

domatec

Technology & Services for Facility and Hygiene

Dr. habil. Anna Salek

# Vorteile Serotypisierung Legionella: Falsch negatives oder positives Ergebnis

GVPC Agar

Oktober 2011

## Legionella pneumophila

Falsch positiv?

oder

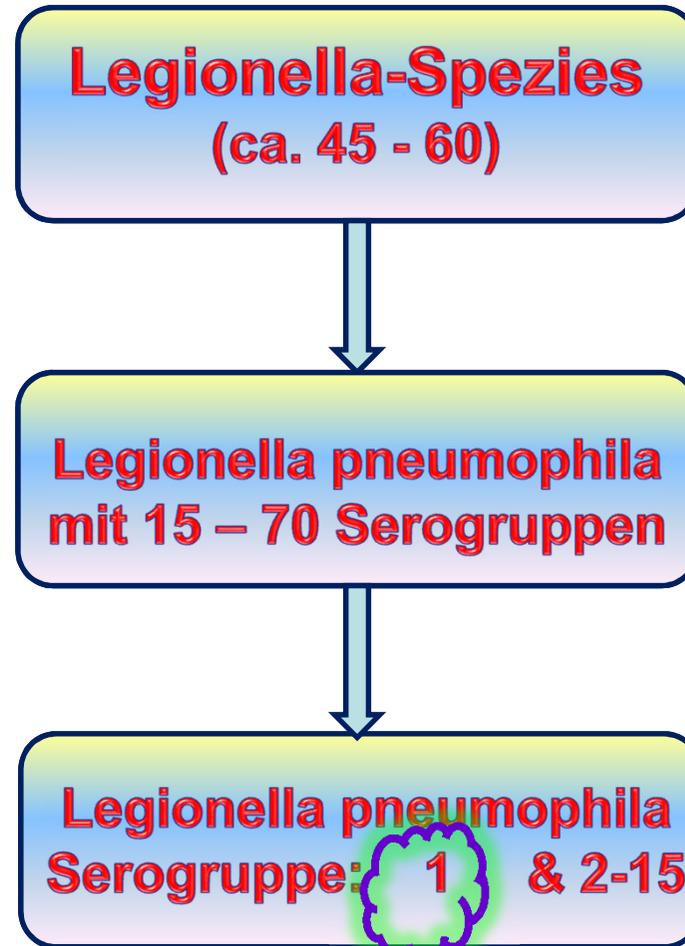
Falsch negativ?

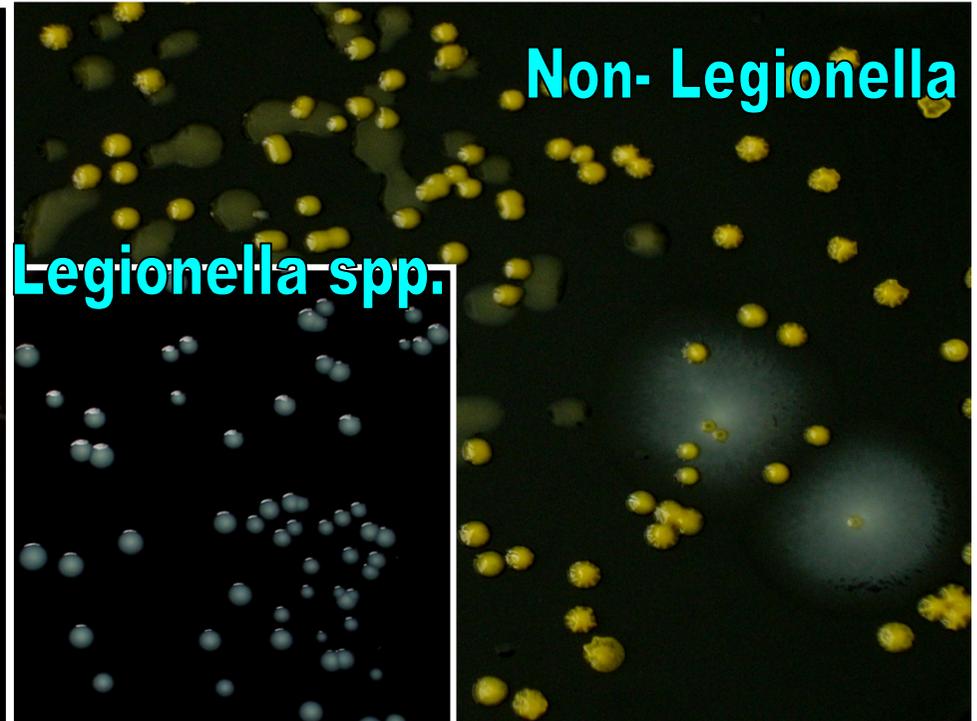
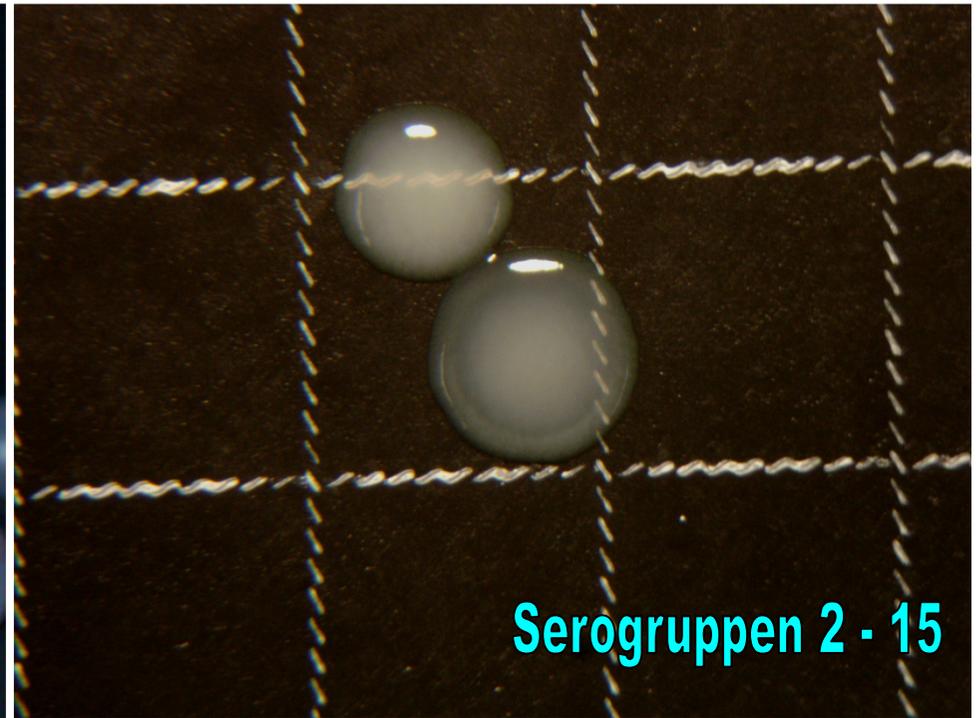
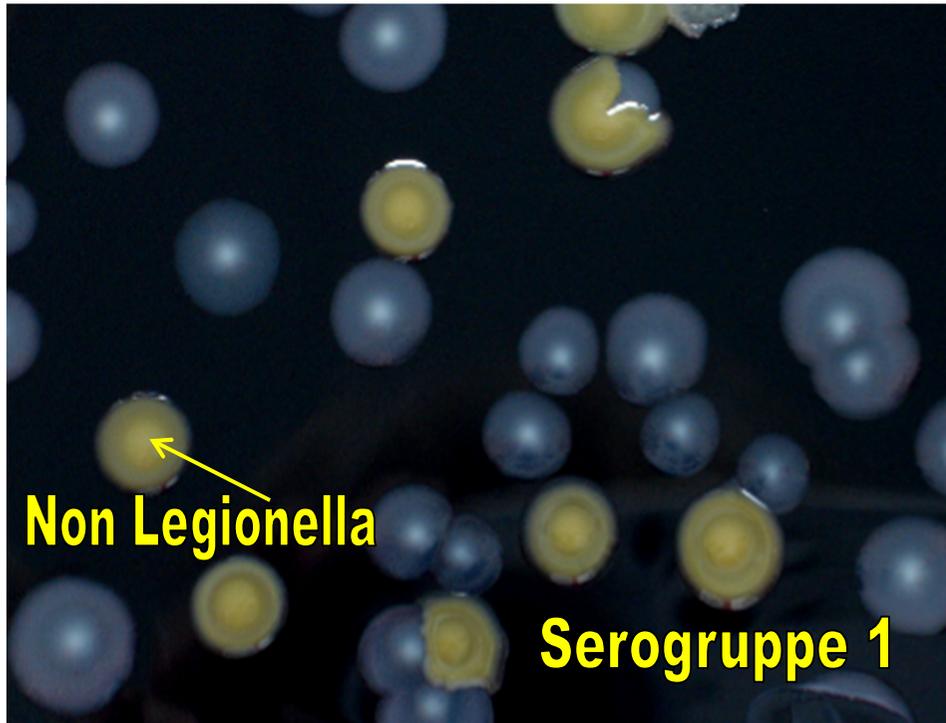


