

**Zeitschrift:** Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene = Travaux de chimie alimentaire et d'hygiène

**Herausgeber:** Bundesamt für Gesundheit

**Band:** 89 (1998)

**Heft:** 3

  

**Artikel:** Modifikation des EnviroAmp™ Legionella Kits für die Routinediagnostik von Legionella pneumophila in Wasserproben = Modification of the EnviroAmp™ Legionella kit for the routine diagnostic of Legionella pneumophila in water samples

**Autor:** Gautsch, Sylvia / Schnyder, Tina / Krieger, Kathrin

**DOI:** <https://doi.org/10.5169/seals-983149>

### **Nutzungsbedingungen**

Die ETH-Bibliothek ist die Anbieterin der digitalisierten Zeitschriften auf E-Periodica. Sie besitzt keine Urheberrechte an den Zeitschriften und ist nicht verantwortlich für deren Inhalte. Die Rechte liegen in der Regel bei den Herausgebern beziehungsweise den externen Rechteinhabern. Das Veröffentlichen von Bildern in Print- und Online-Publikationen sowie auf Social Media-Kanälen oder Webseiten ist nur mit vorheriger Genehmigung der Rechteinhaber erlaubt. [Mehr erfahren](#)

### **Conditions d'utilisation**

L'ETH Library est le fournisseur des revues numérisées. Elle ne détient aucun droit d'auteur sur les revues et n'est pas responsable de leur contenu. En règle générale, les droits sont détenus par les éditeurs ou les détenteurs de droits externes. La reproduction d'images dans des publications imprimées ou en ligne ainsi que sur des canaux de médias sociaux ou des sites web n'est autorisée qu'avec l'accord préalable des détenteurs des droits. [En savoir plus](#)

### **Terms of use**

The ETH Library is the provider of the digitised journals. It does not own any copyrights to the journals and is not responsible for their content. The rights usually lie with the publishers or the external rights holders. Publishing images in print and online publications, as well as on social media channels or websites, is only permitted with the prior consent of the rights holders. [Find out more](#)

**Download PDF:** 29.01.2026

**ETH-Bibliothek Zürich, E-Periodica, <https://www.e-periodica.ch>**

## Modifikation des EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kits für die Routinediagnostik von *Legionella pneumophila* in Wasserproben

Modification of the EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kit for the Routine Diagnostic of  
*Legionella pneumophila* in Water Samples

*Key words:* *Legionella*, *Legionella pneumophila*, PCR, Water, Aerosol

Sylvia Gautsch, Tina Schnyder, Kathrin Krieger und Roy Ewald  
Kantonales Laboratorium Basel-Stadt, Basel

### Einleitung

Als natürlicher Bestandteil der Mikroflora aquatischer Systeme können Legionellen ubiquitär in verschiedenen natürlichen und künstlichen Gewässern gefunden werden (1–3). Hierzu gehören Grundwasser, Oberflächenwasser, Quellwasser und Regenwasser sowie Wasser aus verschiedenen wasserführenden haustechnischen Anlagen, in welche die Legionellen mit der direkten Wasserzufuhr gelangen. Vor allem Anlagen, in denen die Vermehrung der Legionellen begünstigt wird und bei denen es zu einer Aerosolbildung kommt, stellen eine potentielle Gefahr dar. Diese umfassen insbesondere sanitäre Einrichtungen, Lüftungstechnische Anlagen, Industrieanlagen und Warmsprudelbecken.

Bis heute sind 48 Legionellenarten bekannt, von denen 18, besonders *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) als humanpathogen gelten (4, 5). Nach Infektion, in der Regel durch Inhalation legionellenhaltiger Aerosole, kann es beim Menschen zur sogenannten Legionärskrankheit oder zum Pontiac-Fieber kommen (1, 3, 4). Während erstere durch eine schwerwiegende Pneumonie mit relativ hoher Letalität gekennzeichnet ist, kommt es bei der letzteren, milderer Form der Erkrankung zu grippeähnlichen Symptomen ohne Beteiligung der Lungen. Nach Schätzungen des U.S. Centers for Disease Control sollen 85% aller Legionellen-Pneumonien durch *L. pneumophila* hervorgerufen werden (4, 5).

Für den Nachweis von Legionellen in Wasserproben gilt die Kultur als Methode der Wahl (6, 7). Weder für die Probenahme noch für den Nachweis selbst existiert jedoch ein standardisiertes Vorgehen (8). Es bietet sich der Nachweis über verschie-

