



Empfehlungen zu Legionellen und Legionellose

Modul 4

Diagnose von *Legionella* spp. in klinischen Proben

Die Diagnose der Legionärskrankheit basiert auf klinischen und/oder radiologischen Befunden sowie auf Laboruntersuchungen. In diesem Modul werden die verschiedenen Methoden für diese Laboruntersuchungen kurz erläutert.

1 Einleitung	2
2 Kultur	2
3 Antigen	2
4 PCR	3
5 Serologie	3
6 Typisierung	4
Referenzen	4

Version vom	Vorgängerversion	Änderung gegenüber Vorgängerversion
26.04.2024	Totalrevision 2018	Neufassung des Moduls (Totalrevision 2024)

1 Einleitung

Gemäss einem Bericht des Europäischen Zentrums für die Prävention und die Kontrolle von Krankheiten (ECDC) wurden im Jahr 2020 87 Prozent der Legionellosefälle in Europa mittels Urinantigentest diagnostiziert. Die Verwendung von Kultur, Polymerase-Kettenreaktion (PCR) oder einer Kombination von Methoden zum Nachweis von Legionellen ist deutlich seltener. Nur bei rund 10 Prozent der Fälle wurde ein Nachweis mittels Kultur und/oder PCR rapportiert.

2 Kultur

Die Kultur von respiratorischen Proben gilt nach wie vor als «Gold-Standard» für die Diagnose der Legionellose. Damit kann der Bakterienstamm isoliert und anschliessend für die Prüfung der Empfindlichkeit gegenüber Antibiotika und die epidemiologische Typisierung verwendet werden. Es handelt sich um eine eher aufwändige Methode, die viel Erfahrung erfordert. Die Bakterien müssen mehrere Tage kultiviert werden. Legionellen wachsen jedoch nicht auf den Kulturmedien, die in mikrobiologischen Laboratorien standardmässig verwendet werden. Sie brauchen ein Komplexmedium, d.h. einen speziellen Nährboden mit Hefeextrakt und Aktivkohle (buffered charcoal yeast extract, BCYE). Im Übrigen ist auch eine gleichzeitige Kultur von *Legionella* spp. auf Amöben möglich. Mit dieser Technik können nicht auf BCYE wachsende Arten kultiviert werden. Zurzeit befindet sich diese Methode jedoch noch im Forschungsstadium.

Im Vergleich zu Rachen- oder Nasopharynx-Abstrichen wurden Legionellen deutlich erfolgreicher aus Proben von Material aus dem unteren Respirationstrakt isoliert. Bei Proben, die nicht aus dem unteren Respirationstrakt stammen, ist die Kultur nur sehr selten positiv.

Die Nachteile der Kultur sind:

- die lange Dauer der Analyse (bis zu 14 Tage);
- die geringe Sensitivität im Vergleich zu anderen Methoden;
- die beschränkte Verfügbarkeit von geeignetem klinischem Material, das vorzugsweise aus dem unteren Respirationstrakt stammt.

Der grosse Vorteil dieser Methode besteht darin, dass der klinische Stamm genomisch charakterisiert und mit Umweltproben verglichen werden kann. Dies ist einer der Schlüsselfaktoren, um die Infektionsquelle zu identifizieren und die Ausbreitung einzudämmen. Daher ist es wichtig, wenn möglich bei allen Patientinnen und Patienten mit einem positiven Urinantigentest eine Kultur anzulegen (siehe Kapitel 6).

3 Antigen

Mit der Einführung des Enzym-Immuno-Assays für den Nachweis des Antigens von *L. pneumophila* im Urin Ende der 1990er Jahre konnte die Diagnose der Legionellose schneller gestellt werden. Beim nachgewiesenen Antigen handelt es sich um ein bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), dessen unterschiedliche Muster als Basis dienen, um die Serogruppen von *L. pneumophila* zu identifizieren. Das Antigen ist bei den meisten Patientinnen und Patienten bereits ab dem ersten bis dritten Tag nach Auftreten der Symptome nachweisbar. Die Entwicklung und die Verbreitung von Schnelltests für den Nachweis des Antigens im Urin, wie immunochromatographische Lateralfluss-Tests oder Fluoreszenz-Tests, haben die Diagnose der Legionellose revolutioniert und ermöglichen eine frühzeitige Anpassung der Antibiotikatherapie.