## Regelmäßige Kontrollen sind unverzichtbar



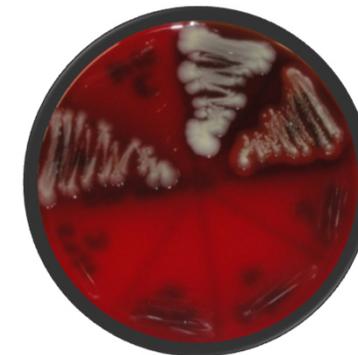
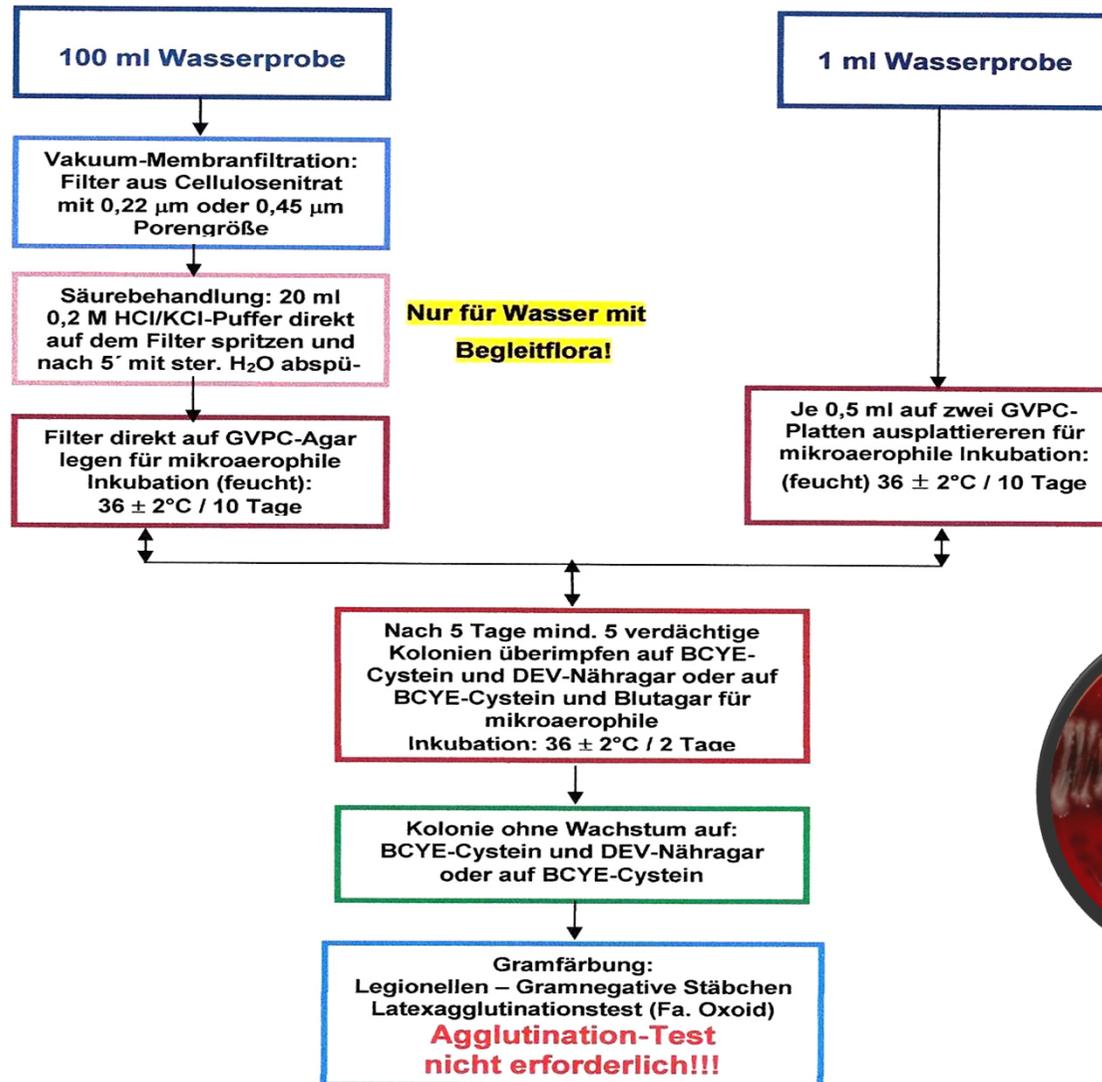
- **sonder für Anwender gemacht.**
- **Normen müssen technisch richtig, in der Praxis bewährt, eindeutig, ohne Widersprüche, für das Anwendungsgebiet zutreffend .... (Vortrag Dipl.-Ing. V. Meyer, 13.10.2011)“**





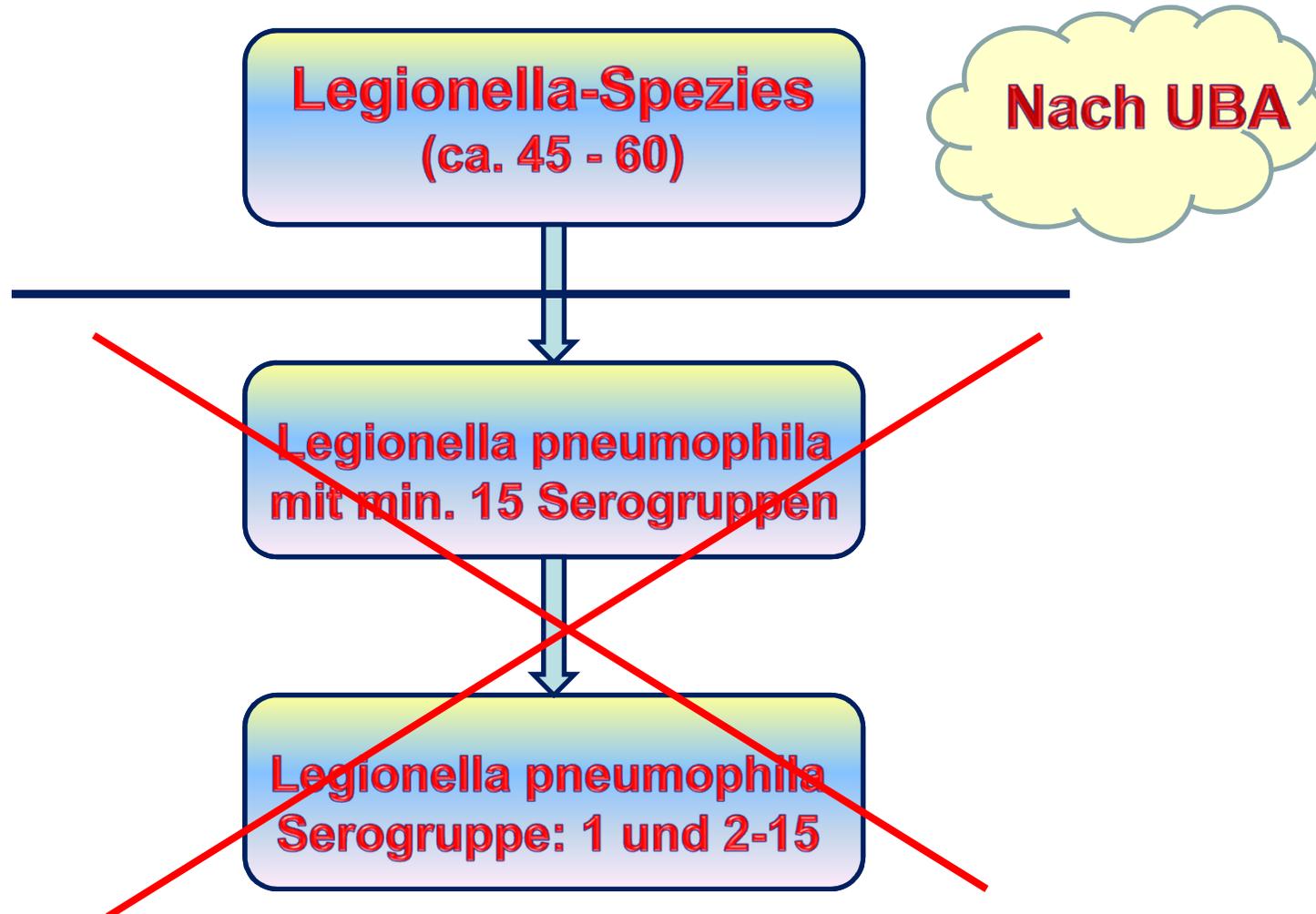
- In Deutschland ist eine Artbestimmung der Gattung *Legionella*, z.B. *Legionella pneumophila*, bei der Routineüberwachung von erwärmtem Trink- und Badewasser nicht erforderlich, nur *Legionella* sp. (s. Empfehlung des UBA, BGBl. 11-2000, s.911ff).

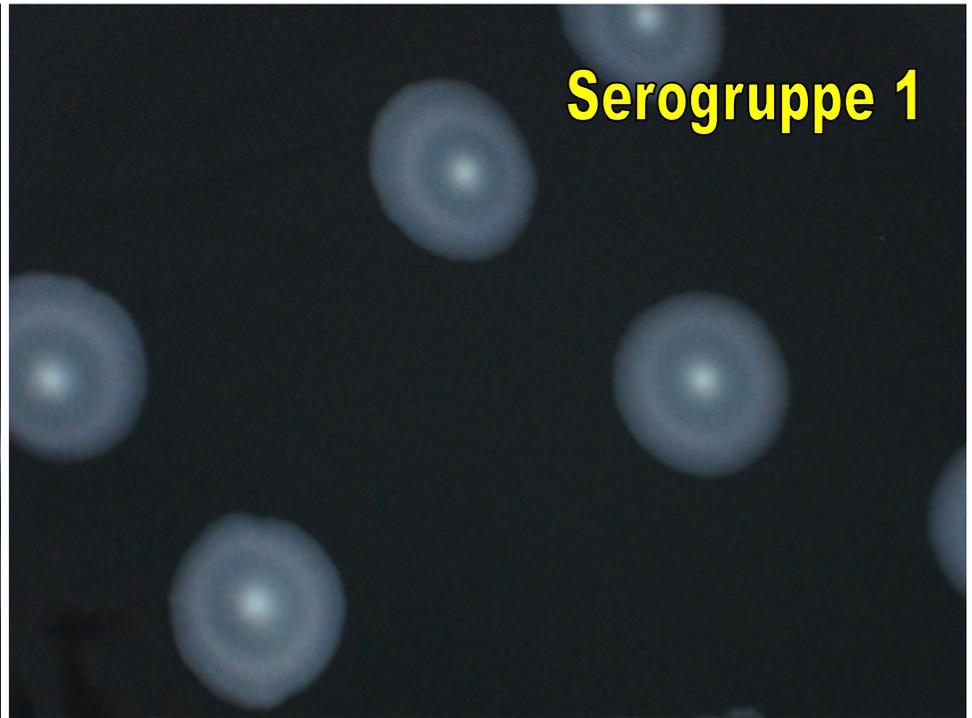
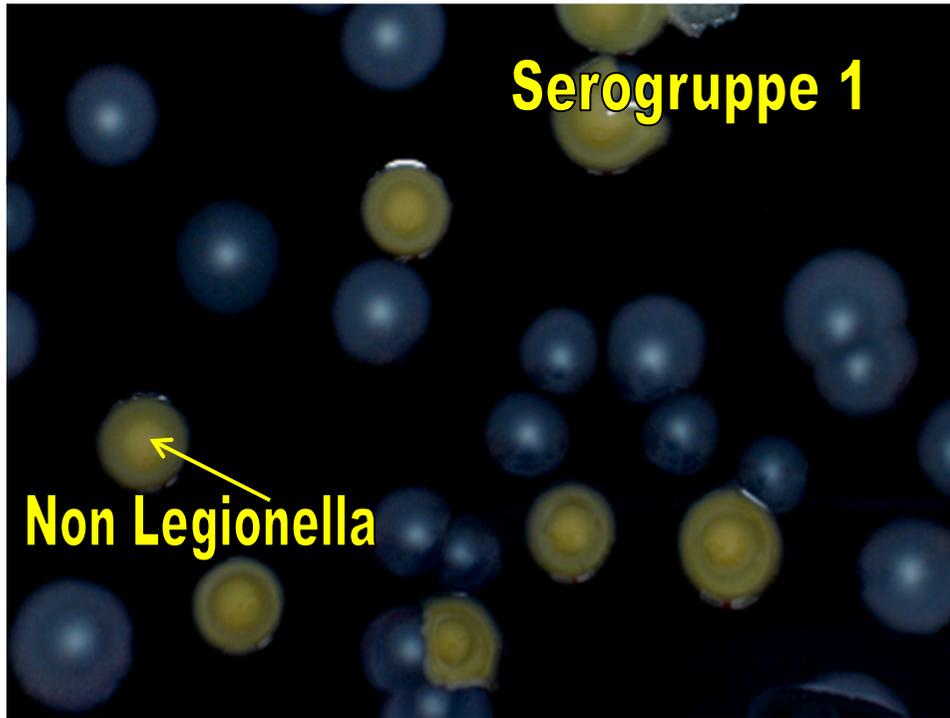
# Legionella pneumophila: Nachweis



