

Dr. Hans-Anton KESERUE; Dr. David BERTSCH; Dr. Daniel SCHAFFHAUSER

Detektion von Legionellen in nur einer Stunde

Mittels der Durchflusszytometrie können sämtliche potenziell infektiösen Legionellen in Wasserproben schnell und genau erfasst werden.

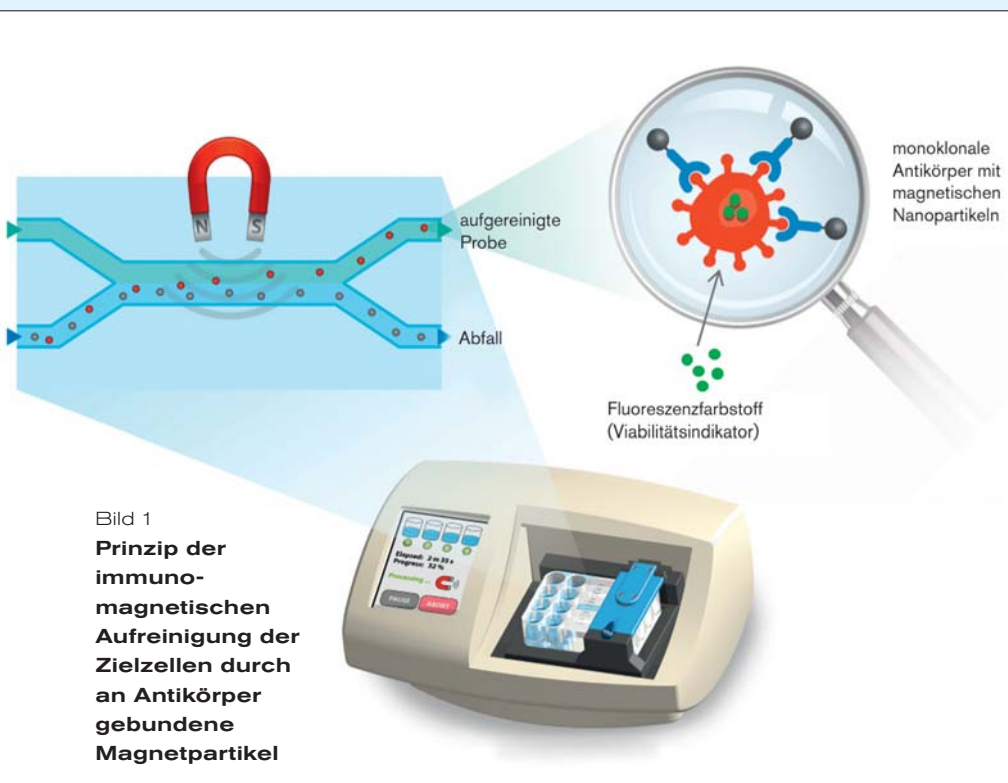


Bild 1
Prinzip der immuno-magnetischen Aufreinigung der Zielzellen durch an Antikörper gebundene Magnetpartikel

Die Standardmethoden zur Legionellenbestimmung basieren auf dem Kultivieren der Organismen auf Agarplatten. Mit durchflusszytometrischen Methoden ist dieser Schritt nicht notwendig und Krankheitserreger können damit schneller und genauer quantifiziert werden. Das Schweizer Jungunternehmen rqmicro GmbH berichtet über die neusten Entwicklungen.

Legionellen

Die Legionellenbakterien wurden erst 1976 in einem Hotel in den Vereinigten Staaten entdeckt. Zu diesem Zeitpunkt fand dort der Kongress der Amerikanischen Legion statt, ein Veteranenverein, dessen Teilnehmer zahlreich an einer unbekanntem Lungenentzündung erkrankten. Im Laufe der Untersuchungen wurde ein Bakterium als Auslöser dieser „Legionärskrankheit“ entdeckt und Legionella benannt /1/. Die Legionellen sind im Gegensatz zu anderen Bakterien vergleichsweise hitzeresistent

und vermehren sich bevorzugt bei Temperaturen von 25 bis 45 °C. Es scheint, dass vor allem die Etablierung von Warmwassersystemen, Raumklimaanlagen, Whirlpools usw. Legionellen die ökologische Nische geschaffen hat, in der sie zu einer ernststen Gesundheitsgefährdung werden konnten.