Die im Handel verfügbaren Test-Kits weisen hauptsächlich *L. pneumophila* Serogruppe 1 (Lp1) nach und erbringen leider nicht die gleichen Leistungen für Stämme anderer Serogruppen. Die Sensitivität hängt daher davon ab, welcher Serotyp die Infektion verursacht hat. Sie liegt bei 86 Prozent für Lp1 und zwischen 74 und 79 Prozent, wenn alle Serogruppen berücksichtigt werden.

Ein grosser Nachteil des Urinantigentests sind die unspezifischen Signale aufgrund der im Urin vorhandenen Immunkomplexe. Diese können den Test beeinflussen und so zu falsch positiven Ergebnissen führen. Dieses Problem kann einfach gelöst werden, indem der Urin kurz auf hundert Grad Celsius erhitzt wird. Da das LPS der Legionellen hitzebeständig ist, können mit dem Erhitzen der Urinprobe die bakteriellen Polysaccharide aus den Antikörperkomplexen freigesetzt und unspezifische Störungen beseitigt werden. Dieses einfache Erhitzungsverfahren wird zur Bestätigung **jedes** positiven Legionellen-Urintantigen-Tests empfohlen. Ein anderer Faktor, der zu falsch positiven Ergebnissen führen kann, ist die Persistenz des Legionellen-

Antigens im Urin. Jüngere Studien haben gezeigt, dass das Antigen mehrere Monate (bis zu ein Jahr) nach dem Abklingen der Symptome nachgewiesen werden kann. Dies lässt sich bei rund zehn Prozent der Fälle beobachten, insbesondere bei Patientinnen und Patienten mit schweren Grunderkrankungen sowie bei immunsupprimierten Personen.

Im Vergleich zu anderen Diagnoseverfahren bietet der Nachweis des Antigens im Urin beachtliche Vorteile:

- Urinproben sind leicht erhältlich.
- Das Antigen kann sehr früh im Krankheitsverlauf nachgewiesen werden.
- Der Test ist schnell und einfach durchführbar.
- Der Test hat einen hohen positiven prädikativen Wert. Das bedeutet, dass die meisten Personen mit einem positiven Testergebnis tatsächlich mit Legionellen infiziert sind.

Für Ärztinnen und Ärzte ist vor allem der hohe positive prädiktive Wert wichtig. Bei Symptomen, die auf eine Legionellose hinweisen, spricht ein positives Testresultat somit stark dafür, dass die Person tatsächlich infiziert ist. Ein negatives Resultat schliesst eine Legionellose aber nicht aus. Wenn also weiterhin der Verdacht besteht, dass eine Person infiziert ist, müssen deshalb bei negativem Resultat andere Nachweismethoden für weitere Abklärungen herangezogen werden.

Kürzlich wurden Tests entwickelt und auf den Markt gebracht, die auf anderen Antigenen wie ribosomalen Proteinen basieren. Es fehlt zwar noch an wissenschaftlichen Studien, aber diese Tests scheinen vielversprechend zu sein und würden den Nachweis anderer Serogruppen oder gar anderer Legionellen-Arten ermöglichen.

4 PCR

Mit der PCR können potenziell alle bekannten Legionellenarten nachgewiesen werden. Wird PCR auf Proben aus dem Respirationstrakt (Bronchialsekret, Bronchioalveolar-Lavage, Biopsien oder Sputum) angewandt, handelt es sich um eine schnelle Testmethode mit einer guten Spezifität und Sensitivität. Die wenigen verfügbaren Studien, welche die PCR in Materialien wie Serum und Urin bewertet haben, ergaben dagegen eine tiefe Sensitivität.

