



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

Rostock, 01.03.2012

Christian Lück

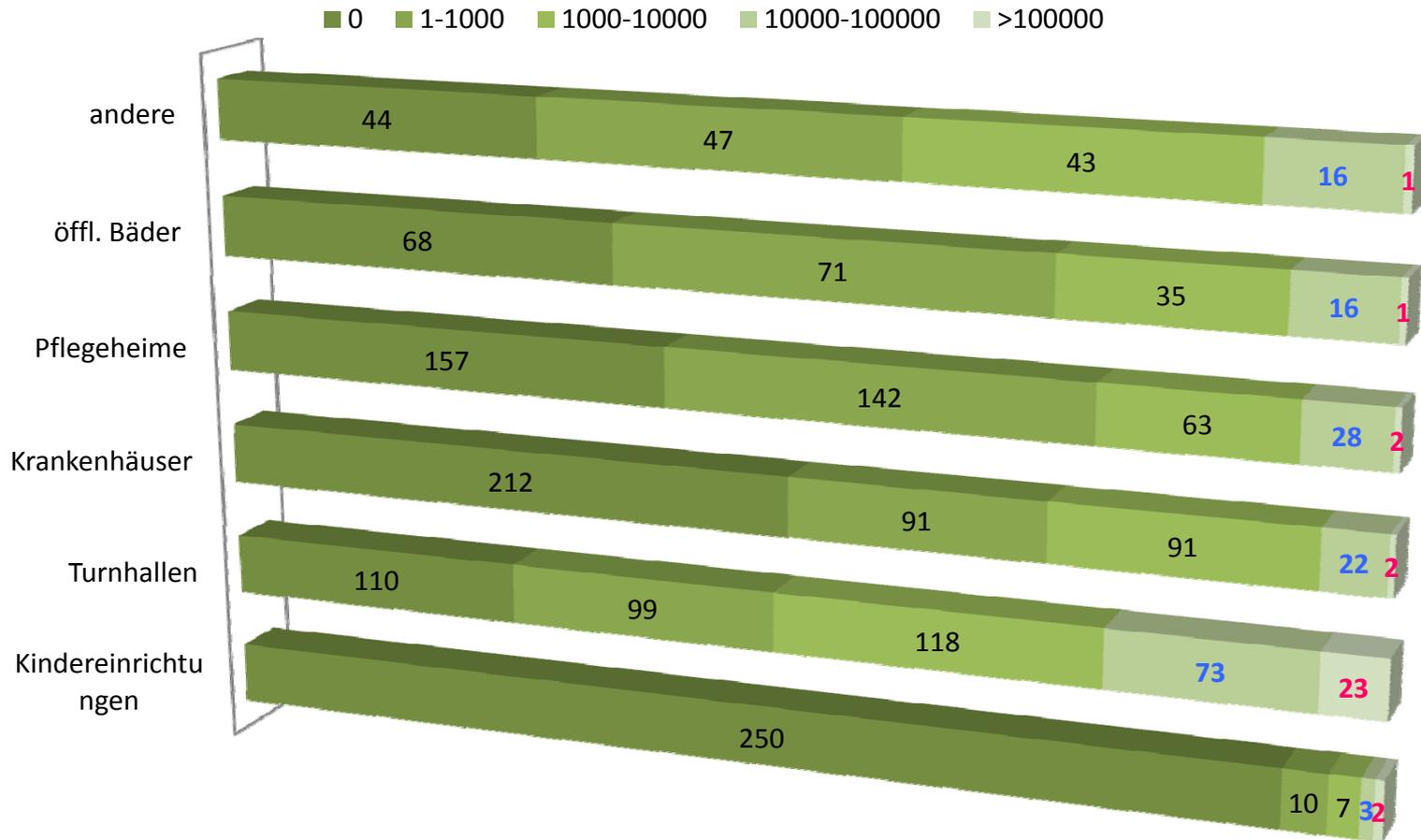
Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene

TU Dresden

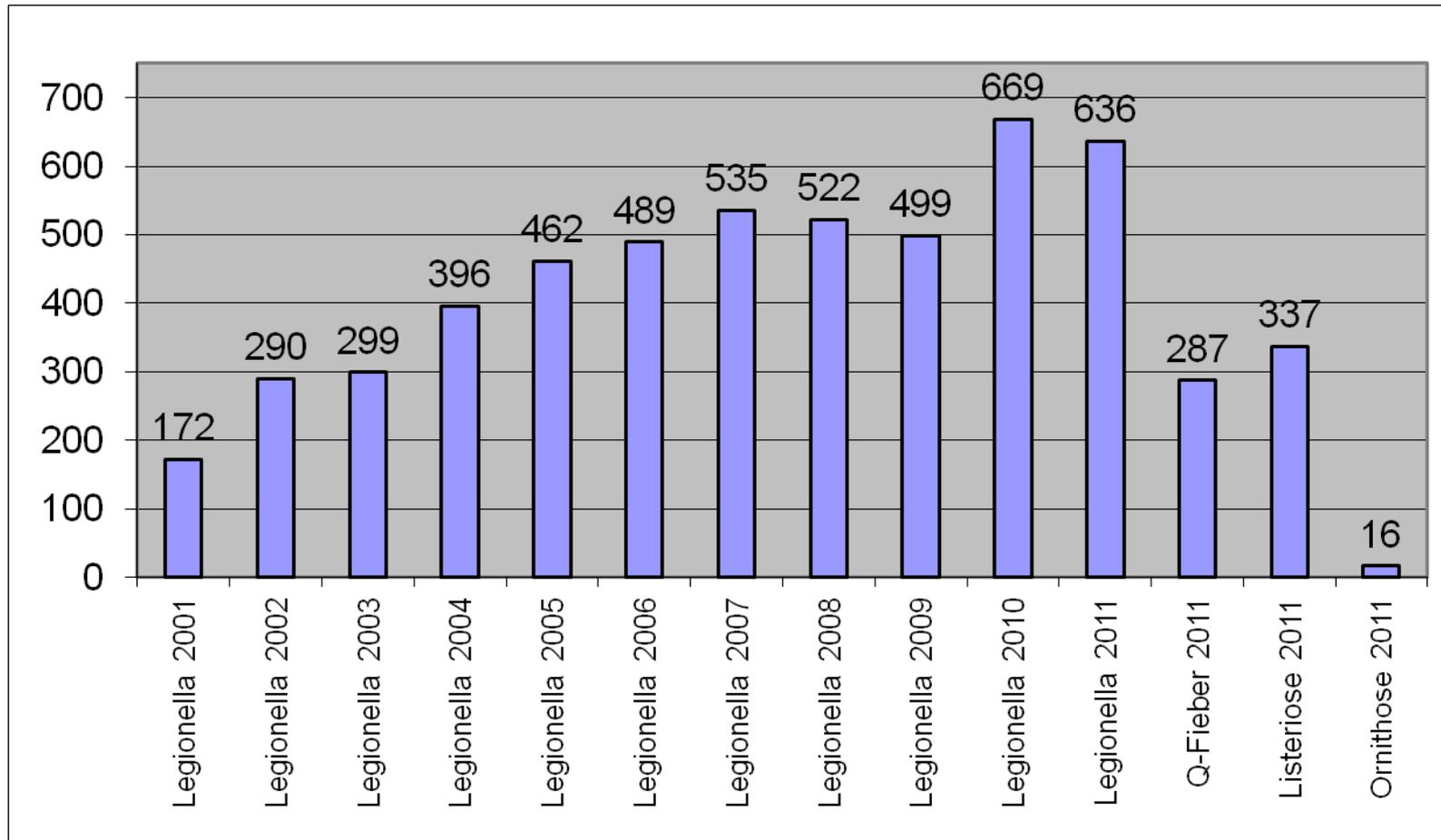
Konsiliarlabor für Legionella am Robert Koch Institut



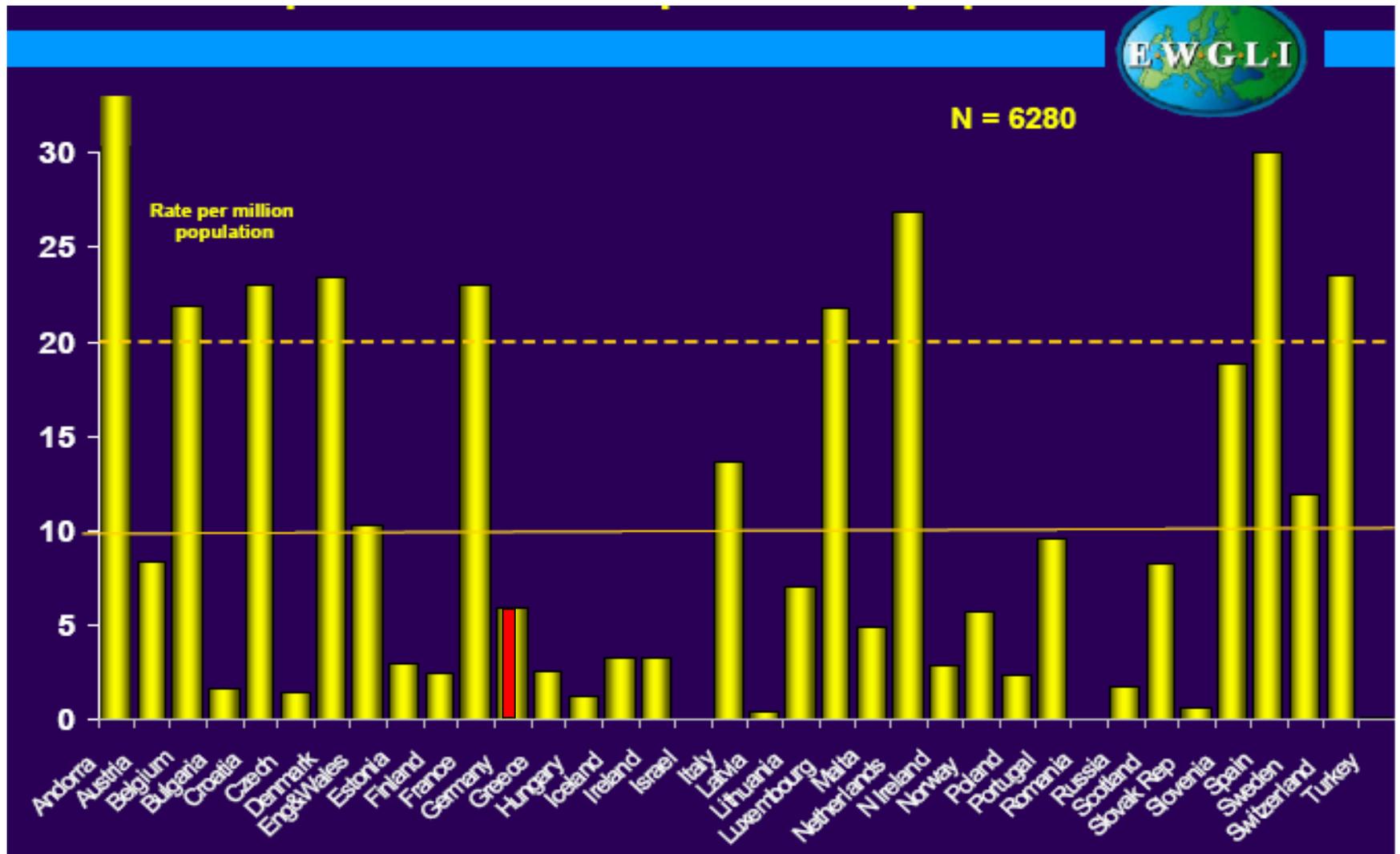
# Vorkommen von Legionellen in Gebäuden KbE/