dene Selektivmedien nach Aufkonzentrierung der Probe durch Membranfiltration oder Zentrifugation und nachfolgender Hitze- oder Säurebehandlung zum Eliminieren der Begleitflora an (5). Neben den anspruchsvollen Bedingungen, welche die Legionellen an die Kultur stellen, ist der kulturelle Nachweis jedoch noch mit anderen Nachteilen verbunden. So steht die lange Inkubationszeit von bis zu 10 Tagen einer möglichst raschen Identifizierung einer potentiellen Infektionsquelle und dem raschen Ergreifen entsprechender Massnahmen zur Reduktion des Infektionsrisikos entgegen (9). Schneller wachsende Mikroorganismen können Legionellen in ihrem Wachstum signifikant hemmen bzw. überwachsen (6, 7). Weiterhin werden lebende, aber nicht kultivierbare Legionellen, deren Vorkommen mehrfach beschrieben ist, durch den kulturellen Nachweis nicht erfasst, obwohl neuere Untersuchungen darauf hinweisen, dass hohe Konzentrationen an lebenden, nicht kultivierbaren Legionellen auch zu Erkrankungen führen können (6, 7, 10). Daher besteht der Wunsch nach Methoden, mit denen sich sowohl kultivierbare als auch nicht kultivierbare Formen der Legionellen schnell und sicher nachweisen lassen. Eine Möglichkeit hierzu bietet der von der Firma Perkin Elmer kommerziell erhältliche EnviroAmp™ *Legionella* Kit (11). Er ermöglicht den Nachweis von Legionellen in Wasser mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und wurde bereits mehrfach für die Untersuchung von Grundwasser, Oberflächenwasser, Regenwasser, Abwasser und Wasser aus Kühltürmen, Brunnen, Duschen und Warmsprudelbecken eingesetzt (4, 6, 7, 9, 10, 12–14). Der EnviroAmp™ *Legionella* Kit besteht aus drei einzeln erhältlichen Teilen, dem *Legionella* Sample Preparation Kit, dem *Legionella* PCR Amplification Kit und dem *Legionella* PCR Detection Kit. Der Kit erlaubt den Nachweis von 25 verschiedenen Spezies und 15 Serogruppen von Legionellen, wobei *L. pneumophila* als wichtigster klinischer Vertreter spezifisch identifiziert werden kann. Die Nachweisgrenze des Kits liegt bei 10–100 Legionellenzellen im ml Wasser. Der Test ist semiquantitativ und enthält eine interne positive Kontrolle zum Nachweis einer Reaktionshemmung. Nach Filtration der Wasserprobe mit nachfolgender DNA-Extraktion schliesst sich eine multiplex PCR-Reaktion an, bei der mit einem Primersatz für den Nachweis des 5S rRNA-Gens die Gattung *Legionella* und mit einem weiteren Primersatz für den Nachweis des mip-Gens (macrophage infectivity potentiator) spezifisch *L. pneumophila* erfasst werden. Die abschliessende Detektion basiert auf der Dot-Blot-Methodik und erfolgt durch Hybridisierung der entstandenen PCR-Produkte. Sowohl die Probenaufarbeitung als auch die Detektion gestalten sich jedoch relativ zeit-, material- und kostenaufwendig und bedürfen zusätzlicher spezieller Gerätschaften, was für ein kleineres mikrobiologisches Wasserlabor nachteilig sein kann.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, basierend auf dem kommerziell erhältlichen EnviroAmp™ *Legionella* Kit ein schnelles, sensibles, einfaches und möglichst kostengünstiges auf der PCR-Methodik beruhendes Verfahren für den Nachweis von *L. pneumophila* in Wasser zu entwickeln, das im Rahmen der Routinediagnostik eines kleineren mikrobiologischen Wasserlabors eingesetzt werden kann. Zu diesem Zweck wurden nach Modifikation der vom Hersteller für den EnviroAmp™ *Legionella* Kit genannten Anleitung künstlich und natürlich kontaminierte Wasserproben unterschiedlicher Herkunft parallel mit der PCR-Methode und einem



kulturellen Nachweisverfahren auf die Anwesenheit von *L. pneumophila* untersucht und die erhaltenen Ergebnisse statistisch miteinander verglichen.

## Material und Methoden

### *Künstlich kontaminierte Wasserproben*

In einer ersten Phase wurden jeweils frisch aus dem laboreigenen Wasserleitungsnetz gefasste Proben Trinkwasser mit verschiedenen Mengen an *L. pneumophila* Serogruppe 1-Organismen (freundlicherweise von Herrn Frei, Kantonsspital Basel-Stadt, zur Verfügung gestellt) versetzt. Hierzu wurde ausgehend von einer dichten *L. pneumophila*-Suspension in GeneAmp<sup>R</sup> PCR Water (Perkin Elmer N808-0133) eine dezimale Verdünnungsreihe über 9 Verdünnungsstufen angelegt. Je 1 ml der jeweiligen Verdünnung wurde zur Keimzahlbestimmung auf BCYE-Agar (Buffered Charcoal Yeast Extract Agar mit BCYE $\alpha$ -Supplement, Oxoid CM 655, SR 110) ausgespatelt, je 1 ml der 9 verschiedenen Verdünnungsstufen des Testkeimes wurden zu 1000 ml Leitungswasser gegeben und wie nachfolgend beschrieben kulturell und mittels PCR-Methode auf die Anwesenheit von *L. pneumophila* untersucht. Insgesamt wurden drei solcher Verdünnungsreihen ange-setzt, wobei jeweils eine nicht künstlich kontaminierte Probe Leitungswasser als Kontrolle mitgeführt wurde. Über die Zusammensetzung dieser 27 künstlich kontaminierten Wasserproben gibt Tabelle 2 Auskunft.

In einer zweiten Phase gelangten im Rahmen einer Teilnahme an Ringversuchen vom Public Health Laboratory Service External Quality Assessment Scheme für die Isolierung von Legionellen aus Wasser 9 simulierte Wasserproben aus häuslichen Heisswassersystemen zur Untersuchung auf *L. pneumophila*. Je 2 ml der Ringversuchsproben, die eine bestimmte Menge an *L. pneumophila* bzw. *Legionella* spp. sowie zum Teil Begleitflora in Konzentrationen von  $10^5$  KbE/ml enthielten, wurden gemäss Angaben der Ringversuchsorganisatoren zu 1000 ml 0,85% NaCl-Lösung gegeben und wie nachfolgend beschrieben kulturell und mittels PCR-Methode auf die Anwesenheit von *L. pneumophila* untersucht. Die Zusammensetzung dieser 9 Proben ist aus Tabelle 3 ersichtlich.

### *Natürlich kontaminierte Wasserproben*

Insgesamt gelangten 78 Wasserproben zur Untersuchung auf das Vorkommen von *L. pneumophila*. Von diesen Proben stammten 37 aus Altersheimen, 10 aus Krankenhäusern, 7 aus Schulen, 3 aus anderen staatlichen Betrieben, 5 aus Hotels, je 2 aus einem öffentlichen Hallenbad und einem Kongresszentrum, 5 aus dem Kühlturm eines Kernkraftwerkes, 6 aus einem das Kantonsgebiet Basel-Stadt durchquerenden Fluss und eine aus einer Abwasserreinigungsanstalt. Über die Anzahl der verschiedenen Betriebe und die Art und Anzahl der dort erhobenen



Proben gibt Tabelle 1 Auskunft. Die Proben wurden in sterile 1000-ml-Glasflaschen entnommen, ungekühlt innerhalb von 2 Stunden in das Untersuchungslabor gebracht und innerhalb von 2 weiteren Stunden wie nachfolgend beschrieben kulturrell und mittels PCR-Methode auf die Anwesenheit von *L. pneumophila* untersucht. Für die Probenahme aus sanitären Anlagen (Wasserhahn, Dusche) wurden die Proben ohne Vorlauf durch Mischen von Heiss- und Kaltwasser gewonnen.

