

Entwicklung einer molekularbiologischen Schnellmethode für die Bestätigung von präsumtiven Kolonien von *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila*

Susette Freimueller Leischtfeld, Roger Kuhn, Lars Fieseler

susette.freimueller@zhaw.ch

Einleitung

Legionellen sind Gram-negative, stäbchenförmige Bakterien, die in verschiedenen natürlichen und künstlichen Süßwasserhabitaten vorkommen. Legionellen können Pneumonie und Pontiac-Fieber hervorrufen. Der wichtigste Vertreter dieser Gattung ist *L. pneumophila*. Am häufigsten werden Legionellen gemäss der EN ISO Norm 11731 kulturell untersucht. Eine Begleitflora kann trotz der Wahl eines Selektivmediums für Legionellen nicht gänzlich unterdrückt werden, weshalb die präsumtiven *Legionella*-Kolonien nach dem kulturellen Nachweis bestätigt werden müssen (Abb. 1). Zu diesem Zweck wurde ein *Sandwich Hybridization Assay* (SHA) für die Bestätigung von *Legionella* spp. und für die spezifische Bestätigung von *L. pneumophila* entwickelt.

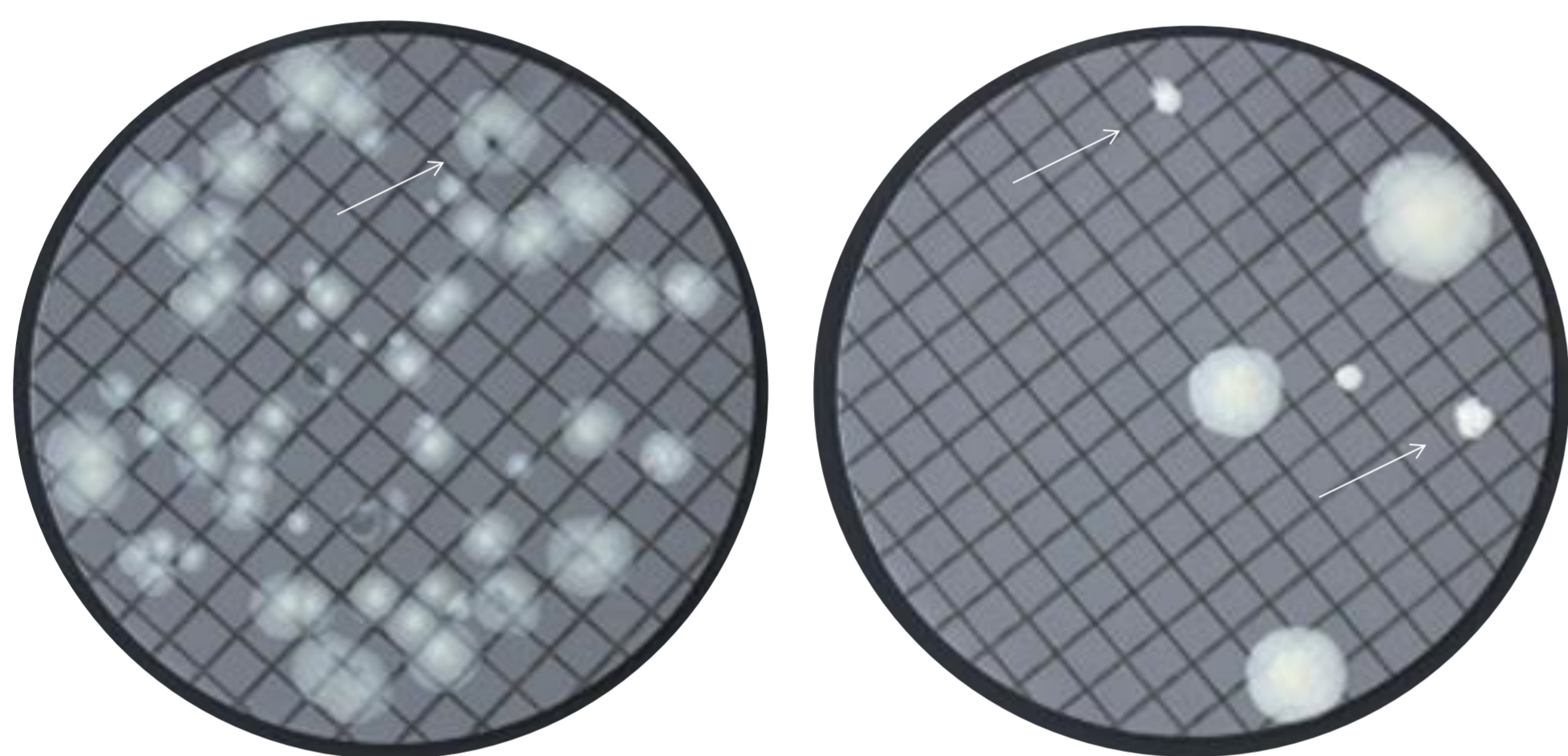


Abb 1. Filter auf einem Selektivmedium für Legionellen. Die Pfeile zeigen Kolonien der Begleitflora

Prinzip

Für die Bestätigungsreaktion mittels SHA muss in einem ersten Schritt die Mikrotiterplatte (MTP) mit einer Fängersonde beschichtet werden. Danach werden die Zellen lysiert und in die Kavitäten der MTP gegeben. In die Kavitäten der MTP hybridisieren die Fänger- und Detektorsonde mit dem Targetmolekül aus den Zellen. Durch eine enzymatische Reaktion erfolgt bei positiven Befunden ein Farbumschlag. Abb. 2 zeigt die schematische Darstellung des Vorgehens.

