



# Legionellen – Infektionen und Nachweis von Infektketten Diagnostik und Typisierung

Arbeitskreis Infektionsprophylaxe, Leipzig  
23.09.2015

C. Lück,

*TU Dresden, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Dresden,  
Nationales Konsiliarlabor für Legionella*

25.09.2015



# Legionellen im Plattenbau



- Legionellen im Wasser
- Keine gesicherte Erkrankung(en)  
Hoher Einzeltiter
- Mieterin wollte Mietschulden „sparen“
- Durch technische Maßnahmen der Wohnungsgesellschaft Nachweisrate von ca. 30% auf 1% gesenkt  
Nachweisgrenze 10/ 100ml

**KEN HAS A POP AT HAGUE**

EXCLUSIVE  
by GEORGE FASCOE-WATSON

TORY John Ken Clarke sparked fears of a lead change challenge in the House of Commons after the Prime Minister, William Hague, belted angry desks.

Angry desks in the Commons smoking room watched the former Chancellor relish his bottle of bubbly. And

Clarke denied the stakes by public falling THREE TIMES in a row to back Mr Hague's decision to fire top Tory lord Viscount Cranborne. Mr Clarke's move came as SIX Tory peers quit in disgust at

Cranborne's sacking for doing a deal on Lords reform with Tony Blair. Four walked out on their front-bench jobs. And two baronesses left the party completely to become cross-benchers. One of

Continued on Page Two

**Sun Royal world exclusive**

**QUEEN QUILTS PALACE OVER KILLER BUGS**



Danger... Queen moved out to Windsor Castle

By JOHN KAY

**THE Queen was forced to flee Buckingham Palace after deadly Legionnaires' disease was found in its water supply. The Sun can reveal today.**

Her Majesty moved 20 miles away to Windsor Castle amid a "bug panic" sparked by the discovery of the bug. Health experts were told to check the water supply. The Queen's own drinking water was found to be contaminated. The water supply system at Buckingham Palace was found to be contaminated. The water supply system at Buckingham Palace was found to be contaminated. The water supply system at Buckingham Palace was found to be contaminated.

**Legionnaires' disease found in her shower**

**THE SOURCE LONDON'S COOLEST LISTINGS MAG — FREE INSIDE**





Sie sind hier: [Home](#) / [Region](#) / [Biberach/Ulm](#) / [Ulm](#) / [Stadtnachrichten Ulm](#)

## • Stadtnachrichten Ulm

[weitere Beiträge](#) ▶

Fehler melden



## Donaucenter kämpft noch immer gegen Legionellen



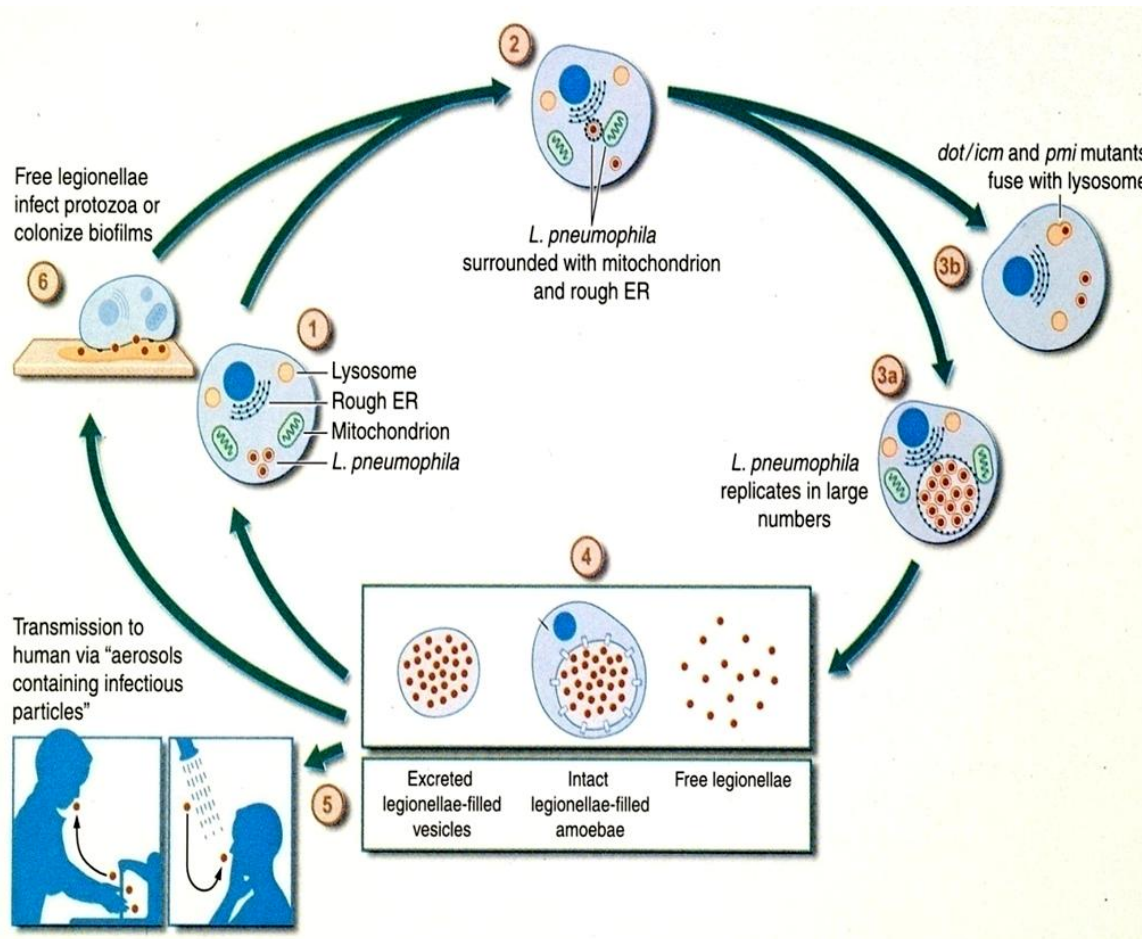
vom Ulmer Ma'nster - Aussicht a'ber Ulm - Donau-Center - Donaucenter Neu-Ulm (Foto: arc)

NEU-ULM / sz - Das Legionellen-Problem im Neu-Ulmer Donaucenter ist noch immer nicht gelöst. Seit Freitag versucht eine Spezialfirma, mit Hilfe eines starken Desinfektionsmittels das Wasserleitungssystem des Wohnkolosses am Donauufer von den gefährlichen Krankheitserregern zu säubern. Die rund 500 Bewohner des Hochhauses dürfen deshalb bis Montag weder duschen, noch sich mit Leitungswasser waschen oder damit kochen. Das Duschverbot besteht bereits seit mehreren Monaten. Die extrem hohe Belastung des Leitungswassers mit Legionellen wurde bereits im November 2012 festgestellt. Seitdem wird

nach einer Lösung für die Bewohner des knapp 40 Jahre alten Wohnkomplexes gesucht. Nach Angaben des Gesundheitsamtes darf das Desinfektionsmittel nicht mit menschlichen Schleimhäuten in Berührung kommen. Deshalb ist für die Bewohner Kochen, Duschen, Körperpflege und Zähneputzen mit Leitungswasser an diesem Wochenende tabu. Wie mehrfach berichtet, können Legionellen, wenn sie mit Wasserbläschen eingeatmet werden, die gefährliche Legionärskrankheit auslösen. Im Donaucenter wurde seit November aber kein solcher Krankheitsfall bekannt.

(Aktualisiert: 01.07.2013 04:09)

# Ökologie von Legionellen



- 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*

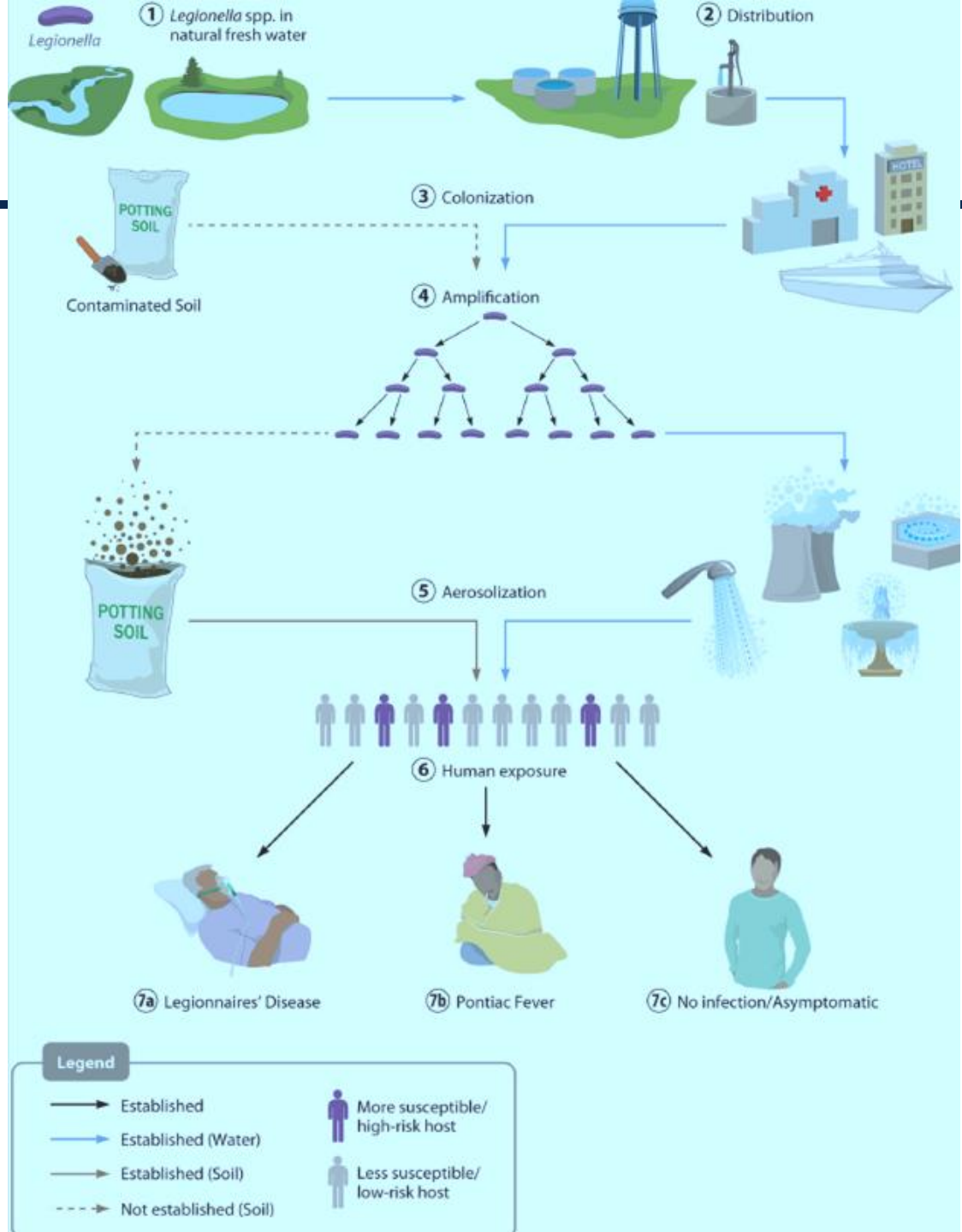
# Legionella-Infektion

Offene Fragen:

Infektionsdosis

Stamm-spezifische Virulenz

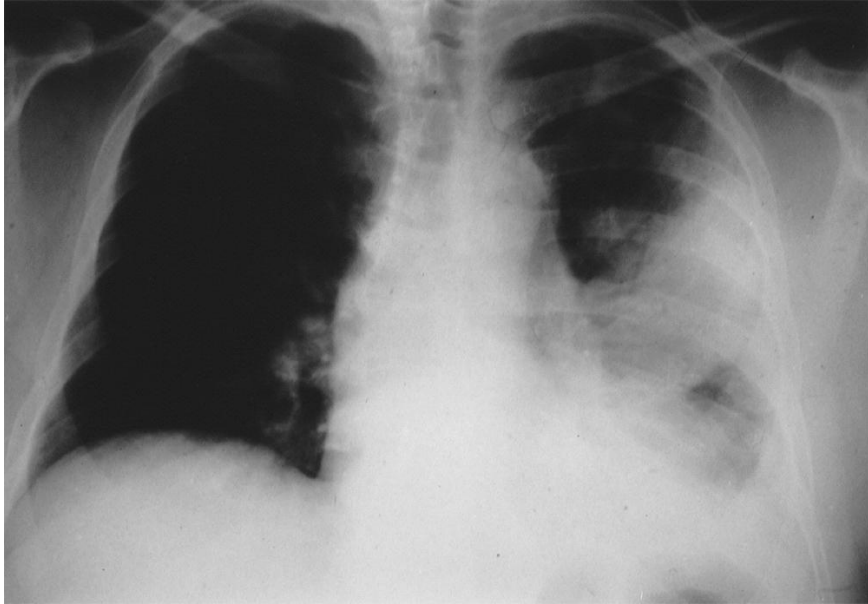
Wirtsfaktoren/  
Immunität



Mercante et al. CMR 2015



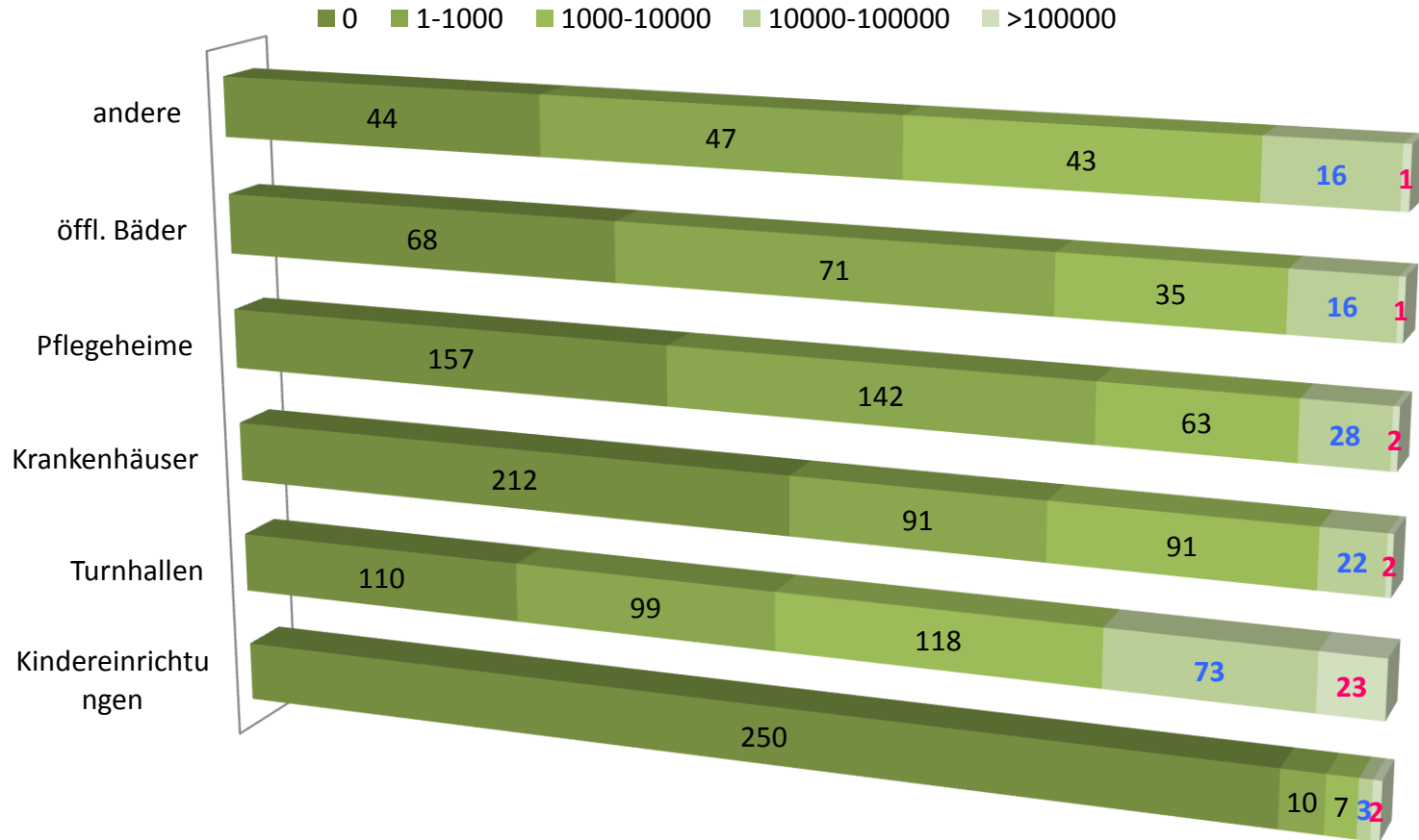
# Legionellose



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

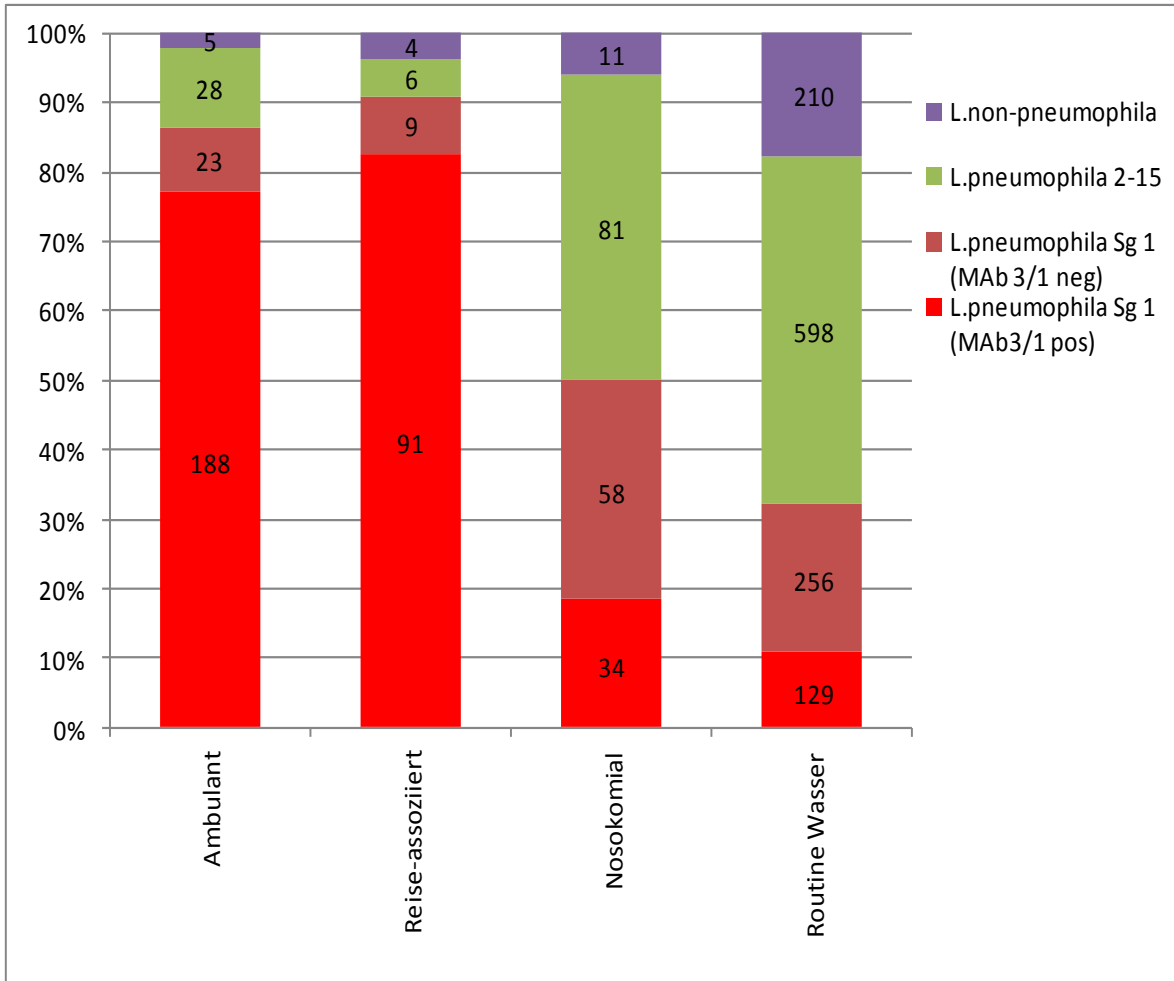
- Erkrankungen:
  - Pneumonie (Legionärskrankheit)
  - Pontiac-Fieber
  - Extrarespiratorische Manifestationen
  - Klinisch inapparente Serokonversion
- Übertragung:
  - Direkte Inhalation
  - Mikroaspiration
  - Alimentär Kontakt über Trinkwasser?
  - Nicht von Mensch zu Mensch**
- Therapie:
  - Quinolone/ neue Makrolide
  - Kombination mit Rifampicin unnötig ?

