

Der Nachweis von *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 – 15 in Patienten – Urin mit Hilfe der Multiplex – Immunoassay – Ausleseplattform MCR 3

Anika Wunderlich¹, Christian Lück², Reinhard Niessner¹, Michael Seidel¹

¹ Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, Lehrstuhl für Analytische Chemie,
Technische Universität München, Marchioninistraße 17, 81377 München, Deutschland
anika.wunderlich@mytum.de

² Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Institut für Virologie,
Medizinische Fakultät "Carl Gustav Carus",
Technische Universität Dresden, Fiedlerstraße 42, 01307 Dresden, Deutschland

Abstract:

Menschen können an einer Legionärskrankheit oder Pontiac-Fieber erkranken, wenn sie Bioaerosole einatmen, die pathogene Legionellen (z. B. *L. pneumophila* Sg1) enthalten. Diese Bioaerosole finden ihren Ursprung sehr oft in Duschen, Rückkühlanlagen auf Dächern von Industriebetrieben oder Warmsprudelbecken bzw. Verneblern. Die Untersuchung von Patientenproben bei Verdacht auf Legionärskrankheit erfolgt standardmäßig mithilfe des Urin-Antikörper-Nachweises. Jedoch ist nach momentanem Stand der Technik lediglich der Nachweis und die Identifikation von *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 sowie Serogruppe 2 – 15 als Summenparameter möglich. Ein automatisierter Schnelltest zur Detektion und Unterscheidung der Legionellenspezies und Serotypisierung ist aufgrund des gehäufteten Auftretens von Legionellose notwendig. Dafür eignen sich Sandwich-Mikroarray-Immunoassays. Mit deren Hilfe ist ein Screening auf Antigene der *Legionella pneumophila*-Serogruppen 1 – 15 in Patienten-Urin möglich. Im Gegensatz zu Screening-Verfahren in Mikrotiterplatten kann schnell und mit einer einzigen Probe die Serogruppe identifiziert werden. Dafür wird in einem ersten Schritt nach hochaffinen, selektiven Paaren aus Fänger- und Detektor-Antikörper gesucht, welche schlussendlich auf einem Serotypisierungs-Chip eingesetzt werden. Die Analyse erfolgt auf der automatisierten Multiplex-Plattform MCR 3. Gleichzeitig ist eine Zuordnung zur Umweltprobe (Wasser oder Luft) notwendig, um Rückschlüsse auf die Emissionsquelle ziehen zu können. Aus diesem Grund wird untersucht, mit welchem Nachweisvermögen auf dem Mikroarray-Chip freie *L. pneumophila*-Serogruppen detektiert werden können.

Key words: *Legionella pneumophila*, Bioaerosol, MCR 3, Urin, Chemilumineszenz, ELISA, Sandwich-Immunoassay-Mikroarray

Einführung

Legionella spp. kommen ubiquitär in allen natürlichen, aber auch künstlichen wasserführenden Systemen vor. Sie können aerosolisiert werden und bei inhalativer Aufnahme Infektionskrankheiten verursachen. So kommt es immer wieder teils sogar zu tödlichen verlaufenden Legionellose, oft auch im Zusammenhang mit dem Austrag von kontaminierten Aerosolen aus Rückkühlanlagen, wie z. B. dem Ausbruch mit über 150 Erkrankten und 2 Toten in Warstein (Sauerland) im August 2013. Mit der vor Kurzem in Kraft getretenen Novellierung der Trinkwasserverordnung kam es auch zu Änderungen bei den Vorgaben zur Legionellen-

Untersuchungspflicht in der Hausinstallation mit Warmwasserspeichern über 400 L. Bei Konzentrationen über 100 KBE/mL muss die Wasserleitung saniert werden und es können Duschverbote ausgesprochen werden [1]. Für die standardmäßige Untersuchung von sanitären Einrichtungen wird entsprechend den Methoden des Umweltbundesamtes (ISO 11731 und DIN EN ISO 11731 – 2) das Kulturverfahren angewandt. Mittels Kulturverfahren ist es jedoch nicht möglich, Zellen im VBNC-Status zu erfassen [2]. Ziel unserer analytischen Methodenentwicklung ist es, ein Testsystem zu entwickeln, das die Korrelation zwischen Luft-, Wasser- und Urinproben für *Legionella pneumophila*-

