



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Analytische Chemie

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

ANTIKÖRPER-MIKROARRAYS ZUR ANALYSE VON *LEGIONELLA PNEUMOPHILA* IN WASSER UND ANDEREN PATHOGENEN MIKROORGANISMEN IM LEBENSMITTEL

Anika Wunderlich

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Chemie der Technischen Universität München zur Erlangung des akademische Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Prof. Dr. Aymelt Itzen

Prüfer der Dissertation: 1. Prof. Dr. Reinhard Nießner

2. Prof. Dr. Michael Seidel

Die Dissertation wurde am 06.04.2017 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 03.07.2017 angenommen.

„Zwei Dinge sind zu unserer Arbeit nötig: Unermüdliche Ausdauer und die Bereitschaft, etwas, in das man viel Zeit und Arbeit gesteckt hat, wieder wegzuwerfen“

Albert Einstein, deutscher Physiker, 1879 – 1955

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit vom 01. Mai 2013 bis 30. April 2016 am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München unter Leitung von Professor Nießner angefertigt. Ein Teil der Arbeit wurde durch das LGL-Projekt „Abschätzung der umweltmedizinischen Relevanz von Verdunstungsrückkühlanlagen: Vergleichende Untersuchungen zum Austrag in die Umgebungsluft“ gefördert. Den Menschen, die mir auf diesem Weg zur Seite standen, möchte ich auf dieser Seite danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Nießner für die Möglichkeit, meine Promotion an seinem Institut durchführen zu dürfen.

Ebenfalls besonders bedanken möchte ich mich bei meinem Arbeitsgruppenleiter PD Dr. Michael Seidel für die interessante Themenstellung. Er ermöglichte mir, meine Arbeit eigenverantwortlich zu planen, war für Fragen erreichbar, zur fachlichen Diskussion bereit und stand mir jederzeit mit wertvollen Ideen und Kritik zur Seite. Durch sein Vertrauen in meine Fähigkeiten konnte ich an vielen Herausforderungen wachsen und mich weiterentwickeln.

Weiterhin danke ich Frau Christian und Frau Kühnel aus dem Legionellen-(Wasser)-Labor des Bayerischen Landesamtes für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim für die Vorbereitung und Inkubation geeigneter Legionellen-Proben und die stets freundliche Unterstützung bei mikrobiologischen Fragestellungen.

Danke an Markus Petzold und Dr. Christian Lück an der TU Dresden. Durch ihre Unterstützung im Projekt konnte ich an Scheidepunkten oft weitermachen. Ihre Motivation hat mir stets geholfen und gut getan. Gemeinsame Projekte habe ich durch ihre Unterstützung sehr gut erledigen können.

Ein riesiger Dank gebührt den Kollegen meiner Arbeitsgruppe: Besonders durch Dr. Andreas Kunze, Dennis Elsässer, Verena Meyer und Dr. Maria Hübner sind stressige Arbeitstage doch nicht ganz so schlimm gewesen. Ich danke euch für euer Verständnis, viel Galgenhumor, ein offenes Ohr in Krisensituationen und viele Erlebnisse außerhalb des Instituts. Ohne euch hätte ich es bestimmt nicht geschafft. Der Zusammenhalt mit euch war echt super.

Weiterhin möchte ich Angelika Nistler, Catharina Kober und Jonas Bemetz für ganz viele nette Runden in der Kaffeeküche danken. So ein kleiner Ratsch bringt einen dann doch schnell wieder auf den richtigen Weg. Ihr habt mich stets abgelenkt und wart immer für mich da.

Den Kolleginnen und Kollegen am Institut möchte ich für ihre Hilfsbereitschaft und die nette Atmosphäre danken. Besonderer Dank gebührt hierbei sowohl Susanna Mahler für die stete Hilfe bezüglich der Chipherstellung, als auch Dr. Natalia Ivleva für Hilfestellungen bei Raman-Themen sowie Unterstützung bei Messungen am Mikroskop.

Weiterhin möchte ich mich bei Bettina Kiwull für die gute Zusammenarbeit bedanken. Wir haben das Thema Bioaerosolkammer im letzten Jahr meiner Dissertation sehr gut zusammen gemeistert und sind teilweise über uns hinaus gewachsen. Ich nehme viel fürs zukünftige Leben mit und erinnere mich gerne an die gemeinsamen Mess-Episoden an der großen Kammer zurück.

Vielen Dank möchte ich auch an meine ehemaligen Kollegen richten, die ich sehr gerne mochte und die mir den Arbeitsalltag immer erleichtert haben: Dr. Elisangela Linares, Alda Gega und Carmen Torggler, danke, dass ich mit euch arbeiten durfte. Es war schön mit euch.

Weitere Danksagungen gehen an alle Kollegen des Instituts. Ihr habt den Arbeitsalltag immer abwechslungsreich gestaltet, ich bin wegen euch allen gerne in die Arbeit gekommen.

Dr. Sandra Walser und Dr. Bernhard Brenner vom LGL danke ich für viele tolle Feldmessungen. In Gummistiefeln und auf 10 m Höhe haben wir so manche Kläranlage kennengelernt und dabei viel Spaß gehabt.

Ein großer Dank geht weiterhin an meine Familie, die mich während dieser Promotion stets unterstützt hat. Insbesondere gilt mein Dank meiner lieben Oma, Ursula Albrecht, die immer für mich da war. Meinen Eltern, Silke und Frank, sowie deren Lebensgefährten Arthur und Regina, danke ich für aufbauende Worte und viel Ermutigung in schwachen Momenten. Gespräche mit meinem Bruder Christopher und meiner Schwester Andrina konnten mir oft wieder den richtigen Weg weisen.

Meine Schwägerin Sina und ihre tolle Tochter Zoe haben meinen Alltag sehr oft bereichert. Ich danke euch, dass ihr Abwechslung und Schwung in manches Wochenende gebracht habt.

Meinem Lebenspartner Philipp gebührt jedoch der größte Dank. Wegen seiner Geduld und bedingungslosen Unterstützung, seinem unendlichen Verständnis, dem nüchternen Zurückholen auf der Boden der Tatsachen, seiner Motivation an Tiefpunkten und ganz viel Liebe habe ich diese Promotion meistern können. Du bist mein Fels in der Brandung!! Ohne dich hätte ich es niemals so weit geschafft.

Vielen herzlichen Dank an alle!

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in folgenden Fachzeitschriften veröffentlicht:

WUNDERLICH, A., TORGLER, C., ELSÄSSER, D., LUECK, C., NIESSNER, R., SEIDEL, M., Rapid quantification method for *Legionella pneumophila* in surface water, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **2016**, 408, 2203-2213.

KIWULL, B., **WUNDERLICH, A.**, HERR, C. E. W., NIESSNER, R., SEIDEL, M., Bioaerosolkammer für legionellenhaltige Duschaerosole, *Gefahrstoffe – Reinhaltung der Luft*, **2016**, 76, 344-350.

WALSER, S. M., BRENNER, B., **WUNDERLICH, A.**, TUSCHAK, C., HUBER, S., NIESSNER, R., SEIDEL, M., HÖLLER, C., HERR, C. E. W., Detection of Legionella-contaminated aerosols in the vicinity of a bio-trickling filter of a breeding sow facility – a pilot study, *Science of the Total Environment*, **2017**, 575, 1197-1202.

1. Problemstellung und Zielsetzung	1
1.1 Problemstellung	1
1.2 Zielsetzung	2
2. Theoretische Grundlagen	6
2.1. Legionellen – relevante Fakten für Umwelt und Gesundheit	6
2.1.1. <i>Morphologie und Eigenschaften</i>	6
2.1.2. <i>Vorkommen und Pathogenität</i>	6
2.1.3. <i>Krankheitsbild und Therapie</i>	10
2.2. <i>Cronobacter sakazakii</i>	12
2.2.1. <i>Vorkommen und Pathogenität</i>	12
2.2.2. <i>Detektionsmethoden</i>	14
2.3. Nachweis von Legionellen	15
2.3.1. <i>Die Lipopolysaccharid-Struktur von Legionella pneumophila</i>	15
2.3.2. <i>Kulturnachweis von L. pneumophila</i>	17
2.3.2.1. <i>Durchflusszytometrie</i>	18
2.3.2.2. <i>Mikroskopie</i>	22
2.3.2.3. <i>Massenspektrometrische Methoden</i>	23
2.3.2.3.1. <i>MALDI-TOF</i>	24
2.3.3. <i>Immunologische Verfahren</i>	25
2.3.3.1. <i>ELISA</i>	25
2.3.3.1.1. <i>Detektionsmethoden für ELISA</i>	27
2.3.3.1.1.1. <i>Photometrie</i>	27
2.3.3.1.1.2. <i>Fluoreszenz</i>	28
2.3.3.1.1.3. <i>Chemilumineszenz</i>	28
2.3.3.1.2. <i>Applikationen für ELISA</i>	31
2.3.3.1.2.1. <i>Urin-Antigen-Nachweis</i>	31
2.3.3.1.2.2. <i>Latex-Agglutinationstest</i>	33

2.3.3.1.2.3.	Duopath-Test	34
2.3.3.2.	Typisierung von <i>L. pneumophila</i>	34
2.3.3.3.	<i>Limulus</i> Amöbozyten-Lysat-Test	37
2.3.4.	Molekularbiologische Methoden	38
2.3.4.1.	Polymerase-Kettenreaktion	39
2.3.4.2.	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung	43
2.3.5.	Vergleichstabelle aller Methoden	45
2.4.	Mikroarray-Technologie	47
2.4.1.	Begriffserklärung	47
2.4.2.	Analytische Mikroarrays	47
2.4.2.1.	Statische analytische Mikroarrays	49
2.4.2.2.	Flussbasierte analytische Mikroarrays	50
2.4.3.	Oberflächenchemie	50
2.4.4.	Immobilisierung der Antikörper	54
2.4.5.	Chemilumineszenz-Detektion	55
2.4.6.	MCR 3 – Aufbau und Messprinzip	55
2.4.6.1.	Aufbau MCR 3	56
2.4.6.2.	Sandwich-Mikroarray-Immunoassay (SMIA)	58
2.5.	Aufkonzentrierungsmethoden für Bakterien im Trinkwasser	59
2.5.1.	Monolithische Adsorptions-Filtration	60
2.5.2.	Zentrifugale Ultrafiltration	61
2.5.3.	Kombination aus Monolithischer Adsorptionsfiltration und Zentrifugaler Ultrafiltration zur Aufkonzentrierung von <i>L. pneumophila</i> -haltigen Realproben	61
3.	Ergebnisse und Diskussion	64
3.1.	Quantifizierung von <i>L. pneumophila</i> -Stammlösungen	64
3.1.1.	Kultivierung von <i>Legionella pneumophila</i>	64
3.1.2.	Verdünnungsreihe von Stammlösungen	65
3.1.3.	Quantifizierung am Durchflusszytometer	66
3.2.	Entwicklung eines Messprogramms zur Detektion von <i>L. pneumophila</i> am MCR 3	70

3.2.1. Vorversuche Masterarbeit	70
3.2.2. Optimierung des Messprogrammes	70
3.2.2.1. Vergleich von kontinuierlichem Fluss und Stopp-Flow für Streptavidin-HRP	72
3.2.2.2. Einfluss von verschiedenen Inkubationszeiten der Proben-Inkrementen	72
3.2.2.3. Fließgeschwindigkeit der Probeninkrementen	73
3.2.2.4. Kombination aus reduzierter Flussrate und verschiedenen Inkubationszeiten	74
3.2.2.5. Einfluss der Waschgeschwindigkeit auf das Chemilumineszenzsignal	75
3.2.2.6. Austausch des Markierungs-Enzyms: SA-poly-HRP anstatt SA-HRP	76
3.2.2.7. Optimierung der Konzentration an SA-poly-HRP	77
3.2.2.8. Optimierung der Konzentration des Detektions-Antikörpers	78
3.2.2.9. Gesamtdarstellung aller Optimierungsschritte	80
3.2.2.10. Etabliertes Messprogramm für die Bestimmung von <i>L. pneumophila</i>	81
3.3. Charakterisierung der einzelnen Antikörper	83
3.3.1. Polyklonaler Antikörper	83
3.3.1.1. Kalibrierung von <i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Bellingham, mit polyklonalem Fänger-Antikörper in ultrareinem Wasser	83
3.3.1.2. Kalibrierung von <i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Bellingham, mit polyklonalem Fänger-Antikörper in Oberflächenwasser	85
3.3.1.3. Aufkonzentrierung von Oberflächenwasser mit einer neuen Kombinationsmethode aus Monolithischer Adsorptions-Filtration (MAF) und Zentrifugaler Ultrafiltration (ZeUF)	88
3.3.1.4. Zusammenfassung	91
3.3.2. Monoklonale Antikörper	92
3.3.2.1. Kalibrierung der monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6 und mAb 20/1	93
3.3.2.2. Kalibrierung des monoklonalen Fänger-Antikörpers mAb 8/4	96
3.3.2.3. Kalibrierung des monoklonalen Fänger-Antikörpers mAb 3	98
3.3.2.4. Kalibrierung des monoklonalen Fänger-Antikörpers mAb 3/1	99
3.3.2.5. MAF und ZeUF in Kombination mit CL-SMIA-Detektion mit monoklonalen Fänger-Antikörpern	104
3.3.2.5.1. Kalibrierkurve für mAb 10/6 in Oberflächenwasser	104

