verlauf der Konzentration von *Legionella* spp. gemessen durch qPCR bei den 6 Probenahmestellen in den Quartieren von Breganzona und Molina Nuovo des Wasserverteilnetzes der Stadt Lugano. Die Probenahme erfolgten von Januar bis Juli 2023. Bei der oberen Abbildung sind die Messungen vom Referenzlabor Bellinzona dargestellt. Es wurde bei 5 Hydranten nach 5 Liter Vorlauf der 3. Liter für die PCR-Analysen des Referenzlabors in Bellinzona und der 4. Liter für die PCR-Analysen der Universität Zürich abgefüllt. Beide Labors führten den Nachweis von *Legionella* spp. mit dem PCR-Kit von Diatheva durch.

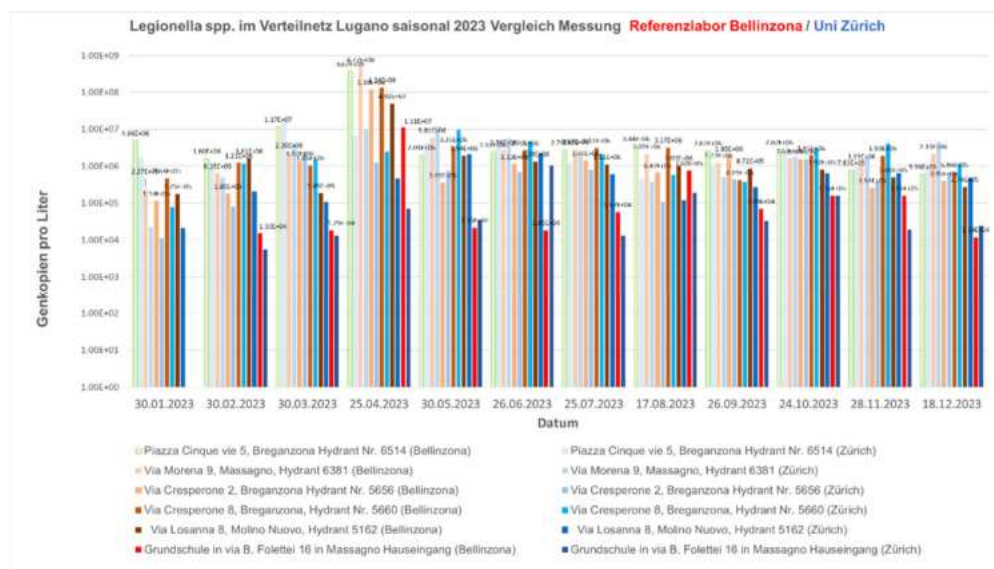


Abbildung 18 Vergleich der qPCR-Messungen des Referenzlabor Bellinzona und Universität Zürich. Beide Labors benutzten den gleichen PCR-Kit von Diatheva. Mit Ausnahme der Proben vom 25.04.2023 sind die Resultate der beiden Labore vergleichbar.

Totalzellzahl (TZZ)

Die Totalzellzahl beziehungsweise Bakterienzellkonzentration wurden in den Proben von Juni und August 2023 in den Proben des Verteilnetz von Lugano gemessen (Abbildung 19). Generell konnte eine Erhöhung der Bakterienzellkonzentration vom Monat Juni zum Monat August festgestellt werden. So erhöhte sich beim Hauseingang der Grundschule in der Via B. Folletti die TZZ von $2.5 \cdot 10^4$ Zellen pro ml auf $1.9 \cdot 10^5$ Zellen pro ml. Ursache hierfür könnte eine Veränderung des Mischungsverhältnisses oder eine verstärkte Vermehrung durch die Erwärmung des Wassers im Leitungsnetz während der Sommermonate sein. Im Hydranten Nr. 6514 wurde mit Abstand höchste Totalzellzahl gemessen. Dies ist zugleich der Hydrant, mit den höchsten Wassertemperaturen und aus dem mehrmals *L. pneumophila* isoliert werden konnte.

Die Bakterienzellkonzentration von Wasserproben aus Hydranten ist mit 4 Liter Vorlauf deutlich höher als mit 30 Liter Vorlauf. Nach 30 Liter Vorlauf sind die Bakterienzellkonzentrationen vergleichbar mit denen von Laufbrunnen (Abbildung 20).

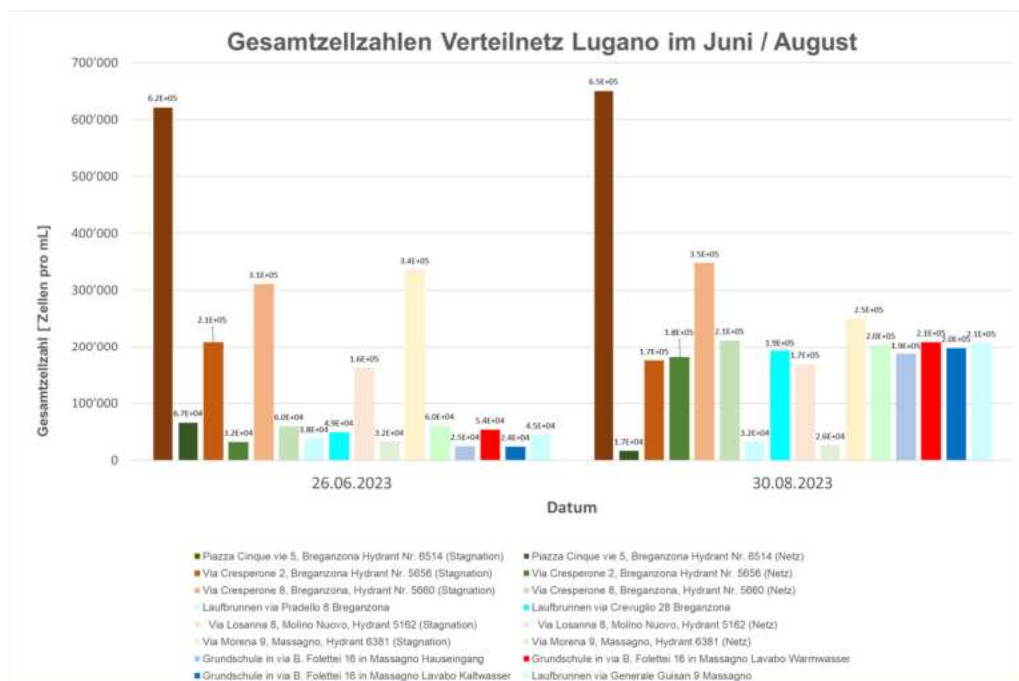


Abbildung 19 Totalzellzahl beziehungsweise Bakterienzellkonzentration der Proben aus dem Verteilnetz der Stadt Lugano der Monate Juni und August 2023.

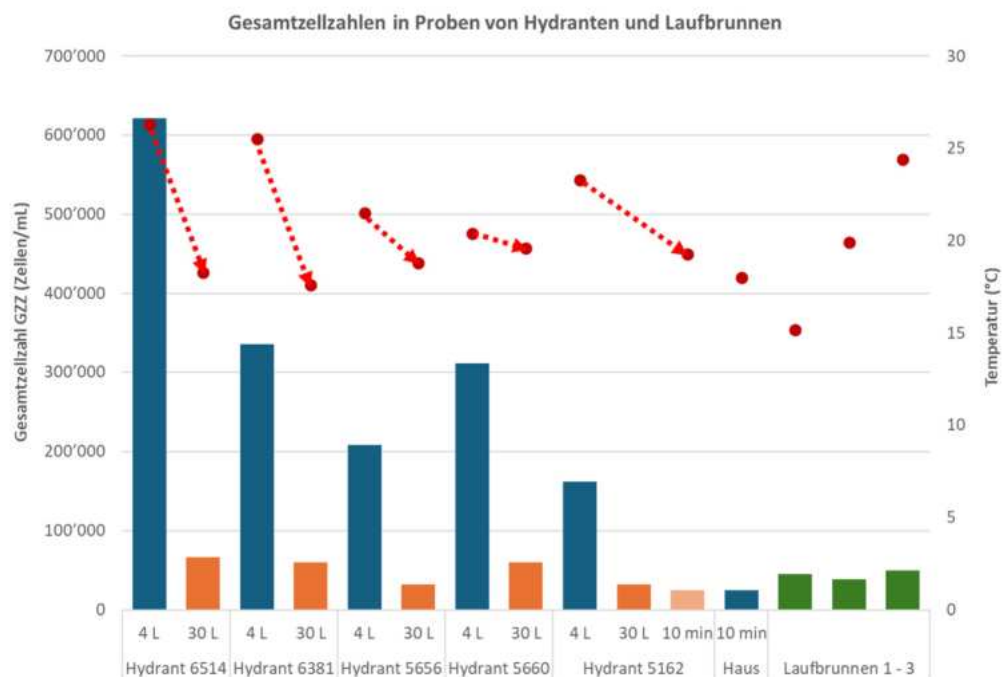


Abbildung 20 Es ist deutlich erkennbar, dass die gemessenen Gesamtzellzahlen in den Hydranten abhängig sind vom Vorlauf. Die tiefen Zellkonzentrationen aus den Laufbrunnen (1. Via Generale Guisan 9, 2. Via Pradello 8, 3. Via Crevuglio 28) wie auch Hauseingang Grundschule in der Via B. Foletti 16 als Referenz zeigen auf, dass das Wasser in den Hydranten und deren Zuleitungen verkeimt. Die Proben sind alle vom 26.06.2023. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die Stagnation und die Erwärmung im Sommer zurückzuführen.

Legionella pneumophila PCR 50 Liter-Filterbeprobung

Bei der Grundschule Via B. Foletti 16 in Massagno wurde beim Hauseingang eine 50 Literbeprobung durchgeführt, um *L. pneumophila* im tiefen Bereich nachweisen zu können. Es konnte aber auch mit der 50 Liter-Filterbeprobung keine *L. pneumophila* oberhalb der für 50 Liter nach unten extrapolierten Nachweisgrenze von 6.4 Genkopien pro Liter in allen Monatsproben nachgewiesen werden.

Amöben-Platten-Test

Mit dem Amöben-Platten-Test wurde ausser in der Probe Hydrant Nr. 6514 vom 03.10.2022 und 06.12.2022 in allen anderen Proben keine Legionellen nachgewiesen. Die isolierten Kolonien wurden in das Referenzlabor Bellinzona eingeschickt und mit dem Agglutinationstest als *L. pneumophila* SG 3 bestimmt.

Standardkultivierung ISO 11731

Mit der Standardkultivierungsmethode ISO 11731 ausgeführt durch das Referenzlabor Bellinzona wurden in zwei Proben jeweils vom Hydrant Nr. 6514 vom 30.01.2023 und vom 30.03.2023 jeweils eine Legionellen-Kolonie bei der Direktplattierung nachgewiesen. Dies entspricht einer Konzentration von 1000 KBE pro Liter. Die beiden isolierten Kolonien wurden im Referenzlabor Bellinzona mit dem Agglutinationstest als *L. pneumophila* SG 1 bestimmt. Alle drei Isolate wurden sequenziert. In allen anderen Proben konnten keine Legionellen nachgewiesen werden.

In Tabelle 9 sind alle PCR- und Kulturnachweise von *L. pneumophila* zusammengefasst. *L. pneumophila* konnte nur in Hydranten, nicht aber aus Wasserproben aus Laufbrunnen oder beim Hauseingang Grundschule Via B. Folettei 16 nachgewiesen werden.

Tabelle 9 Nachweis von *L. pneumophila* durch PCR und Isolation durch Kultivierungsmethoden wie ISO 11731 und Amöben-Platten-Test.

Datum	Labor	Hydrant Nr. 6514	Hydrant 6381	Hydrant Nr. 5656	Hydrant Nr. 5660	Hydrant 5162	Hauseingang
21.07.2022	Zürich	0	0	1'088	0	0	0
03.10.2022	Zürich	7'900	0	0	0	0	0
06.12.2022	Zürich	18'681 Isolation <i>L.pneumophila</i> SG 3	0	0	0	0	0
30.01.2023	Bellinzona	detected Isolation <i>L.pneumophila</i> SG 1	0	0	0	0	0
30.01.2023	Zürich	828	0	0	0	0	0
30.02.2023	Bellinzona	<LOQ	0	0	0	0	0
30.02.2023	Zürich	<LOQ	0	0	0	0	0
30.03.2023	Bellinzona	3'750 Isolation <i>L.pneumophila</i> SG 1	0	0	0	0	0
30.03.2023	Zürich	2'160	0	0	0	0	0
25.04.2023	Bellinzona	<LOQ	0	0	0	0	0
25.04.2023	Zürich	2'336	0	0	0	0	0
30.05.2023	Bellinzona	2'800	0	0	0	0	0
30.05.2023	Zürich	1'938	<LOQ	1'740	0	0	0
26.06.2023	Bellinzona	<LOQ	0	0	0	0	0
26.06.2023	Zürich	2'719	0	<LOQ	0	0	0
25.07.2023	Bellinzona	<LOQ	0	0	0	0	0
25.07.2023	Zürich	<LOQ	0	0	0	0	0
17.08.2023	Bellinzona	<LOQ	0	0	0	0	0
17.08.2023	Zürich	0	0	0	0	0	0
26.09.2023	Bellinzona	<LOQ	0	0	0	0	0
26.09.2023	Zürich	0	0	0	0	0	0
24.10.2023	Bellinzona	<LOQ	0	0	0	0	0
24.10.2023	Zürich	0	0	0	0	0	0
28.11.2023	Bellinzona	0	0	0	0	0	0
28.11.2023	Zürich	0	0	0	0	0	0
18.12.2023	Bellinzona	0	0	0	0	0	0
18.12.2023	Zürich	0	0	0	0	0	0
31.01.2024	Zürich	0	0	0	0	0	0
28.02.2024	Bellinzona	0	0	0	0	0	0
28.02.2024	Zürich	0	0	0	0	0	0
25.03.2024	Bellinzona	<LOQ	0	0	0	0	0
25.03.2024	Zürich	0	8'397	0	29'364	0	0
24.04.2024	Bellinzona	0	<LOQ	0	0	0	0
24.04.2024	Zürich	0	0	0	0	0	0

3.2.6 Geographische Verteilung: Screening von 94 Hydranten

Einführung

Neben der Saisonalität wurde auch die geographische Verteilung der Legionellenkontamination im Verteilnetzes abgeklärt. Es wurden deshalb 94 Hydranten in den Quartieren Bre-ganzona von Lugano überprüft (Tabelle 11 und Abbildung 22), in denen vermehrte Legionellolsefälle in den letzten Jahren zu verzeichnen waren (persönliche Kommunikation mit Dr. Valeria Gaia, Referenzlabor Bellinzona). Die Hydranten-Proben wurden am 06.03., 13.03. und 17.04.2024 erhoben. Ziel der Beprobung war es abzuklären, wie gross der Anteil der mit *L. pneumophila* bzw. *L. pneumophila* SG 1 kontaminierten Hydranten sind.

Material und Methoden

Beprobung

Die Hydranten-Proben wurden von Mitarbeitern des AIL nach folgendem Ablauf erhoben: 5 Liter Vorlauf verwerfen, 6. Liter à 1 Liter Probengefäss A (1. PCR Zürich), 7. Liter Probengefäss B (2. PCR), 8. Liter à 1 Liter Probengefäss C (Amöben-Platten-Test), d) 8.0 bis 8.25 Liter à 250 ml Gefäss C für die Bestimmung der Totallzellzahl.

Tabelle 10 Durchgeführte Analysen Screening von 94 Hydranten

Methode	Kit	Analyten
qPCR	Promega GoTaq® <i>Legionella</i> spp./ <i>L. pneumophila</i> /SG1 qPCR Bestellnummer: AM2202	<i>Legionella</i> spp. <i>L. pneumophila</i> <i>L. pneumophila</i> SG1
Amöben-Platten-Test	Gemäss Hilbi Ref. [3] Gemäss Kapitel 2	Legionellen
Bestimmung der Totallzellzahl	b-Novate gemäss Kapitel 2	Totalzellzahl (TZZ) Verteilung LNA/HNA-Bakterien

qPCR in Kombination mit DNA-Extraktion Maxwell

Für den qPCR-Nachweis wurden das kommerzielle Kit von Promega (AM2202) für den Triplex-Nachweis von *Legionella* spp., *L. pneumophila* und *L. pneumophila* SG 1 verwendet.

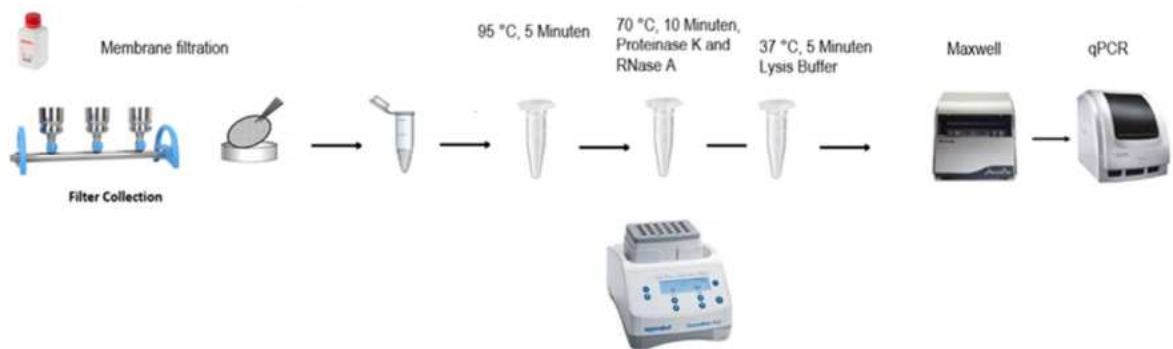


Abbildung 21 Verfahrensschritte zum Nachweis von Legionellen in Wasserproben mittels qPCR. Zunächst wird eine Probe von 100-1000 ml Duschwasser durch Membranfiltration angereichert. Die DNA wird mittels Maxwell (Promega) extrahiert und aufgereinigt und anschliessend werden die Legionellen durch qPCR nachgewiesen.

a) Probenahme

Die Proben sind in sterilen Behältern unter Einhaltung aller erforderlichen Vorsichtsmassnahmen zu entnehmen.

Lagerung

Die Analyse sollte vorzugsweise sofort nach der Probenahme beginnen. Wenn die Proben innerhalb von 24 Stunden nach der Probenahme im Labor eintreffen, können sie bei Raumtemperatur versandt werden. Liegen jedoch mehr als 24 Stunden zwischen der Probenahme und dem Eintreffen im Labor, muss der Versand bei $+5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ erfolgen. Im Labor sollten die Proben so schnell wie möglich membranfiltriert und bei -20°C eingefroren werden, wenn sie nicht am selben Tag analysiert werden können.

b) Anreicherung durch Membranfiltration

Zur Konzentration der Bakterien ein möglichst grosses Probenvolumen (normalerweise 1 Liter) filtrieren. Das Volumen der filtrierten Probe notieren. Es wird für die Berechnung der Ergebnisse benötigt. Die Nachweisgrenze und die Bestimmungsgrenze werden durch zu kleine Probenvolumina negativ beeinflusst und steigen entsprechend an.

c) DNA-Extraktion

Bei der Extraktion wird die DNA durch Lysieren der Mikroorganismen freigesetzt und anschliessend (oder gleichzeitig) gereinigt, wobei die anderen Bestandteile, insbesondere die PCR-Inhibitoren, so weit wie möglich entfernt werden.

Beispiel für DNA-Extraktion durch Maxwell Promega

1. Maxwell Nukleinsäureaufreinigung (Maxwell® RSC-PureFood GMO and Authentication (AS1600) Protokoll)
2. 800 µL CTAB-Puffer und in das 2-mL-Eppendorf-Tube mit Filter hinzufügen
3. Vortexen
4. Inkubation bei 95°C für 5 Minuten mit 1500 rpm (Heizblock)
5. 2 Minuten lang bei Raumtemperatur abkühlen lassen
6. 40 µL Proteinase K und 20 µL RNase A hinzufügen
7. Vortexen
8. 10 Minuten lang bei 70°C und 1500 rpm inkubieren (Heizblock)
9. 2 Minuten lang bei Raumtemperatur abkühlen lassen
10. Pipettieren von 300 µL Lysepuffer direkt in das 2-ml-Röhrchen.
11. Vortexen
12. Inkubation bei 37°C für 10 Minuten mit 1500 rpm (Heizblock)
13. Filter aus dem 2 ml Tube entfernen
14. Abfüllen der Lösung (ca. 1 ml) in das obere Reservoir der Maxwell-Patrone
15. 60 µl Elutionspuffer in Eppendorf-Tube aliquotieren.
16. Pipettenspitzen auf die Kolben platzieren
17. Starten des Protokolls "Maxwell® RSC "PureFood GMO and Authentication AS 1600" (Dauer ca. 36 Minuten)
18. Mit qPCR mit gereinigter 5 µl Nukleinsäureextrakt durchführen; Alternativ können die Proben bei -20°C für eine spätere Analyse aufbewahrt werden.

DNA-Extrakte sind bei 5°C ± 3 °C zu lagern und innerhalb von 24 Stunden nach ihrer Herstellung zu analysieren. Jede längere Lagerung bei dieser Temperatur erfordert eine Validierung. DNA-Extrakte können für mehrere Monate bei unter -18°C eingefroren werden.

Real-time PCR

Der Reaktionsmix oder Mastermix enthält 2x *Legionella* qPCR MasterMix, 20x IPC/Primer/Probe MasterMix und nukleinsäurefreies Wasser (alle von Promega). 15 µL des Mastermixes und 5 µL jeder DNA-Probe wurden aliquotiert. Die PCR wurde auf einem Rotor-gene 6000 Real-Time PCR System (Corbett, Australien) durchgeführt. Das qPCR-Thermocycling-Protokoll war wie folgt: Denaturierungsschritt 2 Minuten bei 95°C; 40 Zyklen Annealing-Schritt 15 Sekunden bei 95°C und 40 Zyklen Extensionsschritt 60 Sekunden bei 61°C.

Als Standard wurde *Legionella* Quantitative DNA-V2 von Promega verwendet. Jede Probe wurde doppelt gemessen.

Auswahl der Hydranten

Die Hydranten wurden von Federica Zanni (AIL) ausgewählt. In Abbildung 22 sind die Standorte der Hydranten ersichtlich.

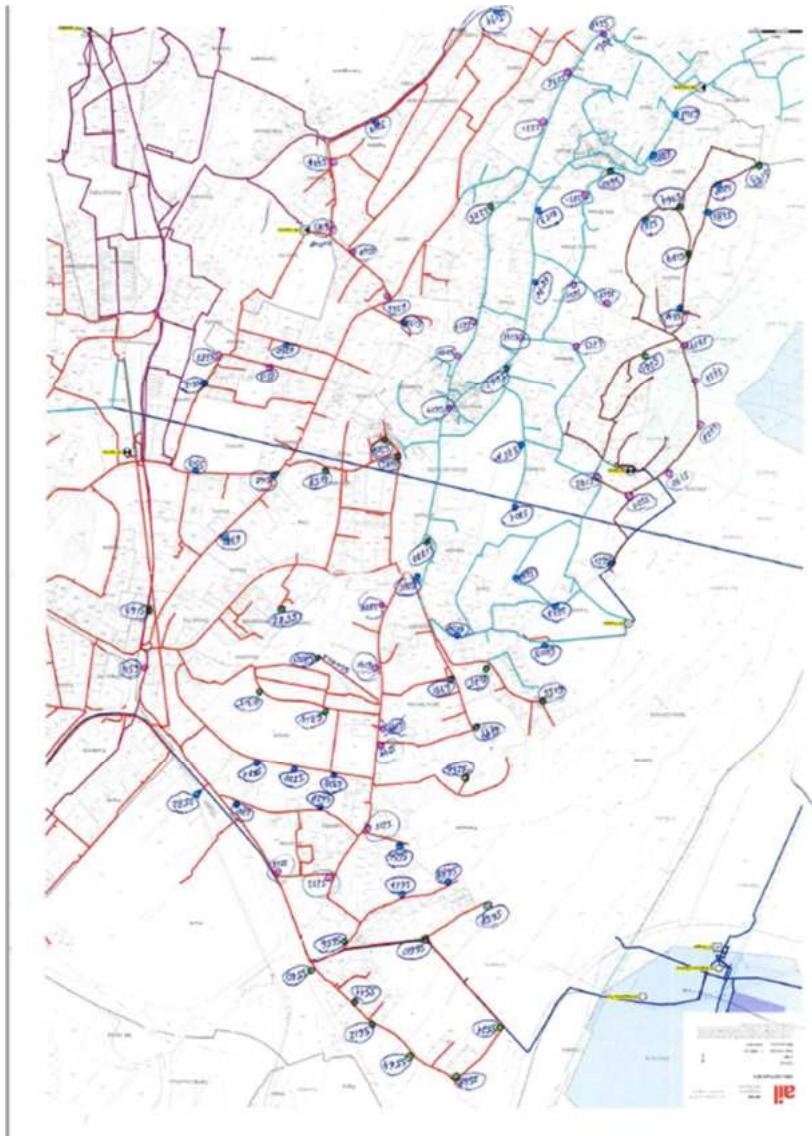


Abbildung 22 Hydranten im Quartier Breganzona in Lugano wurden beprobt. Die Auswahl wurde von Federica Zanni (AIL) getroffen.

Tabelle 11 In der untenstehenden Tabelle sind die Hydranten-Nummern, die Adressen, das Quartier, die Druckzone und das Probenahmedatum der 94 beprobten Hydranten angegeben.

Probe Nr.	Hydranten Nr.	Adresse	Quartier	Druckzone	Probenahme-datum
1	5607	Piazza Arch. C. Frasca 1, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	06.03.2024
2	6514	Piazza Cinque Vie 5, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024
3	5474	Via ai Ronchi 1, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024
4	6183	Via ai Ronchi 9, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024
5	5387	Via al Moretto 2, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024
6	5513	Via al Moretto 5, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024
7	5713	Via al Perato 8, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	06.03.2024
8	5501	Via al Poggio 11, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Alta	06.03.2024
9	5190	Via al Poggio 20, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Alta	06.03.2024
10	5728	Via al Poggio 25, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Alta	06.03.2024
11	5192	Via al Poggio 7, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Alta	06.03.2024
12	5222	Via alla Cava 13, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024
13	5831	Via alla Chiesa di Biogno 10, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	06.03.2024
14	5671	Via alla Chiesa di Biogno 7, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	06.03.2024

15	5000	Via Avv. B. Leoni 14, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	06.03.2024
16	5217	Via Avv. B. Leoni 20, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	06.03.2024
17	5231	Via Avv. B. Leoni 49, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	06.03.2024
18	5236	Via Avv. B. Leoni 58, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	06.03.2024
19	5240	Via Avv. B. Leoni 67, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	06.03.2024
20	5243	Via Bolio 23, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	06.03.2024
21	5027	Via Camara 19, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024
22	5215	Via Camara 27, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024
23	5299	Via Camara 33, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024
24	5799	Via Camara 45, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024
25	6141	Via Camara 52, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024
26	5829	Via Camara 67, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024
27	5479	Via Carà 17, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Alta	06.03.2024
28	5457	Via Carà 22, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Alta	06.03.2024
29	5547	Via Carà 9, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	06.03.2024
30	5549	Via Casarico 27A, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024

31	6566	Via Casarico 5, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	06.03.2024
32	5256	Via Costera 11, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
33	5571	Via Crespera 40, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
34	5568	Via Crespera 46, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
35	5564	Via Crespera 50C, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
36	5612	Via Crespera 56, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
37	5511	Via Crespera 67, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
38	5510	Via Crespera 76, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
39	5658	Via Cresperone 15, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
40	5656	Via Cresperone 2, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
41	5660	Via Cresperone 8, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
42	6175	Via Crevuglio 24, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	13.03.2024
43	6155	Via Crevuglio 31, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
44	6158	Via dei Bonoli 26, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
45	6182	Via dei Bonoli 53, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
46	6391	Via dei Casagrande 24A, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024

47	6499	Via dei Casagrande 30, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
48	5662	Via dei Somazzi 18, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	13.03.2024
49	5225	Via Don G. Gagliardi 8, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	13.03.2024
50	5582	Via Dott. G. Polar 24, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
60	5777	Via Dott. G. Polar 48, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	13.03.2024
61	6314	Via Federica Spitzer 14, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	13.03.2024
62	6370	Via Lucino 21, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
63	6142	Via Lucino 33, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
64	6137	Via Lucino 62A, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
65	5711	Via Maolino 2, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Alta	17.04.2024
66	5199	Via Muzzano 32A, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
67	5749	Via Muzzano 8, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
68	6385	Via Orbisana 19, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	17.04.2024
69	6148	Via Orbisana 20A, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	17.04.2024
70	5200	Via Orbisana 52, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Alta	17.04.2024
71	5484	Via Orbisana 58, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Alta	17.04.2024

72	5540	Via Orbisana 66, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Alta	17.04.2024
73	6230	Via Prada 14, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
74	5638	Via Pradello 17, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	17.04.2024
75	5637	Via Pradello 23A, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	17.04.2024
76	6194	Via Pradello 3, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	17.04.2024
77	5621	Via Pradello 32, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Alta	17.04.2024
78	5509	Via Pradello 8, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	17.04.2024
79	5317	Via Rovere 3, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
80	5688	Via S. Antonio 14, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
81	5677	Via S. Antonio 17, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
82	6341	Via S. Carlo 1, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
83	5628	Via S. Carlo 11, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
84	5532	Via S. Carlo 1A, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
85	5654	Via S. Carlo 27, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
86	6576	Via Sarera 17, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	17.04.2024
87	6153	Via Sarera 4, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	17.04.2024

88	5757	Via Sass Curona 13, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	17.04.2024
89	5701	Via Sass Curona 21, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	17.04.2024
90	5512	Via Valleggia 24, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
91	5771	Via Vergiò 24, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
92	5770	Via Vergiò 30, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
93	6339	Via Vergiò 38, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Alta Integrata	17.04.2024
94	6245	Vicolo Selvetta 5, Breganzona	Lugano Breganzona	ZD Breganzona Media	17.04.2024

Resultate

In 21 von 94 Hydranten-Proben aus Lugano wurden sowohl *L. pneumophila* als auch *L. pneumophila* SG 1 mittels PCR nachgewiesen. Die Konzentration war aber relativ tief und betrug maximal 480 Genkopien pro Liter (Tabelle 12). In nachfolgenden Messungen konnten keine *L. pneumophila* nachgewiesen werden (Tabelle 13 und Tabelle 14). Dies ist eventuell auf den Auswascheffekt bei der Probenahme zurückzuführen.

Tabelle 12 In der untenstehenden Tabelle sind die Resultate der Analysen der 94 Hydranten-Proben zusammengefasst. Orange markiert sind die positiven Befunde von *L. pneumophila* oder *L. pneumophila* SG 1. In allen Proben konnten keine Legionellen mit dem Amöben-Platten-Test nachgewiesen werden.