### *Kulturelle Methode*

Nach Filtration von ca. 1000 ml Probe durch einen Vorfilter (Millipore AP2504700) und einen Polycarbonatmembranfilter mit einer Porengrösse von 0,2 µm (Costar Nuclepore 111206) wurde der Vorfilter verworfen und der Polycarbonatmembranfilter in 10 ml Originalprobe aufgenommen. Es folgte eine Behandlung im Ultraschallbad während 45 s zur Loslösung der am Filter haftenden Bakterien. Nach dieser Aufkonzentrierung wurden die Proben zwecks Abtötung der Begleitflora während 30 min bei 50 °C im Wasserbad erhitzt und danach je 0,1 ml auf BMPA *Legionella*-Selektivagar (Buffered Medium mit Polymyxin B und Anisomycin mit BCYE $\alpha$ -Supplement und BMPA-Selektivsupplement, Oxoid CM 655, SR110, SR 111), MWY *Legionella*-Selektivagar (Medium nach Wadowsky und Yee, modifiziert nach Edelstein mit BCYE $\alpha$ -Supplement und MWY-Selektivsupplement, Oxoid CM 655, SR 110, SR 118) und GVPC *Legionella*-Selektivagar (Selektivmedium mit Glycin, Vancomycin, Polymyxin B und Cycloheximid mit BCYE $\alpha$ -Supplement und GVPC-Selektivsupplement, Oxoid CM 655, SR 110, SR 152) ausgespatelt. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37 °C in mikroaerophiler Atmosphäre (Merck Anaerocult C 1.16275) während 10 Tagen, wobei am 3., 5. und 7. Tag das Wachstum kontrolliert wurde. Beim Vorliegen legionellenverdächtiger Kolonien schloss sich eine Bestätigung von drei Kolonien pro Selektivplatte an. Hierzu wurden diese parallel auf cysteinhaltigen BCYE- und cysteinfreien Blutagar (Bio Mérieux 43041) umgezüchtet und während 3 Tagen bei 37 °C mikroaerophil bebrütet. Isolate, die nicht fähig waren, ohne Cystein zu wachsen, wurden mit Hilfe des *Legionella* Latex Test Kits (Oxoid DR 800M) auf ihre Zugehörigkeit zur Spezies *L. pneumophila* Serogruppe 1, *L. pneumophila* Serogruppe 2–14 bzw. zu *Legionella* spp. getestet.

### *PCR-Methode*

#### *Probenaufarbeitung und DNA-Extraktion*

Für die Probenaufarbeitung kam der EnviroAmp™ Sample Preparation Kit (Perkin Elmer N8080088) mit folgenden Modifikationen zum Einsatz. Anstelle der vom Hersteller angegebenen Filtration der Wasserproben wurden diese wie zuvor beschrieben filtriert, im Ultraschallbad behandelt und erhitzt. Die DNA-Extraktion erfolgte nach der Hitzebehandlung ausgehend von den 10 ml aufkonzentrierte Probe. Entgegen den vom Hersteller in der Anleitung gemachten Angaben wurde nicht der Filter in das Lysis-Reagenz gegeben, sondern zur Gewinnung eines

Tabelle 1. Anzahl, Art und Herkunft der 78 natürlich kontaminierten Wasserproben

Art und Anzahl der Proben	Art und Anzahl der Betriebe									
	Alters-heim	Kranken-haus	Schule	Staatlicher Betrieb	Hotel	Kongress-zentrum	Öffentliches Hallenbad	Kern-kraftwerk	Fluss	Abwasser-reinigungs-anstalt
	10	5	7	3	2	1	1	1	1	1
Leitungswasser aus Dusche	20	5	7	2	2		1			
Leitungswasser von Handwaschgelegenheit	12			1						
Wasser aus Heisswasser-aufbereitungsanlage	5				1					
Badewasser aus Schwimmbecken		5								
Badewasser aus Whirlpool							1			
Wasser aus Klimaanlage					2	2				
Wasser aus Kühlturm								5		
Abwasser										1
Oberflächenwasser									6	



Bakterienpellets in 3 Schritten je 1 ml der aufkonzentrierten Probe in ein steriles Eppendorfröhrchen gegeben und jeweils bei 9000 U/min während 10 min bei 4 °C abzentrifugiert. Nach jedem Zentrifugationsschritt wurde der Überstand jeweils abpipettiert. Das so erhaltene Bakterienpellet wurde mit 500 µl Lysis-Reagenz versetzt und das Röhrchen wie in der Herstelleranleitung beschrieben während 30 s auf einem Vortex geschüttelt und anschliessend während 20 min bei 98 °C in einem Crocodile II Thermocycler (Appligene) erhitzt. Es folgte eine weitere Zentrifugation bei 12500 U/min während 30 s bei 4 °C. Je 400 µl Überstand wurden abpipettiert und mit je 400 µl 100% Isopropanol sowie 10 µl Carrier-Reagenz versetzt. Nach Mischen des Röhrcheninhalts durch mehrmaliges auf den Kopf stellen, wurden diese während 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschliessend erfolgte eine Zentrifugation bei 12500 U/min während 10 min bei 4 °C. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit je 500 µl 75% Isopropanol versetzt und sanft auf einem Vortex geschüttelt. Es folgte eine erneute Zentrifugation bei 12500 U/min während 10 min bei 4 °C mit anschliessendem Verwerfen des Überstandes. Dem Pellet wurden entsprechend den vom Hersteller in der Modifikation A des Probenaufarbeitungsprotokolls gemachten Angaben je 160 µl einer 0,2% bovinen Serumalbuminlösung in GeneAmp<sup>R</sup> PCR Water zugefügt und das Röhrchen auf einem Vortex geschüttelt. Nach Erhitzung der Röhrchen im Wasserbad bei 70 °C während ca. 3 min bis zur vollständigen Lösung des Pellets wurden je 20 µl für die nachfolgende Amplifikation eingesetzt. Zur Kontrolle einer erfolgreichen DNA-Extraktion wurden bei jedem Durchgang eine Positiv- sowie eine Negativkontrolle mitgeführt. Hierzu dienten jeweils eine dichte Suspension von *L. pneumophila* Serogruppe 1 bzw. *E. coli* ATCC 25922 in GeneAmp<sup>R</sup> PCR Water.

