

## SCHNELLEDETEKTION VON LEGIONELLEN

**Durchflusszytometrische Methoden etablieren sich immer mehr in der Mikrobiologie, am prominentesten bisher: die Gesamtzellzahl. Doch auch Krankheitserreger wie die *Legionella pneumophila* können mithilfe automatischer Immunomagnetischer Separation (aIMS) und Durchflusszytometrie schnell und sensitiv quantifiziert werden. Das Spin-Off rqmicro der ETH Zürich berichtet über die neusten Entwicklungen.**

Hans-Anton Keserue\*; David Bertsch; Daniel Schaffhauser, rqmicro GmbH

Der Legionellenausbruch in Warstein im Sommer 2013 war der grösste bisher in Deutschland verzeichnete. Bis Ende September waren 165 Erkrankungen und drei bestätigte Todesfälle zu beklagen. Dieses Ereignis zeigt auf, wie überaus wichtig eine re-

gelmässige und zuverlässige Analytik ist. Wie so oft in solchen Fällen dauert es Wochen, bis die Quelle eindeutig nachgewiesen werden kann. Der Grund hierfür liegt auch in der Tatsache, dass die Standardverfahren zur Quantifizierung von Legionellen sehr zeitaufwendig und unzuverlässig sind.

### RÉSUMÉ

#### DÉTECTION RAPIDE DE LÉGIONELLES PAR LA SÉPARATION IMMUNOMAGNÉTIQUE (IMS) AUTOMATIQUE ET LA CYTOMETRIE EN FLUX

Lorsqu'il s'agit de prouver la présence de bactéries, les méthodes conventionnelles de préparation de cultures en plaques prennent du temps sans fournir de résultats constants et substantiels. Des cellules viables mais non cultivables (VBNC) posent aussi des problèmes lors de la quantification des légionelles. C'est pourquoi s'imposent de plus en plus des procédés rapides et sans le besoin de culture cellulaire, qui pouvant détecter avec précision la pollution microbienne. Le dispositif de détection rapide de légionelles par cytométrie en flux conçu par la société rqmicro, identifie rapidement ces germes pathogènes. De plus il permet d'évaluer l'état physiologique des microorganismes, un élément essentiel pour évaluer avec fiabilité l'efficacité et des mesures d'assainissement et de désinfection. Pour garantir la facilité d'utilisation du système de détection et une forte reproductibilité, rqmicro vise à minimiser les variations des résultats obtenus par l'utilisateur. À cet effet, ils ont développé des puces (chips) microfluidiques, grâce auxquelles les échantillons subissent une purification optimale en éliminant le bruit de fond d'une analyse optique. Le concept de cette séparation immunomagnétique (IMS) automatique repose sur (1) la filtration de l'eau, (2) la resuspension cellulaire dans une solution tampon et (3) la co-incubation de l'échantillon et d'anticorps liés à des fluorophores et/ou particules magnétiques, qui sont utiles à la détection et séparation des organismes cibles. Après séparation ceux-ci peuvent être dénombrés (4) dans un cytomètre en flux. La possibilité d'adaptation de la méthode à d'autres organismes est un attribut supplémentaire de ce système basé sur des puces à usage unique. Ainsi rqmicro développe actuellement des essais dont le but est de détecter de la présence du *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres importants agents pathogènes alimentaires.

### LEGIONELLEN

*Legionella pneumophila* wurde vor 30 Jahren entdeckt und vermehrt 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 zum Gesundheitsproblem werden konnten. Die Infektion erfolgt über Aerosole, z. B. beim Duschen.

Man schätzt, dass in Europa jährlich 10 000 Fälle der lebensbedrohlichen Legionärspneumonie auftreten [1, 2]. Die in der Schweiz erfasste Inzidenz der Legionellose beträgt aktuell ca. 3,5 Fälle/100 000 Einwohner, mit steigender Tendenz [3], wobei die Letalität rund 6,6% beträgt [3]. Neben Krankenhäusern und Hotels sind Wohnhäuser bedeutende Infektionsorte. In den letzten Jahren ist in Deutschland eine Reihe von Fällen bekannt geworden, bei denen neu errichtete Hausinstallationen mikrobiell kontaminiert waren und sich als schwer sanierbar erwiesen [4, 5].

