



Legionellen in der Routineuntersuchung – Differenzierung mittels molekularer Methoden und MALDI-TOF

Rostock, 01.03.2012

Christian Lück

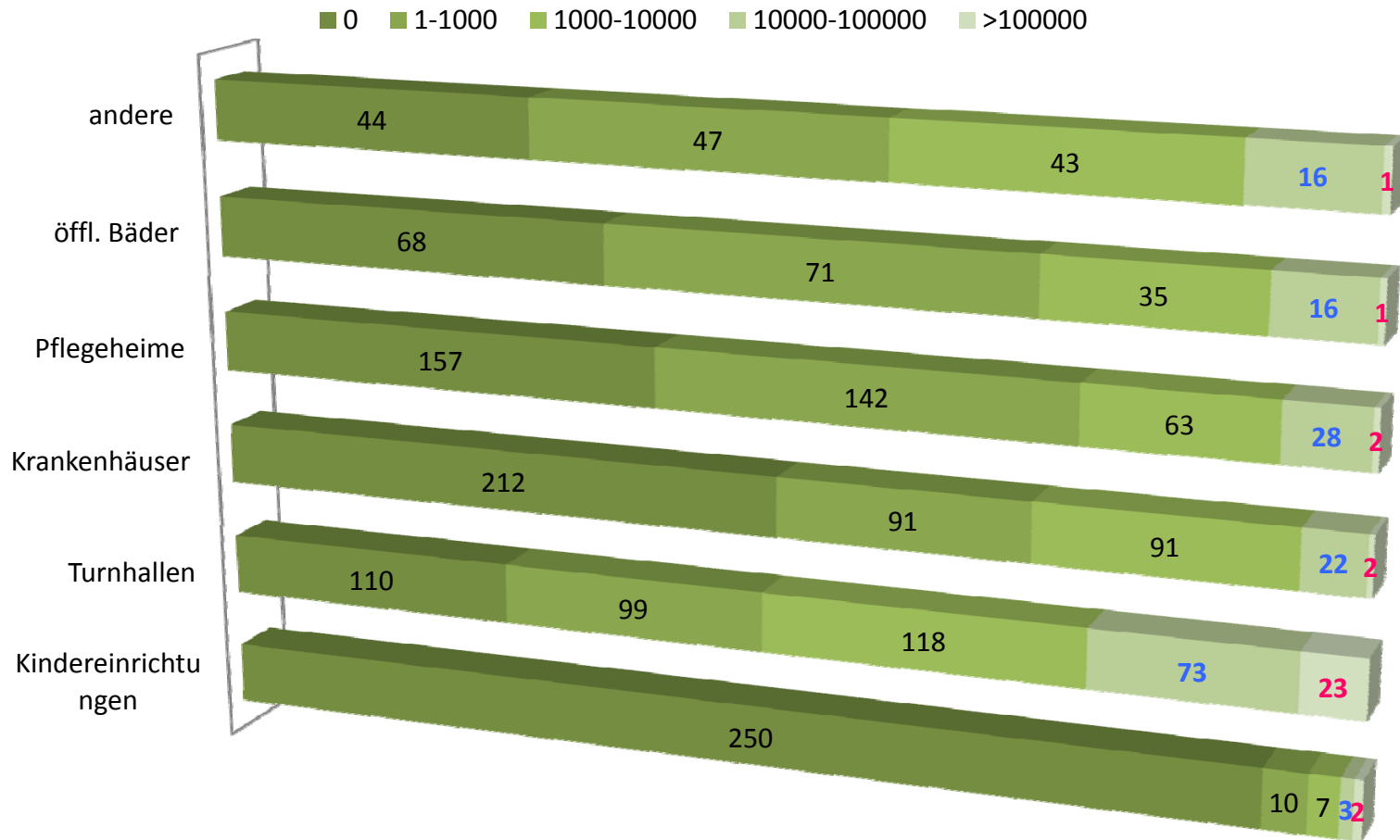
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

TU Dresden

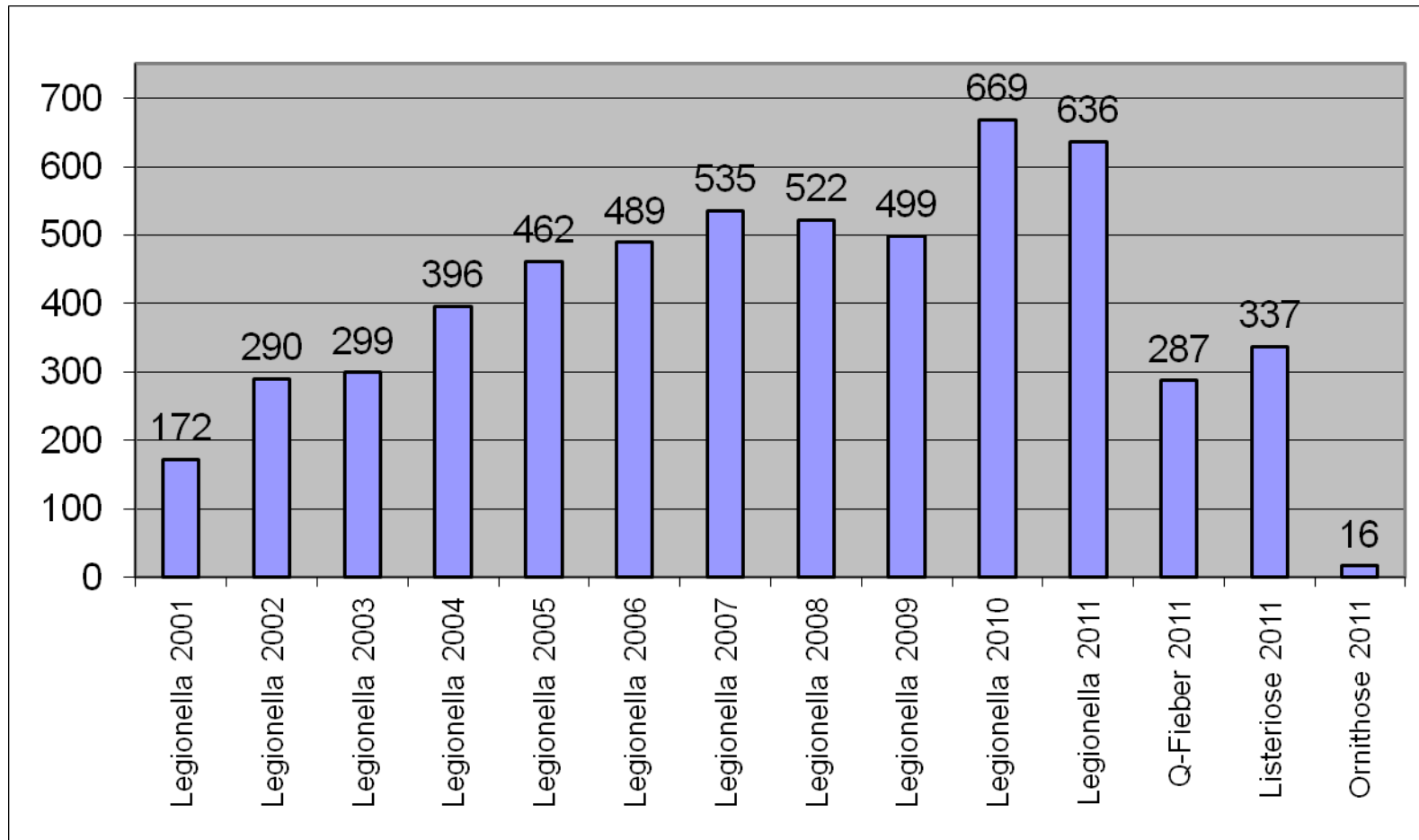
Konsiliarlabor für Legionella am Robert Koch Institut



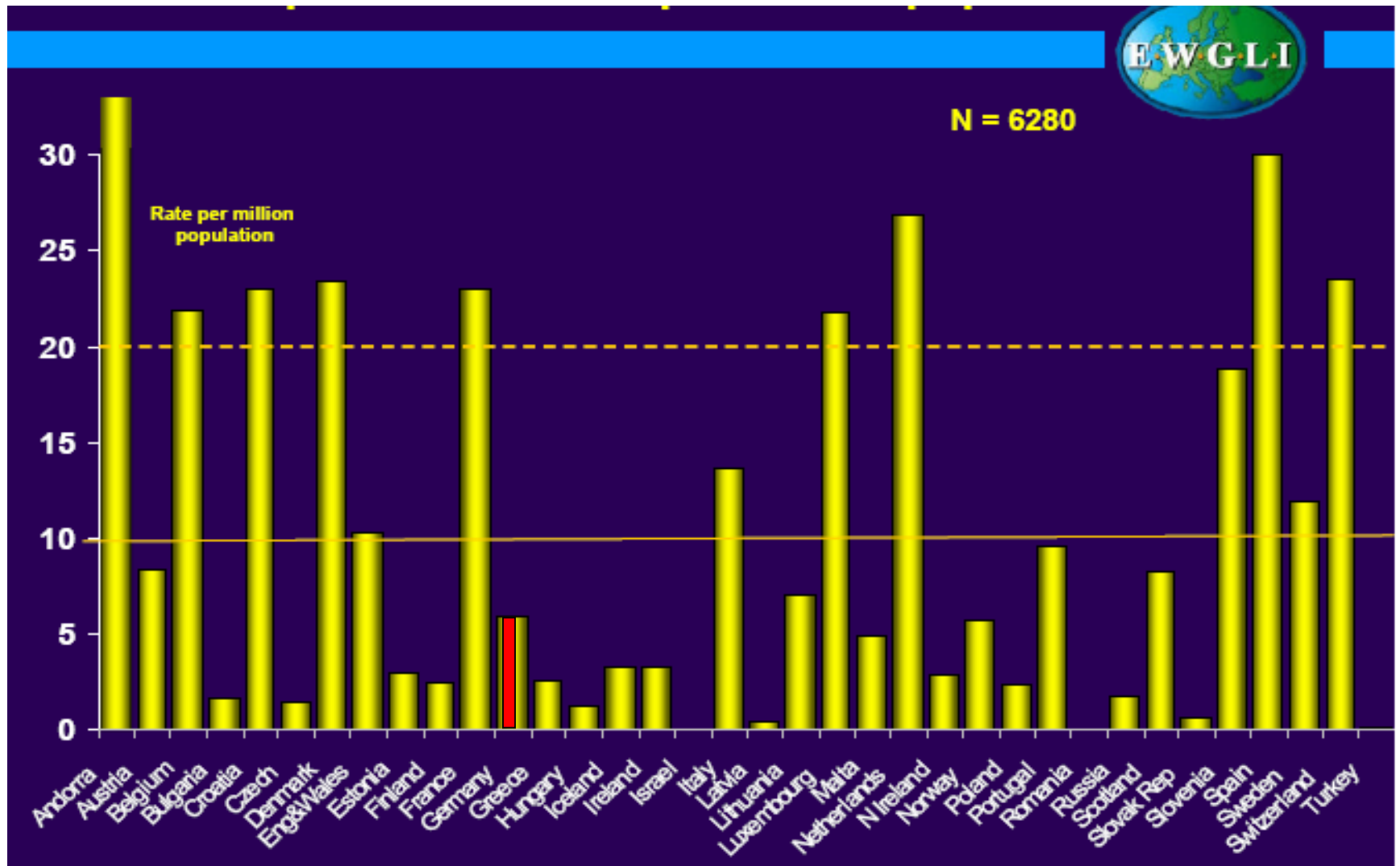
Vorkommen von Legionellen in Gebäuden KbE/