### Amplifikation

Für die Amplifikation kam der EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* PCR Amplification Kit (Perkin Elmer N 8080089) zur Anwendung. Hierzu wurden gemäss der für die Amplifikation auf dem Thermal Cycler 480 gültigen Anleitung des Herstellers je 20 µl des DNA-Extraktes der Proben und Kontrollen in ein 0,5-ml-Röhrchen mit je 65 µl EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* PCR Reaction Mix mit AmpErase<sup>TM</sup> UNG und je 2 Tropfen Mineralöl pipettiert. Als positive PCR-Kontrolle dienten 20 µl der im Kit enthaltenen *L. pneumophila* Kontroll-DNA, als negative PCR-Kontrolle 20 µl GeneAmp<sup>R</sup> PCR Water. Nach Zugabe von je 15 µl MgCl<sub>2</sub> 25 mM zu Proben und Kontrollen und kurzem Abzentrifugieren der Röhrchen erfolgte die Amplifikation in einem Crocodile II Thermocycler mit folgendem Programm: 10 min 45 °C, 10 min 95 °C – 30 s 95 °C, 60 s 63 °C mit 40 Zyklen – 7 min 72 °C, 1 min 30 °C.

### Detektion

Der Nachweis der Amplifikationsprodukte erfolgte nicht mit Hilfe des EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* PCR Detection Kits, sondern durch Auftrennung der Amplifikationsprodukte mittels Elektrophorese auf einem 2% Agarosegel (Boehringer Mannheim 1388983) mit 1 µg/ml Ethidiumbromid (Merck 111608) in TBE-Puffer (15). Als DNA-Längenstandard diente eine 100-bp-Leiter (Pharmacia 27-4001-01). Die Banden wurden auf einem Transilluminator sichtbar gemacht und mit einer

Polaroidkamera (Witec AG) fotografiert und ausgewertet. Nach Angaben des Herstellers, der die Gelelektrophorese in seiner Kit-Anleitung als zusätzliche Möglichkeit zur Kontrolle auf das Vorhandensein von Amplifikationsprodukten der richtigen Grösse angibt, galt beim Nachweis einer Bande von 108 bp (5S-rRNA-Gen) die Probe als legionellenhaltig. Wurde zusätzlich eine Bande bei 168 bp (mip-Gen) nachgewiesen, enthielt die Probe *L. pneumophila*. Das PCR-Produkt der internen positiven Kontrolle stellte sich als schwache Bande auf Höhe von 135 bp dar. Liessen sich keine Banden bzw. nur die der internen positiven Kontrolle nachweisen, galt die Probe als frei von Legionellen.

### Statistische Analyse

Für beide Methoden wurden die Sensitivität und Spezifität nach Standardmethoden berechnet. Als Referenz galt bei der Untersuchung künstlich kontaminierter Proben das tatsächliche Vorkommen von *L. pneumophila* in der Probe, bei der Untersuchung natürlich kontaminierter Proben wurde das kulturelle Verfahren als Referenz herangezogen. Der Vergleich der mit beiden Methoden erzielten Positivraten erfolgte mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests von McNemar (16).

### Resultate

Die Ergebnisse des Nachweises von *L. pneumophila* in 36 künstlich kontaminierten Wasserproben mittels Kulturverfahren und PCR-Methode sind in Tabelle 2 und 3 dargestellt. Tabelle 4 zeigt die für beide Methoden berechneten Sensitivitäten und Spezifitäten. Von diesen 36 Proben enthielten 35 *L. pneumophila* in unterschiedlichen Mengen, die verbleibende Probe war mit *L. micdadei* versetzt. In 31 der 35 (88,6%) untersuchten Proben, die *L. pneumophila* enthielten, konnte dieser Keim mit beiden Methoden nachgewiesen werden. In weiteren drei Proben gelang der Nachweis von *L. pneumophila* nur mit Hilfe der PCR-Methode. In einer Probe, die *L. pneumophila* in einer Menge von  $2,5 \times 10^1$  KbE/1000 ml enthielt, blieb der Nachweis mit beiden Methoden negativ. In der einen künstlich kontaminierten Probe, die mit *L. micdadei*, nicht jedoch mit *L. pneumophila* versetzt war, führte die PCR-Methode zu einem positiven Signal für *L. pneumophila*. Damit ergibt sich für die PCR-Methode gesamthaft eine Sensitivität von 97,1%. Das kulturelle Verfahren zeigte gesamthaft eine Sensitivität von 88,6% und eine Spezifität von 100%. Der beim Vergleich der mit beiden Methoden erzielten Positivraten festgestellte Unterschied war statistisch nicht signifikant ( $\chi^2_{1;0,05} = 2,25$ ;  $p > 0,05$ ). In den jeweils beim Ansetzen der Verdünnungsreihen als Kontrollen mitgeführten nicht künstlich kontaminierten Wasserproben liess sich weder kulturell noch mit Hilfe der PCR-Methode *L. pneumophila* nachweisen.

Die Resultate der Untersuchung von 78 natürlich kontaminierten Wasserproben auf *L. pneumophila* mittels Kulturverfahren und PCR-Methode sowie die Ergebnisse der entsprechenden statistischen Analysen sind aus Tabelle 5 ersichtlich. In



Tabelle 2. Ergebnisse der Untersuchung von 27 mit *L. pneumophila* Serogruppe 1 künstlich kontaminierten Wasserproben mittels Kulturverfahren und PCR-Methode

Verdünnungsreihe/-stufe	Verdünnung	Gehalt an <i>L. pneumophila</i> KbE/1000 ml	Kultur (1000 ml)	PCR (1000 ml)
I/0	Originalsuspension	$2,5 \times 10^9$	+ (Serogruppe 1)	+
I/1	1:10	$2,5 \times 10^8$	+ (Serogruppe 1)	+
I/2	1:100	$2,5 \times 10^7$	+ (Serogruppe 1)	+
I/3	1:1000	$2,5 \times 10^6$	+ (Serogruppe 1)	+
I/4	1:10000	$2,5 \times 10^5$	+ (Serogruppe 1)	+
I/5	1:100000	$2,5 \times 10^4$	+ (Serogruppe 1)	+
I/6	1:1000000	$2,5 \times 10^3$	+ (Serogruppe 1)	+
I/7	1:10000000	$2,5 \times 10^2$	+ (Serogruppe 1)	+
I/8	1:100000000	$2,5 \times 10^1$	–	–
II/0	Originalsuspension	$1,2 \times 10^9$	+ (Serogruppe 1)	+
II/1	1:10	$1,2 \times 10^8$	+ (Serogruppe 1)	+
II/2	1:100	$1,2 \times 10^7$	+ (Serogruppe 1)	+
II/3	1:1000	$1,2 \times 10^6$	+ (Serogruppe 1)	+
II/4	1:10000	$1,2 \times 10^5$	+ (Serogruppe 1)	+
II/5	1:100000	$1,2 \times 10^4$	+ (Serogruppe 1)	+
II/6	1:1000000	$1,2 \times 10^3$	+ (Serogruppe 1)	+
II/7	1:10000000	$1,2 \times 10^2$	–	+
II/8	1:100000000	$1,2 \times 10^1$	–	+
III/0	Originalsuspension	$4,4 \times 10^9$	+ (Serogruppe 1)	+
III/1	1:10	$4,4 \times 10^8$	+ (Serogruppe 1)	+
III/2	1:100	$4,4 \times 10^7$	+ (Serogruppe 1)	+
III/3	1:1000	$4,4 \times 10^6$	+ (Serogruppe 1)	+
III/4	1:10000	$4,4 \times 10^5$	+ (Serogruppe 1)	+
III/5	1:100000	$4,4 \times 10^4$	+ (Serogruppe 1)	+
III/6	1:1000000	$4,4 \times 10^3$	+ (Serogruppe 1)	+
III/7	1:10000000	$4,4 \times 10^2$	+ (Serogruppe 1)	+
III/8	1:100000000	$4,4 \times 10^1$	–	+