# Vorkommen von Legionellen in Gebäuden KbE/I



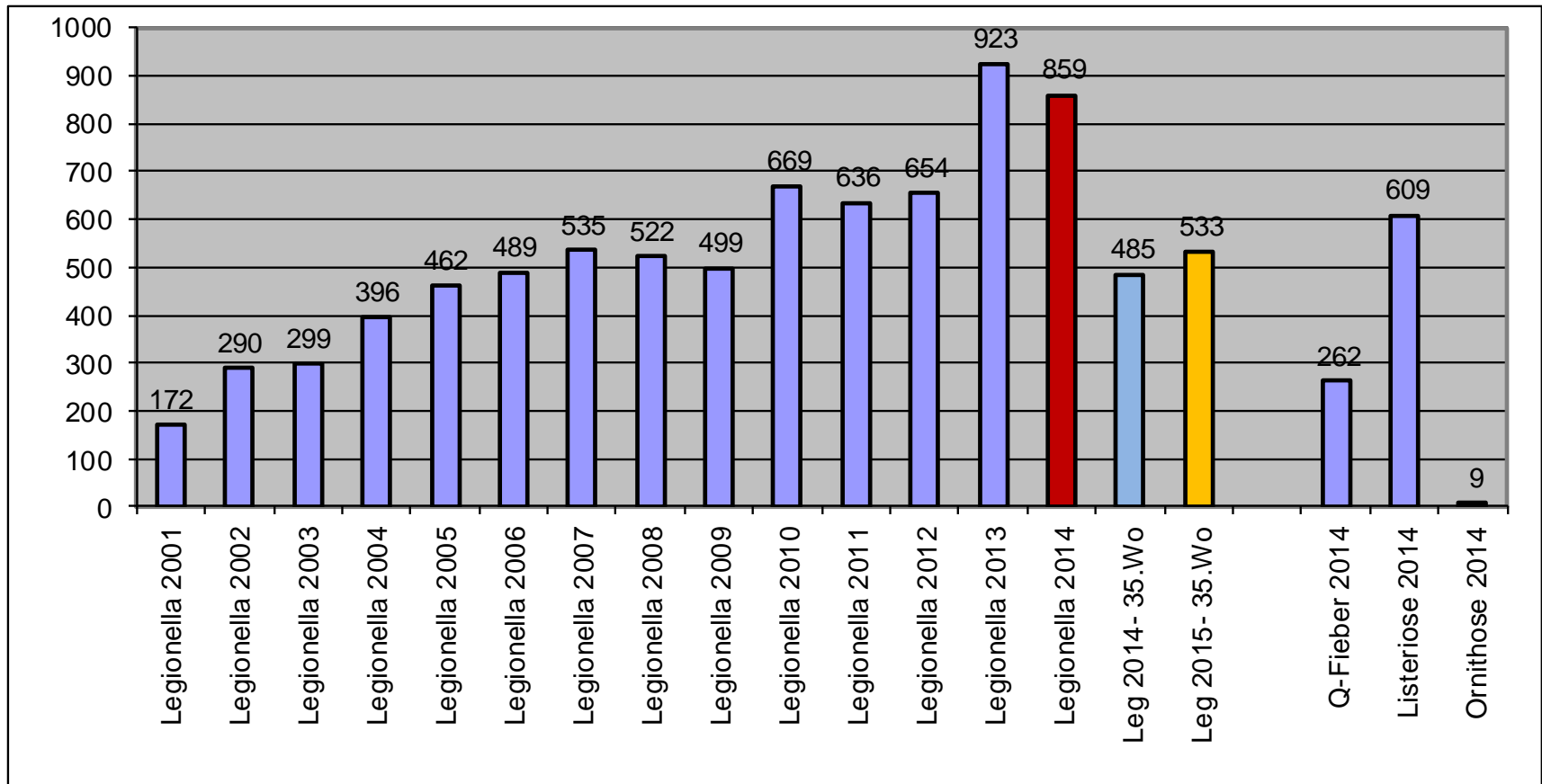


# Serologische Typisierung - Legionella-Isolate (nach Ursprung) 1986-2014



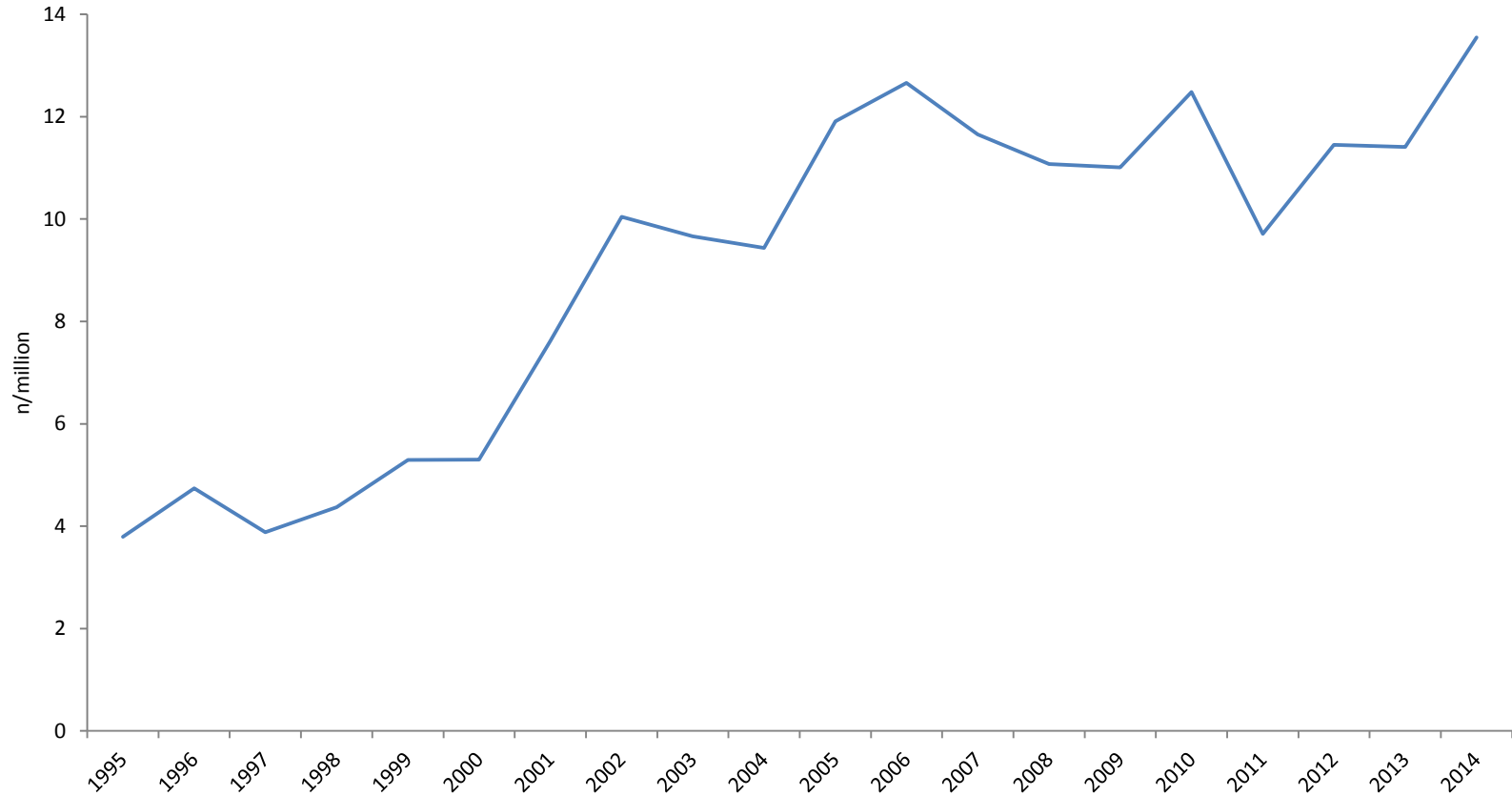
- Mab 3-1 positive Stämme sind virulenter
- Molekulare Basis nicht komplett verstanden
- Hydrophobes LPS = bessere Übertragung
- Ausbruchs-Stämme sind MAb2 (3-1) positiv