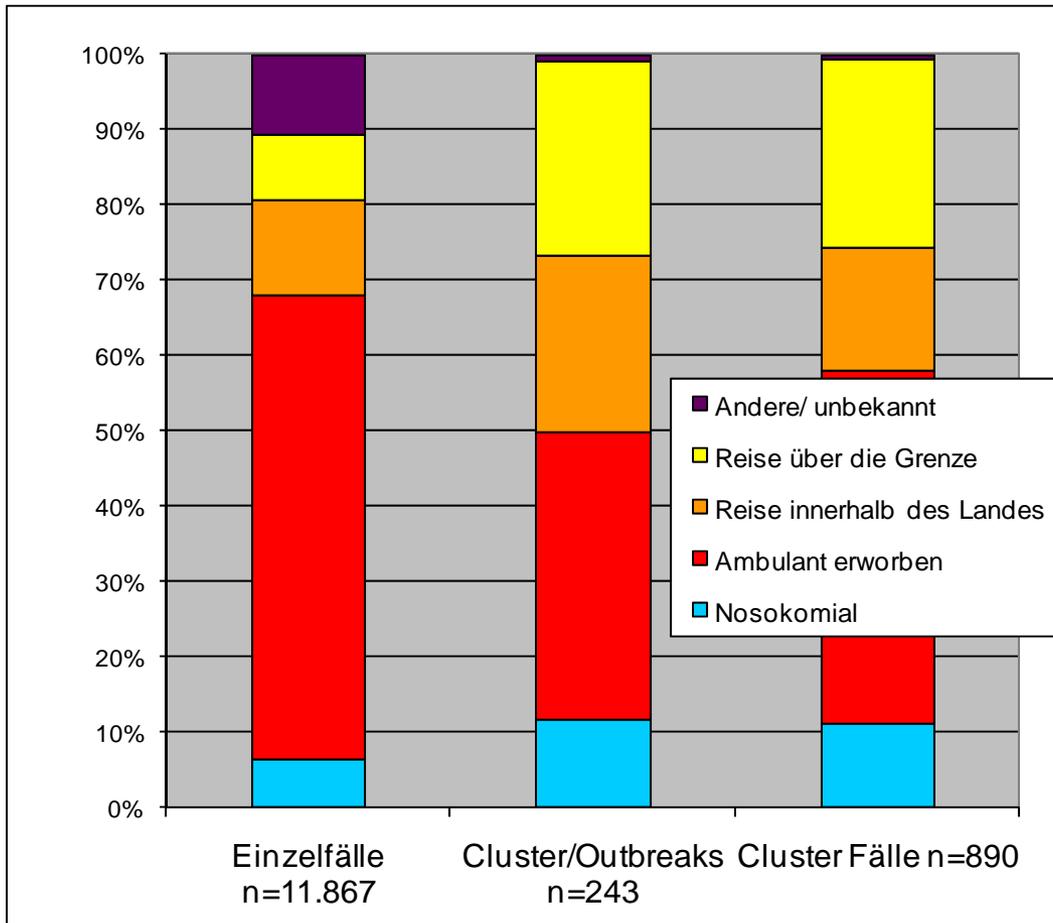
# An RKI gemeldete Legionellose geschätzte Anzahl 15 000-30 000



# Europe: Rate per million population per year

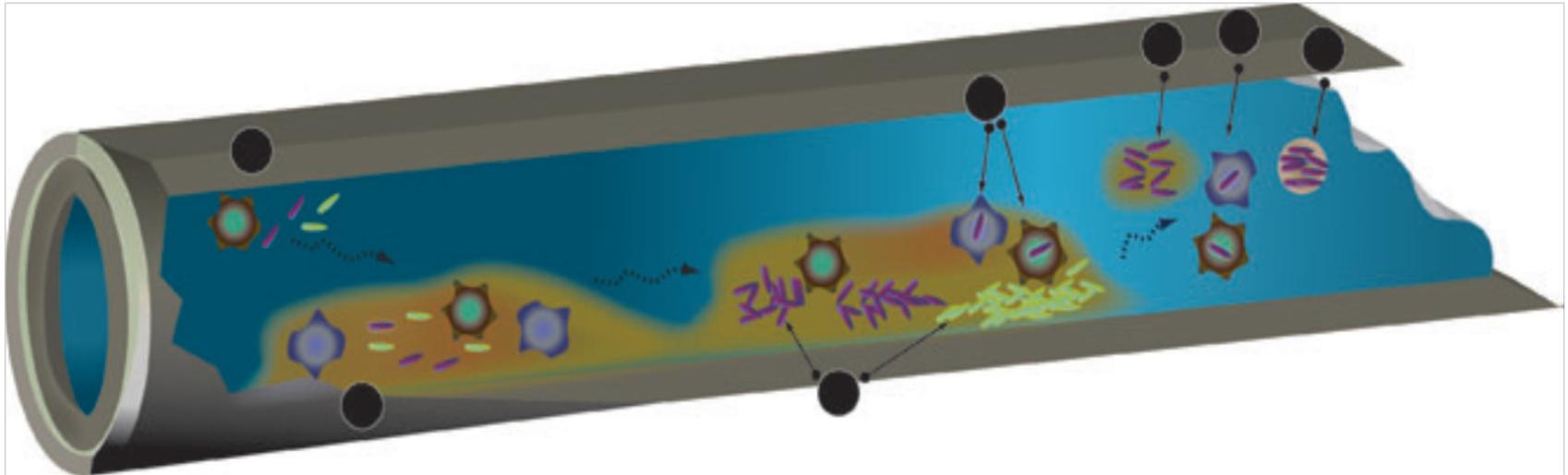


# Legionnaires' disease 2007-2008 (n=11,867)



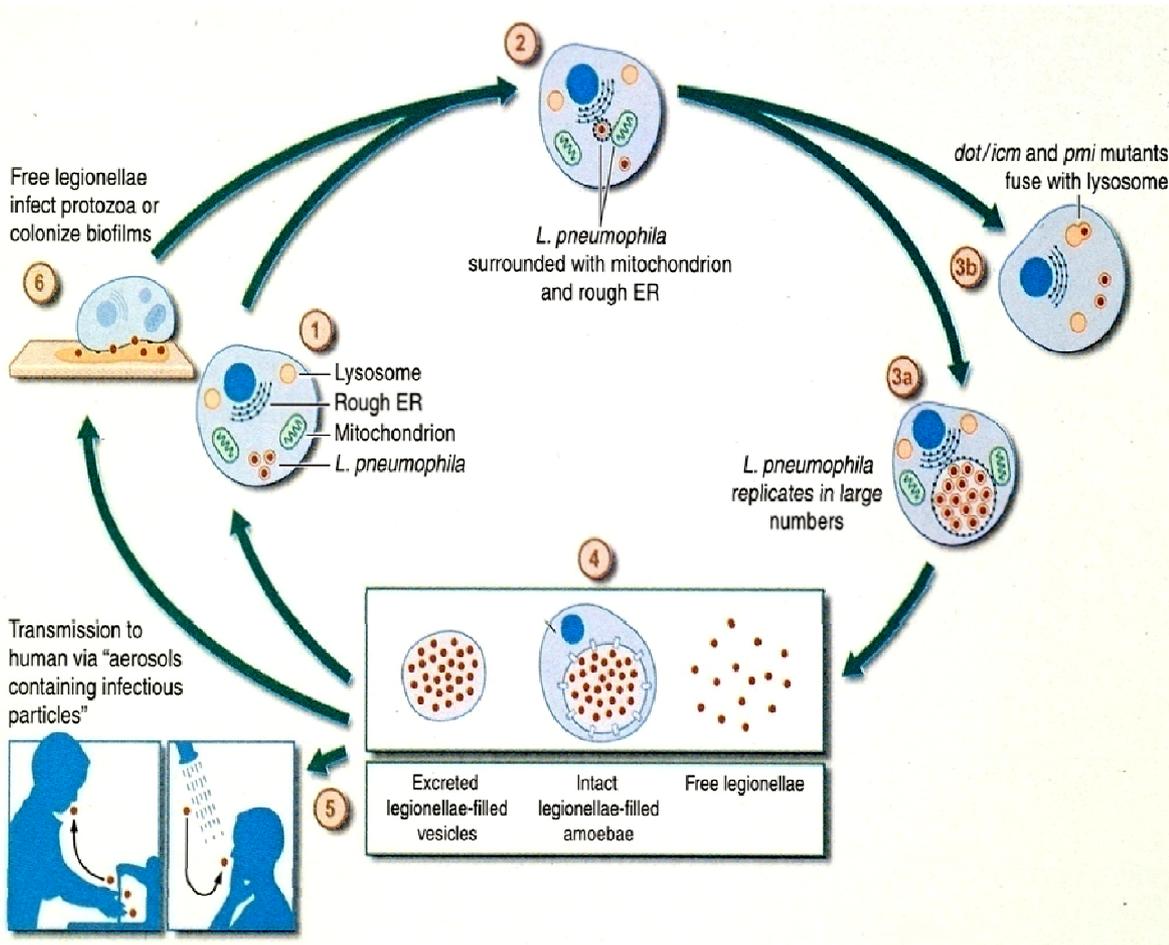
- Fall-Definitionen bevorteilen CAP
  - nosokomial
  - ambulant erworben
  - Reise-assoziiert
  