3.3.2.5.2.	Wiederfindungsbestimmung für MAF, ZeUF und CL-SMIA mit mAb 10/6.	106
3.3.2.5.3.	Einfluss von lebenden und hitzeinaktivierten Zellen sowie aufgereinigtem LPS auf die Kombinationsmethode aus MAF, ZeUF und CL-SMIA.....	108
3.3.2.5.4.	Untersuchung verschiedener Realproben vom Fluss Isar	109
3.3.2.5.5.	Kläranlagen-Proben von Projektpartnern	114
3.3.2.5.6.	Wasserfall-Proben	117
3.3.2.6.	<i>Untersuchung von Realproben mit verschiedenen monoklonalen Fänger- Antikörpern.....</i>	118
3.3.2.6.1.	Definition von Nachweisgrenzen für die immobilisierten Fänger- Antikörper	119
3.3.2.6.2.	Umweltwasserproben und Bioaerosolproben	120
3.3.2.6.2.1.	Papierfabriken	121
3.3.2.7.	<i>Brauereien</i>	123
3.3.2.8.	<i>Schweinstall.....</i>	124
3.3.2.9.	<i>Zusammenfassung</i>	126
3.4.	Urinproben von Legionellose-Patienten	128
3.4.1.	<i>Entwicklung eines Binärcodes für die monoklonale Subtypisierung von L. pneumophila in Patientenurinen auf dem MCR 3</i>	128
3.4.2.	<i>Festlegung der individuellen Nachweisgrenzen für die Fänger-Antikörper</i>	130
3.4.3.	<i>Vermessung von Urin-Realproben mit BINAX®E.I.A. und CL-SMIA am MCR 3.....</i>	131
3.4.4.	<i>Charakterisierung der künstlichen LPS-Standards mittels LAL-Endotoxin-Nachweis....</i>	134
3.4.5.	<i>Vergleich der Nachweisstärke von BINAX®E.I.A. und CL-SMIA mittels Testung von künstlichen LPS-Standards.....</i>	136
3.4.6.	<i>Zusammenfassung zum Urintest</i>	142
3.5.	Entwicklung und Aufbau einer Bioaerosolkammer.....	144
3.5.1.	<i>Dichtigkeitsüberprüfung - Ultrareines Wasser mit Escherichia coli</i>	144
3.5.2.	<i>E. coli als Modellorganismus für Dusch-Bioaerosole</i>	146
3.6.	Etablierung eines Sandwich-Immunoassay-Mikroarrays zur Detektion von <i>Cronobacter sakazakii</i>	148

4. Zusammenfassung und Ausblick / Summary and Outlook	159
5. Experimenteller Teil	169
5.1. Verwendete Materialien	169
5.1.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte	169
5.1.2. Chemikalien und Reagenzien	170
5.1.3. Bakterienstämme	172
5.1.4. Antikörper	173
5.1.5. Puffer	176
5.1.6. Software.....	177
5.2. Standardisierte Herstellungsverfahren	177
5.2.1. Herstellung DAPPG-beschichteter Mikroarrays.....	177
5.2.1.1. Vorbehandlung der Glasobjektträger	177
5.2.1.2. Anätzen der Oberfläche.....	178
5.2.1.3. Silanisierung mit GOPTS	178
5.2.1.4. Beschichtung mit DAPPG.....	178
5.2.2. Aktivierung der Chips mit DSC	179
5.2.3. Immobilisierung der Antikörper	179
5.2.4. Kleben der Antikörper-Mikroarrays	180
5.3. Messungen am MCR 3 SLT.....	181
5.3.1. Auswertung der Messdaten am MCR 3 SLT.....	183
5.4. Arbeiten am LGL Oberschleißheim im Legionellenlabor	183
5.4.1. Ausplattieren der Legionellenlösung auf GVPC-Selektivnährmedium.....	184
5.4.2. Membranfiltration der Legionellenlösung und Inkubation des Filters auf GVPC- Selektivnährmedium	184
5.4.3. Herstellen einer Stammlösung von Legionella pneumophila-Serogruppen und deren Konzentrationsbestimmung über eine Verdünnungsreihe	185
5.5. Bestimmung der Legionellenkonzentration am Durchflusszytometer	186
5.6. Herstellung und Gebrauch der monolithischen Säulen	186
5.6.1. Synthese der Epoxy-basierten Monolithen	187

5.6.2. Hydrolyse der Monolithen	187
5.6.3. Konstruktion der monolithischen Säule	188
5.6.4. Filtration	189
5.6.5. Elutionsprozess	190
5.6.6. Reinigung der Geräte	191
5.7. Aufreinigung von Hybridoma-Zellkulturüberständen für die Gewinnung monoklonaler Antikörper	191
5.7.1. Probenvorbereitung	191
5.7.2. Reinigung, Equilibrierung und Beladung der Protein G-Sepharose-Säulen	191
5.7.3. Elution der monoklonalen Antikörper	192
5.7.4. Dialyse der monoklonalen Antikörper	192
5.7.5. Aufkonzentrierung und Aliquotierung der Antikörper	193
5.7.6. Neutralisierung und Lagerung der Protein G Säulen	193
5.8. Herstellung von künstlichen LPS-Standards in sterilem Urin	193
5.8.1. Charakterisierung der LPS-Standards mit dem LAL-Test	194
5.8.2. Gewinnung der Urin-Proben der Patienten	195
5.9. Duschmodell zur Charakterisierung von Bioaerosolen	195
5.9.1. Erzeugung und Detektion von <i>E. coli</i>	196
5.9.2. Desinfektion der Bioaerosol- und Biosicherheitskammer	197
5.9.3. Bestimmung der <i>E. coli</i> -Konzentration im Duschaerosol	198
6. Abkürzungsverzeichnis	200
7. Literaturverzeichnis	205
8. Anhang	215

1. Problemstellung und Zielsetzung

1. Problemstellung und Zielsetzung

1.1 Problemstellung

Immer wieder tauchen in den Medien Schreckensmeldungen über neue Legionellose-Ausbrüche auf. Während dieser Forschungsarbeit kam es in Deutschland zu 3 großen Ausbrüchen. In Warstein erkrankten 165 Personen im Sommer 2013 an einer Legionellose, 2 davon starben. 2014 kam es dann zu einem weiteren Ausbruch. In Jülich erkrankten 39 Personen an einer Legionellen-Infektion. Tote gab es hier glücklicherweise keine. 2015/2016 stand dann ein Ausbruch in Bremen im Fokus. Bei dieser Erkrankungswelle infizierten sich über 39 Menschen, 3 davon starben.

Es wird deutlich, dass die Legionellose-Ausbrüche in den letzten Jahren stark zugenommen haben. Das mag daran liegen, dass eine bessere Kommunikation mit den Behörden stattfindet, die Ärzte die auftretenden Symptome der richtigen Erkrankung und nicht der klassischen Lungenentzündung zuordnen. Andererseits ist das gehäufte Vorkommen von Legionellen in unser aller Umfeld daran nicht ganz unschuldig.

Seit der Novellierung der Trinkwasserverordnung im Jahr 2011 und den neuen Vorschriften zur Überwachung von Kühltürmen und legionellenhaltigen Bioaerosolen [VDI 2047, VDI 4250] im Jahr 2015 herrscht eine erhöhte Aufmerksamkeit für das Legionellenvorkommen sowohl auf behördlicher, als auch auf Bevölkerungsseite.

Legionellen kommen ubiquitär in vielen natürlichen, wasserführenden Systemen in kleiner Anzahl vor. In wärmeren, künstlich angelegten, aquatischen Umgebungen, wie z.B. Wasserleitungen in großen Wohngebäuden, Fabriken oder Schiffen, finden sie optimale Wachstumsbedingungen vor. Das liegt zum einen an ihrer hohen Wärmetoleranz, zum anderen an der Existenz von Biofilmen im Inneren der Rohrleitungssysteme, in denen sich Legionellen häufig ansiedeln. Weiterhin herrschen dort oft ein Nährstoff-Überangebot sowie wärmere Temperaturen, sodass sich Legionellen sehr gut ausbreiten und vermehren können.

Der Mensch kann sich durch Inhalation von kontaminierten Aerosolen mit Legionellen infizieren. Das passiert meist in Duschen [Bauer et al., 2008] und Schwimmbädern oder der Umgebung von evaporativen Kühlsystemen auf den Dächern von großen Gebäuden, sogenannten Kühltürmen [Ferré et al., 2009], Luftverneblern [Rhame et al., 1986] oder Verdunstungskühlern [Breiman et

al., 1990]. Dabei tritt entweder das harmlose Pontiac-Fieber mit seinen grippeähnlichen Symptomen auf, wo ein Mensch nach Erkrankung innerhalb von einer Woche ohne Folgeschäden genesen kann. Möglich ist aber auch das Auftreten einer Legionellose, die mit einer schweren Lungenentzündung vergleichbar ist. Besonders ältere Menschen, die immunsupprimiert oder gesundheitlich vorbelastet sind, erkranken an dieser Form. Die höchste Infektionsgefahr geht hierbei von *Legionella pneumophila* (*L. pneumophila*) Serogruppe 1 aus [Fields et al., 2002]. Mehr als 90 % aller Ausbrüche sind dieser Subgruppe zuzuordnen.

Als Infektionsquelle für den Ausbruch in Warstein wurde die Rückkühlanlage eines Industriebetriebes als Quelle identifiziert. Weiterhin war jedoch auch die kommunale Kläranlage sehr hoch mit Legionellen belastet [Deutsches Ärzteblatt, 2013]. Das aufgereinigte Wasser aus der Kläranlage wird in den kleinen Fluss Wäster eingeleitet, aus diesem wurde das Kühlwasser für die Rückkühlanlage entnommen. Ob das die Ursache für den Ausbruch ist, konnte im abschließenden Gutachten nie eindeutig geklärt werden. Meist kann man in Deutschland jedoch von sporadischen, nosokomialen oder ambulanten Erkrankungen ausgehen.

Aufgrund des hohen Infektionsrisikos für viele Menschen wäre eine stetige Kontrolle von pathogenen *Legionella*-Spezies in Bioaerosolen für den Immissionsschutz wichtig.

1.2 Zielsetzung

Der aktuelle Goldstandard zur Detektion von Legionellen ist die Kultivierung von Wasserproben auf Selektivnährmedium mit anschließender Inkubation für 7 – 10 Tage bei 37 °C. Diese Methode ist zwar sensitiv, jedoch sehr aufwendig und vor allem zeitintensiv. Im Ausbruchsgeschehen ist ein erstes Ergebnis nach einer Woche nicht hilfreich. Aus diesem Grund ist die Entwicklung schnellerer Messmethoden wichtig.

Bei einem Ausbruch ist die schnelle Identifizierung des verursachenden pathogenen Keims am wichtigsten, weswegen sich Testsysteme besonders eignen, welche eine gesicherte qualitative Aussage, eine sogenannte Ja/Nein-Antwort, in kürzester Zeit liefern. Mit weiteren Proben, die von Patienten und in der Umwelt gesammelt werden, kann anschließend durch alternative Messmethoden der Verdacht bestätigt werden. Anzustreben wäre also hier ein schnelles

Verfahren, welches mit hoher Sensitivität und Selektivität Serogruppen von *L. pneumophila* nachweist. Ein Mikroarray-basiertes Verfahren ist daher sehr vielversprechend, weil aufgrund der Multiplex-Anordnung auf dem Messchip schnell verschiedene Antikörper immobilisiert werden können, welche über ein Signalmuster einzelne Serogruppen eindeutig nachweisen können.

In einem ersten Schritt wurde in der Doktorarbeit ein Messprogramm zur Detektion von *L. pneumophila* auf dem Mikroarray-Messgerät MCR 3 etabliert. Das Testprinzip beruht auf einem flussbasierten Chemilumineszenz-Sandwich-Mikroarray-Immunoassay (CL-SMIA). Dieses „Schnellnachweisverfahren“ stellt die Grundlage dar, um eine vertiefende Typisierung auf Basis eines Panels an verschiedenen, möglichst selektiven und sensitiven monoklonalen Fänger-Antikörpern durchführen zu können.

Eine schnelle Zuordnung zu monoklonalen Subgruppen von *L. pneumophila* ist für das Ausbruchmanagement von enormer Bedeutung, wenn es möglich ist, vergleichbare Ergebnisse in Patientenproben und Umweltproben zu erhalten.

Die angewandte Technologie basiert auf einem Antikörper-Mikroarray zur Detektion von Mikroorganismen in der flüssigen Phase, in Kombination mit einem automatisierten Mess- und Auslesesystem. Die anschließende Detektion erfolgte auf Basis einer Chemilumineszenzreaktion. Verschiedene monoklonale und ein polyklonaler Antikörper gegen *L. pneumophila* dienten dabei als Fängermoleküle, die auf einer Diamino-polypropylenglykol-modifizierten (DAPPG) Glasoberfläche immobilisiert wurden. Mit einem Biotin-markierten Detektionsantikörper wurde der Sandwich-Immunoassay auf dem Mikroarray gebildet. Die Verwendung von Streptavidin-poly-HRP ermöglichte die anschließende Signalerzeugung. Das generierte Chemilumineszenzsignal der Reaktion von Luminol und H_2O_2 wurden mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet. Das erhaltene CL-Signal wurde semilogarithmisch zur Bakterienkonzentration aufgetragen. Die Auswertung erfolgte anschließend über eine sigmoidale Fitfunktion.

Sobald das Nachweissystem etabliert war, sollten die verschiedensten Realproben damit getestet werden. Es sollte gezeigt werden, dass *L. pneumophila* in Abwasser-, Oberflächenwasser- und Leitungswasserproben nachweisbar sind. Luftproben, die mit dem Zyklonsammler Coriolis μ gesammelt wurden, sollten ebenso auf das Vorkommen von

Bioaerosol-haltigen Legionellen untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit war die Anwendung des CL-SMIA auf Urine von infizierten Patienten. Der Multiplex-Nachweis von Legionellen-Serogruppen direkt aus dem Urin sollte als neue Detektionsmöglichkeit auf Machbarkeit untersucht werden.

Die letzte Herausforderung bestand in der Entwicklung einer Bioaerosolkammer für die Generierung eines legionellenhaltigen Bioaerosols im Rahmen des Projektes. Mit einem Kammer-in-Kammer-Prinzip sollte es ermöglicht werden, ein Bioaerosol, welches pathogene Legionellen enthält, zu erzeugen, zu sammeln und anschließend zu detektieren.