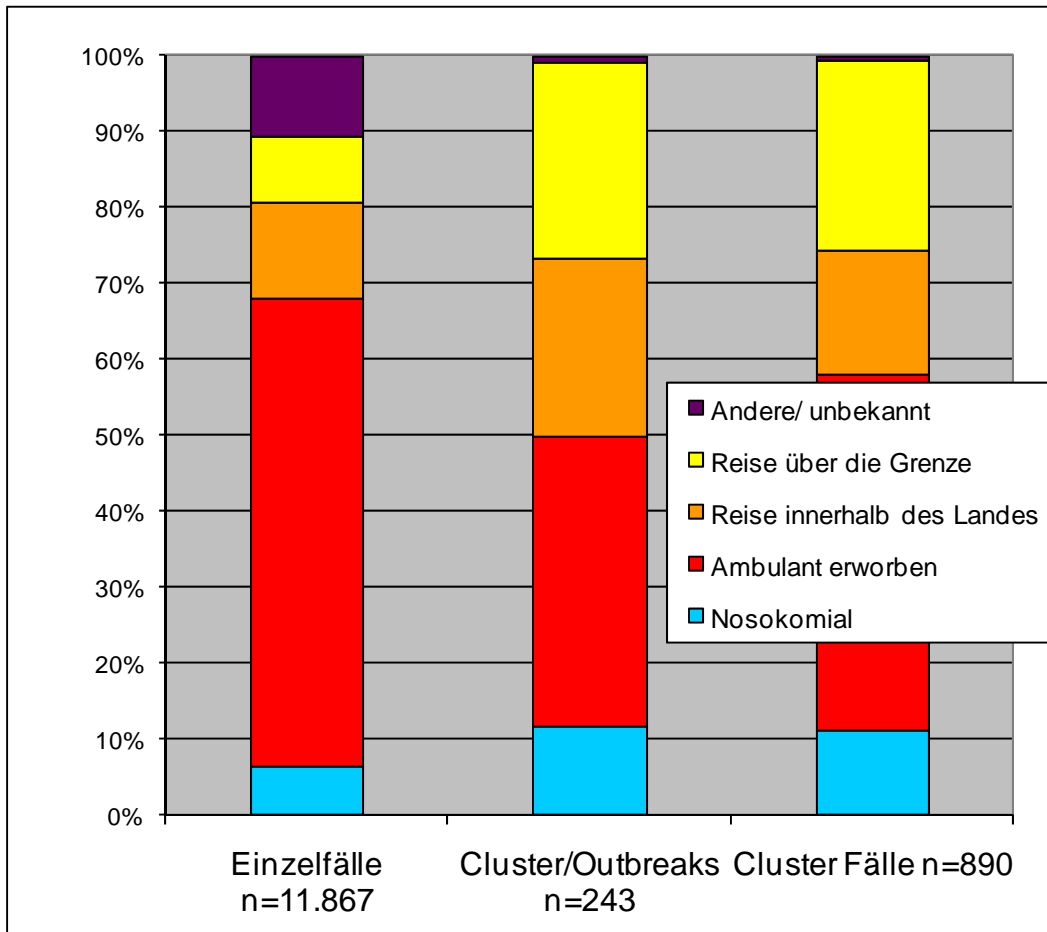
An RKI gemeldete Legionellose geschätzte Anzahl 15 000-30 000



Europe: Rate per million population per year



Legionnaires' disease 2007-2008 (n=11,867)



- Fall-Definitionen bevorteilen CAP
 - nosokomial
 - ambulant erworben
 - Reise-assoziiert

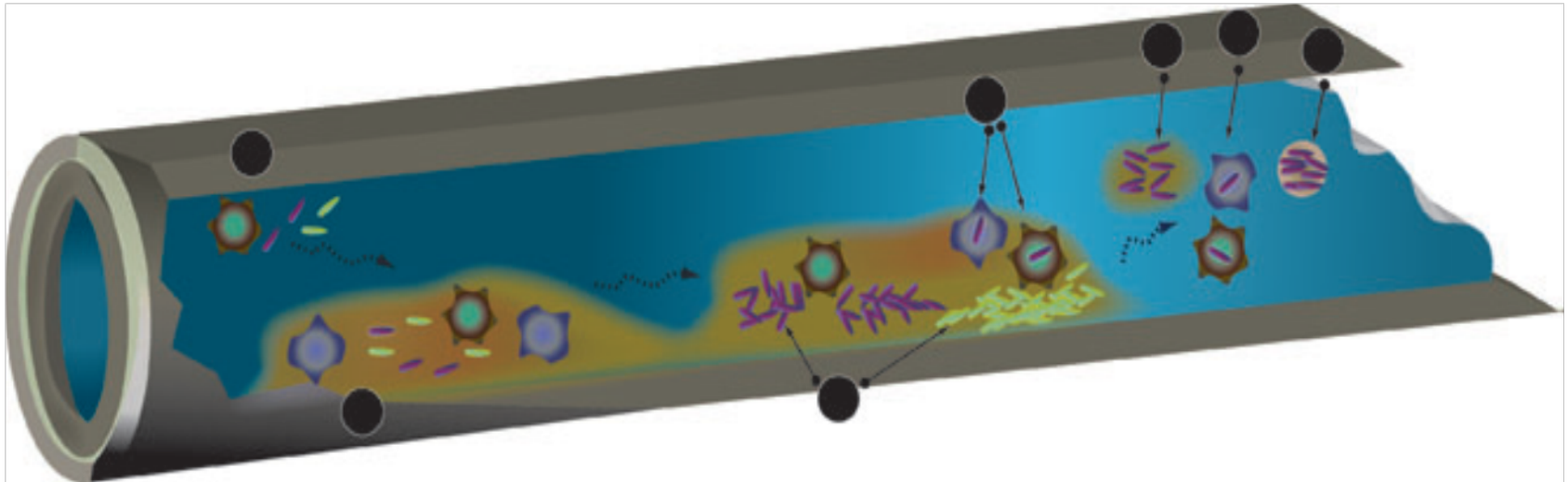
- sporadische Einzelerkrankungen

- Gruppenerkrankungen (7,5%)
 - Cluster
 - Epidemien

- zeitlich begrenzt

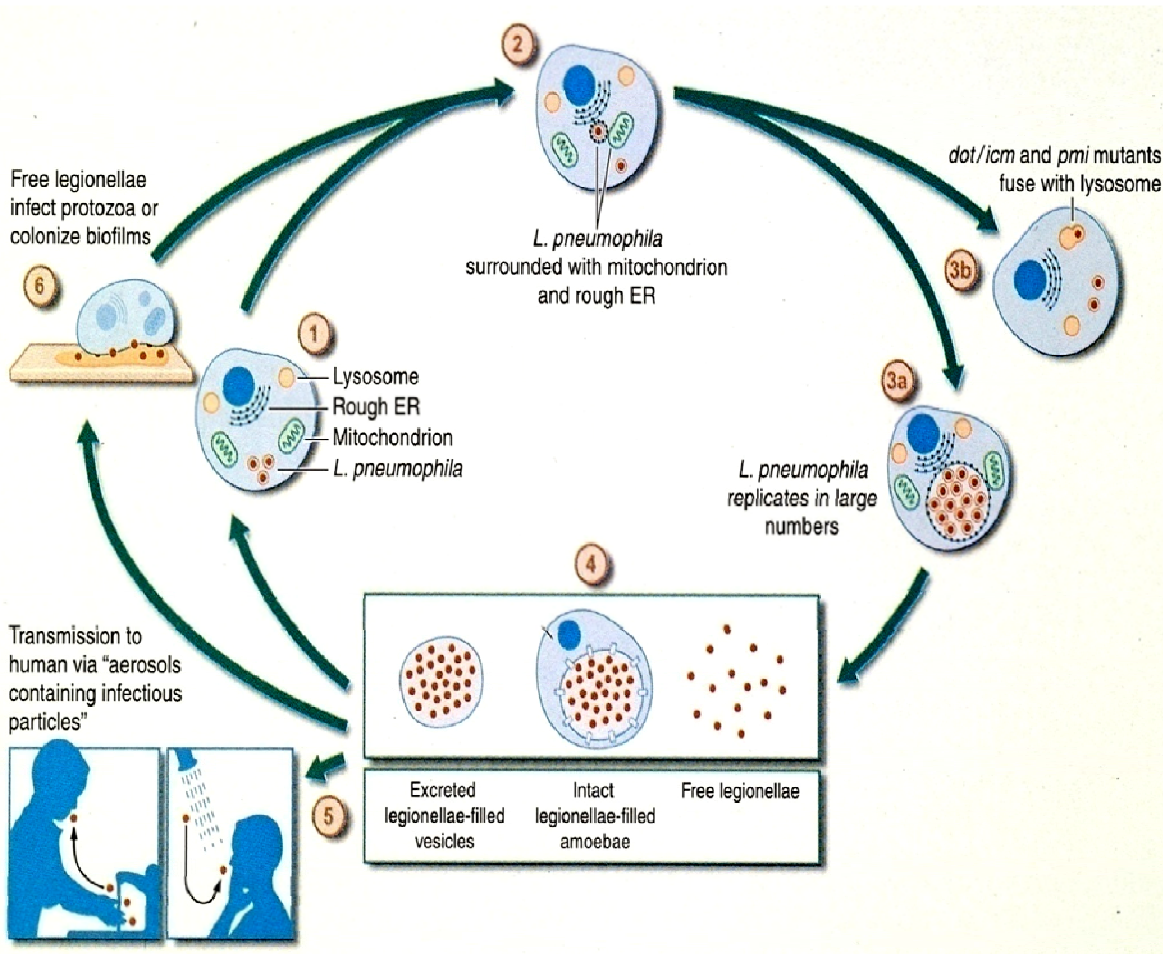
- hyperendemisch

Biofilm



1. Eintrag aus Trinkwasserversorgung
2. Vermehrung auf Biofilm in Protozoen (Komplexes Ökosystem)
3. Freisetzen und mögliche Infektion