# An RKI gemeldete Legionellose (22.09.15)

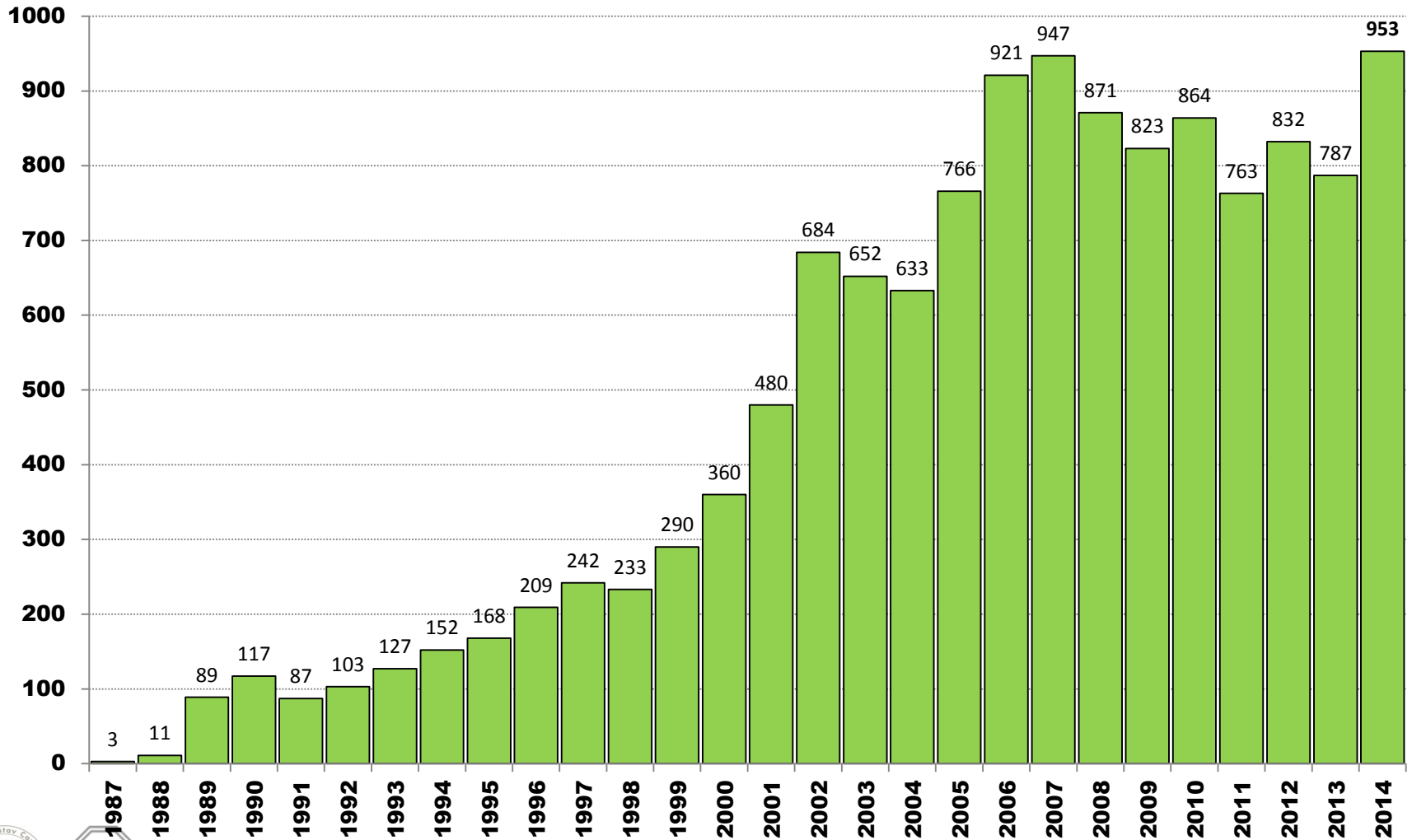


Schätzungen (CAPNetz): 10.000- 20.000 Fälle

# Notification rates Legionnaires' disease EU/EEA 1995-2014 ( Daten ECDC)



# Travel Associated Legionnaires' Disease 1987-2014 (Daten ECDC)



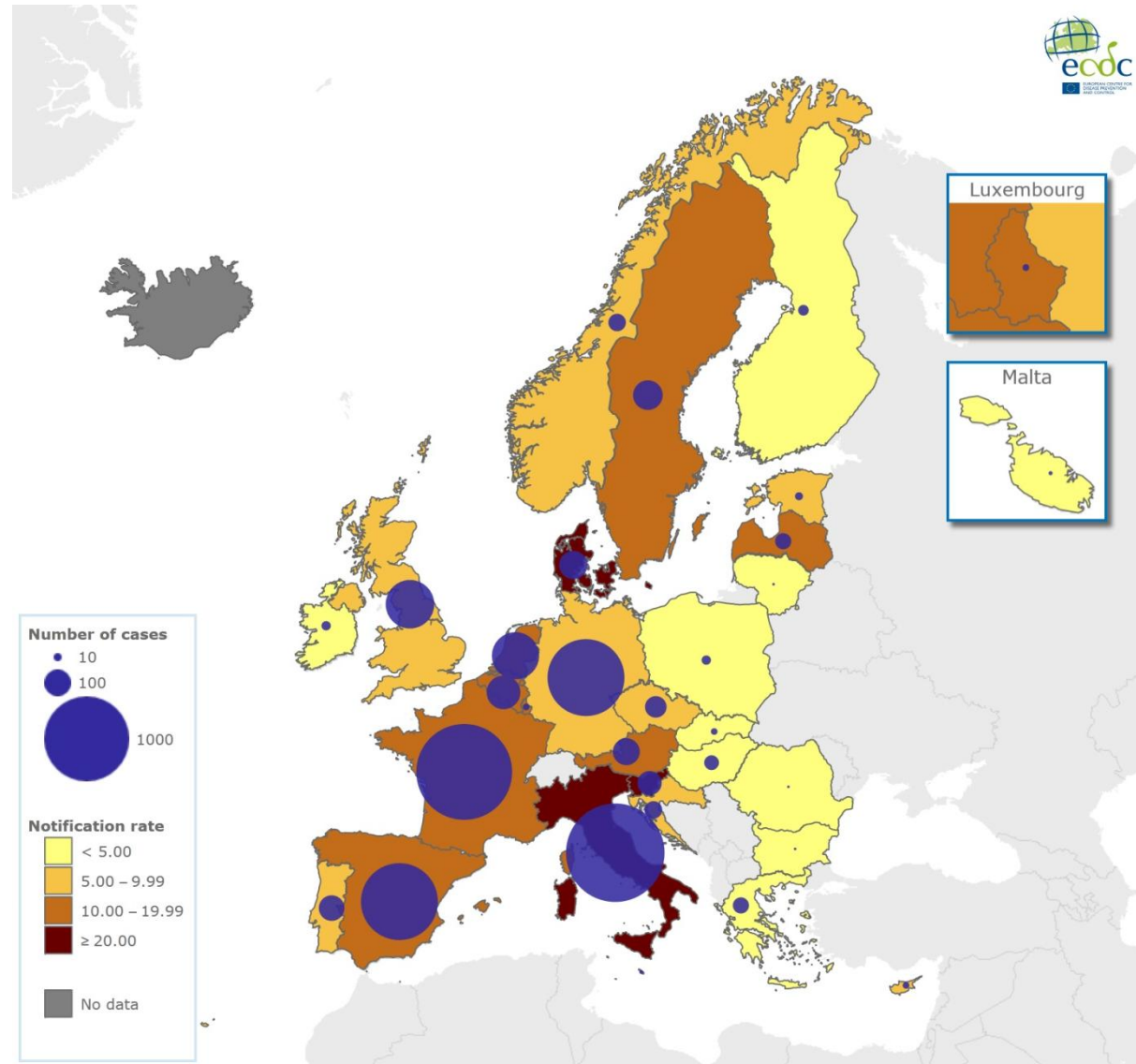


# Legionellose Falldefinitionen RKI (2015)

## Labordiagnostischer Nachweis

- **Erregerisolierung** nur aus Sekreten des Respirationstrakts (z.B. BAL, Trachealsekret, Sputum), Lungengewebe oder Pleuraflüssigkeit
- **Nukleinsäurenachweis** (z.B. PCR) nur aus resp. Material
- **Antigennachweis** nur im Urin (z.B. ELISA, Immunchromatographie),
- **indirekter (serologischer) Nachweis:**
  - Antikörpernachweis mittels IFT (► deutliche Änderung (Titeranstieg) zwischen zwei Proben)
  - Antikörpernachweis mittels IFT (einmalig ► **deutlich erhöhter Wert** nur für den Nachweis von *Legionella pneumophila* **Serogruppe 1**).
- Antigennachweis in Sekreten des Respirationstrakts und
- IgM- und IgG-Antikörpernachweise mittels ELISA (auch Kombination) gelten wegen bisher unzureichender Validierung nicht als labordiagnostischer Nachweis.
- **Epidemiologische Bestätigung:** Epidemiologischer Zusammenhang mit labordiagnostisch nachgewiesenen Infektion beim Menschen.
- **Bei Reise –Infektionen:** (Hotel, Campingplatz, Schiff etc.) exakten Reisedaten (Erkrankungsbeginn, Reisezeit, Hotelname mit Adresse etc.) erfassen.
- Daten werden über das RKI an das Europäische Netzwerk ELDSnet übermittelt. Ermittlung von Hotels u. ä. als Infektionsquellen mit nachfolgenden Überwachungs und ggf. Dekontaminationsmaßnahmen.

# Reported cases of LD per million, by reporting country, EU/EEA, 2013

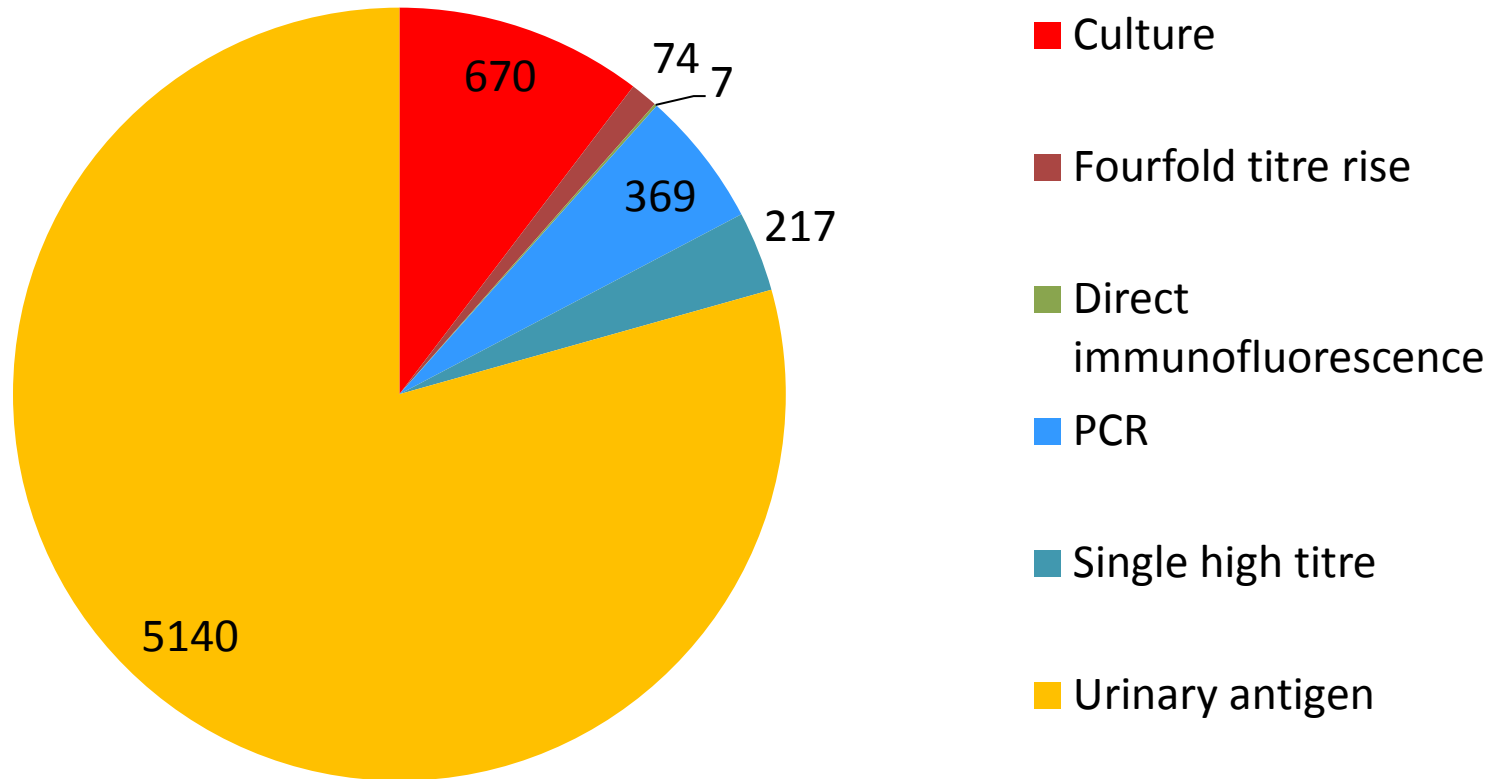


# Diagnostik Legionella-Infektionen

---

- Kultur
- Antigennachweis im Urin
- Nachweis von DNA
- Antigennachweis im respiratorischen Material
- Nachweis von Antikörpern im Patientenserum

# Laboratory methods by reporting country, EU/EEA, 2012 (more than one method per case possible)





# Kultur

---

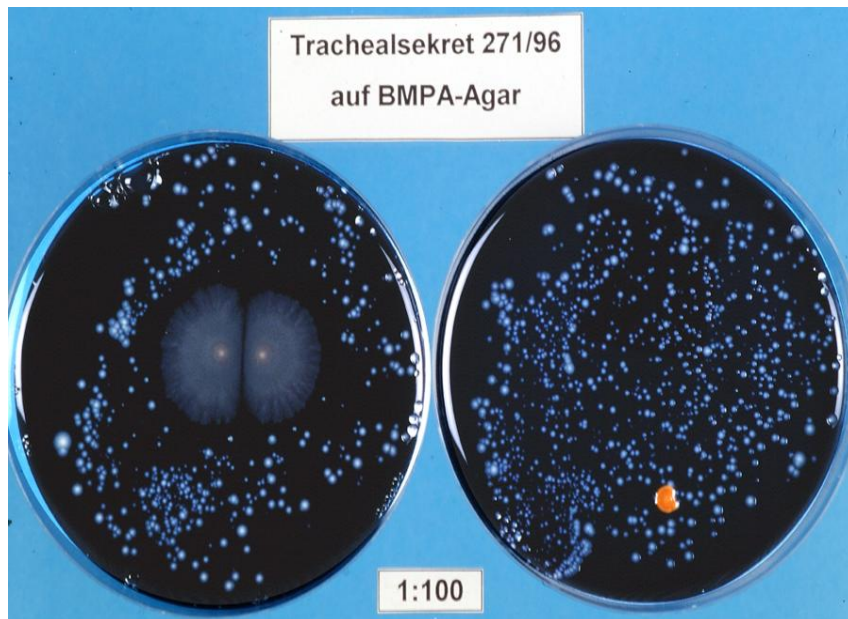
- Hoch spezifisch
  - Keine Kolonisation
  - Kontamination - pseudo- infections/outbreaks
- Nachweis aller Spezies und Serogruppens of *L. pneumophila*
  - Epidemiologische Untersuchung möglich
  - Doppelinfektionen
  - Auch unter Therapie positiv 5-7 Tage
- Für non-pneumophila Spezies geringere Sensitivität
- Dauer: 4-10 Tage
- Sensitivität: 5-60%
- RV für Wasser

# Molekularbiologischer Nachweis von Legionellen

---

- Nachweis von
    - Gattung etabliert (Spezifität nicht absolut geklärt)
    - Spezies etabliert
    - Serogruppe für Sg1 etabliert, für andere Sg in Entwicklung
    - Klon für einzelne Klone etabliert, wenige Daten
  - Nachweis unabhängig von
    - Lagerung
    - Transport
- Ringversuche bei INSTAND