Fernab dieses LGL-geförderten Projektes sollte in einem Nebenprojekt untersucht werden, ob die Übertragbarkeit des entwickelten Schnellnachweises auf Basis eines CL-SMIA auch auf andere lebensmittelrelevante Bakterien gewährleistet ist.

Im Rahmen des Projektes LEVERA sollte untersucht werden, ob *Cronobacter sakazakii* mit diesem Messprogramm detektiert werden kann. Es sollten Kalibrierkurven aufgenommen und die Kreuzreaktivität bestimmt werden. Die Endanwendung für Realproben auf Basis von Milch und Baby-Milchnahrung stellte den Abschluss des Nebenprojekts dar.

2. Theoretische Grundlagen

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Legionellen – relevante Fakten für Umwelt und Gesundheit

In der gesamten Arbeit wurde mit *L. pneumophila* gearbeitet. Im nachfolgenden Kapitel soll auf die Bakterienspezies genauer eingegangen werden, um die Relevanz einer Nachweismethode für diese Mikroorganismen zu verdeutlichen.

2.1.1. Morphologie und Eigenschaften

Legionella sind gramnegative, nichtsporenbildende, fakultativ aerobe Bakterien. Sie weisen verzweigt-kettige Aminosäuren auf, besitzen einen nichtfermentativen Metabolismus und benötigen L-Cystein und Eisensalze für ihr Wachstum. Sie kommen weltweit überall in natürlichen und künstlichen Süß- und Salzwassersystemen vor [Meyer et al., 1984]. Frei lebende Legionellen sind stäbchenförmig, 0,3 bis 0,9 µm breit und ungefähr 1,3 µm lang. In-vitro wachsen sie auf eine Größe von 2-6 µm heran und können dabei Filamente bis auf eine Länge von 20 µm oder mehr ausbilden. Legionellen sind aufgrund einer oder mehrerer polarer oder subpolarer Flagellen beweglich. Ihre Zellwand besteht aus einer Zytoplasmamembran auf der inneren Oberfläche, einer dünnen Peptidoglykan-Schicht, und einer äußeren Membran, die hitzestabile Lipopolysaccharide (LPS) enthält. Die Lipopolysaccharidschicht weist spezies- und serogruppenspezifische O-Antigene auf. Aktuell sind über 57 Spezies der *Legionellaceae* beschrieben. Die meisten davon sind humanpathogen [Brodhun et al., 2011]. Die bedeutendste Spezies, *L. pneumophila*, ist für über 90 % aller Legionellose-Ausbrüche verantwortlich [Fields et al., 2002].

2.1.2. Vorkommen und Pathogenität

In der Natur kommen Legionellen als natürlicher Mikroorganismus in Grund- und Oberflächenwasser vor. Da sie dort nur in geringen Konzentrationen vorhanden sind, geht von ihnen keine pathogene Gefahr aus [Brodhun et al., 2011]. Jedoch können sie in technische Anlagen, wie z.B. Rohrleitungssysteme o.Ä., gelangen. Dort finden sie bestimmte Bedingungen vor, unter denen eine Vermehrung nicht mehr ausgeschlossen werden kann. Gerade ältere und

nur spärlich gewartete, wasserführende Rohrsysteme bieten aufgrund von anhaftendem Biofilm und Ablagerungen ideale Lebensbedingungen für Legionellen. Die thermophilen Bakterien vermehren sich zwischen 25 °C und 45 °C ideal [Brodhun et al., 2011] und breiten sich aus. Gerade große, künstlich angelegte und wasserführende Systeme, wie Rohrleitungen in Krankenhäusern, Pflegeheimen und Hotels sowie Prozesswasser-Rohranlagen von Industriebetrieben, bieten eine optimale Lebensgrundlage. Ebenso wirken Totleitungen sowie reduzierte Flussraten in Rohranlagen wachstumsfördernd.

In der Umwelt leben Legionellen meistens in Gesellschaft von oder sogar im Inneren von Einzellern, beispielsweise Amöben [Fields et al., 2002] (siehe Abbildung 1) oder anderen Bakterien, weil sie von deren Stoffwechsel profitieren [Solomon et al., 2000; Hägele et al., 2000]. Sie nehmen dabei ein lebensfähiges, aber nicht kultivierbares Stadium (VBNC – viable, but not culturable) ein, womit sie auch sehr lange Zeit in Biofilmen überdauern können [Hussong et al., 1987].



Abbildung 1: Legionellen in Einzeller (evtl. Amöbe) – eigene Mikroskopie-Aufnahme am RAMAN-Mikroskop vom 08.01.2015.

Unter einem Biofilm versteht man eine Schicht von lebenden und teils abgestorbenen Mikroorganismen. Sie können entstehen, wenn Bakterien, Algen, Pilze und Protozoen sich an den Grenzflächen zwischen verschiedenen Phasen ansiedeln. Das tritt meistens zwischen Flüssig- und Festphase, z.B. Kies an einem Wasserlauf, Flüssig-/ Flüssigphasen, z.B. Öltröpfchen im Wasser, oder an Grenzflächen zwischen Luft und Flüssigphase (Kahmhaut auf einer Wasserlache) auf. An dieser Grenzfläche siedeln sich sehr oft Mikroorganismen an und es wird eine dünne, meist geschlossene Schleimschicht aus Zuckern und Proteinen ausgebildet. Die Biofilmbildung durchläuft meist mehrere Stufen, bis sich ein stabiler, geschlossener Bewuchs

gebildet hat [Monroe et al., 2007]. Die Biofilmbildung ist besonders abhängig von der Art der besiedelnden Mikroorganismen, den Oberflächenmaterialien an den Grenzflächen und den physikalischen Parametern wie Luftfeuchte und Temperatur. Weiterhin entscheidend sind das Nahrungsangebot für die Mikroorganismen sowie die Strömungsgeschwindigkeit der Flüssigphase. Zuerst haften frei schwimmende Zellen an der Oberfläche an. Dafür sind meist Van-der-Waals-Kräfte verantwortlich. Anschließend entwickeln sich in einem nur noch bedingt reversiblen Vorgang verschiedene Monolagen durch die Bindung von sogenannten Adhäsinen mit der Oberfläche. Der Schleim, der zusammen mit Polysacchariden den Biofilm ausmacht, lässt sich auch durch ein kräftiges Spülen kaum noch von der Oberfläche waschen. Aus dem Biofilm können nun Zellen freigesetzt werden, die selbst wieder einen neuen Biofilm schaffen können, wenn sie eine geeignete Ansiedlungsfläche finden. In Abbildung 2 wird das Entstehen von Biofilmen schematisch dargestellt:

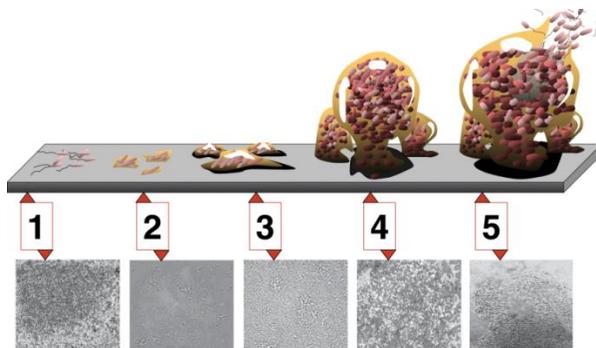


Abbildung 2: Bildung von Biofilm in 5 einzelnen Schritten: 1 - Initiale Anhaftung, 2 - Irreversible Anhaftung, 3 - Reifung I, 4 - Reifung II, 5 - Verbreitung. Im dargestellten Schema ist die Biofilmbildung von *Pseudomonas aeruginosa* dargestellt [gemäß Monroe et al. (2007)].

Das Zusammenleben im Biofilm hilft den Mikroorganismen sehr oft, Angriffe von außen (z.B. durch Desinfektionsmittel, Antibiotika, usw.) besser zu überstehen und im Mikroorganismenverbund weitaus weniger sensibel darauf zu reagieren.

Die Übertragung von Legionellen auf den Menschen geschieht meist durch Einatmen eines mit ihnen kontaminierten Bioaerosols. Die Bioaerosole lassen sich als Untergruppe der Aerosole bezeichnen, da in der Luft hier biologische Bestandteile dispergiert sind. Der Verein Deutscher Ingenieure (VDI) definiert Bioaerosole als "[...] alle im Luftraum befindlichen Ansammlungen von

Partikeln, denen Pilze (Sporen, Konidien, Hyphenbruchstücke), Bakterien, Viren und/oder Pollen sowie deren Zellwandbestandteile und Stoffwechselprodukte (z. B. Endotoxine, Mykotoxine) anhaften bzw. diese beinhalten oder bilden" [VDI 4252, 2004; VDI 4253, 2004].

Legionellen-haltige Bioaerosole entstehen meist dort, wo mit Legionellen belastete Flüssigkeiten intensiv mit Luft vermischt oder vernebelt werden, z.B. in Kühltürmen [Ferré et al., 2009; Sabria et al., 2006], Warmwassersystemen [Wadowski et al., 1982], Duschwasser [Bauer et al., 2008], Luftverneblern [Rhame et al., 1986], Verdunstungskühlern [Breiman et al., 1990] oder bei der papierverarbeitenden Industrie [Blatny et al., 2008] bzw. in Kompostieranlagen [Casati et al., 2010]. Die VDI-Empfehlungen zur Überwachung von Kühltürmen und legionellenhaltigen Bioaerosolen [VDI 2047, VDI 4250] im Jahr 2015 führten zu einer erhöhten Aufmerksamkeit für das Legionellenvorkommen sowohl auf behördlicher als auch auf Bevölkerungsseite. Kühltürme sind vermehrt in den Überwachungsfokus gerückt und unterliegen nun einer regelmäßigen Beprobungspflicht (VDI-Kühlturmregeln).

Im menschlichen Körper angekommen, suchen sich Legionellen einen Ort, an dem sie vor vielen gängigen Antibiotika sicher sind. Sie werden von den Fresszellen (Makrophagen) im Lungen- und Bronchiengewebe aufgenommen, verschanzen sich in ihnen und sind somit vor äußeren Einflüssen relativ gut geschützt. Die befallene Wirtszelle wird als Transportvehikel benutzt. Die Bakterien können sich im Inneren der Fresszellen vermehren (siehe Abbildung 3) und die Makrophagen der Lunge zuletzt auch zerstören. Dabei gelangen Stoffe in das umliegende Gewebe, die die Fresszelle normalerweise nutzt, um Krankheitserreger zu "verdauen". Diese Stoffe verursachen eine Entzündung im Gewebe und locken weitere Abwehrzellen an [Birtles et al., 1990].



Abbildung 3: Legionellen befallen die Fresszellen (Makrophagen) der Lunge eines Legionellose-Patienten [Website ethz].

2.1.3. Krankheitsbild und Therapie

Bei der Legionellose handelt es sich um eine bakterielle Infektionskrankheit, die durch die Erreger der Spezies *Legionella* hervorgerufen wird. Es kann zwischen zwei Krankheitsbildern der Legionellose unterschieden werden, welche sich entweder als schwere Lungenentzündung – Legionärskrankheit genannt – oder dem Pontiac-Fieber ausprägt. Das wesentlich milder verlaufende Pontiac-Fieber, dessen Name auf den US-amerikanischen Ort Pontiac zurückgeht, an dem es in der Vergangenheit zu einer Häufung von Krankheitsfällen kam, tritt meist mit grippeähnlichen Symptomen auf, die von Erkrankten als erträglich und relativ kurz verlaufend eingestuft werden. Nach einer Inkubationszeit von 20 – 48 Stunden ist die nichtpneumoische fieberhafte Erkrankung mit Symptomen wie Kopfschmerzen, Muskelschmerzen, trockenem Husten und Fieber für den Patienten meist nicht einmal behandlungsbedürftig. Eine Pneumonie kann medizinisch nicht festgestellt werden. Oft haben sich die Patienten innerhalb weniger Tage wieder vollkommen erholt, ohne dass eine spezielle Therapie von Nöten war. Bei der Legionärskrankheit [McCormick et al., 2012] treten nach einer Inkubationszeit von 2 bis 9 Tagen Beschwerden von Unwohlsein bis hin zum gänzlichen Krankheitsgefühl, Kopfschmerzen, Fieber, Schüttelfrost, Muskelschmerzen, Reizhusten und Schmerzen im Brustkorb auf. Der zuerst trockene Husten kann in starken Reizhusten mit blutigem Auswurf übergehen. Ein Mediziner kann die Legionärskrankheit anhand von Röntgenbildern kaum von einer normalen Lungenentzündung unterscheiden. Bei zu später oder verzögerter Behandlung kann die Krankheit auch einen tödlichen Verlauf annehmen. Die Letalität beträgt bei vorher gesunden Personen ca. 15 % [Freudenmann et al., 2011], bei immunsupprimierten, geschwächten, älteren Personen kann sie auf bis zu 70 % ansteigen. Die Diagnose „Legionärskrankheit“ ist erst gesichert, wenn der Erreger eindeutig im Körper nachgewiesen worden ist. Mit der richtigen Diagnose ist es jedoch ohne weiteres möglich, die Krankheit erfolgreich zu behandeln und eine völlige Ausräumung des Patienten zu erreichen. Dafür werden dem Patienten Fluorchinolone wie z.B. Levofloxacin oder Makrolidantibiotika (z.B. Azithromycin, Clarithromycin) verabreicht. Diese wirken gezielt gegen den Legionellose-Erreger und ermöglichen somit eine viel effektivere Therapie als ein Breitband-Antibiotikum, was bei einer „normalen“ Pneumonie verabreicht wird. In Deutschland ist nach §7 des Infektionsschutzgesetzes das Labor, welches die Legionellose diagnostiziert, meldepflichtig. Die ermittelten Krankheitsfälle werden seit 2001 vom Robert-

Koch-Institut erfasst. Die Anzahl gemeldeter Erkrankungen in Deutschland hat sich auf einem konstanten Level von ca. 600-700 Fällen pro Jahr eingepegelt. Aufgrund des schweren Legionellose-Ausbruchs 2013 in Warstein wurden in diesem Jahr über 900 Fälle erfasst [RKI, 2015]. Die Diagnostik wird mit verschiedenem Patientenmaterial wie Sputum bzw. Lungengewebe sowie Urin oder Blut durchgeführt. Es wird dabei das als Antigen wirkende LPS der Legionellen oder bereits gebildete Antikörper im Blut des infizierten Patienten nachgewiesen. Es ist davon auszugehen, dass nicht alle Fälle einer Legionellose bei der Routine-Diagnostik erfasst werden, somit ist mit einem Minderbefund zu rechnen. Um eine gesicherte Diagnose stellen zu können und die vorliegende Lungenentzündung von anderen Pneumonien zu unterscheiden, ist eine gezielte Untersuchung auf Legionellen erforderlich. Dies wird meist aus Zeitgründen vom behandelten Arzt nicht durchgeführt [Brodhun et al., 2011]. Nach den Hochrechnungen des Netzwerkes für ambulant erworbene Pneumonien (CAPNETZ) geht man in Deutschland aktuell von ca. 20.000 Erkrankungsfällen pro Jahr aus.