+ = *L. pneumophila* nachgewiesen

– = *L. pneumophila* nicht nachgewiesen

28 von insgesamt 78 (35,9%) untersuchten Proben wurde *L. pneumophila* kulturell nachgewiesen, während die PCR-Methode bei 42 von 78 (53,8%) Proben zu einem positiven Signal für *L. pneumophila* führte. Dabei liess sich in 27 von 78 (34,6%) analysierten Proben mit beiden Methoden *L. pneumophila* aufzeigen. Weitere 15 Proben (19,2%) zeigten bei der Untersuchung mit Hilfe der PCR-Methode ein positives Signal für *L. pneumophila*, während der kulturelle Nachweis negativ blieb. In einer Wasserprobe, die sich kulturell als *L. pneumophila*-haltig erwies, blieb der Nachweis dieses Keimes mit der PCR-Methode negativ. In 35 der 78 (44,9%) analysierten Proben konnte weder kulturell noch mit Hilfe der PCR-Methode *L. pneumophila* nachgewiesen werden. Damit ergibt sich für die PCR-Me-

Tabelle 3. Ergebnisse der Untersuchung von 9 Ringversuchsproben auf *L. pneumophila* mittels Kulturverfahren und PCR-Methode

Probe	Gehalt an <i>L. pneumophila</i> KbE/1000 ml	Gehalt an Begleitflora (normale aquatische Flora) KbE/1000 ml	Kultur (1000 ml)	PCR (1000 ml)
1	$2,7 \times 10^3$ (Serogruppe 1)	$2 \times 10^5$	+	+
2	$1,1 \times 10^4$ (Serogruppe 1)	$2 \times 10^5$	+	+
3	$6,4 \times 10^3$ (Serogruppe 2-14)	–	+	+
4	$4,7 \times 10^3$ (Serogruppe 6)	$2 \times 10^5$	+	+
5	$2,3 \times 10^3$ (Serogruppe 1)	$2 \times 10^5$	+	+
6	–	$10^4$ ( <i>L. micdadei</i> )	–	+
7	$2,5 \times 10^3$ (Serogruppe 3)	$2 \times 10^5$	+	+
8	$5,2 \times 10^3$ (Serogruppe 3)	$2 \times 10^5$	+	+
9	$5,7 \times 10^3$ (Serogruppe 1)	$2 \times 10^5$	+	+

+ = *L. pneumophila* nachgewiesen

– = *L. pneumophila* nicht nachgewiesen

thode im Vergleich zum Kulturverfahren eine Sensitivität von 96,4% und eine Spezifität von 70%. Der mit Hilfe des  $\chi^2$ -Tests von McNemar festgestellte Unterschied zwischen den mit beiden Methoden erzielten Positivraten war statistisch signifikant ( $\chi^2_{1; 0,05} = 10,56$ ;  $p < 0,05$ ).

## Diskussion

Der kommerziell erhältliche auf der PCR-Methodik basierende EnviroAmp™ *Legionella* Kit wurde für den Nachweis von *L. pneumophila* in Wasserproben modifiziert und anhand der Untersuchung künstlich und natürlich kontaminierter Wasserproben unterschiedlicher Herkunft mit einem kulturellen Nachweisverfahren verglichen. Insgesamt wurden 36 künstlich und 78 natürlich kontaminierte Wasserproben parallel mit Hilfe eines kulturellen Verfahrens und der modifizierten PCR-Methode untersucht. Von 36 künstlich kontaminierten Proben enthielten 35 *L. pneumophila* in unterschiedlichen Mengen, die verbleibende *L. micdadei*. Bei der Untersuchung dieser künstlich kontaminierten Proben zeigte die PCR-Methode eine höhere Sensitivität als das Kulturverfahren. Während erstere nur bei einer



Tabelle 4. Vergleich des *L. pneumophila*-Nachweises mittels Kulturverfahren und PCR-Methode bei 36 künstlich kontaminierten Wasserproben

Art der Proben	Anzahl Proben	Kontamination der Probe mit <i>L. pneumophila</i>	Testergebnis Kultur (1000 ml)		Testergebnis PCR (1000 ml)		Sensitivität % Kultur	Sensitivität % PCR	Spezifität % Kultur	Spezifität % PCR
			+	-	+	-				
Verdünnungsreihen I/0-III/8	27	ja	23	4	26	1	85,2	96,3	-	-
		nein	0	0	0	0				
Ringversuchsproben	9	ja	8	0	8	0	100	100	100	0
		nein	0	1	1	0				
Total	36	ja	31	4	34	1	88,6	97,1	100	0
		nein	0	1	1	0				

+ = *L. pneumophila* nachgewiesen

- = *L. pneumophila* nicht nachgewiesen

Tabelle 5. Vergleich des *L. pneumophila*-Nachweises mittels Kulturverfahren und PCR-Methode bei 78 natürlich kontaminierten Wasserproben

Anzahl Proben	Kultur (1000 ml)	PCR (1000 ml)		Sensitivität %	Spezifität %
		+	-		
78	+	27	1	96,4	70
	-	15	35		