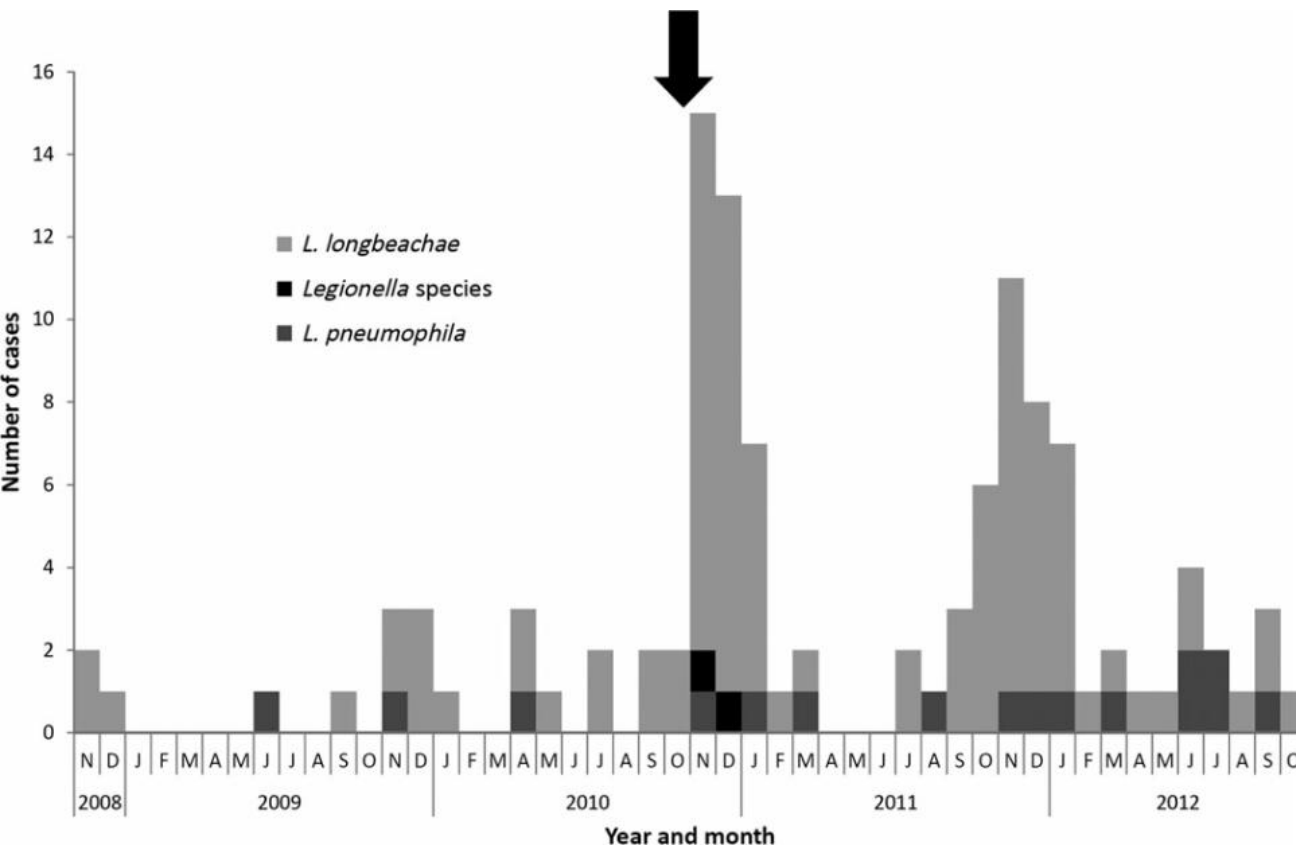
# Kultur von Legionellen aus klinischen Proben



- Acid washing (5 min, pH = 2,2)
- Hitzevorbehandlung (3 min 60 °C)
- Antibiotika
  - Cefamandol,
  - Polymyxin B,
  - Vancomycin,
  - Anisomycin
- Anbehandelte Patienten: niedrigere Anzuchtsrate
- Anzucht Non-*pneumophila*-spp.: (aus Wasser) schwieriger

**BAL Immer auch auf Legionella**  
**Breiter kultureller Ansatz bei „positiven“ Patient**

# Legionella Infections detected by PCR



- Number of cases of Legionnaires' disease throughout the study period.
- The arrow indicates when the routine polymerase chain reaction testing strategy was introduced

Murdoch et al. CID 2013;57(9):1275–81





# Nachweis von Legionella-Antigenen im Urin

## Charakteristik des Urin-Antigens

ca. 10 kDa

Resistent gegenüber Proteinasen;