### HEUTIGE KULTIVATIONSABHÄNGIGE VERFAHREN

Die etablierte Standardmethode zur Legionellendetektion, ISO 11731 [6], basiert auf dem Plattierungsverfahren, das zu sehr variablen Ergebnissen führt und 10 bis 13 Tage dauert [7-9]. Ausgedehnte Ringversuche zwischen verschiedenen Laboratorien haben gezeigt, dass damit im Schnitt 20-mal zu wenige Keime quantifiziert werden [10]. Zudem kommt es vor, dass Zellen zwar leben, aber auf dem Agarmedium nicht wachsen (sogenannte VBNC-Zellen, *viable but nonculturable*). 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 Resultate von Plattierungsmethoden nur sehr schwer zu in-

\* Kontakt: keserue@rqmicro.ch

interpretieren sind [11–13]. Das ist eine wichtige Erkenntnis, denn die grosse Mehrheit aller Informationen über die Verbreitung und das Verhalten von Krankheitserregern in Wassersystemen wurde mit 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, 14].

#### NEUE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE SCHNELLEDETEKTION

Mittels der Durchflusszytometrie kann die Gesamtzahl an Zellen in einer Wasserprobe bestimmt werden. Die Firma rqmicro, ein Spin-Off der ETH Zürich, hat sich zum Ziel gesetzt, diese Methode für Krankheitserreger 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 mithilfe von magnetischen Nanopartikeln und anschliessender durchflusszytometrischer Detektion, dauert lediglich eine Stunde und erfasst, im Gegensatz zu den etablierten Verfahren, sämtliche potenziell infektiösen Legionellen.

Die magnetischen Nanopartikel binden mithilfe eigens hergestellter Antikörper an die Oberfläche der Legionellen, die daraufhin mit einem externen Magnetfeld aus der Masse der Begleitflora und Schmutzpartikel, die sich im Wasser befinden, «herausgefischt» werden können. 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 lediglich 100 Legionellen finden möchte. In diesem Beispiel entspricht die Legionellenkonzentration 0,0001% – die sprichwörtliche Nadel im Heuhaufen dürfte in vergleichbarer Häufigkeit vorkommen. Nach der Aufreinigung werden nun wieder mit der Hilfe von Antikörpern fluoreszente Farbstoffe auf die Oberfläche der Zellen angebracht, um diese über Fluoreszenzemission erkennen zu können. Im Anschluss an diese Färbung werden die Proben in wenigen Minuten an einem Durchflusszytometer ausgezählt. Dadurch liegt der Zeitaufwand für eine Legionellenbestimmung bei der erwähnten einen Stunde.

#### VIABLE BUT NONCULTURABLE

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 kann. Weiterhin werden bei den durchflusszytometrischen Methoden alle Zellen, also auch die VBNC, quantifiziert.

Erste Ergebnisse von Desinfektionsstudien im Labor deuten darauf hin, dass Legionellen nicht so schnell absterben, wie durch Plattierungsexperimente angenommen (Fig. 1) [15]. 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 [12]. Das führte dazu, dass mit dieser Methode bereits in verschiedenen bewohnten Objekten nicht plattierbare, aber infektiöse Keime quantifiziert wurden. In zwei Fällen war die vorgestellte Methode die einzige, die nach Erkrankungsfällen die Quelle der Infektion aufzeigen konnte. Die Möglichkeit, nicht nur die Gegenwart, sondern auch die phy-

