

Herausforderung
Schnelle zuverlässige Quantifizierung der bakteriellen Gesamtbelastung in Kühlturmwasserproben, sowie Bestimmung von *Legionella* spp. und pathogener *Legionella pneumophila*.

Lösung
Automatisierte Extraktion bakterieller DNA mit dem InnuPure C16 *touch* und qPCR-Analyse mit innuDETECT Assays auf dem qTOWER³.

Extraktion und Nachweis von Legionellen-DNA in Wasserproben aus Kühltürmen mit Hilfe des InnuPure C16 *touch* und qTOWER³

Einleitung

Sowohl die Legionärskrankheit als auch das Pontiac-Fieber werden durch Bakterien der Gattung Legionella ausgelöst. Da die Bakterien sich bevorzugt über Aerosole verbreiten, konnten diverse Ausbrüche der Legionärskrankheit mit der Verbreitung durch Kühltürme in Verbindung gebracht werden. So gelangen sie über die Atemluft in die Lunge, wo sie alveolare Makrophagen infizieren.
Die Legionärskrankheit wird hauptsächlich von der Art Legionella pneumophila verursacht. Allerdings können auch andere *Legionellen (Legionella spp.)* zum Ausbruch einer Legionellose führen.
Nach der 42. Bundesimmissionsschutzverordnung (BImSchV), müssen Betreiber von Verdunstungskühlanlagen, Kühltürmen und Nassabscheidern regelmäßig die Kenngröße *Legionella spp.* überprüfen, um die hygienische Qualität des Nutzwassers zu gewährleisten. Wenn die Grenzwerte überschritten werden, ist die zusätzliche Differenzierung in *L. pneumophila* und *non-pneumophila* vorgeschrieben.

Um Qualitätsstandards von Wasser zu gewährleisten, muss sowohl Trink- als auch Nutzwasser auf Legionellen überprüft werden. Komplexe ernährungsphysiologische Anforderungen von Bakterien sowie Beeinträchtigungen durch Begleitflora machen konventionelle Nachweismethoden, die auf der Kultivierung von Bakterien beruhen, zu einer Herausforderung. Darüber hinaus werden für die Kultivierung einige Tage benötigt, bevor korrekte Schlussfolgerungen über den Bakterienbefall möglich sind. Der Nachweis von Legionellen-DNA mittels quantitativer Real-Time-PCR erfolgt jedoch innerhalb weniger Stunden (Abbildung 1).
Bereits 1 ml Wasserprobe aus einem Kühlturm reicht für die Extraktion bakterieller DNA mit dem InnuPure C16 *touch* aus. Der Einsatz des innuPREP Bacteria Lysis Boosters (IST Innuscreen GmbH), einem optimierten Mix aus mehreren lytischen Enzymen, sorgt für einen effizienten Vorverdau einer Vielzahl von Bakterien. Die Lyse der Bakterien wurde in

das automatisierte Protokoll integriert, wodurch die externe Lyse und die anschließende manuelle Zugabe des Lysats zur Reagenzplatte entfallen.
Um die extrahierte DNA sowohl auf die Gesamtkeimbelastung als auch auf Legionellen, einschließlich Unterarten, zu analysieren, wurden zwei verschiedene innuDETECT Water Pathogen Assays (beide von der IST Innuscreen GmbH) in Kombination mit dem Real-Time-PCR-Thermocycler qTOWER³ verwendet. Der sondenbasierte *Legionella*-spezifische Assay unterscheidet in einer Multiplex-Real-Time-PCR zwischen *L. pneumophila* und *Legionella spp*.