Die Infektion erfolgt über Aerosole, z. B. beim Duschen. Man schätzt, dass in Europa jährlich 10.000 Fälle der lebensbedrohlichen Legionärspneumonie auftreten /2, 3/. Neben Krankenhäusern und Hotels sind Wohnhäuser bedeutende Infektionsorte. In den letzten Jahren ist in Deutschland eine Reihe von Fällen bekannt geworden, bei denen neuerrichtete Hausinstallationen mikrobiell kontaminiert waren und sich als schwer sanierbar erwiesen /4, 5/.

Ausbrüche

Jedes Jahr kommt es zu zahlreichen Ausbrüchen durch Klimaanlagen, Kühltürme oder Trinkwassersysteme /6/. Der bisher größte

Ausbruch von Legionellen in Deutschland ereignete sich 2013 in Warstein. Die Untersuchungen ergaben, dass eine Kläranlage im Belebtecken hohe Legionellenkontaminationen aufwies und die Keime über einen Fluss zu industriellen Rückkühlanlagen gelangten. Von dort wurden die Legionellen dann über Aerosole in die Umwelt verteilt und es kam zu 165 Erkrankungen /7/. Die oft lange Dauer bis zur Aufklärung von Ausbrüchen liegt auch an der langwierigen Analytik.

Heutige kultivationsabhängige Verfahren

Die etablierte Standardmethode zur Legionellendetektion, ISO 11731 /8/, basiert auf dem Plattierungsverfahren, das zu sehr variablen Ergebnissen führt und 10 bis 13 Tage dauert /9 bis 11/. Ein ausgedehnter Ringversuch zwischen verschiedenen Laboratorien in den USA hat gezeigt, dass mit Plattierungsmethoden die Legionellenkonzentration dramatisch unterschätzt werden kann /12/. Zudem kommt es vor, dass Zellen zwar leben aber auf dem Agarmedium nicht wachsen (VBNC- Zellen, siehe S. 9).

Das hat zur Folge, dass ein Großteil der Legionellen nicht erkannt und die Quantifizierung damit unzuverlässig wird. Die VBNC-Zellen kommen gerade nach Stagnation und chemischer oder thermischer Desinfektion vermehrt vor und führen dazu, dass die mikrobiologischen Resultate zur Prüfung der Effizienz von Hygienisierungsmaßnahmen nur sehr schwer zu interpretieren sind /13 bis 15/. Das ist eine wichtige Erkenntnis, denn die große Mehrheit aller Informationen über die Verbreitung und das Verhalten von Krankheitserregern in Wassersystemen wurde mit eben diesen konventionellen, kultivationsabhängigen Verfahren erarbeitet. Dies bedeutet nach neuestem Wissensstand, dass die Genauigkeit und Verlässlichkeit der Daten weder zufriedenstellend, noch ausreichend für die Bewertung der Trinkwasserhygiene ist. Dadurch ist es nicht verwunderlich, dass oft sehr hohe Legionellenkontaminationen schon Wochen nach erfolgten Maßnahmen wieder gemessen werden können /5, 16/.

Neue durchflusszytometrische Schnelldetektion

Mittels der Durchflusszytometrie kann die Gesamtzahl an Zellen in einer Wasserprobe bestimmt werden. Die Firma qmicro, ein Spin-Off der ETH Zürich, hat sich zum Ziel gesetzt, diese Methode zur Erkennung von Krankheitserregern zu etablieren. Dank einer ausgeklügelten Probenaufbereitung sind die Wissenschaftler in der Lage, Legionellen in Wasserproben zu detektieren und zu quantifizieren.

Die Methode basiert auf der immunomagnetischen Anreicherung der Zellen mit Hilfe magnetischer Nanopartikel und anschließender durchflusszytometrischer Detektion, dauert lediglich 1 Stunde und erfasst, im Gegensatz zu den etablierten Verfahren, sämtliche potenziell infektiösen Legionellen.

Die magnetischen Nanopartikel verbinden sich mit Hilfe eigens hergestellter Antikörper mit der Oberfläche der Legionellen. Durch ein Magnetfeld können sie aus der Masse der sich im Wasser befindlichen Begleitflora und Schmutzpartikel „herausgefischt“ werden (Bild 1). Die Notwendigkeit dafür wird schnell klar wenn man sich vor Augen führt, dass sich in einem Liter Wasser ca. 100 Mio. Zellen befinden und man z. B. lediglich 100 vorhandene Legionellen finden möchte. In diesem Beispiel entspricht die Legionellenkonzentration 0.0001 % – die sprichwörtliche Nadel im Heuhaufen dürfte in einer vergleichbaren Häufigkeit vorkommen.