Ökologie von Legionellen

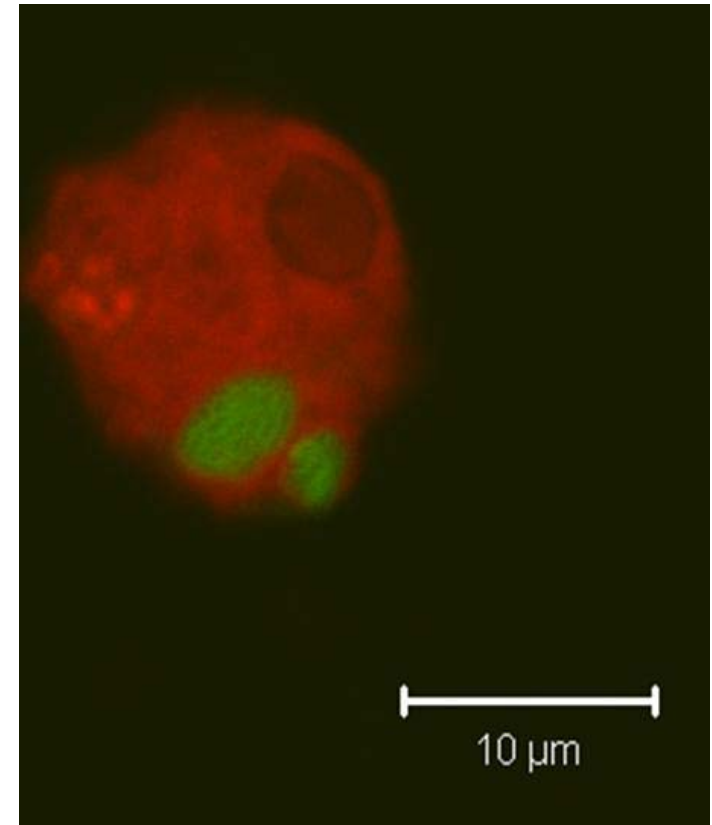


AbuKwaik 2002

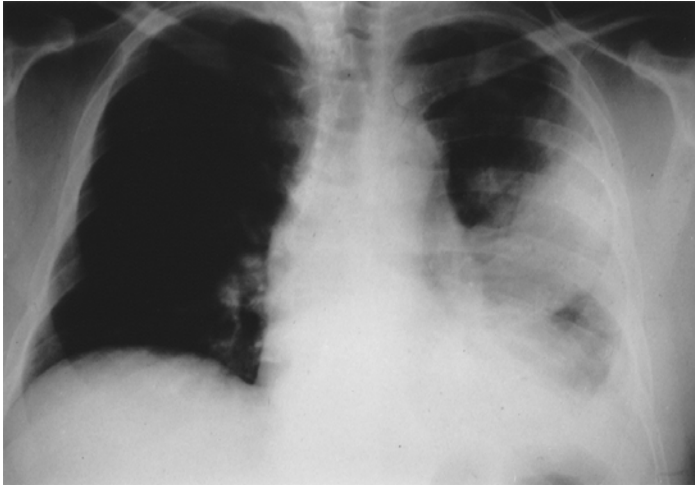
- Alle Legionellen müssen sich in der Umwelt vermehren
- Amöben bestimmen die Kolonisierung eines Endstranges
- Umweltresistenz
- 57 beschriebene Spezies
 - *L. pneumophila*
 - Serogruppe 1
 - **MAB 3-1 positiv**
 - *L. bozemanii*
 - *L. micdadei*
 - *L. longbeachae*

Übertragung von Legionella: Protozoen - aerogen

- Protozoen ermöglichen die Replikation von Legionella
- KEIN extrazelluläres Wachstum an /im Biofilm
- Protozoen setzen teilweise Vesikel $<5\mu\text{m}$ frei, die virulente Legionellen enthalten
- Intrazellulär gewachsene Legionellen sind infektiöser für Zellkulturen und Versuchstiere (ID50 steigt 100 -1000)
- Keine Übertragung von Mensch zu Mensch
- Geringe Manifestationsrate in Epidemien (und bei sporadischen Fällen)



Legionellose

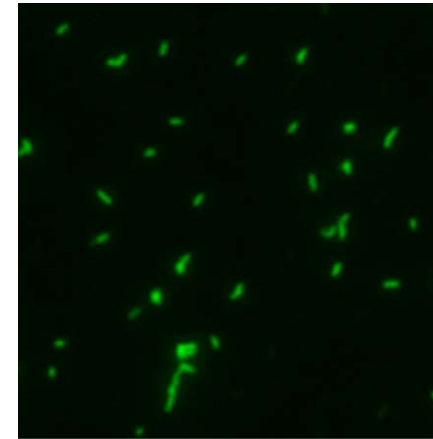
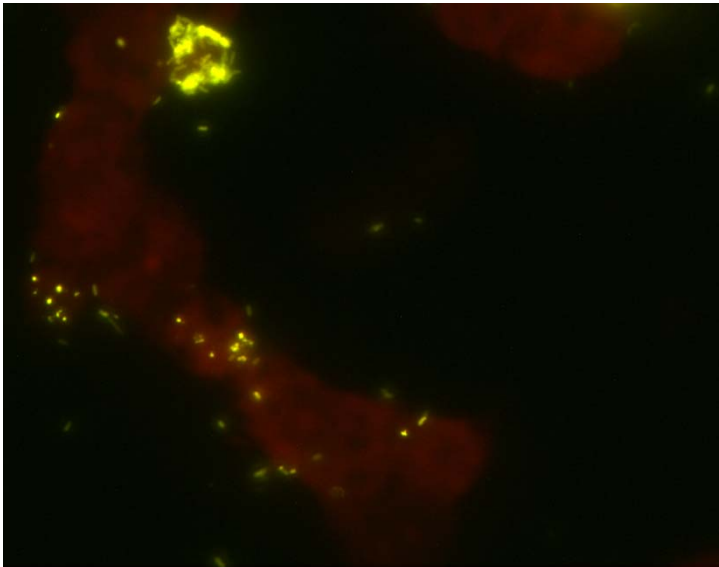


Reise nach Italien
Kultur von *L. pneumophila*
Sg1, MAbtyp Philadelphia

- **Erkrankungen:**
 - Pneumonie (Legionärskrankheit)
 - Pontiac-Fieber
 - Extrarespiratorische Manifestationen
 - Klinisch inapparente Serokonversion
- **Übertragung:**
 - Direkte Inhalation
 - Mikroaspiration
 - Alimentär Kontakt über Trinkwasser?

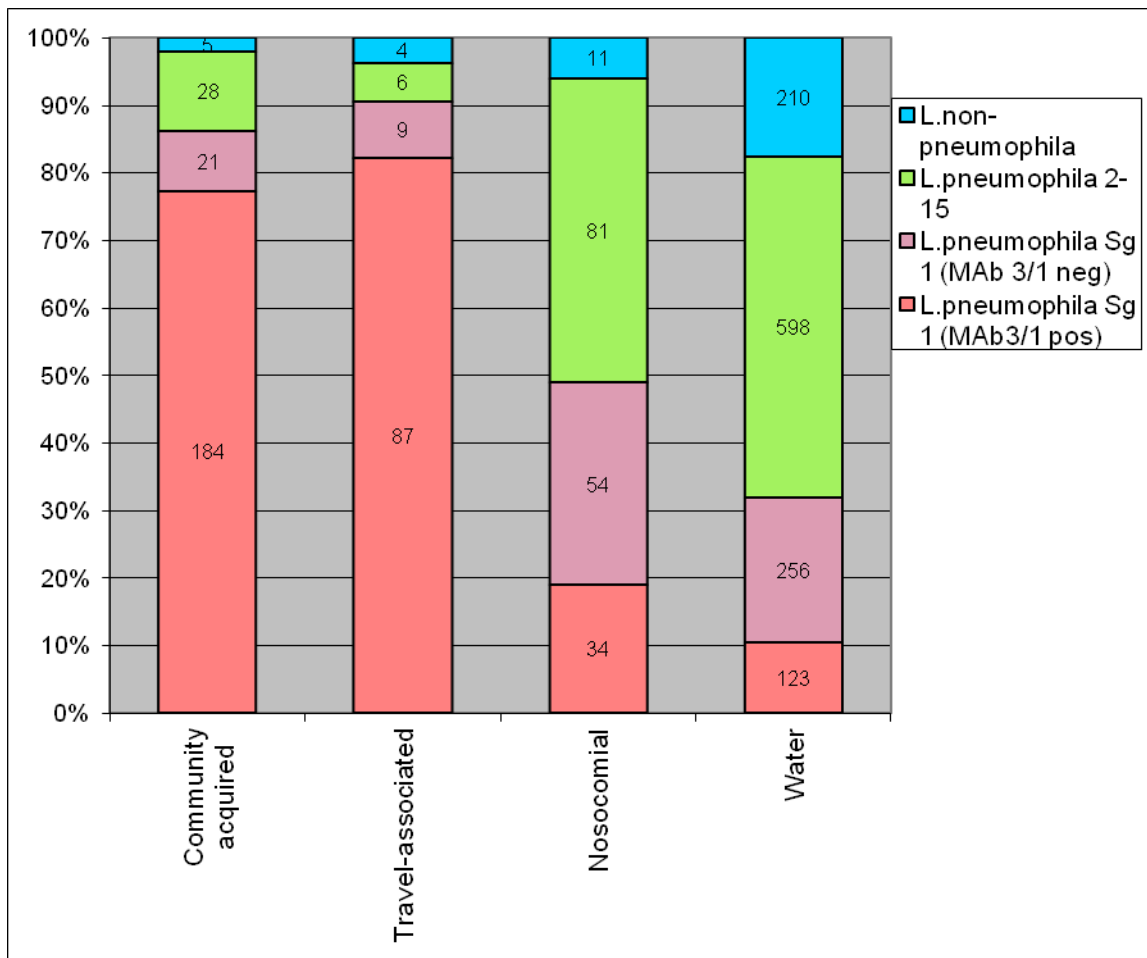
Transmission von Legionellen: little and large particle theory

- large particle = infizierte Amöben
- Gute Adaptation an intrazelluläres Milieu
- **Legionella-Pneumonie**