Nr.	Hydrant Nr.	Legionella spp. [GE pro L]	L. pneumophila [GE pro L]	L. pneumophila SG 1 [GE pro L]	TCC (cells/mL)	HNAP (%)	Braunverfärbung / Bodensatz
1	5607	7.8E+05	0.0E+00	0.0E+00	2.75E+05	58.8%	klar ohne Bodensatz
2	6514	3.0E+04	0.0E+00	0.0E+00	1.12E+05	56.0%	klar ohne Bodensatz
3	5474	1.8E+05	0.0E+00	0.0E+00	4.20E+05	48.8%	Bodensatz schwach
4	6183	1.0E+05	0.0E+00	0.0E+00	3.43E+05	51.5%	Bodensatz stark
5	5387	3.4E+06	0.0E+00	0.0E+00	4.09E+05	49.6%	Bodensatz stark
6	5513	1.0E+04	0.0E+00	0.0E+00	1.03E+05	40.8%	klar ohne Bodensatz
7	5713	1.1E+05	3.5E+01	0.0E+00	8.57E+05	79.5%	Bodensatz schwach
8	5501	6.7E+05	0.0E+00	0.0E+00	3.47E+05	64.9%	Bodensatz schwach
9	5190	3.0E+05	0.0E+00	0.0E+00	2.09E+05	59.7%	klar ohne Bodensatz
10	5728	1.7E+05	0.0E+00	0.0E+00	1.62E+05	50.3%	Bodensatz mittel
11	5192	1.5E+05	0.0E+00	0.0E+00	3.48E+05	67.7%	klar ohne Bodensatz
12	5222	6.9E+05	7.7E+00	0.0E+00	3.39E+05	59.9%	Bodensatz mittel
13	5831	6.4E+05	0.0E+00	0.0E+00	5.97E+05	53.2%	Bodensatz stark
14	5671	5.3E+05	0.0E+00	0.0E+00	1.09E+05	54.7%	klar ohne Bodensatz
15	5000	1.3E+05	0.0E+00	0.0E+00	3.12E+05	53.0%	Bodensatz schwach
16	5217	5.2E+04	0.0E+00	0.0E+00	2.51E+05	57.0%	Bodensatz schwach
17	5231	3.7E+03	0.0E+00	0.0E+00	8.91E+04	41.0%	Bodensatz mittel
18	5236	2.8E+06	0.0E+00	0.0E+00	5.72E+05	52.3%	Bodensatz mittel
19	5240	8.2E+04	0.0E+00	0.0E+00	3.01E+05	56.7%	Bodensatz schwach
20	5243	1.8E+06	0.0E+00	0.0E+00	4.02E+05	64.5%	Bodensatz schwach
21	5027	5.1E+04	7.3E+00	0.0E+00	3.98E+05	27.3%	klar ohne Bodensatz
22	5215	1.7E+05	0.0E+00	0.0E+00	2.90E+05	52.0%	Bodensatz mittel
23	5299	1.7E+05	0.0E+00	0.0E+00	2.37E+05	50.3%	Bodensatz schwach
24	5799	1.8E+05	1.0E+02	3.2E+01	1.04E+06	74.4%	klar ohne Bodensatz
25	6141	3.3E+05	0.0E+00	0.0E+00	8.59E+05	74.7%	Bodensatz mittel
26	5829	1.2E+06	0.0E+00	0.0E+00	1.49E+05	49.5%	klar ohne Bodensatz
27	5479	4.0E+05	0.0E+00	0.0E+00	1.42E+05	39.3%	Bodensatz schwach
28	5457	1.7E+05	0.0E+00	0.0E+00	2.54E+05	66.8%	klar ohne Bodensatz
29	5547	5.7E+04	0.0E+00	0.0E+00	2.30E+05	44.4%	klar ohne Bodensatz
30	5549	3.4E+05	1.3E+00	0.0E+00	2.44E+05	46.8%	Bodensatz schwach
31	6566	2.5E+05	0.0E+00	0.0E+00	2.64E+05	67.9%	Bodensatz schwach
32	5256	5.5E+04	4.9E+01	0.0E+00	7.94E+05	37.9%	Braunverfärbung stark
33	5571	4.0E+04	1.0E+02	7.9E+01	5.99E+05	46.6%	Bodensatz mittel
34	5568	2.5E+04	0.0E+00	0.0E+00	1.43E+05	59.4%	klar ohne Bodensatz
35	5564	9.9E+02	0.0E+00	0.0E+00	3.13E+05	57.5%	Bodensatz mittel
36	5612	4.0E+04	0.0E+00	0.0E+00	2.73E+05	77.1%	Bodensatz schwach
37	5511	2.1E+03	0.0E+00	0.0E+00	3.54E+05	56.5%	Bodensatz mittel
38	5510	4.0E+04	0.0E+00	0.0E+00	2.05E+05	68.4%	klar ohne Bodensatz
39	5658	1.8E+05	0.0E+00	0.0E+00	2.04E+05	62.5%	klar ohne Bodensatz
40	5656	1.7E+05	0.0E+00	0.0E+00	2.15E+05	63.2%	klar ohne Bodensatz
41	5660	1.1E+05	0.0E+00	0.0E+00	2.00E+05	62.0%	klar ohne Bodensatz
42	6175	2.6E+07	0.0E+00	0.0E+00	1.15E+06	35.0%	Bodensatz schwach
43	6155	4.5E+05	0.0E+00	0.0E+00	5.95E+05	56.6%	Bodensatz schwach
44	6158	1.1E+05	0.0E+00	0.0E+00	1.45E+05	48.0%	klar ohne Bodensatz
45	6182	3.3E+04	0.0E+00	0.0E+00	5.17E+05	78.3%	Bodensatz schwach
46	6391	7.9E+05	2.3E+01	0.0E+00	6.19E+05	56.4%	Bodensatz mittel
47	6499	4.0E+05	3.0E+01	0.0E+00	4.62E+05	68.6%	klar ohne Bodensatz
48	5662	2.0E+06	0.0E+00	0.0E+00	4.43E+05	63.3%	klar ohne Bodensatz
49	5225	2.3E+04	0.0E+00	0.0E+00	4.14E+05	60.9%	Bodensatz schwach
50	5582	8.6E+05	0.0E+00	0.0E+00	1.06E+06	70.4%	Bodensatz schwach
51	5777	1.5E+05	0.0E+00	0.0E+00	5.19E+05	69.2%	Bodensatz mittel
52	6314	5.7E+04	0.0E+00	0.0E+00	2.95E+05	58.9%	Bodensatz schwach
53	6315	1.1E+05	0.0E+00	0.0E+00	3.81E+05	71.9%	klar ohne Bodensatz
54	5800	1.6E+04	0.0E+00	0.0E+00	2.07E+05	58.6%	klar ohne Bodensatz
55	5610	1.6E+05	0.0E+00	0.0E+00	2.99E+05	56.1%	klar ohne Bodensatz
56	5189	1.2E+06	0.0E+00	0.0E+00	3.77E+05	55.2%	klar ohne Bodensatz
57	5764	2.9E+05	0.0E+00	0.0E+00	3.84E+05	44.7%	Bodensatz mittel
58	5193	9.0E+05	0.0E+00	0.0E+00	3.37E+05	44.9%	Bodensatz schwach
59	5207	2.2E+04	0.0E+00	0.0E+00	3.27E+05	71.3%	klar ohne Bodensatz
60	5163	9.5E+04	0.0E+00	0.0E+00	2.44E+05	66.1%	klar ohne Bodensatz
61	5741	2.0E+05	5.3E+02	3.5E+02	6.56E+05	39.1%	klar ohne Bodensatz
62	6370	4.1E+03	0.0E+00	0.0E+00	3.22E+05	81.0%	klar ohne Bodensatz
63	6142	5.3E+04	0.0E+00	0.0E+00	1.36E+05	65.4%	klar ohne Bodensatz

Nr.	Hydrant Nr.	Legionella spp. [GE pro L]	L. pneumophila [GE pro L]	L. pneumophila SG 1 [GE pro L]	TCC (cells/mL)	HNAP (%)	Braunverfärbung / Bodensatz
64	6137	2.2E+06	0.0E+00	0.0E+00	5.08E+05	64.3%	
65	5711	9.0E+05	0.0E+00	0.0E+00	1.02E+06	55.5%	
66	5199	5.1E+04	0.0E+00	0.0E+00	3.89E+05	54.5%	
67	5749	2.4E+05	1.6E+02	1.9E+02	3.63E+05	72.8%	
68	6385	1.4E+05	2.7E+02	4.8E+02	5.75E+05	67.3%	
69	6148	1.9E+04	0.0E+00	2.2E+01	5.16E+05	86.3%	
70	5200	3.7E+05	0.0E+00	1.5E+01	1.43E+06	85.1%	
71	5484	2.7E+05	0.0E+00	0.0E+00	9.35E+05	69.5%	
72	5540	1.7E+04	0.0E+00	0.0E+00	5.50E+05	68.1%	
73	6230	6.1E+04	0.0E+00	0.0E+00	3.14E+05	68.4%	
74	5638	1.1E+05	0.0E+00	0.0E+00	1.49E+06	78.6%	
75	5637	1.9E+05	4.4E+02	1.4E+02	7.05E+05	87.4%	
76	6194	6.1E+04	1.1E+02	4.9E+01	7.02E+05	43.6%	
77	5621	1.6E+05	2.8E+02	1.4E+02	8.58E+05	81.4%	
78	5509	2.4E+04	4.6E+02	3.2E+02	5.52E+05	81.0%	
79	5317	1.2E+04	3.0E+01	1.3E+01	1.55E+05	67.6%	
80	5688	3.9E+04	6.3E+01	0.0E+00	3.13E+05	63.4%	
81	5677	4.3E+04	9.8E+01	2.5E+01	9.44E+05	72.4%	
82	6341	5.4E+04	4.4E+02	3.1E+02	7.31E+05	85.2%	
83	5628	1.4E+05	4.1E+01	8.5E+00	4.75E+05	66.7%	
84	5532	1.1E+05	4.4E+01	3.4E+01	8.55E+05	47.2%	
85	5654	1.5E+05	1.4E+02	2.1E+01	5.45E+05	85.2%	
86	6576	2.6E+02	0.0E+00	0.0E+00	4.69E+05	63.9%	
87	6153	1.8E+05	1.1E+02	5.9E+01	9.85E+05	75.8%	
88	5757	2.0E+05	3.9E+01	2.3E+01	3.08E+05	71.0%	
89	5701	2.1E+05	2.3E+01	2.0E+01	2.65E+05	52.4%	
90	5512	3.8E+04	0.0E+00	0.0E+00	2.14E+05	80.0%	
91	5771	8.9E+04	9.3E+01	8.6E+00	4.05E+05	31.1%	
92	5770	2.3E+05	8.0E+01	8.6E+01	5.75E+05	41.9%	
93	6339	7.3E+05	0.0E+00	1.1E+01	9.77E+05	84.0%	
94	6245	4.5E+04	1.1E+02	1.6E+02	7.43E+05	36.5%	

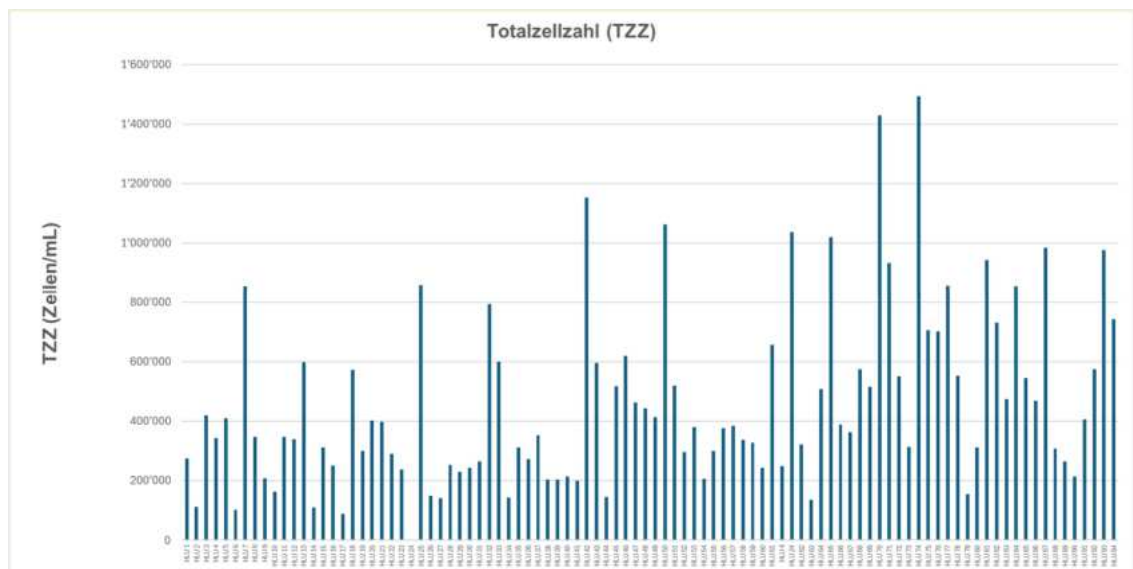


Abbildung 23 Die Totale Zellzahl der 94 Hydranten-Wasserproben wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Die Zellkonzentration war zwischen $8.91 \cdot 10^4$ und $1.49 \cdot 10^6$.



Abbildung 24 Probenahmegefäße der Hydrantenproben 1 bis 61. Die Wasserproben aus Hydranten sind vielfach braun verfärbt. Dies lässt auf Korrosion und Stagnation schließen.

3.2.6.1 Wiederholungsmessungen von Hydranten

Tabelle 13 Am 22. und 28.5.2024 wurden ein Teil der Hydranten noch einmal beprobt und durch das Referenzlabor Bellinzona mit PCR und mit der Standardkultivierungsmethode ISO 11731 analysiert.

Sample	Hydrant	Lpn [GU/L]	Lpn result	Lsp [GU/L]	Lsp result	Culture [CFU/L]	Remarks
HLU 095	6576	0	not detected	1.23E+06	detected	<100	22.05.2024
HLU 096	6153	0	not detected	4.34E+07	detected	<100	22.05.2024
HLU 097	5243	0	not detected	1.98E+06	detected	<100	22.05.2024
HLU 098	5225	0	not detected	3.73E+06	detected	<100	22.05.2024
HLU 099	5757	0	not detected	1.76E+07	detected	<100	22.05.2024
HLU 100	6701	0	not detected	3.28E+06	detected	<100	22.05.2024
HLU 101	5713	<LOQ	detected	2.52E+06	detected	<100	22.05.2024
HLU 102	5638	0	not detected	4.05E+06	detected	<100	22.05.2024
HLU 103	6245	0	not detected	4.88E+05	detected	<100	22.05.2024
HLU 104	5777	0	not detected	2.40E+06	detected	<100	22.05.2024
HLU 105	5688	0	not detected	8.31E+05	detected	<100	22.05.2024
HLU 106	5677	0	not detected	1.59E+06	detected	<100	22.05.2024
HLU 107	5656	0	not detected	1.06E+06	detected	<100	22.05.2024
HLU 108	5222	0	not detected	2.45E+06	detected	<100	22.05.2024
HLU 109	5660	0	not detected	1.10E+06	detected	<100	22.05.2024
HLU 110	6341	0	not detected	3.16E+05	detected	<100	29.05.2024
HLU 111	5532	0	not detected	1.49E+06	detected	<100	29.05.2024
HLU 112	5628	0	not detected	1.73E+06	detected	<100	29.05.2024
HLU 113	5654	0	not detected	3.71E+05	detected	<100	29.05.2024
HLU 114	5215	0	not detected	3.04E+06	detected	<100	29.05.2024
HLU 115	5512	0	not detected	1.80E+06	detected	<100	29.05.2024
HLU 116	5387	0	not detected	3.36E+06	detected	<100	29.05.2024
HLU 117	5771	0	not detected	4.00E+06	detected	<100	29.05.2024
HLU 118	5770	0	not detected	2.42E+06	detected	<100	29.05.2024
HLU 119	6339	0	not detected	7.41E+05	detected	<100	29.05.2024
HLU 120	6314	0	not detected	2.33E+05	detected	<100	29.05.2024
HLU 121	5027	0	not detected	1.86E+06	detected	<100	29.05.2024
HLU 122	5215	0	not detected	9.13E+05	detected	<100	29.05.2024
HLU 123	5799	0	not detected	1.31E+06	detected	<100	29.05.2024
HLU 124	5299	0	not detected	1.31E+06	detected	<100	29.05.2024

Tabelle 14 Am 04.09.2024 wurden ein Teil der Hydranten noch einmal beprobt und durch drei verschiedene Labors Universität Zürich (Diatheva-Kit, Kit MBK 0081), Referenzlabor Bellinzona (Diatheva-Kit) und Industrielle Werke Basel (Hygiene-Kit KIT230119 und KIT230120) gemessen. In allen Proben wurden von allen Laboratorien keine *L. pneumophila* nachgewiesen. Die *Legionella* spp. – Konzentrationen werden in der Tabelle verglichen.

Sample	Hydrant Nr.	Lpn [GU/L]	Lpn result	Lsp [GU/L] Uni Zürich	Lsp [GU/L] Bellinzona	Lsp [GU/L] IWB	Lsp [GU/L] Uni Zürich	Lsp [GU/L] Bellinzona	Lsp [GU/L] IWB
HLU 125	5688	0	not detected	3.35E+05	1.43E+06	1.90E+05	100%	428%	57%
HLU 126	5677	0	not detected	1.79E+05	5.85E+06	1.75E+05	100%	803%	106%
HLU 127	6341	0	not detected	2.99E+04	4.74E+05	4.00E+04	100%	4790%	635%
HLU 128	5628	0	not detected	6.99E+05	7.14E+05	1.40E+05	100%	205%	27%
HLU 129	5532	0	not detected	3.99E+05	7.06E+06	8.90E+05	100%	359%	48%
HLU 130	5654	0	not detected	4.11E+05	4.23E+05	4.65E+04	100%	349%	46%
HLU 131	6576	0	not detected	6.48E+04	2.03E+06	4.45E+05	100%	2215%	293%
HLU 132	6153	0	not detected	5.61E+05	1.23E+06	4.30E+05	100%	256%	34%
HLU 133	5757	0	not detected	5.20E+05	2.75E+06	1.73E+05	100%	276%	37%
HLU 134	5701	0	not detected	3.06E+05	1.45E+06	1.29E+05	100%	468%	62%
HLU 135	5512	0	not detected	2.24E+05	2.42E+05	3.05E+04	100%	639%	85%
HLU 136	5771	0	not detected	1.01E+06	6.54E+05	7.55E+04	100%	143%	19%
HLU 137	5770	0	not detected	8.94E+05	4.30E+06	5.25E+05	100%	160%	21%
HLU 138	6339	0	not detected	1.76E+05	8.59E+05	1.80E+05	100%	815%	108%
HLU 139	6245	0	not detected	3.01E+05	4.52E+05	3.80E+04	100%	477%	63%
						Durchschnitt	100%	825%	109%

3.2.7 Clustering der Isolate aus dem Verteilnetz

Die drei Isolate aus dem Hydrant Nr. 6514 wurden serotypisch und anschliessend genetisch analysiert. Sie wurden mit den klinischen Isolatzen aus der Region vom Referenzlabor verglichen.

Tabelle 15: Isolierte Legionellenstämme aus dem Verteilnetz von Lugano.

Nr.	Ursprung	Datum	Serotypisierung	cgMLSTI	SNP-Analyse
1	Hydrant Nr. 6514	06.12.2022	Lg SG 3	Cluster ST 23	Match mit klinischen Isolatzen
2		30.01.2023	Lg SG 1		
3		30.03.2023	Lg SG 1		

Core Genome Multilocus Sequence Typing (cgMLST)

Die Core Genome Multilocus Sequence Typing (cgMLST) ist eine hochauflösende molekulare Typisierungsmethode, die in der Mikrobiologie und Epidemiologie eingesetzt wird. Sie analysiert Variationen in einer Reihe von Kerngenen, die von allen Stämmen einer bestimmten Bakterienart gemeinsam genutzt werden. Diese Technik vergleicht die Nukleotidsequenzen mehrerer Kerngene in bakteriellen Isolatzen. Sie ermöglicht eine präzise Differenzierung und Verfolgung von Stämmen.

Die cgMLST-Analysen wurden durch Dr. Tim Roloff von der Universität Zürich durchgeführt. Die Hydrantenisolate wurden genetisch analysiert und mit klinischen und Umweltisolaten aus der Umgebung verglichen, welche im Legionellen-Referenzlabor in Bellinzona hinterlegt waren. Das Resultat der Clusteranalyse ist in Abbildung 25 präsentiert.

Übersicht core-Genom Analyse (cgMLST)

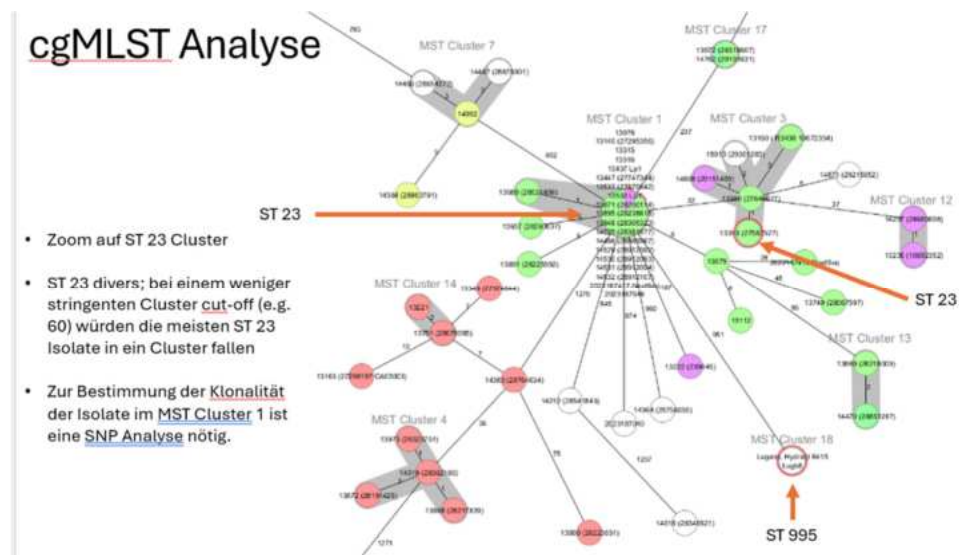
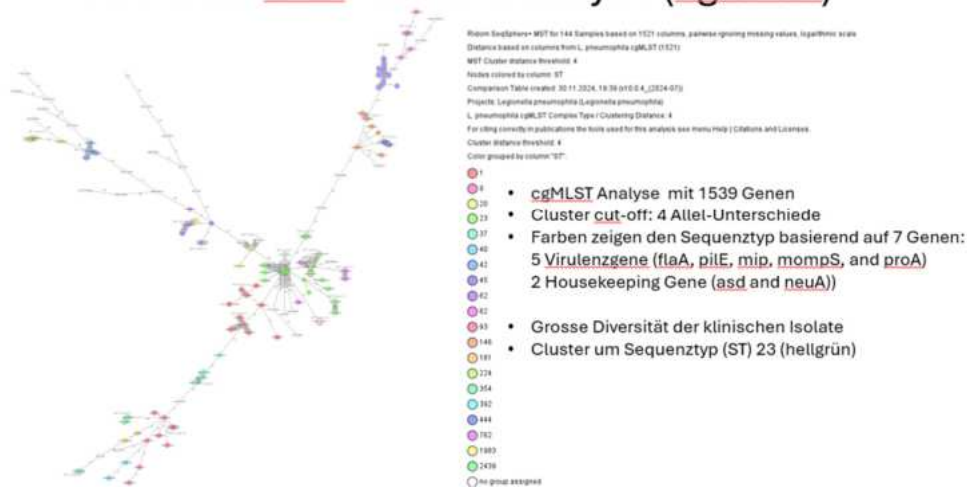


Abbildung 25 Grosser ST 23-Cluster: Alle Isolate, die in der cgMLST-Analyse identisch sind, werden im selben Kreis dargestellt. Die Grösse der Kreise entspricht der Anzahl identischer *L. pneumophila*-Isolate. Die kleinen Zahlen zwischen den Kreisen geben die Anzahl der Allelunterschiede zwischen den Isolaten an (je kleiner die Zahl, desto ähnlicher sind die Isolate im Cluster). Die beiden Isolate *L. pneumophila* SG 1 aus Hydrant Nr. 6514 sind im Cluster ST 23.

SNP Analyse

Die SNP-Analyse (Single Nucleotide Polymorphism) ist eine genetische Technik, die zum Vergleich von DNA-Sequenzen zwischen verschiedenen Proben oder Individuen durch Untersuchung einzelner Nukleotidvariationen verwendet wird. Sie untersucht Veränderungen einzelner Basenpaare in DNA-Sequenzen. Sie kann verwendet werden, um kleine genetische Unterschiede zwischen Isolate zu erkennen. Sie bietet eine höhere Auflösung als andere genetische Vergleichsmethoden wie MLST und cgMLST.

Im Rahmen dieser *Legionella*-Studie wurde die SNP-Analyse eingesetzt, um sehr kleine genetische Unterschiede zwischen Isolaten aus verschiedenen Quellen zu untersuchen, um deren Verwandtschaftsgrad und möglichen Ursprung zu bestimmen. Die beiden *L. pneumophila* SG1-Isolate aus dem Hydranten in Lugano (13437 Lp1 und 13533 Lp1) sind auch nach eingehender SNP-Analyse identisch mit den Patientenisolaten aus dem Cluster ST 23 (siehe Bericht von Herrn Dr. Tim Roloff im Anhang).

SNP Analyse Cluster MST 1 (ST23)

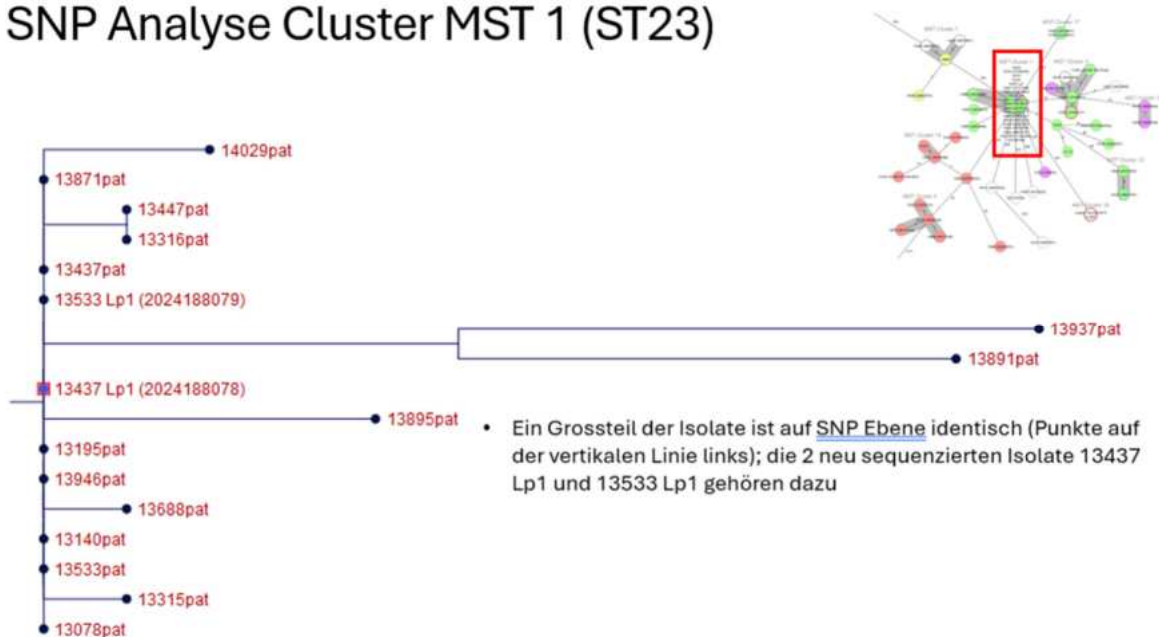


Abbildung 26 Vertiefte SNP-Analyse der Isolate aus Cluster MST 1 (ST23). Die beiden *L. pneumophila* SG1-Isolate aus dem Hydranten von Lugano (13437 Lp1 und 13533 Lp1) sind auch gemäss der vertieften SNP-Analyse identisch mit den Patientenisolaten aus Cluster ST 23.

3.3 Saisonalität der Legionellosefälle in Lugano

Für die Städte Zürich und Lugano wurde die Jahresverlaufskurve der Legionellosefälle für die Jahre 2017 bis 2021 generiert (Abbildung 27). Diese Daten wurden verdankenswerterweise von Prof. Daniel Mäusezahl und Dr. Fabienne Fischer vom Swiss Public Health Institute (STPH) zur Verfügung gestellt. Die Verlaufskurven müssen mit Vorsicht interpretiert werden, da sie auf statistisch gesehen auf wenigen Fällen gründen. Was aber auffällt, ist, dass im Falle von Lugano generell keine Saisonalität festgestellt werden kann. Dies steht im Gegensatz zu der Gesamtschweiz. Bei der Stadt Zürich ist in den Jahren 2020 und 2021 eine Saisonalität erkennbar.

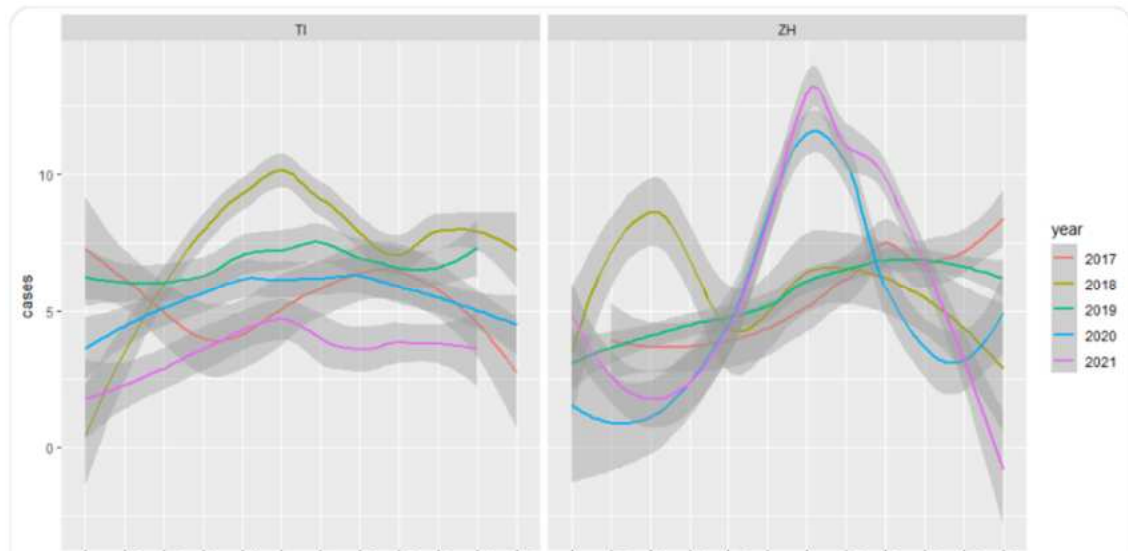


Abbildung 27 Für die Städte Zürich und Lugano wurde die Jahresverlaufskurve der Legionellosefälle für die Jahre 2017 bis 2021 generiert. Diese Graphik wurde verdankenswerterweise von Prof. Daniel Mäusezahl und Dr. Fabienne Fischer vom Swiss Public Health Institute (STPH) zur Verfügung gestellt.

3.4 Filterbeprobung Hauseingang

Risikobasiert wurden Proben bei Hydranten genommen. In Hydranten-Proben wurden sporadisch *L. pneumophila* nachgewiesen. Sporadisch werden von der Zuleitung zu den Hydranten Legionellen in die Hauptleitung und anschliessend die Gebäude und zu den Duschen gelangen. Deshalb wurde beim Hauseingang Proben genommen, um die *L. pneumophila*-Kontamination zu bestimmen. Durch den Verdünnungseffekt werden die zu erwartenden *L. pneumophila*-Kontaminationen sehr tief sein. Es wurden deshalb beim Hauseingang Filterbeprobungen mit grossem Probenvolumen durchgeführt.

Material und Methoden

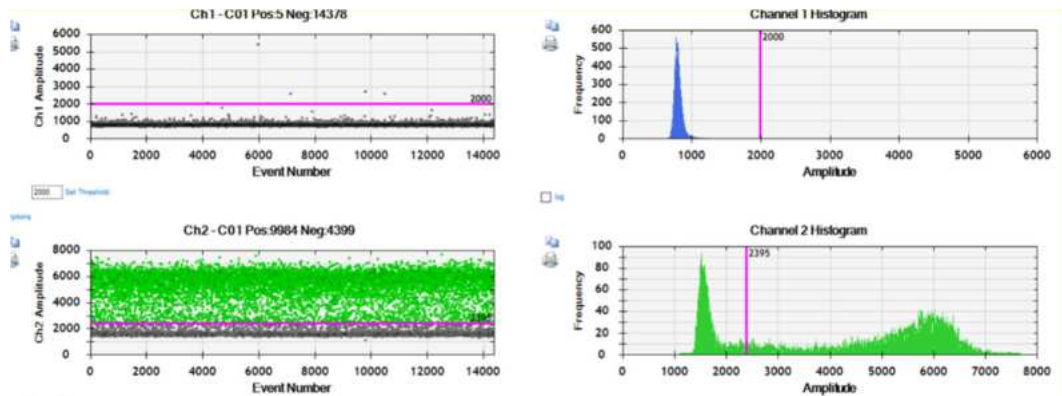
Die Filterbeprobung mit anschliessendem PCR wurde nicht validiert. Es wurden aber bei jeder Messung Kontrollen mitgeführt (Positiv- und Negativkontrollen).



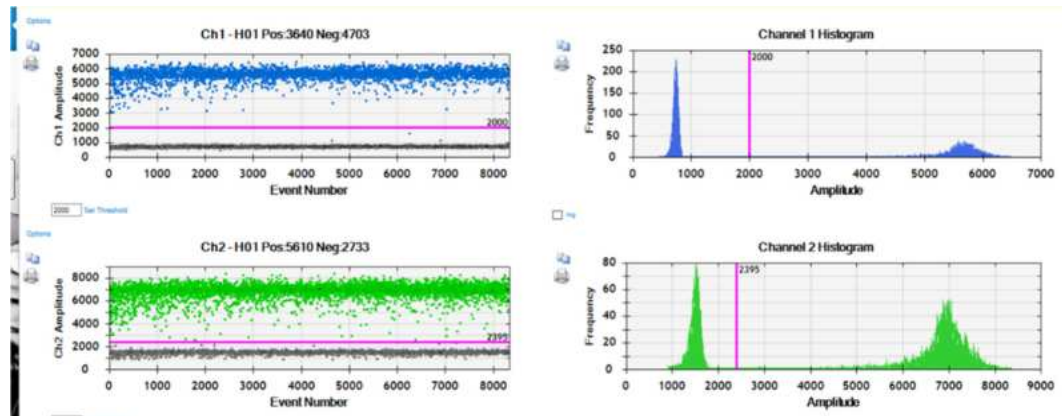
Abbildung 28 Allgemeiner Ablauf der Filterbeprobung mit anschliessender DNA-Extraktion und DNA-Nachweis. Möglichst nahe beim Hauseingang wird der Filterhalter mit Membrane an einem Probenahmehahnen mit Standardgewinde montiert. Es werden ein Probenvolumen von bis 50 bis 500 Liter durch den Filter gespült. Die Membrane wird im Labor aus dem Filterhalter montiert und gemäss Promega-Standardprozedur wurde die DNA direkt von der Membrane extrahiert und mit dem Maxwell-Gerät aufgereinigt. Anschliessend wurde die extrahierte DNA mit ddPCR analysiert. Die ddPCR ist gegenüber Inhibition robuster als die qPCR.