- Die vorgeschriebenen Nachweismethoden (nach BGBl. 11-2000, s. 911ff oder ISO 11731-2 vom 6-2008) besagen, dass alle Kolonien, die auf GVPC-Agar wachsen, aber auf cysteinfreiem Medium kein Wachstum zeigen, als *Legionellen spp.* betrachtet werden.
- Aber zusätzlich sehen wir in der Praxis auch Wachstum von Begleitflora (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*) auf GVPC-Agar. Dieses kann das Zählergebnis verfälschen, z.B. durch Verdrängung von *Legionella* Kolonien oder sogar vollständige Inhibition von *Legionella*-Wachstum.

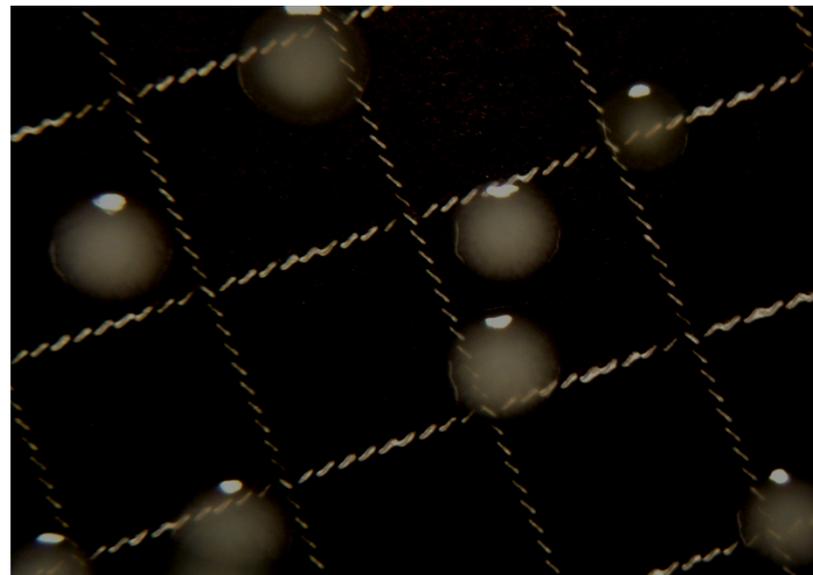
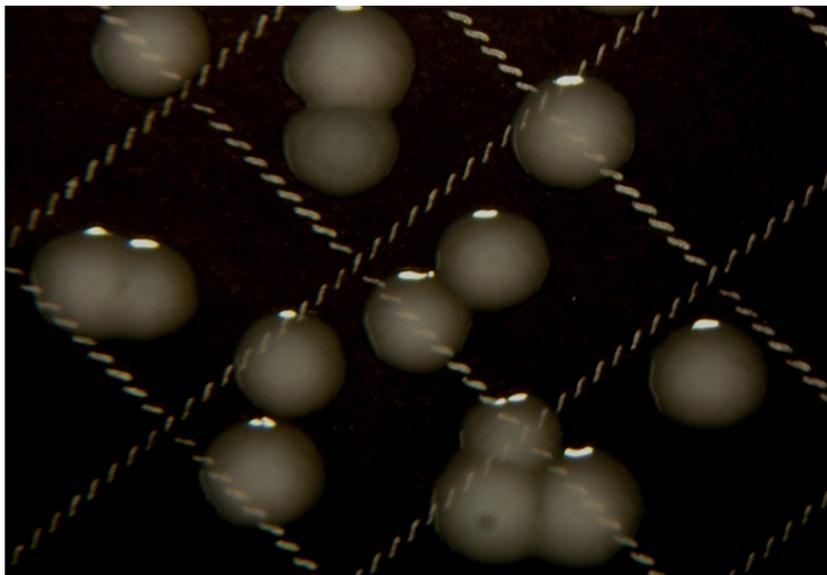
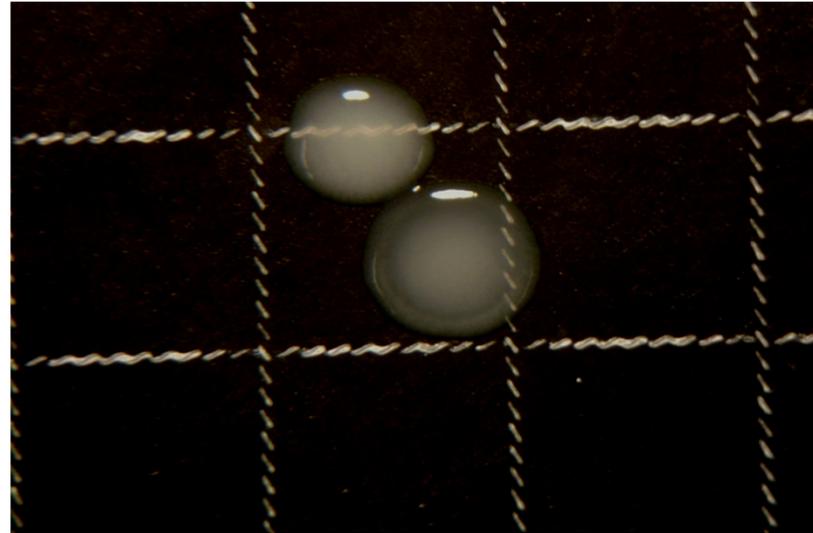
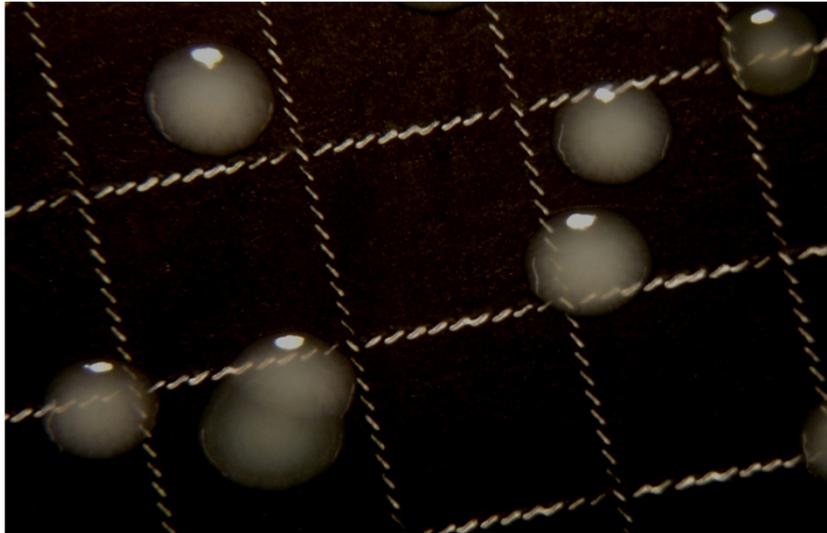
# Untersuchung nur *Legionella*-Spezies



