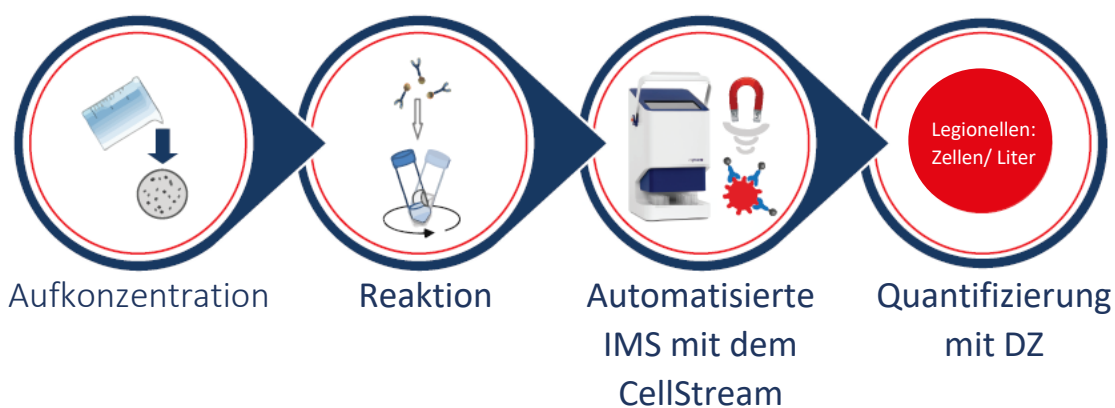


- Isolieren und quantifizieren von Legionellen aus wässrigen Proben in weniger als zwei Stunden mit der rqmicro-Methode
- Identifizieren der Lebendzellpopulation

## Automatisierte IMS kombiniert mit Durchflusszytometrie

Das CellStream-Instrument von rqmicro ermöglicht eine vollautomatisierte IMS, welche aufgereinigte und aufkonzentrierte Proben für die Analyse mit einem Standard-Durchflusszytometer (DZ) liefert (Abbildung 1). In Kombination mit den rqmicro *Legionella* Kits bietet der CellStream eine optimale Komplettlösung für die schnelle Probenvorbereitung. Die Zielzellen werden aus wässrigen Proben unterschiedlicher Matrices mittels Antikörperbeschichteter Magnetpartikel isoliert. Die Bakterien werden ausserdem mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt und anschließend mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Darüber hinaus kann mit Hilfe des Viabilitäts-Farbstoffs zwischen lebenden und toten Zellen unterschieden werden. Leistungstests zeigen eine Wiederfindungsrate von > 80% über einen breiten Anwendungsbereich. Resultate werden in unter zwei Stunden statt in bis zu 14 Tagen ermittelt mit einer 10 - 40 mal höheren Sensitivität im Vergleich zur ISO 11731-Methode. Das untere Detektionslimit liegt bei 20 - 50 Zellen pro Liter, abhängig von der Komplexität der Probenmatrix und dem Durchflusszytometer.



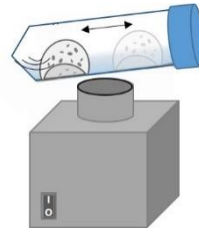
**Abbildung 1:** Quantitative Resultate in unter zwei Stunden von der Filtration bis zur Analyse mit dem Durchflusszytometer.

## Protokoll

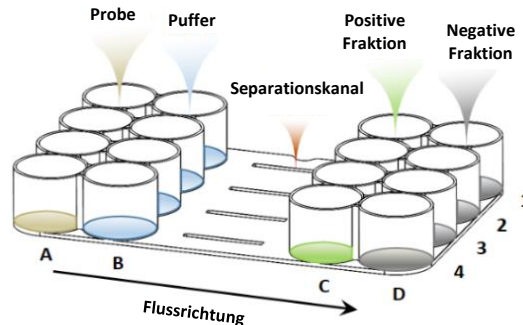
Optional für Proben mit komplexen Matrices/PLUS Kit: Vorfiltration des gesamten Probenvolumens über einen 5 µm- Filter und Auffangen des Filtrats in einem sterilen Behälter.

1. Filtrieren der gewünschten Wassermenge mit einer Standardfiltrationseinheit über einen 0,2 µm Polycarbonatfilter.

- Transferieren des Filters in ein 50 mL-Röhrchen, in das 3 mL Puffer 1 vorgelegt wurden. Der Filter sollte flach auf der inneren Wand des Röhrchens liegen.
- Das 50 mL Falcon-Röhrchen während 60 s in horizontaler Lage vortexen, um die bakteriellen Zellen auf dem Filter in Puffer 1 zu resuspendieren. Den Filter entfernen.



- Die Magnetpartikel-Suspension vorsichtig mischen und 30  $\mu$ L zu jeder Probe pipettieren. Den Farbstoff für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren und ebenfalls 30  $\mu$ L zu jeder Probe pipettieren
- Die Proben bei Raumtemperatur für 30 min inkubieren bei kontinuierlicher, leichter Bewegung, beispielsweise auf einem Rotator oder einer Mini-Wippe. Ein Lichtschutz ist nicht erforderlich, wird aber empfohlen.
- Die Proben sowie Puffer 2 in die vorgesehenen Behälter der mit dem Kit mitgelieferten Einweg-Kartusche laden. Die Kartusche in die Kartschenkammer des CellStreams legen und die IMS starten.