Bei den über das RKI gemeldeten Fällen sind über $\frac{3}{4}$ ambulant erworben, das heißt im privaten oder beruflichen Umfeld des Patienten kam es zu der Infektion mit Legionellen. 17 % der Fälle sind reiseassoziiert. Im Zusammenhang mit einem Aufenthalt im Krankenhaus bzw. einer Pflegeeinrichtung wurden 2,8 % bzw. 1,2 % der Erkrankungen gemeldet (siehe Abbildung 4).

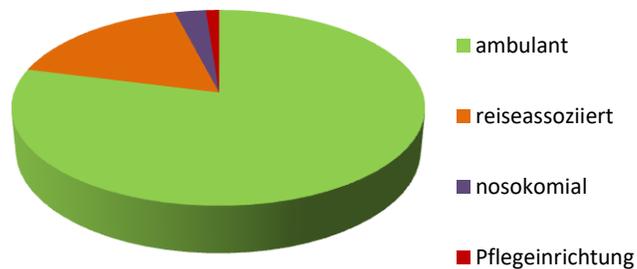


Abbildung 4: Infektionsstelle der im Jahre 2013 an das RKI gemeldeten Legionellosen [gemäß RKI, 2015].

Insgesamt lässt sich sowohl in Deutschland als auch innerhalb der EU eine stetige Zunahme der gemeldeten Fälle verzeichnen. Es ist zu vermuten, dass aufgrund des gesteigerten Interesses der Presse und der zunehmenden Berichterstattung in den Medien von Legionellose-Ausbrüchen

die Bevölkerung mehr dafür sensibilisiert wird und auch die Ärzte mehr in diese Richtung denken, wenn es um die Diagnose einer Pneumonie geht.

Die meisten Fälle (79 %) der 2013 gemeldeten Legionellose wurden mittels Urin-Antigen-Nachweis diagnostiziert, gefolgt von DNA-basierten Nachweismethoden (12,8 %). Eine kulturbasierte Detektion erfolgte in lediglich 4,4 % der Fälle. 98 % aller Infektionen wurden durch den Erreger *L. pneumophila* ausgelöst [RKI, 2015].

2.2. *Cronobacter sakazakii*

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde an einem Nebenprojekt (LEVERA, BMBF-gefördert) gearbeitet. Das Projekt LEVERA hatte zum Ziel, Lebensmittel sicherer zu machen und dafür schnelle Nachweismethoden zu entwickeln, die eine Detektion direkt in Lebensmittel-Matrix ermöglichen. Zum Beispiel war es unter anderem Aufgabenstellung, *Cronobacter sakazakii* (*C. sakazakii*) in Milch und Säuglingsnahrung (z.B. Milchpulver) nachzuweisen. Dafür sollte ein Schnellnachweisverfahren als SMIA am MCR 3 etabliert werden. Die entwickelte Messmethode für *L. pneumophila* sollte auf Übertragbarkeit/Erweiterbarkeit für andere Mikroorganismen überprüft werden und wurde als Ausgangsbasis für das Messprogramm genutzt. Im nachfolgenden Kapitel wird auf den Mikroorganismus *C. sakazakii* und sein Vorkommen eingegangen. Dieser Abschnitt wird jedoch bewusst knapp gehalten, weil es sich im Rahmen dieser Arbeit lediglich um ein kleines Nebenprojekt handelte.

2.2.1. Vorkommen und Pathogenität

C. sakazakii gehört zur Familie der *Enterobacteriaceae*. Im Jahr 1980 wurde das Bakterium aufgrund unterschiedlicher DNA-Zusammensetzung und abweichender biochemischer Reaktionen als eigene Spezies eingestuft und nach dem japanischen Bakteriologen Riichi Sakazaki benannt [Farmer et al., 1980]. Seinen heutigen Namen bekam dieser Mikroorganismus offiziell erst 2008, vorher wurde er, wie eben genannt, unter *Enterobacter sakazakii* geführt. Morphologisch gesehen handelt es sich um ein gramnegatives, stäbchenförmiges, sich durch

Geißeln fortbewegendes Bakterium. *C. sakazakii* kommt ubiquitär in der Umwelt vor. Seine morphologische Besonderheit ist die gelbe Pigmentierung (siehe Abbildung 5).

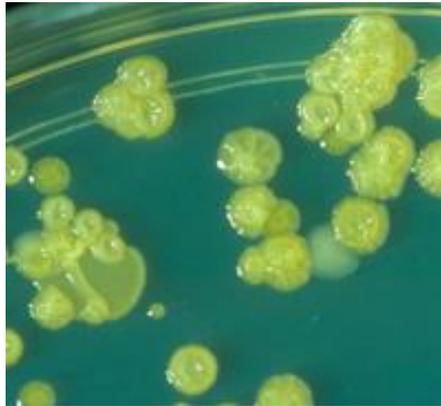


Abbildung 5: Gelbe Pigmentierung von *C. sakazakii*, ausplattiert auf einer Platte mit Selektivnährmedium [gemäß Homepage des CDC].

Prinzipiell kann man davon ausgehen, dass das Risiko, bei normaler Gesundheit und ausgereiftem Immunsystem an einer Cronobacter-Infektion zu erkranken, sehr gering ist. Die eher selten auftretende Infektion trifft manchmal stark immunsupprimierte Personen (alte Menschen und Kranke). Die am meisten betroffene Risikogruppe sind jedoch Kinder unter 6 Monaten, vor allem Frühgeborene oder durch Erkrankungen vorgeschwächte und immunsupprimierte Säuglinge. Man geht besonders bei dieser Altersgruppe davon aus, dass die Übertragung der Keime über die Säuglingsanfangsnahrung auf Milchpulverbasis erfolgt. Wenn diese nicht mit kochend heißem Wasser aufgegossen und vor jeder Mahlzeit frisch zubereitet wird, kann eine Infektion erfolgen. Neugeborene und Säuglinge können bei einer Infektion an Blutvergiftung (Sepsis), Hirnhautentzündung (Meningitis) oder einer gefährlichen Darmerkrankung (nekrotisierende Enterokolitis) leiden. Leider weisen derartige Erkrankungen meist eine sehr hohe Sterblichkeitsrate auf, zumal das Immunsystem von Neugeborenen und Säuglingen dem Keim kaum etwas entgegenzusetzen hat. Da eine Kontamination von Säuglingsnahrung nicht immer völlig auszuschließen ist, empfiehlt die Weltgesundheitsorganisation (WHO), Säuglingsnahrung immer frisch zuzubereiten und sie dem Säugling nach dem Abkühlen auf Trinktemperatur sofort zu geben.

2.2.2. Detektionsmethoden

Die klassische Methode zum Nachweis für *C. sakazakii* ist die Kultivierung auf Selektivnährmedium. Die Identifikation des Keims kann dann über die Morphologie, Fluoreszenz und Pigmentierung (gelb) der gewachsenen Kolonien durchgeführt werden. Grundlage für die Kultivierung von *C. sakazakii* in Säuglingsmilch, Milchpulver und Milchprodukten bildet dafür der ISO Standardentwurf ISO/DTS 22964:2006-02. Weiterhin bietet die Publikation von Fox et al. [Fox et al., 2008] eine sehr gute Grundlage für die analytische Vorgehensweise im Labor.

Eine weitere Möglichkeit zur Detektion von *C. sakazakii* stellt die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) dar. Für *C. sakazakii* stehen sehr viele kommerziell erhältliche Test-Kits zur Verfügung. Sehr oft benutzt wird das Testsystem BAX[®] von DuPont (Wilmington, USA). Laut Herstellerangaben detektiert dieser Kit *C. sakazakii* mit einer Spezifität von 98 %. Die Detektion kann innerhalb von 3 – 4 Stunden erfolgen. Die leichte Anwendung im Labor und der multifunktionale Einsatz der Plattform für verschiedene Mikroorganismen ermöglichen einen hohen Probendurchsatz (siehe Abbildung 6).

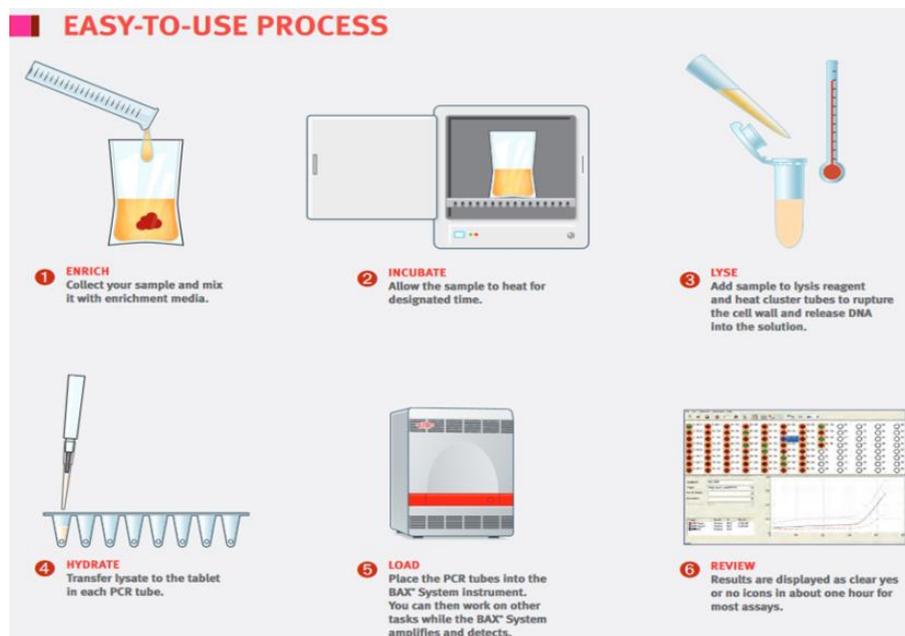


Abbildung 6: Packungsbeilage des BAX[®] Systems von DuPont. Ein Gerät für verschiedene Anwendungen [entnommen aus Homepage von DuPont].

2.3. Nachweis von Legionellen

Sowohl legionellenhaltiges Wasser, als Ursache für Wasser-assoziierte Infektionen, als auch keimhaltige Aerosole, stellen eine Infektionsquelle für Legionellose dar. Aus diesem Grund ist der Nachweis von Legionellen in Wasser und im Bioaerosol entscheidend. Weiterhin ist eine Diagnostik von Legionellen in klinischen Proben von infizierten Patienten (z.B. Blut, Urin, Sputum oder Lungenmaterial) von Wichtigkeit. Zum Nachweis dieser Erreger werden verschiedene Ansatzpunkte in Betracht gezogen.

Eine Nachweismethode ist das Wachstum von Legionellen auf bestimmten Selektivnährmedien. Hier werden jedoch ausschließlich lebende und kultivierbare Zellen erfasst. Der Nachweis von *L. pneumophila* neben dem Kulturnachweis kann durch verschiedene Marker stattfinden. Hierbei erfolgt die Detektion von *L. pneumophila* unter anderem durch verschiedene Strukturen an der Bakterienzelle, z.B. Lipopolysaccharidstrukturen an der äußeren Zellmembran, das sogenannte LPS. Sofern ein Legionellennachweis durch Zielstrukturen auf der Zelloberfläche erfolgt, z.B. Proteine der Zellmembran, werden automatisch sowohl Bruchstücke, tote Zellen und Zellen im VBNC-Status als auch intakte Legionellen erfasst.

Legionellen können ebenso auch durch Methoden identifiziert werden, die positiv auf innere Zellbestandteile reagieren. Diese Zellbausteine sind z.B. Nukleinsäuren (DNA, RNA), bestimmte Zellproteine oder der Energiebaustein ATP. Um diese Verfahren durchführen zu können, ist jedoch eine Lyse der Zelle, das heißt eine Zerstörung der Zellwand und eine Zerlegung der Zelle in alle Einzelbausteine, von Nöten.