Resultate

a



b



c

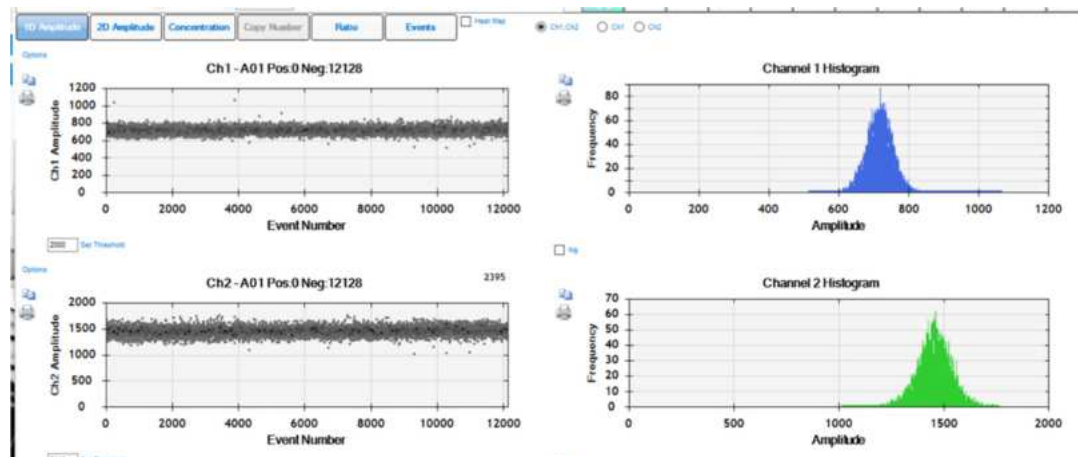


Abbildung 29 Plots von ddPCR Einzelkanälen für Sonden für *L. pneumophila* (FAM, blau) und *Legionella* spp. (grün). Es wurden die Plots für a) 150 Liter Filterprobe Hauseingang in Lugano, b) Positivkontrolle (30'000 Genkkopien) und c) Negativkontrolle.

Tabelle 16 Zusammenstellung der durchgeführten Analysen mit Filterbeprobung und anschliessendem PCR-Nachweis.

Nr.	Ort	Datum	Probenvolumen	<i>L. pneumophila</i> [Genkopien pro Liter] Schätzwert*	Extrapolierte Nachweisgrenze**
1	Hauseingang Schulhaus Massagno	24.05.2024	150 Liter	1.7	3.3 Genkopien pro Liter
3	Hauseingang Schulhaus Massagno	24.04.2024	500 Liter	0.37	1 Genkopien pro Liter
5	Hauseingang Sihlsportanlage Stadt Zürich	1.7.2024	500 Liter	0.073	1 Genkopien pro Liter

Schlussfolgerung

Die durchgeführten Filterbeprobungen mit anschliessendem PCR-Nachweis ergaben nur Ergebnisse unterhalb der theoretischen Nachweisgrenze. Die Schätzwerte sind als sehr unsicher einzustufen. Sie geben einen Hinweis darauf, dass im Leitungswasser, das in die Gebäude gelangt, von einer Konzentration für *L. pneumophila* < 3,4 Genkopien pro Liter (theoretische Nachweisgrenze) auszugehen ist. Eventuell lösen sich die Legionellen auch vereinzelt vom Biofilm ab und gelangen temporär in das Hauptverteilnetz. Dies kann zu sporadischem Auftreten von *L. pneumophila* führen.

Der Nachweis von *L. pneumophila* im Leitungswasser der Hauptleitung stellt aufgrund der geringen Konzentrationen eine Herausforderung für Probenahme und Nachweis dar. In diesem Fall ist eine Weiterentwicklung der Methode erforderlich.

3.5 16S Amplikonsequenzierung

Einführung

16S RNA (rRNA) Sequenzierung ist eine gängige Amplikon-Sequenzierungsmethode, die zur Identifizierung und zum Vergleich von Bakterien oder Pilzen in einer bestimmten Probe verwendet werden. Die Sequenzierung von 16S rRNA-Genen auf der Basis von Next-Generation Sequencing (NGS) ist eine gut etablierte Methode zum Vergleich der Phylogenie und Taxonomie von Proben aus komplexen Mikrobiomen oder Umgebungen, die nur schwer oder gar nicht untersucht werden können.

Das prokaryotische 16S rRNA-Gen ist etwa 1500 bp lang und besteht aus neun variablen Regionen, die zwischen konservierten Regionen eingeschoben sind. Variable Regionen des 16S rRNA-Gens werden häufig zur phylogenetischen Klassifizierung von Gattungen oder Arten in verschiedenen mikrobiellen Populationen verwendet.

Material und Methoden

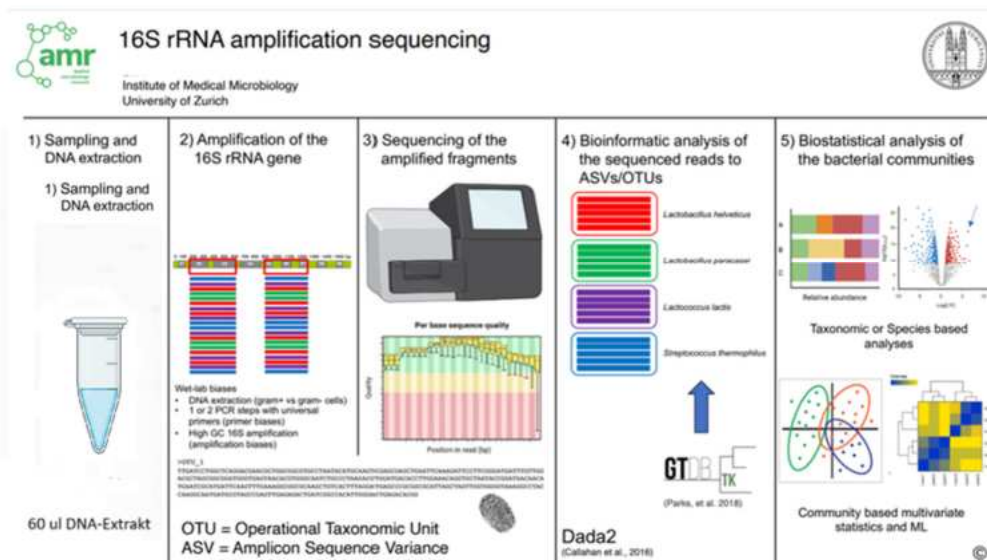


Abbildung 30 Allgemeiner Ablauf der Filterbeprobung mit anschliessender 16S-Sequenzanalyse. Möglichst nahe beim Hauseingang wird der Filterhalter mit Membran an einem Probenahmehahn mit Standardgewinde montiert. Es werden ein Probenvolumen von bis 50 bis 500 Liter durch den Filter gespült. Die Membran wird im Labor aus dem Filterhalter montiert und gemäss Promega-Standardprozedur wurde die DNA direkt von der Membrane extrahiert und mit dem Maxwell-Gerät aufgereinigt. Anschliessend wurde die extrahierte DNA mit dPCR analysiert.

Tabelle 17 Liste der beprobten Hydranten und Hauseingänge Trinkwasser

Nr.	Ort der Probenahme	Kürzel	Datum	Bemerkung
1	Hydrant Nr. 50 Stadt Zürich	50-V3V4	12.06.2024	
2	Hydrant Nr. 207 Stadt Zürich	207-V3V4	12.06.2024	
3	Hydrant Nr. 2086 Stadt Zürich	2086-V3V4	13.06.2024	
4	Hydrant Nr. 2212 Stadt Zürich	2212-V3V4	12.06.2024	
5	Hydrant Nr. 4402 Stadt Zürich	4402-V3V4	13.06.2024	
6	Hydrant Nr. 5183 Stadt Zürich	5183-V3V4	13.06.2024	
7	Hydrant Nr. 2560 Stadt Zürich Messung A	WVZ9-50L-A-V3V4	30.08.2022	
8	Hydrant Nr. 2560 Stadt Zürich Messung B	WVZ9-50L-B-V3V4	30.08.2022	
9	Hauseingang Sihlsportan- lage Stadt Zürich	S177-V3V4	21.06.2024	
10	Hydrant Nr. 6514 Stadt Lugano Messung A	Lugb-8-A-V3V4	27.07.2022	
11	Hydrant Nr. 6514 Stadt Lugano Messung B	Lugb-8-B-V3V4	27.07.2022	
12	Hauseingang Schulhaus Massagno, Stadt Lugano	S179-V3V4	24.04.2024	

Resultate

Als erste Visualisierung wird die Gesamtkomposition der Proben auf verschiedenen taxonomischen Ebenen dargestellt

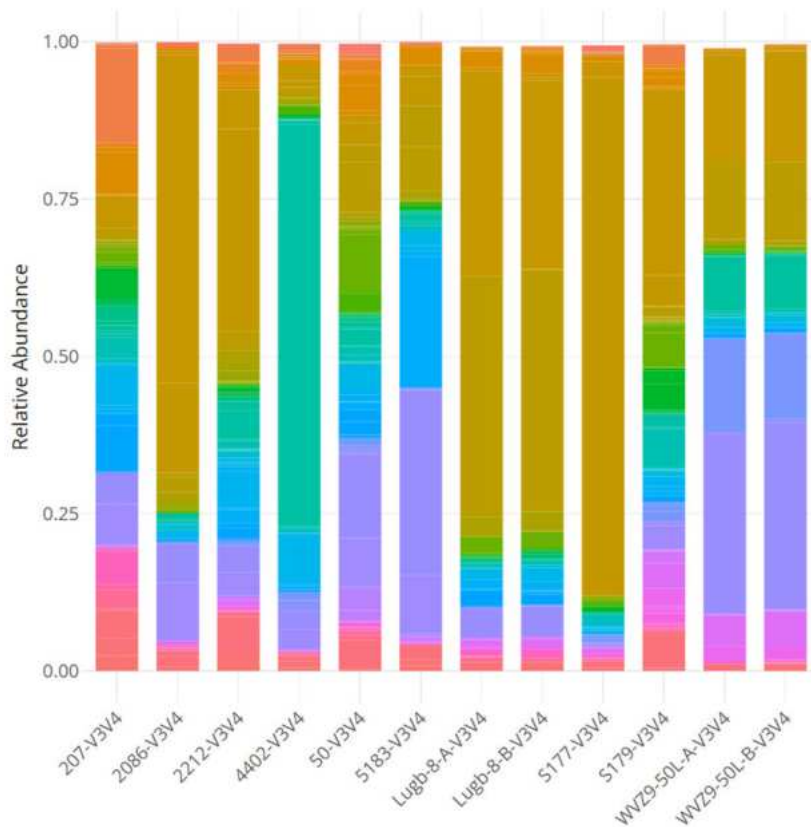


Abbildung 31 Darstellung der relativen Häufigkeit auf taxonomischer Ebene Familien.

Die technischen Duplikate Lugb 8 A/B und WVZ9-50 Liter A/B sind praktisch identisch, was auf eine Reproduzierbarkeit der Methode schliessen lässt. Bei den Proben der Wasserversorgung Zürich unterscheiden sich die Hydranten Nr. 207, 2086, 2212, 4402, 50, 5183 und WVZ9-50 Liter A/B sowie der Hausanschluss S177 stark, obwohl sie aus der gleichen Trinkwasserversorgung stammen. Dies lässt auf eine unterschiedliche Zusammensetzung des Mischwassers sowie auf unterschiedliche lokale Bedingungen schliessen. Bei den Proben aus Lugano unterscheidet sich der Hauseingang S179 deutlich von den Hydranten Lugb 8 A/B. Auch dies deutet darauf hin, dass die lokalen Bedingungen zu unterschiedlichen mikrobiologischen Populationen führen.

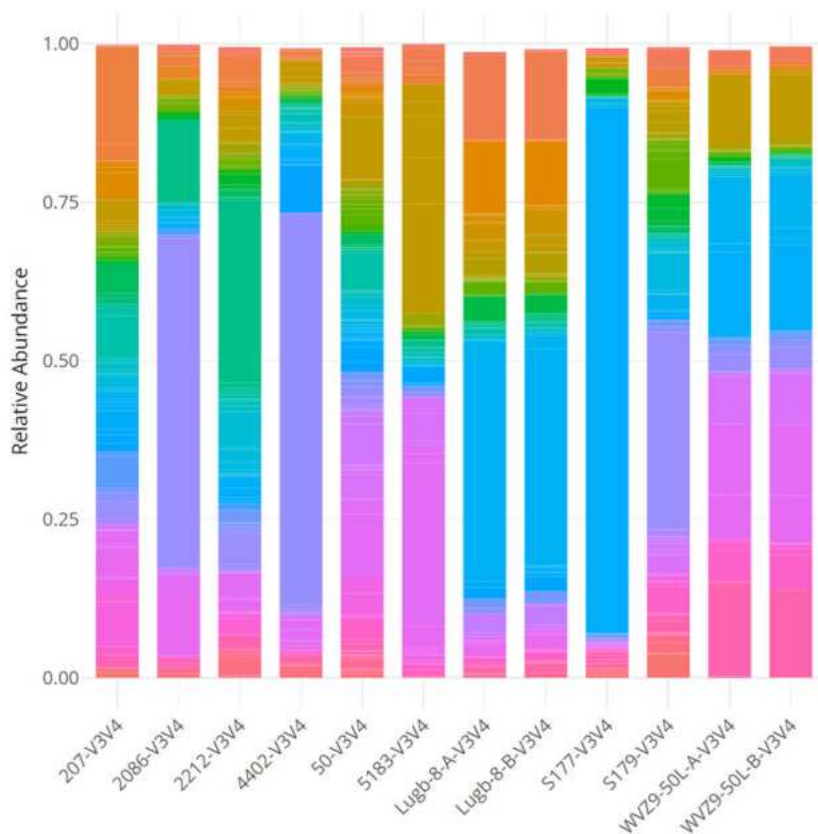


Abbildung 32 Darstellung der relativen Häufigkeit auf taxonomischer Ebene Gattung.

Die technischen Duplikate Lugb 8 A/B und WVZ9-50 Liter A/B sind praktisch identisch, was auf eine Reproduzierbarkeit der Methode schliessen lässt. Bei den Proben der Wasserversorgung Zürich unterscheiden sich die Hydranten Nr. 207, 2086, 2212, 4402, 50, 5183 und WVZ9-50 Liter A/B sowie der Hausanschluss S177 stark, obwohl sie aus der gleichen Trinkwasserversorgung stammen. Dies lässt auf eine unterschiedliche Zusammensetzung des Mischwassers sowie auf unterschiedliche lokale Bedingungen schliessen.

Bei den Proben aus Lugano unterscheidet sich der Hauseingang S179 deutlich von den Hydranten Lugb 8 A/B. Auch dies deutet darauf hin, dass die lokalen Bedingungen zu unterschiedlichen mikrobiologischen Populationen führen.

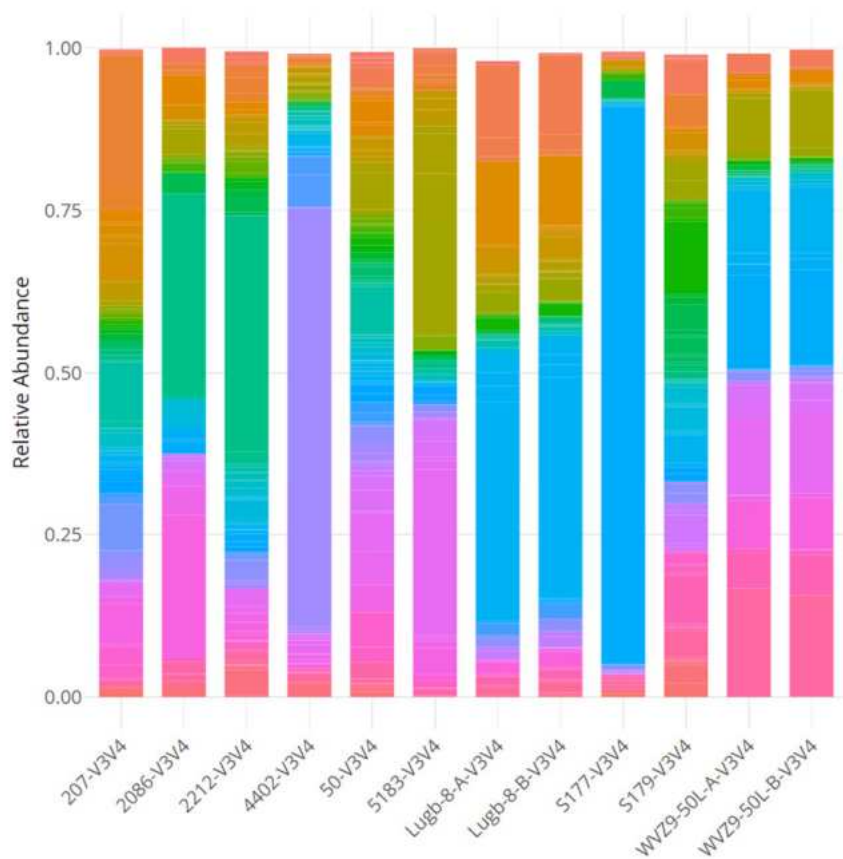


Abbildung 33 Darstellung der relativen Häufigkeit auf taxonomischer Ebene Spezies / Art.

Die technischen Duplikate Lugb 8 A/B und WVZ9-50 Liter A/B sind praktisch identisch, was auf eine Reproduzierbarkeit der Methode schliessen lässt. Bei den Proben der Wasserversorgung Zürich unterscheiden sich die Hydranten Nr. 207, 2086, 2212, 4402, 50, 5183 und WVZ9-50 Liter A/B sowie der Hausanschluss S177 stark, obwohl sie aus der gleichen Trinkwasserversorgung stammen. Dies lässt auf eine unterschiedliche Zusammensetzung des Mischwassers sowie auf unterschiedliche lokale Bedingungen schliessen. Bei den Proben aus Lugano unterscheidet sich der Hauseingang S179 deutlich von den Hydranten Lugb 8 A/B. Auch dies deutet darauf hin, dass die lokalen Bedingungen zu unterschiedlichen mikrobiologischen Populationen führen.

Nachweis von Umweltpathogenen

Tabelle 18 Nachweis von Umweltpathogenen und Legionellenarten durch 16S-Sequenzanalyse und Kultivierungsmethoden. Ergebnisberichte sind im Anhang 8 a) Detection of Legionella through 16S sequencing vom 04.12.2024 und 8 c) Auftrag: A-017461 und d) Auftrag: A-017462.

Nr.	Ort der Probenahme	Nachgewiesene Umweltpathogene	
		16S-Sequenzanalyse mit Angaben der relativen Häufigkeit	Kultivierungsmethode
Zürich			
1	Hydrant Nr. 50 Stadt Zürich	<i>Mycobacterium tusciae</i> 0.0021	
2	Hydrant Nr. 207 Stadt Zürich	<i>Legionella_D</i> 0.010 <i>Mycobacterium tusciae</i> 0.0074	
3	Hydrant Nr. 2086 Stadt Zürich		>2'420 MPN/100 mL <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Bakterienrasen aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , keine Einzelkolonien auszählbar
4	Hydrant Nr. 2212 Stadt Zürich	<i>Legionella_C</i> 0.0047 <i>Mycobacterium tusciae</i> 0.0058	
5	Hydrant Nr. 4402 Stadt Zürich	<i>Legionella_D</i> 0.0010 <i>Legionella_B_627867 geestiana</i> 0.0020 <i>Mycobacterium tusciae</i> 0.0056	28 MPN/100 mL 13 MPN/100 mL <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
6	Hydrant Nr. 5183 Stadt Zürich		
7	Hydrant Nr. 2560 Stadt Zürich Messung A	<i>Legionella_B_627867 geestiana</i> 0.0010	
8	Hydrant Nr. 2560 Stadt Zürich Messung B	<i>Legionella_D drancourti</i> ,0.0010	
9	Hauseingang Sihlsportanlage Stadt Zürich		
Lugano			
10	Hydrant Nr. 6514 Stadt Lugano Messung A	<i>Legionella_D</i> 0.0010 <i>Legionella_B_627867 geestiana</i> 0.00052 <i>Legionella_D pneumophila_627694</i> 0.00105 <i>Pseudomonas_E_650326 aeruginosa_A</i> 0.014	
11	Hydrant Nr. 6514 Stadt Lugano Messung B	<i>Legionella_D</i> 0.0011 <i>Legionella_D pneumophila_627694</i> 0.0021 <i>Pseudomonas_E_650326 aeruginosa_A</i> 0.0209 <i>Mycobacterium tusciae</i> 0.00053	
12	Hauseingang Schulhaus Massagno, Stadt Lugano	<i>Mycobacterium tusciae</i> 0.0057	

Nachweis von Legionellen

Relative Häufigkeit der *Legionella*-Sequenzen

Da das Analyseziel Arten sind, die zur Gattung *Legionella* gehören, wurden Nicht-*Legionella*-Sequenzen herausgefiltert und ihr Vorkommen auf Gattungs- und Artniveau angegeben.

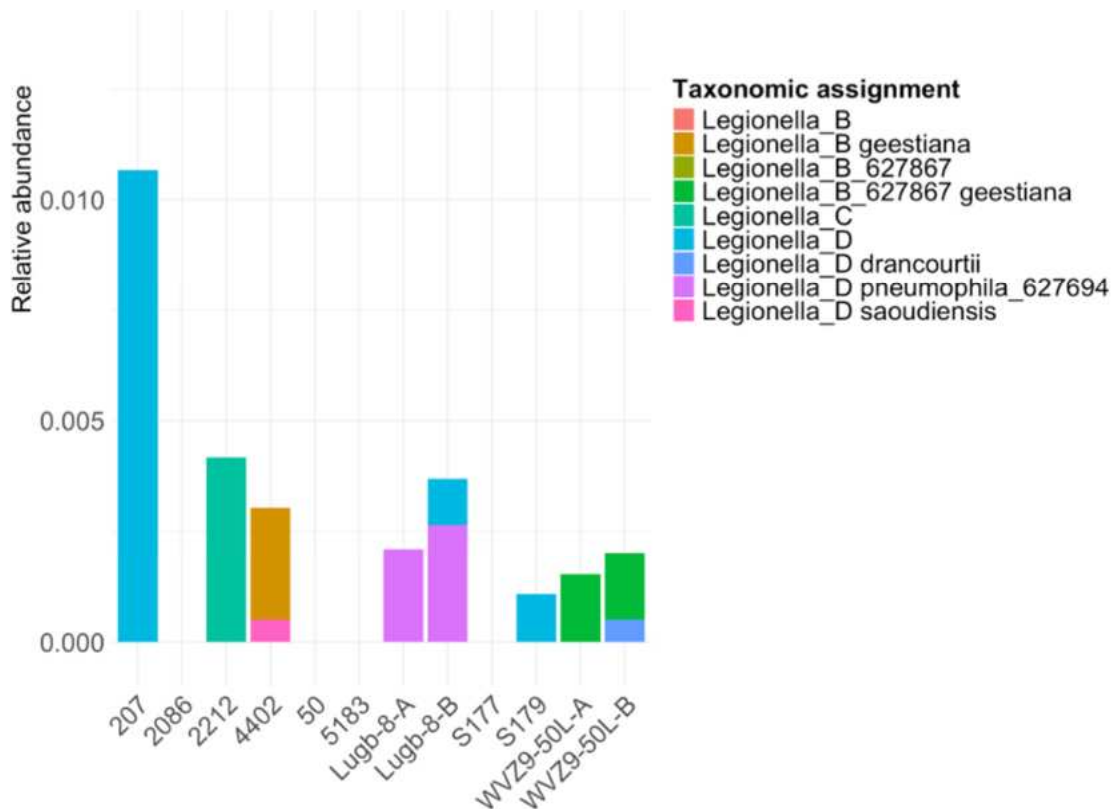


Abbildung 34 Relative Häufigkeit der Gattung *Legionella* in den Proben

Schlussfolgerung

In 8/12 Proben wurden Sequenzen der Gattung *Legionella* gefunden, in 5/12 Proben Sequenzen, die auf Artniveau klassifiziert wurden. Die für die Legionärskrankheit wichtigste Art, *L. pneumophila*, wurde in zwei Proben gefunden, Duplikate einer Hydranten-Probe (LugB-8). Die anderen nachgewiesenen Spezies waren *L. geestiana* und *L. drancourtii*. Es muss darauf hingewiesen werden, dass es bei der 16S-Amplikon-Sequenzierung üblich ist, Sequenzen mit einer relativen Häufigkeit von weniger als 0,001 (0,1 %) zu entfernen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden, die durch sehr seltene oder unechte Sequenzen verursacht werden. Dieser Schwellenwert wurde in dieser Analyse nicht angewendet, da das betreffende Bakterium bekannt ist. Es muss jedoch darauf hingewiesen werden, dass die nachgewiesenen Legionellen-Häufigkeiten nahe an diesem Schwellenwert liegen.

Diskussion

Die 16S-Sequenzanalyse ist eine etablierte Methode in der medizinischen Mikrobiologie und wird routinemässig eingesetzt. Sie liefert sehr viele Informationen. Die Analysekosten von 225 Fr. pro Probe inkl. Bericht sind im Vergleich zu Standardkulturmethoden günstig. Es fehlt jedoch noch an Erfahrung, um die Aussagekraft der Ergebnisse einordnen zu können. Die Interpretation der Resultate muss deshalb mit der nötigen Vorsicht erfolgen und es dürfen keine voreiligen Schlüsse gezogen werden. So wurden bei den beiden Proben Nr. 3 und 5 mit der Kultivierungsmethode *P. aeruginosa* nachgewiesen, nicht aber mit der 16S-Sequenzanalyse Tabelle 18. In den Proben Nr. 2, 4, 5, 7 und 8 wurden durch die 16S-Sequenzanalyse Legionellen nachgewiesen, die mit der Standardkultivierungsmethode nicht festgestellt werden konnten.

Aus den Hydranten konnten mit der 16S-Sequenzanalyse-Methode verschiedene opportunistische Pathogene wie *Legionella pneumophila*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Mycobacterium tusciae* nachgewiesen werden. Beim Hauseingang in der Primarschule Massagno in Lugano konnten *Mycobacterium tusciae* nachgewiesen werden.

Schlussfolgerung

Der Nachweis von opportunistischen Erregern aus Hydranten und Hauseinführungen durch 16S-Sequenzanalyse-Methode unterstützt die These, dass sich Umweltpathogen in Hydranten und deren Zuleitungen vermehren und durch Austausch in Gebäudeeinführungen gelangen können in weiteren Abklärungen sollte die Relevanz für die Gesundheit der Konsumenten abgeklärt werden.

3.6 Optimierung des Amöben-Platten-Tests für die Isolation von Legionellen und anderen opportunistischen Pathogenen aus Umwelt-Wasserproben

Optimierung des Amöben-Platten-Tests für die Isolierung von Legionellen und anderen opportunistischen Krankheitserregern aus Umweltwasserproben

Zusammenfassung

Freilebende Amöben sind ein Reservoir für eine Reihe von Umweltbakterien, die opportunistische Krankheitserreger für den Menschen sind. *Legionella pneumophila* ist ein Gram-negatives, amöbenresistentes Bakterium, welches beim Einatmen eine lebensbedrohliche atypische Lungenentzündung, die Legionärskrankheit, verursachen kann. Die Fähigkeit, in Amöben und anderen Protozoen zu wachsen, ist eine Voraussetzung für die Virulenz von *L. pneumophila* und erfordert das bakterielle Icm/Dot Typ IV Sekretionssystem (T4SS). Der Amöbenplattentest (APT) nutzt die Fähigkeit von virulenten *L. pneumophila*, auf BCYE-Agarplatten in Gegenwart von Amöben zu wachsen. In der vorliegenden Studie haben wir den APT für verschiedene *Legionella*-Spezies angewendet und den Test optimiert durch die Variation der Amöben-Konzentration, der Wachstums-Temperatur, der Agarplatten-Kulturbedien und Zusatzstoffen wie z.B. Fungizide. Der optimierte APT reichert amöbenresistente Umweltbakterien an und unterdrückt die übrige mikrobielle Flora. Dementsprechend ermöglicht der APT die Identifizierung in komplexen Umweltwasserproben von Legionellen und weiteren opportunistisch pathogenen Bakterien wie *Delftia acidovorans*, einem seltenen Erreger von Sepsis und Lungenentzündung.

Schlussfolgerungen

Der Nachweis, die Quantifizierung und die Risikobewertung von humanpathogenen Bakterien in technischen und natürlichen Wassersystemen sind eine grosse Herausforderung. Legionellen und eine Reihe von anderen opportunistisch pathogenen Umweltbakterien sind resistent gegenüber Amöben, eine Eigenschaft, die als Indikator für die bakterielle Virulenz dienen kann. Der APT ermöglicht den Nachweis, die Quantifizierung und die Bewertung der Virulenz von Legionellen und anderen amöbenresistenten Bakterien.

In dieser Studie haben wir den APT für verschiedene *Legionella*-Spezies optimiert, indem wir die Konzentration von *A. castellanii*-Amöben auf Agarplatten, die Inkubations-Temperatur, die Zusammensetzung des Agarplatten-Mediums und Zusätze wie z.B. Fungizide, variierten. Diese Experimente lassen den Schluss zu, dass *L. pneumophila*, *L. bozemanii* und *L. longbeachae* auf BCYE-Agarplatten in Gegenwart von bis zu 4×10^6 *A. castellanii* pro Agarplatte robust wachsen und bereits $\geq 0.5 \times 10^6$ Amöben den avirulenten *L. pneumophila*-Stamm $\Delta icmT$ effizient eliminieren. Unter Verwendung von *A. castellanii* ist der APT kompatibel mit dem Fungizid Thiabendazol (20 µg/mL) in BCYE-Medium und mit Thiabendazol (20 µg/mL), Fluconazol (10 µg/mL) und Voriconazol (10 µg/mL) in GVP-Medium bei einer Inkubation bei 30°C, nicht aber bei 37°C.

Wir konnten ausserdem nachweisen, dass der optimierte APT in komplexen Umwelt-Wasserproben amöbenresistente Bakterien anreichert und die übrige mikrobielle Flora unterdrückt. Der Einsatz des APT zur Bewertung des Mikrobioms von Dusch- und Hydranten-Wasserproben ermöglichte den Nachweis und die Identifikation der opportunistischen Krankheitserreger *L. pneumophila* und *D. acidovorans*. Der APT liefert auch Informationen über die Virulenz einer bestimmten *Legionella*-Spezies oder anderen Bakterien und kann daher als Ergänzung zum „Goldstandard“ ISO 11731 dienen. Ausserdem können mittels APT verschiedene Legionellen und andere amöbenresistente Krankheitserreger aus Mikrobiomen anreichert werden, die unter Standardbedingungen keinen Nachweis von pathogenen Bakterien erlauben.

Die Publikation von Moreno et. al. (2024) ist im Anhang [3].

4. Generelle Diskussion

4.1 Trinkwasser-Verteilnetz als Habitat für Legionellen

In den Trinkwasserverteilnetzen von Lugano und Zürich wurden relativ hohe Konzentrationen von *Legionella* spp. von 10^3 bis 10^8 genomische Einheiten pro Liter mit PCR nachgewiesen, aber selten kultivierbare Legionellen mit der ISO 11731 Methode. Die Tatsache, dass Legionellen nicht kulturell nachgewiesen werden können, aber durch PCR, kann verschieden Gründe haben. 1. Legionellen können in einen Viable but not culturable (VBNC)-Zustand übergehen, in dem sie lebensfähig, aber nicht kultivierbar sind. In diesem Zustand sind sie metabolisch aktiv, können sich aber nicht auf Nährmedien vermehren. 2. Die verwendeten Nährmedien können möglicherweise nicht alle Legionellen-Stämme optimal unterstützen. Einige Stämme könnten aufgrund spezifischer Nährstoffanforderungen nicht wachsen. 3. Tote Legionellen: Abgestorbene Bakterien lassen sich nicht kultivieren, können aber in Proben vorhanden sein und zu falsch-negativen Ergebnissen führen. 4.