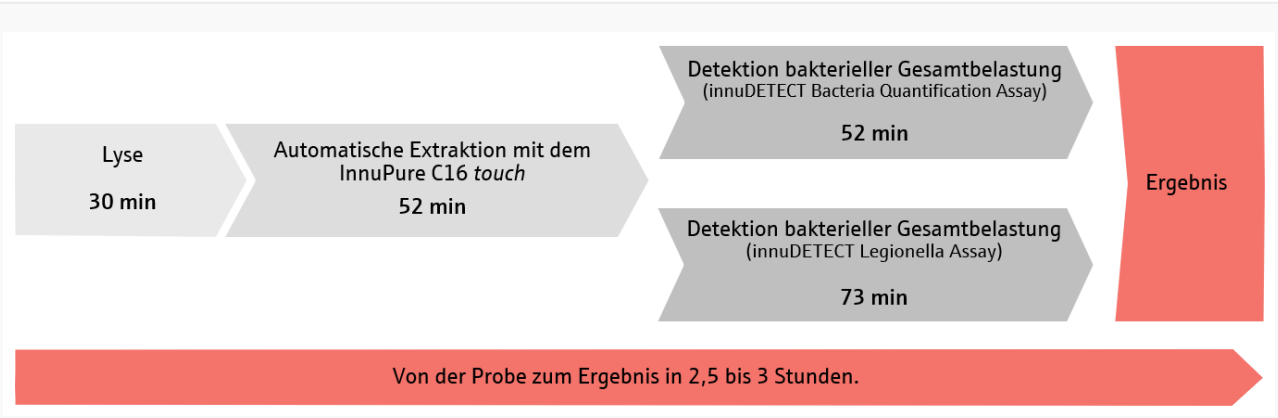


Abbildung 1: Ablauf – Übersicht über die notwendigen Schritte, um innerhalb weniger Stunden zum Ergebnis zu kommen

Material und Methoden

Proben und Reagenzien

- innuPREP Bacteria Lysis Booster (845-KA-1000050, IST Innuscreen GmbH)
- innuPREP Bacteria DNA Kit-IPC16 (845-IPS-5516096, IST Innuscreen GmbH)
- innuDETECT Bacteria Quantification Assay (845-IDF-0031024, IST Innuscreen GmbH)
- innuDETECT Legionella Assay (845-IDF-0033024, IST Innuscreen GmbH)
- Legionella pneumoniae DNA (Stamm: DSM 7513) als Positiv-Kontrolle
- Wasserproben aus Kühlwassertürmen

Geräte

- Vortex Mixer
- Tischzentrifuge
- Mikrotiterplatten-Zentrifuge
- Thermoshaker
- InnuPure C16 *touch* (Analytik Jena)
- qTOWER³ (inklusive der Farbmodule 1, 2 and 5, Analytik Jena)

Probenvorbereitung

Drei Kühlturmwasserproben von je einem Milliliter wurden in Tris/EDTA umgepuffert und nach den Vorgaben des innuPREP Bacteria Lysis Booster Handbuchs enzymatisch vorlysiert. Anschließend wurde mit Hilfe des innuPREP Bacteria DNA Kit-IPC16 die bakterielle DNA vollautomatisch mit dem InnuPure C16 *touch* aus den Proben extrahiert. Die Proben wurden in Duplikaten (A+B) extrahiert und anschließend mittels Real-Time-PCR analysiert. Auch die PCR-Analyse wurde in Duplikaten durchgeführt.
Der Gesamtkeimgehalt der Proben wurde mit Hilfe des innuDETECT Bacteria Quantification Assays bestimmt. Das verwendete Temperatur-Zeit-Protokoll und die Einstellungen der Fluoreszenzkanäle sind in Abbildung 2 dargestellt. Dabei wird das universelle bakterielle Zielgen für 16S ribosomale RNA nachgewiesen. Darüber hinaus beinhaltet der Assay einen DNA-Standard mit einer definierten Menge bakterieller DNA (10^7 Kopien/µl). Die Amplifikation einer seriellen Verdünnung dieser DNA ermöglicht die semiquantitative Bestimmung des DNA-Gehalts der Proben durch die Korrelation mit den resultierenden Ct-Werten.