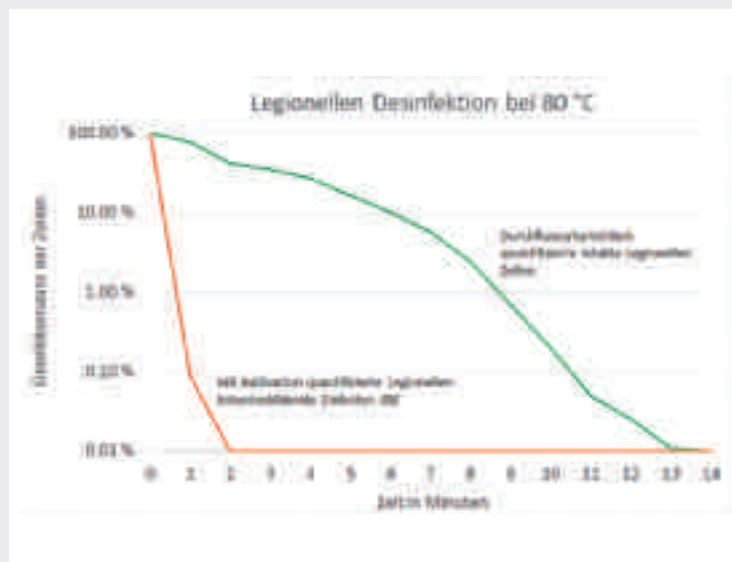


Fig. 1 Desinfektion von Legionellen bei 80 °C. Die rote Linie stellt die Ergebnisse der Plattierung und die grüne Linie der Durchflusszytometrie dar. Nach zwei Minuten können bei der kultivationsabhängigen Methode keine Legionellen mehr nachgewiesen werden. Die durchflusszytometrische Methode zeigt allerdings noch bis zur 13. Minute Zellen mit intakter Membran an. Mithilfe von Amöbeninfektionstests kann gezeigt werden, dass diese Zellen auch wirklich lebendig sind

Désinfection de légionelles à 80 °C. La ligne rouge représente les résultats de la culture sur plaques, la ligne verte ceux de la cytométrie en flux. Au bout de deux minutes, le procédé de culture ne parvient plus à prouver la présence de légionelles. La méthode de la cytométrie en flux révèle quant à elle des cellules à membrane intacte pendant encore 13 minutes maximum. Des tests d'amibiase-infection permettent de montrer que ces cellules sont bien vivables



Fig. 2 Prototyp eines rqmicro-ALMS-Chips für vier gleichzeitige und unabhängige Legionellentests

Prototype d'une puce ALMS rqmicro pour quatre essais de détection de légionelles simultanés et indépendants

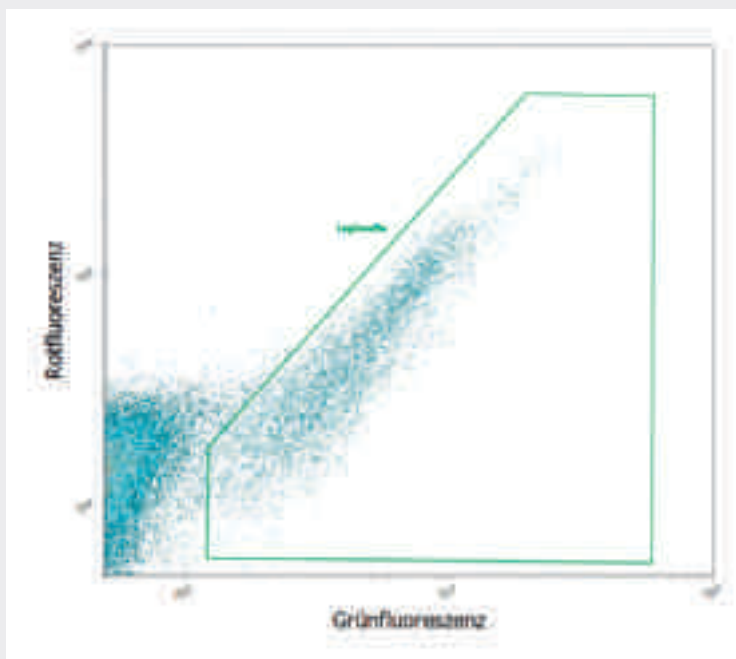


Fig. 3 Durchflusszytometrischer Dot-Plot von Grün- gegen Rotfluoreszenzsignalen. Innerhalb der grünen Region kann man die Legionellenpopulation sehen und automatisch zählen

Graphique de points de cytométrie en flux représentant des signaux de fluorescences rouges par rapport aux verts. A l'intérieur de la zone en vert, on peut voir la population de légionelles et de dénombrer celles-ci automatiquement

siologischen 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, welche leider nicht immer zu einer nachhaltigen Problemlösung führen [5, 14], 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 INDUSTRIEKONZERN

Genau um diese Wissenslücke zu schliessen, arbeiten die ETH Zürich, die rqmicro GmbH und die GF JRG AG im Rahmen eines KTI-Projektes des eid. Departements für Wirtschaft, Bildung und Forschung WBF an der Entwicklung und Validierung neuer und nachhaltiger Desinfektions- und Sanierungsstrategien. Im Rahmen des Projektes werden Hausinstallationsmodelle mit Krankheitserregern wie z.B. Legionellen kontaminiert und wieder gezielt desinfiziert, bei genauer Überwachung der Nachhaltigkeit der Massnahmen. Gerade die absolute Quantifizierung und die kurze Analysezeit der Durchflusszytometrie ermöglichen eine sehr rasche und effiziente Durchführung solcher Forschungsvorhaben.

