

Quantifizierung von *Legionella* spp. mittels isothermaler Amplifikation auf einem Chemilumineszenz-basierten Mikroarray

Gerhard Schwaiger¹, Michael Seidel¹

¹Lehrstuhl für Analytische Chemie und Wasserchemie, TU München, München, Deutschland
Kontakt: Gerhard.Schwaiger@tum.de

Einleitung

Die Anzahl an Legionellose-Erkrankten in Deutschland stieg in den letzten Jahren stetig. Im Jahr 2019 waren es mehr als 1500 erkrankte Menschen [1]. 2020 ist das erste Jahr, in dem die Fallzahlen rückläufig sind. Grund dafür sind laut RKI die Corona-bedingten Schutzmaßnahmen [1]. Legionellose ist eine schwere Lungenentzündung, die in 10 bis 15 % der Fälle tödlich enden kann. Ausgelöst wird diese durch Legionellen, meist *Legionella pneumophila*, ein 2-5 µm großes, gramnegatives und stäbchenförmiges Bakterium. Legionellen kommen in fast allen Süßwassersystemen vor und können sich durch Biofilme als auch durch Einnistung in Amöben hervorragend vor Umwelteinflüssen schützen. Eine Infektion tritt meist über Aerosole auf, deshalb sind neben Duschen, Kühltürmen und Verdunstungskühlanlagen auch Luftfiltersysteme ein Risiko. Bioaktive Luftfilteranlagen, wie sie in der Schweinemast verwendet werden, sind bisher noch wenig untersucht und können aufgrund lebender Mikroorganismen nicht mit Bioziden behandelt werden. Sie dienen zur Reinigung der Luft, bei dem ein Gasstrom mit einer Flüssigkeit in Kontakt gebracht wird und Luftschadstoffe, wie Ammoniak von den Mikroorganismen abgebaut werden. Derzeit sind in Deutschland etwa 1200 Stück im Einsatz. Für eine Risikobewertung von solchen Anlagen wird eine schnelle und sichere Detektionsmethode benötigt, um Monitoring-Versuche über einen längeren Zeitraum durchzuführen. Kultivierung, wie sie nach der EN ISO 1731:2017 angewandt wird, benötigt 7-10 Tage und unterschätzt meist die Anzahl an vorhandenen Legionellen, da ein Teil in einem lebendigen, aber nicht-kultivierbaren Zustand vorliegt. Außerdem können aufgrund der hohen Biodiversität in den Realproben Agarplatten überwachsen werden. Deshalb wurde ein Chemilumineszenz (CL) basierter DNA-Mikroarray entwickelt, der mit einem einfachen und kostengünstigen Versuchsaufbau schnelle Ergebnisse liefert und zusätzlich Vor-Ort-Messungen ermöglicht.

Methoden und Materialien

Für diesen Mikroarray wurde die Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA) als Nukleinsäureamplifikationstest (NAT) verwendet [2,3]. Die RPA funktioniert ähnlich wie die eine PCR, jedoch wird zum Auftrennen der Doppelstränge kein Temperaturzyklus benötigt. Die RPA nutzt dabei eine Rekombinase und ist damit eine isothermale NAT, was einen einfacheren Versuchsaufbau ermöglicht. Kombiniert mit einem Mikroarray wird der Assay als heterogene, asymmetrische RPA (haRPA) bezeichnet. Das Prinzip der haRPA ist in Abbildung 1 dargestellt.

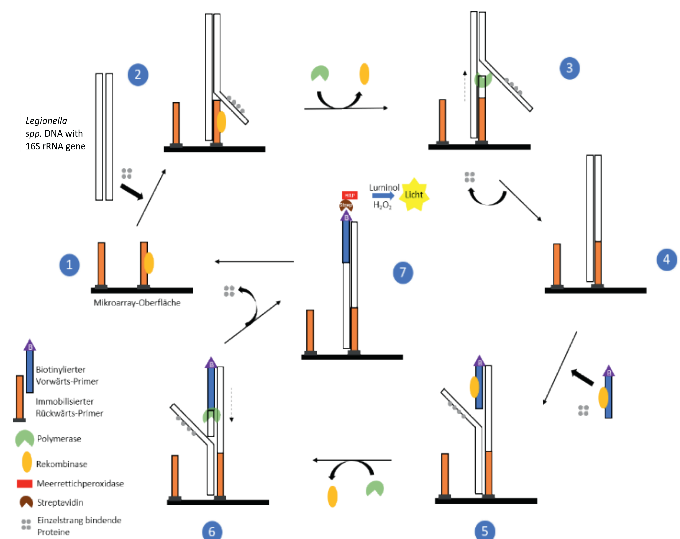


Abb. 1: Schematische Darstellung haRPA auf einer Mikroarray-Oberfläche, gekoppelt mit einer Chemilumineszenz-basierten Detektion. 1) Die Mikroarray-Oberfläche trägt immobilisierte Rückwärts-Primer. 2) Die Doppelstrang-DNA kann von der Rekombinase, gebunden am immobilisierten Primer, aufgetrennt werden. Einzelstrang bindende Proteine stabilisieren diesen Zustand. 3) Die Polymerase verdrängt die Rekombinase und fängt mit der Amplifikation an. 4) Die Amplifikation des ersten Strangs ist vollendet. 5) Ein biotinylierter Vorwärts-Primer, gebunden an einer Rekombinase bindet am oberen Ende des ersten Amplikons. 6) Der zweite Strang wird von der DNA-Polymerase amplifiziert. 7) Das immobilisierte Amplikon kann nun durch den biotinylierten Vorwärts-Primer

einen Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex binden und durch eine enzymatische Reaktion der Peroxidase mit Luminol und H_2O_2 zu einem Chemilumineszenz-Signal führen.