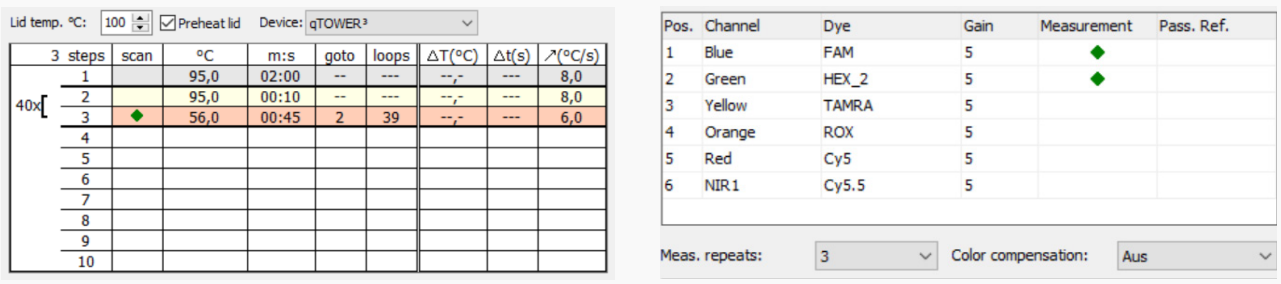


Abbildung 2: Übersicht der qPCR-Einstellungen in qPCRsoft für die Bestimmung der Gesamtkeimzahlbelastung der Kühlwasserproben mit dem qTOWER³. Die Ziel-DNA wird im blauen Kanal detektiert, während die interne Kontrolle im grünen Kanal detektiert wird.

Ergebnisse und Diskussion

Bestimmung der bakteriellen Gesamtbelastung

Mit dem innuDETECT Bacteria Quantification Assay wurden fünf Verdünnungsstufen des DNA-Standards amplifiziert und nachgewiesen (Abbildung 4). Wenn die PCR-Effizienz 100% beträgt, zeigen Verdünnungen von 1:10 eine Verschiebung der Ct-Werte um 3,3. Die durchschnittliche Ct-Verschiebung für die Verdünnungen des DNA-Standards beträgt 3,6, was einer PCR-Effizienz von 89% entspricht (Abbildung 5). Damit wurde eine gute Korrelation zwischen den Ct-Werten und dem bakteriellen DNA-Gehalt erreicht (Tabelle 1). Die NTC zeigt einen Ct-Wert über 35. Es ist zu beachten, dass die in PCR-Gemischen verwendeten Polymerasen in der Regel rekombinante Enzyme sind, die in gentechnisch veränderten Bakterien in großen Mengen produziert und isoliert werden. Dementsprechend können diese aufgereinigten Enzyme noch Spuren bakterieller DNA enthalten. Auch diese Spuren werden durch den Assay detektiert, so dass die NTC notwendig ist, um diesem Hintergrund an bakterieller DNA Rechnung tragen zu können. Ausgehend von den Messwerten für die Verdünnungsreihe des DNA-Standards (10^6–10^3 Kopien) wurde die absolute Kopienzahlen für die jeweilige DNA Probe bestimmt. Die ermittelten Kopiezahlen der drei Extraktionsproben, welche in Doppelbestimmung extrahiert wurden (1A+B, 2A+B, 3A+B) sind in Tabelle 2 dargestellt. Wie in Abbildung 6 zu sehen ist, ist der Gehalt an bakterieller DNA in den extrahierten Proben sehr hoch, was die hohe Effizienz der Extraktion und des Nachweises mit diesem System belegt. Der einwandfreie Ablauf der PCR sowie die korrekte Funktionsweise des Nachweissystems wurden durch die Amplifikation der internen Kontroll-DNA gezeigt (Abbildung 7).

Bakterieller DNA-Standard

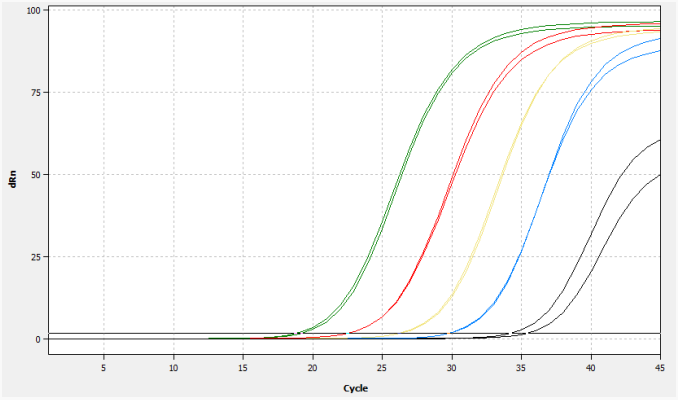


Abbildung 4: Amplifikationskurven des bakteriellen DNA-Standards Serielle Verdünnungen mit 1 x 10^6 (grün), 1 x 10^5 (rot), 1 x 10^4 (gelb) und 1 x 10^3 (blau) Kopien bakterieller DNA wurden als Doppelbestimmungen aufgenommen. Die Kurven der Negativkontrollen (NTCs) sind schwarz dargestellt. Die Detektion erfolgte im FAM-Kanal auf dem qTOWER³.

