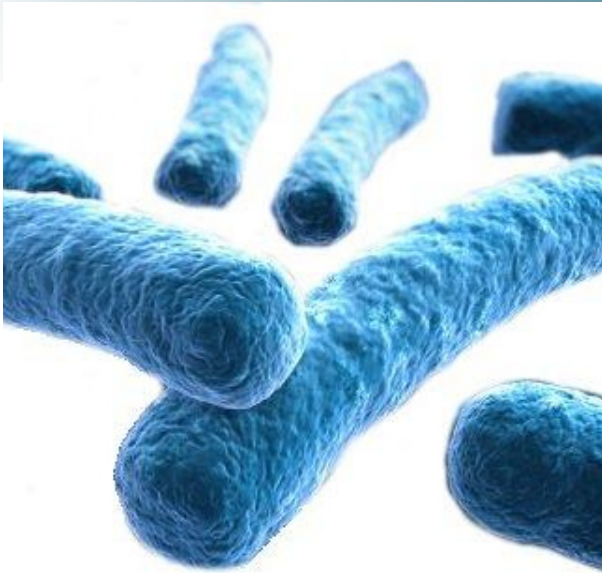


# Legionellen-Diagnostik



Nachweis von *Legionella spp.* mittels Schnelltest, IFT und real time PCR

# Legionellen-Diagnostik



## Wissenschaftlicher Hindergrund (1):

- Legionellen sind in natürlichen und künstlichen Wassersystemen (nur Süßwasser) weit verbreitete, gram-negative Stäbchen-Bakterien. Sie können Protozoen infizieren und sich in diesen vermehren. Die Fähigkeit, in Biofilmen zu überleben, insbesondere bei Temperaturen zwischen 30°C und 50°C, trägt erheblich zu ihrer Verbreitung bei.
- Aus natürlichen Vorkommen gelangen Legionellen in künstliche Reservoirs, z.B. in die Trinkwasserversorgung, Kühltürme, Klimaanlage, Schwimmbäder und Whirlpools.
- Durch Inhalation von kontaminierten Aerosolen, die beispielsweise beim Duschen, durch Fontänen etc. in Spaßbädern, in Whirlpools oder durch Klimaanlage entstehen, können Legionellen-Infektionen ausgelöst werden.
- Die Legionellen gelangen dabei tief in die Lungen und vermehren sich insbesondere in Makrophagen.

# Legionellen-Diagnostik



## Wissenschaftlicher Hindergrund (2):

Legionellen treten in zwei verschiedenen, nicht von Mensch zu Mensch übertragbaren, Verlaufsformen auf:

- Das sogenannte **Pontiac-Fieber** gilt als leichter Verlauf, vor allem mit grippeähnlichen Symptomen. Die weitaus gefährlichere Erkrankungsform wird als **Legionärskrankheit** bezeichnet - eine schwere Pneumonie, deren Verlauf lebensgefährlich werden kann.
- Dabei ist *L. pneumophila*, meist Serogruppe 1, für mehr als 90% der Erkrankungen verantwortlich, andere humanpathogene Legionellen sind z.B. *Legionella anisa*, *L. bozemanii*, *L. dumoffi*, *L. gormanii*, *L. jordanis*, *L. longbeachae* und *L. micdadei*.
- Legionellen-Nachweise, die im Zusammenhang mit Krankheitssymptomen stehen, sind in Deutschland meldepflichtig.

# Legionellen-Diagnostik



## Wissenschaftlicher Hindergrund (3):

- Anfangssymptome der Legionärskrankheit sind hohes Fieber, Schüttelfrost, Kopf- und Muskelschmerzen. Es folgen trockener Husten, Atembeschwerden, Diarrhoe, Lungenentzündung. Nicht immer treten alle Symptome auf.
- 10-15% der in Deutschland gemeldeten Fälle von 2011 bis 2019 endeten tödlich. Bei Immunsupprimierten bzw. Herz-/Lungen-Vorerkrankten waren es bis zu 71%.
- Richtig erkannt, lassen sich Legionellose in der Regel gut mit Antibiotika behandeln.
- Im Falle der Legionärskrankheit beträgt die Inkubationszeit 2-10 Tage (meist 5-6 Tage), beim Pontiac Fieber 5-72 Stunden (meist 8-24 Stunden). Bei einigen Ausbrüchen wurden längere Inkubationszeiten von 16-26 Tagen ermittelt.\*

*\*Quelle: RKI: Ratgeber Legionellose*

# Legionellen-Diagnostik



## Labordiagnostik bei Legionellosen (1):

Eine alleinige Diagnose aufgrund des klinischen Bildes ist nicht möglich, da andere bakterielle und virale Infektionen ähnliche Krankheitsbilder ergeben können.