2.3.1. Die Lipopolysaccharid-Struktur von *Legionella pneumophila*

Bei gramnegativen Bakterien des Typs *L. pneumophila* findet man die Bindungsstelle des Antigens in den Lipopolysaccharidstrukturen auf der Oberfläche der äußeren Membran. Bei Lipopolysacchariden (Kurzform LPS) handelt es sich um hitzeunempfindliche Ketten aus Fettsäuren und Zuckermolekülen. Aufgrund ihrer Wirkung als Antigen ermöglichen sie eine serologische Zuordnung und Charakterisierung der Bakterien, z.B. in monoklonale Subgruppen [Ciesielky et al., 1986]. Die Struktur des LPS ist bisher noch nicht komplett erforscht. Ein Großteil

der Erkenntnisse entstammt der Forschung am Stamm Philadelphia 1. Bekannt ist bisher, dass die O-Kette dieses LPS aus einem Homopolymer eines α -(2 \rightarrow 4) verbundenen Zuckers, der 5-Acetamidino-7-acetamido-8-O-acetyl-3,5,7,9-tetradecyloxy-D-glycero-D-galacto-nonulosonsäure, genannt Legionaminsäure, besteht. Da keine Hydroxylgruppen vorhanden sind, ist die Bakterienoberfläche sehr hydrophob. Die Adhäsion an die Wirtszelle wird somit unterstützt [Zähringer et al., 1995]. Der Core-Anteil des LPS besteht aus einem inneren und einem äußeren Bereich, wobei der äußere Anteil ebenso einen hydrophoben Charakter aufweist.

Die gesamte Kern-Region (engl. core region) des Stammes Philadelphia 1 wurde chemisch analysiert. Als darin enthaltene Komponenten konnten 2-Keto-3-desoxy-octonat (KDO), N-Acetyl-Glucosamin, Rhamnose, Mannose und N-Acetyl-Quinovosamin identifiziert werden [Moll et al., 1997]. Die O-Kette ist dabei ebenso einzigartig und subgruppenspezifisch wie das Lipid A. Das Grundgerüst besteht aus einem biphosphorylierten Disaccharid. Langkettige Fettsäuren sind ebenso zu finden. Diese sind möglicherweise dafür verantwortlich, dass das Lipid A der Bakterien eine geringere Endotoxin-Aktivität aufweist [Shevchuk et al., 2011]. In nachfolgender Abbildung 7 ist der Aufbau der LPS-Struktur von *L. pneumophila* schematisch dargestellt.

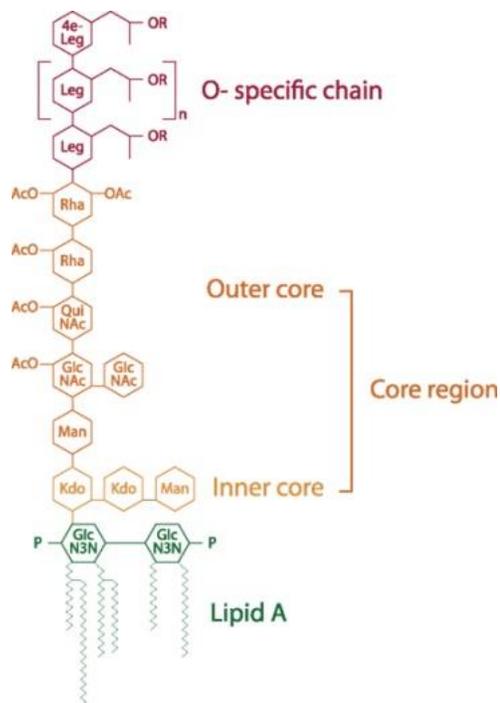


Abbildung 7: Schematischer Aufbau eines *L. pneumophila*-Lipopolysaccharids (LPS) mit Lipid A, Kern-Region (unterteilt in inner und outer core) sowie der spezifischen O-Kette [gemäß Shevchuk et al., 2011].

Eine antikörperbasierte Diagnostik für *L. pneumophila* macht sich die spezifische Bindung von LPS an einem bestimmten Antikörper-Epitop zunutze.

Im nachfolgenden Abschnitt soll auf die nach aktuellem Stand der Technik angewandten Nachweismethoden für *L. pneumophila* eingegangen werden.

2.3.2. Kulturnachweis von *L. pneumophila*

Die standardmäßig am häufigsten verwendete Methode zur Bestimmung von Legionellen ist die Kultivierung auf Nährmedium [Buse et al., 2012]. Sie findet Einsatz im Falle eines Legionellose-Verdachts bei Patienten sowie bei der Untersuchung von Wasser- und Aerosolproben. Dabei wird nach 2 empfohlenen Methoden des Umweltbundesamtes, aktualisiert im Jahre 2012 [Website Umweltbundesamt], vorgegangen. Es handelt sich um die Vorgaben DIN EN ISO 11731 [2015] und DIN EN ISO 11731-2 [2008].

Zur Durchführung der Analytik nach DIN EN ISO 11731 werden 0,5 mL der Probe direkt auf GVPC-Selektivnährmedium ausplattiert, im Brutschrank für 7 Tage bei 37 °C inkubiert und anschließend ausgezählt. Die Bestandteile des GVPC-Mediums sind Hefeextrakt, Agar, Puffer, α -Ketoglutarat, L-Cystein, Eisen(III)-pyrophosphat, Glycin und Antibiotika (z.B. Polymyxin B und Vancomycin) zur Verminderung von Begleitflora. Die eingearbeitete Aktivkohle besitzt eine antitoxische Wirkung durch Adsorption diverser Fettsäuren sowie den Abbau von Sauerstoffradikalen und entstehendem Wasserstoffperoxid. Bei DIN EN ISO 11731-2 werden 100 ml der Probe zuerst mit Säurepuffer behandelt, um Begleitflora abzutöten, und anschließend vakuumfiltriert. Der Filter wird dann auf GVPC-Nährmedium für 7 Tage bei 37 °C inkubiert. Beide Methoden werden in den Abbildungen 8 A und 8 B gezeigt.

Verdächtige Kolonien werden anschließend auf einem Cystein-freien Medium einer Subkultivierung unterzogen, sogenannte Blut-Agar-Kolonien. Solche Kolonien, die auf GVPC-Medium wachsen, auf Cystein-freiem Medium jedoch kein Wachstum zeigen, werden als Legionellen betrachtet [Umweltbundesamt, 2000].

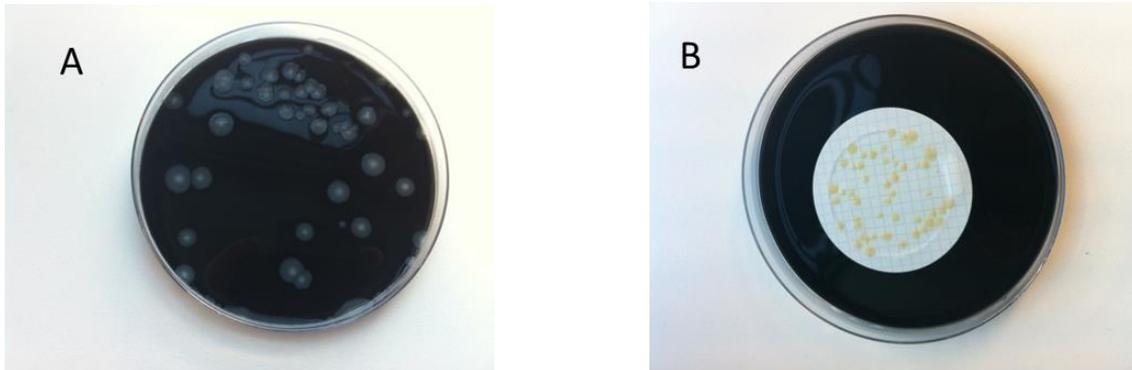


Abbildung 8 A und B: a) Legionellen, 0,5 mL ausplattiert auf GVPC-Selektivnährmedium nach DIN ISO 11731; b) Legionellen, 100 ml vakuumfiltriert auf GVPC-Selektivnährmedium nach DIN ISO 11731-12 [gemäß DIN EN ISO 11731:2015-12 und DIN EN ISO 11731-2:2008].

Abhängig von der Wachstumsrate der Legionellen dauert das Wachstum zwischen 48 Stunden und 7 Tagen, bis eindeutige qualitative und quantitative Aussagen getroffen werden können [Deisingh et al., 2002]. Der Vorteil der Kultivierungsmethode ist die geringe Nachweisgrenze. Das heißt, dass mit diesem Verfahren laut Theorie 1 KBE/100 mL (koloniebildende Einheit pro 100 Milliliter), abhängig vom eingesetzten Ausgangsvolumen, nachgewiesen werden kann. Die Bakterienkultur, pur und unverändert eingesetzt oder z.B. resuspendiert in ultrareinem Wasser, kann anschließend für verschiedene Detektionsmethoden als Untersuchungslösung eingesetzt werden.

2.3.2.1. Durchflusssytometrie

Die Durchflusssytometrie (engl.: flow cytometry, FCM) ist ein optisches Messverfahren, das sowohl in Biologie und Chemie, als auch in der Medizin Anwendung findet. Es werden hierbei mit Fluoreszenzfarbstoff angefärbte Partikel oder Probenzellen analysiert, die einzeln, in einem laminaren Hüllstrom eingeschlossen, mit sehr hoher Geschwindigkeit an einem Lichtstrahl vorbeigeleitet werden. Alternativ wird die Widerstandsänderung über eine Kapillare beim Durchgang einer Zelle gemessen. Es findet eine starke Verdünnung der Probenlösung statt, was zu einer Verjüngung des Probenstromes und schließlich zur Vereinzelung der enthaltenen Zellen führt. Biochemische und physikalische Parameter der Zellen, z.B. Fluoreszenz, Granularität und relative Zellgröße können dabei simultan bestimmt werden [Robinson et al., 2004; Sack et al.,

2007]. Bei einem standardmäßigen Zytometer gibt das detektierte Streulicht Auskunft über die Eigenschaften der untersuchten Zellen. Die Intensität des Vorwärtsstreulichts (engl. *forward scatter*, FSC) hängt von der relativen Größe der Zelle ab. Das Seitwärtsstreulicht (engl. *side scatter*, SSC), welches im rechten Winkel streut, steht als Maß für die interzelluläre Granularität der untersuchten Zellen. Bei diesen Zytometern werden auch hauptsächlich Vakuumpumpen für die Injektion der Probensuspension in das Durchflusszytometer verwendet.

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Cell Lab Quanta von Beckman Coulter (Abbildung 9) injiziert eine Spritzenpumpe ein definiertes Volumen der Probenlösung bei stabilem und konstantem Fluss in die Flusszelle.



Abbildung 9: In der Arbeit verwendetes Durchflusszytometer Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter).

Somit kann die Konzentration der enthaltenen Bakterienzellen direkt in Abhängigkeit der Zeit bestimmt werden. Der laminare Hüllstrom leitet die Probenzellen in eine trianguläre Flusszelle (siehe Abbildung 10).

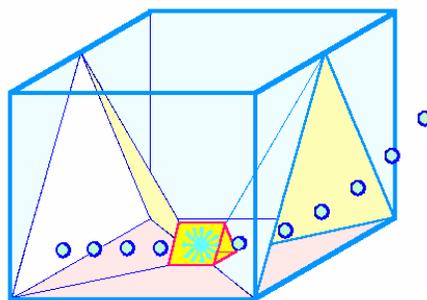


Abbildung 10: Schematischer Aufbau der triangulären Flusszelle des verwendeten Durchflusszytometers (entnommen aus Handbuch Cell Lab Quanta, 2005).

Durch die Vereinzelung der Zellen aufgrund des laminaren Hüllstromes passiert nur eine Zelle pro Zeiteinheit den Laserstrahl. Beim verwendeten Zytometer stehen zur Detektion drei verschiedene Photomultiplier zur Verfügung. Diese detektieren jedoch nur jeweils in einem ganz bestimmten Wellenlängenbereich (FL 1: 525 nm, FL 2: 575 nm und FL 3: > 670 nm; + X in Abhängigkeit vom eingesetzten Filter) (siehe Abbildung 11).

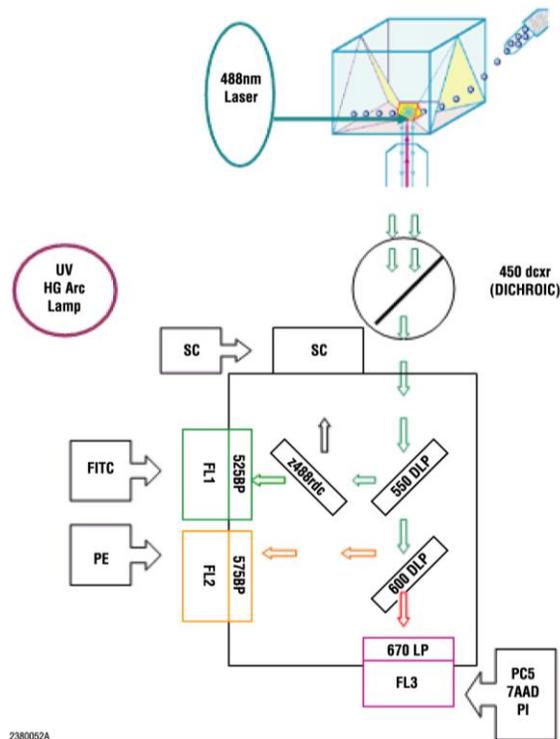


Abbildung 11: Aufbau der Optik sowie Strahlengang des verwendeten Durchflusszytometers (gemäß Handbuch Cell Lab Quanta, 2005).

Beim verwendeten Zytometer von Beckman Coulter wird die Zellgröße durch das Coulter-Prinzip bestimmt. Dieses beruht auf der Veränderung des elektrischen Widerstandes, welche durch den Durchtritt der Zelle in der Elektrolytlösung durch die Flusszelle verursacht wird. Wenn sich eine Zelle in der Flusszelle befindet, erhöht sich der elektrische Widerstand; wenn die Flusszelle leer ist, ändert sich der Widerstand. Diese Widerstandsänderung wird detektiert und gibt Aufschluss über die Zellgröße. Die erhaltenen Messdaten werden als Punktwolke dargestellt.