Der Mikroarray-Chip besteht aus Polycarbonat, der mit einem modifizierten Polyetheramin (Jeffamine ED-2003) per Siebdruckverfahren beschichtet wird. An dieser Oberfläche werden *Legionella spp.* spezifische Rückwärts-Primer immobilisiert. Die Primer sind mit einem 5'-NH₂-C₁₂-tag modifiziert und werden durch einer EDC/NHS Kopplung per Mikrodosierungsverfahren orts aufgelöst auf dem Mikroarray gebunden. Der Rückwärtsprimer hat zusammen mit seinem Vorwärtsprimer das 16S rRNA von *Legionella spp.* als Zielgen. Für die Messung werden die Reagenzien der RPA, als auch die extrahierte Probe zusammen pipettiert und für 10 Minuten bei 39 °C inkubiert. Anschließend wird die Reaktion in den Mikroarray injiziert und für weitere 30 Minuten bei 39 °C inkubiert. Der Reaktionsansatz enthält neben dem Enzym pellet der RPA auch einen biotinylierten Vorwärtsprimer. Durch diesen Primer sind die immobilisierten Amplikons mit einem Biotin markiert und dienen als Ankerpunkt der Detektionsreaktion. Die Detektion startet durch das Binden eines Streptavidin-Meerrettichperoxidase-Komplex an die biotinylierten Amplikons, dass über den Mikroarray gepumpt wird. Danach wird ein 1:1 Gemisch aus Luminol und Peroxidase in den Mikroarray injiziert und durch die Meerrettichperoxidase wird eine Chemilumineszenz-Reaktion (CL) katalysiert das mit einer CCD Kamera detektiert wird. Die Intensität des CL-Signals ist dabei abhängig von der Ausgangskonzentration an *L. spp.* DNA in der Probe. Bei einer Analyse von Realproben ist neben der haRPA auch eine effektive Konzentrations- und Extraktionsmethode nötig. Dafür wird die Probe zuerst mit einem Vorfilter (\varnothing 5 μ m) behandelt um grobe Matrixbestandteile abzutrennen. Anschließend wird 100 mL mit einem PC-Sterilfilter (\varnothing 0,22 μ m) gefiltert. Nach der Elution wird die DNA extrahiert. Zusätzlich kann die haRPA noch durch die Zugabe von Propidium Monoazid (PMA) vor der Extraktion erweitert werden, um nur lebende Zellen zu detektieren. PMA kann dabei die Zellmembran von nicht intakten Zellen passieren und an die DNA binden. Die Amplifizierung dieser DNA sowie von freier DNA wird dabei blockiert. Der finale Arbeitsablauf ist in Abbildung 2 dargestellt.

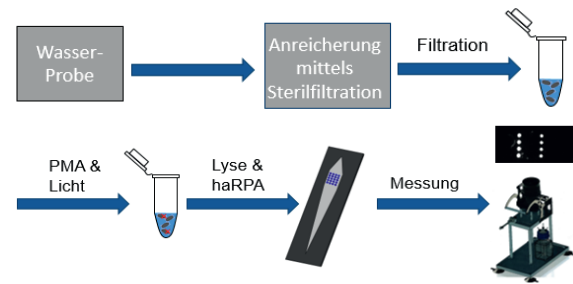


Abb. 2: Schematische Darstellung des finalen Arbeitsablaufs der haRPA mit vorheriger Konzentration durch Sterilfiltration.

Ergebnisse

Der Assay wurde zuerst mit DNA-Verdünnungen von *Legionella spp.* optimiert. Nach der Etablierung eines geeigneten Konzentrations- und Extraktionsverfahrens wird der Assay mit *Legionella spp.* kalibriert und anschließend werden Realproben von ausgewählten Schweinemastbetrieben über einen Zeitraum von einem Jahr analysiert. Abbildung 3 zeigt die Kalibrierung mit *Legionella spp.* mittels haRPA (Abb. 3) ohne Filtration.