Gleichzeitig zur immunomagnetischen Aufreinigung sorgen die an Antikörper gebundenen fluoreszenten Farbstoffe dafür, dass die Zielzellen über Fluoreszenzemission erkannt werden können. Dieser Vorgang passiert in einem Durchflusszytometer. Insgesamt liegt der Zeitaufwand für eine komplette Legionellenbestimmung bei ca. 1 Stunde.

Antikörper und alternative Bindungsmoleküle

Auch wenn Antikörper zur selektiven Bindung von Zellen traditionell am häufigsten verwendet werden, so haben sie durchaus Nachteile. Die Herstellung ist relativ aufwendig und erfordert die Immunisierung von Tieren, die Haltbarkeit von Antikörpern ist eingeschränkt und die Bindungseffizienz kann bei polyklonalen Antikörpern von Charge zu Charge schwanken. In manchen Fällen können andere Bindungsmoleküle, wie zum Beispiel Lektine oder Aptamere geeignete Alternativen darstellen. Lektine sind in der Natur weitverbreitete Proteine, die sich spezifisch an Zuckerstrukturen auf der Oberfläche von Mikroben binden können. Aptamere haben dieselbe Funktion, bestehen hingegen oft aus einzelsträngigen DNA-Sequenzen. Der Vorteil bei der Selektion

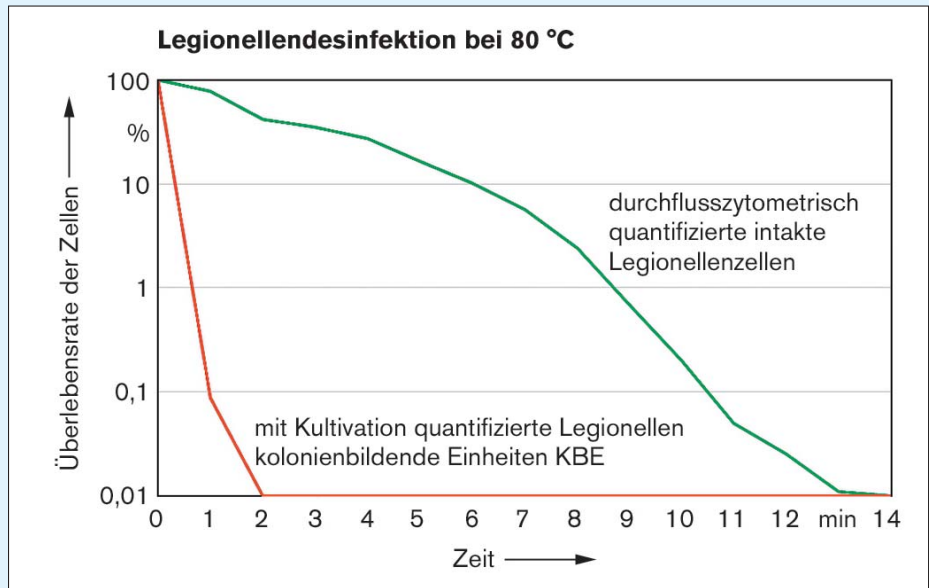


Bild 2 Desinfektion von Legionellen bei 80 °C. Die rote Linie stellt die Ergebnisse der Plattierung und die grüne Linie diejenigen der Durchflusszytometrie dar. Nach 2 Minuten Hitzebehandlung können bei der kultivationsabhängigen Methode keine Legionellen mehr nachgewiesen werden. Die durchflusszytometrische Methode zeigt allerdings noch bis zur 13. Minute Zellen mit intakter Membran an. Mit Hilfe von Amöbeninfektionstests kann gezeigt werden, dass diese Zellen auch wirklich lebendig sind.

tion dieser Moleküle ist, dass keine Tiere zum Einsatz kommen müssen und dass nach Identifizierung von geeigneten Molekülen eine kostengünstige Herstellung möglich ist. Um möglichst optimale und kosteneffiziente Tests anbieten zu können, arbeitet qmicro je nach Organismus mit den geeignetsten Technologien und verlässt sich nicht nur auf Antikörper.