Konkurrierende Mikroorganismen: Andere Bakterien in der Probe können das Wachstum von Legionellen hemmen oder überdecken. Auch in anderen Studien wurden mit PCR Legionellen in einem ähnlichen hohen Konzentrationsbereich gemessen [8-10]. *L. pneumophila* hingegen wurde in Trinkwasser-Verteilnetzen nur sporadisch kulturell oder auch durch PCR nachgewiesen [11-13]. Das allgegenwärtige Vorkommen von *Legionella* spp. in allen untersuchten Wasserversorgungsanlagen deutet darauf hin, dass behandeltes Wasser das Potenzial für das Wachstum von *Legionella* hat, selbst bei einer niedrigen Nährstoffkonzentration. *L. pneumophila* kann sich nur bei erhöhten Temperaturen gegenüber der Konkurrenz durchsetzen und sich in nachweisbaren Konzentrationen vermehren und kann daher nur sporadisch nachgewiesen werden. In der Studie von van der Kooij konnte gezeigt werden, dass *L. pneumophila* sich ab einer Temperatur von $\geq 25^{\circ}\text{C}$ gegen die anderen Legionellenarten durchsetzen und vermehren kann [14]. Bei Temperaturen $\leq 25^{\circ}\text{C}$ wird vorwiegend *Legionella anisa* nachgewiesen [15]. Kommunale Wassersysteme gelten im Allgemeinen nicht als signifikante Quelle für Legionellen und das Legionellenrisiko wird als entsprechend klein eingeschätzt [16, 17]. Dieses Verständnis basiert auf mehreren Faktoren:

1. Aufbereitungsverfahren: Kommunale Wassersysteme setzen in der Regel umfassende Aufbereitungsverfahren ein, einschliesslich Desinfektion, die dazu beitragen, das Wachstum von Mikroben zu kontrollieren.
2. Regelmässige Überwachung: Diese Systeme werden häufig getestet und unterliegen Qualitätskontrollmassnahmen, um die Sicherheit des Wassers zu gewährleisten.
3. Kontinuierlicher Durchfluss: Die ständige Bewegung des Wassers in kommunalen Systemen verhindert die Bildung von Biofilmen, in denen sich Legionellen vermehren können.
4. Temperaturkontrolle: Kommunales Wasser wird in der Regel auf Temperaturen gehalten, die für das Wachstum von Legionellen nicht optimal sind.
5. Regulatorische Aufsicht: Strenge Vorschriften und Richtlinien regeln den Betrieb von kommunalen Wassersystemen, einschliesslich Massnahmen zur Verhinderung einer Legionellenkontamination.

Stagnationszone Hydranten

In den bisherigen Studien wurden gemäss unserem Kenntnisstand ausschliesslich die Hauptleitungen kontrolliert, nicht aber die Stagnationszonen wie die Hydranten und deren Zuleitungen. Ein Ausbruch von Legionellosefällen in einem Spital, bei dem vermutet wird, dass naheliegende Hydranten eine Rolle spielen, wurde beschrieben [18]. In den Zuleitungen zu den Hydranten stagniert und erwärmt sich das Wasser in den Sommermonaten (Abbildung 2). Alle 2 Jahre wird gemäss Feuerwehrrglement eine Funktionskontrolle durchgeführt, dabei wird der Hydrant gespült [19]. Nur wenn ein spezieller Spülplan der Wasserversorgung vorliegt, werden zwischen den Funktionskontrollen zusätzliche Spülungen durchgeführt. Die Anforderungen an Hydranten sind im SVGW-Reglement W15005 definiert [20].

Der Hydrant besteht generell aus Gusseisen. Die Zuleitungen können aus verschiedenen bestehen wie Gusseisen oder Kunststoff. In den Sommermonaten kann sich die Temperatur im Wasser der Zuleitung auf bis zu 30°C erwärmen. Das Wasser ist vielfach braun verfärbt und hat teilweise einen rostbraunen Rückstand **Fehler! Verweisquelle konnte nicht**

gefunden werden.. Die Oberflächenrauheit bietet einen geschützten Lebensraum für Biofilmorganismen [21]. Die Korrosion von Rohroberflächen stellt ebenfalls eine Nährstoffquelle dar. Eine erhöhte Bioverfügbarkeit verschiedener Metallkorrosionsprodukte, wie z. B. Eisen, kann auch die Virulenz von Legionellen erhöhen und das allgemeine Biofilmwachstum stimulieren [22]. In Laborexperimenten konnte gezeigt werden, dass Korrosionsprodukte organische Substanzen binden und mikrobiologisches Wachstum fördern können [23]. Es stellt sich die Frage, ob bei einem kontinuierlichen Austausch zwischen Hydranten-zuleitung und Hauptleitung möglicherweise organische Substanzen «eingefangen» werden und zu lokalen Verkeimungszonen führen können.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass Bakterien in den Zuleitungen zu Hydranten gute Bedingungen für Ihre Vermehrung wie Stagnation, erhöhte Wassertemperaturen, raue Oberfläche, erhöhte Eisenkonzentrationen wie auch eventuell organische Kohlenstoffe vorfinden. Es ist deshalb erklärbar, dass die Gesamtzellzahl von Proben aus Hydranten mit wenig Vorlauf deutlich erhöht sind gegenüber Laufbrunnen oder Proben mit 30 Liter Vorlauf (Abbildung 20).

4.2 Vergleich Lugano und Zürich

Die Inzidenzrate für Legionellose ist in Lugano mit 26.6 (Legionellosefälle pro 100'000 Personen und Jahr) fast viermal höher als in Zürich. Bis heute konnte keine Erklärung für diese deutlich höhere Inzidenzrate in Lugano gefunden werden. In der Abbildung 22 werden die beiden Städte und deren Wasserversorgungen Lugano und Zürich verglichen. 2023 konnten *L. pneumophila* nur in Lugano in den Wasserproben von Hydranten gemessen werden nicht aber in Zürich. Beide Trinkwasser-Verteilnetze werden nur sporadisch und sehr schwach gechlort. Auch gehen wir davon aus, dass die Stagnation insbesondere bei den Hydranten sehr ähnlich ist. Ein Unterschied ist die Temperatur des Leitungswassers, welche in Lugano höher als in Zürich ist (siehe Abbildung 13 und 17). Ein weiterer Unterschied könnte im Nährstoffgehalt des Leitungswassers liegen. In Lugano wird das Seewasser nach der Ozonisierung direkt in das Verteilnetz abgegeben, währenddessen in Zürich eine Langsamsandfiltration durchgeführt wird. Dies könnte zu einem höheren Nährstoffgehalt im aufbereiteten Seewasser in Lugano führen.

Tabelle 19 Vergleich der beiden Wasserversorgungen Lugano und Zürich

	Lugano	Zürich
Legionellosefälle (Abschätzung durch Fächslin)	17 Fälle pro 64'000 EW Inzidenzrate: 26.6 Fälle pro 100'000 EW	30 Fälle pro 440'000 EW Inzidenzrate: 6.8 Fälle pro 100'000 EW
Legionellen im Verteilnetz 2023	<i>Legionella</i> spp.: $5.6 \cdot 10^3$ - $4.8 \cdot 10^8$ $\varnothing 1.6 \cdot 10^7$ Kopien pro Liter <i>L. pneumophila</i> : 3 von 5 Hydranten Nachweis durch PCR	<i>Legionella</i> spp.: $2.1 \cdot 10^4$ - $3.3 \cdot 10^6$ $\varnothing 7.5 \cdot 10^5$ Kopien pro Liter <i>L. pneumophila</i> : Kein Nachweis
Netzschutz	Unbedeutend (gleich)	Unbedeutend (gleich)
Stagnation	Gleich (Spülplan Hydrant)	Gleich (Spülplan Hydrant)
Wassertemperatur	Höher	Tiefer
Nährstoffgehalt (Assimilable organic Carbon (AOC))	Eventuell höher	Eventuell tiefer

4.3 Risikoeinschätzung der nachgewiesenen Legionellen und anderer Umweltpathogenen

In der Fachliteratur sind zwei Fälle beschrieben, bei denen der Ursprung der Legionärskrankheit im Trinkwasserverteilungssystem vermutet wird [24, 25]. Das Trinkwasserverteilnetz als Infektionsquelle muss als mögliche Infektionsquelle für die Legionärskrankheit in Betracht gezogen werden.

Nachweis von *L. pneumophila* in Hydranten

Aus dem Hydrant Nr. 6514 in Lugano wurde zweimal *L. pneumophila* SG 1 und einmal *L. pneumophila* SG 3 isoliert. Die von Dr. Tim Roloff durchgeführte Gensequenzanalyse hat ergeben, dass die zwei *L. pneumophila* SG 1 Isolate mit den klinischen Isolatzen aus der Region identisch sind und entsprechend einen Match bilden. Dies ist ein starker Hinweis, dass die aus Verteilnetz isolierten Legionellen klinisch relevant sind. Ausserdem wurden in 16 von 94 Hydranten *L. pneumophila* SG 1 mit PCR nachgewiesen (Kapitel 3.2.6). Die nachgewiesenen Konzentrationen waren bis maximal 483 GE / Liter aber relativ tief. Die meisten Erkrankungen im Tessin wie auch in der Schweiz werden durch *L. pneumophila* SG 1 verursacht. Die Zubringerleitung zum Hydranten ist gegenüber der Hauptleitung offen und im Austausch und könnte so stetig Legionellen an das vorbeifliessende Wasser

abgeben, welches zu den Duschen in die Haushalte gelangt. Es stehen zwei plausible Übertragungswege von *L. pneumophila* SG 1 aus Hydranten zur Diskussion:

a) Einzelne *L. pneumophila* gelangen durch das Verteilnetz in Hausinstallationen. Dort vermehren sie sich unter günstigen Bedingungen zu gesundheitsgefährdenden Konzentrationen. Menschen werden dann über Duschen, Waschbecken und ähnliche Wasserquellen im Gebäude infiziert.

b) Geringe Konzentrationen von *L. pneumophila* verbreiten sich über das Trinkwasser-Verteilnetz und erreichen viele Menschen. Dies führt direkt zu vereinzelt, sporadischen Fällen von Legionellose.

Beide Varianten beschreiben plausible Übertragungswege, die sich in der Art der Vermehrung und dem Ort der Infektion unterscheiden. Die erste Variante betont die Vermehrung in Hausinstallationen, während die zweite eine direkte Infektion durch das Verteilnetz vorschlägt.

Neben der Art der Legionellen ist ihre Konzentration entscheidend, ob sie zu Legionellose-Erkrankungen führen können. In der Hauptleitung wurden mit der 50 Liter Filtermethode oberhalb der Nachweisgrenze von 6.4 KBE pro Liter keine *L. pneumophila* nachgewiesen (Hauseingang Grundschule in Via B. Folletei Lugano und Sihlsportanlage (Zürich)). Es gibt gemäss unserer Kenntnis kein Schwellenwert für die Legionellenkonzentration, die einem vor einer Legionelleninfektion schützt. Bei sehr tiefen Konzentrationen ist die Wahrscheinlichkeit sehr klein, aber nicht null für eine Infektion. Gemäss Hamilton wird ein jährliches 10^{-4} -Risiko bei einer Legionellenkonzentration von 1.38 KBE *L. pneumophila* pro Liter erwartet [26]. Übertragen auf die Stadt Zürich bedeutet ein 10^{-4} -Risiko bei einer Einwohnerzahl von 440'000, dass jährlich mit 44 Legionellose-Erkrankungen gerechnet werden muss. In den letzten Jahren wurden ca. 30 Legionellosefälle pro Jahr in der Stadt Zürich gemeldet. Die Stadt Zürich liegt mit $0.7 \cdot 10^{-4}$ leicht unter dem $1.0 \cdot 10^{-4}$ -Risiko. Der berechnete Zielwert von 1.38 KBE *L. pneumophila* pro Liter für ein 10^{-4} -Risiko ist mit vielen Annahmen und Unsicherheiten behaftet. Er gibt aber eine Grössenordnung an, welche messtechnisch wie auch zur Einschätzung der Relevanz diskutiert werden kann. Mit der aktuellen Standardkultivierungsmethode (ISO 11731) können weder in diesem Konzentrationsbereich Legionellen nachgewiesen werden, noch die vorhandenen Legionellen in ihrem physiologischen Zustand kultiviert werden. Mit unserer PCR-Methode in Verbund mit der 50 Liter-Sammelprobe erreichen wir eine nach unten extrapolierte Nachweisgrenze von 6.4 Genkopien/l. Dieser Wert ist numerisch höher. Es führt aber nicht jede Genkopie zu einer Kolonie auf der Platte. Es ist aber technisch schwierig in diesem tiefen Bereich Legionellen zu quantifizieren. Legionellen, die mit dem Leitungswasser in die Hausinstallation gelangen, können sich weiter vermehren.

Ein Grossteil der Leitungen und Hydranten besteht aus Gusseisen. Es ist deshalb erklärbar, dass viele Hydrantenproben durch Korrosion braun verfärbt waren (**Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**). Die Virulenz von Legionellen könnte in den Stagnationszonen von Hydranten durch die hohen Eisenkonzentrationen erhöht sein. Erhöhte Eisenkonzentrationen wurden in Verbindung mit steigenden Infektionsraten von Amöben und Makrophagen durch Legionellen in Verbindung gebracht, die als Indikatoren für eine erhöhte Virulenz gelten [24, 25].

Es bleibt eine offene Frage, ob die nachgewiesenen *L. pneumophila* direkt oder über die Vermehrung in den Hausinstallationen zu Infektionen führen.

Klinisch relevante Legionellen unter den hohen Konzentrationen an *Legionella* spp.

Hohe Werte an *Legionella* spp. konnten durch PCR (10^3 bis 10^7 Kopien pro Liter) in beiden Verteilnetzen von Lugano und Zürich gemessen werden. Es stellt sich die Frage, ob unten den nachgewiesenen Legionellen sich auch klinisch relevante Legionellen befinden. In unseren 16S-Sequenzanalysen konnten keine klinisch relevanten nicht-pneumophila Legionellenarten festgestellt werden (Kapitel 3.5). Die Methode der 16S-Sequenzanalyse hat aber eine relative hohe Nachweisgrenze von 0.1 bis 1 % relative Häufigkeit. Zukünftig sollte eine Multiplex-PCR für klinisch relevante nicht-pneumophila Legionellen-Spezies wie *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, *L. micdadei*, und *L. anisa* etabliert werden, um Leitungswasser mit einer niedrigeren Nachweisgrenze untersuchen zu können.

4.4 Mögliche Präventionsmassnahmen für die Verkeimung bei Hydranten

Im Verteilnetz müssen Zonen vermieden werden, in denen sich Umweltpathogene wie Legionellen, *P. aeruginosa*, Mykobakterien und *D. acidoverans*, etc. vermehren können oder das Leitungswasser verkeimt. In diesem Kapitel sollen mögliche Präventionsmassnahmen vorgeschlagen und diskutiert werden. Als Grundlage soll das Hygienedreieck für die Legionellenprävention in Gebäuden dienen (Abbildung 35). Was für die Hausinstallation gilt, kann generell auch auf das Verteilnetz übertragen werden. So sollte in den Zuleitungen zu den Hydranten Stagnation und übermässige Erwärmung vermieden werden. Auch sollte das Leitungswasser generell nährstoffarm sein.

Temperatur

Legionellen können sich in Trinkwasserverteilungsnetzen ab ≥ 20 °C, fallweise bereits ab ≥ 15 °C vermehren [12]. *L. pneumophila* können sich ab ≥ 25 °C vermehren [20-23].

Nährstoffe

In niederländischen Trinkwasserverteilungssystemen wurden deutlich niedrigere AOC-Werte von 5 bis 10 µg/l mit niedrigeren *L. pneumophila*-Werten assoziiert [27].

Gelöstes Eisen fördert die Vermehrung von Legionellen [28]. Ausserdem wurden erhöhte Eisenkonzentrationen in Verbindung mit steigenden Infektionsraten von Amöben und Makrophagen durch Legionellen in Verbindung gebracht, die als Indikatoren für eine erhöhte Virulenz gelten [29, 30].

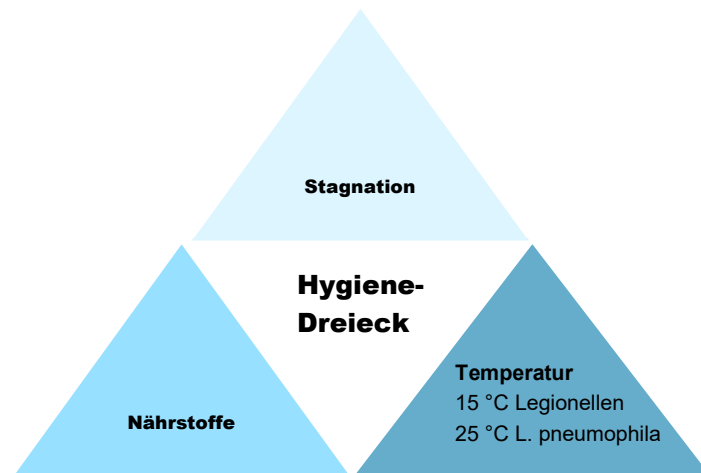


Abbildung 35 Hygienedreieck: Die wichtigsten Faktoren zur Legionellenprävention in der Hausinstallation lassen sich im Allgemeinen auch auf das Verteilungsnetz übertragen.

4.4.1 Regelmässig spülen

In zweijährigem Rhythmus wird eine Funktionskontrolle durchgeführt, im Rahmen derer Hydranten gespült werden [19]. In Problemzonen ist eine Verkürzung des Intervalls für die Hydrantenspülung zu erwägen. Eine Erwärmung des Leitungswassers lässt sich nicht verhindern. Allerdings besteht die Möglichkeit, sowohl die Eisen- als auch die Legionellenkonzentration zu reduzieren. In unserer Messkampagne zeigte sich, dass bei regelmässigen Probenahmen sich die Legionellenkonzentration reduzierte.

4.4.2 Vermeidung von Stagnationszonen durch verschlaufte Leitungsführung

In Gebäudeinstallationen werden verschlaufte Leitungen angewendet, um Stagnationszonen zu vermeiden. Es stellt sich die Frage, ob dies auf das kommunale Trinkwasserversorgungsnetz übertragen werden kann. Die Hydranten sollen in einem Ringleitungssystem angeordnet werden, um Tottleitungen und «Sackgassen» zu vermeiden. Die Herausforderung liegt in der aufwändigeren Installation mit entsprechend höheren Kosten. Die verschlaufenen Leitungen führen zu Druckverlusten. Die Frage ist, ob der Wasserdruck auf einem ausreichenden Niveau gehalten werden kann.

4.4.3 Leitung tiefer in Boden verlegen

Die Reduzierung der Wassertemperatur im Sommer kann durch eine tiefere Verlegung der Wasserleitungen erreicht werden. Diese Massnahme führt zu einer Senkung der Wassertemperatur in den Leitungen während der kritischen Sommermonate. Allerdings resultiert aus der Tieferlegung der Leitungen ein erhöhter Installationsaufwand. Die Realisierbarkeit für bestehende Infrastrukturen muss generell in Frage gestellt werden.

4.4.4 Netzschutz (Chlorung)

Das Leitungswasser könnte gechlort und somit ein Netzschutz etabliert werden. Gemäss US-amerikanischen Experten wird im «Management of *Legionella* in Water Systems» [31] ein Netzschutz als präventive Massnahme gegen Legionellen in Wassersystemen empfohlen. Untersuchungen haben gezeigt, dass sich Legionellen im Verteilnetz unter einer Chlorkonzentration von 0,1 mg/l vermehren können [12]. Es wird davon ausgegangen, dass sich das Chlor in den Zuleitungen zu den Hydranten schnell neutralisieren wird. Ein wirkungsvoller Chlornetzschutz kann jedoch auch Nachteile wie Chlorgeruch und die Bildung von kanzerogenen Chlornebenprodukten mit sich bringen.

4.4.5 Reduktion von Nährstoffen

Durch Reduktion der Nährstoffe könnte die Vermehrung von Bakterien und Legionellen reduziert werden.

a) Reduktion des biologisch verfügbaren organischen Kohlenstoff (AOC)

Ein wesentlicher Unterschied zwischen der Wasserversorgung von Lugano und Zürich liegt in der Wasseraufbereitung. In Lugano wird das aufbereitete Seewasser direkt in das Verteilnetz geleitet, nachdem es mit Ozon behandelt wurde. In Zürich hingegen wird nach der Ozonung eine Langsandsandfiltration durchgeführt. Im Rahmen der Langsandsandfiltration wird durch die Ozonung gebildeter AOC abgebaut. In Lugano ist eine Langsandsandfiltration für die kommenden Jahre geplant.

b) Reduktion von verfügbarem Eisen

In den Wasserproben aus Hydranten konnte häufig eine braune Verfärbung des Wassers festgestellt werden (vgl. Abbildung 23). Eine mögliche Methode zur Reduktion des Eisengehalts ist das Spülen. Eine weitere Option könnte der Ersatz stark korrodierter Leitungen und Hydranten durch Kunststoff- bzw. rostfreie Leitungen sein. Es ist jedoch noch zu untersuchen, ob durch diese Massnahme allein eine deutliche Reduktion der Kontamination durch *L. pneumophila* zu erreichen ist. Diese Fragestellung bedarf weiterer Untersuchung.

4.5 Projektfragen und offene Fragen Legionellen im Verteilnetz

4.5.1 Projektfragen

Im Forschungsantrag wurden vor drei Jahren folgende Teilaufgaben und Thesen zur Abklärung formuliert. Dazu wird Stellung genommen.

1. Nachweis, Quantifizierung und Differenzierung von Legionellen im Verteilungsnetz

Mit wenigen Ausnahmen konnte durch Standard-Kultivierungsmethode ISO 11731 keine Legionellen im Verteilungsnetz nachgewiesen werden. Mit PCR wurden hohe Konzentrationen von *Legionella* spp. 10^3 bis 10^7 Kopien pro Liter durch PCR gemessen werden. *L. pneumophila* konnte nur sporadisch aus Hydranten nachgewiesen werden. Es war nicht möglich, *L. pneumophila* im Leitungswasser im Hauptverteilnetz zu quantifizieren. Es ist fraglich, ob die Konzentration von *L. pneumophila* unterhalb der Nachweisgrenze lagen und ob *L. pneumophila* nur sporadisch im Hauptverteilnetz auftritt.

2. These: Legionellen können sich im Verteilungsnetzwerk vermehren

Legionellen können sich vor allem in den Leitungen zu den Hydranten zu nachweisbaren Konzentrationen vermehren.

3. Bestimmung der Pathogenität von Legionellen im Verteilungsnetzwerk

Isolate aus dem Verteilnetz stimmen mit den klinischen Isolaten aus der Region überein. Dies ist ein Hinweis auf eine hohe Pathogenität dieser Isolate. Der Nachweis von *L. pneumophila* in Hydranten mittels Amöben-Platten-Test zeigt, dass diese Stämme amöbenresistent sind, und deutet darauf hin, dass die Stämme virulent sind. Die Pathogenität konnte aber nicht direkt bestimmt werden.

4. Epidemiologische Relevanz von Legionellen aus dem Verteilungsnetzwerk

Aus dem Hydranten 6514 vom Trinkwasser-Verteilnetz aus dem Tessin konnten zwei *L. pneumophila* SG 1 – Stämme isoliert werden. Die Sequenzanalyse hat ergeben, dass die zwei Isolate einen Match mit den lokal vorhandenen klinischen Isolaten sind. Dies ist ein Hinweis auf eine hohe epidemiologische Relevanz der Legionellen im Verteilnetz.

L. pneumophila konnte nicht im Hauptleitungsnetz quantifiziert werden. Somit konnte keine Modellierung durchgeführt werden.

Wir hoffen, dass die Gesamtanalyse durch das Swiss-Legio – Projekt diese Frage weiter klären wird.

4.5.2 Offene Fragen

Die wichtigsten offenen Fragen, die sich aus dem Projekt ergeben haben:

1. Sind die nachgewiesenen *L. pneumophila* im Verteilnetz von Lugano die Ursache für die fast viermal höhere Inzidenzrate von Legionellose-Fällen der Stadt Lugano im Vergleich zur Stadt Zürich?
2. Was sind die Infektionswege der *L. pneumophila* SG 1 aus den Hydranten? Zwei Varianten werden zur Diskussion gestellt.
 - a) Durch Verteilnetz gelangen einzelne Legionellen in Hausinstallationen und vermehren sich dort unter günstigen Bedingungen zu gesundheitsgefährdenden Konzentrationen. Personen werden via Duschen, Lavabohähnen etc. infiziert.
 - b) Durch das Trinkwasser-Verteilnetz gelangen tiefe Konzentrationen an *L. pneumophila* an viele Menschen. Dies führen direkt zu einzelnen sporadischen Legionellosefällen.
3. Wie hoch ist die hydraulische Austauschrate zwischen Hydrantenzuleitung und Hauptleitung? Wie viele Legionellen gelangen aus einem kontaminierten Hydranten in das Hauptnetz?
4. Häufig wurde braun gefärbtes Rostwasser aus Hydranten entnommen. Erhöhte Eisenkonzentrationen wurden mit erhöhten Infektionsraten von Amöben und Makrophagen durch Legionellen in Verbindung gebracht, die als Indikatoren für eine erhöhte Virulenz gelten [29, 30]. Es sollte geklärt werden, ob Legionellen aus Hydranten durch Rostwasser eine erhöhte Virulenz aufweisen.
5. Was ist die Konzentration von *L. pneumophila* im Leitungswasser der Hauptleitung? Die Konzentrationen sind sehr tief (wenige Genkopien pro Liter) und sehr wahrscheinlich schwankend. Es müssen Methoden entwickelt werden, welche *L. pneumophila* in diesem tiefen Bereich nachweisen und quantifizieren kann.
6. Es wurden hohe Konzentrationen an *Legionella* spp. durch PCR (10^3 bis 10^7 Kopien pro Liter) in beiden Verteilnetzen von Lugano und Zürich nachgewiesen werden. Es stellt sich die Frage, ob unten den nachgewiesenen Legionellen sich auch klinisch relevante Legionellen befinden, die nicht *L. pneumophila* sind.
7. In der Schweiz wird das Leitungswasser normalerweise nicht gechlort. Der fehlende Netzschutz kann die Vermehrung von Umweltpathogenen zusätzlich fördern. Mit der Klimaerwärmung muss in Zukunft mit höheren Temperaturen des Leitungswassers gerechnet werden. Die aktuellen mikrobiologischen Kontrollparameter wie Fäkalindikatoren und Gesamtkeimzahl bieten keinen Schutz vor Umweltpathogenen. Die Entwicklung neuer Methoden zur Kontrolle des Leitungsnetzes hinsichtlich einer Vielzahl von Umweltpathogenen ist eine zukünftige Herausforderung. Als Screening-Methode könnte 16S-Sequenzanalyse wie auch der Amöben-Platten-Test evaluiert werden.

5. Schlussfolgerungen

In den Trinkwasserverteilungsnetzen von Lugano und Zürich wurden mittels PCR hohe Konzentrationen von *Legionella* spp. nachgewiesen, aber nur selten kultivierbare Legionellen mit Standardmethoden oder dem Amöben-Platten-Test.

Hydranten und ihre Versorgungsleitungen scheinen potenzielle Reservoirs für Legionellen zu sein, insbesondere bei höheren Temperaturen im Sommer.

L. pneumophila wurde in Hydranten in Lugano, aber nur mit einer Ausnahme in Zürich nachgewiesen, möglicherweise aufgrund höherer Wassertemperaturen und eines potenziell höheren Nährstoffgehalts in Lugano.

Die Legionellose-Inzidenz ist in Lugano im Vergleich zu Zürich deutlich höher. Es ist eine offene Frage, ob ein Zusammenhang besteht mit den nachgewiesenen *L. pneumophila* im Verteilnetz von Lugano. Die genauen Gründe sind unklar.

Der optimierte Amöbenplattentest kann als ergänzende Methode zum Nachweis und zur Bestimmung der Virulenz von Legionellen dienen.

Die Studie ergab, dass 21 von 94 Hydranten in Lugano mittels PCR positiv auf *L. pneumophila* und *L. pneumophila* SG 1 getestet wurden.

L. pneumophila-Isolate aus dem Verteilungsnetz in Lugano stimmten genetisch mit klinischen Isolaten aus der Region überein, was auf ihre klinische Relevanz hindeutet.

Eisenkorrosion in Hydranten kann zum Wachstum von Legionellen beitragen und möglicherweise ihre Virulenz erhöhen. Dies sollte in weiteren Studien abgeklärt werden.

Die Studie deutet darauf hin, dass die derzeitigen mikrobiologischen Kontrollparameter möglicherweise keinen ausreichenden Schutz vor umweltbedingten Krankheitserregern bieten, was die Notwendigkeit neuer Überwachungsmethoden unterstreicht. Als Screening-Methode könnte 16S-Sequenzanalyse wie auch der Amöben-Platten-Test evaluiert werden.

Die Schweizer Bevölkerung genießt eine gute Trinkwasserqualität, und die Wasserversorgungen verzichten in der Regel auf die Chlorung des Leitungswassers. Die Klimaerwärmung wird in Zukunft zu höheren Leitungswassertemperaturen führen. Es ist daher zu erwarten, dass die Vermehrung von Bakterien und auch von Umweltpathogenen wie Legionellen im Leitungsnetz begünstigt wird. Es sollten weitere Studien zur Risikobewertung durchgeführt werden, um abschätzen zu können, ob in Zukunft deswegen konkrete Massnahmen ergriffen werden müssen. Eventuell könnte eine regelmässige Spülung von Hydranten in den Problemzonen der betroffenen Wasserversorgungen eine wesentliche Verbesserung bringen.

6. Verdankungen

Das Projekt «Relevanz von Legionellen im Verteilungsnetz» wird finanziell unterstützt durch das Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (BLV), das Bundesamt für Energie (BFE), Amt für Hochbauten der Stadt Zürich (AHB), Immobilien Stadt Zürich (IMMO), die Aziende Industriali di Lugano (AIL) und die Wasserversorgung Zürich (WVZ). Die Projektpartner und Mitarbeitenden sind nebst Dr. Hans Peter Füchsli (KLZH), Prof. Dr. Hubert Hilbi (UZH), Prof. Dr. Adrian Egli (UZH), Dr. Valeria Gaia (Nationales Referenzzentrum Legionellen Bellinzona), sowie Dr. Tim Roloff, Dr. Anaisa Moreno, Tong Chen, Severin Wälty und Colin Schmid (alle UZH). Wir danken Prof. Dr. Daniel Mäusezahl und Melina Bigler (Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut) für den fachlichen Austausch. Auch danken wir den beiden Firmen bNovate Technologies und Promega AG für ihre materielle und fachliche Unterstützung.

7. Referenzen

1. (SVGW), S.V.d.G.-u.W. www.trinkwasser.ch [cited 2025 03.01.2025]; Available from: <https://trinkwasser.ch/>.
2. Zürich, S. *Beschreibung Wasserversorgung Zürich*. 03.01.2025]; Available from: <https://www.stadt-zuerich.ch/de/umwelt-und-energie/wasser/verteilung-aufbereitung.html>.
3. Moreno A., et al., *Optimization of the Amoeba Plate Test for the Isolation of Legionella and Other Opportunistic Pathogens from Environmental Water Samples*. ACS ES&T Water, 2024(December 5, 2024).
4. Eble, D., et al., *Comparison of the culture method with multiplex PCR for the confirmation of Legionella spp. and Legionella pneumophila*. J Appl Microbiol, 2021. **131**(5): p. 2600-2609.
5. Herpers, B. and e. al., *Real-Time PCR Assay Targets the 23S-5S Spacer for Direct Detection and Differentiation of Legionella spp. and Legionella pneumophila*. Journal of Clinical Microbiology, 2003. **41**(10).
6. Welte, M., et al., *Development of a multiplex real-time quantitative PCR assay to detect Chlamydia pneumoniae, Legionella pneumophila and Mycoplasma pneumoniae in respiratory tract secretions*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2003. **45**(2): p. 85-95.
7. Khachatryan, V., et al., *Search for quark compositeness with the dijet centrality ratio in pp collisions at $\sqrt{s}=7$ TeV*. Phys Rev Lett, 2010. **105**(26): p. 262001.
8. Wullings, B., A. and D. van der Kooij, *Occurrence and Genetic Diversity of Uncultured Legionella spp. in Drinking Water Treated at Temperatures below 15°C*. Appl Environ Microbiol, 2006. **72**: p. 157-166.
9. Wullings, B.A., G. Bakker, and D. van der Kooij, *Concentration and diversity of uncultured Legionella spp. in two unchlorinated drinking water supplies with different*

- concentrations of natural organic matter. Appl Environ Microbiol, 2011. **77**(2): p. 634-41.
10. Zhang, C., et al., *Legionella and other opportunistic pathogens in full-scale chloraminated municipal drinking water distribution systems*. Water Res, 2021. **205**: p. 117571.
 11. LeChevallier, M., *Monitoring distribution systems for Legionella pneumophila using Legiolert*. AWWA Water Science 2018.
 12. LeChevallier, M.W., *Occurrence of culturable Legionella pneumophila in drinking water distribution systems*. AWWA Wat Sci., 2019. **e1139**: p. 1-13.
 13. Hozalski, R.M., et al., *On-site filtration of large sample volumes improves the detection of opportunistic pathogens in drinking water distribution systems*. Appl Environ Microbiol, 2024. **90**(2): p. e0165823.
 14. van der Kooij, D., H.R. Veenendaal, and W.J. Scheffer, *Biofilm formation and multiplication of Legionella in a model warm water system with pipes of copper, stainless steel and cross-linked polyethylene*. Water Res, 2005. **39**(13): p. 2789-98.
 15. Oesterholt, F. and D. van der Kooij, *Legionella in woninginstallaties*. H2O, 2003. **38**(4): p. 19-20.
 16. Benedict, K.M., et al., *Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water - United States, 2013-2014*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2017. **66**(44): p. 1216-1221.
 17. Beer, K.D., et al., *Surveillance for Waterborne Disease Outbreaks Associated with Drinking Water - United States, 2011-2012*. MMWR Morb Mortal Wkly Rep, 2015. **64**(31): p. 842-8.
 18. Patterson, W.J., et al., *Colonization of transplant unit water supplies with Legionella and protozoa: precautions required to reduce the risk of legionellosis*. Journal of Hospital Infection, 1997. **37**(1): p. 7-17.
 19. (GVZ), G.K.Z., *Merkblatt Hydranten* G.K.Z. (GVZ), Editor. 2018.
 20. SVGW, *W15005 d Fachinformation; Grundlagen für die Planung, Erstellung, Betrieb und Unterhalt von Wasserversorgungen und Hydrantenanlagen*. 2000.
 21. Characklis, W.G. and K.C. Marshall, *Biofilms*. 1990, New York: Wiley.
 22. Buse, H.Y., M.E. Schoen, and N.J. Ashbolt, *Legionellae in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure*. Water Research, 2012. **46**(4): p. 921-933.
 23. Abernathy, C. and A. Camper. *The effect of phosphorus based corrosion inhibitors and low disinfectant residuals on distribution biofilms*. in *Proceedings of the 1998 American Water Works Association Water Quality Technology Conference, San Diego, Calif.* 1998.
 24. Cohen, P.D., et al., *Community outbreak of legionellosis and an environmental investigation into a community water system*. Epidemiol. Infect. , 2015. **143**: p. 1322–1331.
 25. Zahran, S., et al., *Assessment of the Legionnaires' disease outbreak in Flint, Michigan*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2018. **115**(8): p. E1730-E1739.
 26. Hamilton, K.A., et al., *Risk-Based Critical Concentrations of Legionella pneumophila for Indoor Residential Water Uses*. Environ Sci Technol, 2019. **53**(8): p. 4528-4541.