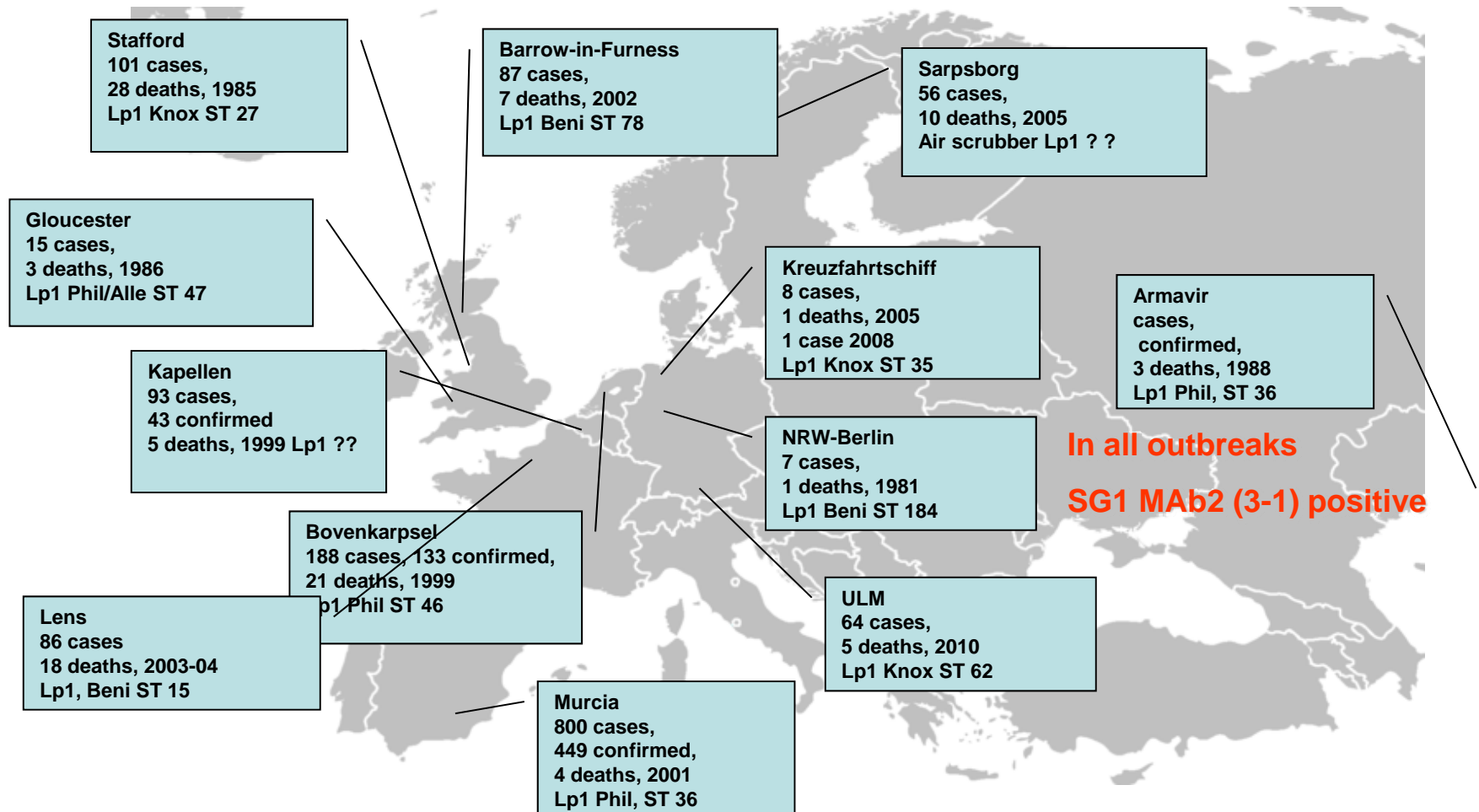
- little particles
- Schlechte Adaptation an intrazelluläres Milieu
- freie Legionellen
- viable but not culturable
- **Pontiac-fever**

Serologische Typisierung - Legionella-Isolate (nach Ursprung) 1986-2011



- Mab 3-1 positive Stämme sind virulenter
- Molekulare Basis nicht komplett verstanden
- Hydrophobes LPS = bessere Übertragung
- Ausbruchs-Stämme sind MAb2 (3-1) positiv

Ausbrüche Legionnaires' disease in Europa



Entstehung von Legionella-Infektionen

Stamm-spezifische Virulenz

L.pneumophila Sg 1
MAb 2 (3/1)-Typ

Amöben



Anzahl der Bakterien



Legionellose



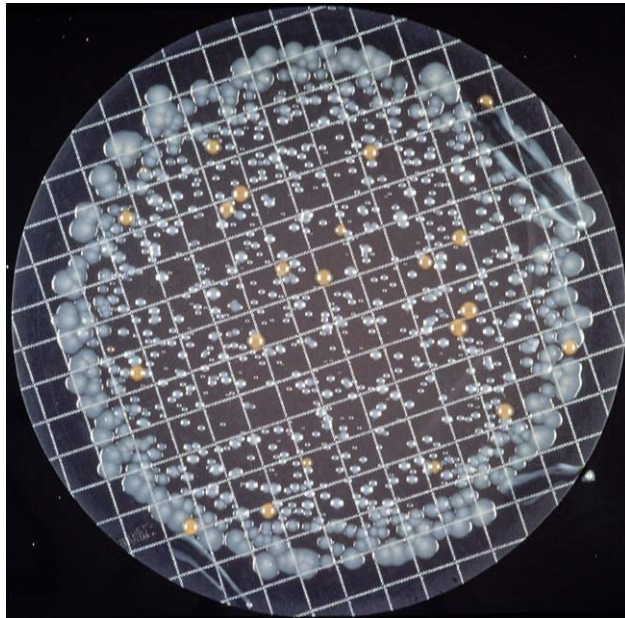
Wirtsfaktoren

Transplantation,
Kortikosteroide,
TNF alpha Antagonisten
Schluckstörungen
Alter, Raucher



Kultur von Legionellen aus Wasser

Direktansatz

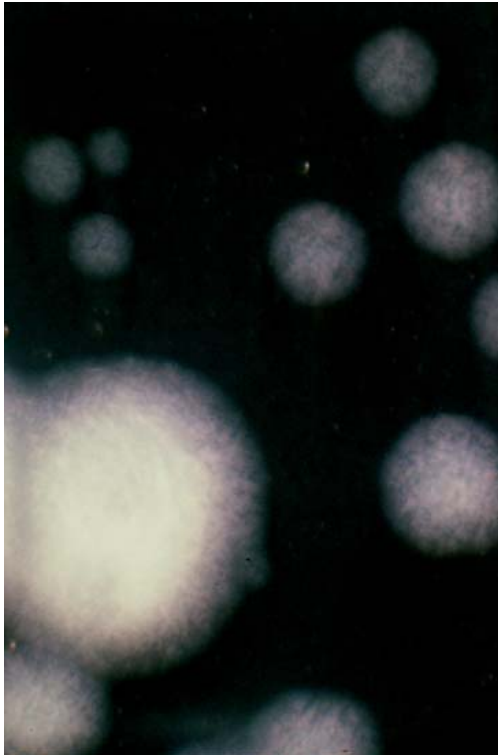


Subkultur

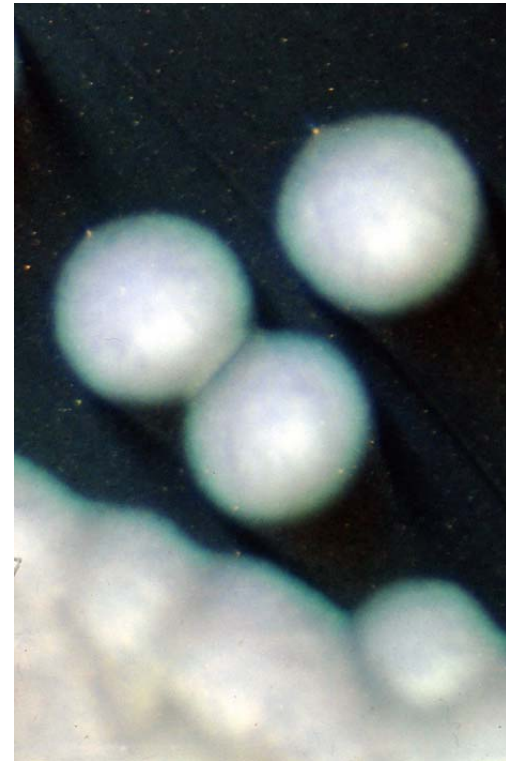


Koloniemorphe von Legionellen/Pseudomonas

Legionellen



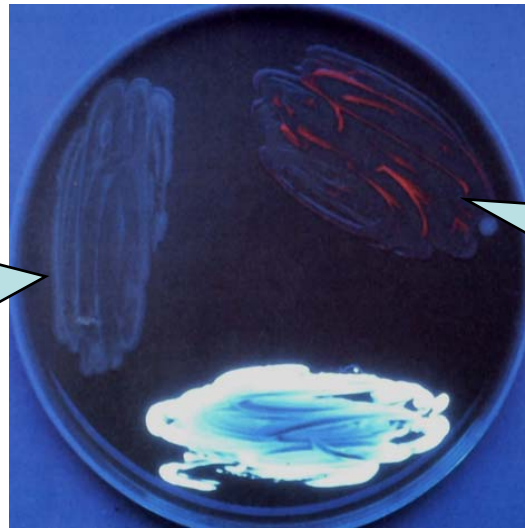
Pseudomonas



Kultur von Legionellen: Autofluoreszenz

- Pigmente sind für Umweltbakterien typisch
- Gruppierung möglich
- Keine Speziesbestimmung

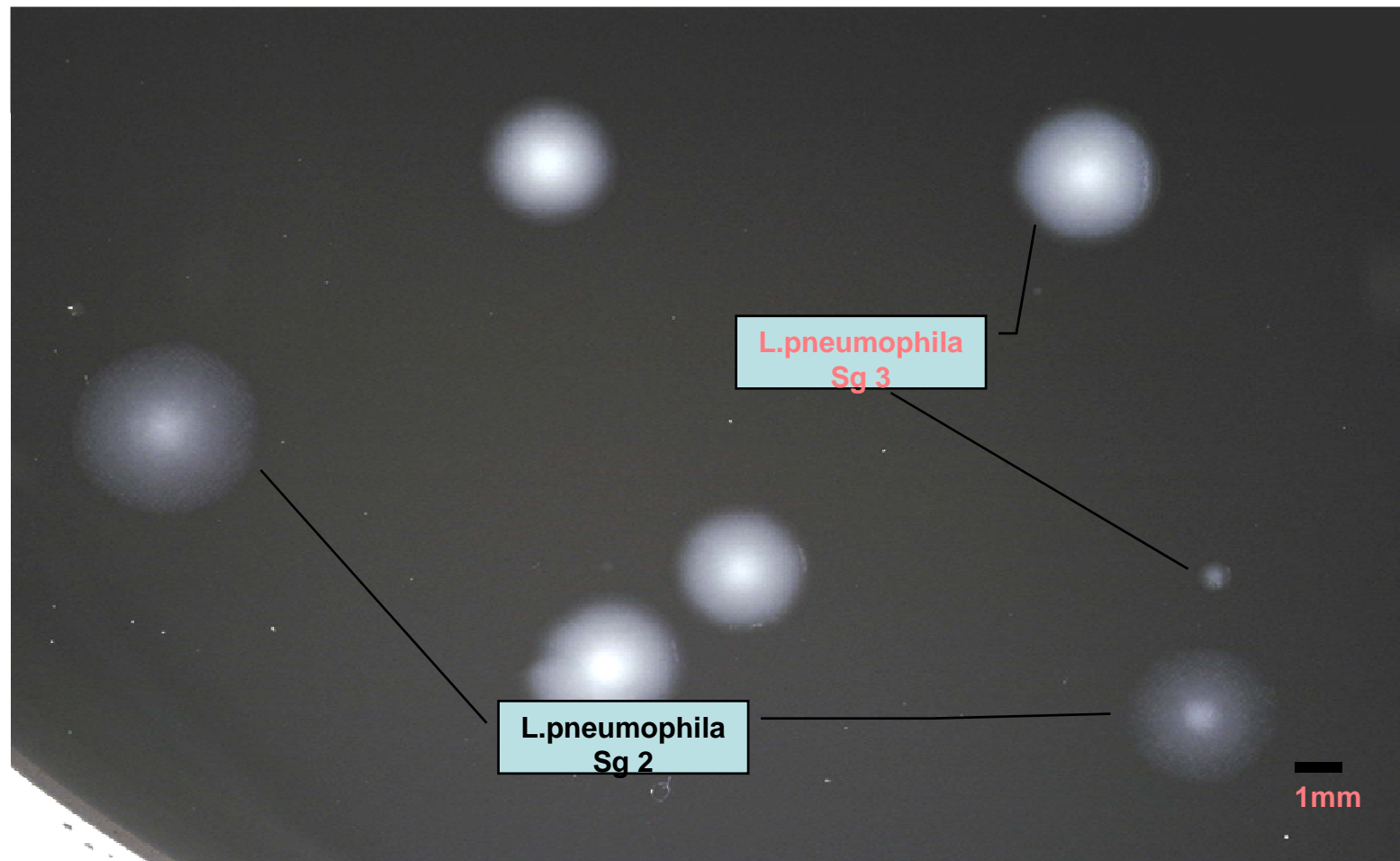
L. pneumophila
L. longbeachae
L. micdadei
L. feelei