Viable, but nonculturable (VBNC)

Zusätzlich zu der genaueren Bewertung und der schnelleren Quantifizierung spricht für die Nutzung von durchflusszytometrischen

Methoden, dass diese den physiologischen Zustand von Zellen anzeigen, also z. B. membrangeschädigte, und damit tote Zellen, von lebendigen unterscheiden können. Weiterhin werden bei den durchflusszytometrischen Methoden alle Zellen, also auch die viable, but nonculturable – VBNC, quantifiziert.

Erste Ergebnisse von Desinfektionsstudien im Labor deuten darauf hin, dass Legionel-

Bild 3

Prototyp einer aIMS-Kartusche für vier gleichzeitige und unabhängige Legionellentests



LITERATUR

/1/ Brenner, D.J., Steigerwalt AG, McDade JE (1979): Classification of the Legionnaires' disease bacterium: Legionella pneumophila, genus novum, species Nova, of the family Legionellaceae, familia nova. Ann Intern Med 90, S. 656-658

/2/ ECDC (2012) Legionnaires' disease in Europe, 2010: European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm

/3/ EWGLI (2012) The European Working Group for Legionella Infections. In: The European Working Group for Legionella Infections. <http://www.ewgli.org/>. Accessed 16 Aug 2013

/4/ Kistemann, T. (2004): Hygienisch-mikrobiologische Risiken von Großgebäude-Wasserinstallationen. Bonn, Germany

/5/ Völker S.; Schreiber C.; Kistemann, T. (2010): Drinking water quality in household supply infrastructure – A survey of the current situation in Germany. International Journal of Hygiene and Environmental Health 213, S. 204-209

/6/ (2014) List of Legionnaires' disease outbreaks. Wikipedia

/7/ (2014) Legionellose-Ausbruch in Warstein 2013. Wikipedia

/8/ ISO (2004) ISO 11731. Water quality – detection and enumeration of Legionella. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland

/9/ Boulanger CA, Edelstein PH (1995) Precision and accuracy of recovery of Legionella pneumophila from seeded tap water by filtration and centrifugation. Appl Environ Microbiol 61, S. 1805-1809

/10/ Bentham, R.H. (2000): Routine sampling and the control of Legionella spp. in cooling tower water systems. Curr Microbiol 41, S. 271-275

/11/ Napoli, C.; Iatta, R.; Fasano, F.; et al. (2009): Variable bacterial load of Legionella spp. in a hospital water system. Sci Total Environ 408, S. 242-44

/12/ Lucas, C.E.; Taylor, T.H. Jr; Fields, B.S. (2011): Accuracy and precision of Legionella isolation by US laboratories in the ELITE program pilot study. Water Res 45, 4428-4436

/13/ Allegra, S.; Grattard, F.; Girardot, F.; et al. (2011): Longitudinal evaluation of the efficacy of heat treatment procedures against Legionella spp. in hospital water systems by using a flow cytometric assay. Appl Environ Microbiol 77, 1268-1275

/14/ Allegra, S.; Berger, F.; Berthelot, P.; et al. (2008): Use of flow cytometry to monitor Legionella viability. Appl Environ Microbiol 74, S. 7813-7816

/15/ Oliver, J.D. (2010): Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. FEMS Microbiol Rev 34, S. 415-425

/16/ Bendinger, B.; Benölken, J. (2010): Praxisnahe Untersuchungen zur Kontamination von Trinkwasser in halbertechnischen Trinkwasser-Installationen

/17/ Keserue, H.-A.; Egli, T. (2012): Durchflusszytometrie: Nachweis von Krankheitserregern. Aqua & Gas 92, S. 34-38