Hitze-stabil

Hauptkomponente: Lipopolysaccharid

## Beginn und Dauer der Antigen-Ausscheidung

1-3 Tage nach Symptome

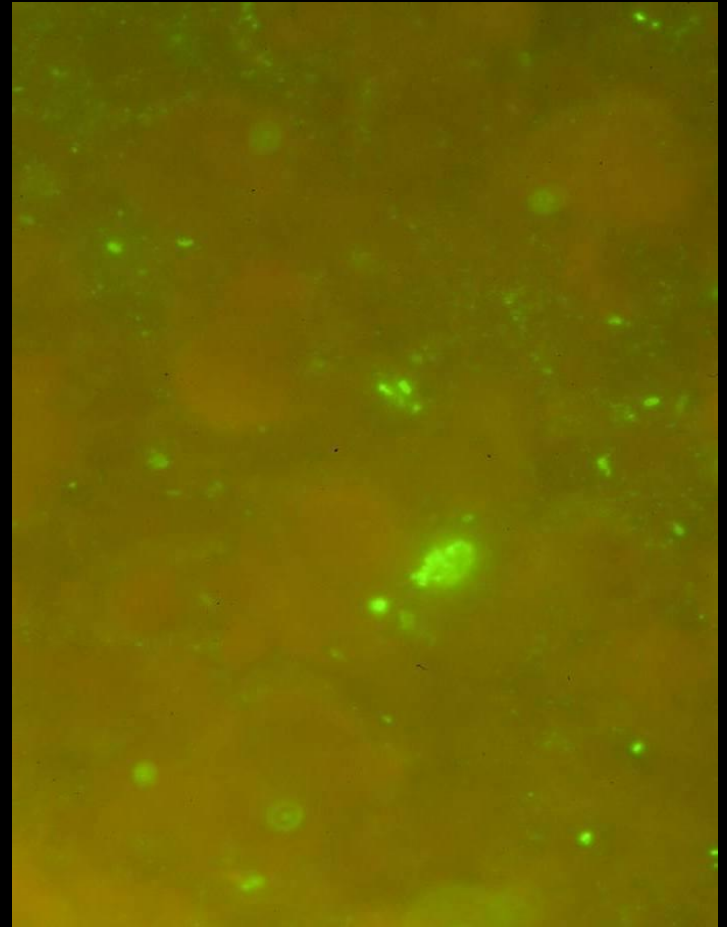
intermittierend oder kontinuierlich

42 Tage und länger nach Beginn der

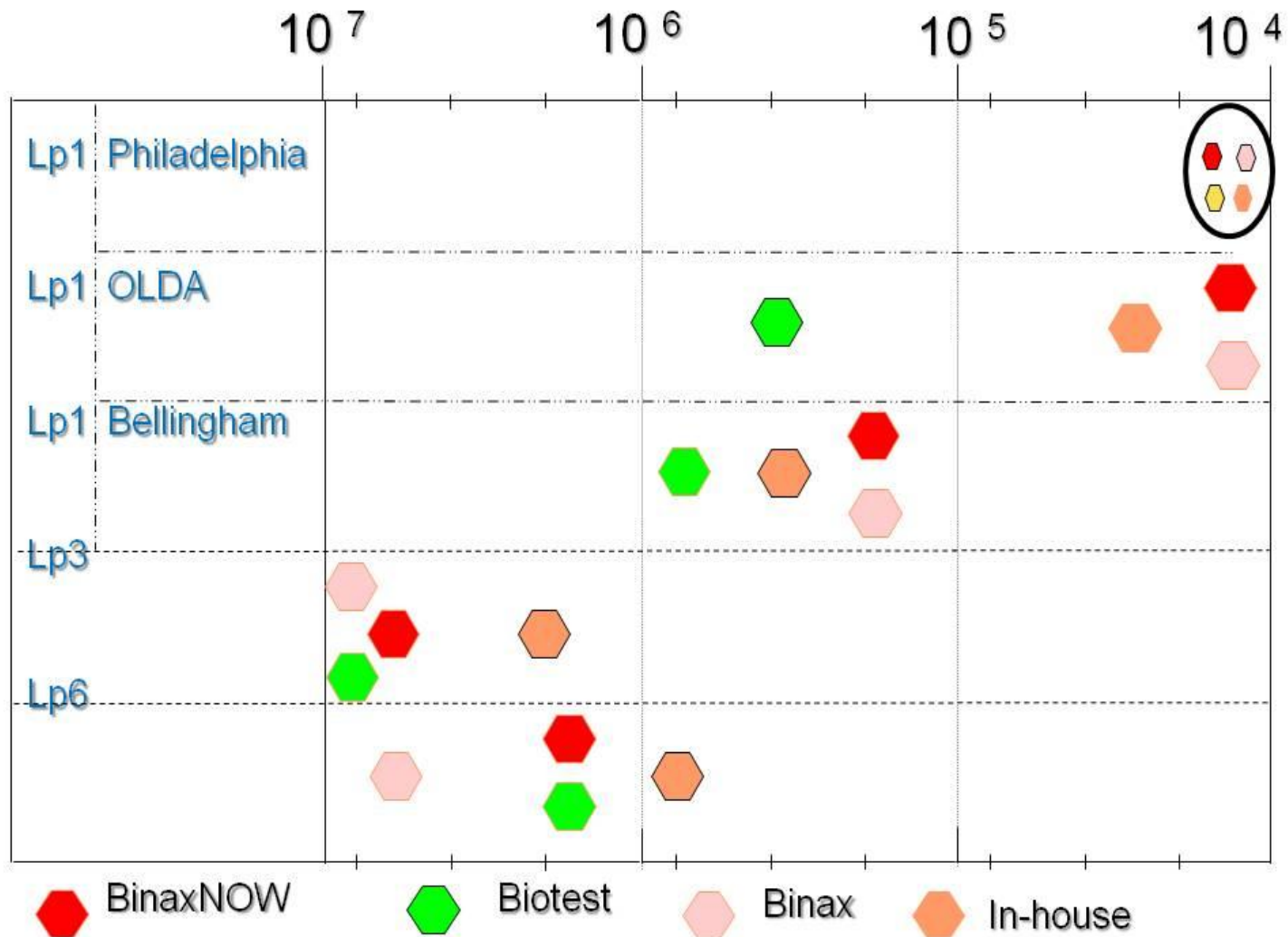
Antibiotikatherapie - selten

keine Therapiekontrolle

**Problem: Serogruppenspezifität**



# Sensitivity of urinary antigen detection in vitro sonicated Legionella cells/ml

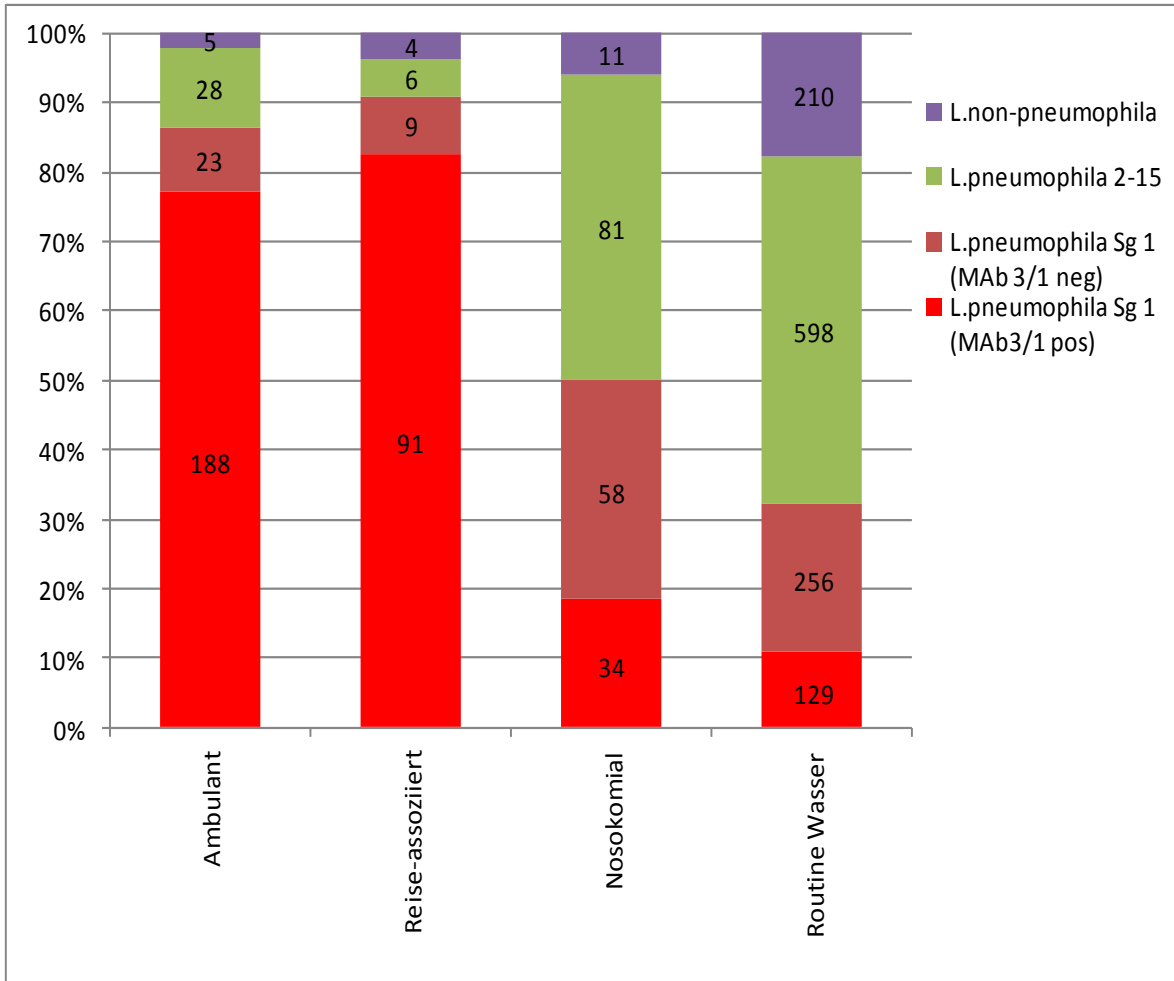


# Urin-Antigen Nachweis

---

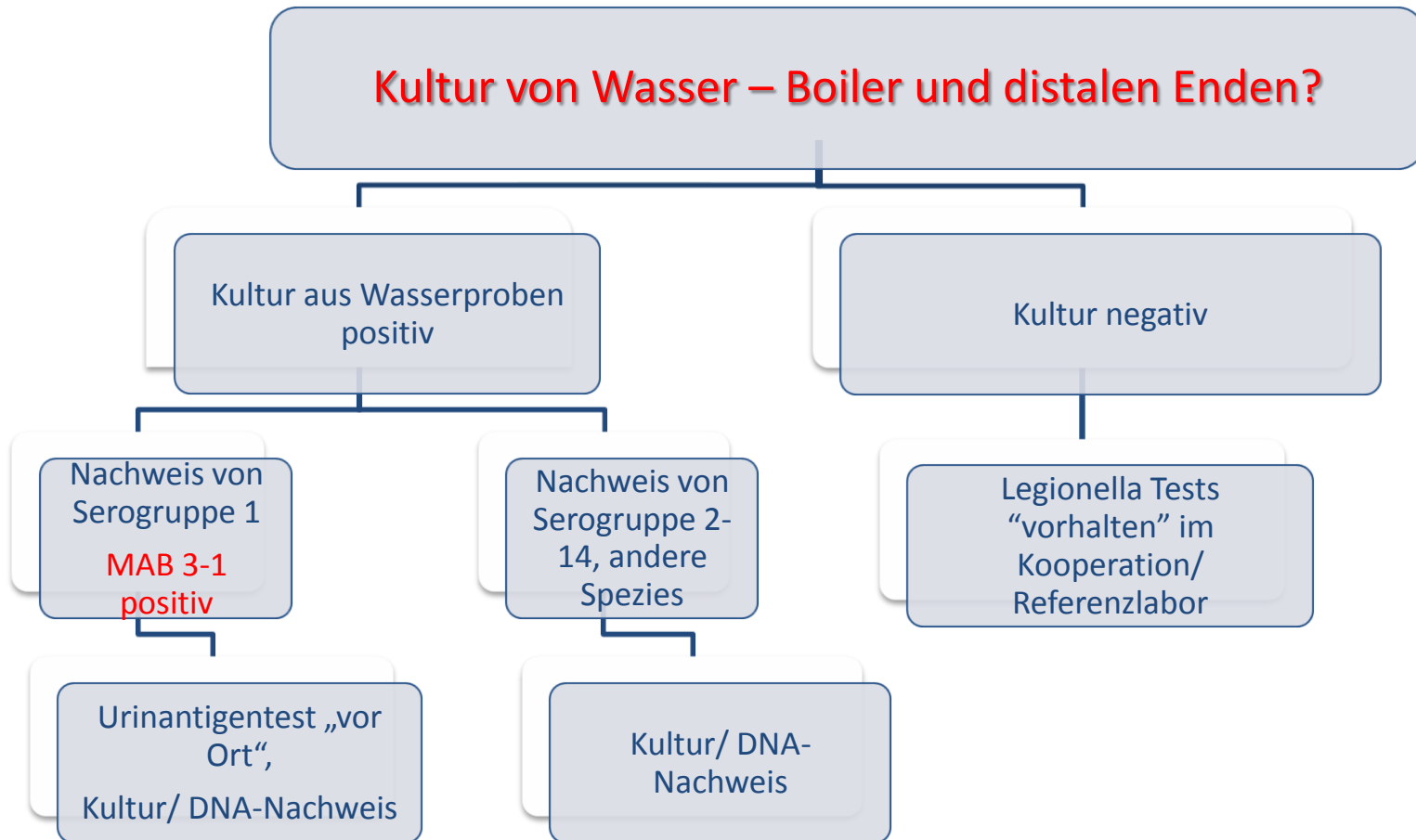
- Urine antigen ist hochspezifisch mit ELISA
- Immunochromatographic assays ????
- Hohe Sensitivität bei  
schweren Verläufen Lp1,  
MAb 2 /3-1 positive, adäquat zur Prävalenz  
Reise-assoziiert und ambulant erworben (CAP)
- Geringe/ moderate Sensitivität in nicht schweren  
Verläufen Lp1
- Geringe/ moderate Sensitivität bei MAb 2 / 3-1 negativen  
and non Lp1 Fällen
- Sensitivität hoch in Routine Laboratorien

# Serologische Typisierung - Legionella-Isolate (nach Ursprung) 1986-2014



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

# Mikrobiologisches Monitoring zur Überwachung nosokomialer Legionellose



# Infektionsquellen Legionella-Pneumonien

Häufig	Warmwassersysteme in der häuslichen Umgebung, in <b>Hotels, Bädern, im Krankenhaus, etc. TwVO</b>
	Rückkühlwerke mit „feuchter Kühlung“ <b>DIN 2047-2</b>
	Whirl Pools
Selten	Thermalbäder, Befeuchter in Restaurants und Geschäften (Lebensmittel), Inhalatoren Zimmer-/ Zierspringbrunnen,
Sehr selten	Geburtswannen Magenspülsonde/ Transoesophageale Echo-Sonde (Leitungswasser) Wundinfektionen nach Baden, Eismaschinen Dentaleinheiten Straßenbefeuchtungsmaschinen Scheibenwischeranlage , Gartenerde ( <i>L. longbeachae</i> ) Autowaschanlagen,
(noch) nicht:	Gewächshäuser

# Praktische Probleme bei der Typisierung von Legionellen

---

- **IKZ:**           **2 bis 10 (bis 19 Tage)**
- Multiple Expositionsmöglichkeiten
- Untersuchung mehrerer Umweltproben nötig
- **Vergleich von Patienten- und Umwelt-Stämmen setzt idealerweise Anzucht voraus**
- **Alternativ – direktes SBT**
- **Infektionsort oft nicht Wohnort- RKW ?**
- **Umweltproben:**   Vorkommen mehrerer Stämme
- (Spezies, Serogruppen, Genotypen)
- Anzahl der zu untersuchenden Isolate



# Suche der Infektionsquelle

Patientenmaterial  
2-3 Kolonien



Wasserproben  
2 je Morphotyp  
Mind. 3 Probe



1. Serologische Typisierung bei *L. pneumophila*:

Serogruppe, MAb Subtyp

bzw. Speziesbestimmung:

MALDI-TOF, DNA-Sequenz (mip, 16S rRNA)

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

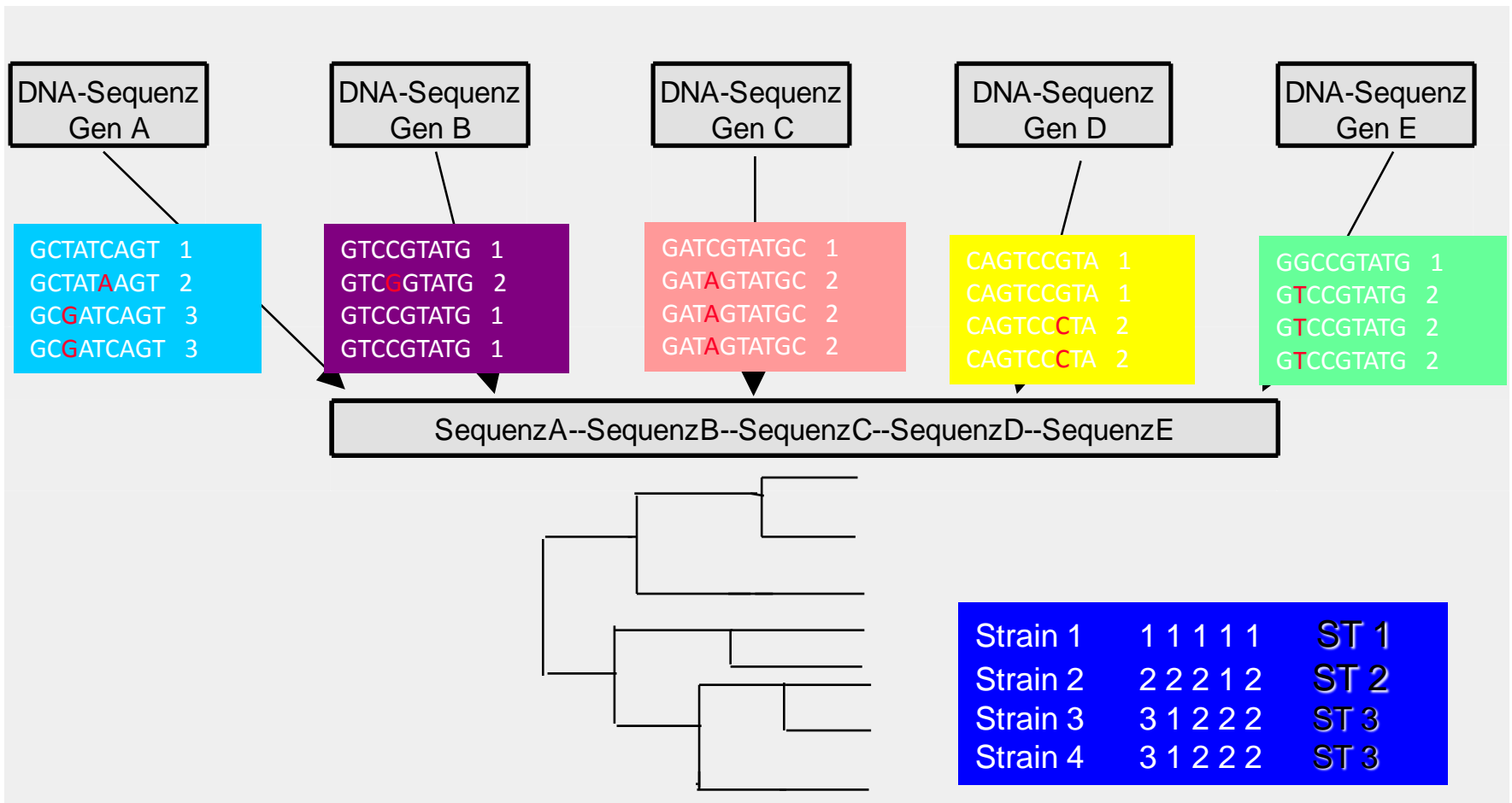
Nicht unterscheidbar > Übertragung aus dem Wassersystem