Serogruppen darstellt. Die schnelle Serogruppen-Typisierung von Urinproben erkrankter Patienten ist notwendig, um im Erkrankungsfall schnell handeln zu können. Dabei soll zuallererst die Probe des Patienten untersucht werden, um dann mit gesammelten Umweltproben aus Luft und Wasser einen Abgleich durchführen zu können. Die kulturunabhängige Methode eines Sandwich-ELISA ermöglicht über die Detektion der Zielstrukturen (LPS-Strukturen) auch die Erfassung von Zellbruchstücken, toten und inaktiven Zellen. Das Konzept des Sandwich-ELISA ist in Abbildung 1 dargestellt. Mit Hilfe eines Kontaktdruck-Verfahrens wird ein Detektionsantikörper auf einen Glasträger aufgebracht, der vorher oberflächenchemisch behandelt wurde. Anschließend wird die Probe über den Chip geleitet und die Bakterien binden am Antikörper. Nach Zugabe des Biotin-gelabelten Detektionsantikörpers kann die Markierung des Antikörpers mit Streptavidin-*HRP* erfolgen. Das mittels Luminol und H_2O_2 erzeugte Chemilumineszenzsignal wird durch eine CCD-Kamera erfasst, an die automatische Ausleseplattform des MCR 3 übertragen und über die installierte Software ausgewertet.

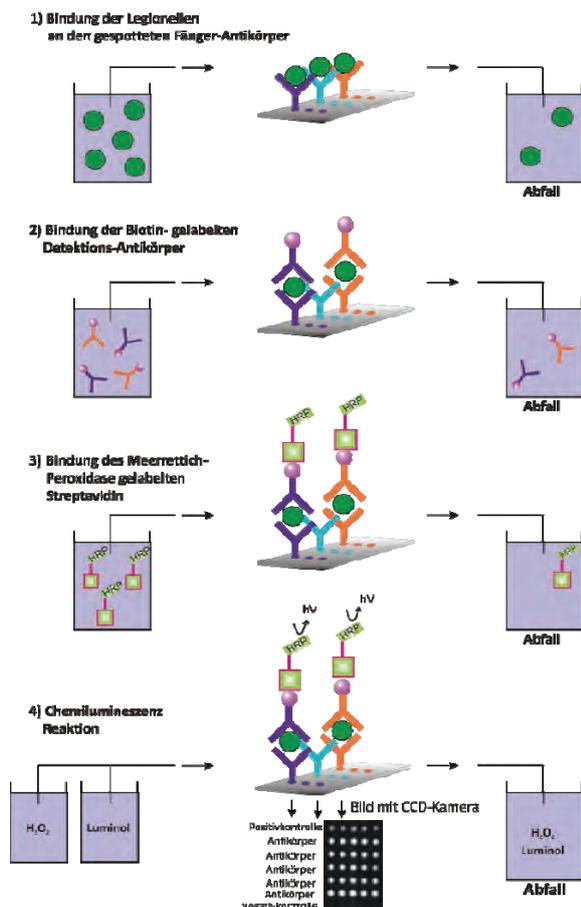


Abb. 1. Schema des durchgeführten Sandwich-ELISA am MCR 3.