+ = *L. pneumophila* nachgewiesen

- = *L. pneumophila* nicht nachgewiesen

von 35 *L. pneumophila*-haltigen Proben zu einem falsch negativen Ergebnis führte, was einer Sensitivität von 97,1% entsprach, waren kulturell 4 falsch negative Resultate zu verzeichnen. Der Grund hierfür liegt höchstwahrscheinlich darin, dass in den entsprechenden Proben die für einen positiven Nachweis notwendige *L. pneumophila*-Konzentration nicht vorlag. Gelang mit Hilfe der PCR-Methode der Nachweis von *L. pneumophila* in Mengen von  $1,2 \times 10^1$ , in einem anderen Fall von  $4,4 \times 10^1$  KBE/1000 ml, waren für den Nachweis von *L. pneumophila* mittels Kulturverfahren dagegen um eine Zehnerpotenz höher liegende Keimgehalte notwendig. Mit beiden Methoden liessen sich jedoch, auch bei Anwesenheit von Begleitflora in Keimgehalten von  $2 \times 10^5$ /1000 ml, wenige Tausend *L. pneumophila*-Keime in 1000 ml Probe nachweisen. Im Gegensatz hierzu liegt die vom Hersteller für den nicht modifizierten EnviroAmp™ *Legionella* Kit genannte Nachweisgrenze bei  $10^1$ – $10^2$  Legionellenzellen/ml Wasser. Dies entspricht  $10^4$ – $10^5$  *L. pneumophila*-Keimen in 1000 ml Wasser. Während die Spezifität für das kulturelle Verfahren bei 100% lag, führte die PCR-Methode bei einer Probe, die *L. micdadei*, nicht jedoch *L. pneumophila* enthielt, zu einem falsch positiven Ergebnis. Der Grund hierfür bleibt unklar. Anhand der bei der PCR-Methode mitgeführten Kontrollen kann eine generelle Kontamination ausgeschlossen werden. Es ist jedoch bekannt, dass mip-ähnliche Gene bei anderen Vertretern des Genus *Legionella*, unter anderem auch *L. micdadei* vorkommen (17). Das für den spezifischen Nachweis des bei *L. pneumophila* vorkommenden mip-Gens eingesetzte Primerpaar könnte in diesem Fall zur Amplifikation eines ähnlichen Fragmentes bei der *L. micdadei*-enthaltenden Probe geführt haben.

Auch bei der Untersuchung natürlich kontaminierter Wasserproben zeigte sich für die PCR-Methode im Vergleich zum kulturellen Verfahren eine hohe Sensitivität von 96,4%. Eine Probe Flusswasser, in der *L. pneumophila* Serogruppe 1 kulturell nachgewiesen werden konnte, zeigte in der PCR-Methode ein positives Signal für *Legionella* spp., nicht jedoch für *L. pneumophila*. Ähnliche Beobachtungen machten Okpara et al. (6). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die Tatsache, dass das für den Genus *Legionella* spezifische 5S rRNA-Gen, welches in mehrfacher Kopie auf dem Genom vorhanden ist, effizienter amplifiziert wurde als das für *L. pneumophila* spezifische mip-Gen. Im Gegensatz hierzu wies die PCR-Methode im Vergleich zum Kulturverfahren eine relativ geringe Spezifität von 70%



auf. So konnte in 15 natürlich kontaminierten Wasserproben *L. pneumophila* mittels PCR-Methode, nicht jedoch kulturell nachgewiesen werden. Damit lag die Anzahl der mittels PCR-Methode ermittelten *L. pneumophila*-haltigen Proben wesentlich höher als bei dem Kulturverfahren, wobei die mit beiden Methoden erzielten Positivraten statistisch signifikant voneinander abwichen. Der Grund für die ermittelte Abweichung der durch beide Methoden erzielten Resultate ist unklar. Da der wahre Gehalt an *L. pneumophila*-Keimen in natürlich kontaminierten Proben unbekannt bleibt, kann nicht gesagt werden, welche der beiden Methoden die richtigen Resultate liefert. Nachdem jedoch der anhand der Analyse von künstlich kontaminierten Wasserproben festgestellte Unterschied zwischen den mit beiden Methoden erzielten Positivraten statistisch nicht signifikant war, also beide Methoden als gleichwertig anzusehen sind, dürfte der bei der Untersuchung natürlich kontaminierter Proben ermittelte Unterschied entweder auf von der Matrix oder vom Erreger selbst ausgehende Effekte zurückzuführen sein. So ist bekannt, dass in Wasser vorhandene Begleitflora Legionellen in ihrem Wachstum hemmen bzw. überwachsen kann, so dass der kulturelle Nachweis negativ bleibt. Ebenso ist die Kultur nicht in der Lage, tote bzw. lebendige, aber nicht kultivierbare Legionellenzellen, die nach einer Schädigung durch Umwelteinflüsse oder Desinfektionsmassnahmen auftreten können, zu erfassen (4–7, 12). Auch wenn die bei den eigenen Untersuchungen künstlich kontaminierter Wasserproben erzielten Ergebnisse zeigen, dass das Kulturverfahren häufiger zu falsch negativen Resultaten führt als die PCR-Methode und umgekehrt bei letzterer falsch positive Ergebnisse auftreten können, erscheint es eher unwahrscheinlich, dass es sich bei den zuvor genannten 15 Proben insgesamt um falsch positive Resultate handelt. Mindestens bei einem der 4 Betriebe, aus denen die 15 Proben stammten, in denen nur mittels PCR-Methode *L. pneumophila* nachgewiesen werden konnte, handelte es sich um ein Altersheim, bei dem vorausgegangene und nachfolgende kulturelle Untersuchungen die Anwesenheit von *L. pneumophila* Serogruppe 1 im Wasserleitungssystem klar aufzeigten. Eine wahrscheinlichere Erklärung ist, dass bei den mit Hilfe der PCR-Methode durchgeführten Untersuchungen tote bzw. lebensfähige, aber nicht kultivierbare Legionellen erfasst wurden. Ähnliche Beobachtungen machten Okpara et al. (6). Bei der Untersuchung von 74 Wasserproben mit Hilfe des EnviroAmp<sup>TM</sup> Legionella Kits und einem Kulturverfahren erwiesen sich 25 Proben mit der PCR-Methode, nicht jedoch kulturell als legionellenhaltig. In zwei dieser Proben wurde *L. pneumophila* nachgewiesen. Auch Lye et al. (10) konnten in 12 von 21 untersuchten Wasserproben aus Zahnarztpraxen Legionellen mit Hilfe des EnviroAmp<sup>TM</sup> Legionella Kits nachweisen, nicht jedoch kulturell. Dabei handelte es sich in sechs Fällen um *L. pneumophila*. In einer anderen Studie, bei welcher der EnviroAmp<sup>TM</sup> Legionella Kit zur Anwendung kam, erwiesen sich 27% der analysierten Wasserproben in der Untersuchung mittels PCR-Methode als legionellenhaltig, wobei fünf Proben *L. pneumophila* aufwiesen. Der kulturelle Nachweis blieb negativ (9). Bei Untersuchungen im Rahmen der Abklärung eines Ausbruchs von Legionärskrankheit, hervorgerufen durch *L. pneumophila* Serogruppe 1, konnte in 15 von 27 analysierten Wasserproben *L. pneumophila* mit Hilfe des EnviroAmp<sup>TM</sup> Legionella Kits gefunden werden, während dieser Erreger kul-