# Was ist eine monoklonaler (MAb) Subtyp ?

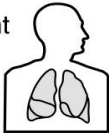
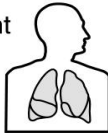
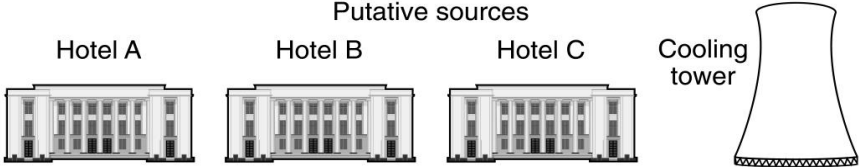
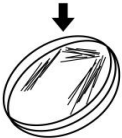
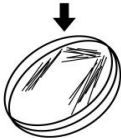
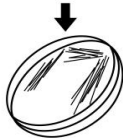
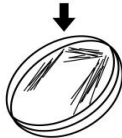
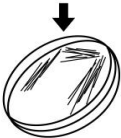
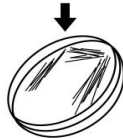
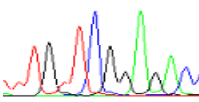
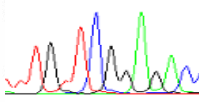
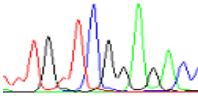
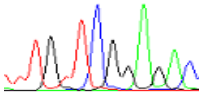
Dresden	8/5	3/1		10/6		8/4	20/1
Standard panel	1	2	3	4	5	6	7
Type strain (ATCC)							
Philadelphia 1 (33152)	+++	+++	0	0	+++	+++	0
Allentown 1 (43016)	+++	+++	0	0	+++	0	0
Benidorm 030E (43108)	+++	+++	0	0	+++	0	+++
Knoxville 1 (33153)	+++	+++	+++	0	0	++	0
France 5811 (43112)	+++	+++	0	0	0	0	0
OLDA (43109)	+++	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

- 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

# Was ist ein Sequenztyp ?



# MAb – SBT - WGS

	Country A	Country B	Country C			
Clinical investigations and cases reported to EWGLI	Patient 1 	Patient 2 				
Environmental investigations			Putative sources Hotel A   Hotel B   Hotel C   Cooling tower 			
Species identification	 <i>L. pneumophila</i>	 <i>L. pneumophila</i>	 <i>L. pneumophila</i>	 <i>L. pneumophila</i>	 <i>L. pneumophila</i>	 <i>L. pneumophila</i>
mAb subgrouping of <i>L. pneumophila</i> sg 1 isolates	<i>L. pneumophila</i> sg 1 Knoxville	<i>L. pneumophila</i> sg 1 Knoxville	<i>L. pneumophila</i> sg 1 Knoxville	<i>L. pneumophila</i> sg 1 Knoxville	<i>L. pneumophila</i> sg 1 Oxford	Non- <i>L. pneumophila</i> sg 1 NA
EWGLI molecular typing of mAb indistinguishable isolates	ST2 6,10,19,3,19,4,9 	ST2 6,10,19,3,19,4,9 	ST9 3,10,1,3,14,9,11 	ST2 6,10,19,3,19,4,9 	NA	NA
			Hotel B Possible source of outbreak			



Exchange types..... not strains.

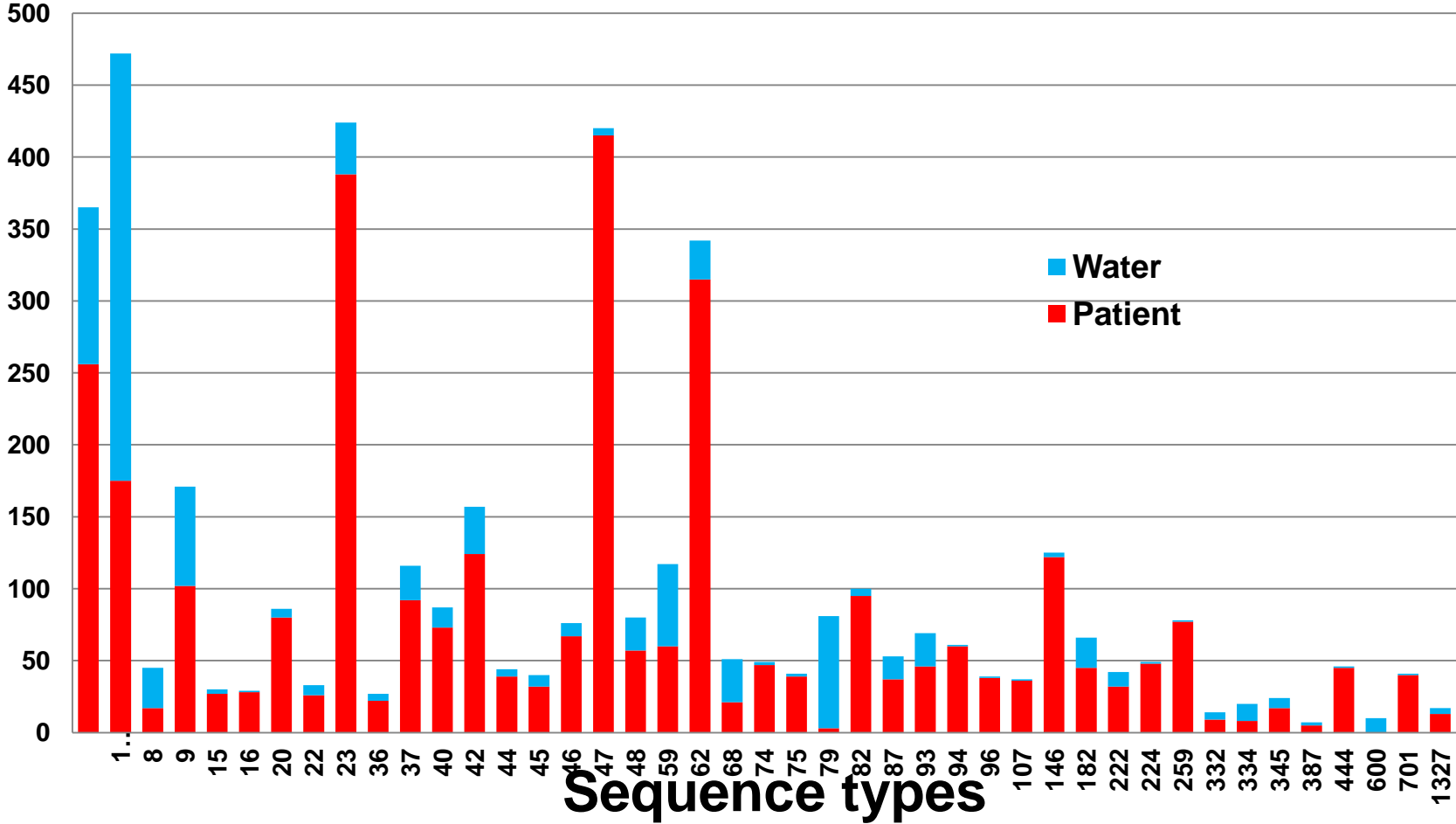


# Genotyping of Strains isolated in the NL

- Primary prevention: Routineuntersuchung
- Secondary prevention: Suche nach IQ nach Erkrankung
- Schlussfolgerung.
- „primary prevention efforts do not include the most important reservoir(s) causing the transmission of *L. pneumophila* in the Netherlands“
- Euser et al. 2013 Eur JCM

<i>L. pneumophila</i> SG1, ST	Patient isolates (n=179)	Environmental strains			$\chi^2$ test p-value
		Primary prevention strains (n=182)	Secondary prevention strains (n=60)		
47	74	–	–	NA	
62	23	1	–	0.565	
23	5	–	1	0.081	
42	3	–	9	<0.001	
46	12	1	–	0.565	
1	7	123	25	<0.001	
9	6	2	2	0.239	
45	10	1	–	0.565	
82	8	–	1	0.081	
37	4	–	1	0.081	
109	4	–	–	NA	
48	1	1	–	0.565	
146	2	–	1	0.081	
207	3	–	–	NA	
479	2	–	–	NA	
36	1	2	–	0.415	
534	1	1	2	0.091	
953	1	–	1	0.081	
7	–	4	1	0.802	
59	–	8	2	0.720	
188	–	9	1	0.269	
492	–	–	2	0.013	
866	–	–	2	0.013	
177	–	5	–	0.195	
1066	–	2	–	0.415	
1120	–	2	1	0.415	
Other sequence types	12	20	9	NA	

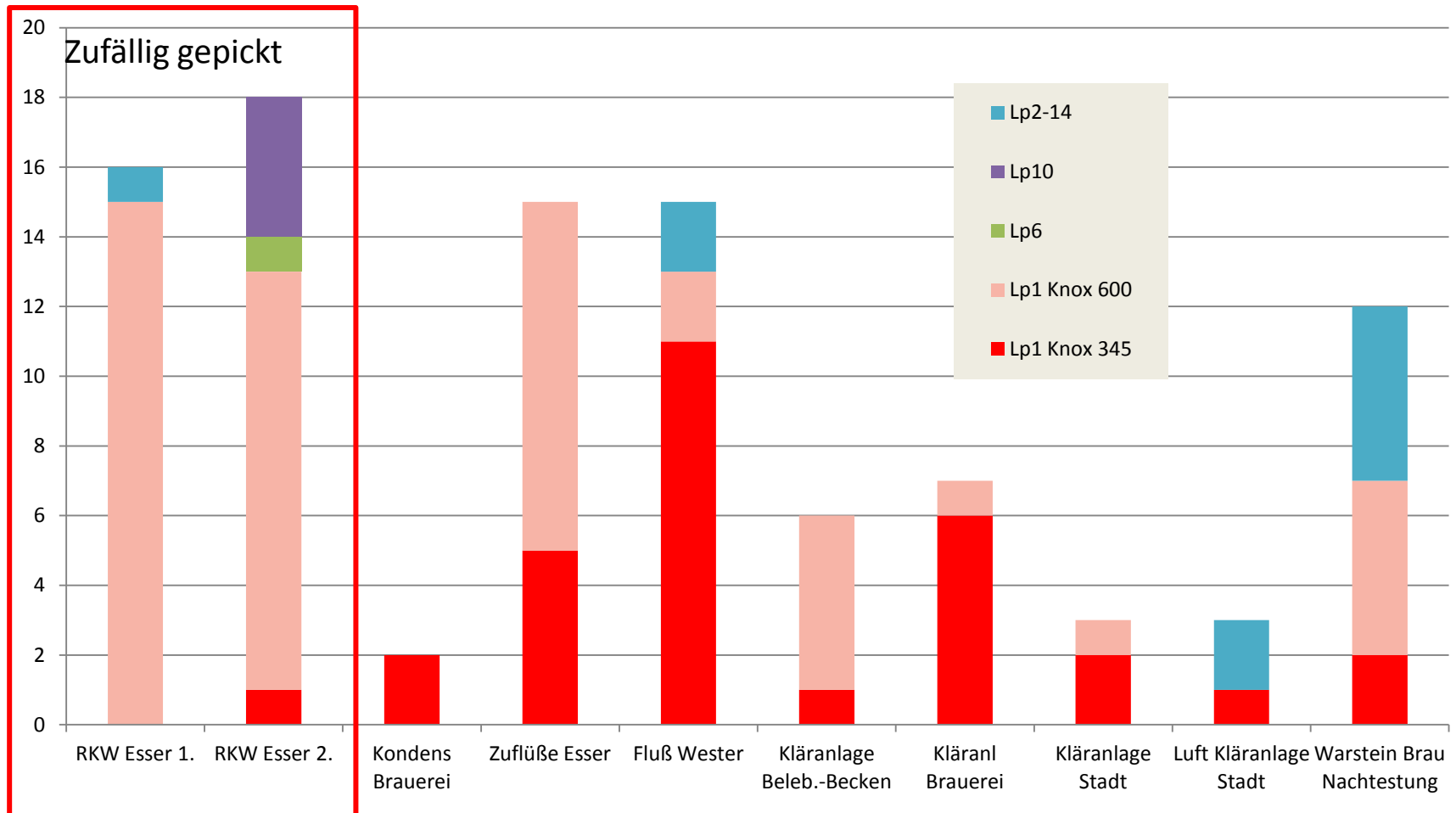
# Distribution of ST among clinical isolates