Bei der Punktwolkendarstellung wird die Intensität zweier Messparameter für das gleiche Ereignis auf den beiden Diagramm-Achsen aufgetragen. Die Datenpunkte für Zellen desselben

Typus erscheinen damit immer in der gleichen Diagrammregion. Das bedeutet, dass Ereignisse, die in derselben Diagrammregion auftreten und eine gemeinsame Punktwolke bilden, durch die genaue Definition einer Region zusammengefasst werden können. Das bedeutet faktisch, sie können ein und demselben Analyten zugeordnet werden.

Eine Quantifizierung von Zellen kann erfolgen, wenn einerseits die Häufigkeit f_R [Ereignisse/min] von Ereignissen, die der Region R zugeordnet werden, und andererseits die Flussrate Q [mL/min] bekannt ist. In diesem Fall kann die Konzentration c [Ereignisse/mL] anhand von Formel 1 berechnet werden:

$$c = f_R \times Q \quad \text{(Formel 1)}$$

Die routinemäßige Anwendung von Durchflusszytometrie hat besonders in der klinischen Diagnostik eine große Bedeutung. In der Hämatologie und Immunologie [Shapiro et al., 2005; Jennings et al., 1998] finden besonders Geräte Anwendung, welche in der Lage sind, Bakterien zu detektieren, welche mitunter 1/1000 der Größe von eukaryotischen Zellen entsprechen. Im Rahmen von mikrobiologischen Untersuchungen werden hauptsächlich Wasserproben und Lebensmittel zytometrisch untersucht [Vives-Rego et al., 2000; Flint et al., 2006]. Entweder die Zellen werden nur gezählt, um eine quantitative Aussage zu erhalten. Eine andere Möglichkeit ist die Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen, welche zusätzliche Aussagen über physiologische und biochemische Eigenschaften der Analyten ermöglichen [Veal et al., 2000].

Die Verwendung der Durchflusszytometrie zum Nachweis von *Legionella spp.* wurde bereits in verschiedenen Studien beschrieben. In der Studie von Ingram et al. [1982] wurden *L. pneumophila* mit einem fluoreszierenden Farbstoff markiert und anschließend mit Durchflusszytometrie detektiert. Eine Kombination aus Kultivierung, Markierung der *L. pneumophila*-Zellen mit einem fluoreszenzmarkierten polyklonalen Antikörper, Aufkonzentrierung der Bakterienlösung über Membranfiltration und anschließender Detektion über Durchflusszytometrie fand für *L. pneumophila* ebenso Anwendung [Füchslin et al., 2010]. Mit dieser Methode konnte für *L. pneumophila* eine Nachweisgrenze von 500 Zellen/L erreicht werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff SYTO 9 [Gaio et al., 2008] verwendet. Er durchdringt die Zellmembran jeder lebenden Zelle und lagert sich in der im Zellkern befindlichen Zell-DNA an. Der Farbstoff, gebunden an die Zell-DNA, absorbiert das Laser-Licht bei einem Maximum von 480 nm. Das Emissionsmaximum wird bei 500 nm erreicht. Daher wurde ein Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm eingesetzt. Die mit SYTO 9 angefärbten Zellen fluoreszieren deutlich geringer. Nicht angefärbte, d.h. meist tote Zellen und solche mit zerstörter Zellmembran, weisen eine deutlich geringere Intensität auf. Das hängt unmittelbar mit der erhöhten Quantenausbeute aufgrund der DNA-Interkalation des Fluoreszenzfarbstoffes zusammen [Stocks et al., 2004]. Aufgrund dieser Eigenschaft ist nur eine eindeutige Fluoreszenzdetektion von Legionellen möglich, wenn diese die einzigen lebenden Zellen in der zu untersuchenden Probe sind. Davon kann man nur bei einer frischen Bakterienlösung ausgehen, wenn man die Zellen in autoklaviertem ultrareinem Wasser suspendiert. Aus diesem Grund kann diese Methode zur Herstellung von Kalibrierstandards eingesetzt werden, indem die Zellzahl in einer Reinkultur bestimmt wird. Der spezifische Nachweis einzelner Spezies ist nur mit einem spezifischen fluoreszenzmarkierten Antikörper möglich.

Ein Nachteil der Durchflusszytometrie ist die fehlende Spezifität. Alle lebenden Bakterien werden mit der Methode nachgewiesen, der Farbstoff interkaliert unspezifisch. Eine Quantifizierung ist bei Realproben somit nicht möglich. Lediglich aufgestockte Bakterienlösungen einer Reinkultur können über eine Kalibrierung mit vorab vermessener Verdünnungsreihe quantifiziert werden.

2.3.2.2. *Mikroskopie*

Mikroskopische Methoden werden meist dann eingesetzt, wenn man Objekte, die für das menschliche Auge nicht sichtbar sind, abbilden bzw. sichtbar darstellen möchte. Dafür finden hochauflösende Geräte wie das Transmissionselektronenmikroskop (TEM) oder das Rasterelektronenmikroskop (REM) Anwendung. Sie erlauben eine optische Vergrößerung des Objektes, dessen Größe unter dem Auflösungsvermögen des menschlichen Auges liegt. Mit Hilfe einer Markierung mit Fluoreszenzfarbstoff können Legionellen-Infektionen unter einem

Epifluoreszenzmikroskop diagnostiziert werden. Dazu werden die markierten Zellen angeregt und danach mikroskopisch betrachtet [Ristagno et al., 1985; Zuravleff et al., 1983].

Die Detektion von *L. pneumophila* kann durchaus durch direktes Betrachten der Bakterienkultur unter einem Mikroskop erfolgen. Meist werden *L. pneumophila* jedoch direkt in respiratorischem Patientengewebe (Lungenmaterial oder Sputum) nachgewiesen. Nach Markierung der Zellen mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern, die selektiv an das LPS der Zellmembran binden, erfolgt eine visuelle Auswertung unter dem Mikroskop. Prinzipiell ist ein Nachweis von allen monoklonalen Subtypen und Serogruppen von *L. pneumophila* möglich. Jedoch weisen einige Antikörper eine sehr geringe Spezifität auf, sodass es zu Kreuzreaktivität kommen kann [Hayden et al., 2001]. Eine zu geringe Sensitivität bei den eingesetzten Antikörpern kann zu falsch-negativen Nachweisen führen.

Bei Patienten mit Verdacht auf Legionärskrankheit wird der Nachweis mit fluoreszierendem Antikörper auch im Blut eingesetzt, um festzustellen, ob der Antikörperspiegel gegen Legionellen im Blut angestiegen ist. Im positiven Krankheitsverlauf findet dies meist jedoch erst zwischen der 6. und 8. Krankheitswoche statt. Weiterhin ist es bei bis zu 30 % der Patienten der Fall, dass gar keine Bildung eines Antikörpers stattfindet [Wadowsky et al., 1982]. Somit ist eine Legionellose auch mit dem Fehlen von Antikörpern im Blut nicht eindeutig auszuschließen [Lück et al., 2006]. Aufgrund der Unsicherheit wird diese Nachweismethode mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern und anschließender Mikroskopie zunehmend seltener durchgeführt.

2.3.2.3. *Massenspektrometrische Methoden*

Bei der Massenspektrometrie wird die zu untersuchende Substanz in die Gasphase überführt und ionisiert. Die Ionen werden durch ein elektrisches Feld beschleunigt und dem Analysator zugeführt, der sie nach dem Masse-zu-Ladung-Verhältnis (m/z) "sortiert" und räumlich in Teilstrahlen auftrennt. Das geschieht beispielsweise im Sektorfeld-Massenspektrometer. Die Moleküle können dabei fragmentiert werden. Die anschließende Auswertung der einzelnen Massenfragmente der Probe erfolgt durch Abfrage von verschiedenen Datenbanken.

2.3.2.3.1. MALDI-TOF

Bei der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI)-TOF-Massenspektrometrie sind zwei Verfahren miteinander gekoppelt. Zuerst wird die untersuchte Probe aufgrund einer Laserbestrahlung in seine Einzelbestandteile ionisiert. Das erfolgt durch eine Co-Kristallation des Analyten mit einer MALDI-Matrix. Dabei handelt es sich meist um kleine organische Moleküle, die die Laserstrahlung gut absorbieren. Die Analytmoleküle müssen in die Kristalle der im Überschuss zugegebenen MALDI-Matrix „eingebaut“ werden, damit sich die Kristalle bilden. Kurze, hochenergetische Laserpulse von 2 – 5 ns Pulsdauer regen die Analytmoleküle an. Nach deren Relaxation im Kristallgitter kommt es zu explosionsartigen Teilchenablösungen an der Oberfläche des Kristalls. Gemeinsam mit der MALDI-Matrix werden dabei die eingeschlossenen Moleküle des Analyten in das Vakuum des Massenspektrometers überführt. Anschließend kann eine massenspektrometrische Analyse mit Flugzeitanalyse (engl.: time of flight, TOF) erfolgen. Im Flugzeitmassenspektrometer findet die Bestimmung des Masse-zu-Ladung-Verhältnisses (m/z) durch Messung der Flugzeit statt. Dazu werden die Ionen in einem elektrischen Feld beschleunigt und durchlaufen anschließend eine Flugstrecke. Der Zeitpunkt des Eintreffens der Ionen am Ende der Flugstrecke wird durch einen Detektor nachgewiesen. Dessen Signal kann durch einen schnellen A/D-Wandler oder TDC digitalisiert und in einem Spektrum dargestellt werden. In Abbildung 12 wird der gesamte massenspektrometrische Detektionsprozess schematisch dargestellt:

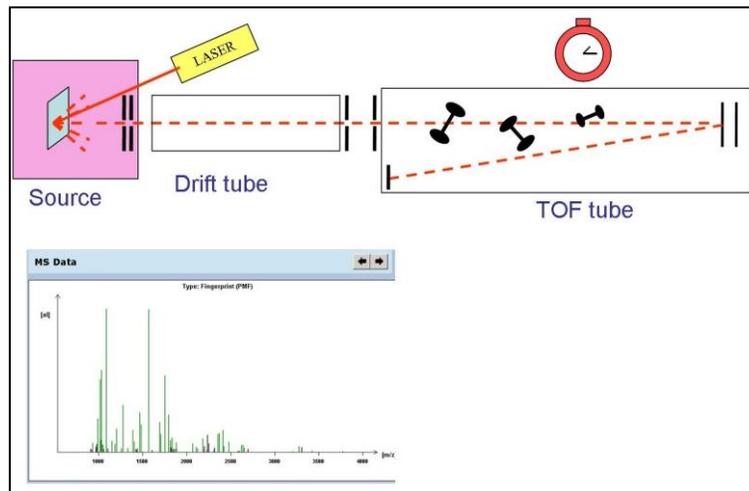


Abbildung 12: Schematische Darstellung der MALDI-TOF-Methode mit Laserbestrahlung der Probe, Flugzeitanalysator und anschließend ermitteltem Spektrum [gemäß Homepage Max-Planck-Institut (mpipz)].

Bei Legionellen kann die Detektion ebenso mit MALDI-TOF erfolgen. Die Kultur auf dem Selektivnährmedium wird zur Messung direkt eingesetzt. Nach erfolgter Analyse wird das ermittelte Spektrum in eine Datenbank gespeist und mit vorhandenen Referenzspektren abgeglichen [Gaia et al., 2011]. Hierbei ist jedoch nur eine Typisierung der Legionellen-Spezies möglich. Eine Bestimmung von Serotyp bzw. monoklonalem Subtyp ist leider nicht möglich, weil die Massenunterschiede innerhalb der Serogruppe bzw. Subspezies zu gering sind, um für die Datenbank relevante Unterschiede zu produzieren.

2.3.3. Immunologische Verfahren

Die immunologischen Methoden beruhen auf dem Prinzip der Bindung zwischen Antigen und Antikörper. Die Bindung erfolgt im Epitop, dem Oberflächenbereich eines Antigens, an dem die spezifische Bindung zum Antikörper ausgebildet wird. Die zum Epitop passende Bindungsfläche des Antikörpers wird als Paratop bezeichnet. Ein Epitop kann sowohl individual- als auch artspezifisch sein. Der Nachweis einer genauen spezifischen Bindung ist jedoch meist von dem angewandten Assay-Prinzip abhängig. Sehr oft richten sich Antikörper auch gegen bestimmte Proteine. Weiterhin ist aber ebenso eine Bindung gegen Polysaccharide, DNA oder andere chemische Strukturen wie Schwermetalle oder z.B. Hormone möglich.

2.3.3.1. ELISA

Beim ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay) handelt es sich um ein heterogenes Nachweisverfahren. Antigen und Antikörper werden mittels einer enzymatischen Farbreaktion quantifizierbar, weil sie miteinander in Wechselwirkung treten. Das nachzuweisende Antigen aus der untersuchten Probensubstanz wird zuvor mittels Fänger-Antikörper an die Festphase (hier eine Mikrotiterplatte) gekoppelt und angereichert. Als nachzuweisendes Antigen können Strukturen aus dem Zellinneren oder der Zelloberfläche des Zielmikroorganismus dienen. Der Detektions-Antikörper, an den meist ein Enzym gekoppelt ist, führt zu einer Farbreaktion.

Die am meisten angewandte Art eines ELISA für die Detektion von Mikroorganismen ist der Sandwich-ELISA. Bei dieser Anwendungsform sind monoklonale oder polyklonale Antikörper als Fängermoleküle auf der Festphase immobilisiert. Es ist hierbei besonders wichtig, dass der immobilisierte Fänger-Antikörper und der zugesetzte Detektions-Antikörper an zwei unterschiedliche Epitope (Andockstellen) am nachzuweisenden Antigen binden, sonst kann es möglicherweise zu sterischen Behinderungen kommen. Daher lassen sich auch oft nur Antigene mit einer bestimmten erforderlichen Größe bzw. bestimmtem Molekulargewicht nachweisen. Nach Ablauf der Inkubationsphase haben die Antigene an die Fänger-Antikörper gebunden. Anschließend wird dann der Detektions-Antikörper dazu gegeben, der an einem anderen Epitop an das Antigen bindet. Es entsteht damit ein Antikörper-Antigen-Antikörper-Komplex. Zur Quantifizierung wird ein passendes Substrat zugegeben, das von dem, an dem Detektions-Antikörper gekoppelten, Enzym umgesetzt wird. Durch die schnelle Umsetzung wird ein Nachweis über Farbstoffreaktion oder Chemilumineszenz ermöglicht. Anhand einer vorher erstellten Kalibrierkurve wird eine Quantifizierung des Antigens durchgeführt.