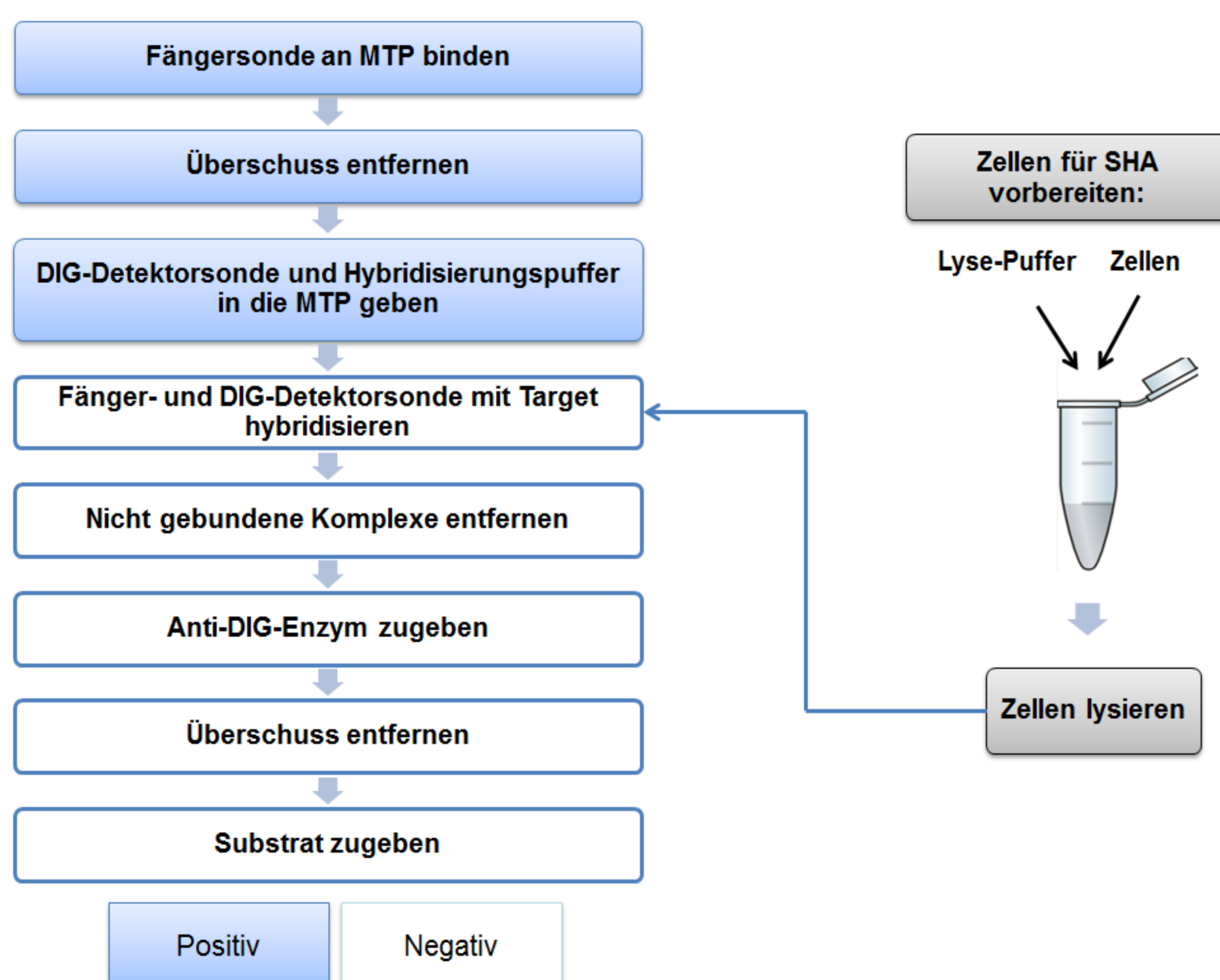


Abb 2. Schematische Darstellung des Vorgehens der Bestätigungsreaktion mittels Sandwich Hybridisation Assay (SHA).

Ergebnisse

Die Sensitivität und Spezifität des SHA für die Bestätigung von *Legionella* spp. und *L. pneumophila* wurde anhand von 171 präsumtiven Legionellen aus 47 Wasserproben und 25 referenzierten Stämmen ermittelt. Die Sensitivität des SHA für die Bestätigung von *Legionella* spp. lag bei 91 % und die Spezifität bei 89 %. Der SHA für die Bestätigung von *L. pneumophila* wies eine Sensitivität von 94 % und eine Spezifität von 85 % auf (Tab. 1). Die 171 Isolate wurden zuvor mittels MALDI-TOF MS und Sequenzierung der 16S rDNA identifiziert. Die Ergebnisse sind in Abb. 3 graphisch dargestellt.

Tab 1. Übersicht aller korrekt bestätigten Kolonien und der daraus abgeleiteten Sensitivität und Spezifität. SHA, Sandwich Hybridisation Assay.

Betätigungs-Methode	Anzahl präsumtiver Kolonien, die korrekt als <i>Legionella</i> spp. bzw. <i>L. pneumophila</i> bestätigt wurden	Sensitivität	Anzahl präsumtiver Kolonien, die korrekt als Begleitflora bestätigt wurden	Spezifität
SHA für die Bestätigung von <i>Legionella</i> spp.	143 von 158	91 %	31 von 35	89 %
SHA für die Bestätigung von <i>L. pneumophila</i>	101 von 108	94 %	72 von 85	85 %