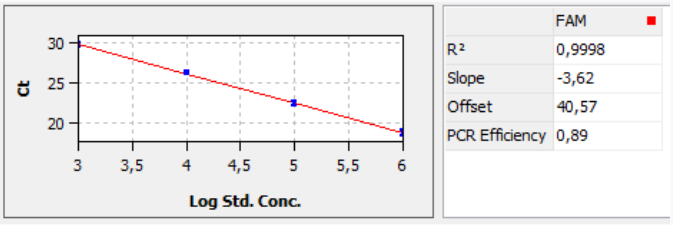


Abbildung 5: Korrelation der Ct-Werte mit der Konzentration des bakteriellen DNA-Standards – Wenn der Logarithmus der Konzentration des DNA-Standards gegen seinen Ct-Wert aufgetragen wird, zeigt die Steigung der resultierenden Geraden die Verschiebung der Ct-Werte zwischen den seriellen Verdünnungen an. Die Effizienz dieser qPCR liegt bei 89%.

Tabelle 1: Ct-Werte der seriellen Verdünnung des bakteriellen DNA-Standards, die im FAM-Kanal detektiert wurden

Verdünnung	Ct-Wert	Kopien
1 :10	19,69 20,04	1,0 x 10^6
1:100	23,51 23,49	1,0 x 10^5
1:1,000	27,17 27,27	1,0 x 10^4
1:10,000	30,63 30,74	1,0 x 10^3
NTC	36,32 35,18	-

Nachweis der Gesamtmenge an bakterieller DNA

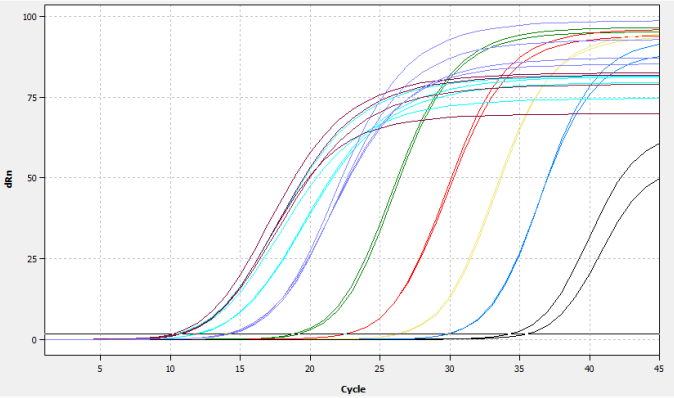


Abbildung 6: Nachweis bakterieller DNA mittels Real-Time-PCR auf dem qTOWER³.
Die Abbildung zeigt neben den Amplifikationskurven der Verdünnungsreihe (vergl. Abbildung 2) auch die sechs Extraktionsproben (Extraktion aus drei Proben als Doppelbestimmung); n=2 (Probe 1A+1B in cyan, Probe 2A+2B in braun und Probe 3A+3B in lila). Die NTCs sind schwarz dargestellt. Die Ct-Werte und die entsprechenden Kopienzahlen der bakteriellen DNA der Proben sind in Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2: Berechnung der Gesamtmenge an bakterieller DNA in Kühlturmwasserproben

Probenname	Ct-Wert	Kopien
Probe 1A	10,29 10,48	2,2 x 10^8
Probe 1B	11,69 11,80	9,3 x 10^7
Probe 2A	10,01 10,60	2,3 x 10^8
Probe 2B	10,40 10,31	2,3 x 10^8
Probe 3A	13,83 14,15	2,2 x 10^7
Probe 3B	14,08 14,13	2,1 x 10^7