Technologien zur Amplifikation von Nukleinsäuren erfordern speziell ausgebildetes Personal und hochentwickelte Ausrüstungen. Dank den technologischen Fortschritten in den vergangenen Jahren werden diese Methoden jedoch immer häufiger auch für Laboratorien mit einem kleineren Budget verfügbar.

Einige Studien haben gezeigt, dass die Durchführung einer PCR zusätzlich zum Urinantigentest die Anzahl der erfolgreichen Diagnosen von Legionellosefällen um achtzehn bis dreissig Prozent erhöht. Mit der immer häufigeren Verwendung von Multiplex-PCR-Panels (die mehrere Mikroorganismen gleichzeitig nachweisen) für die Diagnose von im Alltag erworbenen Lungenentzündungen dürfte auch die Diagnose von Legionellen mittels PCR zunehmen.

5 Serologie

Bis Mitte der 1990er Jahre basierte der Nachweis der Legionärskrankheit hauptsächlich auf der serologischen Diagnose. Mit der Einführung des Urinantigentests und der immer häufigeren Verwendung von molekularen Techniken bei Proben aus dem Respirationstrakt hat die serologische Diagnose aber schrittweise an Bedeutung verloren.

Die Serologie liefert nur eine retrospektive Diagnose und ist kein zeitnaher Indikator für die Krankheit. Verlässt man sich auf eine Serokonversion zwischen Proben in der Akut- und der Rekonvaleszenzphase, die in einem Abstand von vier bis acht Wochen entnommen werden, so bedeutet dies, dass das Behandlungsfenster längst geschlossen ist. Zudem kann ein einziger erhöhter Antikörpertiter wenig aussagen, da verschiedene Prävalenzstudien nahelegen, dass je nach Alter, Wohnort und Arbeitsumfeld bei bis zu dreissig Prozent der gesunden Personen hohe Antikörpertiter gegen Legionellen nachgewiesen werden können.

Angesichts all dieser Einschränkungen haben die serologischen Tests bei der Primärdiagnose der Legionellose an Bedeutung verloren. Ihre Anwendung ist eher für epidemiologische Studien von Nutzen.

6 Typisierung

Die Typisierung der Stämme von *Legionella* spp., die aus Patientenproben und Umweltproben isoliert wurden, dient dazu, einen Zusammenhang mit Infektionsquellen festzustellen oder auszuschliessen. Sie erlaubt, die Entwicklung der Verteilung der Bakterienstämme von der lokalen bis zur internationalen Ebene zu analysieren und über die Zeit zu verfolgen.

Es werden zwei Arten von Typisierungen von kultivierten Isolaten unterschieden: Die phänotypischen Methoden wie beispielsweise die Serotypisierung verwenden biochemische oder immunologische Charakteristiken der Isolate. Die genotypischen Methoden der molekularen Typisierung basieren auf den unterschiedlichen Mustern der Nukleinsäuresequenzen des Genoms der Bakterien, dazu gehören beispielsweise Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE), Sequence-Based Typing (SBT) oder die Gesamtgenomsequenzierung (whole genome sequencing, WGS). Mit WGS kann die komplette DNA der Legionellen dargestellt und miteinander verglichen werden.

Referenzen

European Centre for Disease Prevention and Control. Legionnaires' disease. In: ECDC. Annual epidemiological report for 2020. Stockholm: ECDC; 2022.

Kawasaki T., Nakagawa N., Murata M., Yasuo S., Yoshida T., Ando K, Satoshi O., Okada Y. Diagnostic accuracy of urinary antigen tests for legionellosis: A systematic review and meta-analysis. *Respiratory Investigation* 2022; 60:205-214.

Mercante J. W., Winchell J. M. Current and emerging Legionella diagnostics for laboratory and outbreak investigations. *Clinical Microbiology Reviews* 2015; 28:95-133.

Viasus D., Gaia V., Manzur-Barbur C., Carratalà J. Legionnaires' Disease: Update on Diagnosis and Treatment. *Infectious Diseases and Therapy* 2022; 11:973-986.