Der Sandwich-ELISA ist ein nichtkompetitiver Assay, das heißt, es herrscht ein Überschuss an Fänger-Antikörper-Bindungsstellen im Vergleich zu zugegebenem Analyten. Als Messgröße wird die Menge des zugegebenen Analyten (Antigens) angesetzt. In folgender Abbildung 13 wird die Funktionsweise eines Sandwich-ELISAs schematisch dargestellt:

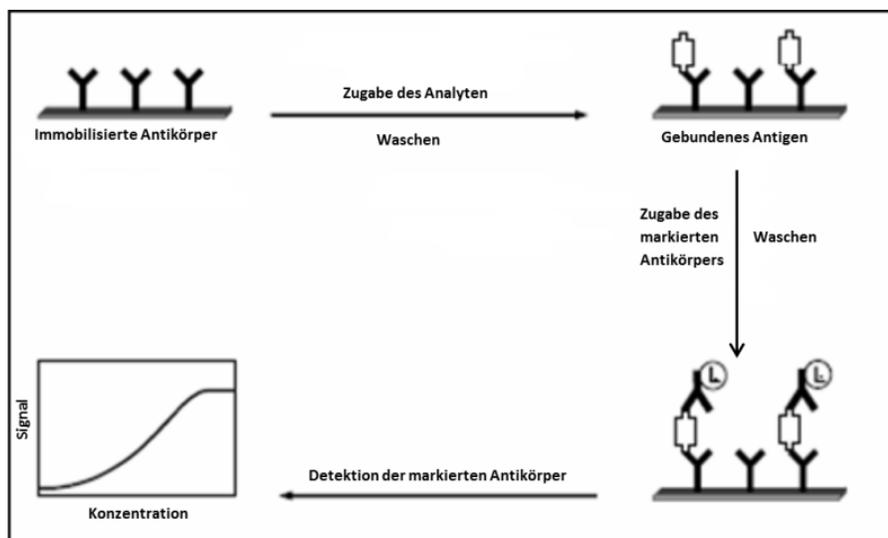
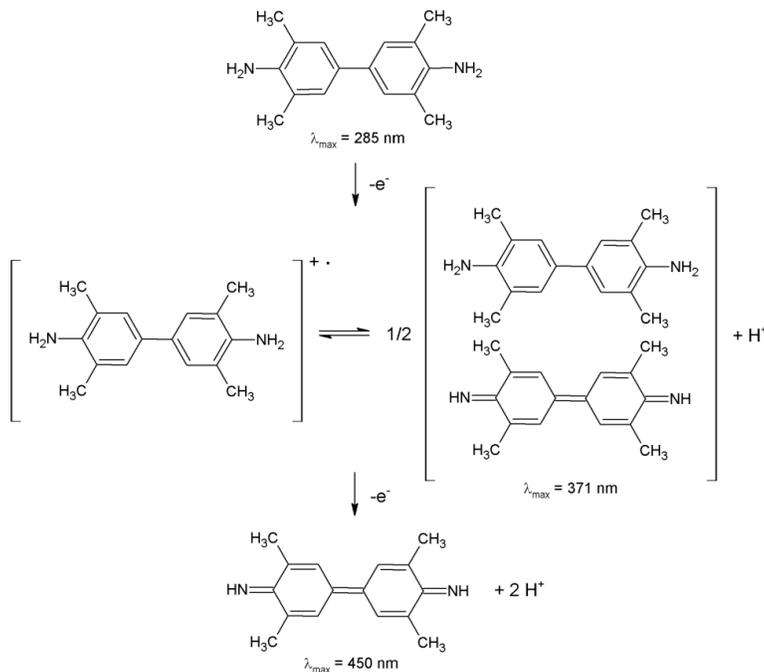


Abbildung13: Funktionsweise eines Sandwich-ELISAs [gemäß Darwish et al., 2006].

2.3.3.1.1. Detektionsmethoden für ELISA

2.3.3.1.1.1. Photometrie

Unter Photometrie versteht man die Messung der Lichtintensität bzw. der Lichtabsorption. Bei einer photometrischen Messung im Rahmen eines ELISA macht man sich eine enzymatische Farbreaktion im Bereich des sichtbaren Lichts (VIS: 350-850 nm) zunutze. Die zu detektierenden Antigene aus der Probenlösung sind an einen Fänger-Antikörper gebunden. Die Detektion erfolgt anschließend mit einem enzymgekoppelten Detektions-Antikörper. Die häufigste Anwendung ist der Nachweis von Antigenen durch den Farbumschlag von TMB, welches als signalgebendes Substrat eingesetzt wird. Meerrettich-Peroxidase (HRP) katalysiert eine Reaktion von TMB, die eine Blaufärbung verursacht. Der Farbumschlag nach gelb erfolgt dann durch die eingesetzte Schwefelsäure. Der bei der Reaktion entstehende Farbstoff wird photometrisch bei der für den Farbstoff spezifischen Wellenlänge von 450 nm nachgewiesen (siehe Reaktionsgleichung 1).



Reaktionsgleichung 1: HRP-katalysierte Oxidation von TMB (gemäß [Josephy et al., 1982]).

Die Quantifizierung des Analyten erfolgt nach Ermittlung einer Kalibrierkurve. Bei der Kalibrierung wird die Absorption gegen die eingesetzte Konzentration aufgetragen.

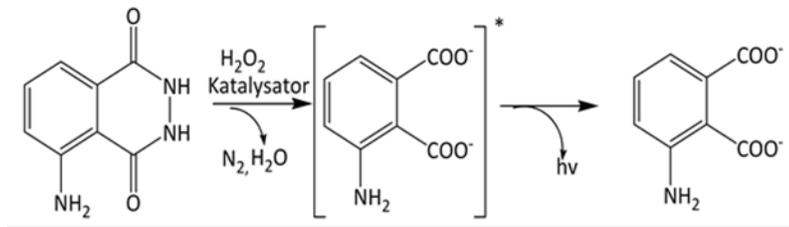
2.3.3.1.1.2. Fluoreszenz

Fluoreszenz ist die spontane Emission von Licht beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie. Der Name ist von dem fluoreszierenden Material Fluorit abgeleitet (Flussspat, Calciumfluorid, CaF_2). Die Fluoreszenz ist dadurch gekennzeichnet, dass sie nach dem Ende der Bestrahlung rasch endet. Fluoreszenz tritt auf, wenn der angeregte Zustand eines Atoms nicht stabil ist und das Elektron rasch wieder auf das niedrigere Energieniveau zurückfällt. Dabei wird ein Teil der Energie als Schwingungsenergie, also Wärme, abgegeben. Die restliche Energie emittiert als elektromagnetische Welle. Das führt wiederum dazu, dass das emittierte Licht eine größere Wellenlänge hat, als das zur Anregung ursprünglich absorbierte Licht. Dieses emittierte Licht wird Fluoreszenzlicht genannt. Zur Anregung werden z.B. Laser, LEDs oder Quecksilberdampflampen benutzt [Yu et al., 2003; Nickkova et al., 2005].

Für Fluoreszenz-basierte Immunoassays werden in der Mikrotiterplatte Fluoreszenz-Farbstoff-markierte Antikörper als Sekundärantikörper eingesetzt. Die Markierung kann dabei z.B. mit SYBR-Green, Propidiumiodid (PI) oder SYTO 9 erfolgen. Zur Detektion werden dann Standard-Fluoreszenz-Auslesegeräte wie Fluoreszenz-Mikroskope oder Fluoreszenz-Scanner eingesetzt [Gehring et al., 2006]. Da eine Lichtquelle zur Anregung eingesetzt werden muss, ist die Empfindlichkeit von Fluoreszenz-Immunoassays oft nicht so hoch wie bei Formaten, die mit einer Chemilumineszenz-Auswertung arbeiten.

2.3.3.1.1.3. Chemilumineszenz

Ein verbreitetes Enzym zur Markierung der Antikörper ist die HRP, welche als Katalysator für die Chemilumineszenzreaktion von Luminol mit Wasserstoffperoxid fungiert. Ursache für Chemilumineszenz (CL) ist eine chemische Reaktion, hier die Oxidation von Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid [Garcia-Campagna et al., 2007]. In nachfolgender Reaktionsgleichung 2 ist die Chemilumineszenzreaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid schematisch dargestellt:



Reaktionsgleichung 2: Chemilumineszenzreaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid [gemäß Marquette et al., 2006].

Diese Reaktion generiert das Licht im sichtbaren Bereich. Das emittierte Licht entsteht, weil ein Elektron aus einem angeregten Zustand in einen energetisch niedrigeren Zustand übergeht. Dabei wird die freiwerdende Energie in Form von Licht ausgesendet. Der angeregte Zustand des Elektrons wird durch die stattfindende chemische Reaktion erreicht. Der Reaktionsaufbau ist relativ simpel, da für diesen Nachweis keine externe Lichtquelle benötigt wird. Die Messung des emittierten Lichtes erfolgt z.B. mittels einer CCD-Kamera, die an ein rechnergestütztes Auswertesystem angeschlossen ist. Die Kamera ist außerdem in der Lage, bereits sehr geringe Lichtintensitäten aufzuzeichnen. Weiterhin ist sie aufgrund ihres Aufbaus vor von außen einfallendem Streulicht, das Signalabweichungen zur Folge hätte, geschützt. Die Chemilumineszenz findet oft Anwendung zusammen mit einem ELISA. Bei 425 nm kann das Emissionsmaximum für Luminol detektiert werden. Zur Photonenemission führen im Wesentlichen die folgenden Reaktionsschritte, die in oben aufgeführter Abbildung gezeigt sind. Es erfolgt eine Oxidation von Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion). Dadurch kommt es zur Bildung eines angeregten Aminophthalat-Ions. Dieses sendet Licht aus, wenn es in den energieärmeren Grundzustand übergeht. Die Intensität dieses ausgesandten Lichtes korreliert dabei mit der Menge an gebundenem Antigen (Analyt) und somit mit der Konzentration in der zu untersuchenden Probe. Zur Signalaufnahme für Chemilumineszenz werden hauptsächlich „charge coupled device“ (CCD)-Kameras, Photomultiplerröhren (PMT) oder „complementary metal-oxide semiconductor“ (CMOS)-Halbleiterelemente herangezogen [Golden et al., 2002]. Ein Vorteil dieser Detektoren liegt vor allem darin, dass sie ein großes Wellenlängenspektrum simultan erfassen können (200 bis 1100 nm). Ein weiterer Vorteil der Chemilumineszenz-Auslesemethode ist, dass dafür keine zusätzliche, externe Lichtquelle benötigt wird. Somit kann eine hohe Empfindlichkeit und ein geringes Untergrundsignal erreicht

werden. Aus diesem Grund sind Chemilumineszenz-Techniken im Vergleich zur Fluoreszenz meist empfindlicher [Roda et al., 2003]. Einerseits gehen die Hintergrundsignale aufgrund der nicht vorhandenen Lichtquelle gegen Null. Weiterhin kann das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis durch zusätzliche Verstärker erhöht werden.

Der äußere Photoeffekt findet bei Photomultiplerröhren Anwendung. Ziel ist es, sehr schwache Lichtsignale (bis hin zu einzelnen Photonen) durch Erzeugung und Verstärkung eines elektrischen Signals zu detektieren. Die ausgesandten Photonen treffen auf die Photokathode und lösen durch den äußeren Photoeffekt, ähnlich wie bei einer Photozelle, Elektronen aus deren Oberfläche. Diese Elektronen werden beschleunigt und exponentiell vervielfältigt. Durch das Auftreffen der Elektronen auf eine Anode wird ein Spannungsabfall über einen Widerstand generiert und gemessen. Diese Spannung ist das Ausgangssignal und kann detektiert werden. Aufgrund der hohen Lichtsensibilität muss ein Photomultiplier vor eintretendem Tageslicht geschützt werden, ansonsten kommt es zu Verfälschungen des Messergebnisses.

Beim inneren Photoeffekt, der bei einer CCD-Kamera Anwendung findet, wird die elektrische Leitfähigkeit von Halbleitermaterialien bei der Bestrahlung erhöht. Das einfallende Licht überträgt seine Energie auf die Elektronen des Halbleiters. Die negativ geladenen, freien Elektronen, die dabei gleichzeitig entstehen, trennen sich aufgrund der angelegten Spannung von den positiv geladenen „Löchern“. Alle Ladungen sammeln sich im Potentialtopf und werden nach einer vorab definierten Zeit ausgelesen. Aufgrund der hohen Lichtempfindlichkeit der Photodioden, die in der CCD-Kamera verbaut sind, kann eine sehr hohe Sensitivität bei der Signalaufzeichnung erreicht werden.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit erfolgte die Detektion des Sandwich-Mikroarray-Immunoassays mithilfe der Chemilumineszenzreaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid. Die Katalyse dieser Reaktion erfolgte durch das Enzym HRP, welches mit dem Bindeprotein Streptavidin verbunden war. Es wurde ein poly-Meerrettichperoxidase-Konjugat eingesetzt, das quantitativ den Enzymumsatz je Antikörperbindung erhöht. Streptavidin-poly-Meerrettichperoxidase-Moleküle bestehen aus 5 identischen Meerrettichperoxidase-Homopolymeren, welche an viele Streptavidin-Moleküle gekoppelt sind. Bei Streptavidin-poly-(40)-Meerrettichperoxidase sind das 200 Meerrettichperoxidase-Monomere (40×5). 5 poly-Meerrettichperoxidase-

Homopolymere koppeln mit Streptavidin zu einem Streptavidin-poly-(40)-Meerrettichperoxidase-Molekül (siehe Abbildung 14).