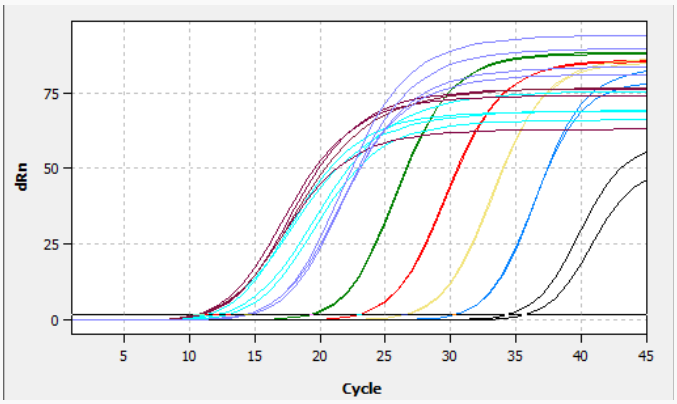


Abbildung 7: Interne Kontroll-DNA
Die Abbildung zeigt die Amplifikationskurven der internen Kontrolle (IC), welche jeder Probe vor dem qPCR Lauf hinzugefügt wurden. Die HEX-markierte IC-spezifische Sonde kann im grünen oder gelben Farbmodul des qTOWER³ nachgewiesen werden. Diese Abbildung zeigt die Amplifikation,welche im grünen Kanal detektiert wurde.

Legionella Nachweis

Der Nachweis der Legionellen-DNA in den extrahierten Proben erfolgte mit dem innuDETECT Legionella Assay. Dabei konnte in der Extraktionsprobe 1B ein schwacher Anstiegt des Fluoreszenzsignals sowie ein Ct von > 37 detektiert werden. Diese Probe kann somit also schwach positiv gewertet werden. In der zweiten Extraktionsprobe (Probe 1A) konnte hingegen keine Legionellen DNA nachgewiesen werden. Probe 2 ist für dieses Gen negativ. Probe 3 zeigt ein positives Signal in beiden Extraktionsduplikaten, so dass man auf das Vorhandensein von Legionellen-DNA in der Probe schließen kann. Das starke Signal der Positivkontrolle bestätigt, dass die Real-Time-PCR korrekt durchgeführt wurde. Die NTC hingegen zeigt, dass keine Kontamination der PCR-Reagenzien vorlag, da dort keine Amplifikation erfolgte.
Um festzustellen, ob Probe 1 oder Probe 3 *L. pneumophila*-DNA enthält, wurde die Amplifikation der DNA Zielsequenz, basierend auf dem *mip* Gen, analysiert (Abbildung 9). Keine der beiden Proben zeigt eine Amplifikation dieses *L. pneumophila*-spezifischen Gens (Tabelle 4). Die Positivkontrolle und die Negativkontrolle (NTC) bestätigen, dass die PCR-Ergebnisse valide und die Reagenzien nicht kontaminiert sind.

Allgemeines *Legionella*-Gen

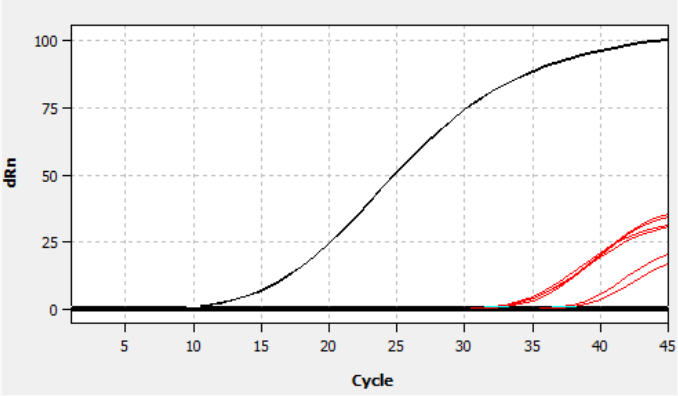


Abbildung 8: Amplifikation eines konservierten *Legionella*-Gens Allgemeiner Nachweis von Legionellen – sowohl *Legionella pneumophila* als auch andere Legionellen-Arten (*Legionella* spp.) – im Cy5-Kanal. Die Positivkontrolle ist schwarz dargestellt; Proben sind rot dargestellt. Jede Probe wurde in zweifacher Ausführung analysiert.