27. van der Kooij, D. and P.W.J.J. van der Wielen, *Microbial growth in drinking-water supplies. Problems, causes, control and research needs*. IWA Publishing, 2014.
28. Van der Kooij, D., *Microbial growth in drinking water supplies problems, causes, prevention and research needs*. 2014, London: IWA Publishing. 453 S.
29. Buracco, S., et al., *Differential Effects of Iron, Zinc, and Copper on Dictyostelium discoideum Cell Growth and Resistance to Legionella pneumophila*. Front Cell Infect Microbiol, 2017. **7**: p. 536.
30. James, B.W., et al., *Poly-3-hydroxybutyrate in Legionella pneumophila, an energy source for survival in low-nutrient environments*. Appl Environ Microbiol, 1999. **65**(2): p. 822-7.
31. Sciences, N.A.o., *Management of Legionella in Water Systems*. 2019: Washington (DC). p. page 35, 62, 64.

8. Anhang

Publikationen im Rahmen des Projektes

Moreno, A. B., Chen, T., Gökuguz, Y., Wälty, S., Schmid, C., Egli, A., Gaia V., Fuchsli H.P., Hilbi, H. (2024). Optimization of the Amoeba Plate Test for the Isolation of Legionella and Other Opportunistic Pathogens from Environmental Water Samples. *ACS ES&T Water*, <https://doi.org/10.1021/acsestwater.4c00915>.

F., Fuchsli, F. Di Rosario, Y. Gökuguz, S. Kaufmann und T. Egli (2024). Umweltpathogene im Verteilnetz. *Aqua & Gas*, (12).

Untersuchungs-Berichte

- a) Detection of *Legionella* through 16S sequencing vom 04.12.2024
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Zürich
Autor: Vanni Benvenega
- b) Molekulare Typisierung mittels Genom-Sequenzierung (WGS) vom 03.01.2025
Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universität Zürich
Autor: Dr. T. Roloff Handschin)
- c) Mikrobiologische Analysen Legionellen im Verteilnetz (Oberflurhydranten)
Wasserversorgung Zürich
Auftrag: A-017461
- d) Mikrobiologische Analysen Legionellen im Verteilnetz (Oberflurhydranten)
Wasserversorgung Zürich
Auftrag: A-017462

Optimization of the Amoeba Plate Test for the Isolation of *Legionella* and Other Opportunistic Pathogens from Environmental Water Samples

Anaís B. Moreno, Tong Chen, Yasemin Gökuguz, Severin Wälty, Colin Schmid, Adrian Egli, Valeria Gaia, Hans Peter Fuchsli, and Hubert Hilbi*



Cite This: <https://doi.org/10.1021/acsestwater.4c00915>



Read Online

ACCESS |

Metrics & More

Article Recommendations

Supporting Information

ABSTRACT: Free-living amoebae represent a reservoir for some environmental bacteria that are opportunistic human pathogens. *Legionella pneumophila* is a Gram-negative, amoeba-resistant bacterium, which upon inhalation can cause a life-threatening atypical pneumonia termed Legionnaires' disease. The capacity to grow within amoebae and other protozoa is a prerequisite for *L. pneumophila* virulence and requires the bacterial Icm/Dot type IV secretion system (T4SS). The amoeba plate test (APT) exploits the capacity of virulent rather than Icm/Dot-deficient *L. pneumophila* to grow on BCYE agar plates in the presence of amoeba. Here, we apply the APT to different *Legionella* species and optimize the test by varying the amoeba concentration, growth temperature, agar plate culture media, and additives such as fungicides. The optimized APT enriches amoeba-resistant environmental bacteria and suppresses other microbial flora. Accordingly, the APT allows the identification in complex environmental water samples of *Legionella* species and further opportunistic pathogenic bacteria such as *Delftia acidovorans*, a rare causative agent of sepsis and pneumonia.

KEYWORDS: *Acanthamoeba*, *Delftia*, drinking water, environmental sampling, free-living amoebae, host–pathogen interactions, *Legionella*, opportunistic human pathogens, pneumonia, surveillance



1. INTRODUCTION

Free-living amoebae interact with and feed on bacteria but also represent a reservoir for some environmental bacteria, which are opportunistic human pathogens.^{1–6} Amoeba-resistant opportunistic pathogens include members of the genera *Legionella*, *Chlamydia*, *Mycobacterium*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, and others.⁶ Among more than 65 different *Legionella* species, *Legionella pneumophila* and *Legionella longbeachae* are the most prevalent causative agents of a severe pneumonia termed Legionnaires' disease.^{7,8} *L. pneumophila* reaches the lung upon inhalation of bacteria-contaminated aerosols and kills alveolar macrophages, thus triggering Legionnaires' disease. The capacity to grow within macrophages underlies *L. pneumophila* virulence, is mechanistically similar to growth in protozoa and requires the bacterial Icm/Dot type IV secretion system (T4SS), which translocates more than 300 different so-called "effector proteins" into host cells.^{9,10} Furthermore, *L. pneumophila* adopts the *Legionella* quorum sensing (Lqs) system to promote interbacterial and interkingdom (bacteria-amoeba) small molecule communication.^{11,12}

Over the past decades, cases of Legionnaires' disease (an atypical pneumonia) have been globally reported in continuously increasing numbers. In the last 20 years, the incidence of Legionnaires' disease has been steadily increasing in the United

States.¹³ The American Centers for Disease Control and Prevention (CDC) reported a rising number of Legionnaires' disease cases since 2000 (2.7 cases per 100,000 persons) (<https://www.cdc.gov/legionella/health-depts/surv-reporting/2018-19-surv-report-508.pdf>). In Asia, comprehensive epidemiological studies report the same trend.^{14,15} Similarly, Legionnaires' disease cases have almost doubled between 2015 and 2019 in Europe according to the European Legionnaires' Disease Surveillance Network (ELDSNet).¹⁶ 1.4 cases per 100,000 persons were reported in 2015, and this number has increased to 2.2 in 2019. Thus far, the European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) documented the highest number of Legionnaires' disease cases in their latest report for the year 2021 (2.4 cases per 100,000 persons) (<https://www.ecdc.europa.eu/sites/default/files/documents/legionnaires-disease-annual-epidemiological-report-2021.pdf>).

Received: September 24, 2024

Revised: November 26, 2024

Accepted: November 27, 2024

While significant concentrations of *L. pneumophila* are detected in rainwater and soil,¹⁷ anthropogenic water systems like cooling towers, showers, humidifiers, fountains, air conditioning systems, or pools are more relevant for infection of humans.¹⁸ Moreover, drinking water is increasingly discussed as a source of infections, especially in the context of climate change.^{19,20} However, despite these known or suspected transmission routes, the majority of the community-acquired, sporadic cases of Legionnaires' disease (cases not linked to major outbreaks), cannot be tracked back to any specific source.^{21,22}

Given that technical water systems play a major role as the source of infection, there is a high demand for *Legionella* surveillance and for more sensitive assays to identify and—importantly—cultivate *Legionella* species from these sources.²³ Culture enrichment is indispensable for genome sequencing and source identification of *L. pneumophila*.²⁴ The culture method employed as the “gold standard” for *L. pneumophila* enumeration, ISO 11731, does not employ the bacteria's natural host, amoeba. However, amoeba coculture as a *Legionella* detection method is outlined in protocols from the CDC (<https://stacks.cdc.gov/view/cdc/11895>) and has been successfully used to detect and enrich amoeba-resistant environmental bacteria, including a number of human pathogens.^{25–27} Accordingly, the use of amoebae also increases the detection sensitivity toward amoeba-resistant *Legionella* spp.^{28,29}

Many different widespread bacterial pathogens have been shown to infect and replicate in amoeba.⁶ However, less frequently identified opportunistic pathogens such as *Delftia acidovorans* are also believed to be amoeba-resistant.^{30,31} *D. acidovorans* is a Gram-negative, rod-shaped, motile and aerobic bacterium, which thrives in drinking water and promotes biofilm formation,³² and which is implicated in biomineralization and bioremediation.^{33–35} Mainly in immuno-compromised and comorbid patients, *D. acidovorans* may cause opportunistic infections,^{36,37} such as sepsis,^{38–42} catheter-associated bacteremia during hemodialysis,^{42–44} endocarditis,⁴⁵ keratitis,^{46,47} or atypical (interstitial) pneumonia.^{48,49} Accordingly, *D. acidovorans* should be considered a potential human pathogen when water or soil contamination is suspected.

The amoebae plate test (APT) was established as a proxy for virulence of *L. pneumophila* and possibly other environmental bacteria.⁵⁰ The APT exploits the capacity of wild-type rather than *Icm/Dot*-deficient *L. pneumophila* to grow on BCYE agar plates in the presence of amoebae. *L. pneumophila* wild-type and partially growth defective *icm/dot* mutant strains were spotted on agar plates in the presence of *Acanthamoeba castellanii*, and a plasmid library was screened for revertants of the growth defect.⁵⁰ This approach revealed that a putative paralog of the lipid A disaccharide synthase *LpxB* increased the cytotoxicity of an *icmG* mutant strain against *A. castellanii*. The APT has also been used to recover *Legionella* strains from clinical samples.⁵¹ Here, we report the optimization of the APT by varying the amoeba concentration, growth temperature, agar plate culture media, and additives such as fungicides, which suppress background flora and allow the identification of *Legionella* species and other opportunistic bacterial pathogens in complex environmental water samples.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Culture of Bacterial Strains and Amoebae. The following bacterial strains were used in this study: *L. pneumophila* JR32,⁵² *L. pneumophila* $\Delta icmT$,⁵³ *L. bozemanii*,⁵⁴ *L. longbeachae* NSW150,⁵⁵ *L. micdadei*,⁵⁶ and *L. anisa* (Swiss National Reference Centre for *Legionella*, EOC, Bellinzona).

The *Legionella* strains were grown on *N*-(2-acetamido)-2-aminoethanesulfonic acid (ACES)-buffered charcoal-yeast extract supplemented with α -ketoglutarate (BCYE) agar plates^{57,58} or in ACES-buffered-yeast extract broth (AYE).⁵⁹ In addition to BCYE, the following media were used for agar plates:²⁴ GVP (BCYE with glycine (3 g/L), vancomycin (1 mg/L), polymyxin B (80,000 International Units/L, IU/L)); GVPC (BCYE with glycine (3 g/L), vancomycin (1 mg/L), polymyxin B (80,000 IU/L), cycloheximide (80 mg/L));^{60,61} GVPN (BCYE with glycine (3 g/L), vancomycin (1 mg/L), polymyxin B (80,000 IU/L), natamycin (40 mg/L));⁶² BMPA (BCYE with cefamandole (4 mg/L), polymyxin B (80,000 IU/L), anisomycin (80 mg/L));⁵⁸ and MWY (modified Wadowsky Yee; BCYE with glycine (3 g/L), vancomycin (1 mg/L), polymyxin B (50,000 IU/L), anisomycin (80 mg/L), bromothymol blue (10 mg/L), bromocresol purple (10 mg/L)).^{63,64} GVPC agar plates were made by adding *Legionella* selective supplement (Oxoid, SR0152) to BCYE agar. BMPA and MWY agar plates were purchased from ThermoFisher (PO5035A and PO5071A, respectively). The following antibiotics and fungicides were used and prepared as stock solutions: polymyxin B (Supelco, PHR1595), vancomycin (Sigma-Aldrich, SR00001), natamycin (Supelco, PHR1703), amphotericin B (Gibco, 15290026), fluconazole (Supelco, PHR1160), voriconazole (Supelco, PHR1892), and thiabendazole (Supelco, PHR1259).^{65,66}

A. castellanii (ATCC 30234) amoebae were grown in proteose-yeast extract-glucose medium (PYG, ATCC 712) at 30 °C.^{67,68} The amoebae were subcultured two to three times a week by tapping or scraping them off the tissue culture flask surface.

2.2. Amoebae Plate Test. The amoebae plate test (APT) was performed as described.⁵⁰ To this end, *A. castellanii* cultures in T75 flasks were fed with PYG medium 2 days before an experiment. On the day of the experiment, the medium was removed, and the amoebae were tapped or scraped off the tissue culture flask into 7 mL Page's amoeba saline (PAS, ATCC 1323). The amoebae were counted in a Neubauer chamber and subsequently diluted in PAS to the desired concentration ($0.125\text{--}6.0 \times 10^6$ per mL). One mL of the resuspended amoebae or 1 mL PAS was spread onto a prewarmed BCYE agar plate and let dry for 1–2 h in a laminar flow hood. For the APT, the bacterial strains (*Legionella* spp., *D. acidovorans*) were grown on BCYE plates for 3 d, swabbed, and resuspended in 1 mL PAS. The suspensions were adjusted to an identical OD₆₀₀ of 1.0, and for each strain, a series of 10-fold dilutions in sterile H₂O was prepared. Three μ L of each dilution were spotted onto the agar plates and incubated at 30 °C for 5 days or at 37 °C for 3 days. Environmental water samples (preparation see below) were spread onto prewarmed BCYE agar plates concomitantly with $2\text{--}6 \times 10^6$ *A. castellanii* per plate in a total volume of 1.5 mL PAS. The suspension was let dry in a laminar flow hood for 1–2 h and was incubated at 30 °C for 5–10 d.

2.3. Sample Collection from Environmental Sources. Water samples were collected in 1-L high-density polyethylene

(HDPE) bottles with 20 mg/L sodium thiosulfate (VWR). Water samples from residential house installations (1 L) were collected after 30 s flow of mixed hot and cold water at around 40 °C. Water samples (1 L) from public institution showers or from outdoor fire hydrants were collected after 5 L of flowthrough. To prepare for filtering the water samples, a stainless-steel filtration apparatus was sterilized with ethanol, and 0.45 μ m polycarbonate track etch (PCTE) membrane disc filters (Sebio) were placed onto the filtration apparatus using sterile tweezers. The water samples were then concentrated by applying a vacuum. Subsequently, the filter was removed and placed into a Petri dish, 10 mL of PAS were added, and the material was scraped off the filter with a cell scraper. Finally, the suspension was collected in a falcon tube and vortexed. For each water hydrant, 3 $\times$ 1 L samples were filtered through separate filters.

For the APT, 6 $\times$ 1 mL of the concentrated water samples (triplicate of 1 mL each for analysis with and without amoebae) were pelleted in Eppendorf tubes (4500 $\times$ g, 5 min) and resuspended in 1.5 mL of PAS or PYG containing *A. castellanii* or not. Usually 2 $\times$ 10⁶ (or up to 6 $\times$ 10⁶) *A. castellanii* amoebae per plate were used. The entire 1.5 mL were then spread on a prewarmed BCYE agar plate, let dry for 1–2 h in a laminar flow hood and incubated at 30 °C for 5 d (or up to 10 d). Occasionally, 100 μ L of nonconcentrated water sample was directly mixed with 1.5 mL PAS or PYG containing *A. castellanii* or not, spread on a prewarmed BCYE agar plate, let dry for 1–2 h in a laminar flow hood and incubated at 30 °C for 5–10 d.

To apply the ISO 11731 procedure, a concentrated suspension was prepared like for the APT, and 3 samples were plated onto 3 GVPC plates: 1) 0.5 mL concentrate was directly plated, 2) 1 mL concentrate was mixed with 9 mL 0.2 M HCl, vortexed, incubated (5 min; room temperature, RT), and 0.5 mL was plated, and 3) 1.5 mL concentrate were incubated in a 2 mL Eppendorf tube (50 °C, 30 min, 200 rpm shaking), and 0.5 mL was plated.

2.4. Determination of *L. pneumophila* Serogroup. *L. pneumophila* strains were tested by slide agglutination (Latex test; Biomérieux) to determine the serogroup (serogroup 1 or serogroup 2–15), and further subgrouped by immunofluorescent antibody typing, using the monoclonal antibodies from the Dresden panel.⁶⁹

2.5. MALDI-TOF Mass Spectrometry Biotyping. For matrix assisted laser desorption ionization-time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS), single colonies were picked and applied to a spot of an MSP 96 polished steel BC target plate (Bruker). Next, 1 μ L of 70% formic acid (Sigma-Aldrich) was added on top and let dry for 10 min at RT. Immediately after drying, 1 μ L of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (HCCA, Bruker) matrix solution was applied to each spot and let dry for 10 min at RT. Each spot was measured by MALDI-TOF MS microflex LT (Bruker) and flexControl with a standard MALDI Biotyper method (MBT_autoX, standard preprocessing and standard MSP identification method with BDAL, fungi and clinical SR library). Ion source 1 was set to 20 kV, ion source 2 was set to 18.25 kV, lens was set to 6 kV, and detection was set from 2 to 20 kDa.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Optimization of the APT by Varying *A. castellanii* Concentration. The APT has originally been established to

assess amoeba-resistant *L. pneumophila* wild-type and avirulent mutant strains.⁵⁰ To further explore and optimize the APT, we spotted on BCYE agar plates in 10-fold dilutions *L. pneumophila* wild-type JR32 or Δ icmT lacking a functional Icm/Dot T4SS, and other *Legionella* species, such as *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, and *L. micdadei* (Figure 1). In the

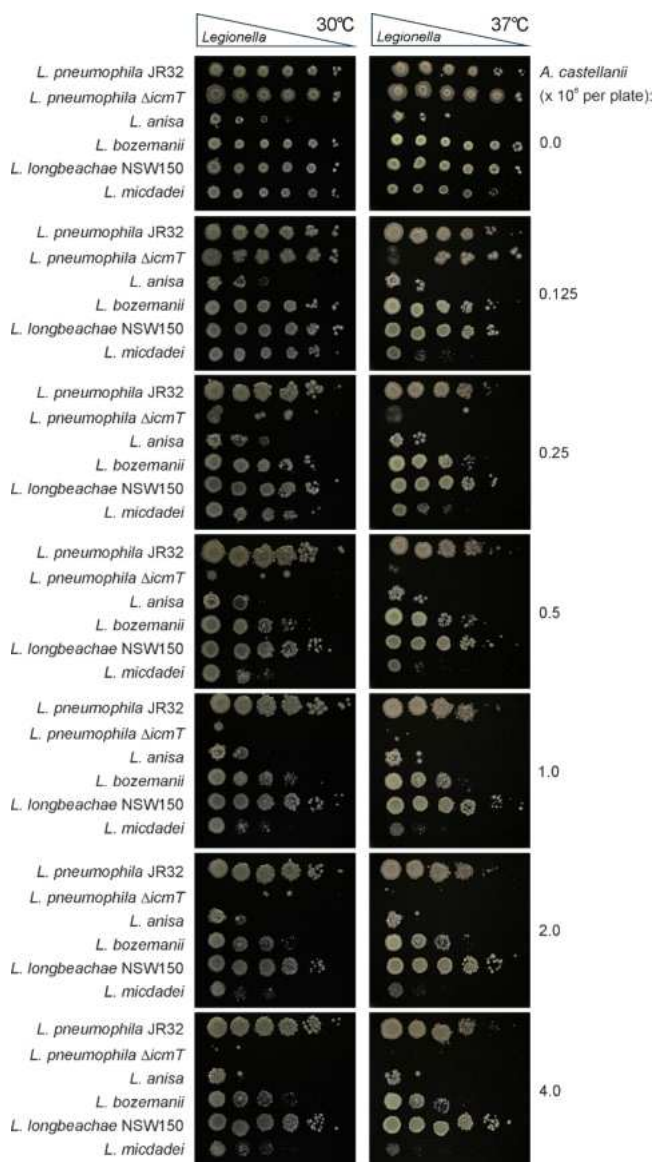


Figure 1. Growth of *Legionella* species on BCYE plates in the presence of increasing amoeba concentrations. The *Legionella* species indicated were spotted in 10-fold serial dilutions on BCYE (buffered charcoal yeast extract) agar plates in the presence of increasing concentrations of *A. castellanii* and incubated at 30 °C for 5 days or at 37 °C for 3 days. The data shown is representative of three independent biological replicates.

absence of *A. castellanii*, all strains grew well on the agar plates at 30 or 37 °C, except *L. anisa*, which grew only at the 3 highest concentrations, reflecting the growth of these strains in AYE broth (Figure S1). The number of *A. castellanii* amoebae spread on the agar plates ranged from 0.125–4 $\times$ 10⁶. In presence of up to 4 $\times$ 10⁶ amoebae, *L. pneumophila*, *L. bozemanii*, and *L. longbeachae* grew robustly, and therefore, are highly amoeba-resistant. *L. micdadei* and *L. anisa* were only

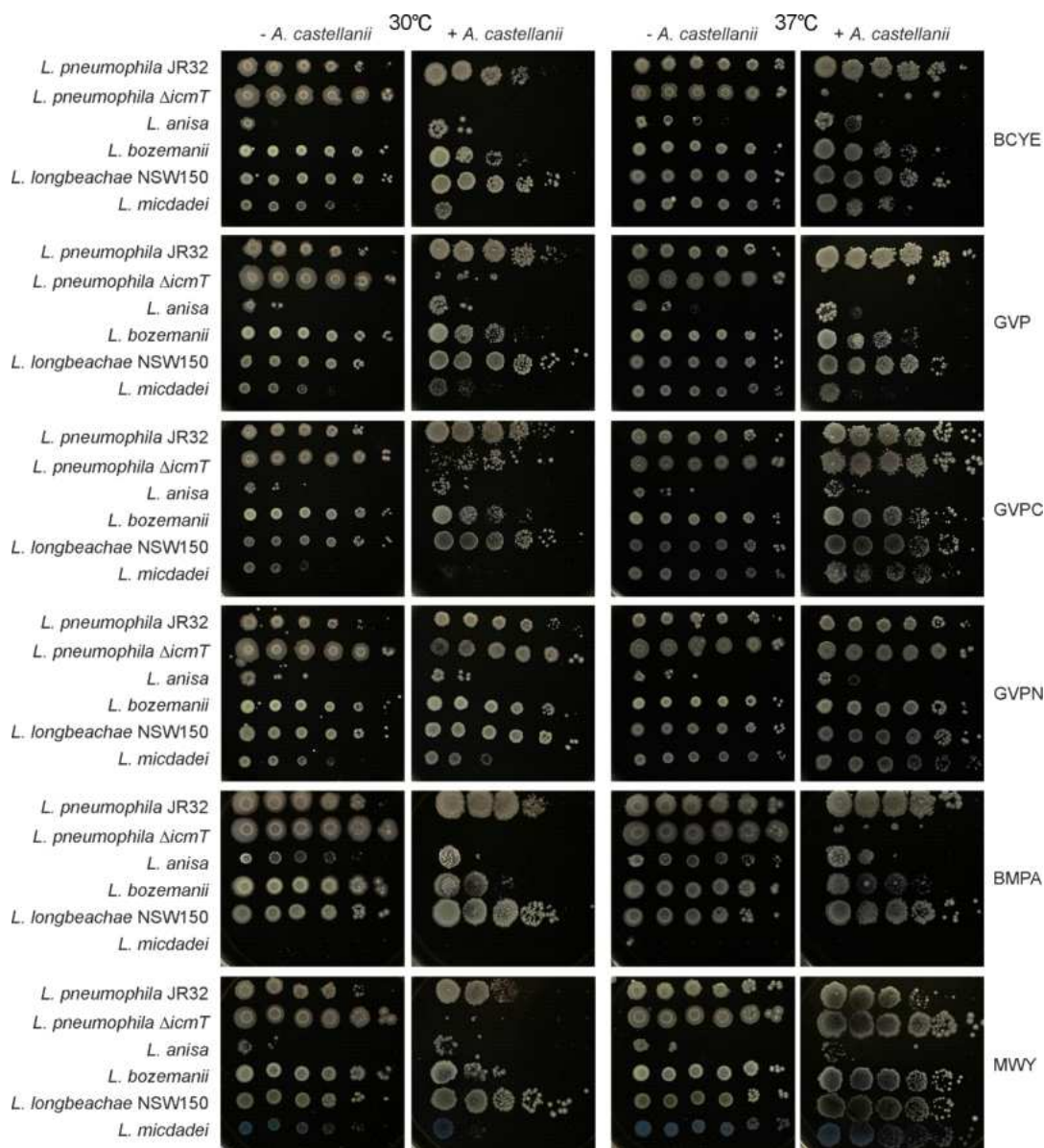


Figure 2. Growth of *Legionella* species on different agar plates in the presence of amoeba. The *Legionella* species were spotted in 10-fold serial dilutions on the agar plates indicated in the presence of 2×10^6 *A. castellanii* and incubated at 30 °C for 5 days or at 37 °C for 3 days. BCYE, buffered charcoal yeast extract; GVP, BCYE with glycine/vancomycin/polymyxin B; GVPC, BCYE with glycine/vancomycin/polymyxin B/cycloheximide; GVPN, BCYE with glycine/vancomycin/polymyxin B/natamycin; BMPA, BCYE with cefamandole/polymyxin B/anisomycin; MWY, BCYE with glycine/vancomycin/polymyxin B/anisomycin. The data shown is representative of three independent biological replicates.

partly amoeba-resistant, in particular at $\geq 0.5 \times 10^6$ amoebae per plate and upon incubation at 37 °C (Figure 1). *L. pneumophila* $\Delta icmT$ bacteria were efficiently cleared by $\geq 0.5 \times 10^6$ *A. castellanii* per plate. Taken together, *L. pneumophila*, *L. bozemanii*, and *L. longbeachae* grow robustly on BCYE agar plates in the presence of up to 4×10^6 *A. castellanii* per plate, and $\geq 0.5 \times 10^6$ amoebae efficiently clear avirulent *L. pneumophila* $\Delta icmT$.

3.2. Effect of Agar Plate Culture Media on APT. Next, we sought to test the effect of different agar plate culture media on the APT. To this end, we used different selective media established to cultivate *L. pneumophila*: GVP (BCYE with glycine/vancomycin/polymyxin B), GVPC (BCYE with glycine/vancomycin/polymyxin B/cycloheximide), GVPN (BCYE with glycine/vancomycin/polymyxin B/natamycin), BMPA (BCYE with cefamandole/polymyxin B/anisomycin),

or MWY (modified Wadowsky Yee; BCYE with glycine/vancomycin/polymyxin B/anisomycin). The same *Legionella* strains used above were tested (*L. pneumophila* JR32, *L. pneumophila* $\Delta icmT$, *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, and *L. micdadei*) and found to grow at 30 or 37 °C on these agar plates (Figure 2). However, *L. micdadei* did not grow on BMPA, indicating that cefamandole is toxic for this species.

Growth of the *Legionella* strains in the presence or absence of 2×10^6 *A. castellanii* per plate revealed that on BCYE, GVP, BMPA, and MWY agar plates *L. pneumophila* $\Delta icmT$ was efficiently cleared by the amoebae (Figure 2), indicating that bacterial killing by the amoebae was effective under these conditions. While MWY was compatible with the APT, the antibiotic anisomycin is expensive, precluding its use in routine diagnostic tests. In contrast, *A. castellanii* did not clear *L. pneumophila* $\Delta icmT$ mutants on GVPC and GVPN agar plates,

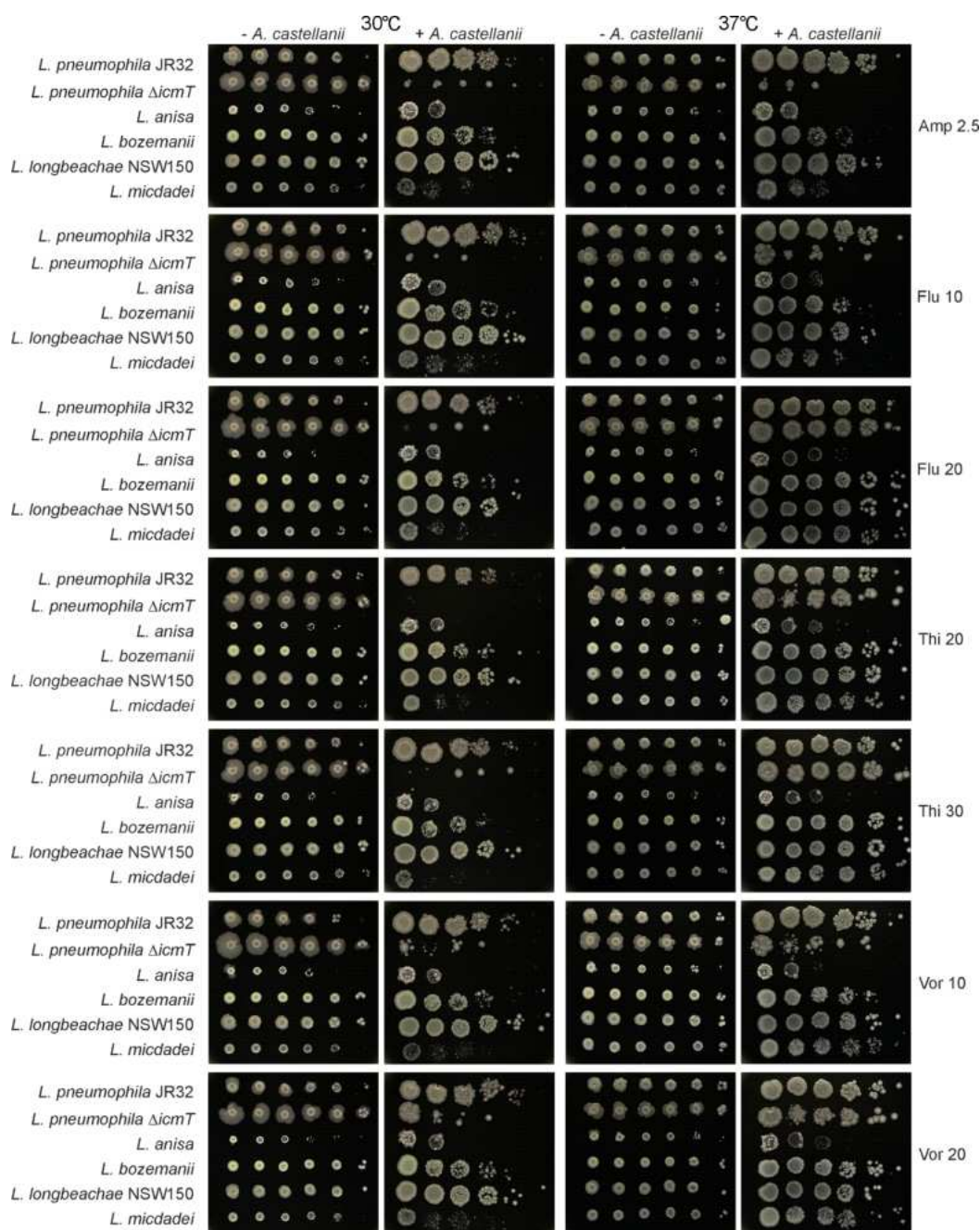


Figure 3. Growth of *Legionella* species on BCYE agar plates in the presence of fungicides and amoeba. The *Legionella* species were spotted in 10-fold serial dilutions on BCYE agar plates with the fungicides indicated in the presence of 2×10^6 *A. castellanii* and incubated at 30 °C for 5 days or at 37 °C for 3 days. Amp, amphotericin B (2.5 $\mu\text{g/mL}$); Flu, fluconazole (10 or 20 $\mu\text{g/mL}$); Vor, voriconazole (20 or 30 $\mu\text{g/mL}$); Thi, thiabendazole (10 or 20 $\mu\text{g/mL}$). The data shown is representative of three independent biological replicates.

indicating that the antifungal compounds cycloheximide and natamycin either kill the amoebae or impair the phagocytosis and/or the degradation of avirulent *L. pneumophila* by the amoebae. Fungicides are known to affect the physiology of amoebae, e.g., cycloheximide impairs protozoan ingestion,^{70,71} and tridemorph and fenpropimorph alter sterol biosynthesis of *Acanthamoeba polyphaga*.⁷² In summary, among the media tested, only the BCYE and GVP media allowed the growth of all *Legionella* species used and were compatible with the APT, that is, they did not interfere with clearance of avirulent *L. pneumophila* by *A. castellanii*.