- sporadische Einzelerkrankungen
  
- Gruppenerkrankungen (7,5%)
  - Cluster
  - Epidemien
  
- zeitlich begrenzt
  
- hyperendemisch

# Biofilm



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

# Ökologie von Legionellen

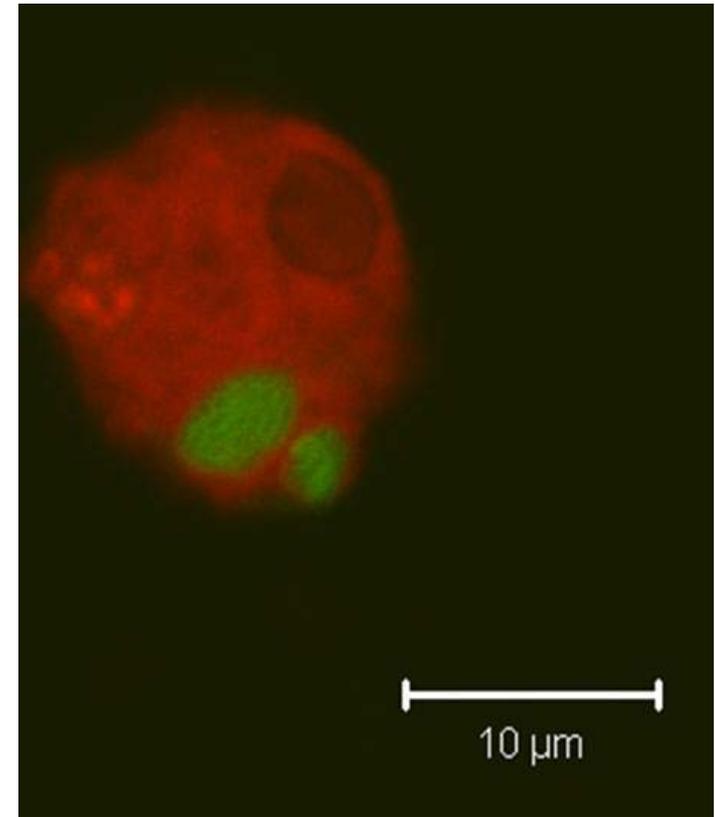


AbuKwaik 2002

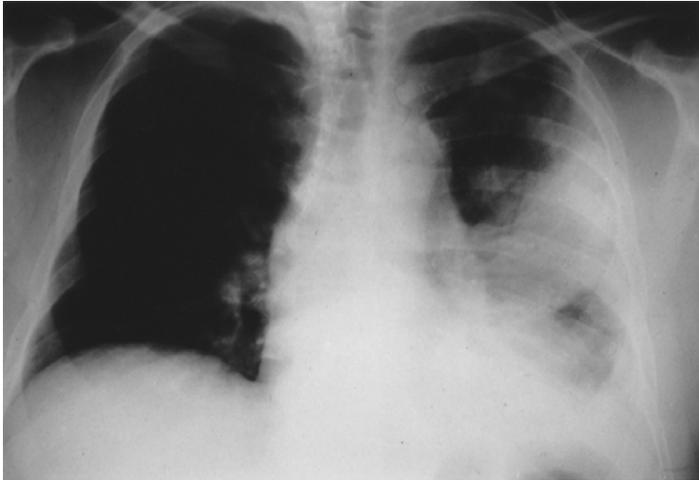
- Alle Legionellen müssen sich in der Umwelt vermehren
- Amöben bestimmen die Kolonisierung eines Endstranges
- Umweltresistenz
- 57 beschriebene Spezies
  - *L. pneumophila*
    - Serogruppe 1
      - **MAB 3-1 positiv**
  - *L. bozemanii*
  - *L. micdadei*
  - *L. longbeachae*

# 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

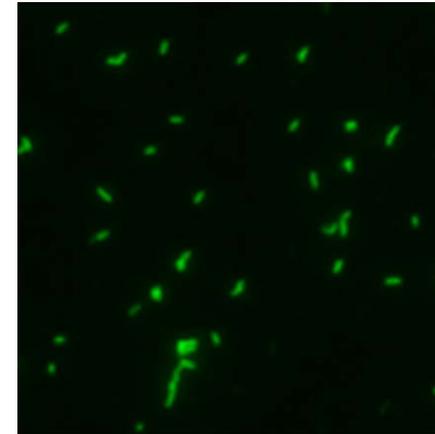
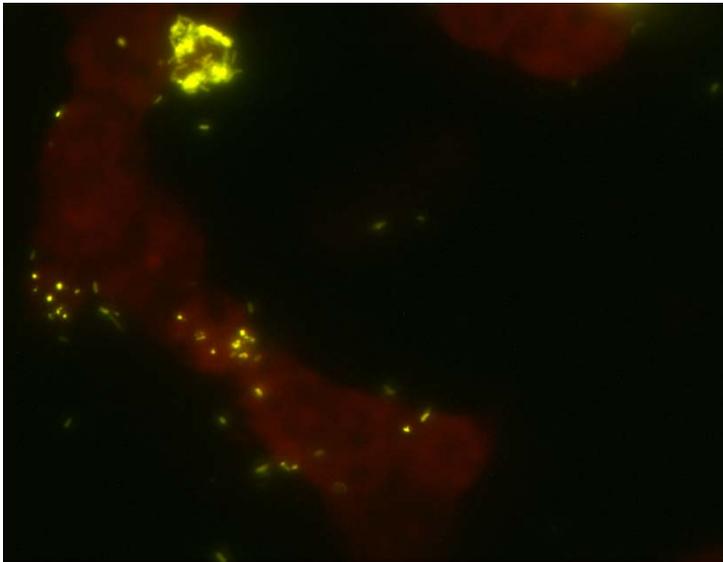


Reise nach Italien  
Kultur von *L. pneumophila*  
Sg1, MAbtyp Philadelphia

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

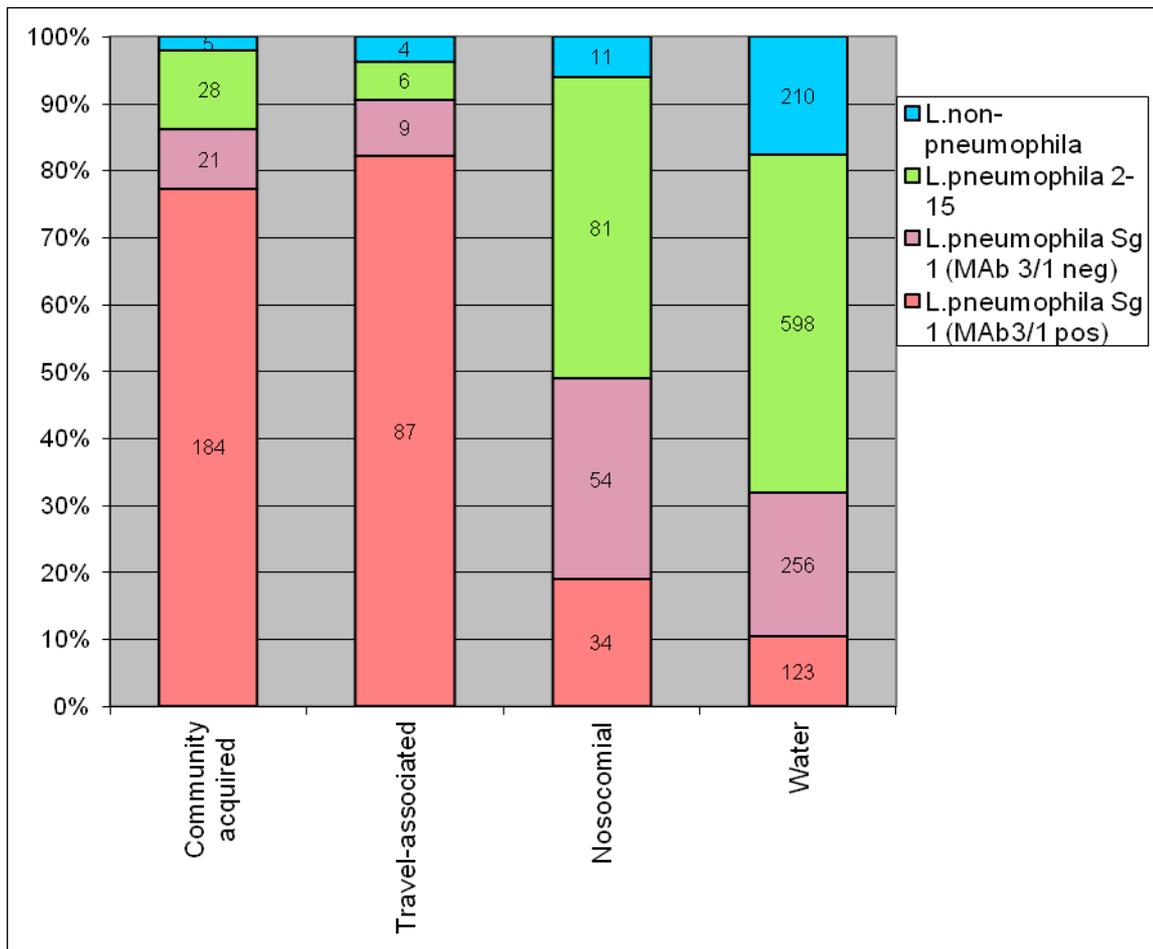
# Transmission von Legionellen: little and large particle theory