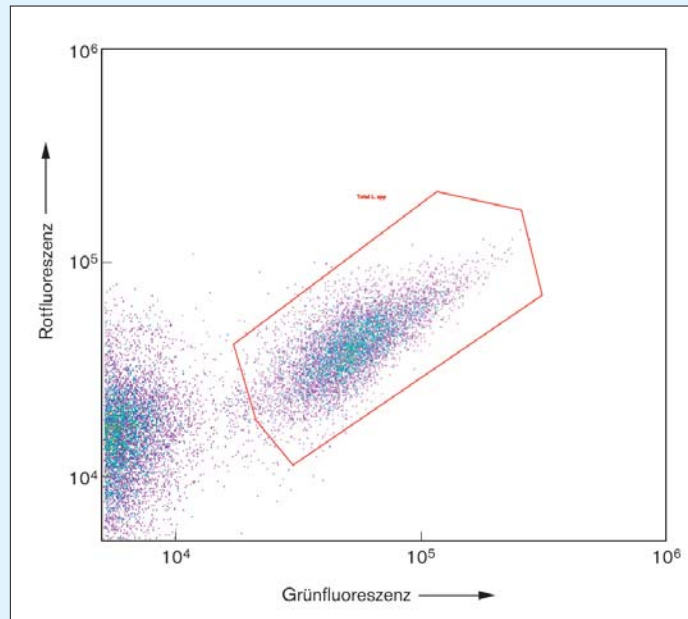


Bild 4
Durchflusszytometrischer Dot-Plot von Grün- gegen Rotfluoreszenzsignalen einer mit Legionellen angeimpften Wasserprobe. Innerhalb der roten Region kann man die Legionellenpopulation sehen und automatisch zählen.

len nicht so schnell absterben, wie durch Plattierungsexperimente angenommen (Bild 2, /17/). Es scheint auch, dass solche VBNC-Zellen über Co-Kultivierung mit Amöben wieder plattierbar werden und somit sehr wohl lebensfähig sind und infektiös sein könnten /14/. Das führte dazu, dass mit dieser Methode bereits in verschiedenen bewohnten Objekten nicht-plattierbare, aber infektiöse Keime quantifiziert wurden. In zwei Fällen war unsere Methode die einzige, die nach Erkrankungsfällen die Quelle der Infektion aufzeigen konnte.

Die Möglichkeit, nicht nur die Gegenwart, sondern auch die physiologischen Zustände von Zellen zu beurteilen, ist von besonders großem Nutzen bei Desinfektionsmaßnahmen. Dadurch schaffen diese neuen Methoden die Basis dazu, die heutigen Desinfektions- und Sanierungsmaßnahmen, die leider nicht immer zu einer nachhaltigen Problemlösung führen /5, 16/, neu zu bewerten und verbesserte Verfahren anzubieten. Weiterhin werden sie es ermöglichen, Produkteigenschaften in der Gebäudetechnik zu optimieren und geeignete Probeentnahmestellen in den Hausinstallationen an kritischen Stellen zu installieren.

Forschungsprojekt mit Georg Fischer

Genau um diese Wissenslücke zu schließen arbeiten die ETH Zürich, die rmicro GmbH und die Georg Fischer JRG AG im Rahmen eines Projektes an der Entwicklung und Validierung neuer und nachhaltiger Desinfektions- und Sanierungsstrategien. Dafür werden Hausinstallations-Modelle mit Krankheitserregern wie zum Beispiel Legionellen kontaminiert und wieder gezielt desinfiziert, bei genauer Überwachung der Nachhaltigkeit der Maßnahmen. Gerade die absolut quantitativen Daten und die kurze Analysezeit der Durchflusszytometrie er-

möglichen eine sehr rasche und effiziente Durchführung solcher Forschungsvorhaben. Hierbei geht es nicht nur um die Legionellen, die frei im Wassersystem schwimmen, sondern vor allem auch um deren Vorkommen in Biofilmen. Laut Untersuchungen befindet sich der Großteil an Bakterien in solchen Gebilden, die nicht nur für eine längere Verweildauer in den Leitungssystemen sorgen, sondern z. B. auch Schutz vor Desinfektionsmitteln bieten. Da es bekannt ist, dass lösliche Bestandteile aus Wasserrohren als Nährstoffquelle für Mikroorganismen dienen können, ist es wichtig, diese unterschiedlichen Materialien in Bezug auf die Biofilmbildung zu vergleichen und zu bewerten.