3.3. Effect of Fungicides on *Legionella* spp. and *A. castellanii*. Given that cycloheximide and natamycin seem to impair the physiology of *A. castellanii*, we evaluated alternative antifungal compounds for their compatibility with the APT. To this end, we added amphotericin B, fluconazole, voriconazole, and thiabendazole at different concentrations to BCYE medium and performed the APT with 2×10^6 *A. castellanii* at 30 or 37 °C with the same *Legionella* strains (*L. pneumophila* JR32, *L. pneumophila* ΔicmT , *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, and *L. micdadei*). In BCYE medium, thiabendazole (20 $\mu\text{g/mL}$) was compatible with the APT at 30 °C, since *L. pneumophila* ΔicmT was efficiently cleared by *A. castellanii*

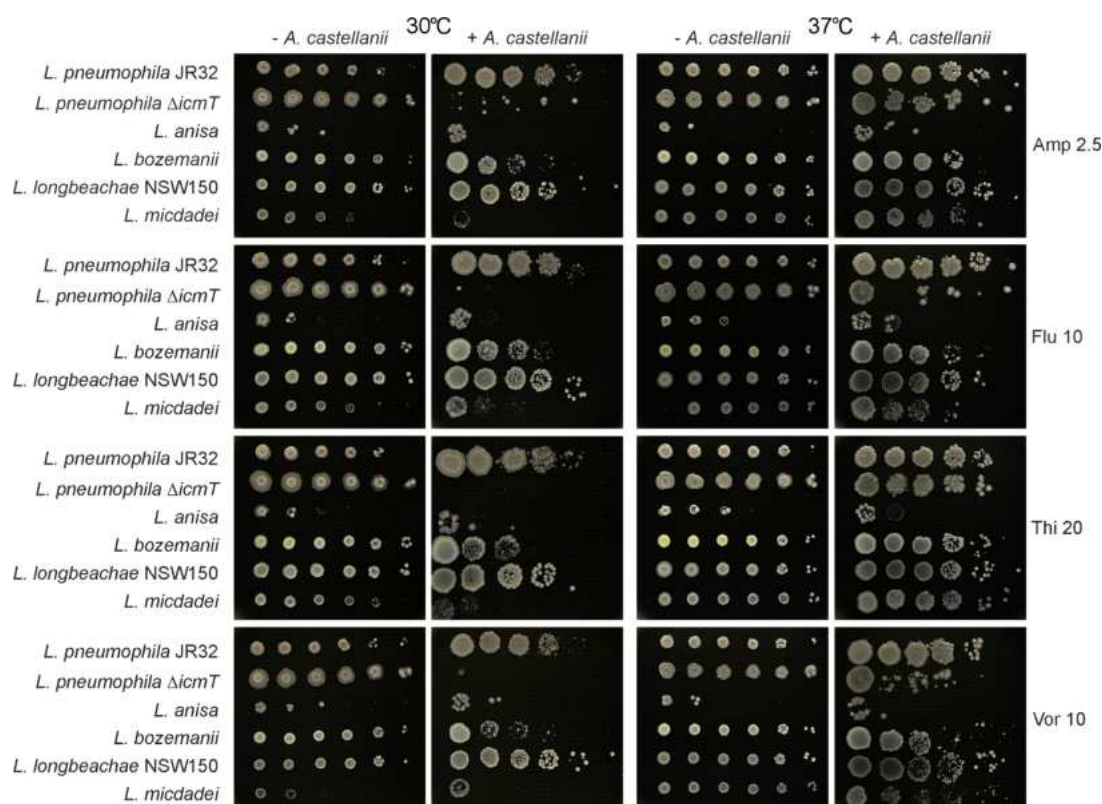


Figure 4. Growth of *Legionella* species on GVP agar plates in presences of fungicides and amoeba. The *Legionella* species were spotted in 10-fold serial dilutions on GVP agar plates with the fungicides indicated in the presence of 2×10^6 *A. castellanii* and incubated at 30 °C for 5 days or at 37 °C for 3 days. Amp; amphotericin B (2.5 $\mu\text{g/mL}$); Flu, fluconazole (10 $\mu\text{g/mL}$); Vor, voriconazole (20 $\mu\text{g/mL}$); Thi, thiabendazole (10 $\mu\text{g/mL}$). The data shown is representative of three independent biological replicates.

(Figure 3). Amphotericin B, fluconazole, and voriconazole, on the other hand, appeared to interfere with the APT, as *L. pneumophila* ΔicmT was less efficiently cleared by the amoebae. Thiabendazole, fluconazole, and voriconazole were incompatible with the APT at 37 °C, since *L. pneumophila* ΔicmT grew like the virulent parental strain in the presence of *A. castellanii* (Figure 3). Moreover, in the presence of amphotericin B, the ΔicmT mutant strain was not completely eradicated, indicating that this antifungal compound also impairs *A. castellanii*. In the presence of the fungicides, *L. micdadei* did not survive the amoebae at 30 °C (Figure 3), like what was observed for the other media and conditions used (Figure 1, 2). In summary, among the antifungal compounds tested, only thiabendazole at a concentration of 20 $\mu\text{g/mL}$ is compatible with the APT in BCYE medium and only upon growth of the *Legionella* strains at 30 °C.

Analogously, we added amphotericin B, fluconazole, voriconazole, and thiabendazole to GVP medium and performed the APT with 2×10^6 *A. castellanii* at 30 or 37 °C with the same *Legionella* strains (*L. pneumophila* JR32, *L. pneumophila* ΔicmT , *L. anisa*, *L. bozemanii*, *L. longbeachae*, and *L. micdadei*). In GVP medium, fluconazole (10 $\mu\text{g/mL}$), thiabendazole (20 $\mu\text{g/mL}$), and voriconazole (10 $\mu\text{g/mL}$) were compatible with the APT at 30 °C, since *L. pneumophila* ΔicmT was efficiently cleared by *A. castellanii* (Figure 4). Amphotericin B (2.5 $\mu\text{g/mL}$), on the other hand, appeared to interfere with the APT, as *L. pneumophila* ΔicmT was less efficiently cleared by the amoebae. Amphotericin B, fluconazole, thiabendazole, and voriconazole were incompatible with the APT at 37 °C, since *L. pneumophila* ΔicmT grew

similarly to the virulent parental strain in the presence of *A. castellanii* (Figure 4). In the presence of the fungicides, *L. micdadei* did not survive the amoebae at 30 °C (Figure 4), like what was observed for the other media and conditions used (Figures 1–3). In summary, among the antifungal compounds tested, fluconazole (10 $\mu\text{g/mL}$), thiabendazole (20 $\mu\text{g/mL}$), and voriconazole (10 $\mu\text{g/mL}$) are compatible with the APT in GVP medium at 30 °C. While *A. castellanii* does not seem to be affected by these fungicides at the concentrations used, other protozoa might show different sensitivities toward fungicides. In summary, the effects of the antifungals on *A. castellanii* appear to be less pronounced in the GVP medium than in the BCYE medium, and GVP with supplemental fungicides seems to constitute a well-suited medium for the APT.

3.4. Application of the APT to Environmental Water Samples.

Next, we sought to assess the different media and antifungal compounds in APTs with technical and environmental water samples. To this end, shower water samples from public institutions in central Switzerland were analyzed. After 5 L of flowthrough, 1 L water samples were collected from the shower installations in 1-L HDPE bottles with 20 mg/L sodium thiosulfate. The water samples were then concentrated in the lab through a PCTE 0.45 μm membrane filter, and the material was scraped off the filter in 10 mL of PAS.

One mL each of concentrated shower sample was spread on different BCYE plates (GVP, GVPC, GVP/amphotericin B, GVP/fluconazole, GVP/thiabendazole, GVP/voriconazole) in the absence or presence of 2×10^6 *A. castellanii* and incubated at 30 or 37 °C (Figure 5). In the absence of amoebae, the

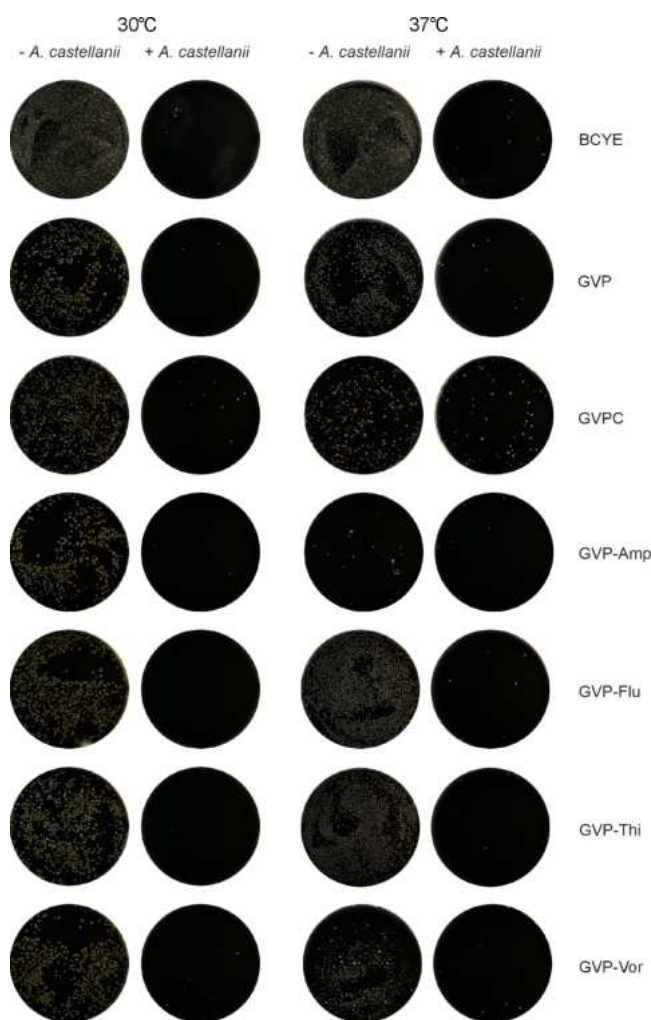


Figure 5. Shower water samples analyzed on BCYE-based agar plates in the presence of fungicides and amoeba. The shower water samples were spread on different BCYE-based plates: GVP (BCYE with glycine/vancomycin/polymyxin B), GVPC (BCYE with glycine/vancomycin/polymyxin B/cycloheximide), GVP-Amp (2.5 $\mu\text{g/mL}$), GVP-Flu (10 $\mu\text{g/mL}$), GVP-Thi (20 $\mu\text{g/mL}$), GVP-Vor (10 $\mu\text{g/mL}$) in absence or presence of 2×10^6 *A. castellanii* and incubated at 30 °C for 5 days or at 37 °C for 3 days. The data shown is representative of three independent biological replicates.

environmental samples produced a lawn of microbes at 30 or 37 °C. In contrast, the presence of the amoebae resulted in almost clear plates upon growth at 30 °C as well as at 37 °C, particularly those containing the antifungal compounds amphotericin B (2.5 $\mu\text{g/mL}$), fluconazole (10 $\mu\text{g/mL}$), thiabendazole (20 $\mu\text{g/mL}$), or voriconazole (10 $\mu\text{g/mL}$). Agar plates treated with cycloheximide allowed the growth of a number of different colonies, in agreement with the finding that this antifungal compound impaired the physiology of the amoebae, and hence, the APT (Figure 2). As a comparison, the shower water samples were treated with heat (50 °C, 30 min) or acid (0.2 M HCl, pH 2.2), which also substantially reduced the microbial growth on BCYE agar plates (data not shown). Taken together, *A. castellanii* used in the APT significantly reduced the growth of microbes present in shower water samples on BCYE and GVP plates in the absence or presence of antifungal compounds.

3.5. Isolation of *L. pneumophila* by the APT from House Installations and Showers. Further residential house installation and public shower water samples were filtered, and the concentrates from PCTE membranes were used in APTs to possibly identify *L. pneumophila*. As described above (Figure 5), in the absence of *A. castellanii*, house installation and shower water samples yielded a complex mixture of brownish colonies (e.g., Figure 6 - sample 1), while

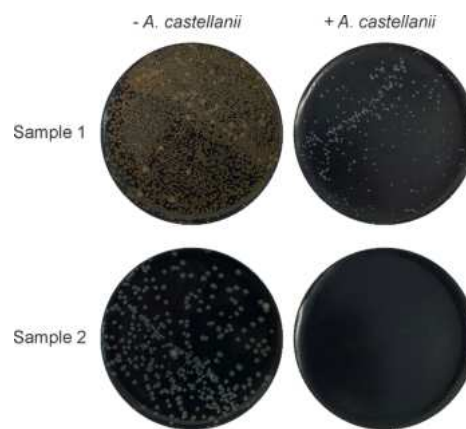


Figure 6. House installation and shower water samples analyzed by the amoeba plate test. Concentrated water samples (1 mL) from a public house installation (sample 1) or shower (sample 2) were spread on BCYE plates in absence or presence of 4×10^6 *A. castellanii* and incubated at 30 °C for 5 days. The data shown is representative of three technical replicates.

other samples yielded greyish-white colonies of different diameters and morphology (e.g., Figure 6 - sample 2). Upon coincubation of a house installation water sample (sample 1) with 4×10^6 *A. castellanii*, the complexity of the bacterial colonies was drastically reduced, and only greyish-blue-white colonies remained. These colonies were identified by MALDI-TOF MS as *L. pneumophila*, and their quantification by colony forming units yielded a very high concentration of ca. 2×10^6 bacteria per liter. Upon coincubation of a shower water sample (sample 2) with 4×10^6 *A. castellanii*, the agar plate remained clear, and not a single colony appeared. In parallel, the samples were assessed by the ISO 11731 procedure for the presence of *L. pneumophila*. This standard approach yielded ca. 2×10^6 *L. pneumophila* per liter (sample 1) or none (sample 2). In summary, using the APT to detect *L. pneumophila* in technical water samples allowed us to specifically enrich and identify *L. pneumophila*, and thus, in pure potable water samples, the APT can be used to detect and possibly also quantify *L. pneumophila*. Furthermore, the APT yielded results similar to the ISO 11731 procedure regarding the sensitivity and quantification of *L. pneumophila*.

3.6. Isolation of *L. pneumophila* by the APT from Water Hydrant Samples. Given that *L. pneumophila* can be identified with the APT in pure potable water samples (household installations, showers), we sought to employ the APT to analyze complex and impure environmental samples such as stagnant water from outdoor fire hydrants in southern Switzerland. After 5 L of flowthrough, 1 L water samples were collected from the hydrants in 1-L HDPE bottles with 20 mg/L sodium thiosulfate. The hydrant water samples were then concentrated in the lab through a PCTE 0.45 μm membrane filter, and the material was scraped off the filter in 10 mL of

PAS. One mL sample was then used in the APT (Figure 7). In the absence of *A. castellanii*, hydrant water samples yielded a

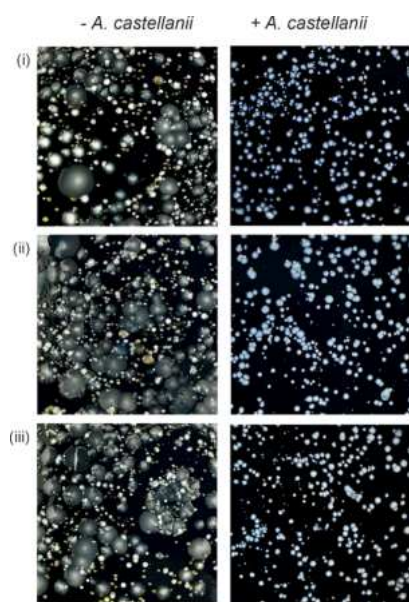


Figure 7. Water hydrant sample analyzed by the amoeba plate test. The concentrated hydrant water sample (1 mL) was spread on BCYE plates in absence or presence of 5.8×10^6 *A. castellanii* and incubated at 30 °C for 10 days. The data shown represents three technical replicates [(i) - (iii)].

complex mixture of mostly brownish and greyish-white colonies, some of which seemed to swarm on the agar plates. Upon coinoculation of the hydrant water samples with *A. castellanii*, the complexity of the bacterial colonies was drastically reduced, and greyish-blue-white colonies remained. Some of these seemingly identical colonies were identified by MALDI-TOF MS as *L. pneumophila*, and further characterized by the agglutination test as *L. pneumophila* serogroup 3. The ISO 11731 procedure performed in parallel with the hydrant water sample failed to detect *L. pneumophila*. Taken together, the APT can be employed to successfully detect *L. pneumophila* in complex, impure environmental water samples such as water hydrants.

3.7. Isolation of *Delftia acidovorans* and Possibly Other Opportunistic Pathogens by the APT from Water Hydrant Samples. To further characterize bacteria in water hydrant samples, which are enriched in the APT and show a “*Legionella*-like” appearance, we routinely picked colonies of a greyish-blue-white color and a defined, not fuzzy or swarming colony morphology. This approach led to the repeated identification by MALDI-TOF MS of *Delftia acidovorans*, a Gram-negative, rod-shaped, motile and aerobic bacterium. *D. acidovorans* has been identified as an infrequent but significant opportunistic pathogen.^{36,37,40,48}

To validate the amoeba-resistance of *D. acidovorans*, we performed APTs with a 10-fold dilution series of *D. acidovorans* and compared its growth on BCYE agar plates to *L. pneumophila* strain JR32 and $\Delta icmT$ mutant bacteria in absence and presence of *A. castellanii* (Figure 8). This approach revealed that *D. acidovorans* robustly grows at 30 °C on BCYE agar plates and is indeed amoeba-resistant under these conditions. In absence of the amoebae, *D. acidovorans* grew faster than *L. pneumophila* at 30 °C, but in the presence

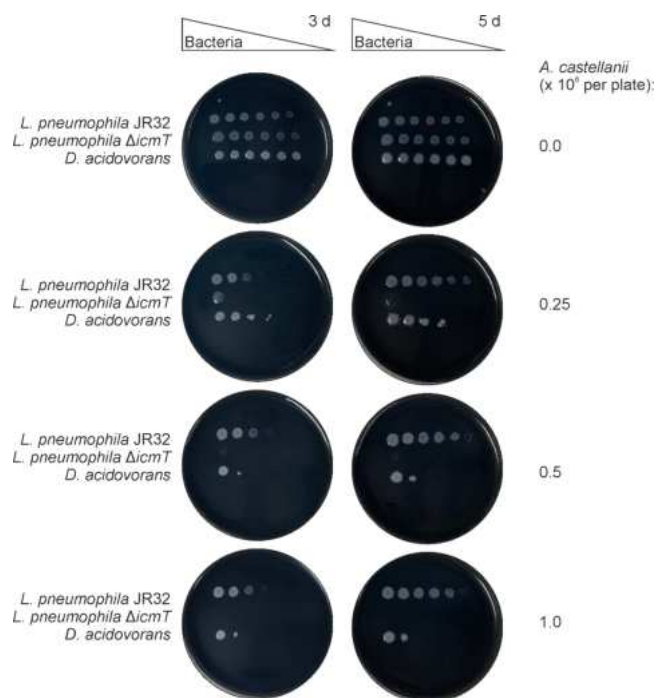


Figure 8. Growth of *Delftia acidovorans* on BCYE agar plates in the presence of amoeba. Virulent *L. pneumophila* strain JR32, avirulent *L. pneumophila* $\Delta icmT$ lacking a functional Icm/Dot T4SS, or an environmental isolate of *Delftia acidovorans* were spotted in 10-fold serial dilutions on BCYE agar plates in the absence or presence of the indicated concentrations of *A. castellanii* and incubated at 30 °C for 3 and 5 days. The data shown is representative of 3 independent biological replicates.

of the amoebae, *D. acidovorans* grew less robustly. While at a concentration of $>0.25 \times 10^6$ *A. castellanii* per plate, *D. acidovorans* grew similarly as *L. pneumophila* JR32, at concentrations of $>0.5 \times 10^6$ *A. castellanii* per plate, *D. acidovorans* resisted *A. castellanii* less efficiently, particularly after 5 d of growth (Figure 8). In summary, the APT has proven useful to isolate amoeba-resistant, opportunistic pathogenic environmental bacteria such as *Legionella* spp. and *D. acidovorans*. The optimization of the APT revealed that BCYE or GVP agar plates and 2×10^6 or more amoebae per plate can be used to enrich *L. pneumophila* at 30 and 37 °C. Moreover, the fungicides fluconazole, thiabendazole, and voriconazole are compatible with the APT on GVP plates upon incubation at 30 °C. Future studies will employ the optimized APT to systematically and routinely assess the presence of amoeba-resistant potentially pathogenic environmental bacteria in complex natural and technical water samples.

4. CONCLUSIONS

The detection, quantification and risk assessment of bacterial pathogens in aquatic environments is a challenge. A number of environmental bacteria is amoeba-resistant, a property which can serve as a proxy for virulence. *Legionella* species and *D. acidovorans* are environmental bacteria and opportunistic human pathogens. The APT allows the detection, quantification and virulence assessment of *Legionella* species and other amoeba-resistant bacteria. Here, we optimized the APT using different *Legionella* species by varying the concentration of *A. castellanii* on agar plates, incubation temperature, agar plate

media composition, and additives such as fungicides. These studies revealed that *L. pneumophila*, *L. bozemanii*, and *L. longbeachae* grow robustly on BCYE agar plates in the presence of up to 4×10^6 *A. castellanii* per agar plate, and $\geq 0.5 \times 10^6$ amoebae efficiently clear avirulent *L. pneumophila* Δ icmT. Using *A. castellanii* as host cells, the APT was compatible with the fungicide thiabendazole (20 μ g/mL) in BCYE medium and with thiabendazole (20 μ g/mL), fluconazole (10 μ g/mL), and voriconazole (10 μ g/mL) in GVP medium upon incubation at 30 °C but not at 37 °C.

The optimized APT was found to enrich amoeba-resistant environmental bacteria and suppresses other microbial flora in complex environmental water samples. Employing the APT to assess the microbiomes of shower and hydrant water samples allowed the detection of the opportunistic pathogens *L. pneumophila* and *D. acidovorans*. The APT is a rather elaborate approach to quantify *L. pneumophila* and might be suitable only for properly equipped laboratories. However, the APT also yields information about the virulence of a given *Legionella* species, and thus, might serve as an amendment to the “gold standard” ISO 11731 procedure. Finally, the APT might even enrich *Legionella* spp. and other amoeba-resistant pathogens from certain microbiomes which under standard conditions are not detectable.

■ ASSOCIATED CONTENT

SI Supporting Information

The Supporting Information is available free of charge at <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsestwater.4c00915>.

Growth of *Legionella* species in AYE broth (Figure S1) (PDF)

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

Hubert Hilbi – Institute of Medical Microbiology, University of Zürich, Zürich 8006, Switzerland; orcid.org/0000-0002-5462-9301; Phone: +41 43 634 2650; Email: hilbi@imm.uzh.ch

Authors

Anaís B. Moreno – Institute of Medical Microbiology, University of Zürich, Zürich 8006, Switzerland
Tong Chen – Institute of Medical Microbiology, University of Zürich, Zürich 8006, Switzerland
Yasemin Gökuguz – Institute of Medical Microbiology, University of Zürich, Zürich 8006, Switzerland; Kantonales Labor Zürich, Zürich 8032, Switzerland
Severin Wälty – Institute of Medical Microbiology, University of Zürich, Zürich 8006, Switzerland; Kantonales Labor Zürich, Zürich 8032, Switzerland
Colin Schmid – Institute of Medical Microbiology, University of Zürich, Zürich 8006, Switzerland; Kantonales Labor Zürich, Zürich 8032, Switzerland
Adrian Egli – Institute of Medical Microbiology, University of Zürich, Zürich 8006, Switzerland
Valeria Gaia – Service of Microbiology, Institute of Laboratory Medicine, National Reference Centre for Legionella, EOC, Bellinzona 6500, Switzerland
Hans Peter Fuchsli – Kantonales Labor Zürich, Zürich 8032, Switzerland

Complete contact information is available at:

<https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acsestwater.4c00915>

Author Contributions

CRediT: **Anaís B. Moreno** formal analysis, investigation, methodology, visualization, writing - review & editing; **Tong Chen** formal analysis, investigation, methodology, visualization, writing - review & editing; **Yasemin Gökuguz** investigation, methodology, visualization; **Severin Wälty** investigation, methodology, visualization; **Colin Schmid** investigation, methodology, visualization; **Adrian Egli** funding acquisition, resources, writing - review & editing; **Valeria Gaia** funding acquisition, investigation, methodology, resources, writing - review & editing; **Hans Peter Fuchsli** funding acquisition, investigation, methodology, supervision, writing - review & editing; **Hubert Hilbi** conceptualization, formal analysis, funding acquisition, project administration, resources, supervision, writing - original draft.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Pia Stauffer for help with the APT. The work was financially supported by the Swiss Federal Office for Food Safety and Veterinary Affairs (BLV), the Swiss Federal Office of Public Health (BAG), the Swiss Federal Office for Energy (BFE), “Immobilien Zürich” (ImmoZH), “Amt für Hochbauten Zürich” (AHB Zürich), “Wasserversorgung Zürich” (WVZH), and “Aziende Industriali Lugano” (AIL).

■ REFERENCES

- (1) Greub, G.; Raoult, D. Microorganisms resistant to free-living amoebae. *Clin. Microbiol. Rev.* **2004**, *17* (2), 413–433.
- (2) Hoffmann, C.; Harrison, C. F.; Hilbi, H. The natural alternative: protozoa as cellular models for *Legionella* infection. *Cell. Microbiol.* **2014**, *16* (1), 15–26.
- (3) Boamah, D. K.; Zhou, G.; Ensminger, A. W.; O'Connor, T. J. From many hosts, one accidental pathogen: the diverse protozoan hosts of *Legionella*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2017**, *7*, 477.
- (4) Swart, A. L.; Harrison, C. F.; Eichinger, L.; Steinert, M.; Hilbi, H. *Acanthamoeba* and *Dictyostelium* as cellular models for *Legionella* infection. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2018**, *8*, 61.
- (5) Hochstrasser, R.; Michaelis, S.; Brülisauer, S.; Sura, T.; Fan, M.; Maass, S.; Becher, D.; Hilbi, H. Migration of *Acanthamoeba* through *Legionella* biofilms is regulated by the bacterial Lqs-LvbR network, effector proteins and the flagellum. *Environ. Microbiol.* **2022**, *24* (8), 3672–3692.
- (6) Price, C. T. D.; Hanford, H. E.; Al-Quadan, T.; Santic, M.; Shin, C. J.; Da'as, M. S. J.; Abu Kwaik, Y. Amoebae as training grounds for microbial pathogens. *mBio* **2024**, *15* (8), No. e0082724.
- (7) Newton, H. J.; Ang, D. K.; van Driel, I. R.; Hartland, E. L. Molecular pathogenesis of infections caused by *Legionella pneumophila*. *Clin. Microbiol. Rev.* **2010**, *23* (2), 274–298.
- (8) Whitley, H.; Bentham, R. *Legionella longbeachae* and legionellosis. *Emerg. Infect. Dis.* **2011**, *17* (4), 579–583.
- (9) Mondino, S.; Schmidt, S.; Rolando, M.; Escoll, P.; Gomez-Valero, L.; Buchrieser, C. Legionnaires' disease: state of the art knowledge of pathogenesis mechanisms of *Legionella*. *Annu. Rev. Pathol.* **2020**, *15*, 439–466.
- (10) Hilbi, H.; Buchrieser, C. Microbe profile: *Legionella pneumophila* - a copycat eukaryote. *Microbiology* **2022**, *168* (3), No. 001142.
- (11) Striednig, B.; Hilbi, H. Bacterial quorum sensing and phenotypic heterogeneity: how the collective shapes the individual. *Trends Microbiol.* **2022**, *30* (4), 379–389.
- (12) Michaelis, S.; Gomez-Valero, L.; Chen, T.; Schmid, C.; Buchrieser, C.; Hilbi, H. Small molecule communication of *Legionella*: the ins and outs of autoinducer and nitric oxide signaling. *Micob. Mol. Biol. Rev.* **2024**, *88* (3), No. e0009723.