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



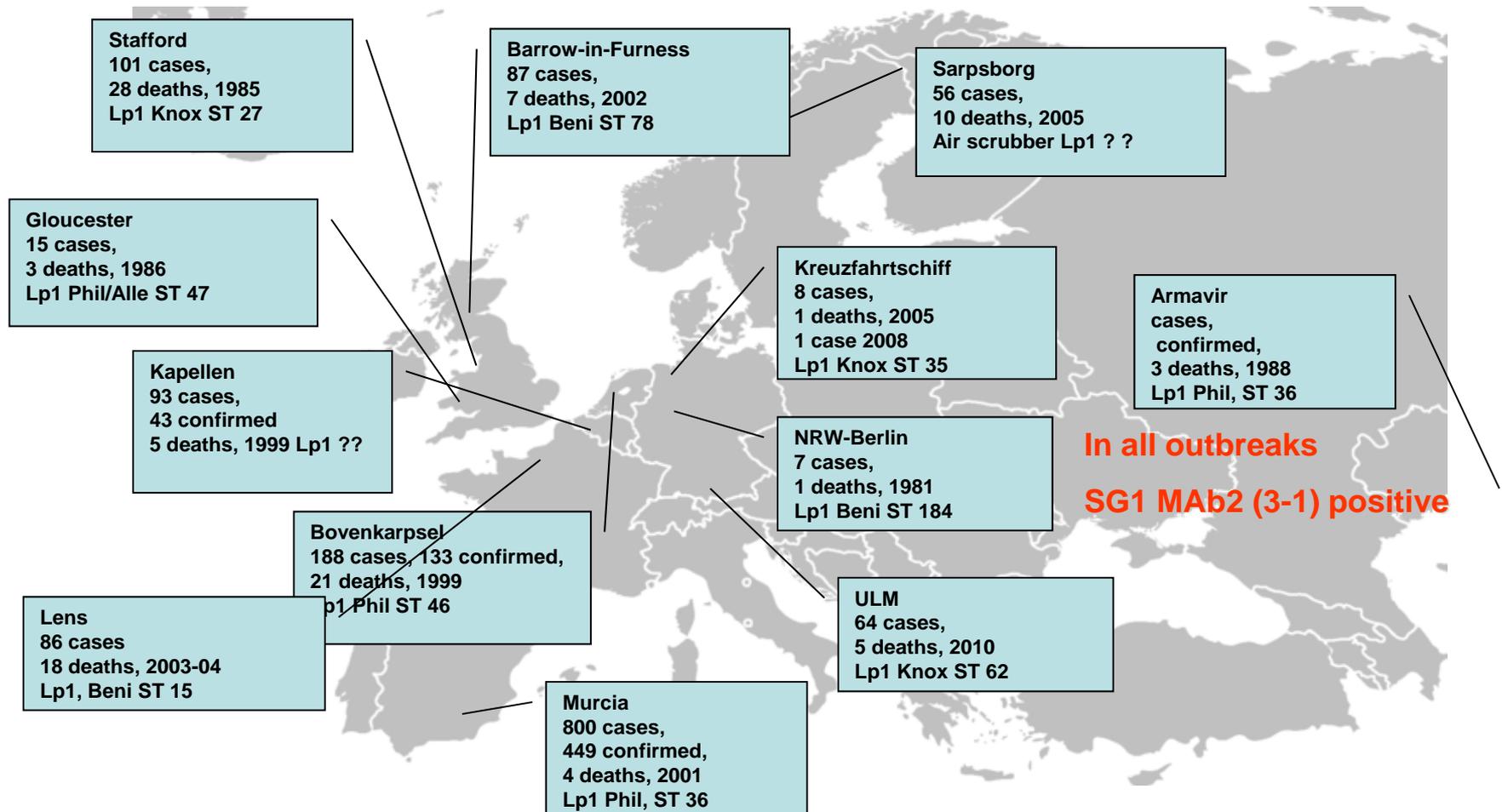
- little particles
- Schlechte Adaptation an intrazelluläres Milieu
- freie Legionellen
- viable but not culturable
- **Pontiac-fever**

# 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

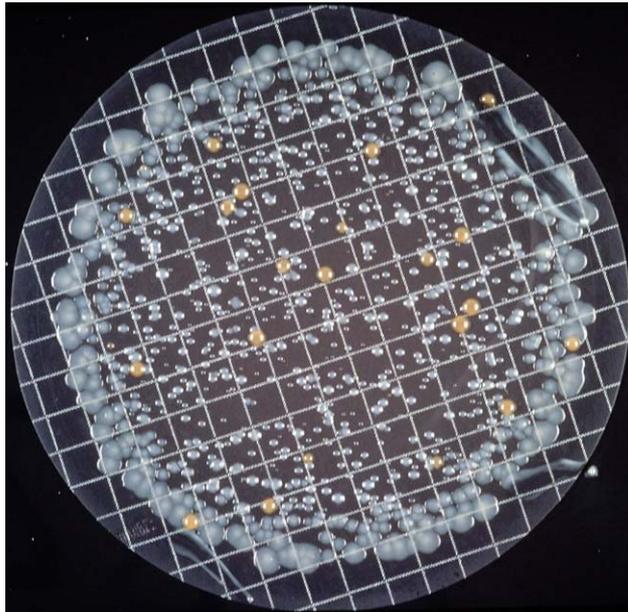
## Wirtsfaktoren

Transplantation,  
Kortikosteroide,  
TNF alpha Antagonisten  
Schluckstörungen  
Alter, Raucher