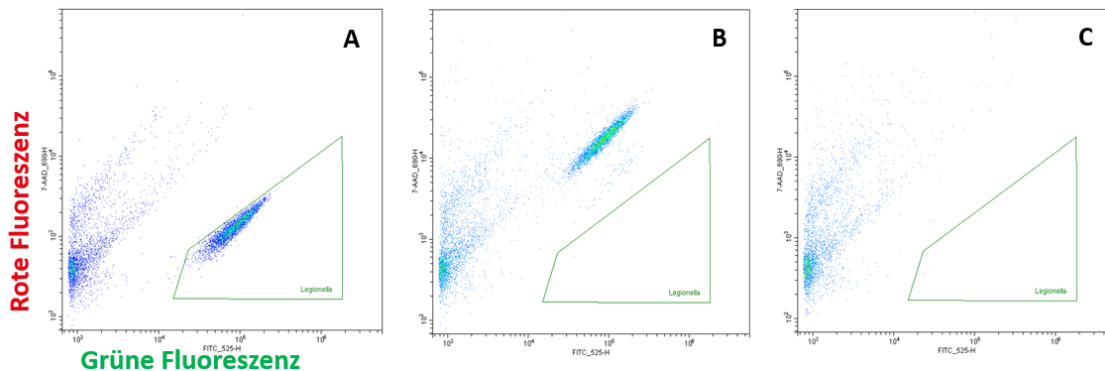
- Nachdem der Prozess beendet ist, die gesamte Positivfraktion (1 mL) sorgfältig aus dem Behälter pipettieren und in ein steriles 1,5 mL-Röhrchen überführen.
- Um zwischen lebenden und toten Legionellen zu unterscheiden, kann die Hälfte der Positivfraktion in ein frisches 1,5 mL-Röhrchen überführt und mit 10  $\mu$ L/mL Viabilitätsfarbstoff angefärbt werden. Kurz vortexen und 10 min inkubieren.
- Die Zielzellen können im Durchflusszytometer quantifiziert werden.

## Einstellungen Durchflusszytometer

Den grünen Detektionskanal (Farbstoff) versus den roten Detektionskanal (Viabilitätsfarbstoff) anzeigen, um im Punktdiagramm die Lebendzellpopulation zu identifizieren. Optional auf einem zweiten Diagramm das Seitenstreulicht (SCC) versus den grünen Detektionskanal anzeigen, um zusätzliche Informationen zur Zielzellpopulation zu erhalten.

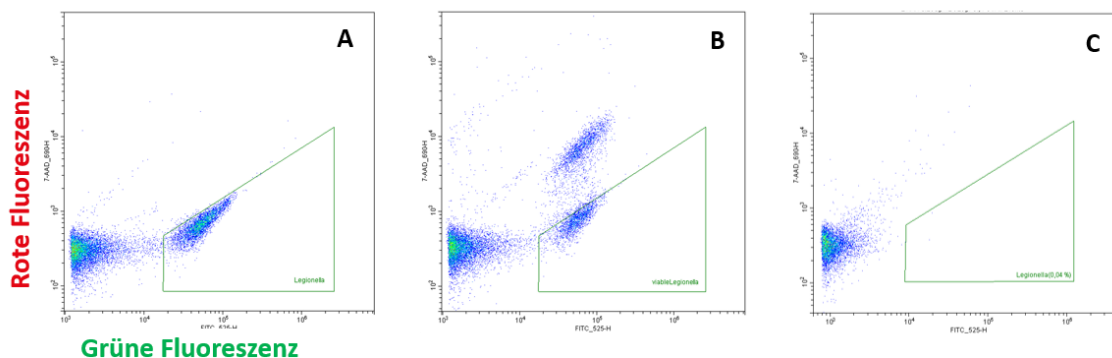
## Resultate

### Fixierte Zellen in Trinkwasser



**Abbildung 2.** Mit Positivkontrolle (lyophilisierte, chemisch fixierte *Legionella pneumophila Philadelphia*-Zellen) versetztes Leitungswasser wurde gemäss Protokoll prozessiert. Totale Anzahl Legionellen mit Farbstoff angefärbt (Abbildung 2A) und lebensfähige Legionellen mit Farbstoff und Viabilitätsfarbstoff angefärbt (Abbildung 2B). Leitungswasser ohne Zugabe von Positivkontrolle (Negativkontrolle) gemäss Protokoll prozessiert (Abbildung 2C). Repräsentative Beispiele.

### *L.p.* SG1-Zellen aus Laborkultur in EVIAN



**Abbildung 3** Mit *L.p.* SG1-Zellen versetztes EVIAN, gemäss Protokoll prozessiert. Totale Anzahl Legionellen mit Farbstoff angefärbt (Abbildung 3A) und lebensfähige Legionellen mit Farbstoff und Viabilitätsfarbstoff angefärbt (Abbildung 3B). EVIAN ohne Zugabe von Positivkontrolle (Negativkontrolle) gemäss Protokoll prozessiert (Abbildung 3C). Repräsentative Beispiele.

**Reagenzien:** *Legionella pneumophila* SG1 DETECTION Kit.

**Geräte:** CellStream

#### Kontakt:

rqmicro AG  
Brandstrasse 24  
8952 Schlieren  
Schweiz  
+41 44 512 51 51

Bestellinformation: sales@rqmicro.com  
Generelle Information: info@rqmicro.com

[www.rqmicro.com](http://www.rqmicro.com)

Copyright© rqmicro AG 2018