- (13) Moffa, M. A.; Rock, C.; Galiatsatos, P.; Gamage, S. D.; Schwab, K. J.; Exum, N. G. Legionellosis on the rise: a scoping review of sporadic, community-acquired incidence in the United States. *Epidemiol. Infect.* **2023**, *151*, No. e133.
- (14) Leung, Y. H.; Lam, C. K.; Cheung, Y. Y.; Chan, C. W.; Chuang, S. K. Epidemiology of Legionnaires' disease, Hong Kong, China, 2005–2015. *Emerg. Infect. Dis.* **2020**, *26* (8), 1695–1702.
- (15) Kutsuna, S.; Ohbe, H.; Kanda, N.; Matsui, H.; Yasunaga, H. Epidemiological analysis of *Legionella* pneumonia in Japan: a national inpatient database study. *J. Epidemiol.* **2024**, *34* (8), 365–371.
- (16) Samuelsson, J.; Payne Hallström, L.; Marrone, G.; Gomes Dias, J. Legionnaires' disease in the EU/EEA*: increasing trend from 2017 to 2019. *Euro Surveill.* **2023**, *28* (11), No. 2200114.
- (17) van Heijnsbergen, E.; Schalk, J. A.; Euser, S. M.; Brandsema, P. S.; den Boer, J. W.; de Roda Husman, A. M. Confirmed and potential sources of *Legionella* reviewed. *Environ. Sci. Technol.* **2015**, *49* (8), 4797–4815.
- (18) Atlas, R. M. *Legionella*: from environmental habitats to disease pathology, detection and control. *Environ. Microbiol.* **1999**, *1* (4), 283–293.
- (19) Sharaby, Y.; Rodríguez-Martínez, S.; Pecellin, M.; Sela, R.; Peretz, A.; Höfle, M. G.; Halpern, M.; Brettar, I.; Dozois, C. M. Temperature-dependent growth modeling of environmental and clinical *Legionella pneumophila* multilocus variable-number tandem-repeat analysis (MLVA) genotypes. *Appl. Environ. Microbiol.* **2018**, *84* (10), e00429–18.
- (20) Dupke, S.; Buchholz, U.; Fastner, J.; Forster, C.; Frank, C.; Lewin, A.; Rickerts, V.; Selinka, H. C. Impact of climate change on waterborne infections and intoxications. *J. Health Monit.* **2023**, *8* (Suppl 3), 62–77.
- (21) Buchholz, U.; Jahn, H. J.; Brodhun, B.; Lehfeld, A. S.; Lewandowsky, M. M.; Reber, F.; Adler, K.; Bochmann, J.; Forster, C.; Koch, M.; Schreiner, Y.; Stemmler, F.; Gagell, C.; Harbich, E.; Barwolff, S.; Beyer, A.; Geuss-Fosu, U.; Hanel, M.; Larscheid, P.; Murajda, L.; Morawski, K.; Peters, U.; Pitzing, R.; von Welczeck, A.; Widders, G.; Wischniewski, N.; Abdelgawad, I.; Hinzmann, A.; Hedeler, D.; Schilling, B.; Schmidt, S.; Schumacher, J.; Zuschneid, I.; Atmowihardjo, I.; Arasteh, K.; Behrens, S.; Creutz, P.; Elias, J.; Gregor, M.; Kahl, S.; Kahrner, H.; Kimmel, V.; Lehmkne, J.; Migaud, P.; Mikolajewska, A.; Moos, V.; Naumann, M. B.; Pankow, W.; Scherubl, H.; Schmidt, B.; Schneider, T.; Stocker, H.; Suttrop, N.; Thiemig, D.; Gollnisch, C.; Mannschatz, U.; Haas, W.; Schaefer, B.; Luck, C. Source attribution of community-acquired cases of Legionnaires' disease—results from the German LeTriWa study; Berlin, 2016–2019. *PLoS One* **2020**, *15* (11), No. e0241724.
- (22) Den Boer, J. W.; Euser, S. M.; Brandsema, P.; Reijnen, L.; Bruin, J. P. Results from the national *Legionella* outbreak detection program, the Netherlands, 2002–2012. *Emerg. Infect. Dis.* **2015**, *21* (7), 1167–1173.
- (23) Viasus, D.; Gaia, V.; Manzur-Barbur, C.; Carratala, J. Legionnaires' disease: update on diagnosis and treatment. *Infect. Dis. Ther.* **2022**, *11* (3), 973–986.
- (24) Wüthrich, D.; Gautsch, S.; Spieler-Denz, R.; Dubuis, O.; Gaia, V.; Moran-Gilad, J.; Hinic, V.; Seth-Smith, H. M.; Nickel, C. H.; Tschudin-Sutter, S.; Bassetti, S.; Haenggi, M.; Brodmann, P.; Fuchs, S.; Egli, A. Air-conditioner cooling towers as complex reservoirs and continuous source of *Legionella pneumophila* infection evidenced by a genomic analysis study in 2017, Switzerland. *Euro Surveill.* **2019**, *24* (4), No. 1800192.
- (25) Pagnier, I.; Raoult, D.; La Scola, B. Isolation and identification of amoeba-resisting bacteria from water in human environment by using an *Acanthamoeba polyphaga* co-culture procedure. *Environ. Microbiol.* **2008**, *10* (5), 1135–1144.
- (26) Evstigneeva, A.; Raoult, D.; Karpachevskiy, L.; La Scola, B. Amoeba co-culture of soil specimens recovered 33 different bacteria, including four new species and *Streptococcus pneumoniae*. *Microbiology* **2009**, *155* (Pt 2), 657–664.
- (27) Lagier, J. C.; Drancourt, M.; Charrel, R.; Bittar, F.; La Scola, B.; Ranque, S.; Raoult, D. Many more microbes in humans: enlarging the microbiome repertoire. *Clin. Infect. Dis.* **2017**, *65* (Suppl_1), S20–S29.
- (28) Dey, R.; Mount, H.; Ensminger, A. W.; Tyrrell, G. J.; Ward, L. P.; Ashbolt, N. J. Isolation of *Legionella pneumophila* by co-culture with local amoeba, Canada. *Emerg. Infect. Dis.* **2019**, *25* (11), 2104–2107.
- (29) Boillat, N.; Barrassi, L.; Bouanane-Darenfed, A.; La Scola, B. Isolation and identification of *Legionella* spp. from hot spring water in Algeria by culture and molecular methods. *J. Appl. Microbiol.* **2021**, *130* (4), 1394–1400.
- (30) De Obeso Fernandez Del Valle, A.; Lorenzo-Morales, J.; Maciver, S. K. *Leptomyxa valladaresi* n. sp. (Amoebozoa, Tubulinea, Leptomyxida), from Mount Teide, Tenerife, Spain. *Exp. Parasitol.* **2017**, *183*, 85–91.
- (31) Muchesa, P.; Leifels, M.; Jurzik, L.; Hoorzook, K. B.; Barnard, T. G.; Bartie, C. Coexistence of free-living amoebae and bacteria in selected South African hospital water distribution systems. *Parasitol. Res.* **2017**, *116* (1), 155–165.
- (32) Afonso, A. C.; Gomes, I. B.; Saavedra, M. J.; C. Simões, L.; Simões, M. Drinking-water isolated *Delftia acidovorans* selectively coaggregates with partner bacteria and facilitates multispecies biofilm development. *Sci. Total Environ.* **2023**, *875*, No. 162646.
- (33) Ubalde, M. C.; Brana, V.; Sueiro, F.; Morel, M. A.; Martinez-Rosales, C.; Marquez, C.; Castro-Sowinski, S. The versatility of *Delftia* sp. isolates as tools for bioremediation and biofertilization technologies. *Curr. Microbiol.* **2012**, *64* (6), 597–603.
- (34) Johnston, C. W.; Wyatt, M. A.; Li, X.; Ibrahim, A.; Shuster, J.; Southam, G.; Magarvey, N. A. Gold biomineralization by a metallophore from a gold-associated microbe. *Nat. Chem. Biol.* **2013**, *9* (4), 241–243.
- (35) Amer, A.; Kim, Y. Isolation of Pb(II)-reducing bacteria and demonstration of biological Pb(II) reduction to metallic Pb. *J. Hazard. Mater.* **2022**, *423* (Pt A), No. 126975.
- (36) Lu, T. L.; Huang, C. Retrospective cohort study on *Delftia acidovorans* infections in patients: a rare and significant infection. *Infect. Drug Resist.* **2024**, *17*, 1741–1749.
- (37) Højgaard, S. M. M.; Reza Hosseini, O.; Knudsen, J. D.; Fuglebjerg, N. J. U.; Skov, M.; Nielsen, S. D.; Harboe, Z. B.; Papp-Wallace, K. M.; Yassin, M.; Crotty, M. Characteristics and outcomes of patients with *Delftia acidovorans* infections: a retrospective cohort study. *Microbiol. Spectr.* **2022**, *10* (4), No. e0032622.
- (38) Kawamura, I.; Yagi, T.; Hatakeyama, K.; Ohkura, T.; Ohkusu, K.; Takahashi, Y.; Kojima, S.; Hasegawa, Y. Recurrent vascular catheter-related bacteremia caused by *Delftia acidovorans* with different antimicrobial susceptibility profiles. *J. Infect. Chemother.* **2011**, *17* (1), 111–3.
- (39) Lang, K. J.; Chinzowu, T.; Cann, K. J. *Delftia acidovorans* as an unusual causative organism in line-related sepsis. *Indian J. Microbiol.* **2012**, *52* (1), 102–3.
- (40) Patel, D.; Iqbal, A. M.; Mubarik, A.; Vassa, N.; Godil, R.; Saad, M.; Muddassar, S. *Delftia acidovorans*: a rare cause of septic pulmonary embolism from catheter-related infection: case report and literature review. *Respir. Med. Case Rep.* **2019**, *27*, No. 100835.
- (41) Alam, M. S.; Ranjan, A.; Kumar, V.; Kumar, R. *Delftia acidovorans* sepsis in a neonate with nosocomial pneumonia. *BMJ. Case Rep.* **2023**, *16* (10), No. e256439.
- (42) Backman, L.; Dumigan, D. G.; Oleksiw, M.; Carusillo, E.; Patel, P. R.; Nguyen, D. B.; Moulton-Meissner, H.; Boyce, J. M. A cluster of gram-negative bloodstream infections in Connecticut hemodialysis patients associated with contaminated wall boxes and prime buckets. *Am. J. Infect. Control* **2023**, *51* (6), 638–643.
- (43) Chotikanatis, K.; Backer, M.; Rosas-Garcia, G.; Hammerschlag, M. R. Recurrent intravascular-catheter-related bacteremia caused by *Delftia acidovorans* in a hemodialysis patient. *J. Clin. Microbiol.* **2011**, *49* (9), 3418–3421.
- (44) Yassin, M. H.; Abramovitz, B.; Hariri, R.; McKibben, L.; Pinevich, A. J. *Delftia acidovorans* pseudo outbreak in portable reverse osmosis machines: interventions to ensure safe and cost-effective hemodialysis. *Am. J. Infect. Control* **2020**, *48* (3), 304–308.

- (45) Mahmood, S.; Taylor, K. E.; Overman, T. L.; McCormick, M. I. Acute infective endocarditis caused by *Delftia acidovorans*, a rare pathogen complicating intravenous drug use. *J. Clin. Microbiol.* **2012**, *50* (11), 3799–3800.
- (46) Lee, S. M.; Kim, M. K.; Lee, J. L.; Wee, W. R.; Lee, J. H. Experience of *Comamonas acidovorans* keratitis with delayed onset and treatment response in immunocompromised cornea. *Korean J. Ophthalmol.* **2008**, *22* (1), 49–52.
- (47) Deb, A. K.; Chavhan, P.; Chowdhury, S. S.; Sistla, S.; Sugumaran, R.; Panicker, G. Endophthalmitis due to *Delftia acidovorans*: an unusual ocular pathogen. *Indian J. Ophthalmol.* **2020**, *68* (11), 2591–2594.
- (48) Bilgin, H.; Sarmis, A.; Tigen, E.; Soyletir, G.; Mulazimoglu, L. *Delftia acidovorans*: a rare pathogen in immunocompetent and immunocompromised patients. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol.* **2015**, *26* (5), 277–279.
- (49) Yildiz, H.; Sunnetcioglu, A.; Ekin, S.; Baran, A. I.; Ozgokce, M.; Asker, S.; Uney, I.; Turgut, E.; Akyuz, S. *Delftia acidovorans* pneumonia with lung cavities formation. *Colomb. Med. (Cali)* **2019**, *50* (3), 215–221.
- (50) Albers, U.; Reus, K.; Shuman, H. A.; Hilbi, H. The amoebae plate test implicates a paralogue of *lpxB* in the interaction of *Legionella pneumophila* with *Acanthamoeba castellanii*. *Microbiology* **2005**, *151* (Pt 1), 167–182.
- (51) Descours, G.; Hannetel, H.; Reynaud, J. V.; Ranc, A. G.; Beraud, L.; Kolenda, C.; Campese, C.; Lina, G.; Ginevra, C.; Jarraud, S.; Carroll, K. C. Adaptation of amoeba plate test to recover *Legionella* strains from clinical samples. *J. Clin. Microbiol.* **2018**, *56* (5), No. e01361.
- (52) Sadosky, A. B.; Wiater, L. A.; Shuman, H. A. Identification of *Legionella pneumophila* genes required for growth within and killing of human macrophages. *Infect. Immun.* **1993**, *61* (12), 5361–5373.
- (53) Segal, G.; Shuman, H. A. Intracellular multiplication and human macrophage killing by *Legionella pneumophila* are inhibited by conjugal components of IncQ plasmid RSF1010. *Mol. Microbiol.* **1998**, *30* (1), 197–208.
- (54) Spirig, T.; Tiaden, A.; Kiefer, P.; Buchrieser, C.; Vorholt, J. A.; Hilbi, H. The *Legionella* autoinducer synthase LqsA produces an α -hydroxyketone signaling molecule. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283* (26), 18113–18123.
- (55) Hochstrasser, R.; Hilbi, H. The *Legionella* Lqs-LvbR regulatory network controls temperature-dependent growth onset and bacterial cell density. *Appl. Environ. Microbiol.* **2022**, *88* (5), No. e0237021.
- (56) Fan, M.; Kiefer, P.; Charki, P.; Hedberg, C.; Seibel, J.; Vorholt, J. A.; Hilbi, H. The *Legionella* autoinducer LAI-1 is delivered by outer membrane vesicles to promote inter-bacterial and inter-kingdom signaling. *J. Biol. Chem.* **2023**, *299* (12), No. 105376.
- (57) Feeley, J. C.; Gibson, R. J.; Gorman, G. W.; Langford, N. C.; Rasheed, J. K.; Mackel, D. C.; Baine, W. B. Charcoal-yeast extract agar: primary isolation medium for *Legionella pneumophila*. *J. Clin. Microbiol.* **1979**, *10* (4), 437–441.
- (58) Edelstein, P. H. Improved semiselective medium for isolation of *Legionella pneumophila* from contaminated clinical and environmental specimens. *J. Clin. Microbiol.* **1981**, *14* (3), 298–303.
- (59) Horwitz, M. A.; Silverstein, S. C. Intracellular multiplication of Legionnaires' disease bacteria (*Legionella pneumophila*) in human monocytes is reversibly inhibited by erythromycin and rifampin. *J. Clin. Invest.* **1983**, *71* (1), 15–26.
- (60) Bopp, C. A.; Sumner, J. W.; Morris, G. K.; Wells, J. G. Isolation of *Legionella* spp. from environmental water samples by low-pH treatment and use of a selective medium. *J. Clin. Microbiol.* **1981**, *13* (4), 714–719.
- (61) Dennis, P. J. L.; Bartlett, C. L. R.; Wright, A. E., Comparison of isolation methods for *Legionella* spp. *Legionella: Proceedings of the 2nd International Symposium 1984*, Thornsby, C. et al., eds., (American Society for Microbiology: Washington, D.C.), 294–296.
- (62) Edelstein, P. H.; Edelstein, M. A. Natamycin as a selective antifungal agent in media for growth of *Legionella* spp. *J. Clin. Microbiol.* **1996**, *34* (1), 185–187.
- (63) Wadowsky, R. M.; Yee, R. B. Glycine-containing selective medium for isolation of Legionellaceae from environmental specimens. *Appl. Environ. Microbiol.* **1981**, *42* (5), 768–772.
- (64) Edelstein, P. H. Comparative study of selective media for isolation of *Legionella pneumophila* from potable water. *J. Clin. Microbiol.* **1982**, *16* (4), 697–699.
- (65) Inoue, H.; Noda, A.; Takama, T.; Ishima, T.; Agata, K. Enhanced antifungal effect of the selective medium for the detection of *Legionella* species by a combination of cycloheximide, amphotericin B and thiabendazole. *Biocontrol. Sci.* **2006**, *11* (2), 69–74.
- (66) Khalil, J. Y. B.; Andreani, J.; La Scola, B. Updating strategies for isolating and discovering giant viruses. *Curr. Opin. Microbiol.* **2016**, *31*, 80–87.
- (67) Moffat, J. F.; Tompkins, L. S. A quantitative model of intracellular growth of *Legionella pneumophila* in *Acanthamoeba castellanii*. *Infect. Immun.* **1992**, *60* (1), 296–301.
- (68) Segal, G.; Shuman, H. A. *Legionella pneumophila* utilizes the same genes to multiply within *Acanthamoeba castellanii* and human macrophages. *Infect. Immun.* **1999**, *67* (5), 2117–2124.
- (69) Helbig, J. H.; Bernander, S.; Castellani Pastoris, M.; Etienne, J.; Gaia, V.; Lauwers, S.; Lindsay, D.; Lück, P. C.; Marques, T.; Mentula, S.; Peeters, M. F.; Pelaz, C.; Struelens, M.; Uldum, S. A.; Wewalka, G.; Harrison, T. G. Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **2002**, *21* (10), 710–716.
- (70) Chisholm, G. E.; Vaughan, M. H. Isolation and characterization of a cycloheximide-resistant mutant of *Acanthamoeba castellanii* Neff. *J. Bacteriol.* **1979**, *138* (1), 280–283.
- (71) Abu Kwaik, Y.; Fields, B. S.; Engleberg, N. C. Protein expression by the protozoan *Hartmannella vermiformis* upon contact with its bacterial parasite *Legionella pneumophila*. *Infect. Immun.* **1994**, *62* (5), 1860–1866.
- (72) Raederstorff, D.; Rohmer, M. The action of the systemic fungicides tridemorph and fenpropimorph on sterol biosynthesis by the soil amoeba *Acanthamoeba polyphaga*. *Eur. J. Biochem./FEBS* **1987**, *164* (2), 421–6.

UMWELTPATHOGENE IM VERTEILNETZ

HYDRANTEN ALS HYGIENISCHE PROBLEMZONE

In Hydranten und deren Zuleitungen stagniert das Wasser und erwärmt sich. Dies kann zur Verkeimung und Vermehrung von Umweltpathogenen wie Legionellen, Pseudomonaden oder Mykobakterien führen. Mit der Klimaerwärmung wird sich dieses Problem in Zukunft verschärfen – insbesondere in der Schweiz, wo mit wenigen Ausnahmen das Leitungswasser nicht gechlort wird. Es müssen Abklärungen und eventuell Massnahmen ergriffen werden, um die Trinkwasserhygiene auch in Zukunft zu gewährleisten.

*Hans Peter Füchslin; Federica Di Rosario; Yasemin Goekuguz, Kantonales Labor Zürich
Silvan Kaufmann, bNovate Technologies SA; Thomas Egli, Microbes-in-Water GmbH*

RÉSUMÉ

AGENTS PATHOGÈNES ENVIRONNEMENTAUX DANS LE RÉSEAU: LES HYDRANTS, UNE ZONE PROBLÉMATIQUE SUR LE PLAN DE L'HYGIÈNE

Les hydrants sont des robinetteries servant à prélever l'eau d'un réseau de distribution d'eau. Pour des raisons d'approvisionnement en eau d'extinction, un réseau d'hydrants dense est nécessaire dans tout réseau de conduites. L'eau stagne dans les hydrants et leurs conduites d'alimentation et s'y réchauffe, ce qui peut entraîner une contamination et la multiplication d'agents pathogènes tels que les légionelles, les pseudomonas, etc. Avec le réchauffement climatique, ce problème pourrait s'aggraver à l'avenir, en particulier en Suisse où l'eau du robinet n'est pas chlorée, à quelques exceptions près. L'évolution démographique actuelle fait qu'une partie de plus en plus importante de la population suisse est davantage sujette aux maladies infectieuses. L'eau potable est pauvre en germes mais pas stérile. Est-ce que les agents pathogènes environnementaux présents dans les hydrants et leurs conduites d'alimentation présentent un risque pour la santé? Les premières campagnes de mesure montrent que les systèmes de distribution d'eau sont contaminés à des degrés divers par des agents pathogènes environnementaux dans les zones problématiques que sont les hydrants. Les principaux facteurs de multiplication des agents pathogènes environnementaux sont la stagnation, la température et les nutriments disponibles.

EINFÜHRUNG

Hydranten sind Armaturen zur Entnahme von Wasser aus einem Wasserversorgungsnetz. Aus Gründen der Löschwasserversorgung ist ein dichtes Netz von Hydranten in jedem Verteilungsnetz erforderlich. Im städtischen Bereich muss zur Bereitstellung von Löschwasser alle 80 bis 130 m ein Hydrant vorhanden sein [1]. Es wird geschätzt, dass die Zuleitung zu den Hydranten ca. 1% des Gesamtvolumens des Verteilnetzes entspricht. In Hydranten besteht die Gefahr von stehendem Wasser oder zumindest ständig feuchten Innenwänden. Ausserdem können die Hydranten in den Sommermonaten durch Sonneneinstrahlung stark erwärmt werden. Bei sonnenexponierten Hydranten können Temperaturen zwischen 50 bis 70 °C an der Oberfläche gemessen werden. Das Wasser der Zuleitung zum Hydranten erwärmt sich auf 25 bis 30 °C (Fig. 1). Durch die globale Erwärmung steigt potenziell die Temperatur des Wassers im Verteilnetz. Dies begünstigt die Vermehrung von Mikroorganismen. In der Schweiz wird das Leitungswasser nicht gechlort (mit wenigen Ausnahmen), was normalerweise als Schutzmassnahme gegen mikrobiologische Verunreinigungen dient. Ohne diesen Netzschutz sind die Verteilnetze anfälliger für das Wachstum von Mikroorganismen. Das Verteilnetz kann diesbezüglich

Kontakt: H. P. Füchslin, hanspeter.fuechslin@outlook.com

(© AdobeStock)

Lizenz für Hans Peter Füchslin, hanspeter.fuechslin@kl.zh.ch
Kantonales Labor Zürich, Zürich

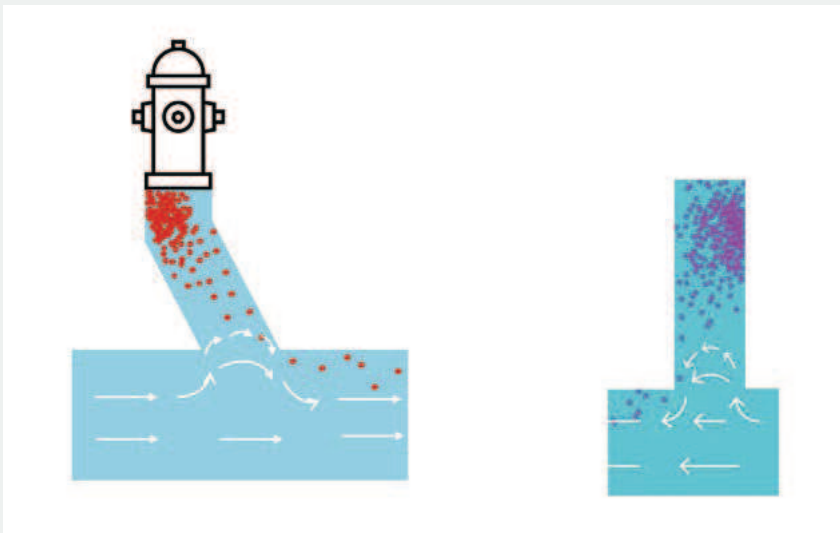


Fig. 1 Die Zuleitungen zu den Hydranten bilden eine Stagnationszone, die sich im Sommer auf 25 bis 30 °C erwärmt und eventuell zur Vermehrung von Umweltpathogenen wie *Pseudomonas aeruginosa*, Legionellen und Mykobakterien führen kann. Die Zubringerleitung zum Hydranten ist gegenüber der Hauptleitung offen und im Austausch. Dadurch kann die Leitung stetig Umweltpathogene in tiefer Konzentration an das vorbeifliessende Wasser abgeben, das dann in die Haushalte gelangt.

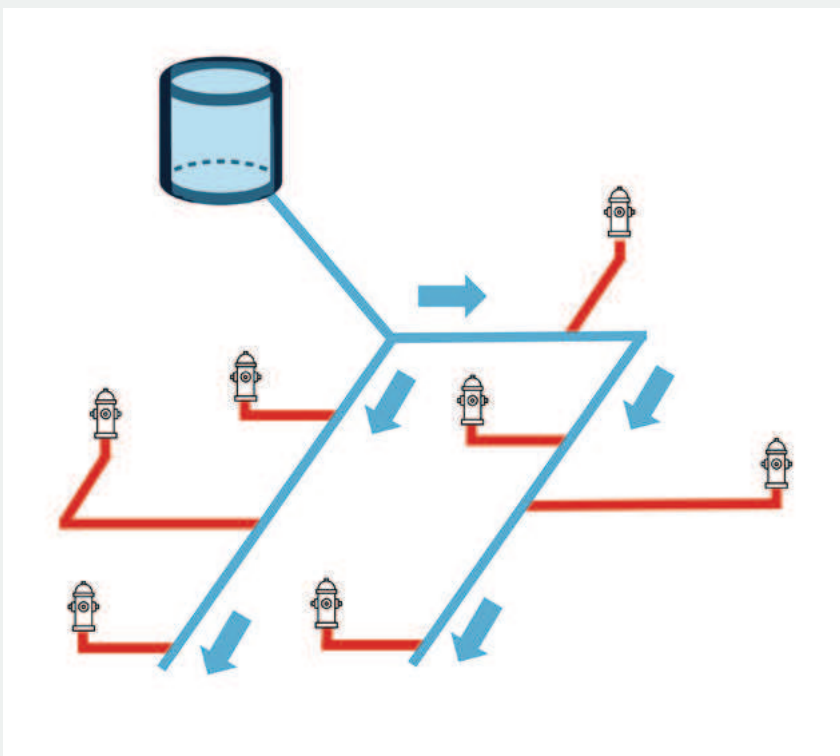


Fig. 2 Das Verteilnetz kann unterteilt werden in einen Teil, der mit frischem, kühlem Wasser regelmässig durchflossen und ausgetauscht wird, z. B. das Hauptverteilsystem (blau), und einen Teil, der stagniert und im Sommer erwärmt wird, z. B. die Zuleitung zu den Hydranten (rot). Das Volumen der Hydrantenzuleitung entspricht ca. 1% des Volumens des Gesamtnetzes.

in zwei Teile gegliedert werden: Während ein Teil regelmässig mit frischem, kühlem Wasser durchflossen und ausgetauscht wird, wie das Hauptverteilsystem, stagniert der andere Teil und erwärmt sich im Sommer, wie die Zuleitungen zu den Hydranten (Fig. 2).

ERHÖHTE ZELLKONZENTRATIONEN BEI HYDRANTEN

Aus einem Verteilnetz einer städtischen Wasserversorgung wurde die durchflusszytometrische Gesamtzellzahl (vgl. SVGW MW102) als Verkeimungsparame-

ter in Proben aus Hydranten und Laufbrunnen gemessen (Fig. 3). Die Proben wurden im Sommer 2023 erhoben. Es wurden vier Hydranten nach vier und nach dreissig Litern Vorlauf beprobt. Hydrant Nr. 5 wurde zusätzlich auch nach zehn Minuten Vorlauf beprobt. Zum Vergleich wurden ausserdem Proben von drei Laufbrunnen genommen. Die Ergebnisse sind deutlich: Hydranten weisen höhere Zellkonzentrationen auf, und mit steigendem Vorlauf sinken die Zellkonzentrationen und die Temperatur. Nach dreissig Litern Vorlauf und mehr ist die Bakterienzellkonzentration deutlich reduziert, teils auf dem tiefen Niveau der Laufbrunnen. Diese Resultate weisen darauf hin, dass das Wasser aus den Hydranten und deren Zuleitungen stärker verkeimt ist als Wasser aus dem Hauptverteilsystem. Stagnation und Erwärmung des Wassers tragen sehr wahrscheinlich zur Verkeimung bei.

HETEROGENE GRUPPE DER UMWELTPATHOGENEN

Neben der allgemeinen Verkeimung besteht aber auch die Gefahr, dass sich Umweltpathogene wie Legionellen, Pseudomonaden und Mykobakterien vermehren können. Die sogenannten Umweltpathogene umfassen eine heterogene Gruppe von Bakterien, die im Gegensatz zu den Fäkalpathogenen nicht von aussen durch Fäkalien tierischen oder menschlichen Ursprungs eingetragen werden, sondern sich im Verteilsystem vermehren [2]. Die wichtigsten Faktoren für ihre Vermehrung sind Temperatur, Stagnation und verfügbare Nährstoffe. Umweltpathogene haben gemeinsam, dass sie sich bei tiefen Nährstoffkonzentrationen und in Biofilmen vermehren können und häufig resistent gegenüber Amöben sind [2].

PSEUDOMONAS-MESSKAMPAGNE IN HYDRANTEN

In einer Messkampagne des Kantonalen Labors Zürich von 2015 bis 2017 wurde *Pseudomonas aeruginosa* in Proben von Hydranten nachgewiesen und quantifiziert [3]. In einem Versorgungsnetz, in dem sich infolge Stagnation das Wasser im Sommer bis auf 23 Grad erwärmen konnte, wurden über drei Jahre das Netzwasser wie auch Hydranten auf *P. aeruginosa* kontrolliert. Die Pseudomonaden konnten sich im Netz trotz der für sie günstigen Vermehrungsbedingungen nicht ausbreiten. Die Anzahl der kontaminierten Hydranten reduzier-

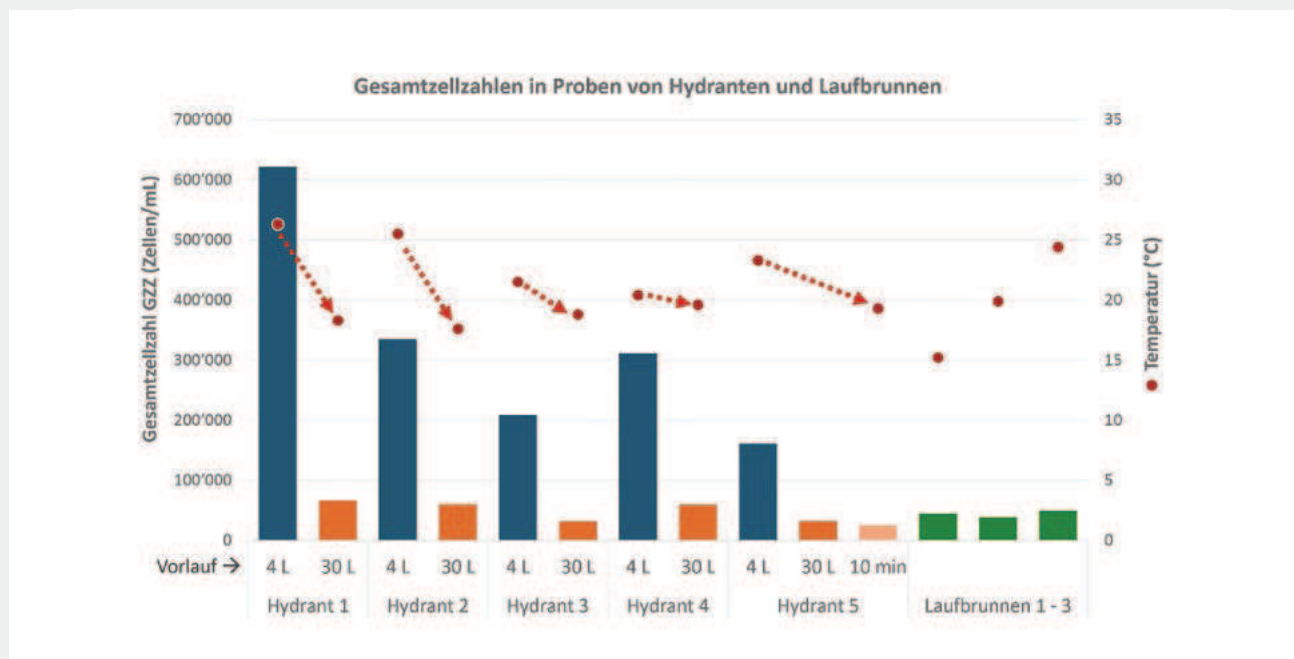


Fig. 3 Es ist deutlich erkennbar, dass die gemessenen Gesamtzellzahlen in den Hydranten abhängig sind vom Vorlauf. Die tiefen Zellkonzentrationen aus den Laufbrunnen als Referenz zeigen auf, dass das Wasser in den Hydranten und deren Zuleitungen verkeimt. Dies ist sehr wahrscheinlich auf die Stagnation und die Erwärmung im Sommer zurückzuführen. Die Resultate stammen aus Messungen des Projekts «Relevanz von Legionellen im Verteilnetz», sie wurden durchflusszytometrisch anhand der SVGW MW102 erhoben (BactoSense Multi, bNovate Technologies).

te sich während der dreijährigen Messkampagne.

Pseudomonaden konnten nur in Proben von Hydranten nachgewiesen werden, nicht aber im freien Wasser des Versorgungsnetzes. So waren alle Proben von Laufbrunnen frei von *P. aeruginosa*. Allerdings war 2017 immer noch ein Hydrant schwach mit *P. aeruginosa* kontaminiert. Dass ein geringer Teil der Hydranten mit *P. aeruginosa* kontaminiert ist, entspricht den Erfahrungen anderer Wasserversorgungen. Wesentliche Faktoren der Besiedlung mit *P. aeruginosa* sind die Wassertemperatur und die Stagnation. *P. aeruginosa* ist ein Umweltkeim und Biofilmbildner. Die Bakterien sind im Trinkwasser nicht lebensmittelrechtlich reglementiert. Aufgrund der vorliegenden Daten wurde von keiner Gefährdung der Trinkwasserqualität im Versorgungsnetz ausgegangen, da nur die Hydranten und nicht das Netz betroffen waren, und sich die Zahl der mit Pseudomonaden belasteten Proben wie auch die gemessenen Konzentrationen über die drei Jahre reduzierte [3]. Eventuell könnte die regelmässige Beprobung zu einer Auswaschung der Verkeimungen und einer Reduktion der Verkeimung mit *P. aeruginosa* geführt haben. Dies wäre ein Hinweis, dass regelmässiges Spülen von kontaminierten Hydranten eine mögliche, einfache Lösung wäre.

LEGIONELLENMESSKAMPAGNE IM VERTEILNETZ

Das Projekt «Relevanz von Legionellen im Verteilnetz» startete 2022 und wird Ende dieses Jahres abgeschlossen [4]. Es konnten aus den Proben von Hydranten *Legionella* spp. und vereinzelt auch *Legionella pneumophila* durch PCR wie auch durch Kultivierung nachgewiesen werden. Ähnlich wie im Beispiel von *P. aeruginosa* konnten im Netzwasser aber keine Legionellen kulturell nachgewiesen werden. Die Daten werden demnächst separat publiziert.

ANALYTISCHE HERAUSFORDERUNG

Als Schutz vor Vereisung im Winter werden Hydranten ausser Betrieb genommen und ordnungsgemäss entleert. Die Zuleitung zu den Hydranten bleibt aber mit Wasser gefüllt, ist gegenüber der Hauptleitung verbunden, offen und im Austausch. Auf diese Weise könnte sie Umweltpathogene in tiefer Konzentration an das vorbeifliessende Wasser abgeben, das in die Haushalte gelangt. Durch die starke Verdünnung im Leitungswasser sind die Konzentrationen gering, und der Nachweis entsprechend erschwert. Auch die Artenvielfalt der Umweltpathogene ist eine Herausforderung für den Nachweis. In der Schweiz sind Umweltpathogene für das Trinkwasser nicht reglementiert.

Wichtig in diesem Zusammenhang ist, dass Umweltpathogene nicht mit Fäkalindikatoren korrelieren. Auch ist die Einhaltung des Höchstwertes von 300 KBE/ml aerob mesophilen Keimen (Gesamtkeimzahl) kein Garant dafür, dass sich Umweltpathogene im Verteilnetz nicht unverhältnismässig vermehren können. So wird in den USA von Experten empfohlen, dass ab 15 °C und bei einem Chlorgehalt von <0,2 mg/l Legionellen im Verteilnetz kontrolliert werden sollen [5]. Es gibt auch keinen Indikatorkeim für Umweltpathogene analog zu *E. coli* und Enterokokken als Indikator für fäkale Verunreinigungen.

LEGIONELLOSEFÄLLE

SCHÜTZT CHLORUNG?