# Kultur von Legionellen aus Wasser

## Direktansatz

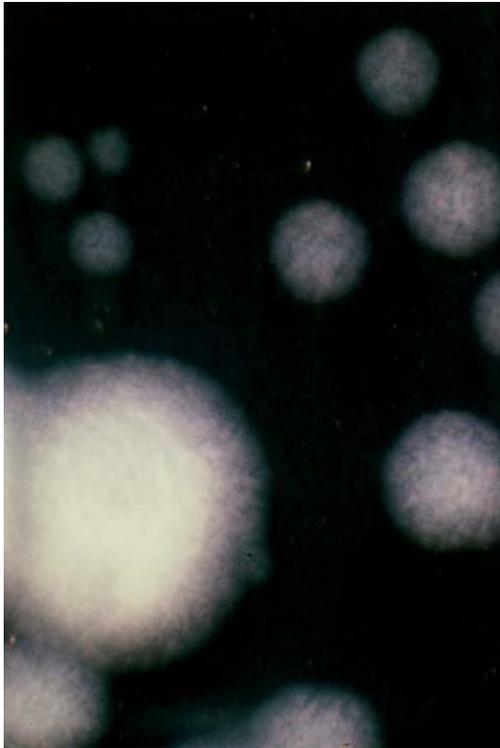


## Subkultur

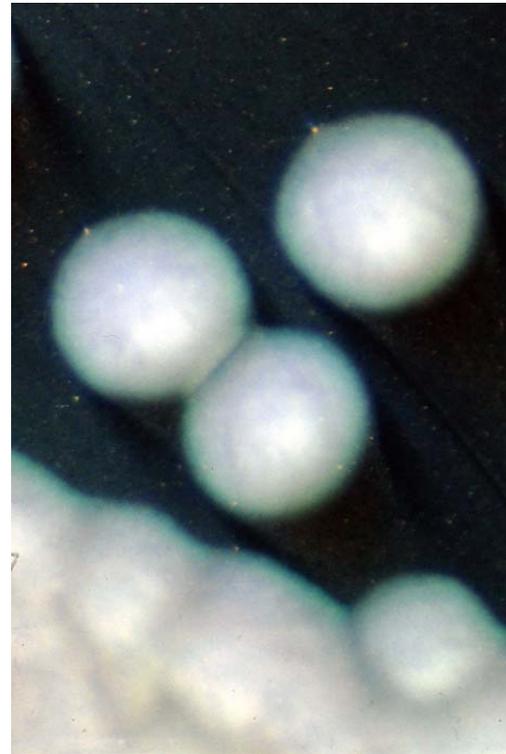


# Koloniemorphe von Legionellen/Pseudomonas

Legionellen



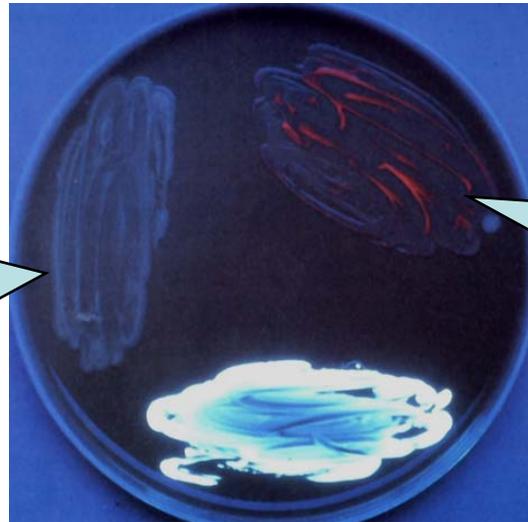
Pseudomonas



# Kultur von Legionellen: Autofluoreszenz

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

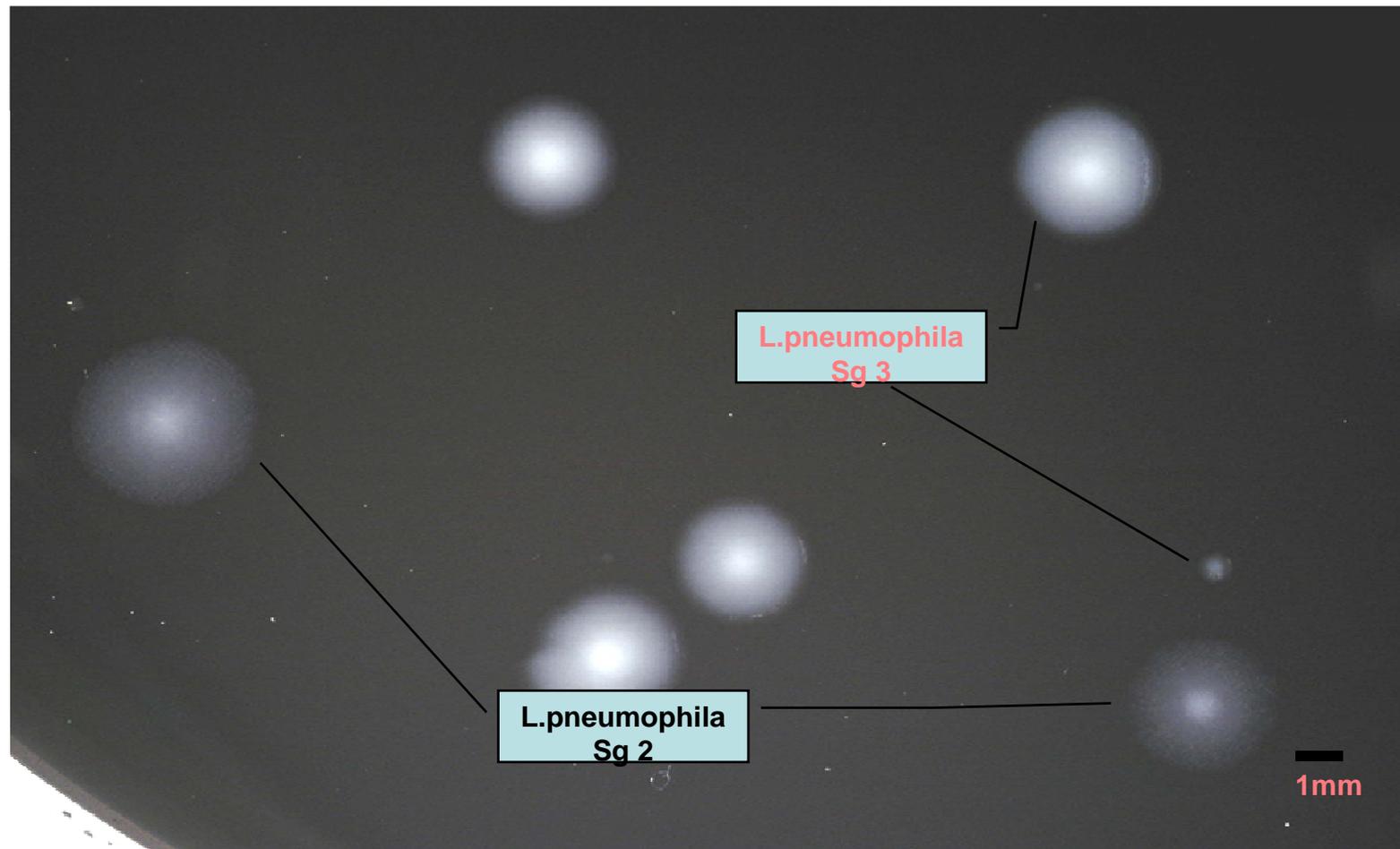
**L. pneumophila**  
**L. longbeachae**  
**L. micdadei**  
**L. feelei**



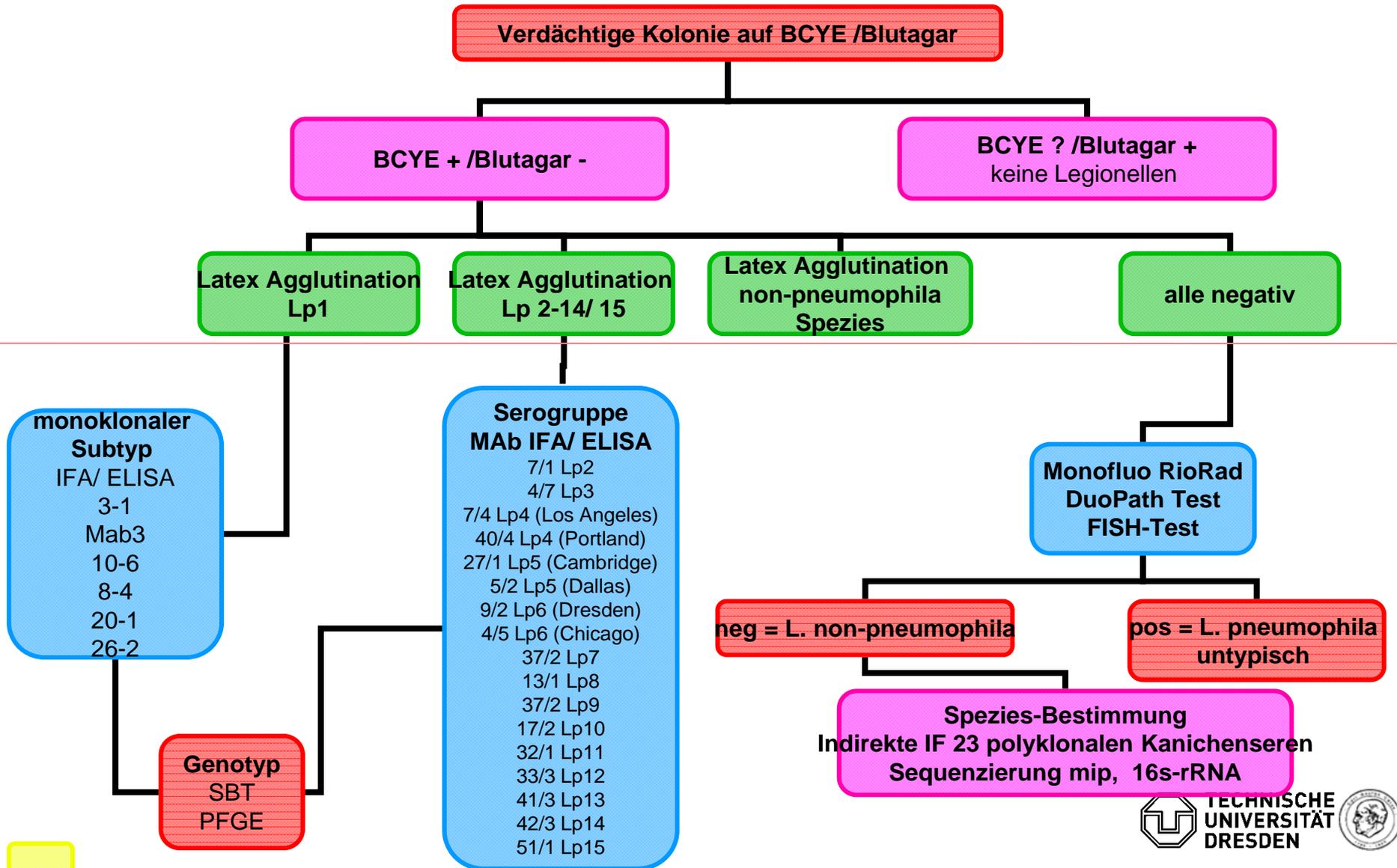
**L. rubrilucens**  
**L. Erythra**  
**L. dresdenensis**