# Typisierung Wasser-Proben Warstein

238 Wasserproben untersucht, 17 positiv



# Unterschiedliche Kolonie-Varianten im Wasser

---



- Lp1 Knox ST 600
- Lp2-14
- Lp1 Knox ST 345

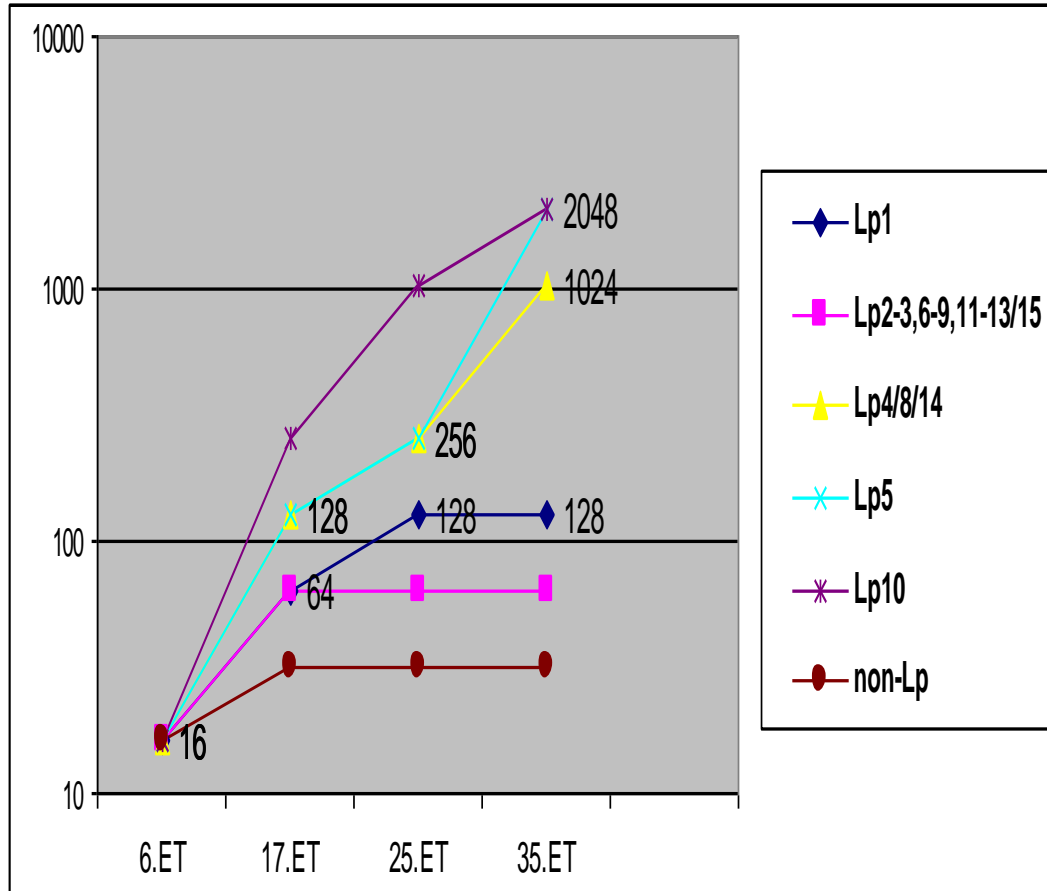
# Typing Clinical Respiratory Samples Jülich

strain	SG-Mab	PCR Lp	PCR sg1	ST	fla	pil	asd	mip	momp	pro	neu
L14-312 R/E	5 Isolat			1327	-	14	16	31	15	13	210
L14-312	DNA	+	0	1327	11	14	16	31	15	13	210
L14-307	5 Isolat			1327	11	14	16	31	15	13	210
L14-307	DNA	+	0	1327 ?	-	14	16	31	-	13	210
L14-308	5 Isolat			1327	11	14	16	31	15	13	210
L14-308	DNA	+	0	1327 ?	-	14	-	31	15	-	210
L14-319	5 Isolat			1327	11	14	16	31	15	13	210
L14-308	DNA	+	0	1327 ?	-	14	-	-	15	-	210
<b>S14-19977</b>	<b>Ak Sg1</b>	<b>512</b>	<b>Ak Sg 2-8</b>	<b>1024</b>							



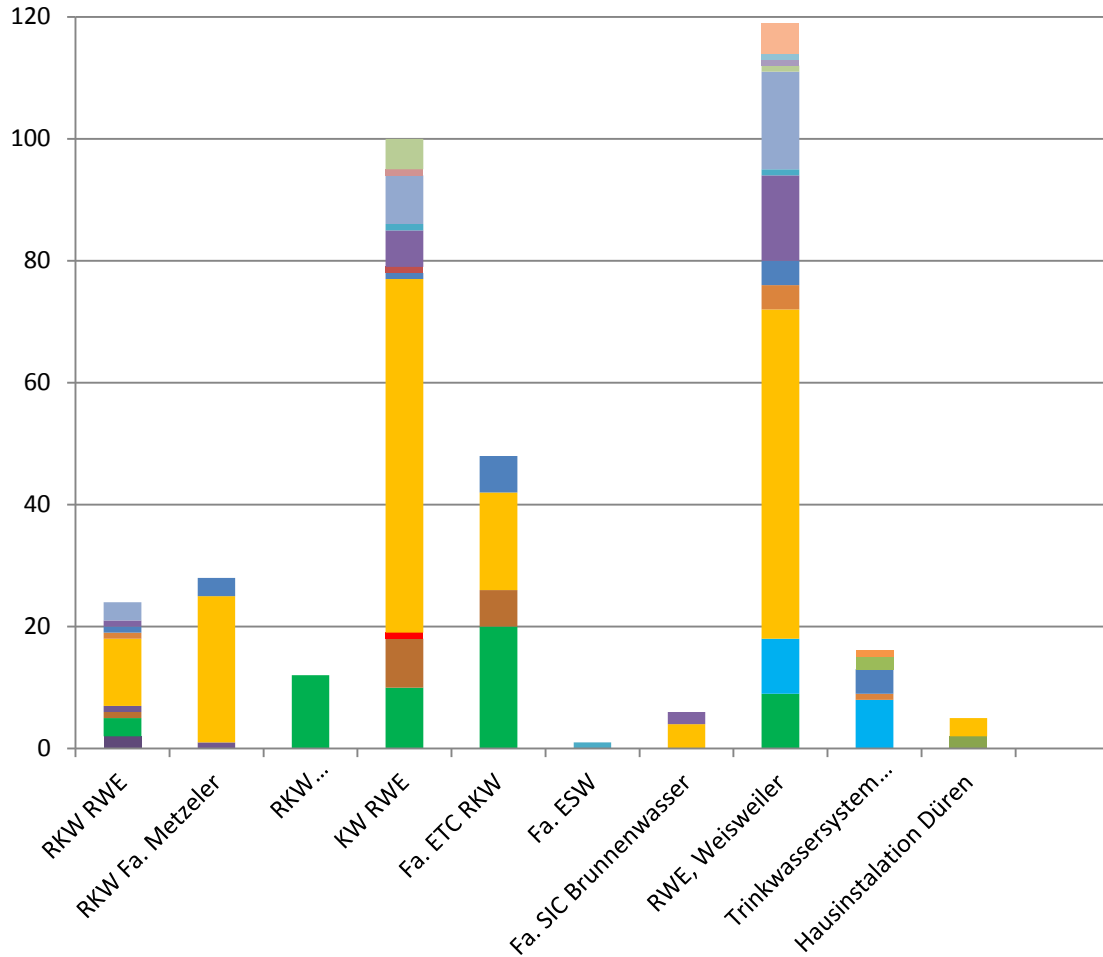
IMMH

# AK-Verlauf einer Kultur-bestätigten Infektion durch *L.pneumophila* Sg10



- Nosokomiale Legionellose, doppelseitige Pneumonie;
- DFA-positiv,
- Urin-Antigen-positiv
- Kultur-Lp10 positiv

# Typisierung Umweltisolate Jülich, 2014-15



- L. osnabrueckensis, neue noch nicht publizierte Spezies
- L. oakridgensis
- L. gratiana
- L. feeleii
- L. species / Differenzierung folgt
- L. pneumophila Sg 10
- L. pneumophila Sg 9
- L. pneumophila Sg 6 Mabtyp Dresden
- L. pneumophila Sg 6 Mabtyp Chicago
- L. pneumophila Sg 2-14, Sg 4 schwach positiv, kreuzreagierend, ST 1376
- L. pneumophila Sg 5, Mab 54-4 negativ, SBT 8;6;34;9;53;8; ST209
- L. pneumophila Sg 4 Mabtyp Portland
- L. pneumophila Sg 4 Mabtyp Los Angeles
- L. pneumophila Sg 2-14, Sg 5 negativ
- L. pneumophila Sg 2-14, Sg 5 negativ, kreuzreagierend
- L. pneumophila Sg 3
- L. pneumophila Sg 1 Mabtyp Bellingham
- L. pneumophila Sg 1 Mabtyp Oxford
- L. pneumophila Sg 1 Mabtyp Olda/Oxford
- L. pneumophila Sg 1, Mabtyp nicht bestimmt
- L. nonpneumophila-Spezies, keine weitere Subkultur/Typisierung möglich

# Diagnostische Methoden bei Legionella-Infektionen

Klin. Material	Diagnostische Methode	Für Diagnostik: Fallbestätigung	Für Epidemiologie Feintypisierung
Resp. Proben:	Kultur:	empfohlen	Ideal: Sg, MAb-Typ, ST
	qPCR Genus	empfohlen	eingeschränkt
	qPCR Spezies	empfohlen	eingeschränkt
	qPCR SG1	empfohlen	Nützlich Sg 1/ Ausschluss andere Sg /Spezies
	Antigen detektion IF	Wenig sensitiv	in Ausnahmen: Sg, MAb-Typ
	nSBT/Sequenz (ST)		bei hoher DNA Konzentration: sehr gut: ST
Urin	ELISA, ICT	empfohlen	bei hoher Konzentration: MAb-Typ
	qPCR	sinnlos	
Serum	qPCR	bedingt geeignet/ Sensitivität	sehr eingeschränkt
	Antikörpernachweis	geeignet im Serumpaar	sehr eingeschränkt, besondere Fälle

# Zusammenfassung

---

- Epidemiologie beginnt mit der Diagnose  
900 gemeldete versus mind.10 000 geschätzte Fälle
- Diagnostische Methoden sind besser als ihr Ruf  
EBM 32006 - Kostenneutral bei Verdacht auf meldepfl. Erkr.
- Aufmerksamkeit
- Legionellen im Wasser  
Infektion - kann sein – muss aber nicht  
Ist es wichtiger Infektionen zu detektieren als Legionellen im Wasser ?
- Typisierung

MAb

SBT, Chip

WGS





- 
- Auch wenn alle einer Meinung sind, können alle unrecht haben.

## **Bertrand Russel ( 1872-1970)**



# Nationales Konsiliarlabor für Legionellen

---

Technische Universität Dresden

Institut f. Medizinische Mikrobiologie u. Hygiene

Dr. Christian Lück

Fiedlerstr. 42

01307 Dresden

Tel.: 0351- 458- 16580/ 6213

Fax: 0351- 458- 6310

e-mail: [Christian.Lueck@tu-dresden.de](mailto:Christian.Lueck@tu-dresden.de)

<http://www.konsiliarlabor-legionella.de>