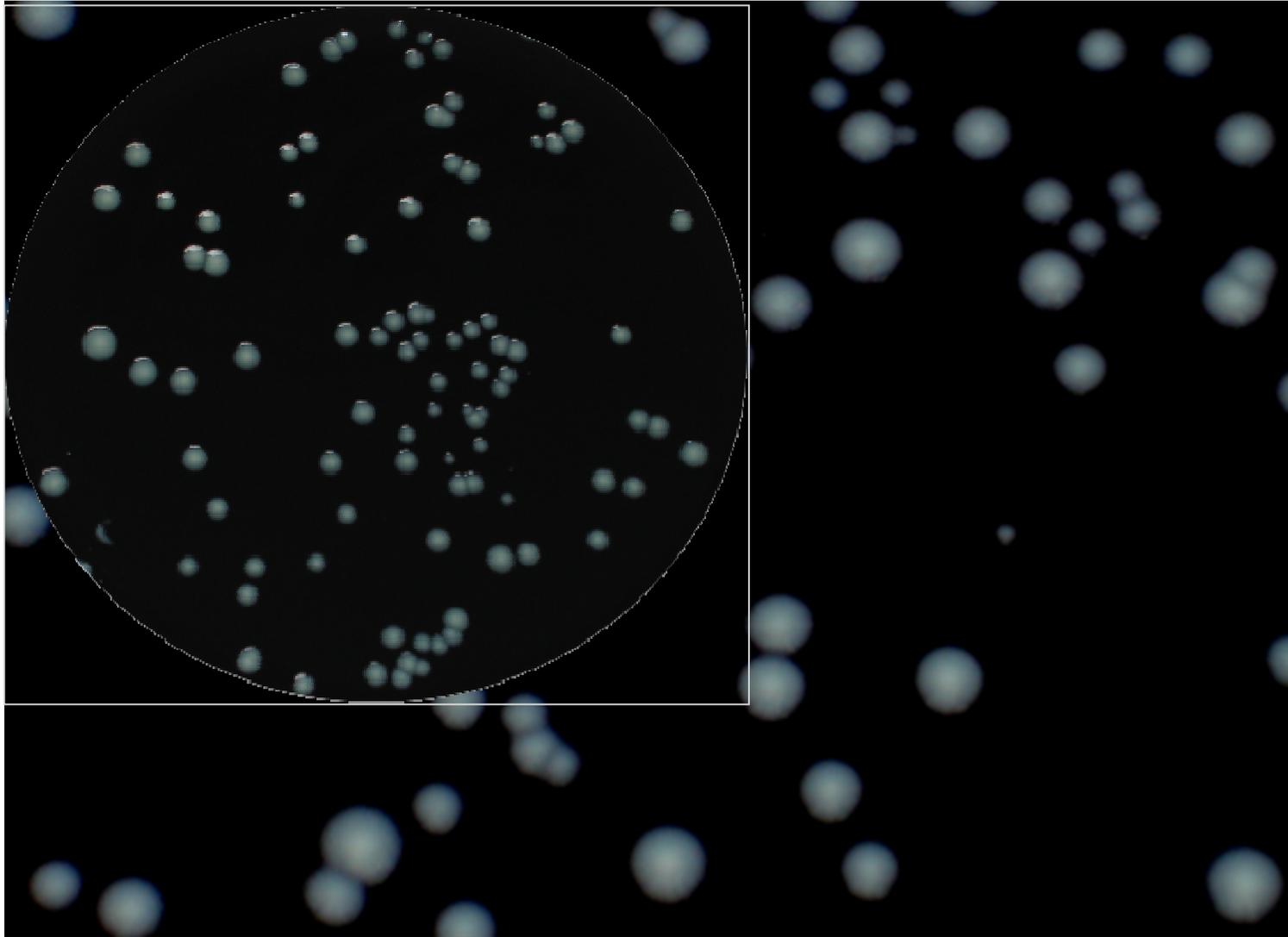


# Legionella pneumophila Serogruppen 2-15

domatec  
Technology & Services for Facility and Hygiene

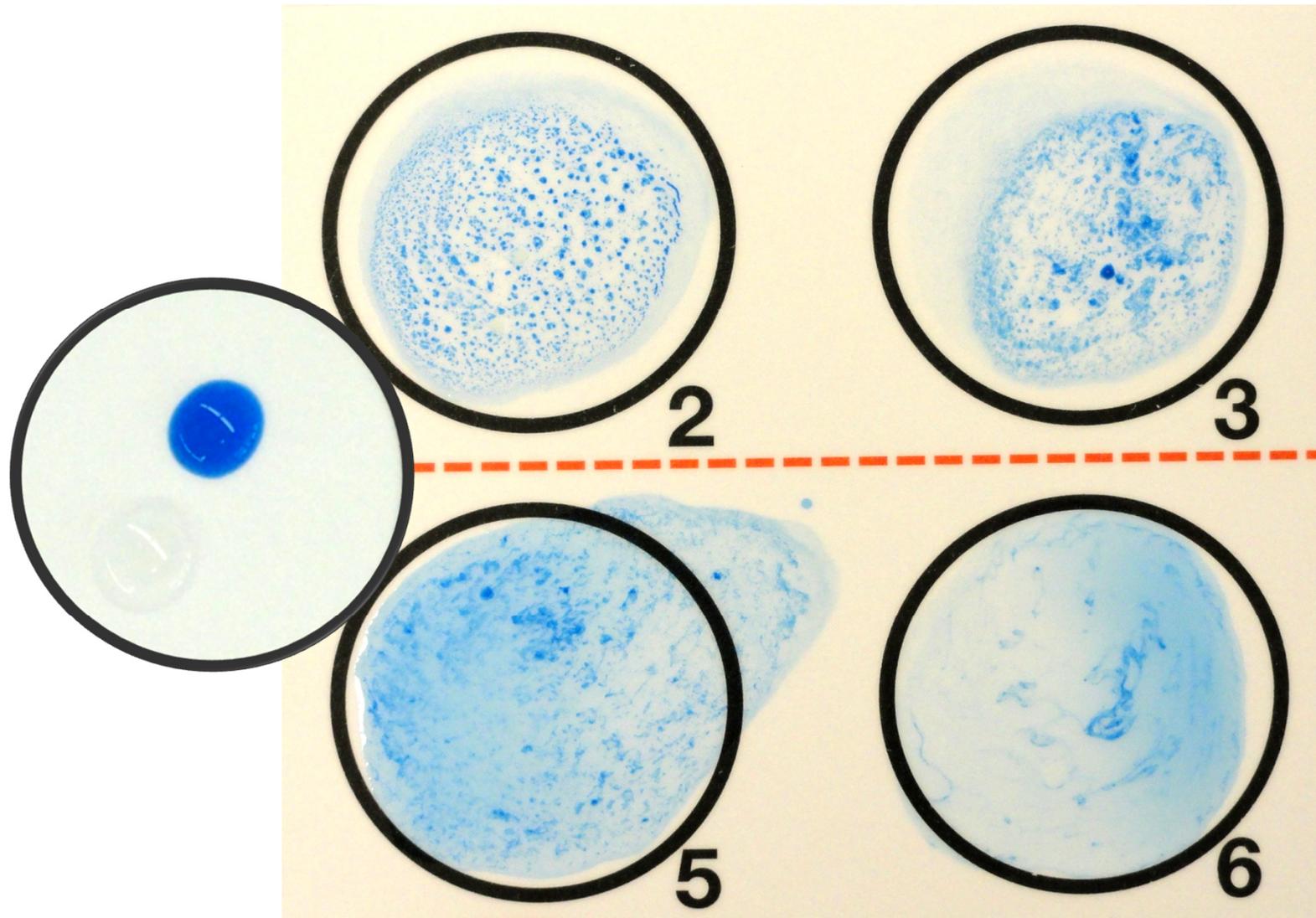


# Legionella spp.



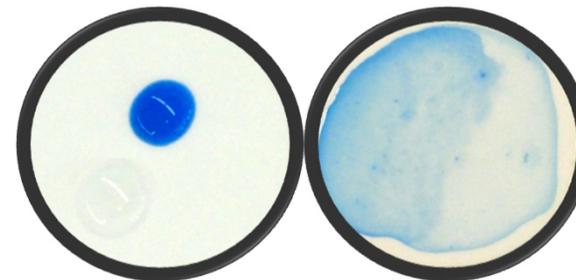
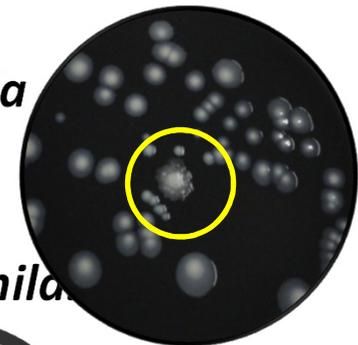
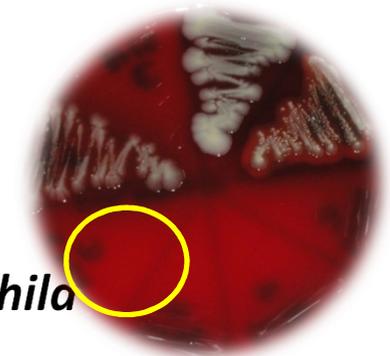
- Die Differenzierung der Legionella-Serogruppen schließt falsch positive oder falsch negative Diagnosen aus.
- Falsch negative Diagnosen sind gefährlich für unsere Gesundheit (wenn nur eine Entscheidung auf Grund der Morphologie getroffen wird, findet evtl. keine Identifizierung von unbekanntem Serogruppen statt).
- Falsch positive Diagnosen können falsche oder unnötige Sanierungen zur Folge haben (KOSTEN!!!). Von unserer Erfahrung wir sehen ca. 60% Fälle falsch positive, darum Sanierungskosten sind relativ hoch!

# Agglutinations-Test-*Legionella*: Beispiele



## 1. Beispiel:

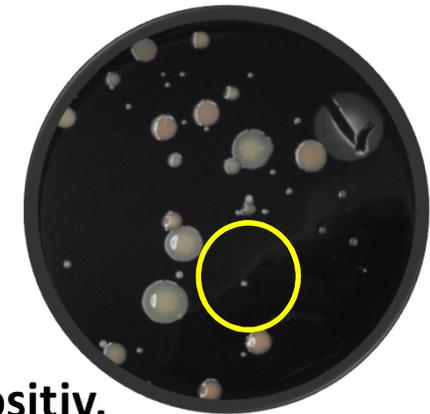
- Wachstum auf GVPC: optisch wie *Legionella pneumophila*,
- Wachstum auf Blut: negativ,
- ohne Agglutinations-Test wäre Ergebnis: *Legionella pneumophila* positiv, aber
- Agglutinations-Test mit Antikörper für *Legionella pneumophila* Serogruppe 1/ 2 - 15 / *Legionella* sp. ist negativ,
- Ergebnis nach Agglutinations-Test: keine *Legionella pneumophila*.



Befund nur nach Blut: falsch positiv!

## 2. Beispiel:

- Wachstum auf GVPC-direkt: optisch wie *Legionella sp.*,
- Wachstum auf Blut: negativ,
- ohne Agglutinations-Test wäre Ergebnis: *Legionella sp.* positiv,

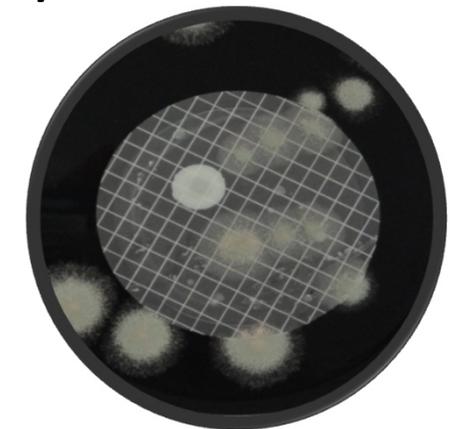


aber



- Agglutinations-Test mit Antikörper für *Legionella pneumophila* Serogruppe 1 / 2 - 15 / *Legionella sp.* ist negativ,
- Ergebnis nach Agglutination-Test: keine *Legionella spp.*

Befund nur nach Blut: falsch positiv!