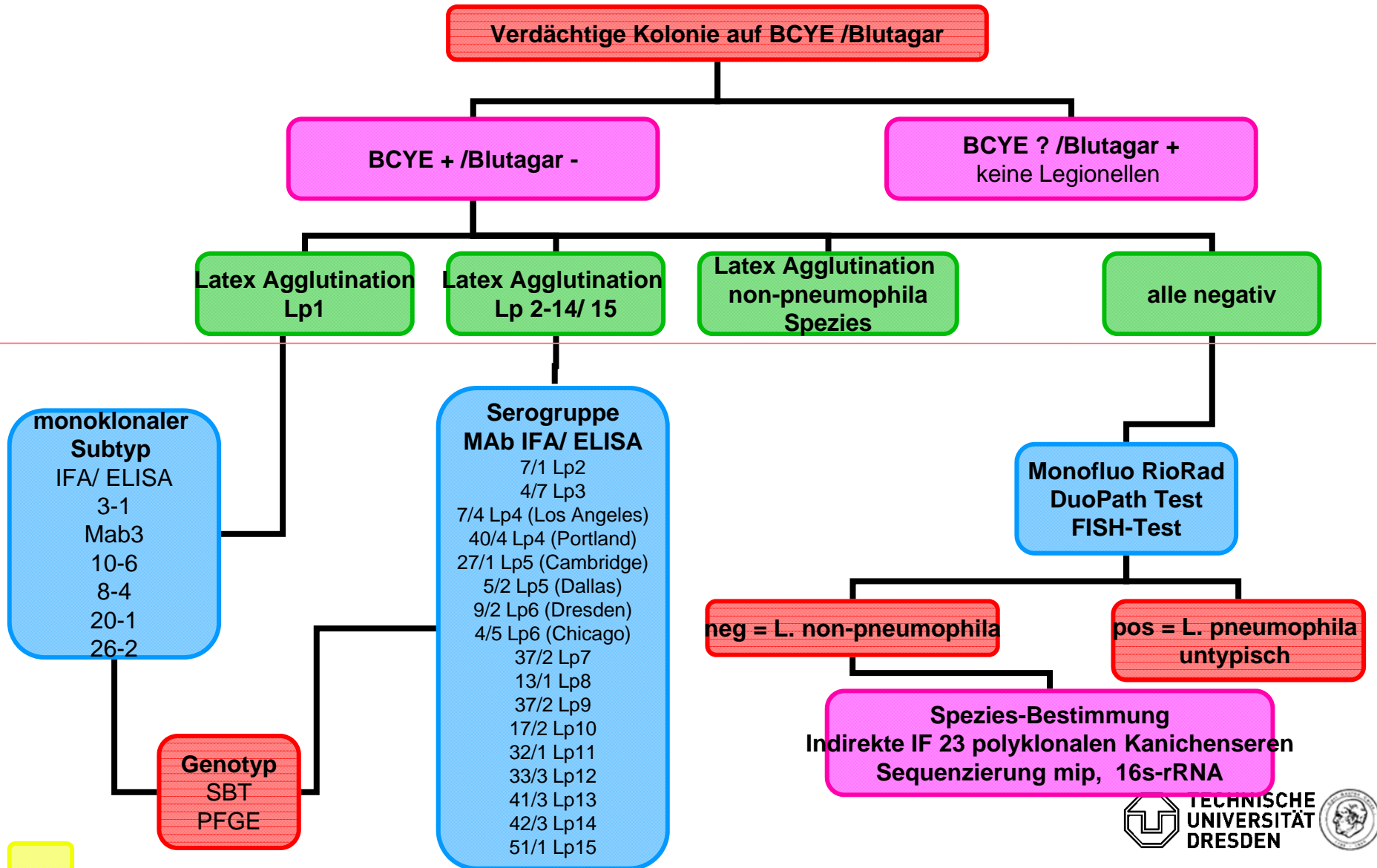
L. rubrilucens
L. Erythra
L. dresdenensis

L. bozemanii
L. anisa
L. dumoffii

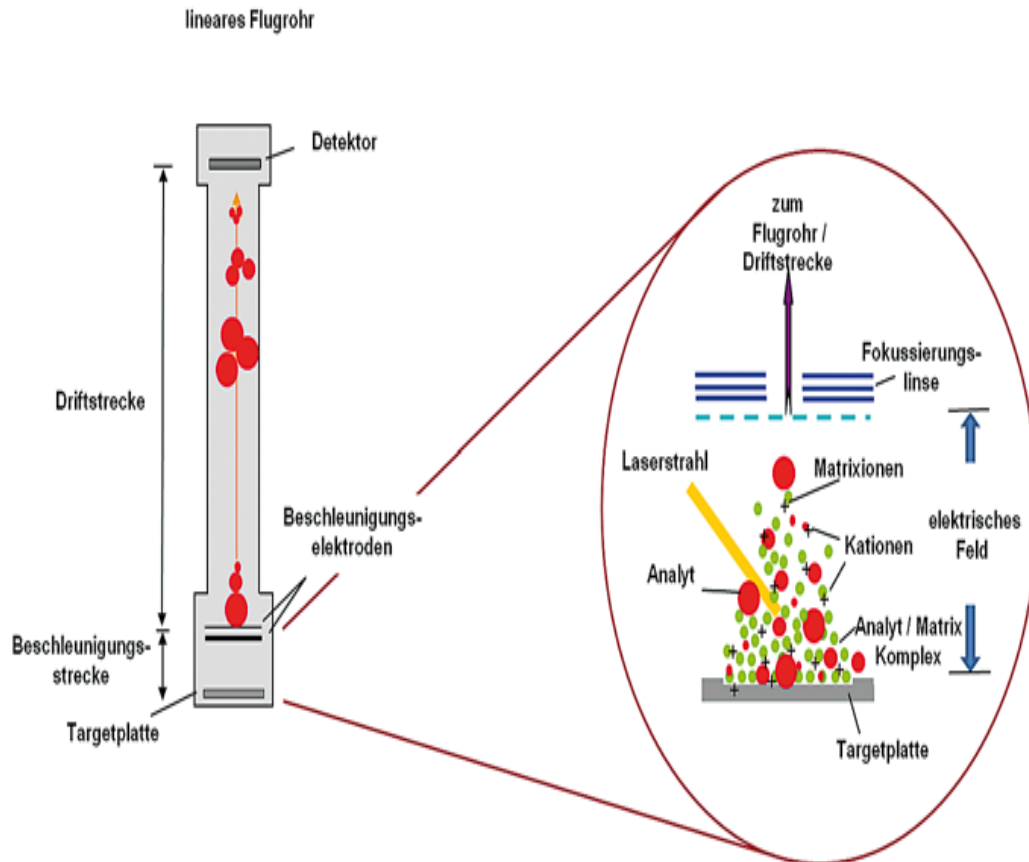
Mehrere Stämme im Wasser



Legionella - Typisierung



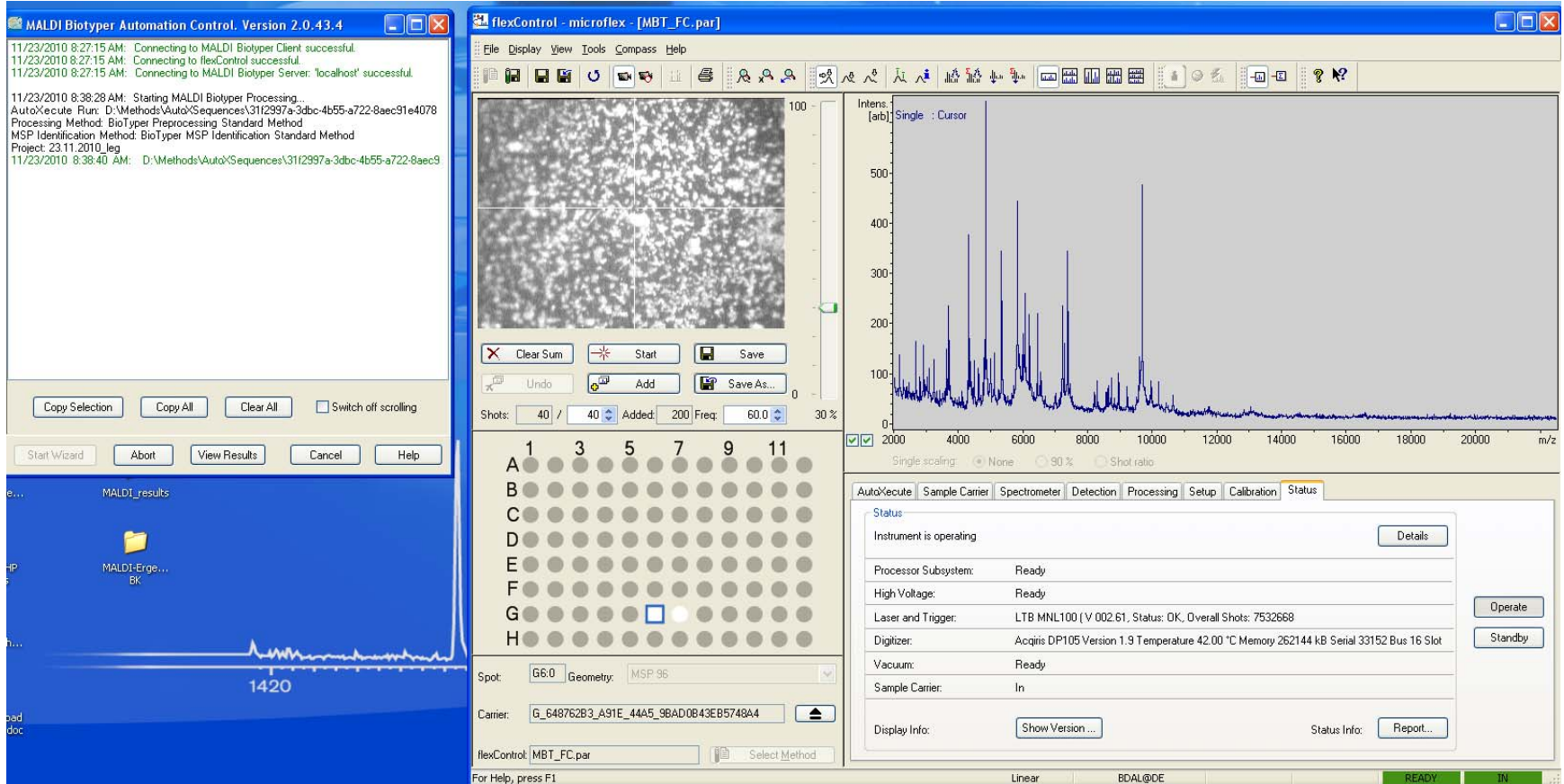
Prinzip der MALDI-TOF-MS-basierten Identifikation von Proteinen und Peptiden