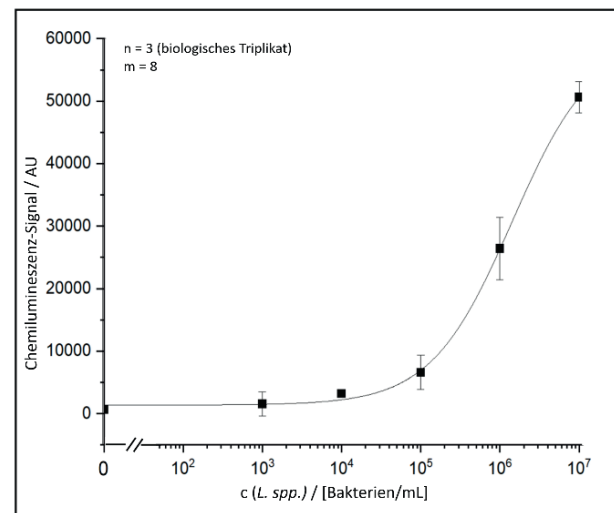


Abb. 3: Kalibrierung der haRPA mit *L. spp.* Verdünnungen in Mineralwasser. Die Verdünnungen sowie die DNA-Extraktion wurden als Triplikat angefertigt.

Die haRPA erreicht eine Nachweisgrenze von $9,2 \times 10^3$ Bakterien/mL. Zum Vergleich der Sensitivität des Assays, wurden die identischen Proben wurden zusätzlich mit einem kommerziellen qPCR-Kit (Analytik Jena) für die Detektion von Legionellen gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4 zu sehen.

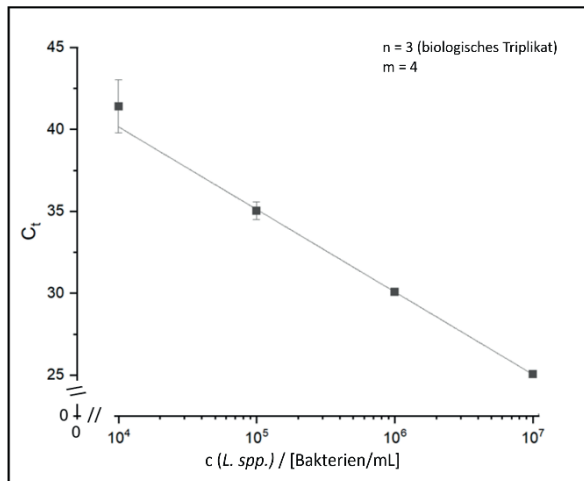


Abb. 4: qPCR Ergebnisse der in Abb. 3 genutzten Proben.

Die qPCR weist eine niedrigste noch messbare *L. spp.* Konzentration von 10⁴ Bakterien/mL auf. Die haRPA ist damit vergleichbar mit den aus der qPCR gewonnenen Daten. Es wurde noch keine Konzentration mittels Sterilfiltration bei den dargestellten Kalibrierungen durchgeführt.

Diskussion und Ausblick

Die Sensitivität des Gesamtassay muss in weiteren Schritten verbessert werden. Im nächsten Schritt wird eine Konzentrierung mittels Sterilfiltration integriert. Außerdem wird parallel an einem zweiten spezies-spezifischen Primersets für *Legionella pneumophila*, die für den Menschen gefährlichste Legionellen-Spezies, gearbeitet. Durch das Immobilisieren des jeweiligen Rückwärts-Primers beider Primerpaare auf der Chipoberfläche soll somit eine Multiplexanalyse ermöglicht werden (siehe Abbildung 5).

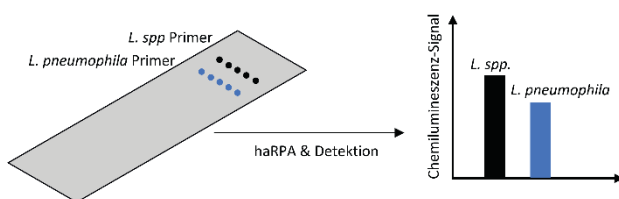


Abb. 5: Prinzip einer Multiplex-Analyse mit der haRPA.

Mit einer Messung ist dann sowohl eine Unterscheidung als auch Quantifizierung von der Gesamt-Legionellenzahl sowie der Anteil an *Legionella pneumophila* möglich. Um zusätzlich lebende von toten Zellen zu unterscheiden kann die haRPA durch Zugabe von PMA zu einer Integritäts-haRPA erweitert werden. Da

nur lebende Zellen infektiös sind, ist dadurch eine bessere Abschätzung von potentiellen Gesundheitsrisiken möglich.

Literatur

- [1] ROBERT KOCH INSTITUT: Legionärskrankheit in Deutschland (2010 bis 2020). *Epidemiologisches Bulletin* (42), 2021
- [2] KOBER, C. ; NIESSNER, R. ; SEIDEL, M.: Quantification of viable and non-viable *Legionella spp.* by heterogeneous asymmetric recombinase polymerase amplification (haRPA) on a flow-based chemiluminescence microarray. In: *Biosens. Bioelectron.* 2018, 100, 49-55
- [2] KUNZE, A. ; DILCHER, M. ; ABD EL WAHED, A. ; HUFERT, F. ; NIESSNER, R. ; SEIDEL, M.: On-Chip Isothermal Nucleic Acid Amplification on Flow-Based Chemiluminescence Microarray Analysis Platform for the Detection of Viruses and Bacteria. In: *Anal. Chem.* 2016, 88, 898-905