#### AUTOMATISIERUNG MIT HILFE VON «LAB-ON-A-CHIP»

Bereits bei der Einführung der durchflusszytometrischen Gesamtzellzahl (DZ GZZ, SLMB 333.1) in Ringversuchen hat sich 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 Grunde arbeitet das Team von rqmicro an der Entwicklung eines Gerätes, das viele dieser Schritte vereinfachen wird. Durch die Verwendung von mikrofluidischen Chips (Fig. 2) werden Anwendungsfehler dramatisch reduziert und die Laborarbeitszeit gesenkt. Zudem ermöglicht das On-Chip-Verfahren eine so hohe Probenaufreinigung, dass die ansonsten störenden Hintergrundsignale vernachlässigbar werden und das elektronische Gating (Definierung der Zielregion in einem Fluoreszenzdotplot; Fig. 3) an einem konventionellen Durchflusszytometer zum Kinderspiel wird. Ausserdem ermöglicht der Chip eine Parallelisierung, sodass aktuell vier und in Zukunft noch mehr Proben gleichzeitig verarbeitet werden können.

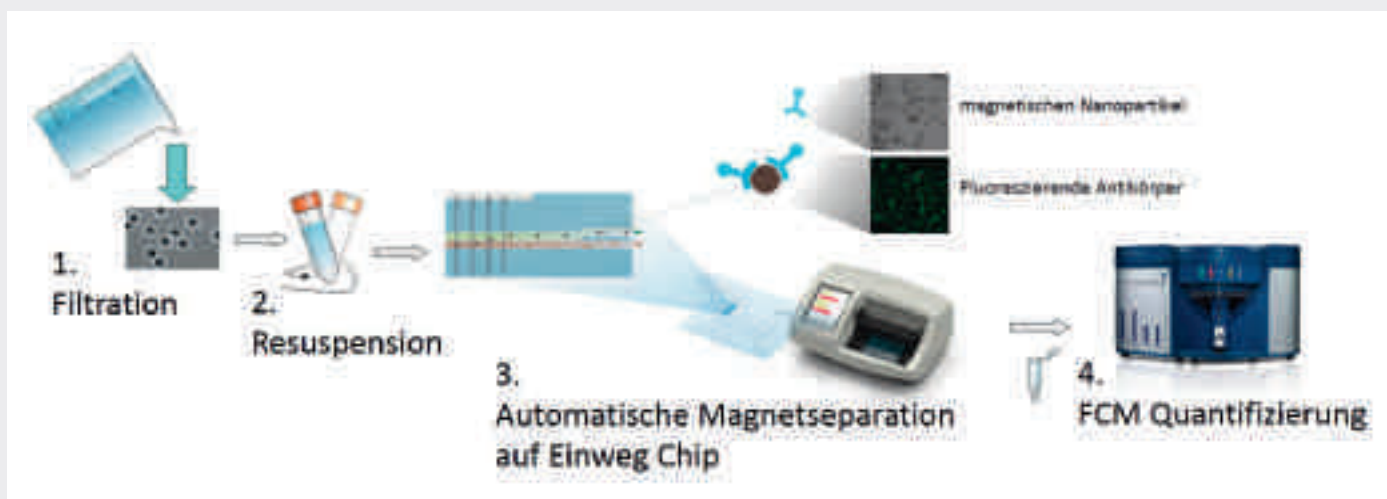


Fig. 4 Schematischer Arbeitsablauf der neuen Legionellendetektion: 1. Filtration der Wasserprobe; 2. Resuspension des Filters in Pufferlösung; 3. Inkubation mit Antikörpern und Separation der Zielorganismen auf dem Chip; 4. Messung an einem konventionellen Durchflusszytometer. Der ganze Ablauf dauert ca. eine Stunde

Schéma du déroulement de la nouvelle méthode de détection des légionelles: 1. Filtration de l'échantillon d'eau; 2. Resuspension du filtre dans une solution tampon; 3. Incubation avec des anticorps et séparation des organismes cibles sur la puce; 4. Mesure dans un cytomètre en flux classique. La durée de l'ensemble du processus est d'une heure environ

### Arbeitsablauf der automatischen Immunomagnetischen Separation (aIMS)

Die Arbeitsabläufe mit dem mikrofluidischen Gerät sind wie folgt: Nach Filtration der Wasserprobe von bis zu einem Liter Wasser werden die Zellen von der Filteroberfläche abgelöst und in eine Pufferlösung aufgenommen. In dieses folglich sehr viel kleinere Volumen werden nun die Antikörper mit Magnetpartikeln hinzugegeben und im Chip inkubiert. Nach Abschluss der Inkubation fängt das Gerät selbständig an, die Zielorganismen zu separieren, und diese können dann direkt aus dem Chip genommen, angefärbt und in einem Durchflusszytometer ausgezählt werden. Der Vorgang ist in *Figur 4* veranschaulicht.

