

- Isolieren und quantifizieren von Legionellen aus wässrigen Proben in unter zwei Stunden mit dem manuellen immunomagnetischen Separator (MIMS) und anschließender durchflusszytometrischer Analyse
- Identifizieren der Lebendzellpopulation

Immunomagnetische Separation (IMS) kombiniert mit Durchflusszytometrie

IMS mit dem manuellen immunomagnetischen Separator (MIMS) von rqmicro liefert aufgereinigte und aufkonzentrierte Proben für die Analyse mit einem Standard-Durchflusszytometer (Abbildung 1). In Kombination mit den rqmicro *Legionella* Kits bietet das MIMS eine optimale Komplettlösung für die schnelle Probenaufbereitung. Die Zielzellen werden aus wässrigen Proben unterschiedlicher Matrices mittels Antikörper-beschichteter Magnetpartikel isoliert. Die Zielzellen werden zusätzlich mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern angefärbt und nach der IMS 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.

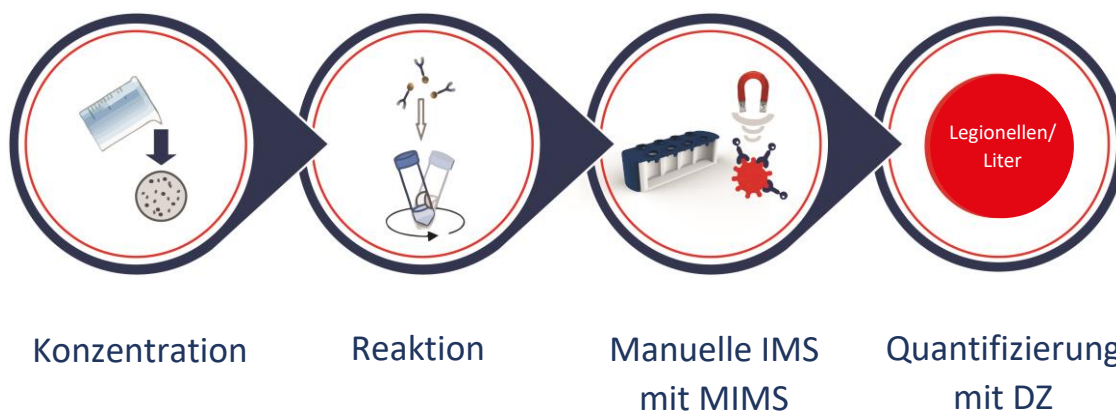


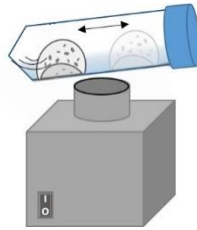
Abbildung 1: Quantitative Resultate in unter zwei Stunden von der Filtration bis zur Analyse mit dem Durchflusszytometer.

Protokoll

Optional für Proben mit komplexen Matrices/PLUS Kits: 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.
2. 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 3 mL-Zellsuspensionen in 5 mL-Röhrchen transferieren.
- Die Magnetpartikel-Suspension vorsichtig mischen und 30 μ L zu jeder Probe pipettieren. Den Farbstoff für 2 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugieren und ebenfalls 30 μ 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 5 mL-Röhrchen auf das Magnetgestell übertragen und für 5 min inkubieren, um die Magnetpartikel zu immobilisieren. Dann vorsichtig den Überstand abpipettieren. Die Röhrchen vom Magnetgestell nehmen und 3 mL Puffer 2 dazugeben. Die Proben gut vortexen, so dass alle Magnetpartikel resuspendiert sind. Diesen Schritt wiederholen.
- Die 5 mL-Röhrchen auf das Magnetgestell übertragen und für 5 min inkubieren, um die Magnetpartikel zu immobilisieren. Dann vorsichtig den Überstand abpipettieren. Die Röhrchen vom Magnetgestell nehmen und für die finale Resuspension 1 mL Puffer 2 dazugeben und gut vortexen.
- Um zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden, die Hälfte der positiven Fraktion in ein frisches 1,5-mL-Röhrchen transferieren und 10 μ L/mL Viabilitätsfarbstoff dazugeben. Gut vortexen und 10 min inkubieren.
- Quantifizieren der Zielzellen mit dem Durchflusszytometer.