## Befund falsch positiv

### Erklärung:

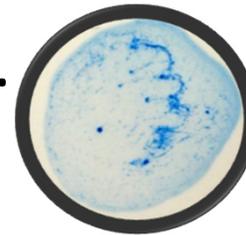
Es handelt sich um einen anderen Keim, der auf GVPC-Platten, aber nicht auf Blut-Platten, wächst.

Oder es handelt sich um *Legionella*, die außerhalb des verwendeten Antikörperspektrums liegen (es gibt mindestens 70 verschiedene *Legionella* Serotypen!).

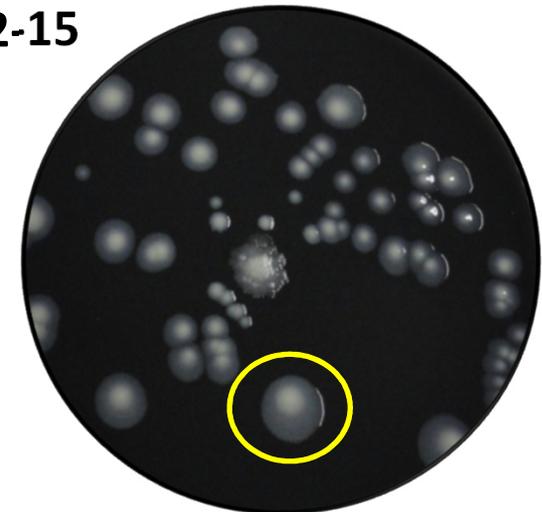
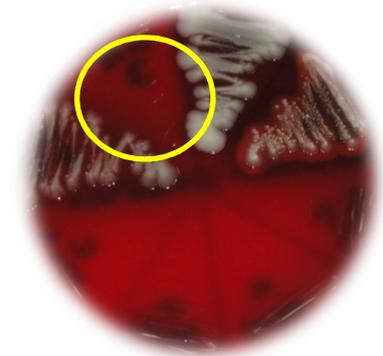


## 3. Beispiel:

- Wachstum auf GVPC: optisch wie *Legionella pneumophila*,
- Wachstum auf Blut: negativ,
- ohne Agglutination-Test wäre Ergebnis: *Legionella pneumophila* - positiv,
- Agglutinations-Test mit Antikörper für *Leg. pn. Sgr.1, 2-15* oder *Leg. sp.* ist nicht deutlich positiv.

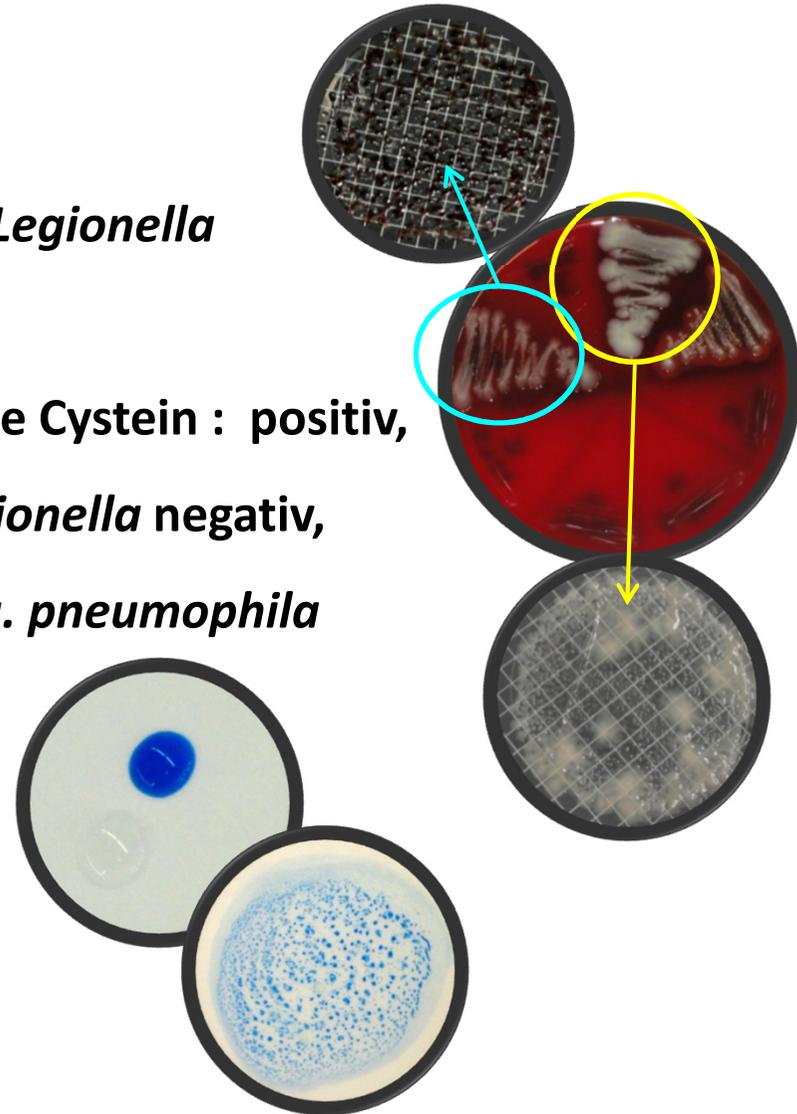


Befund nur nach Blut und GVPC: falsch positiv oder falsch negativ (wegen unbekanntem Serogruppen)!



## 4. Beispiel:

- Wachstum auf GVPC Platten: optisch wie *Legionella pneumophila*, zusätzlich viel Begleitflora,
- Wachstum auf Blut und GVPC-Platten ohne Cystein : positiv,
- ohne Agglutinations-Test Ergebnis ist: *Legionella* negativ,
-  Agglutinations-Test mit Antikörper für *Leg. pneumophila*  
Serogruppe 2-15 ist positiv,
- Ergebnis: *Legionella pneumophila* positiv.



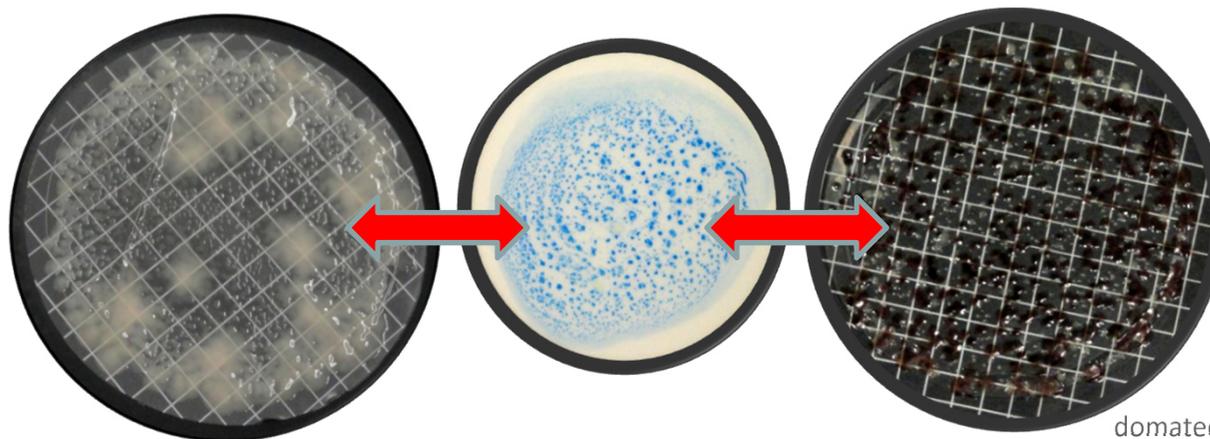
Befund nur nach Blut falsch negativ!

## Befund falsch negativ

### Erklärung:

Es ist in diesem Fall nicht möglich, *Legionella pneumophila* ohne Begleitflora auf Blut- oder auf GVPC-Platten ohne Cystein zu überimpfen. Die Begleitflora überwächst auf Blut oder GVPC-Cystein die eventuell vorhandenen *Legionella pneumophila* Kolonien.

**Das führt ohne Agglutinations-Test zu einem falsch negativen Ergebnis!**

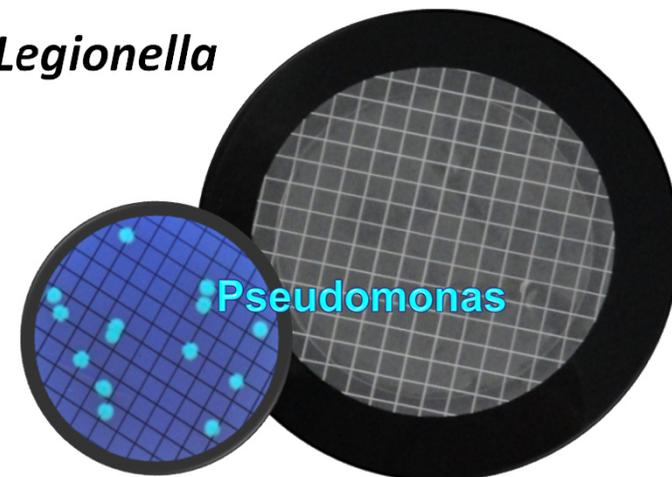


## 5. Beispiel:

- Kein sichtbares Wachstum von *Legionella* auf GVPC-Platten, nur viel Begleitflora,
- Wachstum auf Blut- oder auf GVPC-Platten ohne Cystein: ist nicht nötig,
- Ergebnis: *Legionella* negativ, aber Begleitflora, z.B. einige Arten von *Pseudomonas* oder *Aeromonas*, hemmen *Legionella pneumophila* Wachstum.