turell nicht nachweisbar war (13). Auch bei Untersuchungen zu einem Ausbruch von Pontiac-Fieber konnte das ätiologische Agens, *L. pneumophila*, nur mittels des EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kits ermittelt werden, nicht jedoch kulturell (14). Nebst dem Überwachen der Kulturplatten mit in den Proben vorhandener Begleitflora und dem damit verbundenen Unvermögen, Legionellen bzw. *L. pneumophila* kulturell nachzuweisen, geben auch die Autoren der zuvor genannten Studien als Grund für die Diskrepanz zwischen den mittels kultureller Methode und EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kit erzielten Resultaten immer wieder das Vorhandensein toter bzw. lebendiger, aber nicht kultivierbarer Legionellenzellen an. Dies ist insbesondere wichtig, da lebensfähige, aber nicht kultivierbare Legionellenzellen als infektiös beschrieben worden sind (6, 10). Damit erweist sich die Untersuchung von Wasserproben auf *L. pneumophila* nur mittels kulturellem Verfahren, das als Methode der Wahl gilt, als nicht ausreichend zur Feststellung einer Durchseuchung eines wasserführenden Systems.

Abschliessend kann somit gesagt werden, dass sich das durch Modifikation des kommerziell erhältlichen EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kits entwickelte, auf der PCR-Methodik basierende Verfahren für den Nachweis von *L. pneumophila* in Wasserproben bewährt hat. Durch Änderung des ursprünglichen Probenaufarbeitungs- und DNA-Extraktionsprotokolls sowie den Ersatz des *Legionella* PCR Detection Kits durch den einfachen gelelektrophoretischen Nachweis der Amplifikationsprodukte erweist sich die modifizierte PCR-Methode im Vergleich zum EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kit als weniger zeit-, material- und kostenaufwendig. So fällt der Einsatz zusätzlicher für die Filtration der Wasserproben und die Detektion der PCR-Produkte mittels Hybridisierung benötigten speziellen Geräte weg, und durch Verzicht auf den *Legionella* PCR Detection Kit lassen sich etwa die Hälfte der Gesamtkosten des Kits einsparen. Es handelt sich um eine schnelle und sensitive Nachweismethode, die zwar eine molekularbiologische Grundausrüstung und gut geschultes Laborpersonal verlangt, jedoch nach Etablierung einfach durchzuführen ist. Damit eignet sich diese PCR-Methode auch für den Einsatz in der Routinediagnostik eines kleineren mikrobiologischen Wasserlabors. Gegenüber dem kulturellen Verfahren, das für den Nachweis von *L. pneumophila* als Methode der Wahl gilt, zeigt die PCR-Methode den Vorteil, dass die Resultate schon am Tag des Probenansatzes vorliegen, so dass potentielle Infektionsquellen rasch identifiziert und Massnahmen zur Verminderung des Infektionsrisikos und zur Dekontamination eines mit *L. pneumophila* verseuchten Systems rechtzeitig ergriffen werden können. Mit seiner hohen Sensitivität eignet sich das basierend auf dem EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kit entwickelte PCR-Verfahren als Screening-Methode zur Untersuchung grosser Probenzahlen auf oder zur schnellen Feststellung des Durchseuchungsgrades wasserführender Anlagen mit *L. pneumophila*. In Anlagen, in welchen dieser Erreger isoliert werden konnten, können danach gezielt weitere Proben erhoben und der Untersuchung auf *L. pneumophila* mittels kulturellem Verfahren zugeführt werden. Hierdurch wird nicht nur eine Quantifizierung der Resultate, sondern auch die Serotypisierung der nachgewiesenen *L. pneumophila*-Keime möglich, was bei epidemiologischen Fragestellungen von Interesse sein kann.



## Zusammenfassung

Der kommerziell erhältliche auf der PCR-Methodik basierende EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kit wurde für den Nachweis von *L. pneumophila* in Wasserproben modifiziert und anhand der Untersuchung von 36 künstlich und 78 natürlich kontaminierten Wasserproben unterschiedlicher Herkunft mit einem kulturellen Nachweisverfahren verglichen. Bei der Untersuchung der künstlich kontaminierten Proben führte die PCR-Methode zu einem falsch negativen und einem falsch positiven Ergebnis, das kulturelle Verfahren zu 4 falsch negativen Ergebnissen. Bei der Untersuchung natürlich kontaminierter Wasserproben ergab sich für die PCR-Methode im Vergleich zum kulturellen Verfahren eine Sensitivität von 96,4% und eine Spezifität von 70%. Die Abweichung der mit beiden Methoden erzielten Positivraten erwies sich als statistisch signifikant. Die modifizierte PCR-Methode erwies sich im Vergleich zum EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kit als weniger zeit-, material- und kostenaufwendig und hat sich für den Einsatz in der Routinediagnostik eines kleineren mikrobiologischen Wasserlabors bewährt. Mit ihrer hohen Sensitivität eignet sich das modifizierte PCR-Verfahren als Screening-Methode zur Untersuchung grosser Probenzahlen auf oder zur schnellen Feststellung des Durchseuchungsgrades wasserführender Anlagen mit *L. pneumophila*.