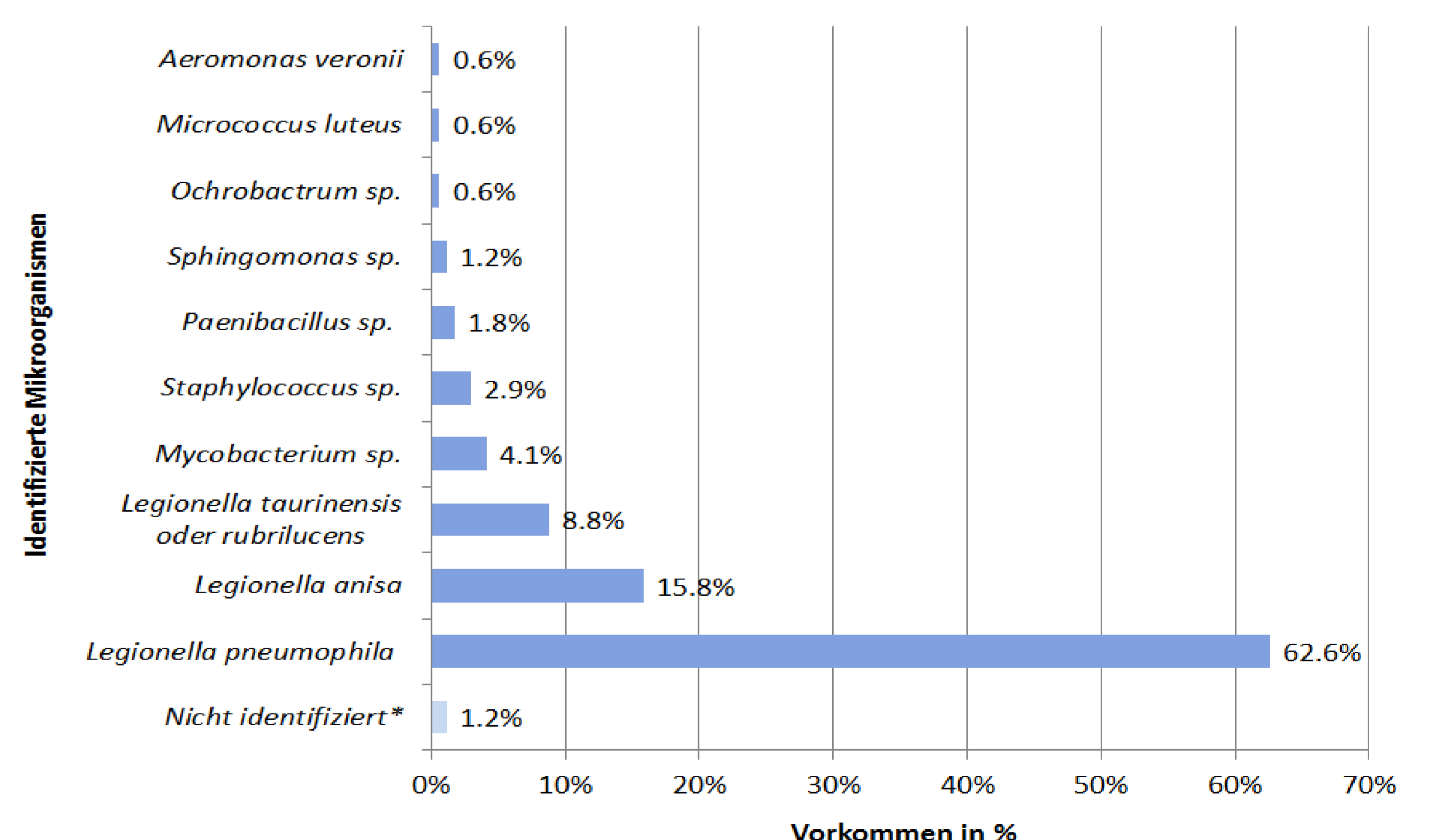


Abb 3. Ergebnis der Identifizierung von 171 Isolaten aus Wasserproben mittels MALDI-TOF MS und Sequenzierung der 16S Region. * Die nicht identifizierten Stämme (1.2 %) konnten nach der Isolierung nicht mehr kultiviert werden.

Schlussfolgerung

Mit dem SHA liegt bereits nach 3 Stunden für ca. CHF 1.00 die Bestätigung einer Kolonie vor. Für die Durchführung der Methode sind lediglich ein Thermoblock für Mikrotiterplatten und Pipetten nötig. Die Beurteilung der Bestätigung erfolgt visuell dank eines Farbumschlages bei positiven Befunden. Der entwickelte SHA eignet sich als weitere Alternative zur Bestätigung von *Legionella* spp. und zur spezifischen Bestätigung von *L. pneumophila*.