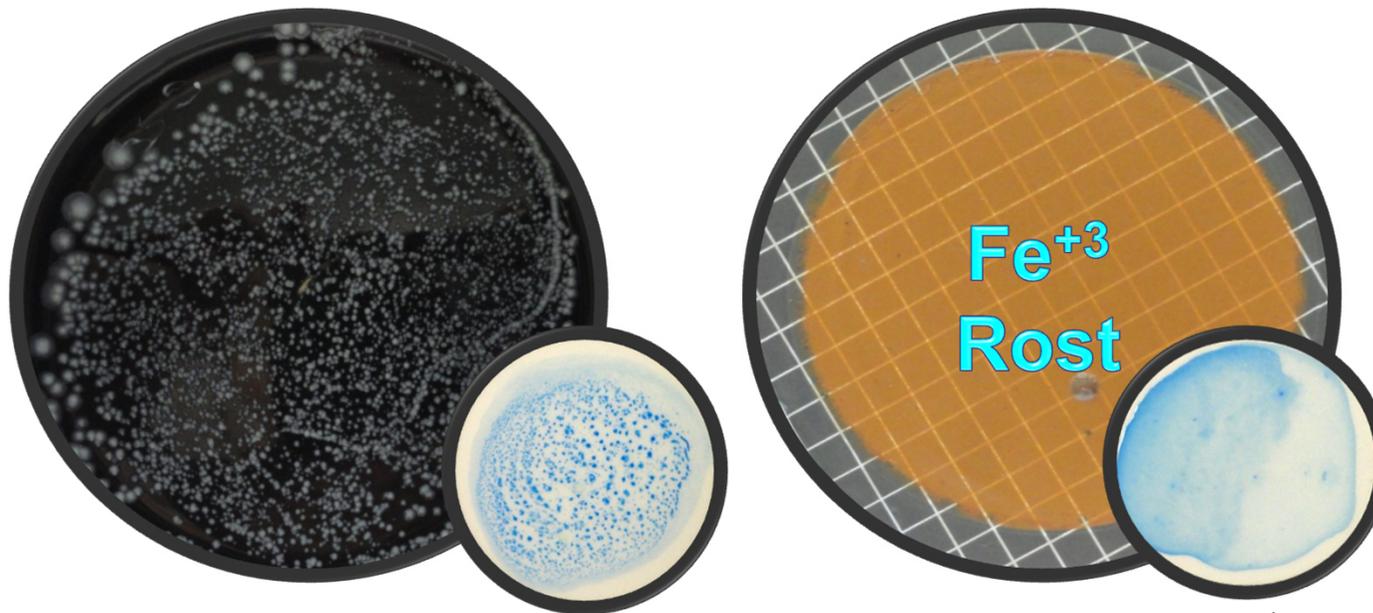
Befund in diesem Fall ist falsch negativ!



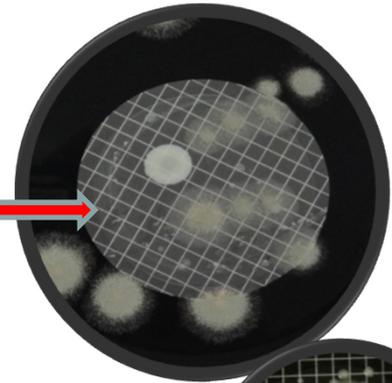
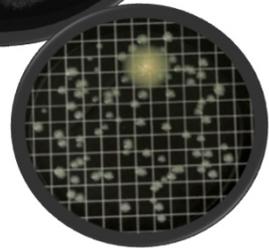
## Befund falsch negativ

### Erklärung:

In diesem Fall wird das *Legionella*-Wachstum durch die Begleitflora oder Rost verhindert und *Legionella pneumophila* ist, trotz Vorkommen einfach nicht nachweisbar (Unten Begleitflora oder Rost).



## 6. Beispiel:

- Niedriges Wachstum von *Legionella pneumophila* auf GVPC, zusätzlich Begleitflora,
- Wachstum auf Blut- oder auf GVPC-Cystein: negativ,
- ohne Agglutinations-Test Ergebnis ist positiv,   
- Ergebnis nach Agglutinations-Test ist positiv,
- Ergebnis für *Legionella pneumophila*: positiv, aber falscher Wert, weil Begleitflora, z.B. einige Arten von *Pseudomonas* oder *Aeromonas*, hemmt *Legionella pneumophila* Wachstum.

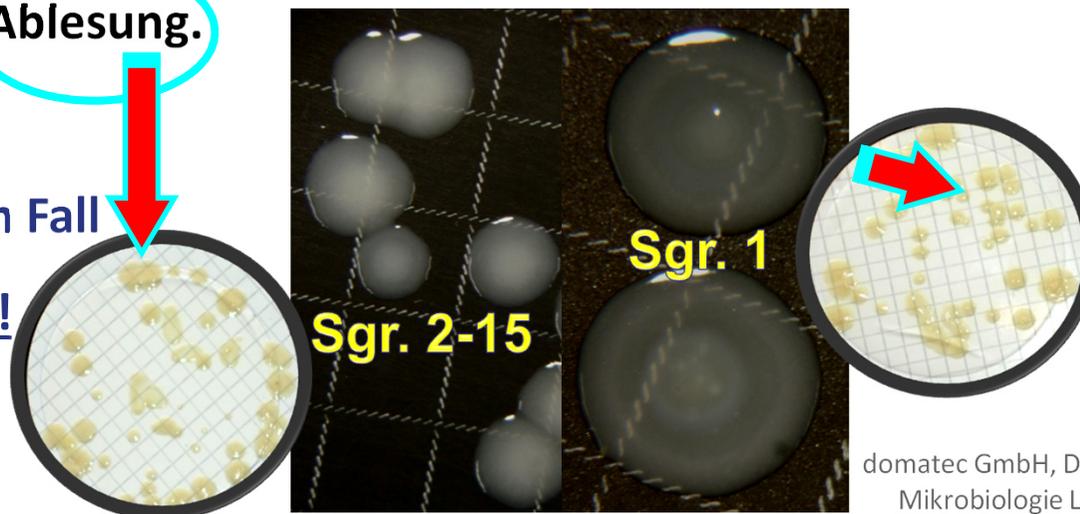
Befund ist: falsch negativ oder zu niedriger Wert!

## 7. Beispiel:

- Kein Wachstum von *Legionella*, evtl. nur Begleitflora, auf GVPC-Platten nach Filtration,
- Wachstum auf Blut- oder auf GVPC-Platten ohne Cystein ist nicht nötig,
- Ergebnis: *Legionella* negativ aber Filtermaterial hat Einfluss auf *Legionella* Wachstum (je nach Hersteller unterschiedlich starke Hemmung) und **Ablesung.**



Befund in diesem Fall  
ist falsch negativ!

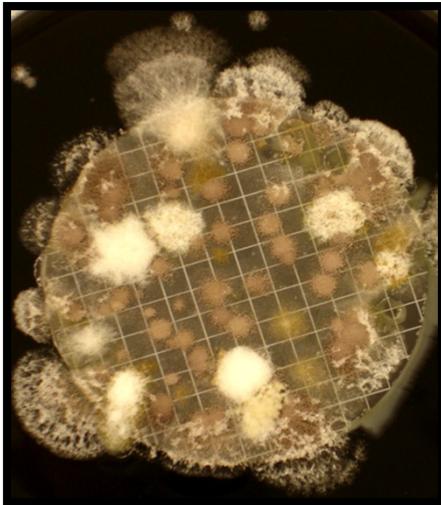


## 8. Beispiel:

- Keine oder niedriges Wachstum von *Legionella pneumophila* auf GVPC Platten nach Filtration mit zusätzlicher Säurebehandlung,
- Wachstum auf Blut- oder auf GVPC-Platten ohne Cystein ist nicht nötig,
- Ergebnis: Säurebehandlung hemmt das Wachstum (es zeigt sich auch  niedrigere KBE-Anzahl) von einigen Arten und Serogruppen von *Legionella pneumophila*.

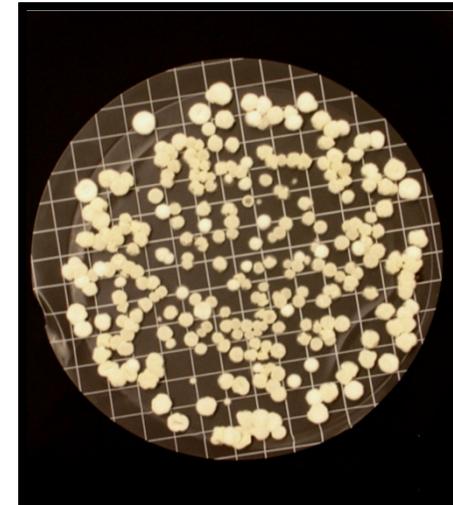
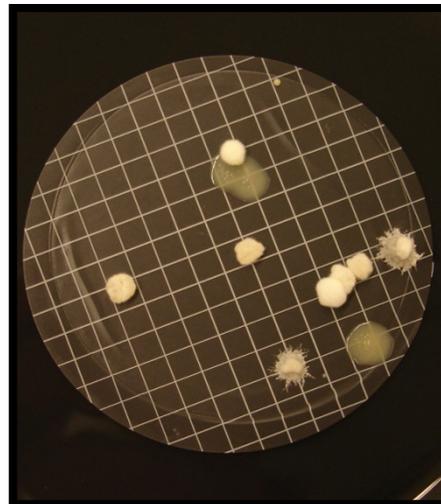
Befund in diesem Fall ist falsch negativ oder nicht richtige KBE-Anzahl!