- ribosomale Proteine der Kultur werden mit der Matrix nach Beschuss mit dem Laser desorbiert, ionisiert und im elektrischen Feld beschleunigt
- Auftrennung nach Ladung und Masse im Flugrohr entsprechend ihrer Ladung und Masse
- speziesspezifische Massenspektren

**matrix-assisted laser desorption/ionization
time-of-flight mass spectrometry,**

MALDI-TOF Legionella



MALDI-TOF Legionella

Analyte Name: 1019 3
Analyte Description:
Analyte ID:
Analyte Creation Date/Time: 2010-11-23 08:29:42.937
Applied MSP Library(ies):
Applied Taxonomy Tree: Bruker Taxonomy

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value
1 (++)	Legionella pneumophila ssp pneumophila ATCC 33152T THL	2.282
2 (+)	Legionella pneumophila ssp pneumophila DSM 7513T DSM	1.815
3 (-)	Legionella pneumophila ssp fraseri DSM 7514T DSM	1.615
4 (-)	Arthrobacter pascens DSM 20545T DSM	1.356
5 (-)	Legionella pneumophila ssp pascullei DSM 7515T DSM	1.35
6 (-)	Pseudomonas pertucinogena LMG 1874T HAM	1.274
7 (-)	Acinetobacter towneri DSM 14962T HAM	1.268
8 (-)	Enterococcus cecorum DSM 20683 DSM	1.232
9 (-)	Arthrobacter woluwensis DSM 10495T DSM	1.222
10 (-)	Weeksella virosa LMG 12995T HAM	1.217

Suche der Infektionsquelle

Patientenmaterial

2- 3 Kolonien



Wasserproben

mind. 10 Kolonien



1. Serologische Typisierung bei *L. pneumophila*:
Serogruppe, MAb Subtyp
bzw. Speziesbestimmung:
MALDI-TOF, DNA-Sequenz (mip, 16S rRNA)

2. Genomisches Fingerprint: PFGE, AFLP, RAPD-PCR, SBT

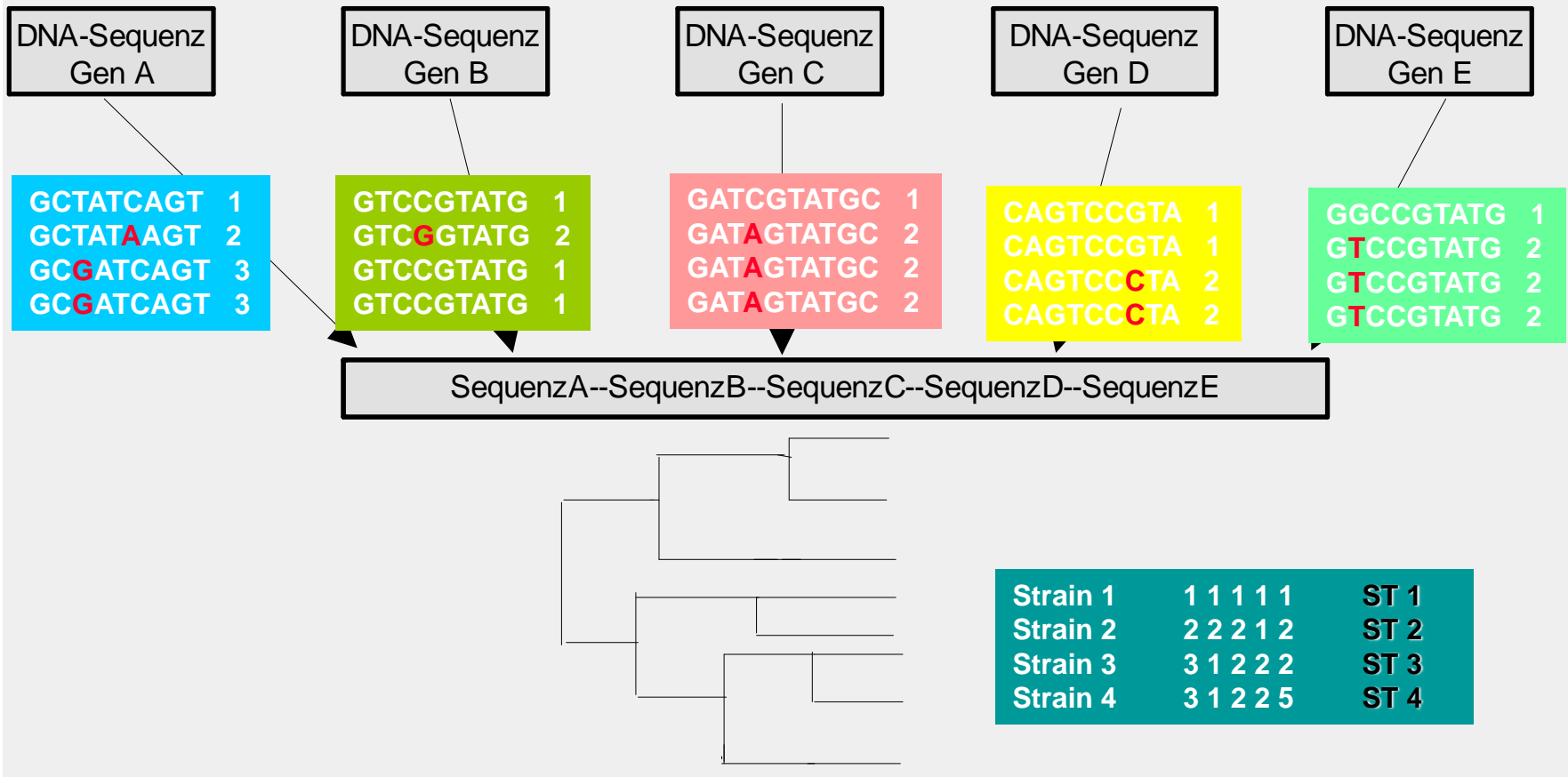
Identität >>> Übertragung aus diesem Wassersystem

Was ist eine monoklonaler (MAb) Subtyp ?

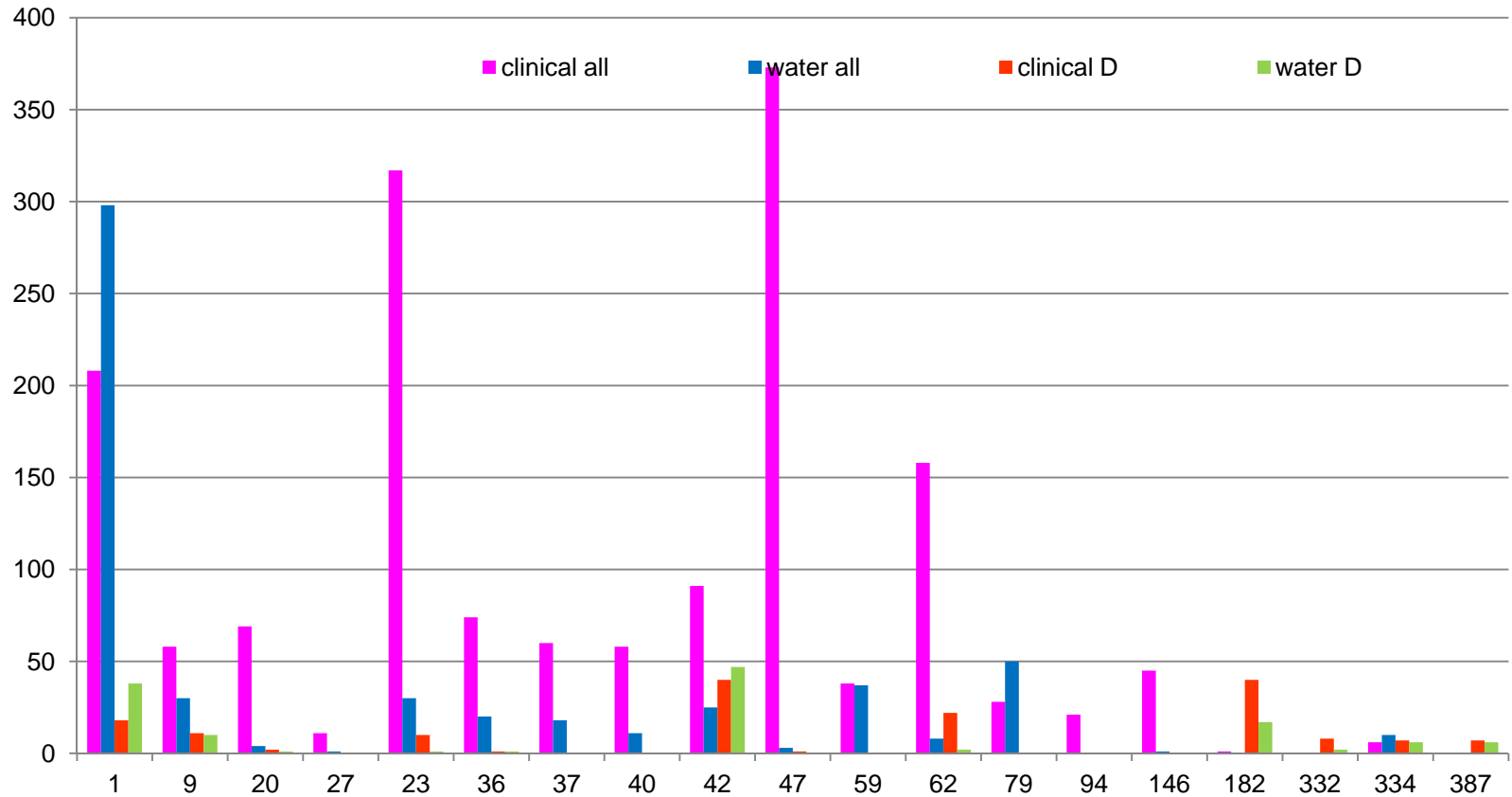
- Reaktivität mit einem Panel monoklonaler Antikörper
- Bezeichnung eines Typs nach eine Stamm mit diesem Muster z. B.
 - 1,2,3 für Knoxville
 - 1, 2, 5, 7 für Benidorm