Automatisierung mit Hilfe von „Lab-on-a-Chip“

Die durchflusszytometrische Bestimmung der Gesamtzahl aller Zellen (Gesamtzellzahl) in einer Wasserprobe wurde 2013 in das Schweizerische Lebensmittelbuch aufgenommen. Im Rahmen von Ringversuchen hat sich dabei gezeigt, dass die Etablierung der Methode und Instrumente ein entsprechendes Training der Mitarbeiter notwendig macht. Auch die Auswertung kann für Anfänger eine erhebliche Herausforderung darstellen. Bei der Messung von Krankheitserregern werden diese Herausforderungen natürlich nicht kleiner, vor allem da die Probenvorbereitung wesentlich anspruchsvoller ist, wenn ganz spezifisch einzelne pathogene Organismen quantifiziert werden sollen. Aus diesem Grund arbeitet man an der Entwicklung eines Geräts, das viele dieser Schritte vereinfachen wird. Durch die Verwendung von mikrofluidischen Kartuschen (Bild 3) werden Anwendungsfehler dramatisch reduziert und die Laborarbeitszeit gesenkt. Zudem ermöglicht das mikrofluidische Verfahren eine so hohe Probenaufrei-

nigung, dass die ansonsten störenden Hintergrundsignale vernachlässigbar werden. Das elektronische Gating – die Definition der Zielregion in einem Fluoreszenz-dotplot (Bild 4) – wird dann an einem konventionellen Durchflusszytometer zum Kinderspiel. Außerdem ermöglicht die Kartusche eine Parallelisierung, so dass aktuell vier Proben gleichzeitig verarbeitet werden können.

Arbeitsablauf der automatischen Immunomagnetischen Separation (aiMS)

Die Arbeitsabläufe mit dem Gerät sind wie folgt: Nach Filtration einer Wasserprobe von bis zu einem Liter, werden die Zellen von der Filteroberfläche abgelöst und in eine Pufferlösung aufgenommen. In dieses folglich sehr viel kleinere Volumen werden nun die Antikörper mit Fluorophoren und Magnetpartikeln hinzugegeben. Nach Abschluss der Inkubation werden die Proben in die mikrofluidische Kartusche pipettiert und automatisch aufgereinigt. Im Anschluss kann die gereinigte Probe mit den gefärbten Zielorganismen in einem Durchflusszytometer gezählt werden. Der Vorgang ist in Bild 5 veranschaulicht.

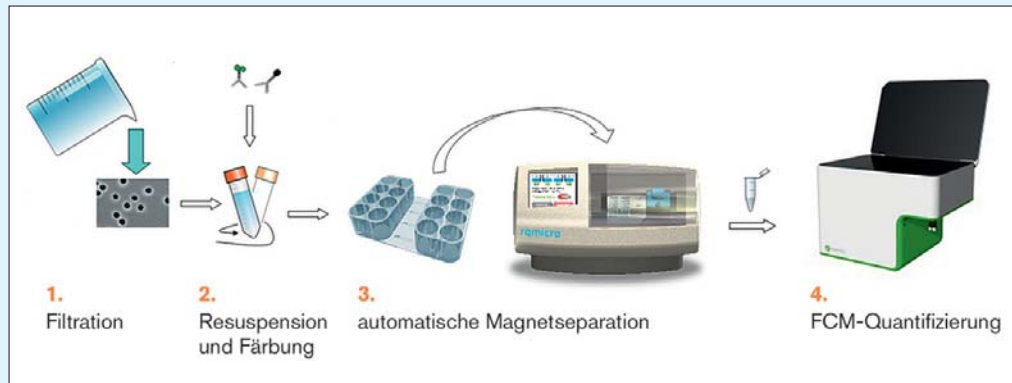


Bild 5 Schematischer Arbeitsablauf der neuen Legionellendetektion:

1. Filtration der Wasserprobe; 2. Resuspension des Filters in Pufferlösung; 3. Inkubation mit Antikörpern und Separation der Zielorganismen auf der Kartusche; 4. Messung an einem konventionellen Durchflusszytometer. Der ganze Ablauf dauert ca. 1 Stunde.

Ausblick

Im Moment wird die Methode ausschließlich als Dienstleistung angeboten (Kontakt). Ab Herbst 2014 plant das Unternehmen die Durchführung von Ringversuchen mit verschiedenen Laboratorien aus dem In- und Ausland und anschließender Zertifizierung der Methode und des Geräts. Des Weiteren soll die Methode auf *Pseudomonas aeruginosa* und wichtige Lebensmittelpathogene ausgebaut werden.

KONTAKT

rqmicro GmbH
 Dr. Hans-Anton Keserue
 c/o ETH Zürich, ieLab, HPL D 16.2
 Schafmattstraße 22
 8093 Zürich
 Tel.: +41 44 520 54 33
 E-Mail: keserue@rqmicro.ch
 www.rqmicro.ch