**L. bozemanii**  
**L. anisa**  
**L. dumoffii**

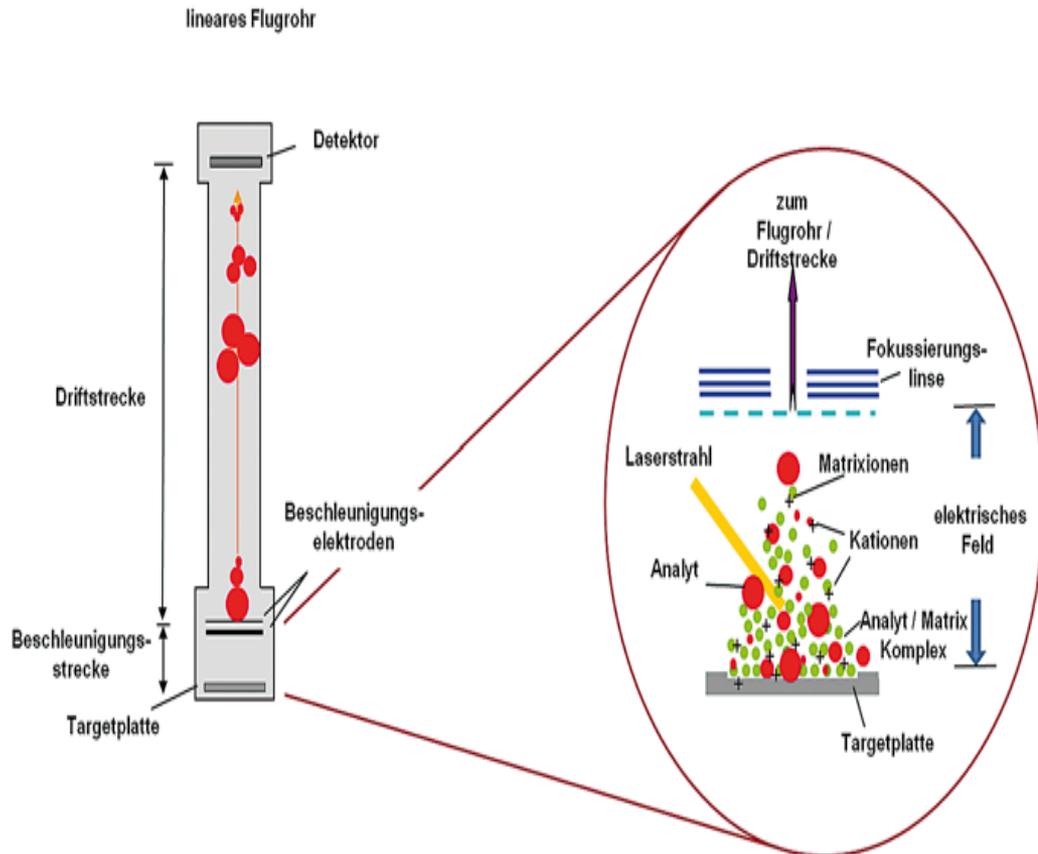
# Mehrere Stämme im Wasser



# Legionella - Typisierung



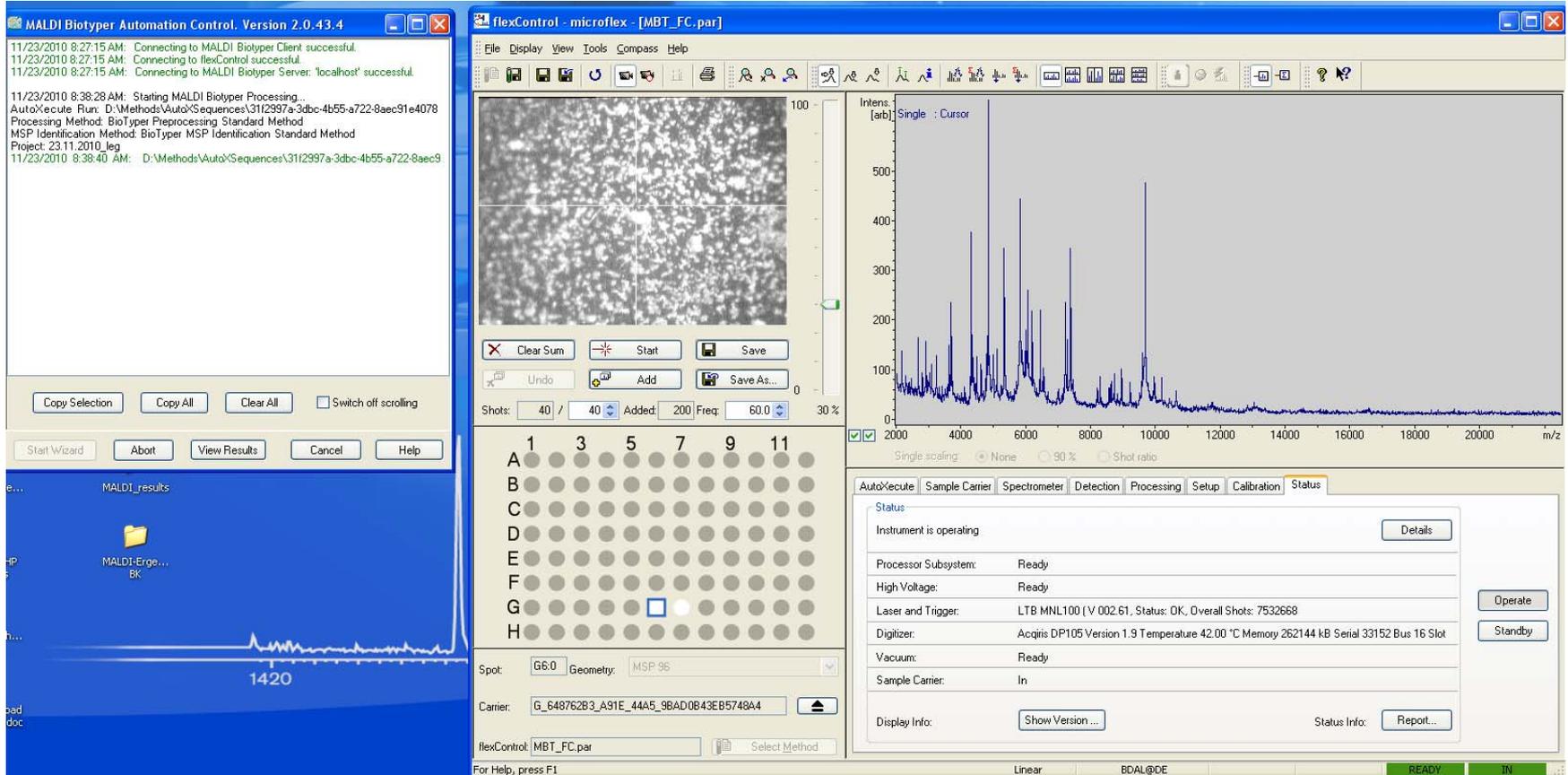
# Prinzip der MALDI-TOF-MS-basierten Identifikation von Proteinen und Peptiden



- 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

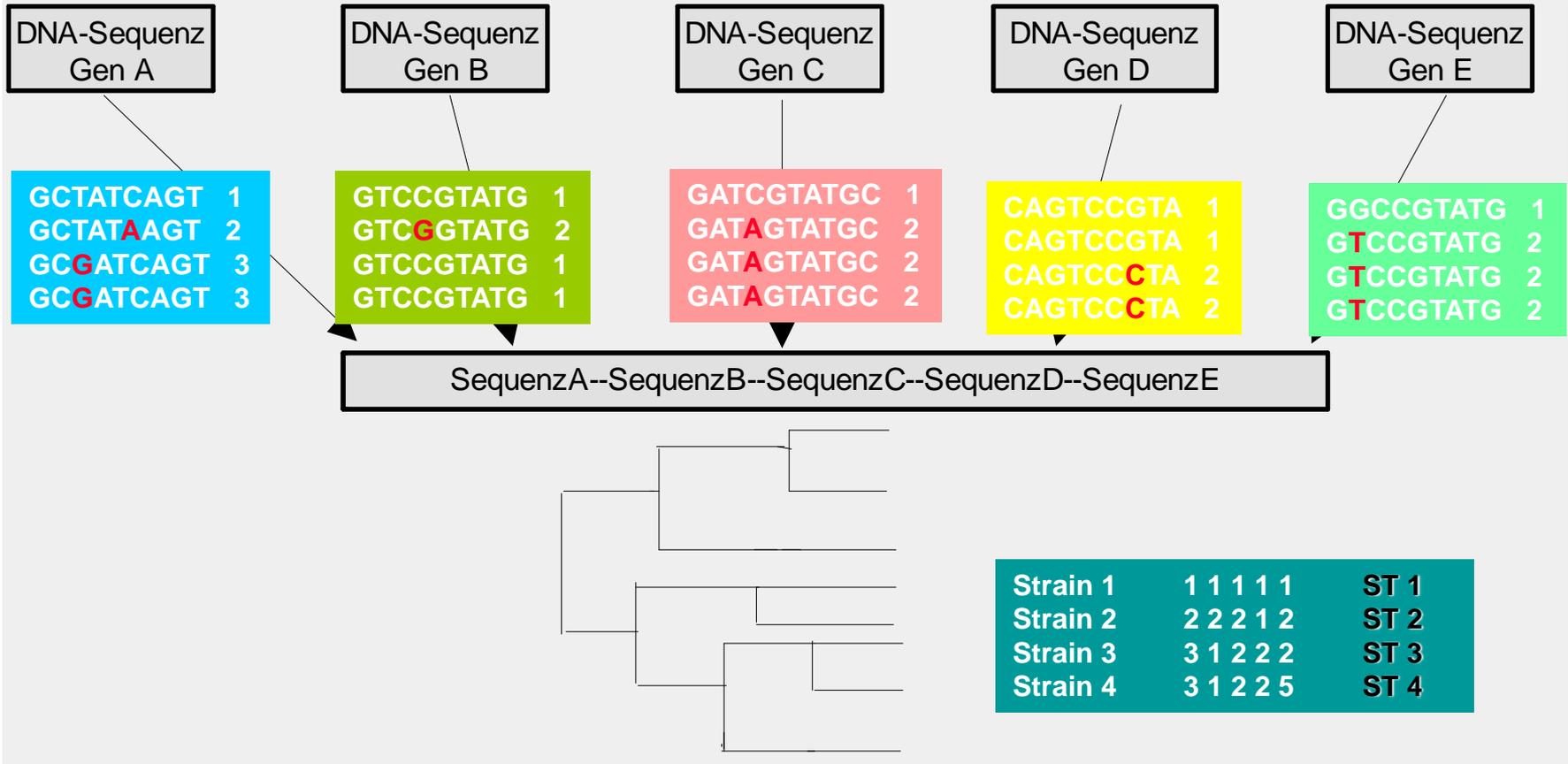
**Identität >>> Übertragung aus diesem Wassersystem**