Dresden	8/5	3/1		10/6		8/4	20/1
Standard panel	1	2	3	4	5	6	7
Type strain (ATCC)							
Philadelphia 1 (33152)	+++	+++	0	0	+++	+++	0
Allentown 1 (43016)	+++	+++	0	0	+++	0	0
Benidorm 030E (43108)	+++	+++	0	0	+++	0	+++
Knoxville 1 (33153)	+++	+++	+++	0	0	++	0
France 5811 (43112)	+++	+++	0	0	0	0	0
OLDA (43109)	+++	0	0	0	0	+++	++
Oxford 4032E (43110)	+++	0	0	0	0	+++	0
Heysham 1 (43107)	+++	0	+++	0	0	0	0
Camperdown 1 (43113)	+++	0	0	0	0	0	0
Bellingham 1 (43111)	+++	0	0	+++	0	0	++
Denver (Stout ,1988)	+++	0	+++	0	0	+++	0

Was ist ein Sequenztyp ?



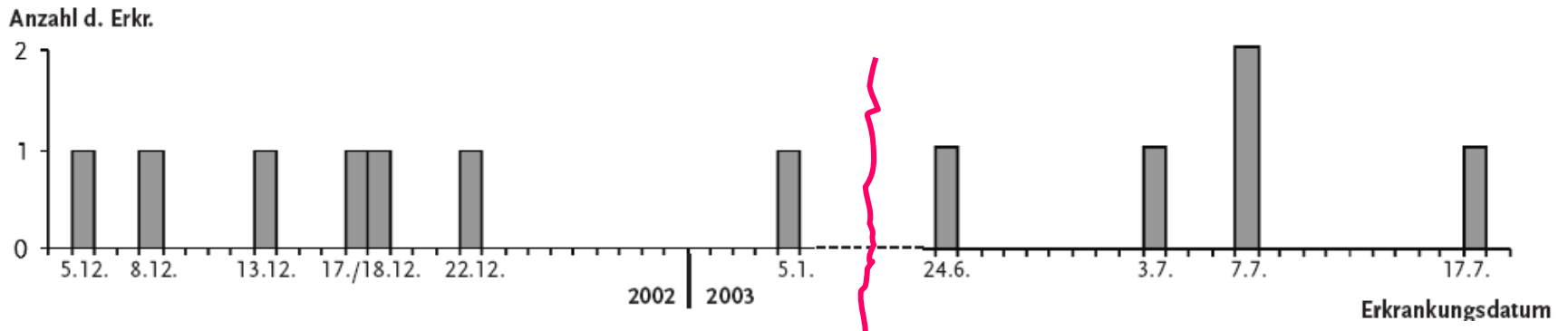
Manche ST sind häufig in Europa und D



Infektionsquellen Legionella-Pneumonien

Häufig	Warmwassersysteme in der häuslichen Umgebung, in Hotels, Bädern, im Krankenhaus, etc. >> TWVo
	Rückkühlwerke mit „feuchter Kühlung“
	Whirl Pools
Selten	Thermalbäder
	Befeuchter (Lebensmittel), Inhalatoren
	Zimmer/ Zierspringbrunnen
Sehr selten	Geburtswannen
	Magenspülsonde/ Transoesophageale Echo-Sonde , kontaminiert mit Leitungswasser
	Wundinfektionen
	Dentaleinheiten
	Strassenbearbeitungsmaschinen
	Scheibenwischernanlage
(noch) nicht:	Gewächshäuser, Autowaschanlagen,

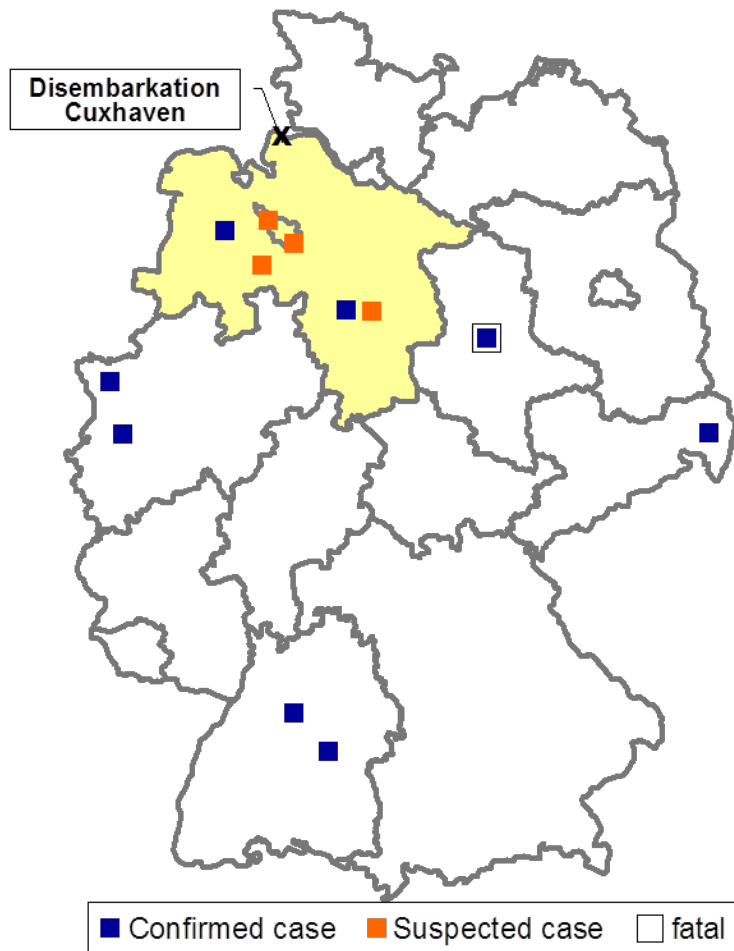
Nosokomialer Ausbruch Frankfurt/O



IQ = (Warm)wasserversorgung

- Legionella Menge initial bis 200/ml (20 000/100ml),
- Danach bis 15 /ml
- Warmwasserinstallation nah am Kaltwasser (bis 28,7°C): >200/ml
- Epidemiestamm selten aber bis 2009 nachweisbar
 - **Lp1 Knoxville ST182**
 - Lp 1 Philadelphia/OLDA ST1
 - Lp 6
 - L. gormanis, L. anisa
- Ab August 2003 keine Erkrankungen mehr

Ausbruch auf Kreuzfahrtschiff



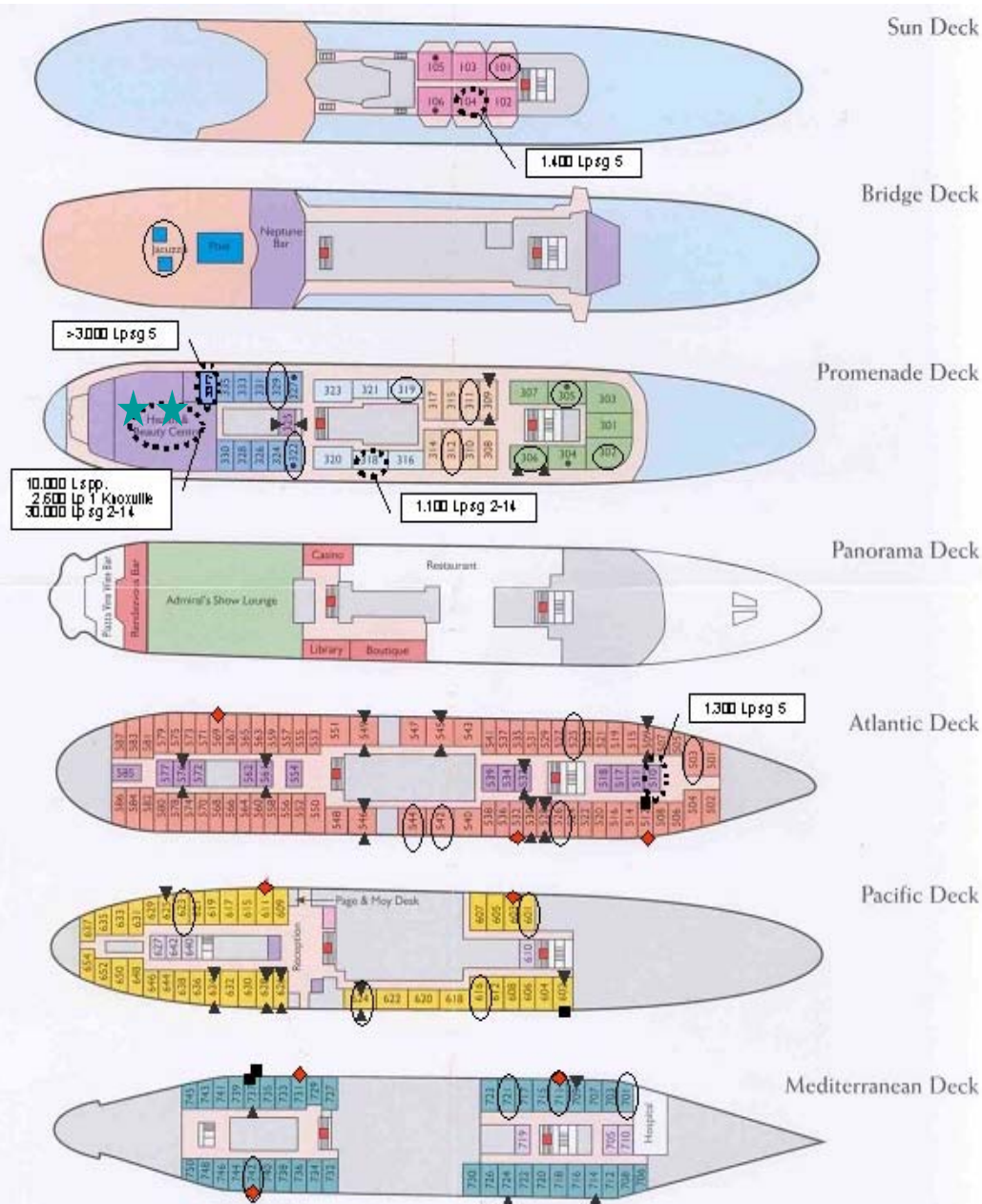
2003 8 Patienten

- 2x Kultur
 - Lp1 Knoxville, ST35
 - bisher nur je 1x in D, NL, Can
- Urin Ag positiv 5x
- Antikörper positiv 3x