# Befund falsch negativ o. nicht richtig



Ohne Säure-  
behandlung

Nach Säure-  
behandlung

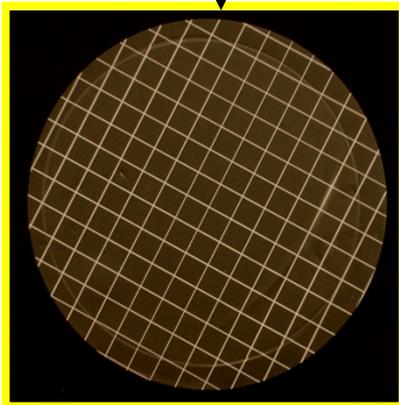
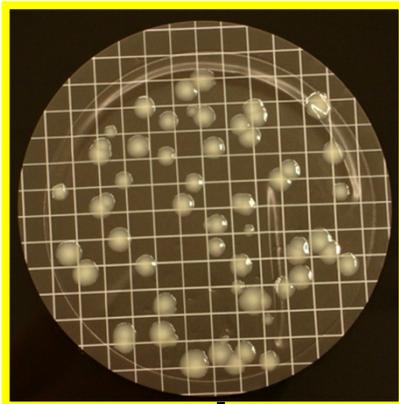


Ohne Säure-  
behandlung

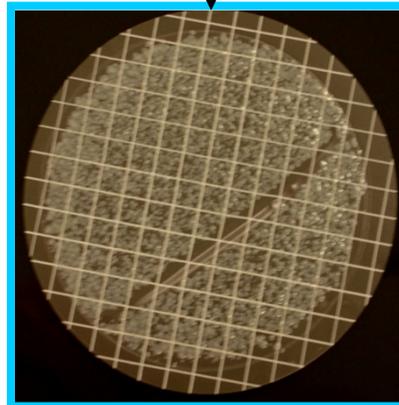
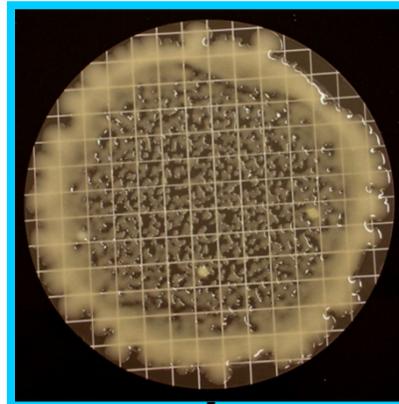
# Befund falsch negativ nach Säure

## Legionella

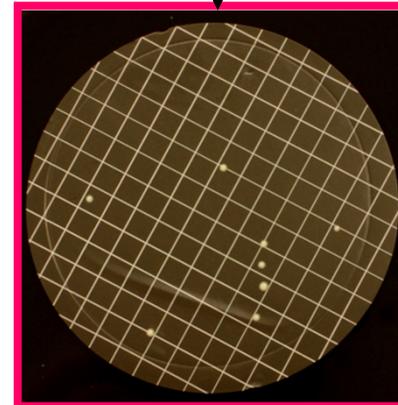
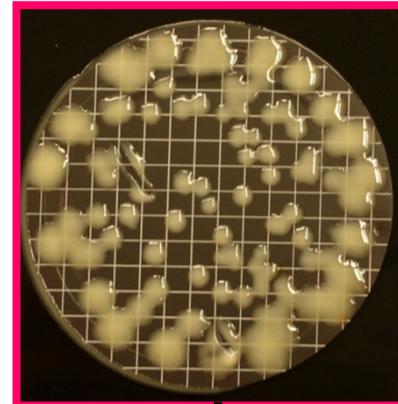
**Probe**  
L. pn. Sgr. 2-15



**Ref. Stamm**  
L. pn. Sgr. 1



**Enterobacter  
cloacae**



**ohne Säure-  
Behandlung**

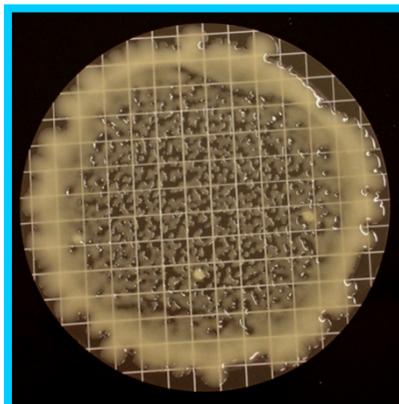
**mit Säure-  
Behandlung**

## 9. Beispiel:

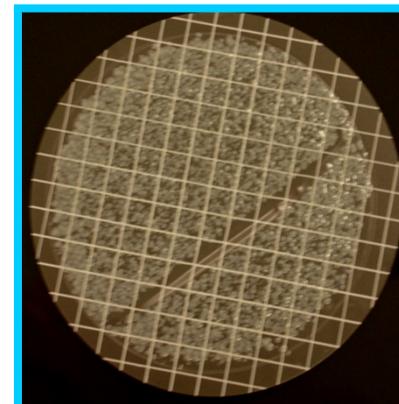
- Niedriges Wachstum von *Legionella pneumophila* auf GVPC-Platten nach Filtration, mit zusätzlicher Säurebehandlung,
- Wachstum auf Blut- oder GVPC-Platten ohne Cystein: negativ,
- Ergebnis: *Legionella pneumophila* positiv, aber Säure reduziert das *Legionella* Wachstum, besonders - Spezies (bis 0).



Befund in diesem Fall : zu niedriger Wert oder falsch negativ!



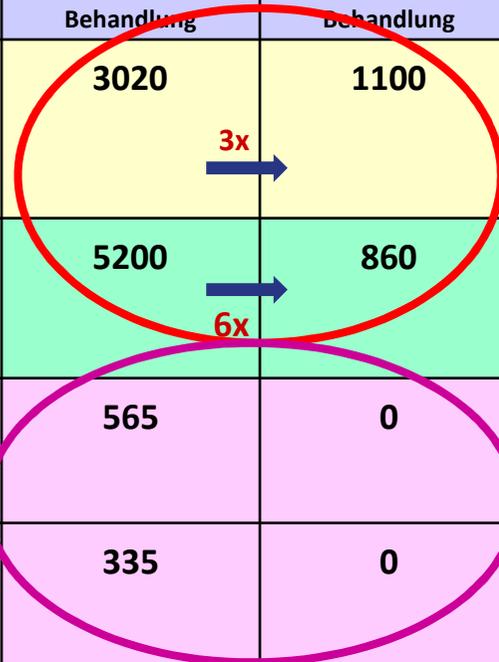
Säure-Puffer



**Legionella pneumophila Sgr. 1**

# Befund falsch negativ o. zu niedriger Wert

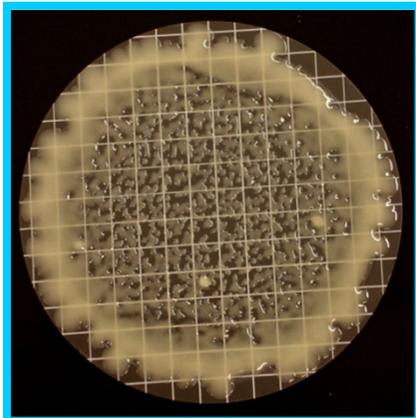
Probe	Nach 5 Tagen ISO Norm Methode 16.08.08			Nach 10 Tagen ISO Norm Methode 21.08.08			Suspension: Legionellen in 1 ml
	100 ml Ohne Säure Behandlung	100 ml Mit Säure Behandlung	1 ml Direkt Einsatz	100 ml Ohne Säure Behandlung	100 ml Mit Säure Behandlung	1 ml Direkt Ansatz	
	L. pn. S-Gr. 1	2990	1080	33	3020	1100	
L. pn. S-Gr. 2-15	5100	850	52	5200	860	54	Suspension 10 <sup>3</sup> pro 1 ml
L. sp.	80	0	0	565	0	62	Suspension 10 <sup>3</sup> pro 1 ml
L. anisa	120	0	0	335	0	61	Suspension 10 <sup>3</sup> pro 1 ml



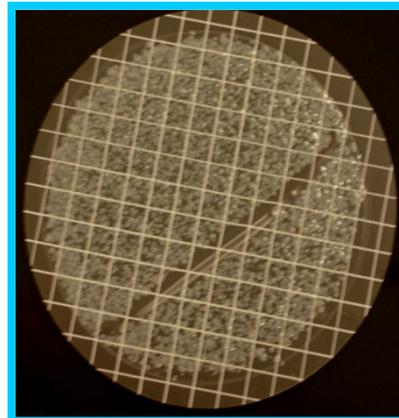
## Erklärung:

Auf Grund unserer Beobachtungen können wir die Aussage treffen, dass die Säurebehandlung das Wachstum von *Legionella pneumophila* deutlich reduziert ; im Falle von *Legionella* spp. sogar bis 100% .

Leg. pn. Sgr. 1

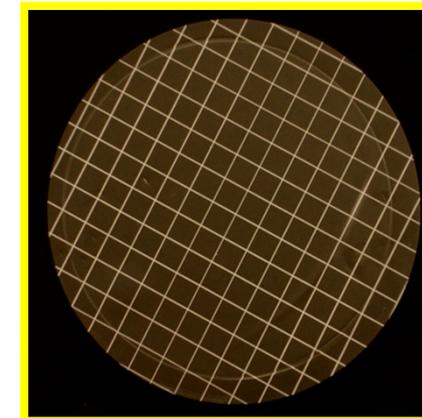


Ohne Säure



Mit Säure

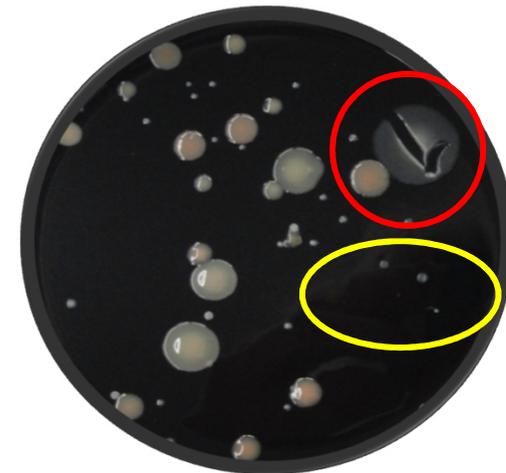
Legionella sp.



Mit Säure

## 10. Beispiel:

- Nach 5 Tagen findet man auf GVPC-Platten bereits über 90% KBE von *Legionella pneumophila*, aber nur eine niedrige Anzahl von *Legionella* spp.
- Nach 7-10 Tagen erhöht sich die *Legionella* spp. Anzahl deutlich.



Nach 5 Tagen ist das Ergebnis: falsch negativ für *Legionella* sp. und zu niedrige Wert für *L. pneumophila*!