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

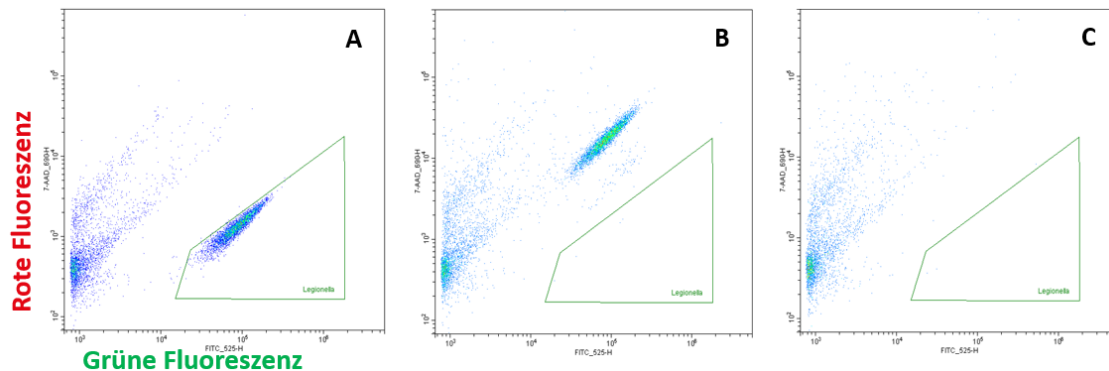


Abbildung 2. Mit Positivkontrolle (lyophilisierte, chemisch fixierte *Legionella pneumophila* Philadelphia-Zellen) versetztes Leitungswasser wurde gemäss Protokoll prozessiert. Totale Anzahl Legionellen mit Farbstoff angefärbt (Abbildung 2A) und lebensfähige Legionellen mit Farbstoff und Viabilitätsfarbstoff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

L.p. SG1-Zellen aus Laborkultur in EVIAN

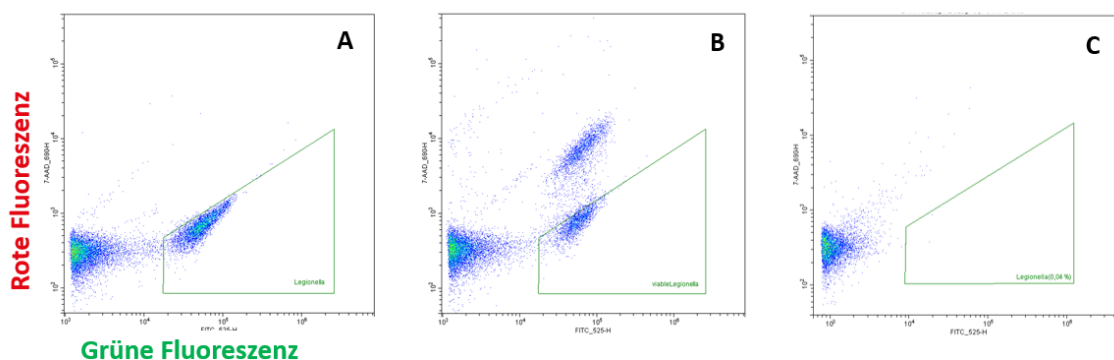


Abbildung 3. Mit *L.p.* SG1-Zellen versetztes EVIAN, gemäss Protokoll prozessiert. Totale Anzahl Legionellen mit Farbstoff angefärbt (Abbildung 3A) und lebensfähige Legionellen mit Farbstoff und Viabilitätsfarbstoff angefärbt (Abbildung 3B). EVIAN ohne Zugabe von Positivkontrolle (Negativkontrolle) gemäss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

Reagenzien: *Legionella pneumophila* SG1 DETECTION Kit.

Geräte: MIMS

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

Copyright© rqmicro AG 2018