39 Personen ohne Symptome
waren nach 6 Wochen
Antikörper negativ

2008 erneuter Fall gleicher
Stamm

LD-Ausbruch Kreuzfahrtschiff



- ◆ Bestätigter Fall
- Verdachtsfall
- ▲ Kontrollperson
- Positiver Legionellen Nachweis (<1.000 KBE/L)
- ⊗ Positiver Legionellen Nachweis (>1.000 KBE/L)

Kaltwasserproben: 46% positiv
Warmwasserproben: 36% positiv

2003

L. Spezies

L. pneumophila

Sg 1 (7x MAbtyp Oxford)

Sg 1 (**2x MAbtyp Knoxville, ST35**)

Whirlpool

Dusche beim Friseur

Sg 3, 5, 10 (54x)

2008

9/10 Wasserproben <100/100ml

Der „Verursacher“ kann selten sein

Case Hotel Cochem – Pat. Hannover

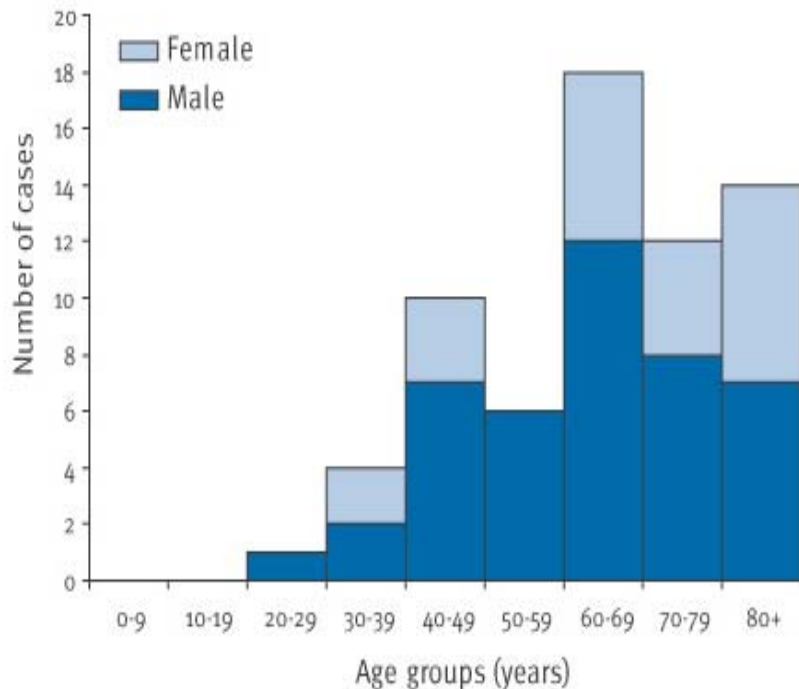


Direkter Nachweis DNA nSBT aus Patienten:
Vergleich mit Wasserisolaten
Keine Übereinstimmung

2010 Ausbruch Ulm

FIGURE 1

Age and sex distribution in patients with Legionnaires' disease, Ulm/Neu Ulm, Germany, as of 22 January 2010 (n=65)



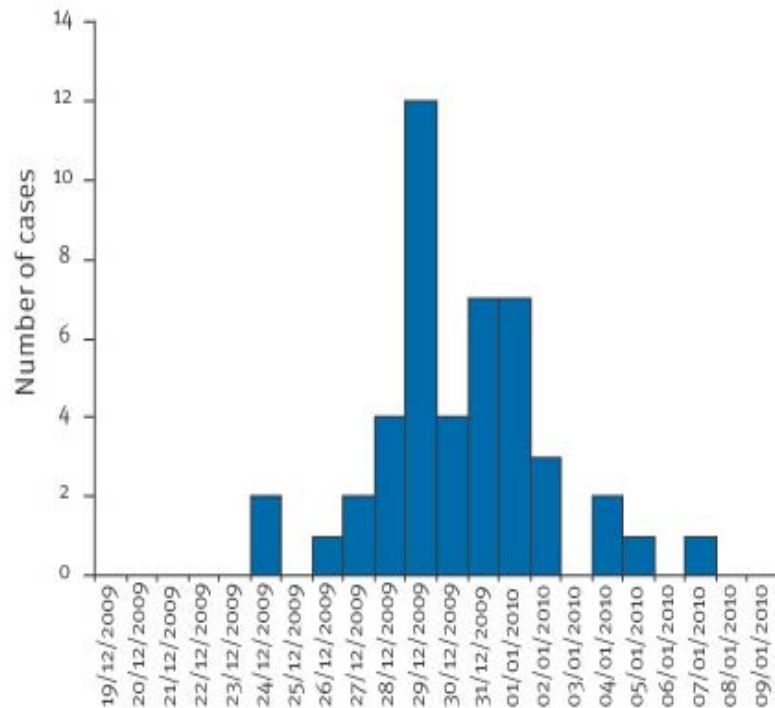
- Daran denken !!!
- Schnelle Diagnose durch chromatographischen Schnelltest
- Bestätigung Urin AG-ELISA
- PCR
- Intensive Kulturversuche
 - 8 Isolate von Patienten
 - Alle Lp1, Latex-Agglutination
 - Mabtype Knoxville
 - Sequenztyp 62

Von Baum et al. Euro Surveill. 2010;15(4):1-2

2010 Ausbruch Ulm

FIGURE 2

Onset of disease in patients with Legionnaires' disease, Ulm/Neu Ulm, Germany, information available as of 22 January 2010, (n=46)

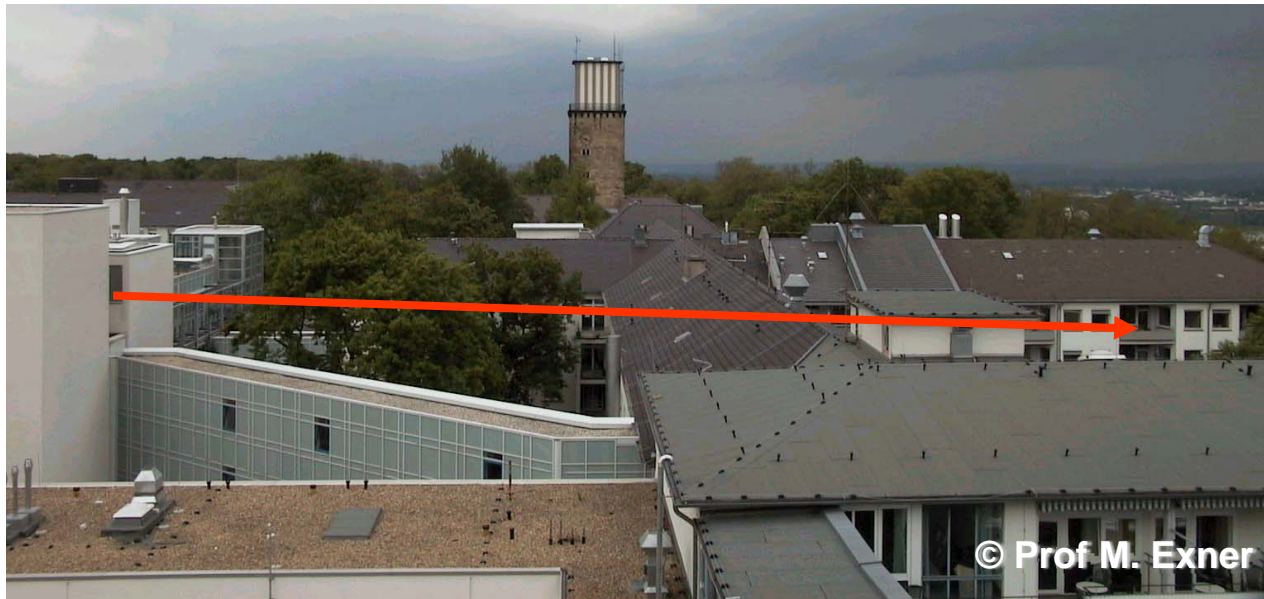


- Infektionsquelle
 - Epidemiologisch keine gemeinsame „Quelle“
 - Schwimmbad
 - Feier
 - Reisen/ Hotel
 - diffus über die Stadt verteilt
 - >>Rückkühlwerk
 - 9/30 Kultur Legionella pos
 - 5x Lp1
 - 1x Mabtyp Knoxville, ST 62
- Intermittierender Betrieb seit Sommer 2009
- Wetterlage:
 - Relativ warm
 - Dichte Wolkenschicht

Von Baum et al. Euro Surveill. 2010;15(4):1-2

Nosokomiale Legionellose

Rückkühlwerk in Klinik, Deutschland, 2003



- Einzelfall im KH:
- Ambulant übertragbar
- *L. pneumophila* Sg1, Mabtyp Knoxville, ST 31 einmalig bisher
- Abstand Balkon – RKW ca 70m
- Die Übertragung vermutlich durch Inversionswetterlage gefördert
- Im KH Wasser andere Stämme: Lp 2-14

Legionella in Trinkwassersystemen: Wann müssen wir sie fürchten ?

- Epidemiologie beginnt mit der Diagnose
 - 700 gemeldete versus mind.10 000 geschätzte Fälle
- Diagnostische Methoden sind besser als ihr Ruf
- Aufmerksamkeit
- Legionellen im Wasser
 - Infektion - kann sein – muss aber nicht
 - Ist es wichtiger Infektionen zu detektieren als Legionellen im Wasser ?
- Routine Wasserkontrollen
 - Im KH ja
 - Sonstiges Umfeld ??

Legionella in Trinkwassersystemen: Wann müssen wir sie fürchten ?

- Virulente Legionellen
 - Kommen auch ohne Erkrankungen vor oder
 - finden wir die Erkrankungen nicht
- Keimzahl im Wasser kann schwanken - 10 -100 fach
 - Unterschiedliche “Virulenz“
 - Prädiktion von „Markern“
- gut bei klinischen Stämmen
- Von Umweltstämmen schlecht
- Fokussieren auf „virulente Klone“ ??
 - Mab2, 3-1 positiv
 - Sequenztyp
 - Non-pneumophila Spezies

Nationales Konsiliarlabor für Legionellen

- Technische Universität Dresden
- Institut f. Medizinische Mikrobiologie u. Hygiene
- Dr. Christian Lück
- Fiedlerstr. 42
- 01307 Dresden

- Tel.: 0351- 458- 6580/ 6213 Fax: 0351- 458- 6310

- e-mail: Christian.Lueck@tu-dresden.de
- <http://www.konsiliarlabor-legionella.de>