Material und Methoden

Die Glasträger wurden silanisiert und anschließend mit DAPEG beschichtet. Anschließend erfolgte eine Aktivierung der Glasoberfläche, wodurch eine kovalente Bindung von Antikörpern ermöglicht wird. Diese Immobilisierung von Antikörpern wird durch ein Kontaktdruck-Verfahren, das sogenannte Spotting, erreicht. Der vollautomatische Prozess wird mit dem Kontaktpotter *BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer* (Bio-Rad Laboratories) durchgeführt. Nach erfolgter Inkubation über Nacht und Abblocken der freien Bindungsstellen mit TRIS (pH 8,5) und BSA (1% in PBS) können die Chips geklebt und für Messungen am MCR3 eingesetzt werden. Die Kalibrierung erfolgt durch quantitative Messungen am Durchfluss-Zytometer (FCM) Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter).

Mit einer aufsuspendierten Stammlösung von *Legionella pneumophila* wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Diese wurden mit SYTO 9-Farbstoff inkubiert und anschließend quantifiziert.

Die hergestellte Stammlösung wurde dann für Kalibrierungsmessungen an der Ausleseplattform MCR 3 (Munich Chip Reader, GWK Präzisionstechnik) verwendet [3]. Es handelt sich hierbei um ein Mikroarray-Messgerät, welches den Chemilumineszenz-Multiplex-Immunoassay automatisiert und mittels zugehöriger Software (MCR ImageAnalyzer) auswertet (siehe Abbildung 2).



Abb. 2. Munich Chip Reader (MCR 3).

Die Legionellen-haltige Probe wird durch die Fluidik des MCR 3 über den mit Antikörpern belegten Chip gepumpt. Alle Reagenzien werden nacheinander über den Chip geleitet. Das dabei entstehende Chemilumineszenz-Signal gibt danach Aufschluss über die enthaltene Konzentration an *Legionella*.

pneumophila in der untersuchten Probe. Weiterhin ist anhand der Spot-Verteilung auf dem Chip eine Serogruppentypisierung, entsprechend der vorher gespotteten monoklonalen Antikörper gegen *Legionella pneumophila*-Serogruppen möglich.

Ergebnisse

Zunächst wurde eine Kalibrierkurve für verschiedene Verdünnungen der Legionellen-Stammlösung im Vergleich mit Kulturverfahren erstellt (siehe Abbildung 3).

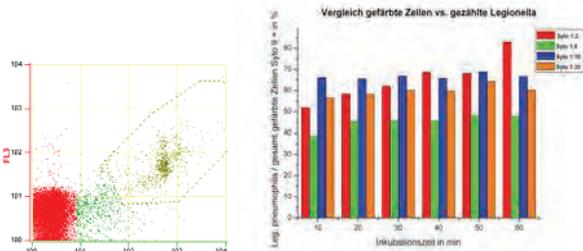


Abb. 3. Kalibrierung lebender Zellen-Kultur im Vergleich zu FCM.

Der damit erhaltene Korrekturfaktor kann für Vergleiche zwischen Kulturverfahren und Durchflusszytometrie herangezogen werden. Die Quantifizierung der Stammlösung am MCR 3 gab Aufschluss über die Legionellen-Konzentration und das dazu korrespondierende Chemilumineszenz-Signal. Es wurde eine Kalibrierfunktion erstellt, die für Quantifizierungen zugrunde gelegt werden konnte (Abbildung 4).

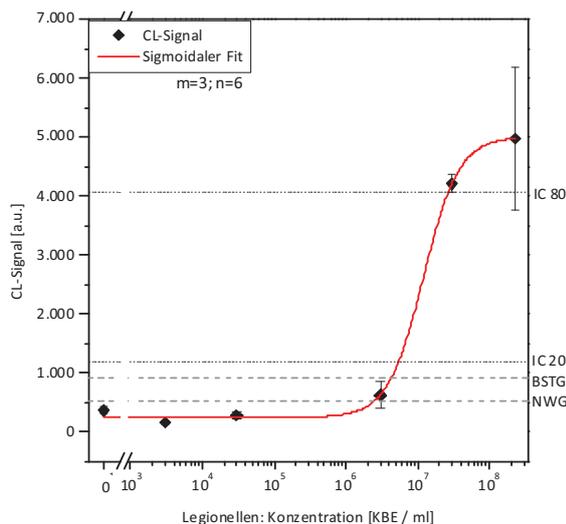


Abb. 4. Kalibrierkurve von *Legionella pneumophila* Serogruppe 1.