Laborteste können bei der Abklärung daher sehr hilfreich sein, müssen aber jeweils durch eine zweite Methode bestätigt werden:

### **Antigennachweis aus Urin (ELISA oder immunchromatografischer Schnelltest):**

- Legionellen-Antigen lässt sich meist schon 24h nach der Infektion im Urin nachweisen. So ist im Verdachtsfall eine schnelle Reaktion möglich. Es persistiert meist 4-6 Wochen. Auch bei erfolgreicher antibiotischer Therapie bleiben die Teste meist positiv, sind also nicht zur Therapiekontrolle geeignet. Meist wird nur die Serogruppe 1 von *Legionella pneumophila* detektiert, die auch die relevanteste ist.

# Legionellen-Diagnostik



## Labordiagnostik bei Legionellose (2):

**Antigennachweis (DNA) mittels PCR** bei Proben aus dem unteren Respirationstrakt (bronchoalveoläre Lavage (= BAL), Lungengewebe, Tracheal-/Bronchialsekret und Sputum):

- Vorteil ist die hohe Sensitivität und Spezifität; somit ist ein früher Nachweis nach dem Auftreten der ersten Symptome möglich. Die PCR aus Urin ist nicht sinnvoll, da keine entsprechend nachweisbaren DNA-Bestandteile im Urin vorkommen.

**Antigennachweis mittels direkter Immunfluoreszenz** aus Trachealsekret oder Sputum:

- Nachteil ist die geringe Sensitivität (20-60%). Gut geeignet bei frischer Pneumonie für Proben aus dem Lungengewebe.

# Legionellen-Diagnostik



## Labordiagnostik bei Legionellosen (3):

### **Kultur:**

- Anzucht aus respiratorischen Materialien (z.B. BAL, Trachealsekret, ggf. auch tiefes Sputum) oder Lungengewebe bzw. Pleura-Flüssigkeit.
- Bedeutsam vor allem für die Differenzierung unterschiedlicher Spezies und Serotypen, beispielsweise um epidemiologische Verläufe abzuklären. Nachteil ist die Dauer von mehreren Tagen.

### **Serologische Nachweise, z.B. mittels Immunfluoreszenztest (IFT, indirekte Immunfluoreszenz):**

Können dabei helfen, die jeweiligen Serogruppen einzugrenzen, z.B. um die Serogruppe 1-6 von den Serogruppen 7-14 und den non-pneumophila Legionellen zu unterscheiden.

# Legionellen-Diagnostik



## Das Produkt-Portfolio von AlphaScience für die Legionellen-Diagnostik:

- **Schnelltest:**
  - AlphaBioScreen® Legionella Antigen Urine Rapid Test*
  - Trinity Biotech Uni-Gold™ Legionella Urinary Antigen PLUS*
- **ELISA:**
  - Bartels® Legionella Urinary Antigen*
- **IFT:**
  - AlphaBioScreen® Legionella spp. IgG IFA (indirekte Immunfluoreszenz)*
- **real time PCR:**
  - diarellaPanLegionella*
  - diarellaLegionella*
- **PCR-Kontrollen:**
  - AlphaCon® Amplification Legionella*
  - AlphaCon® Complete Legionella*



# Legionellen-Diagnostik



## *AlphaBioScreen<sup>®</sup> Legionella Antigen Urine Rapid Test*

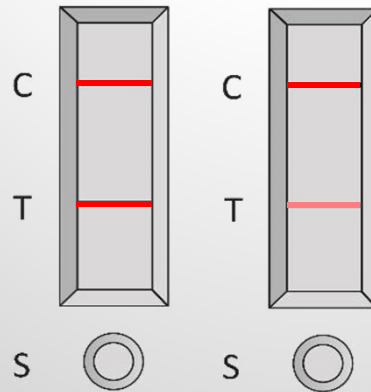
- Leicht zu handhaben: nur Probe auftragen, 15 Min. inkubieren und ablesen
- Ein einfach zu bedienender Reader (Ergebnis: Positiv-Graubereich-Negativ) steht zur Verfügung, ist aber nicht zwingend erforderlich
- Positiv-/Negativkontrolle im Kit enthalten
- Sensitivität: 95,74%
- Spezifität: 97,73%
- Richtigkeit: 96,70%
- Untere Nachweisgrenze:  $10^5$  CFU/ml