# Was ist eine monoklonaler (MAb) Subtyp ?

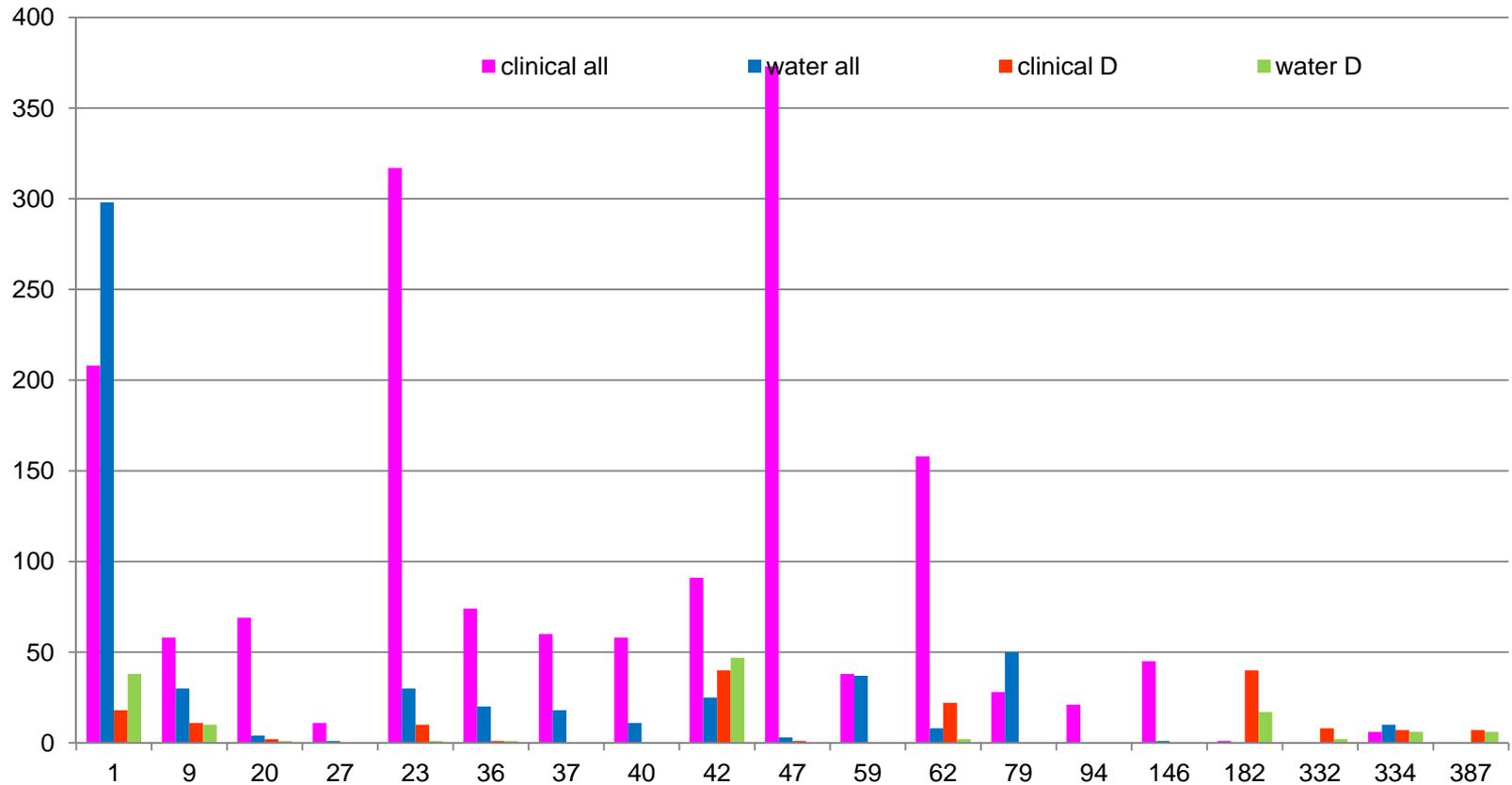
- Reaktivität mit einem Panel monoklonaler Antikörper
- Bezeichnung eines Typs nach eine Stamm mit diesem Muster z. B.
  - 1,2,3 für Knoxville
  - 1, 2, 5, 7 für Benidorm

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 ?



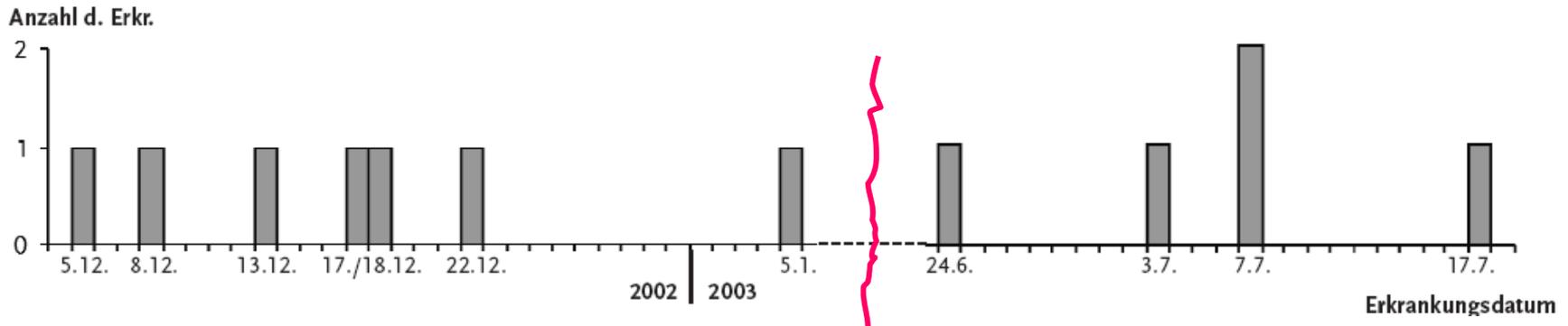
# Manche ST sind häufig in Europa und D



# 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,

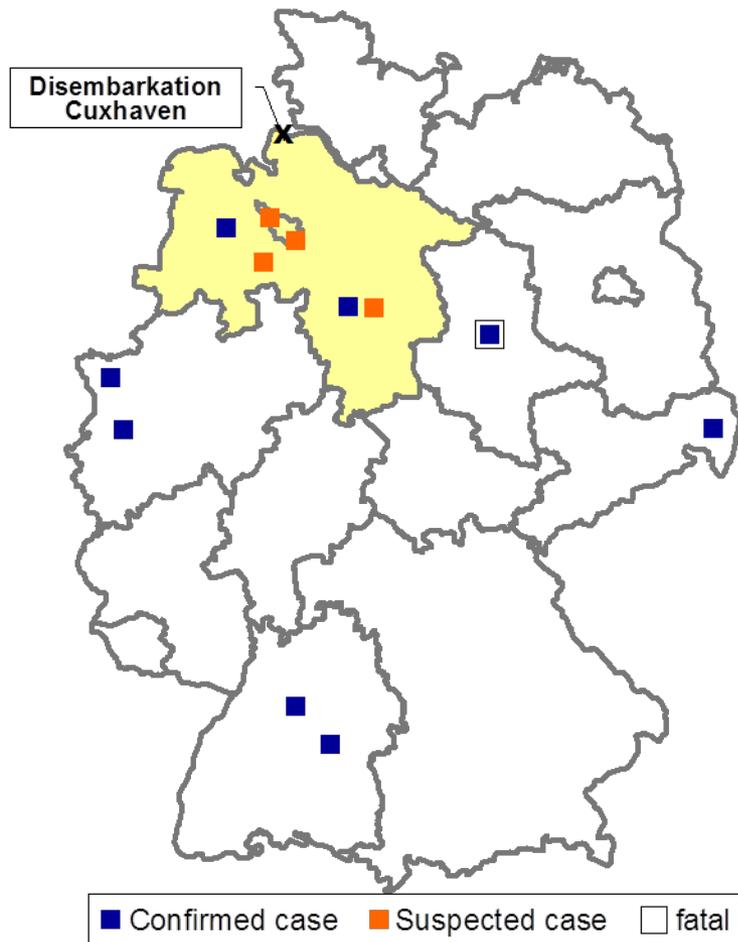
# Nosokomialer Ausbruch Frankfurt/O



## 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



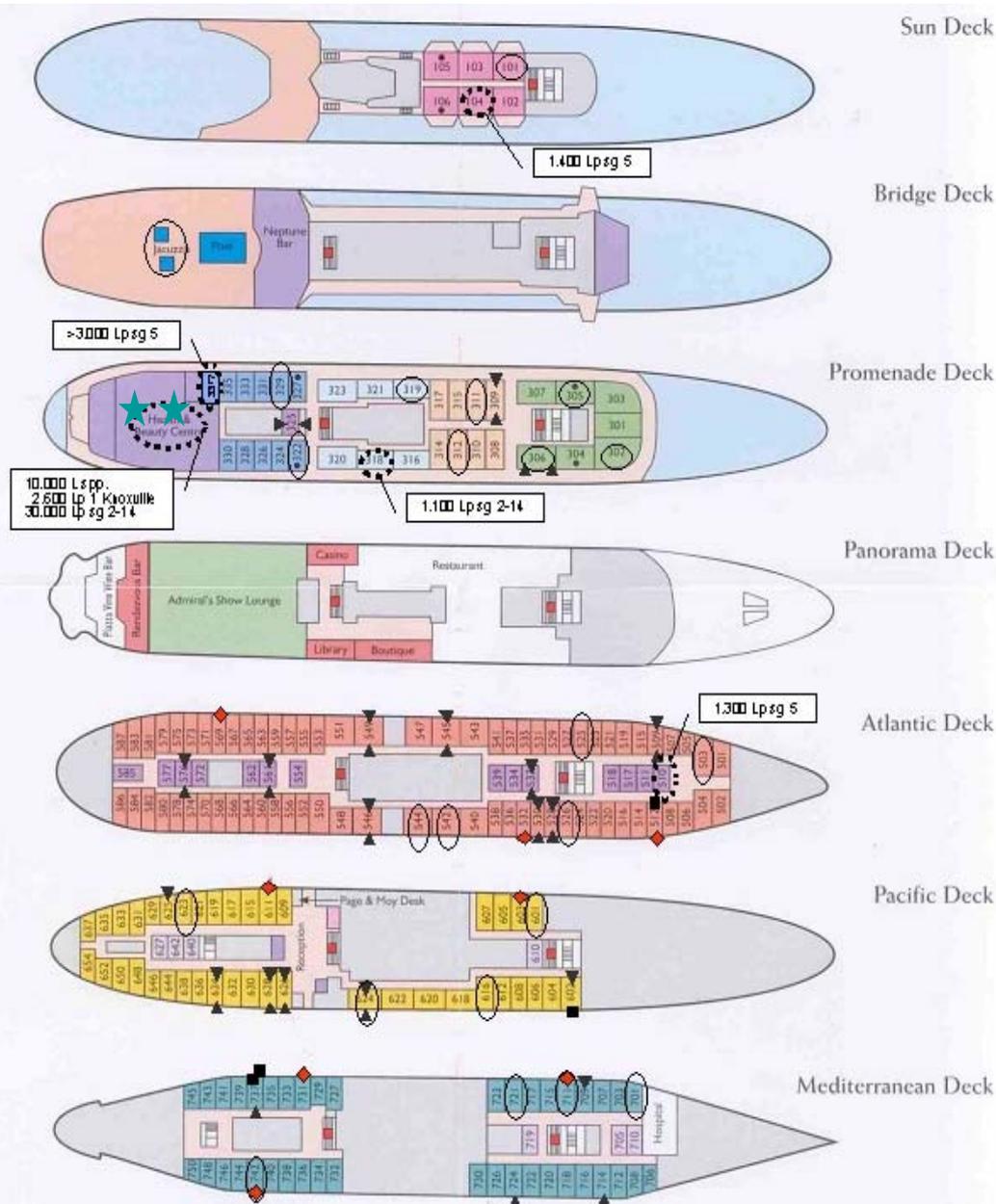
2003 8 Patienten

- 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



Sun Deck  
Bridge Deck  
Promenade Deck  
Panorama Deck  
Atlantic Deck  
Pacific Deck  
Mediterranean Deck