Es wurden in ersten Messungen Nachweisgrenzen von $2,5 \times 10^6$ KBE/mL an *Legionella pneumophila* erreicht.

Im Rahmen einer früheren Promotion wurde ein erstes Panel an *Legionella pneumophila*-Antikörpern gescreent. Ein Großteil der monoklonalen Antikörper wurde identifiziert und kann auf dem Mikroarray eingesetzt werden (siehe Abbildung 5). Mithilfe des Screenings ist es gelungen, Kreuzreaktivitäten aufzudecken. Es wurde gezeigt, dass mit einer Detektion auf dem Chip schnell und selektiv auf geeignete Antikörper untersucht werden konnte.

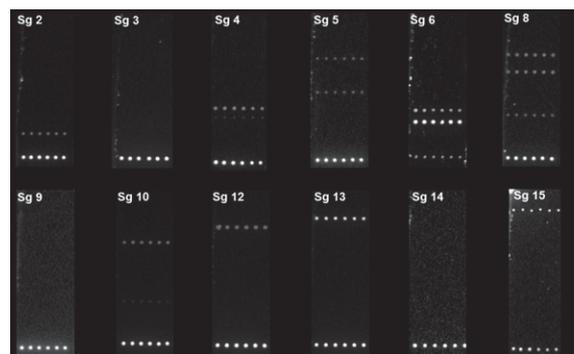


Abbildung 5. Screening von monoklonalen Antikörpern gegen *Legionella pneumophila* Serogruppen [3].

Ausblick

Aktuell wird begonnen, Urin von an *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 erkrankten Patienten zu untersuchen. Der aufkonzentrierte Urin wird am MCR 3 vermessen. Mithilfe eines Panels an selektiven Fänger- und Detektor-Antikörpern sollen Negativ- und Positivproben vermessen werden. Ziel ist es, einen Schwellenwert zu ermitteln, um negative von positiven Patientenproben abgrenzen zu können. Eine weitere Untersuchung von Realproben (wie Bioaerosole, Wasser aus Rückkühlanlagen etc.) ist angestrebt, um Rückschlüsse auf Erkrankung und Herkunft der Infektion ziehen zu können.

Um den Mikroarray für *Legionella pneumophila* zu komplettieren, wird ein weiterer Screening- und Optimierungsprozess durchgeführt. Dabei werden weitere hochselektive, affine Antikörper ermittelt und auf den Chip gebracht. Es kann so zukünftig gezeigt werden, dass aus der untersuchten Probe eine direkte Korrelation zwischen Patienten-Urin und Herkunft bzw. Austragung aus der Umwelt hergestellt werden kann. Mithilfe des Schnell-Nachweis-Verfahrens soll es möglich sein, innerhalb weniger Stunden eine genaue Serogruppen-Typisierung durchzuführen. Somit wird erreicht, dass die Untersuchung im Erkrankungsfall schneller zielgerichtet erfolgen kann.

Referenzen

- [1] <http://www.augsburger-allgemeine.de/neu-ulm/Duschverbot-seit-250-Tagen-id26482861.html>
- [2] D. Hussong, R. R. Colwell, M. O'Brien, E. Weiss, A.D. Pearson, R. M. Weiner, W.D. Burge, Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media, *Biotechnology* 5, 947 – 950 (1987).
- [3] K. Kloth, R. Niessner, M. Seidel, Development of an Open-Stand-Alone Platform for Regenerable Automated Microarrays, *Biosensors & Bioelectronics* 24, 2106 – 2112 (2009), doi: 10.1016/j.bios.2008.11.005.
- [4] V. Langer, Nachweis von *Legionella pneumophila* in Luft und Wasser mittels Antikörper-Mikroarrays, Dissertation, TU München (2013).