# Legionellen-Diagnostik

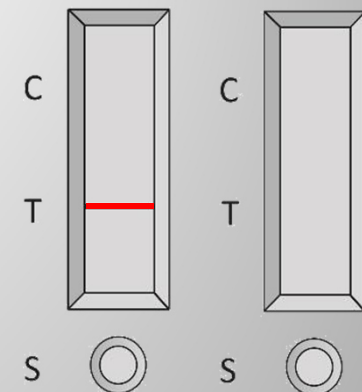
## AlphaBioScreen® Legionella Antigen Urine Rapid Test



**Negatives Testergebnis:**  
Nur die Kontrolllinie erscheint.



**Positives Testergebnis:**  
Die Kontrolllinie erscheint.  
Die Testlinie ist mehr oder minder stark sichtbar.



**Ungültiges Testergebnis:**  
Die Kontrolllinie fehlt.  
Die Testlinie erscheint dennoch oder fehlt ebenfalls.

# Legionellen-Diagnostik



## AlphaBioScreen® Legionella Antigen Urine Rapid Test

### Auswertung mit dem Cube-Reader:

- Kitspezifische Kalibrierungsdaten auf der im Kit mitgelieferten RFID-Karte
- Reader einschalten, mit der RFID-Karte programmieren, Testkassette in den Adapter legen, Cube Reader aufsetzen, messen, Ergebnis ablesen (Leg Neg, Leg VLP (= *very low positive* = Graubereich), Leg Pos)



Testkassette, Adapter und Reader



Adapter aufgesetzt



Cube-Reader aufgesetzt und messbereit

# Legionellen-Diagnostik



## *AlphaBioScreen® Legionella Antigen Urine Rapid Test*

### **Vorteile der Auswertung mit dem Cube-Reader:**

- Kitspezifische Kalibrierung mittels RFID-Karte; keine weitere Eichung o.ä. erforderlich
- Keine zweite Person zur Begutachtung (= 4 Augen-Prinzip) erforderlich
- Messergebnisse werden gespeichert (bis zu 100) und damit dokumentiert

# Legionellen-Diagnostik



## *Bartels<sup>®</sup> Legionella Urinary Rapid Antigen ELISA*

- Qualitativer Nachweis von *L. pneumophila* Serogruppe 1 Antigen in humanem Urin
- Auswertung visuell oder mit handelsüblichem ELISA-Reader möglich
- Positiv-/Negativkontrolle gebrauchsfertig im Kit
- Testdauer insgesamt etwa 90 Minuten
- Sensitivität: 94,7%
- Spezifität: 89,3%
- Richtigkeit: 91,4%

# Legionellen-Diagnostik



## AlphaBioScreen® Legionella spp. IgG IFA

- Indirekter Immunfluoreszenz-Assay
- Detektiert Antikörper gegen *Legionella pneumophila* (Serogruppe 1-6 und 7-14) sowie gegen folgende „non pneumophila“: *Legionella bozemanii*, *L. dumoffi*, *L. jordanis*, *L. gormanii*, *L. longbeachae* und *L. micadadei*
- Flexibel für kleinere und größere Serien, da pro Objektträger 6 x 3 Auftragsstellen vorhanden sind
- Sensitivität: 100%
- Spezifität: 98%
- Richtigkeit: 99%

# Legionellen-Diagnostik

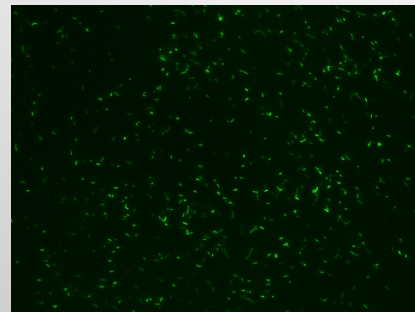


## AlphaBioScreen® Legionella spp. IgG IFA

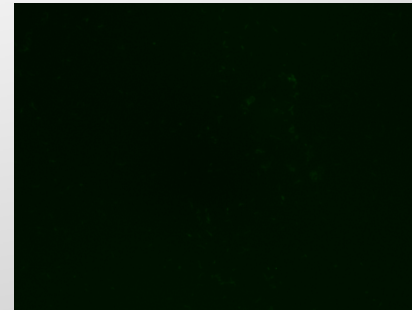
Empfohlenes Auftragschema:

	Kontrolle		Probe			
	Pos.	Neg.	1:64	1:128	1:256	1:512
	1	2	3	4	5	6
A	○	○	○	○	○	○
B	○	○	○	○	○	○
C	○	○	○	○	○	○

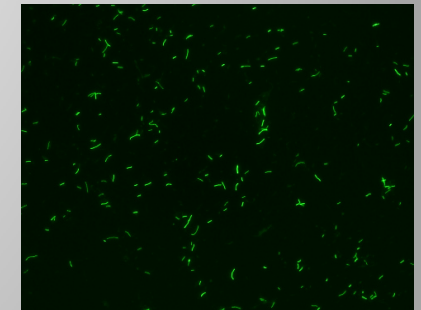
Beispiele zur Auswertung:



Positivkontrolle



Negativkontrolle



Positive Patientenprobe

# Legionellen-Diagnostik



## *diarella PanLegionella und diarella Legionella real time PCR Kits*

### **diarellaPanLegionella:**

Nachweis von *Legionella spp.* DNA in klinischen Proben und in Umweltproben (z.B. Wasser) mittels real-time PCR. Erfasst *Legionella pneumophila* der Serotypen 1-14 und nonpneumophila Stämme. Getestet wurden *L. bozemanii*, *L. gravella feeli*, *L. jordanis*, *L. micadadei*.

### **diarellaLegionella:**

Nachweis von *Legionella pneumophila* DNA in klinischen Proben und in Umweltproben (z.B. Wasser) mittels real-time PCR. Erfasst zuverlässig nur *L. pneumophila* aller Serogruppen; keine Kreuzreaktionen mit «non-pneumophila» Stämmen.



# Legionellen-Diagnostik



## *diarella Pan Legionella und diarella Legionella*

- Beide real time PCR Testkits sowohl für 96 als auch für 32 Proben erhältlich
- Eine Kontroll-DNA, die vor der Extraktion zugegeben wird und damit sowohl zur Überprüfung der DNA-Isolierung als auch zur Detektion einer eventuellen PCR-Inhibition dient, ist in beiden Testkits enthalten
- Für viele offene Cyclersysteme geeignet, z.B. Lightcycler 480I und II, ABI 7500, RotoGene Q, 3000, 6000, Stratagene Mx3000P/Mx300SP

# Legionellen-Diagnostik



## *AlphaCon<sup>®</sup> Amplification Legionella und AlphaCon<sup>®</sup> Complete Legionella*

- Externe Kontrollen zur Überprüfung der Legionella-PCR
- CE-markiert
- Gebrauchsfertig; keine Rekonstitution und Aliquotierung notwendig (anders als bei den meisten Wettbewerbern)
- Enthalten das komplette bakterielle Genom bzw. inaktivierte Legionellen
- Sehr gutes Preis-Leistungsverhältnis

# Legionellen-Diagnostik



## *AlphaCon<sup>®</sup> Amplification Legionella*

- Standardisierte Kontrolle zur **Überprüfung der Amplifikation** mit Angabe von Kopien und CT-Werten
- Universelle Matrix, die in viele Probenmaterialien eingebracht werden kann
- 3 Konzentrationsstufen: **low** = nahe des unteren Meßbereichs  
**medium** = im klinisch relevanten Bereich  
**high** = zur Überprüfung des dynamischen Bereichs
- Haltbarkeit der ungeöffneten Kontrolle: bis zu 18 Monate (bei 4°C - 8°C)
- Stabilität nach Öffnen der Kontrolle: 6 Monate (bei 4°C - 8°C)

# Legionellen-Diagnostik



## *AlphaCon<sup>®</sup> Complete Legionella*

- **Prozess-Kontrolle:** Überwachung der **Extraktion** und der **Amplifikation**
- Zielwert nahe dem Cut-off, daher gut geeignet, die Sensitivität des jeweiligen Tests zu überprüfen
- Basierend auf vollständigen, INAKTIVIERTEN Legionellen; kein Lyophilisat
- Universelle Matrix: kann in beliebige Probenmaterialien eingebracht werden
- Haltbarkeit der ungeöffneten Kontrolle: bei -20°C bis zu 18 Monate
- Stabilität der Kontrolle nach dem Öffnen: 3 Monate (bei 4°C - 8°C)

# Legionellen-Diagnostik



**Danke für die Aufmerksamkeit!**