## Résumé

Le EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kit, un test commercialisé basé sur la méthodologie PCR, a été modifié pour la détection de *L. pneumophila* dans des échantillons d'eau. A cet effet, la présence de *L. pneumophila* a été recherchée par la méthode PCR modifiée dans 36 échantillons d'eau artificiellement contaminés et dans 78 échantillons d'eau de provenances diverses naturellement contaminés. Les résultats ont été comparés à ceux obtenus par une méthode de culture. Lors de l'analyse des échantillons artificiellement contaminés, la méthode PCR modifiée a donné un résultat faussement négatif et un résultat faussement positif. Avec la méthode de culture, 4 résultats faussement négatifs ont été observés. Lors de l'analyse des échantillons naturellement contaminés, la méthode PCR modifiée a montré une sensibilité de 96,4% et une spécificité de 70%. La différence entre les résultats obtenus avec les deux méthodes était statistiquement significative. La méthode PCR modifiée est plus rapide, moins coûteuse et nécessite moins de matériel que le EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kit. Elle peut être utilisée pour le diagnostic de routine dans un petit laboratoire microbiologique pratiquant des analyses d'eau. Avec sa sensibilité élevée elle se prête comme méthode de «screening» à l'analyse d'un grand nombre d'échantillons aussi bien qu'à la détection rapide d'une contamination d'un système d'eau avec *L. pneumophila*.

## Summary

The commercial EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kit, which is based on the PCR methodology, was modified for the detection of *L. pneumophila* in water samples. In total 36 artificially contaminated water samples and 78 naturally contaminated water samples from different origins were analysed for the presence of *L. pneumophila* comparing the modified PCR method with a culture method. With the analysis of the artificially contaminated samples, the modified PCR method showed one false negative and one false positive result, whereas the culture method showed four false negative results. With the analysis of the naturally con-

taminated samples, the sensitivity of the modified PCR method was 96,4%, the specificity 70%. Statistical analysis showed that the results obtained from both methods differed significantly from each other. The modified PCR method was less time consuming, less expensive and necessitated less material than the EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kit. Therefore it is suitable for the routine water analysis in a small microbiological laboratory. With its high sensitivity, the modified PCR method can be used as a screening test for the analysis of a large number of samples or for the rapid detection of the contamination of water systems with *L. pneumophila*.

### Literatur

1. Legionellen – Ein hygienetechnisches Problem. Bericht der Arbeitsgruppe eingesetzt vom Bundesamt für Gesundheitswesen (1994).
2. Seidel, K., Börnert, W., Bätz, G., Blankenberg, A. und Alexander, I.: Vorkommen von *Legionella pneumophila* in Grundwasser sowie kalten und warmen Trinkwässern. Vom Wasser 67, 39–48 (1986).
3. Seidel, K.: Massnahmen zur Verhütung und Bekämpfung von Legionellosen. Bundesgesundhbl. 2, 59–63 (1990).
4. Roll, B. M. and Fujioka, R. S.: Detection of *Legionella* bacteria in sewage by polymerase chain reaction and standard culture method. Wat. Sci. Tech. 31, 409–416 (1995).
5. Paszko-Kolva, C., Thio, C., Yamashiro, C. T. and Danielson, R.: Advantages of the polymerase chain reaction for the rapid detection of *Legionella* species during outbreak investigations. Microbiology Europe 3, 16–21 (1995).
6. Okpara, J., Maiwald, M., Borneff, M., Windeler, J. and Sonntag, H.-G.: Evaluation of a new version of the EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kit for the detection of *Legionellae* in water samples by the polymerase chain reaction. Zbl. Hyg. 198, 502–513 (1996).
7. Ng, D. L. K., Koh, B. B., Tay, L. and Heng, B. H.: Comparison of polymerase chain reaction and conventional culture for the detection of *Legionellae* in cooling tower waters in Singapore. Letters Appl. Microbiol. 24, 214–216 (1997).
8. Ta, A. C., Stout, J. E., Yu, V. L. and Wagener, M. M.: Comparison of culture methods for monitoring *Legionella* species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods. J. Clin. Microbiol. 33, 2118–2123 (1995).
9. Fricker, E. J. and Fricker, C. R.: Detection of *Legionella* spp. using a commercially available polymerase chain reaction test. Wat. Sci. Tech. 31, 407–408 (1995).
10. Lye, D., Fout, G. S., Crout, S. R., Danielson, R., Thio, C. L. and Paszko-Kolva, C. M.: Survey of ground, surface and potable waters for the presence of *Legionella* species by EnviroAmp<sup>TM</sup> PCR *Legionella* Kit, culture and immunofluorescent staining. Wat. Res. 31, 287–293 (1997).
11. «EnviroAmp<sup>TM</sup> *Legionella* Kit», Perkin Elmer International, Grundstrasse 10, CH-6343 Rotkreuz.
12. Frahm, E. and Obst, U.: Comparison of two rapid tests for the detection of *Legionellaceae* in water: a microbiological-immunological method and a commercial gene-probe testkit. Wat. Sci. Tech. 31, 403–406 (1995).
13. Jernigan, D. B., Hofmann, J., Cetron, M. S., Genese, C. A., Nuorti, J. P., Fields, B. S., Benson, R. F., Carter, R. J., Edelstein, P. H., Guerrero, I. C., Paul, S. M., Lipman, H. B. and Breiman, R. F.: Outbreak of Legionnaires disease among cruise ship passengers exposed to a contaminated whirlpool spa. The Lancet, 347, 494–499 (1996).



14. Palmer, C. J., Bonilla, G. F., Roll, B., Paszko-Kolva, C., Sangermano, L. R. and Fujioka, R. S.: Detection of *Legionella* species in reclaimed water and air with the EnviroAmp™ *Legionella* PCR Kit and direct fluorescent antibody staining. Appl. Environm. Microbiol. **61**, 407–412 (1995).
15. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T.: Molecular cloning: a laboratory manual, second edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York 1989.
16. Eckner, K. F., Mciver, D., Lepper, W. A., Fanning, L., Curiale, M. S., Flowers, R. S. and Robison, B.: Use of an elevated temperature and novobiocin in a modified enzyme-linked immunosorbant assay for the improved recovery of *Salmonella* from foods. J. Food Prot. **55**, 758–762 (1992).
17. Cianciotto, N. P., Bangsberg, J. M., Eisenstein, B. I. and Engleberg, N. C.: Identification of miplike genes in the genus *Legionella*. Infect. Immun. **58**, 2912–2918 (1990).

Dr. Sylvia Gautsch  
Kantonales Laboratorium Basel-Stadt  
Postfach  
CH-4012 Basel