In den USA weisen Regionen mit ungechlortem Leitungswasser generell eine höhere Inzidenzrate von Legionellose (Legionärskrankheit) auf als Regionen mit Netzschutz. Auch in Deutschland weist die höchste Inzidenzrate der Legionärskrankheit der Stadtstaat Berlin auf, in dem nicht gechlortes Leitungswasser verteilt wird [6]. Aus Frankreich ist bekannt, dass die Inzidenzraten der Legionellose nicht gleichmässig verteilt, sondern im Nordosten höher sind als im Rest des Landes [7]. Die Konzentration von Chlornebenprodukten in den einzelnen Départements Frankreichs ist umge-

kehrt proportional zu den Inzidenzraten der Legionellose [8]: In den Départements mit hohen Chlornebenproduktkonzentrationen sind die Inzidenzraten der Legionellose im Allgemeinen niedrig, während sie in den Départements mit niedrigen Chlornebenproduktkonzentrationen hoch sind. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Frankreich, ähnlich wie in den USA, ungechlortes Leitungswasser ein höheres Infektionsrisiko durch Legionellen darstellt.

In Europa fallen die Niederlande, Dänemark und die Schweiz trotz guter Trinkwasserinfrastruktur durch überraschend hohe Inzidenzraten der Legionellose auf. In allen drei Ländern wird das Leitungswasser nicht gechlort [9]. Die höheren Inzidenzraten der genannten Länder könnten aber auch andere Gründe haben, z. B. einen grösseren Anteil an infektionsanfälliger Bevölkerung, besseres Meldewesen für Legionellose, mehr Kontrollen etc.

SAISONALE SCHWANKUNGEN

Die beobachteten saisonalen Schwankungen der Legionellose-Fallzahlen sind ein wenig verstandenes Phänomen. Im Sommer gibt es generell mehr Fälle als im Winter [10]. Die Warmwassersysteme in den Sanitäranlagen und Rohrleitungen der Gebäude können die saisonalen Schwankungen nicht erklären, da Warmwasser gemäss den technischen Standards das ganze Jahr über mit konstanter Temperatur erzeugt, gespeichert und verteilt wird. Im Gegensatz dazu unterliegt die Temperatur des kalten Leitungswassers saisonalen Schwankungen, die der Saisonalität der Anzahl Legionellosefälle in der Schweiz zumindest ähnlich sind.

ZUNAHME DER INFektionsANFÄLLIGEN BEVÖLKERUNG

Die aktuell erwarteten demographischen Veränderungen führen dazu, dass ein immer grösserer Teil der Schweizer Bevölkerung ein Alter erreicht, in dem sie anfälliger für Infektionskrankheiten wird. Ausserdem hat ein zunehmender Teil der Bevölkerung ein permanent geschwächtes Immunsystem, zum Beispiel auf Grund chronischer Erkrankungen oder immununterdrückender Behandlungen. Dieser immunokompromitierte Anteil der Bevölkerung ist anfälliger gegenüber Infektionen durch wasserbedingte Umweltpathogenen.

OFFENE FRAGEN

Es ist davon auszugehen, dass Umweltpathogene, z. B. in Hydranten, über das Verteilungsnetz auch in die Trinkwasserinstallationen der Gebäude und zu den Konsumentinnen und Konsumenten gelangen. Allerdings werden die Umweltpathogenen stark verdünnt und sind im Leitungswasser in der Regel nicht nachweisbar. Sehr geringe Konzentrationen von Umweltpathogenen, die an sehr viele Menschen verteilt werden, könnten jedoch zu sporadischen Erkrankungen führen. So sind die meisten Fälle von Legionellose sporadische Einzelfälle, bei denen die Infektionsquelle nicht identifiziert werden kann [10]. Es ist auch möglich, dass Krankheitserreger aus dem Verteilnetz in die Hausinstallation gelangen, und sich dort unter günstigen Bedingungen weiter zu Konzentrationen vermehren, die dann zu Infektionen führen können.

Es ist allgemein bekannt, dass das Trinkwasser im Leitungsnetz nicht steril sondern lediglich keimarm ist. Unter diesen Mikroorganismen befinden sich auch Umweltpathogene. Ob Umweltpathogene in den Hydranten und deren Zuleitungen ein Gesundheitsrisiko darstellen, ist eine offene Frage. Der Nachweis dieser Umweltpathogene ist schwierig. Die ersten Messkampagnen geben Hinweise darauf, dass Wasserversorgungen unterschiedlich stark mit Umweltpathogenen besiedelt sind. Die Hauptfaktoren für die Vermehrung von Umweltpathogenen sind Stagnation, Temperatur und verfügbare Nährstoffe. Eventuell könnte eine regelmässige Spülung von Hydranten in den Problemzonen der betroffenen Wasserversorgungen eine wesentliche Verbesserung bringen.

FAZIT

Die Schweizer Bevölkerung geniesst eine gute Trinkwasserqualität, und die Wasserversorgungen verzichten in der Regel auf die Chlorung des Leitungswassers. Die Klimaerwärmung wird in Zukunft zu höheren Leitungswassertemperaturen führen. Es ist daher zu erwarten, dass die Vermehrung von Bakterien und auch von Umweltpathogenen im Leitungsnetz begünstigt wird. Es sollten weitere Studien zur Risikobewertung durchgeführt werden, um abschätzen zu können, ob in Zukunft deswegen konkrete Massnahmen

DANKSAGUNG

Das Projekt «Relevanz von Legionellen im Verteilungsnetz» wird finanziell unterstützt durch das Bundesamt für Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen (BLV), Bundesamt für Energie (BFE), Amt für Hochbauten der Stadt Zürich (AHB), Immobilien Stadt Zürich (IMMO) und die Aziende Industriali di Lugano (AIL). Die Projektpartner und Mitarbeitenden sind nebst *Hans Peter Fuchsli* (KLZH), *Hubert Hilbi* (UZH), *Adrian Egli* (UZH), *Valeria Gaia* (Nationales Referenzzentrum Legionellen Bellinzona) sowie *Tim Roloff*, *Anaisa Moreno*, *Tong Chen*, *Severin Wälty* und *Colin Schmid* (alle UZH) und *Daniel Mäusezahl* und *Melina Bigler* (Schweizerisches Tropen- und Public Health-Institut).

men ergriffen werden müssen. konkrete Massnahmen ergriffen werden müssen.

BIBLIOGRAPHIE

- [1] Aargauische Gebäudeversicherung (AGV): Richtlinie für die Löschwasserversorgung des Kantons Aargau vom 4. November 2019
- [2] Falkinham III, J. O.; Pruden, A.; Edwards, M. (2015). *Opportunistic premise plumbing pathogens: increasingly important pathogens in drinking water*. *Pathogens*, 4(2), 373–386
- [3] Kantonales Labor Zürich (KLZH): Jahresbericht 2017, Kapitel 7.1 Bericht, *Pseudomonas aeruginosa* in Hydranten
- [4] BLV: Forschungsprojekt «Relevanz von Legionellen im kommunalen Wasserverteilungsnetz» Nr. 4.22.02: <https://www.aramis.admin.ch/Grunddaten/?ProjectID=50284>
- [5] National Academies of Sciences, Engineering, Medicine (2020): *Management of Legionella in Water Systems*. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32200596>
- [6] Robert Koch Institut (RKI): *Infektionsepidemiologisches Jahrbuch meldepflichtiger Krankheiten für 2019 und 2020*: https://www.rki.de/DE/Content/Infekt/Jahrbuch/Jahrbuch_2019.html
- [7] Campese, C. et al. (2011): *Progress in the surveillance and control of Legionella infection in France, 1998–2008*. *Int J Infect Dis*, 15(1): p. e30–7
- [8] Corso, M. et al. 2018): *An assessment of current and past concentrations of trihalomethanes in drinking water throughout France*. *Int. J. Environ. Res. Public Health*
- [9] European Centre for Disease Prevention and Control (2023): *Legionnaires' disease*. In: ECDC. *Annual Epidemiological Report for 2021*. Stockholm: ECDC
- [10] Bundesamt für Gesundheit (BAG): BAG-Bulletin 34 vom 19.08.2024, Bericht Legionärskrankheit in der Schweiz und im Fürstentum Liechtenstein 2023

Detection of Legionella through 16S sequencing



AUTHOR

Vanni Benvenga

PUBLISHED

December 4, 2024

The objective of this experiment was to investigate the potential presence of *Legionella* in water samples. Hydrant water was passed over a bacterial filter, the material deposited on the filter was then directly sequenced.

Pre-analytical steps

Samples were rarefied at a sampling depth of 2000 sequences in order to not lose samples

Abundance analysis

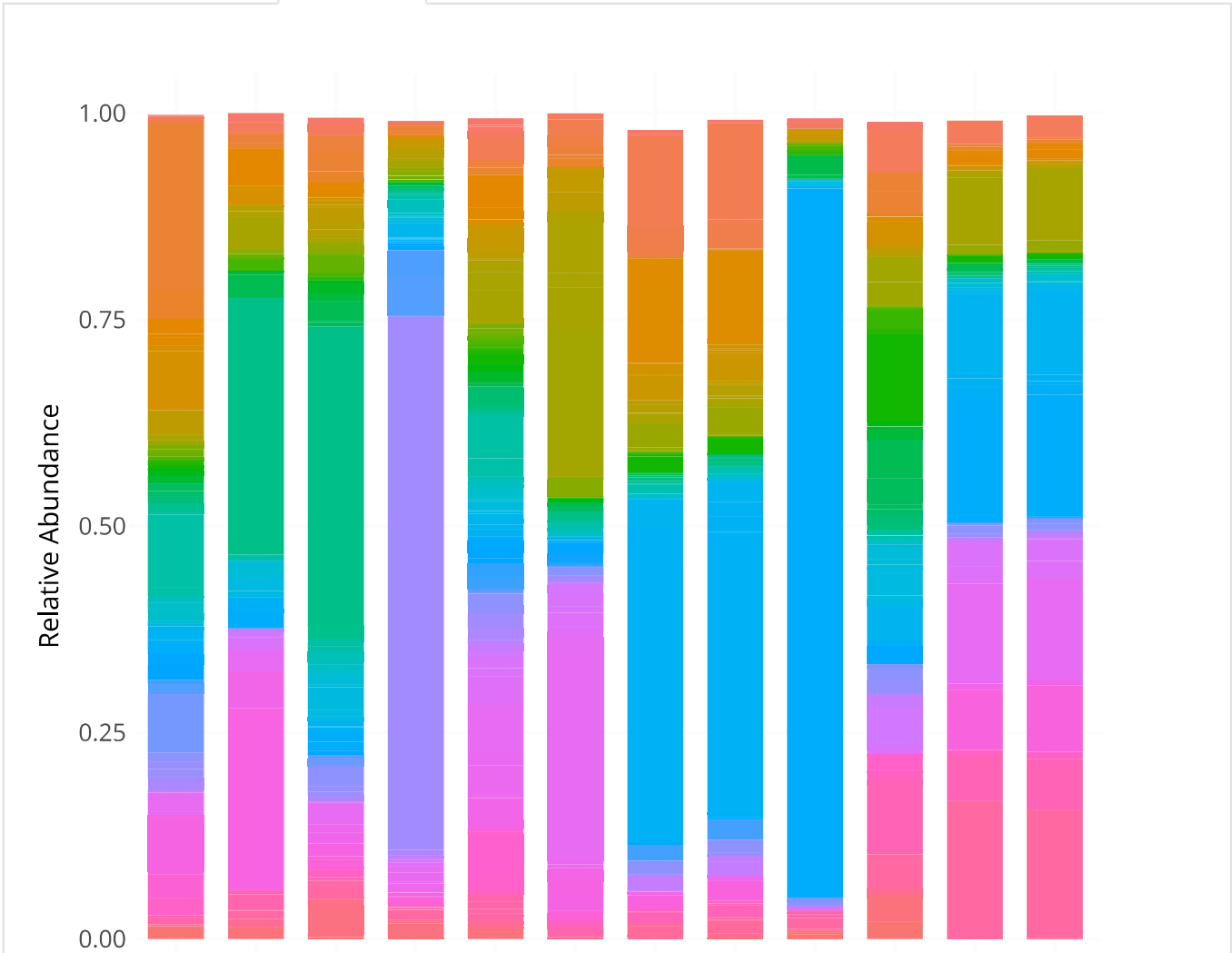
As a first visualization, the overall composition of the samples are shown at different taxonomic levels

Taxonomic relative abundance

Family

Genus

Species



207-V3V4
2086-V3V4
2212-V3V4
4402-V3V4
50-V3V4
5183-V3V4
Lugb-8-A-V3V4
Lugb-8-B-V3V4
S177-V3V4
S179-V3V4
WVZ9-50L-A-V3V4
WVZ9-50L-B-V3V4

Figure 3: Relative abundance of bacterial species (n=10)

Relative abundance of *Legionella* sequences

Since the target of the analysis are species belonging to the *Legionella* Genus, we filter the non-*Legionella* sequences out and show their presence both at the genus and species levels.

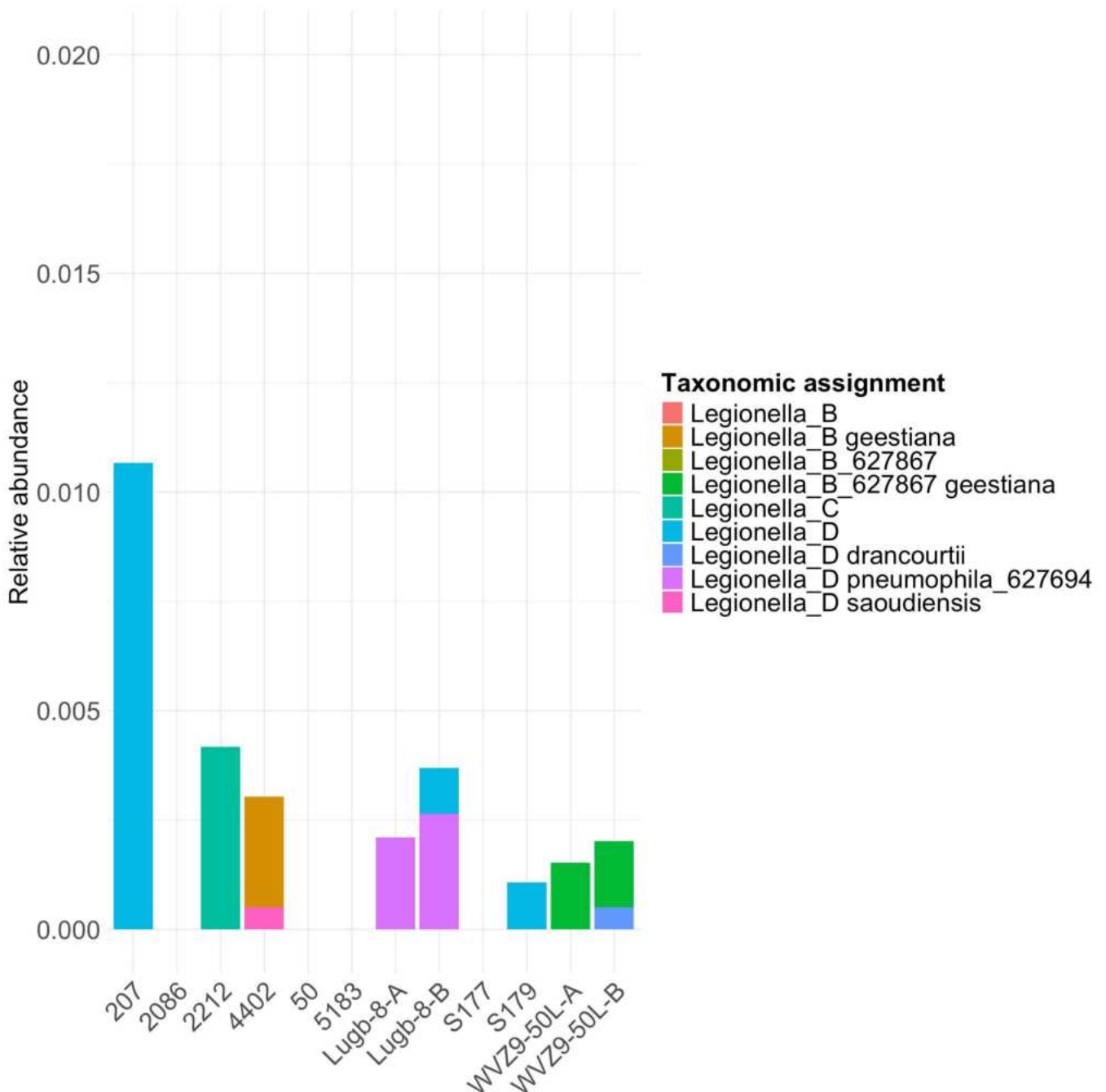


Figure 4: Relative abundance of *Legionella* Genus across samples (n=10)

Conclusion

We see presence of *Legionella* Genus sequences in 8/12 samples, while Sequences classified at the species level are present in 5/12 samples. The main species of interest for legionellosis, *L. pneumophila* is found in two samples, duplicates of one hydrant sampling (LugB-8). The other species detected are *L. geestiana* and *L. drancourtii*.

It must be disclosed, that standard practice for 16S amplicon sequencing is to remove sequences with a relative abundance below 0.001 (0.1%) to avoid false positives caused by very rare or spurious sequences. This threshold was not implemented in this analysis, as the bacterium of interest is known, but we must highlight that the *Legionella* abundances detected are close to this threshold.

Contact

Please do not hesitate to contact us if you have any question or if want access to more raw data. vbenvenga@imm.uzh.ch

Materials and Methods

DNA was quantified using the Qubit Fluorometer (Thermo Fisher). DNA libraries were generated using the QiaSeq 16S/ITS panels (Qiagen, cat# 333822) with 35 PCR cycles. PCR amplicons were subject to quality assessment using the Fragment Analyzer 3200 (Agilent), with the high sensitivity 1- 6 kbp next-generation sequencing fragment kit (cat.# DNF-474-0500). Single libraries were quantified with the Qubit Fluorometer (Thermo Fisher) and diluted to 2nmol and pooled in equimolar concentration. The diluted pooled library (10 pmol) was loaded on the MiSeq (Illumina) for paired-end 301 base pair sequencing using V3 chemistry (600 cycles) (Illumina, lot# 20795255/20769174). Negative controls (QIAgen ultra clean pure PCR Water) and postive control (ZymoBIOMICS Microbial Community DNA Standard II Log (Zymo Research, cat.# D6311)) were included in the sequencing run.

The V3V4 region of the 16S rRNA gene was analyzed in QIIME2 version 2024.2. Demultiplexed paired-end sequences were subject to DADA2 for quality filtering, denoising, and chimera removal. A naïve bayes classifier was trained on the Greengenes2.2024.09 full-length reference sequences and then used to taxonomically annotate sequences. Amplicon sequence variants (ASVs) classified as chloroplasts or mitochondria were removed.



Einsender Adresse
Stadt Zürich
Wasserversorgung
Qualitätsüberwachung
Hardhof 9
8021 Zürich

Prof. Dr. med. Dr. phil. Adrian Egli, FAMH
Direktor am Institut für Medizinische Mikrobiologie
Telefon +41 44 634 26 60
aegli@imm.uzh.ch

Cc:
hanspeter.fuechslin@outlook.com

Zürich, 03.01.2025

Molekulare Typisierung mittels Genom-Sequenzierung (WGS)

Zusammenfassung

Neu typisierte Isolate

Isolat Nr. intern ¹	Isolat Nr. extern ²	MST Cluster	ST ³
2024188078	13437 Lp1	1	762
2024188079	13533 Lp1	1	23
2023188797	Lugano, Hydrant 6415	In keinem Cluster	995

¹ Isolat Nummer intern gemäss unserer Erfassung (mLab Nummer); ² Isolat Nummer extern gemäss ihrer Angaben;

³ ST, Multilocus Sequenztyp

Drei *Legionella pneumophila* Isolate wurden typisiert. Zwei Isolate sind genomisch identisch und mit bereits sequenzierten Patienten-Isolaten verwandt.

Analyse:
T. Roloff Handschin
Bioinformatiker

Ergebnisse

Drei *Legionella pneumophila* Isolate wurden mit Hilfe von WGS analysiert und auf Core-Genome Multi Locus Sequence Typing (cgMLST) sowie whole genome Single Nucleotide Polymorphism (wgSNP)-Ebene untereinander sowie mit einer Datenbank bereits typisierter Isolate verglichen.

Das Isolat Lugano, Hydrant 6415 ist nicht mit den anderen beiden oder bereits typisierten Isolaten verwandt.

Die Isolate 13437 Lp1 und 13533 Lp1 fallen in ein Cluster bereits typisierter klinischer Isolate und sind mit diesen auf im Kerngenom (cgMLST) identisch.

Die cgMLST wird als MST Figur dargestellt und zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Isolaten.

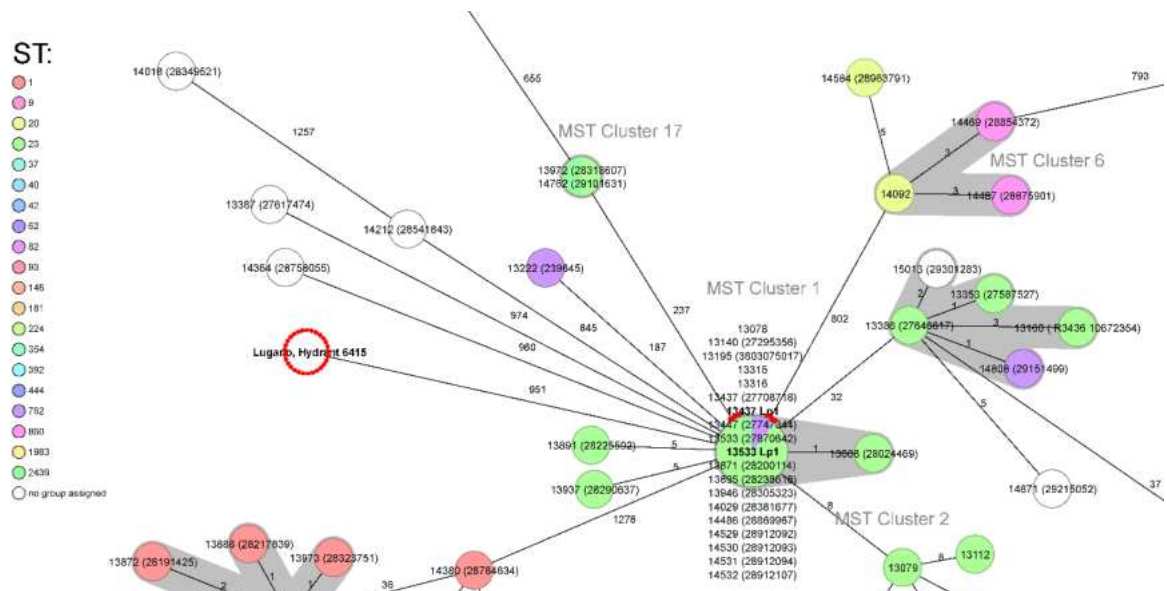


Abbildung / Figur 1. Minimum Spanning Tree (MST) der cgMLST, Fokus auf ST23. Die Farbe der Punkte entspricht dem Sequence Type (ST) der Isolate. Die typisierten Isolate sind rot und fett markiert. Die Nummern zwischen den Isolaten geben an, wie viele unterschiedliche Allele die Isolate zueinander haben. Eine Allel Unterschied unter 4 weist auf eine möglicherweise gleiche Quelle hin (grau). Zwei Isolate sind Teil des MST Cluster 1.

Die wgSNP-Analyse erlaubt eine noch höhere Auflösung der Verwandtschaft und wurde zusätzlich für das MST Cluster 1 der cgMLST Analyse durchgeführt. Der resultierende Baum wird als SNP Tree dargestellt und zeigt die Verwandtschaftsverhältnisse zwischen den Isolaten in dem Cluster.

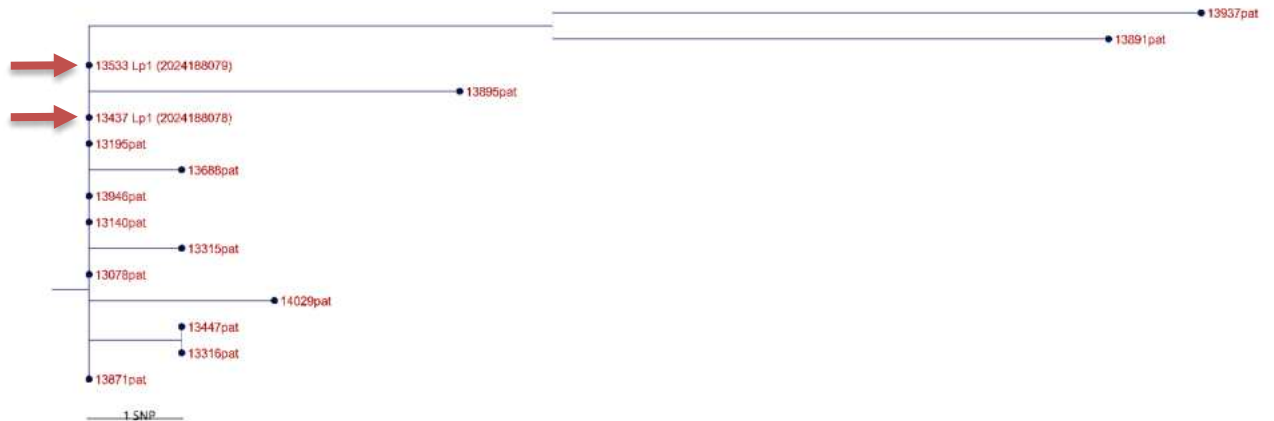


Abbildung / Figur 2. wgSNP Tree von MST Cluster 1. Die typisierten Isolate sind durch rote Pfeile markiert. Isolate, welche auf derselben vertikalen Linie liegen, sind auf SNP-Ebene identisch.

Qualitätssicherung und Durchführung / Methoden und Qualitätssicherung

Die Gesamtgenom-Sequenzierung (WGS) wurde mit Hilfe eines MiSeq Illumina Sequenziergerätes durchgeführt. Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mittels einer bioinformatischen Pipeline bzgl. spezifischer Qualitätskriterien kontrolliert (Seth-Smith et al., 2019, *Front Public Health*, 10.3389/fpubh.2019.00241). Die Resultate wurden mit Ridom SeqSphere (v8.3.4) analysiert durch beschriebene Schema (cgMLST.org). Die core genome MLST (cgMLST) Methodik vergleicht alle gemeinsamen Gene (Kerngenom) der sequenzierten Isolate. Dabei wird untersucht, wie viele unterschiedliche Allele die einzelnen Isolate im Kerngenom zueinander aufweisen. Je kleiner diese Anzahl ist, desto näher sind die Isolate untereinander verwandt. Insgesamt werden mehr als 1'500 Gene in den Vergleich eingeschlossen. Dadurch entsteht eine sehr hohe Auflösung für die Typisierung einzelner Bakterien.

Die Sequenzierungen und Analysen aller Samples haben die internen Qualitätsstandards erreicht (Abdeckung > 30x Durchschnitt; Genomegrösse; Spezies bestimmt).

Technische Auskunft

Dr. phil. Helena Seth-Smith
Co-Fachleiterin Microbial Genomics
Bioinformatikerin
+41 44 634 2624
hsethsmith@imm.uzh.ch

Dr. rer. nat. Tim-C. Roloff Handschin
Co-Fachleiter Microbial Genomics
Bioinformatiker
+41 44 634 0257
troloff @imm.uzh.ch

WVZ / QBM
Sonja Förster

Zürich, 25. Juni 2024

Prüfbericht: Mikrobiologische Analysen
Legionellen im Verteilnetz (Oberflurhydranten)

Auftrag Nr.:	A-017461	Probeneingang:	12.06.2024
Probenahme durch:	intern	Prüfdatum:	12.06.2024 - 24.06.2024

Probenübersicht

Proben-Nr	Kurzbez.	Probenahmestelle	Probenahme	Zeit
P-174072		OFH 2212	12.06.2024	08:45
P-174073		OFH 207	12.06.2024	09:45
P-174074		OFH 50	12.06.2024	10:25

Bemerkungen

Legende:

nn : nicht nachgewiesen/nicht nachweisbar
na : nicht auswertbar
kA : keine Angabe
AMK : Aerobe mesophile Keime
KbE : Koloniebildende Einheiten
MPN : most probable number
LNA : low nucleic acid
HNA : high nucleic acid
GU : Genomic Units
NAM : nicht akkreditierte Methode

Kopie: QB, PN, Q

Prüfbericht: Mikrobiologische Analysen Legionellen im Verteilnetz (Oberflurhydranten)

Auftrag Nr.: A-017461
Probenahme durch: intern

Probeneingang: 12.06.2024
Prüfdatum: 12.06.2024 - 24.06.2024

Angewandte Verfahren

Methode	Messprinzip	WVZ-Prüfvorschrift
Temperaturmessung	Temperaturmessung	PV-09-02-315
Bestimmung der Keimzahl mit Hefeextrakt-Agar	Inkubation	PV-09-02-600
Legionella - ISO 11731 (1 Liter; Matrix A; Verfahren 8, 9, 10; Medium A+C)	Inkubation	PV-09-02-635
Bestimmung von <i>P. aeruginosa</i> mit CNA	Inkubation	PV-09-02-638
Gesamtzellzahlbestimmung	Flowcytometrie	PV-09-02-653
Schnelltest <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (IDEXX)	Inkubation	PV-09-02-671
Intaktzellzahlbestimmung	Flowcytometrie	PV-09-02-677

Allgemeine Parameter

Parameter	Einheit	P-174072	P-174073	P-174074
Wassertemperatur	°C	17.3	15.8	13.7

Mikrobiologie

Parameter	Einheit	P-174072	P-174073	P-174074
AMK	KbE/mL	1'355	2'755	3'500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NAM)	KbE/100 mL	nn	nn	nn
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NAM)	MPN/100 mL	<1	<1	<1
<i>Legionella</i> spp.	KbE/1000 mL	<100	<100	<100
Gesamtzellzahl (NAM)	Zellen/mL	317'667	1'027'944	259'111
Gesamtzellzahl (NAM)	% LNA	29	36	29
Gesamtzellzahl (NAM)	% HNA	71	64	71
Intaktzellzahl (NAM)	Zellen/mL	242'556	662'444	228'389
Intaktzellzahl (NAM)	% HNA	72	82	74
Intaktzellzahl (NAM)	% LNA	28	18	26

WVZ / QBM
Sonja Förster

Zürich, 25. Juni 2024

Prüfbericht: Mikrobiologische Analysen
Legionellen im Verteilnetz (Oberflurhydranten)

Auftrag Nr.:	A-017462	Probeneingang:	13.06.2024
Probenahme durch:	intern	Prüfdatum:	13.06.2024 - 24.06.2024

Probenübersicht

Proben-Nr	Kurzbez.	Probenahmestelle	Probenahme	Zeit
P-174075		OFH 2086	13.06.2024	08:30
P-174076		OFH 5189	13.06.2024	09:15
P-174077		OFH 4402	13.06.2024	09:45

Bemerkungen

P-174075	Bakterienrasen aus <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , keine Einzelkolonien auszählbar
P-174076	Bakterienrasen aus <i>Pseudomonas alcaliphila/oleovorans</i>

Kopie: QB, PN, Q

Prüfbericht: Mikrobiologische Analysen Legionellen im Verteilnetz (Oberflurhydranten)

Auftrag Nr.: A-017462
Probenahme durch: intern

Probeneingang: 13.06.2024
Prüfdatum: 13.06.2024 - 24.06.2024

Legende:

nn : nicht nachgewiesen/nicht nachweisbar
na : nicht auswertbar
kA : keine Angabe
AMK : Aerobe mesophile Keime
KbE : Koloniebildende Einheiten
MPN : most probable number
LNA : low nucleic acid
HNA : high nucleic acid
GU : Genomic Units
NAM : nicht akkreditierte Methode

Angewandte Verfahren

Methode	Messprinzip	WVZ-Prüfvorschrift
Temperaturmessung	Temperaturmessung	PV-09-02-315
Bestimmung der Keimzahl mit Hefeextrakt-Agar	Inkubation	PV-09-02-600
Legionella - ISO 11731 (1 Liter; Matrix A; Verfahren 8, 9, 10; Medium A+C)	Inkubation	PV-09-02-635
Bestimmung von <i>P. aeruginosa</i> mit CNA	Inkubation	PV-09-02-638
Gesamtzellzahlbestimmung	Flowcytometrie	PV-09-02-653
Schnelltest <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (IDEXX)	Inkubation	PV-09-02-671
Intaktzellzahlbestimmung	Flowcytometrie	PV-09-02-677

Allgemeine Parameter

Parameter	Einheit	P-174075	P-174076	P-174077
Wassertemperatur	°C	14.8	16.4	16.8

Mikrobiologie

Parameter	Einheit	P-174075	P-174076	P-174077
AMK	KbE/mL	10'200	13'800	2'064
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NAM)	KbE/100 mL	na	nn	28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (NAM)	MPN/100 mL	>2'420	nn	13
<i>Legionella</i> spp.	KbE/1000 mL	<100	<100	<100
Gesamtzellzahl (NAM)	Zellen/mL	278'833	198'639	218'111
Gesamtzellzahl (NAM)	% LNA	39	39	43
Gesamtzellzahl (NAM)	% HNA	61	61	57
Intaktzellzahl (NAM)	Zellen/mL	235'667	173'389	174'333
Intaktzellzahl (NAM)	% HNA	65	60	59
Intaktzellzahl (NAM)	% LNA	35	40	41