# Befund falsch negativ o. zu niedriger Wert

Probe	Nach 5 Tagen ISO Norm Methode 16.08.08			Nach 10 Tagen ISO Norm Methode 21.08.08			Suspension: Legionellen in 1 ml
	100 ml Ohne Säure Behandlung	100 ml Mit Säure Behandlung	1 ml Direkt Ansatz	100 ml Ohne Säure Behandlung	100 ml Mit Säure Behandlung	1 ml Direkt Ansatz	
	L. pn. S-Gr. 1	2990	1080	33	3020	1100	
L. pn. S-Gr. 2-15	5100	850	52	5200	860	54	Suspension 10 <sup>3</sup> pro 1 ml
L. sp.	80	0	0	565	0	62	Suspension 10 <sup>3</sup> pro 1 ml
L. anisa	120	0	0	335	0	61	Suspension 10 <sup>3</sup> pro 1 ml

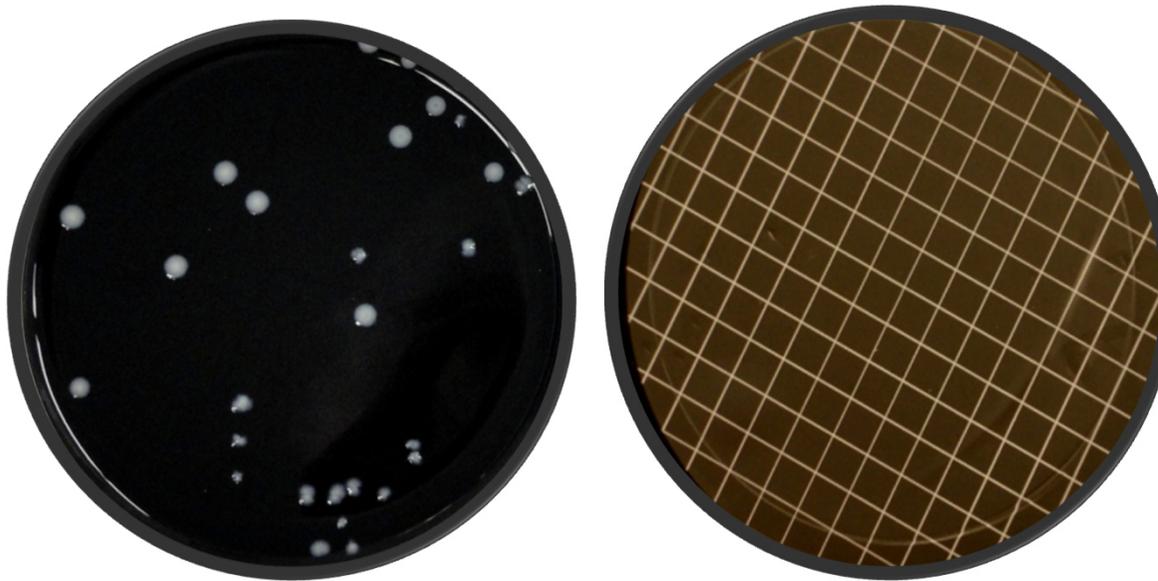
# Befund falsch negativ

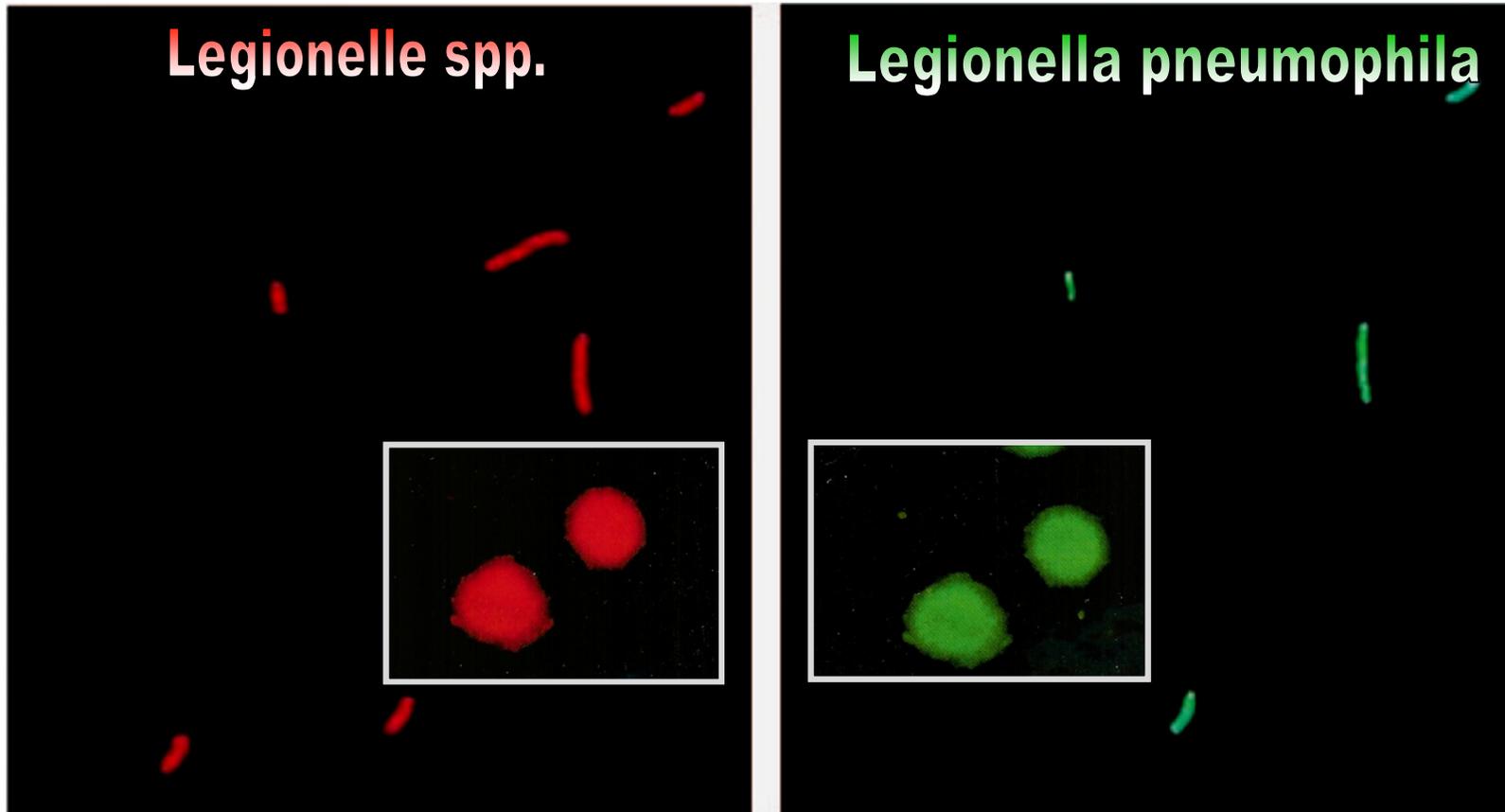
Probe	Nach 5 Tagen			Nach 10 Tagen			Suspension: Legionellen in 1 ml
	ISO Norm Methode 16.08.08			ISO Norm Methode 21.08.08			
	100 ml Ohne Säure Behandlung	100 ml Mit Säure Behandlung	1 ml Direkt Ansatz	100 ml Ohne Säure Behandlung	100 ml Mit Säure Behandlung	1 ml Direkt Ansatz	
Leg. spp.	80	0	0	565	0	62	Suspension 10 <sup>3</sup> pro 1 ml
Leg. anisa	120	0	0	335	0	61	Suspension 10 <sup>3</sup> pro 1 ml

Annotations: Blue circle around the 5-day results for both species. Red circle around the 10-day results for both species. Blue arrows point from the 5-day 'Ohne Säure' results to the 10-day 'Ohne Säure' results, labeled '7x' for Leg. spp. and '3x' for Leg. anisa.

## Erklärung:

Auf Grund unserer Beobachtungen können wir die Aussage treffen, dass die Säurebehandlung das Wachstum von *Legionella* spp. zu nahezu 100% verhindert.





## Diagnostik mittels Fluoreszenz

# Befund falsch negativ o. zu niedriger Wert

Probe	Nach 3 Tagen <b>VERMICON</b> Methode 14.08.08			Nach 10 Tagen <b>ISO Norm</b> Methode 21.08.08			Suspension: Legionellen in 1 ml
	100 ml Ohne Säure Behandlung	100 ml Mit Säure Behandlung	1 ml Direkt Ansatz	100 ml Ohne Säure Behandlung	100 ml Mit Säure Behandlung	1 ml Direkt Ansatz	
L. pn. Sgr. 1	945 5x →	184 →	10	3020 3x →	1100 6x →	34	Suspension 10 <sup>3</sup> pro 1 ml
L. pn. Sgr. 2-15	986 8x →	125 →	11	5200 6x →	860 7x →	54	Suspension 10 <sup>3</sup> pro 1 ml

# Befund falsch negativ

Probe	Nach 3 Tagen <b>VERMICON</b> Methode 14.08.08			Nach 10 Tagen <b>ISO Norm</b> Methode 21.08.08			Suspension: Legionellen in 1 ml
	100 ml Ohne Säure Behandlung	100 ml Mit Säure Behandlung	1 ml Direkt Ansatz	100 ml Ohne Säure Behandlung	100 ml Mit Säure Behandlung	1 ml Direkt Ansatz	
<b>Leg. spp.</b>	78	0	0	565	0	62	Suspension 10 <sup>3</sup> pro 1 ml
<b>Leg. anisa</b>	29	0	0	335	0	61	Suspension 10 <sup>3</sup> pro 1 ml

Blue arrows indicate the ratio of results between the two methods: 7x for Leg. spp. and 11x for Leg. anisa.

1. GVPC-Agar-Nährboden (bzw. nach ISO Norm) ist nicht genug spezifisch für Legionellen (falsch positive Ergebnisse möglich).
2. Auf GVPC-Agar-Platten wachsen auch Schimmelpilze und einige Bakterien, z.B. *Enterobacter cloacae*. Die zeigt zusätzlich falsch positive Reaktionen im Agglutinations-Test für alle *Legionella Sgr.*
3. Eine Säurebehandlung (nach ISO Norm), reduziert die Legionellen Anzahl um das 3-10 fache, besonders *Legionella pneumophila* Serogruppen 2 – 15. *Legionella pneumophila* Serogruppen 2 – 15 sind empfindlicher als *Legionella pneumophila* Serogruppe 1.
4. *Legionella spp.* wachsen nach Säurebehandlung nicht auf GVPC-Agar-Platten (falsch negatives Ergebnis!).
5. *Legionella spp.* wachsen auf GVPC-Agar-Platten (Direktansatz) erst nach 5 Tagen (deutlich nach 7 - 8 Tagen).

- **BGBI. 11-2000 & ISO Norm Methoden ergibt:**
  - ✓ **ca. 60% falsch positive und**
  - ✓ **ca. 40% falsch negative Ergebnisse.**
- **Fluoreszenz Methoden, z.B. VERMICON, sind unsicher:**
  - ✓ **wegen des Risikos falsch negativer Ergebnisse für L. sp,**
  - ✓ **Ergebnisse kommt schon nach 3 Tagen und**
  - ✓ **ist eine Hemmung des Wachstums durch Säure-Puffer.**

**Thank you for your attention!**