### AUSBLICK

Momentan bietet rqmicro die Methode als Dienstleistung an ([www.rqmicro.ch](http://www.rqmicro.ch)). Zum Frühjahr 2014 ist die Durchführung von Ringversuchen mit verschiedenen Laboratorien aus dem In- und Ausland mit anschliessender Zertifizierung der Methode und des Gerätes geplant. Des Weiteren soll die Methode auf *Pseudomonas aeruginosa* und wichtige Lebensmittelpathogene ausgebaut werden. Da die Antikörper die Leistungsdaten des Tests massgeblich mitentscheiden und ein grosser Kostenfaktor sind, baut rqmicro aktuell eine eigene Antikörperproduktion auf – auch um den eigenen Qualitätskriterien gerecht zu werden.

### BIBLIOGRAPHIE

- [1] ECDC (2012): Legionnaires' disease in Europe, 2010. European Centre for Disease Prevention and Control, Stockholm
- [2] EWGLI (2012): The European Working Group for Legionella Infections. In: The European Working Group for Legionella Infections. <http://www.ewgli.org/>. Accessed 16 Aug 2012
- [3] BAG (2012): Meldungen Infektionskrankheiten. [www.bag.admin.ch/k\\_m\\_meldesystem/00733/00804/index.html](http://www.bag.admin.ch/k_m_meldesystem/00733/00804/index.html)
- [4] Kistemann, T. (2004): Hygienisch-mikrobiologische Risiken von Grossgebäude-Wasserinstallationen. Bonn, Germany
- [5] Völker, S. et al. (2010): Drinking water quality in household supply infrastructure – A survey of the current situation in Germany. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 213:204–209. doi: 10.1016/j.ijheh.2010.04.005
- [6] ISO (2004): ISO 11731. Water quality – detection and enumeration of Legionella. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
- [7] Boulanger, C. A.; Edelstein, P. H. (1995): Precision and accuracy of recovery of *Legionella pneumophila* from seeded tap water by filtration and centrifugation. *Appl Environ Microbiol* 61: 1805–1809
- [8] Bentham, R. H. (2000): Routine sampling and the control of *Legionella* spp. in cooling tower water systems. *Curr Microbiol* 41: 271–275. doi: 10.1007/s002840010133
- [9] Napoli, C. et al. (2009): Variable bacterial load of *Legionella* spp. in a hospital water system. *Sci Total Environ* 408: 242–244. doi: 10.1016/j.scitotenv.2009.09.039
- [10] Lucas, CE. et al. (2011): Accuracy and precision of *Legionella* isolation by US laboratories in the ELITE program pilot study. *Water Res* 45: 4 428–4436. doi: 10.1016/j.watres.2011.05.030
- [11] Allegra, S. 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. doi: 10.1128/AEM.02225-10
- [12] Allegra, S. et al. (2008): Use of flow cytometry to monitor *Legionella* viability. *Appl Environ Microbiol* 74: 7813–7816. doi: 10.1128/AEM.01364-08
- [13] Oliver, J. D. (2010): Recent findings on the viable but nonculturable state in pathogenic bacteria. *FEMS Microbiol Rev* 34: 415–425. doi: 10.1111/j.1574-6976.2009.00200.x
- [14] Bendinger, B.; Benölken, J. (2010): Praxisnahe Untersuchungen zur Kontamination von Trinkwasser in halbertechnischen Trinkwasser-Installationen
- [15] Keserue, H.-A.; Egli, T (2012): Durchflusszytometrie: Nachweis von Krankheitserregern. *Aqua & Gas* 92: 34–38

# Wasser-Boden-Abfall

Chemische und bakteriologische Untersuchungen von Umweltproben – [www.bachema.ch](http://www.bachema.ch)

**bachema**  
Analytische Laboratorien