Tabelle 3: Nachweis eines universellen *Legionella*-Gens im Cy5-Kanal

Probenname	Ct-Wert	*Legionella* spp.
Probe 1A	kein Ct	(schwach) positiv
Probe 1B	37,62	
Probe 2A	kein Ct	negativ
Probe 2B	kein Ct	
Probe 3A	32,70	positiv
Probe 3B	32,29	
Positivkontrolle	10,42	positiv
NTC	kein Ct	negativ

L. pneumophila-spezifisches *mip* Gen

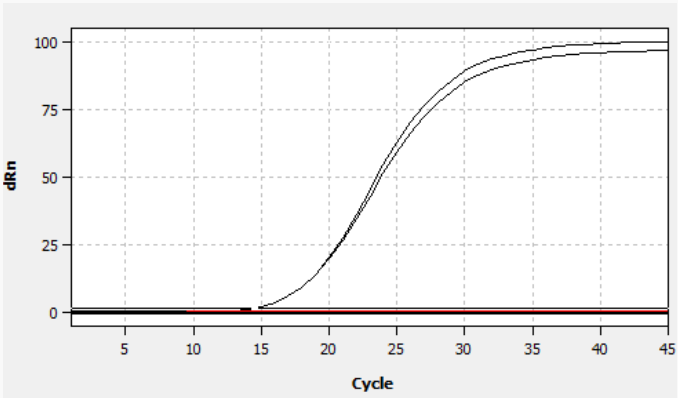


Abbildung 9: Amplifikation des *L. pneumophila*-spezifischen *mip* Gens im FAM-Kanal. Die Positivkontrolle ist schwarz dargestellt; Proben sind rot dargestellt.

Tabelle 4: Nachweis des *L pneumophila*-spezifischen *mip* Gens im FAM Kanal

Probenname	Ct-Wert	*L. pneumophila*
Probe 1 A+B	kein Ct	negativ
Probe 2 A+B	kein Ct	negativ
Probe 3 A+B	kein Ct	negativ
Positivkontrolle	15,15	positiv
NTC	kein Ct	negativ

Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, dass bakterielle DNA im Allgemeinen und Legionellen-DNA im Besonderen mit dem InnuPure C16 *touch* von Analytik Jena effizient automatisiert aus Kühlturmwasserproben extrahiert werden kann. Die bakterielle Gesamtbelastung kann mit dem innuDETECT Bacteria Quantification Assay (IST Innuscreen GmbH) genau bestimmt werden. Mit Hilfe des qTOWER³ ermöglicht der innuDETECT Legionella Assay (IST Innuscreen GmbH) die Unterscheidung von pneumophilen und nicht-pneumophilen Legionellenarten innerhalb der extrahierten Proben. Diese beispielhafte Anwendung zeigt, dass die Real-Time-PCR eine zuverlässige und zeitsparende Methode zum Nachweis von *Legionella* spp. einschließlich der Subspezifizierung von *L. pneumophila* ist und eine effektive Alternative zu konventionellen, kultivierungsbasierten Methoden darstellt. Zudem kann mittels qPCR eine quantitative Aussage über die bakterielle Keimbelastung getroffen werden.



Abbildung 10: InnuPure C16 *touch* und qTOWER³

Referenzen

[1] https://www.gesetze-im-internet.de/bimschv_42/

[2] Cunha, Burke A et al. "Legionnaires' disease." Lancet (London, England) vol. 387,10016 (2016): 376-385. doi:10.1016/S0140-6736(15)60078-2

[3] Paschke, Anne et al. "Legionella transmission through cooling towers: towards better control and research of a neglected pathogen." The Lancet. Respiratory medicine vol. 7,5 (2019): 378-380. doi:10.1016/S2213-2600(19)30041-4

Dieses Dokument ist zum Zeitpunkt der Veröffentlichung wahr und korrekt; die darin enthaltenen Informationen können sich ändern. Dieses Dokument kann durch andere Dokumente ersetzt werden, einschließlich technischer Änderungen und Korrekturen.
Markenrechtlicher Hinweis: Die in der Applikationsschrift genannten Markennamen von Drittprodukten sind in der Regel eingetragene Marken der jeweiligen Unternehmen.

Unternehmenshauptsitz
Analytik Jena GmbH+Co. KG
Konrad-Zuse-Straße 1
07745 Jena · Deutschland

Tel. +49 3641 77 70
Fax +49 3641 77 9279

info@analytik-jena.com
www.analytik-jena.com

Version 1.2 · Autor: CGr / AKo / KHa
de · 07/2024
© Analytik Jena GmbH+Co. KG | Pictures ©: Pixabay/Bru-nO (p. 1)