- ◆ 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

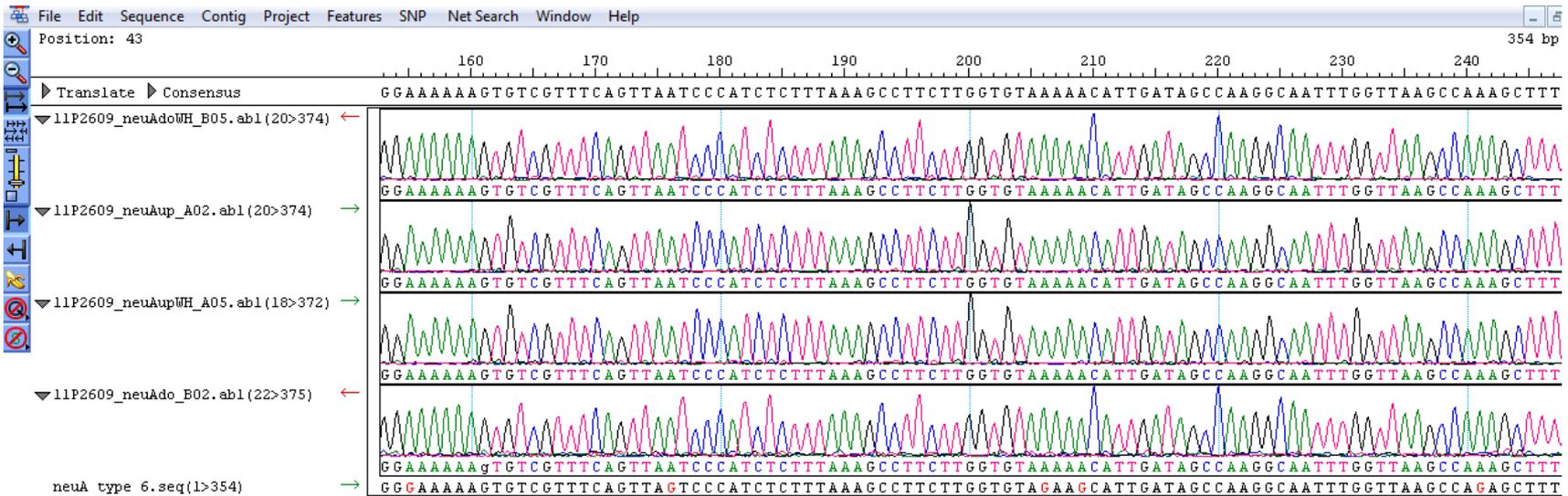
Sg 3, 5, 10 (54x)

2008

9/10 Wasserproben <100/100ml

Der „Verursacher“ kann selten sein

# Case Hotel Cochem – Pat. Hannover

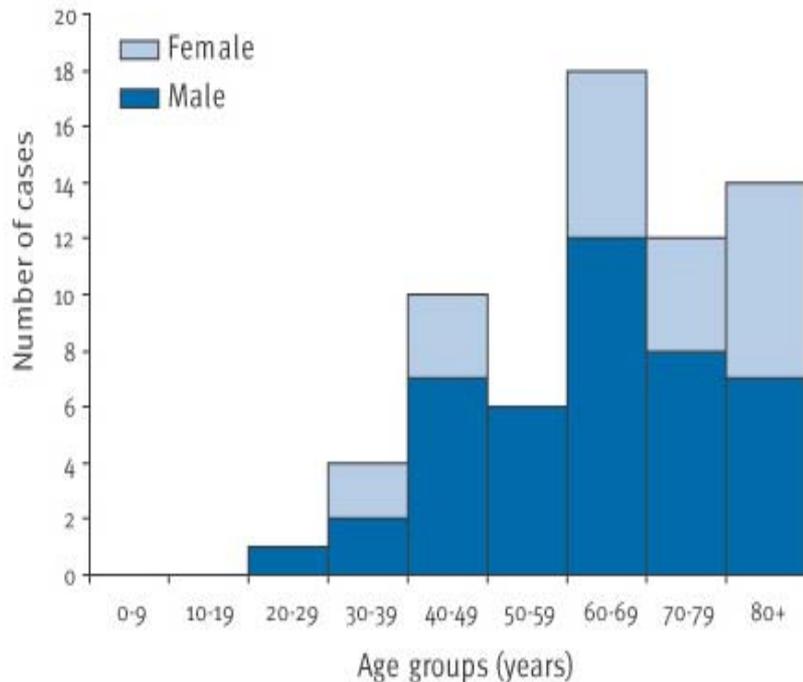


Direkter Nachweis DNA nSBT aus Patienten:  
Vergleich mit Wasserisolaten  
Keine Übereinstimmung

# 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)



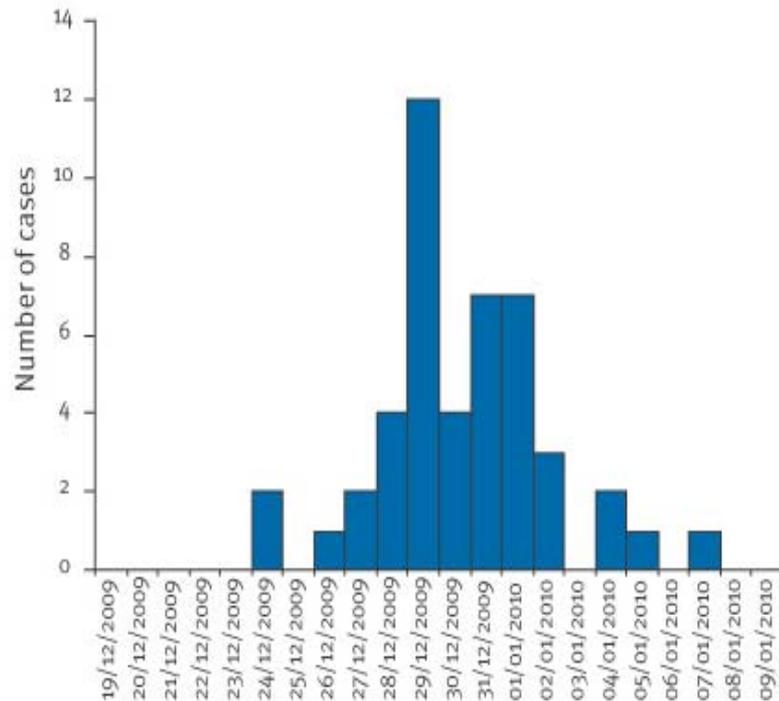
- Daran denken !!!
- Schnelle Diagnose durch chromatographischen Schnelltest
- Bestätigung Urin AG-ELISA
- PCR
- Intensive Kulturversuche
  - 8 Isolate von Patienten
  - Alle Lp1, Latex-Agglutination
  - Mabtype Knoxville
  - Sequenztyp 62

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)

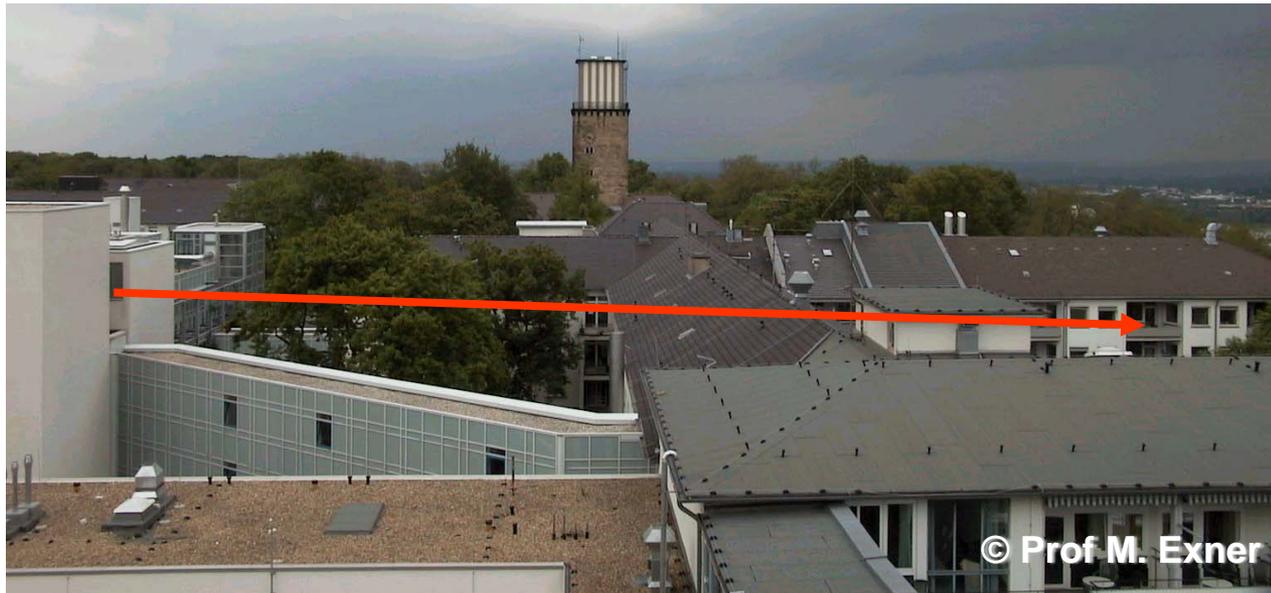


- Infektionsquelle
  - Epidemiologisch keine gemeinsame „Quelle“
    - Schwimmbad
    - Feier
    - Reisen/ Hotel
  - diffus über die Stadt verteilt
  - >>Rückkühlwerk
  - 9/30 Kultur Legionella pos
  - 5x Lp1
  - 1x Mabtyp Knoxville, ST 62
- Intermittierender Betrieb seit Sommer 2009
- Wetterlage:
  - 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](mailto:Christian.Lueck@tu-dresden.de)
- <http://www.konsiliarlabor-legionella.de>