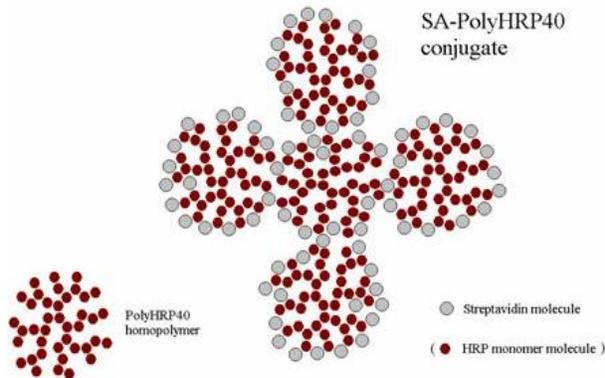


Abbildung 14: 40-fache Belegung von Streptavidin mit poly-HRP bewirkt eine Steigerung des Chemilumineszenzsignals (gemäß [Datenblatt interchim]).

Unspezifische Bindungen an der Oberfläche werden durch Inaktivierung der freien Bindungsstellen verhindert. Somit ist im Vergleich zu einfach markiertem Streptavidin mit diesen hochaktiven Enzymmolekülen eine Detektionssteigerung möglich.

2.3.3.1.2. Applikationen für ELISA

2.3.3.1.2.1. *Urin-Antigen-Nachweis*

Der in der klinischen Diagnostik im Rahmen der Routine-Untersuchung für Legionellose-infizierte Patienten verwendete Urin-Antigen-Nachweis basiert auf einem ELISA. Er findet aufgrund der Schnelligkeit bis zum Testergebnis und wegen seiner einfachen Handhabung beim Hausarzt am meisten Anwendung. Er ist schnell, zuverlässig und detektiert bei Vorliegen einer Infektion mit einer Wahrscheinlichkeit von 95 % positiv. Dieser Urin-Antigen-Nachweis ist seit 1979 vielfach erprobt und eingesetzt, ist jedoch bisher auf *Legionella spp.* beschränkt [Benson et al., 2000; Edelstein et al., 1993; Dominguez et al., 1996 und 1998]. Er kann aber mit breit gefächerter Kreuzreaktivität auch andere Legionellenspezies sowie Serogruppen von *L. pneumophila* unterscheiden (siehe Abbildung 15).



Abbildung 15: Urin-Antigen-Nachweis BinaxNOW® von Alere für Legionellose-infizierte Patienten mit Positivkontrolle; detektiert nur *L. pneumophila* SG 1 [Website Alere, 2016].

Eine weitere Applikation in der klinischen Diagnostik ist der BINAX®E.I.A. Dieser Nachweis wird in den Partner-Laboren des Robert-Koch-Instituts sehr häufig eingesetzt. Es handelt sich hierbei um einen Testkit, der auf einem Sandwich-ELISA basiert (siehe Abbildung 16).



Abbildung 16: Urin-Antigen-Nachweis BINAX® für Legionellose-infizierte Patienten mit Positivkontrolle; detektiert nur *L. pneumophila* SG 1 [Website Biograd, 2016].

Die Mikrotestplatte des BINAX®E.I.A. ist mit polyklonalen Kaninchenantikörpern beschichtet. Diese reagieren positiv auf das enthaltene *L. pneumophila*-Antigen, LPS, aus der Urinprobe. Das LPS wird meist in den ersten Tagen der Infektion ausgeschieden, später ist eine Detektion meist schwieriger möglich. Über eine Reaktion mit farbbildendem Substrat findet am Ende die photometrische Auswertung des Testkits statt [Website Mikrogen, 2016]. Für den BINAX®E.I.A. wurde die Sensitivität im Rahmen einer Studie zwischen 79,1 und 83,4 % definiert [Helbig et. al, 2011].

Im Jahr 2016 erschien ein neues Testkit für *L. pneumophila* Serogruppe 1, der Sofia Legionella

FIA von Quidel (siehe Abbildung 17). Er wurde speziell zur Anwendung in Urin entwickelt. Forschungsberichte zur Performance dieses Testkits liegen bisher jedoch noch nicht vor.



Abbildung 17: Sofia Testkit von Quidel zur Detektion von *L. pneumophila* SG 1 auf Basis eines Fluoreszenz-Immunoassays (FIA) [gemäß Homepage von Quidel].

Für die klinische Diagnostik bleibt zu beachten, dass ein negativer Test eine Legionellose trotzdem nicht ausschließt. Bei entsprechendem klinischem Verdacht sollten daher noch weitere Testmethoden (z.B. Kultur) zu Rate gezogen werden, da nicht alle Legionellose-Patienten auch das Antigen über den Urin ausscheiden. Für eine schnelle Diagnostik bei einem ersten Verdacht ist die Testmethode jedoch sehr gut geeignet.

2.3.3.1.2.2. Latex-Agglutinationstest

Ein weiterer immunologischer Schnelltest zur Detektion von *L. pneumophila* ist der Latex-Agglutinationstest [Loni et al., 2005; Holliday et al., 1990]. Der Test basiert auf der Agglutination von blauen Latexpartikeln, die mit Antikörpern beladen sind. Eine positive Reaktion ist optisch einwandfrei erkennbar. Die Latexpartikel agglutinieren, wenn spezifische Legionellen-Zellwand-Antigene (LPS) in der zu untersuchenden Probe vorhanden sind (siehe Abbildung 18).

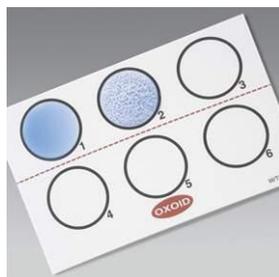


Abbildung 18: Latex-Agglutinationstest von Oxoid zur schnellen Detektion von *L. pneumophila* SG 1 und *L. pneumophila* SG 2 – 14 [gemäß: Homepage ThermoFisher].

Je nach Schnelltest-Hersteller kann zwischen *L. pneumophila* Serogruppe 1 und *L. pneumophila* Serogruppe 2 – 14 unterschieden werden. Prinzipiell ist dieser Test lediglich für eine qualitative Bestimmung geeignet. Es können keine quantitativen Aussagen getroffen werden.

2.3.3.1.2.3. Duopath-Test

Als weiterer kommerziell erhältlicher immunochromatographischer Schnelltest kann der Duopath-Test angewandt werden [Hayden et al., 2001]. Das Detektionsprinzip beruht auf der Erkennung der Antigene der Bakterien mittels hochselektiver, Gold-markierter Fänger-Antikörper, die auf dem Teststreifen immobilisiert sind. Der Antigen-Antikörper-Komplex ist durch die anschließende Färbung des Teststreifens eindeutig optisch zu erkennen. Antikörper gegen *Legionella spp.* bzw. gegen *L. pneumophila* sind auf verschiedenen Bereichen des Teststreifens aufgebracht. Auch mit diesem Schnelltest ist lediglich ein qualitativer Nachweis von Legionellen möglich (siehe Abbildung 19).



Abbildung 19: Duopath-Test von Merck KGaA mit Möglichkeit zur Detektion von *Legionella spp.* sowie *L. pneumophila*.

2.3.3.2. Typisierung von *L. pneumophila*

In den späten 1980er Jahren wurden erstmals Antikörper-Panels vorgestellt, mit denen es möglich war, eine Unterscheidung zwischen verschiedenen monoklonalen Subtypen von *L. pneumophila* SG 1 sowie verschiedenen *L. pneumophila*-Serogruppen durchzuführen [Para et al., 1983; Watkins et al., 1985; Joly et al., 1986]. Heute wird im Rahmen der klinischen Diagnostik von *L. pneumophila* mit einem Panel an monoklonalen Antikörpern gearbeitet. Zur Etablierung dieses Panels wurden aufgereinigte Zellkulturüberstände benutzt, deren Konzentration eingestellt und diese als Standard-Panel für einen ELISA eingesetzt. Die Urinproben von Patienten, die im Verdacht einer Legionellose-Infektion stehen, werden mit

dem Panel untersucht. Anhand eines vorab definierten Schwellwertes wird in der Klinik die Entscheidung über das Vorliegen einer Legionellose-Infektion entschieden.

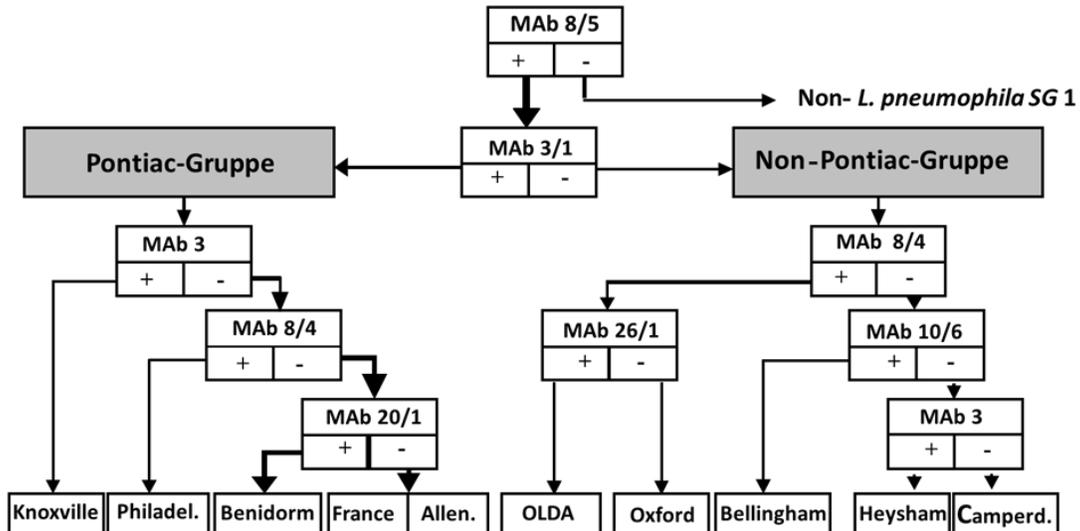


Abbildung 20: Übersicht über die monoklonalen Antikörper, die zur Subtypisierung von *L. pneumophila* Serogruppe 1 notwendig sind; Abbildung wurde zur Verfügung gestellt vom Legionella-Konsiliarlabor Dresden [gemäß Helbig et al., 2002].

In Abbildung 20 wird dargestellt, wie eine monoklonale Subtypisierung für *L. pneumophila* erfolgen kann, wenn man eine unbekannte Probe in einem ELISA mit dem gesamten Panel durchtestet. Das ermittelte Detektionsmuster gibt anschließend Auskunft über den vorliegenden monoklonalen Subtyp von *L. pneumophila*.

Mit dem sogenannten „Dresden Panel“, das aus 98 monoklonalen Antikörpern (mAbs) besteht, wurde erstmals eine groß angelegte Typisierung von Patienten- und Umweltisolaten durchgeführt [Helbig et al. 1997, 2002, 2012]. Durch die Spezifität des Panels, die auf der Unterscheidungsfähigkeit der verschiedenen Lipopolysaccharidstrukturen von Serogruppen und Subtypen begründet ist, wird eine eindeutige Zuordnung von *L. pneumophila*-Stämmen möglich. Die Notwendigkeit, Patientenisolat mit Umweltproben zu korrelieren, ist in den Vordergrund gerückt. Mit dem Panel gelang es erstmals, diese Isolate bestimmten Merkmalen zuzuordnen und Gemeinsamkeiten zwischen Umwelt- und Patientenprobe aufzuzeigen. Diese Antiseren sind jedoch nicht kommerziell erhältlich. Dieses Panel wird in verschiedenen europäischen Untersuchungsämtern und Laboratorien eingesetzt und weiterhin auch in Japan und den USA

genutzt. Das Dresden-Panel ist in der Lage, zwischen 8 gleichwertigen Subgruppen von *L. pneumophila* zu differenzieren. Zuerst wird der monoklonale Antikörper mAb 8/5 eingesetzt, um eine Differenzierung zwischen *L. pneumophila* SG 1 und SG 2 – 15 zu erreichen. Entsprechend der Abbildung 20 gehören alle mAb 3/1-positiven Subgruppen der sogenannten „Pontiac-Gruppe“ an. Die Pontiac-Gruppe wird als die virulenteste aller *L. pneumophila*-Subgruppen definiert. Der Grund dafür ist die hohe Detektionsrate von Pontiac-Stämmen in den Ausbruchsgeschehen des letzten Jahrzehnts [Uldum et al., 2008]. Alle der Pontiac-Gruppe angehörigen Stämme von *L. pneumophila* können wiederum mit den monoklonalen Antikörpern mAb 3, mAb 8/4 und mAb 20/1 auf eine einzelne Subgruppe eingegrenzt werden. Somit ist eine Unterscheidung zwischen Knoxville, Philadelphia, Benidorm, France und Allentown möglich. In der „Non-Pontiac-Gruppe“ ist mittels der monoklonalen Antikörper mAb 26/1, mAb 8/4, mAb 10/6 und mAb 3 eine Unterscheidung zwischen *L. pneumophila* Serogruppe 1, Subtyp OLDA, Oxford, Bellingham, Heysham und Camperdown möglich. Man kann sagen, dass das Panel sozusagen eine Mustererkennung verfolgt, die eine eindeutige Zuordnung einer Probe zu einer Subgruppe bzw. Serogruppe von *L. pneumophila* ermöglicht. In nachfolgender Tabelle 1 wird die Reaktivität der Antikörper des Dresden-Panels für *L. pneumophila* SG 1-Stämme gezeigt:

Tabelle1: Reaktivität der monoklonalen Antikörper (mAbs) des Dresden-Panels (gemäß Lück et al., 2013).

<i>L. pneumophila</i> SG 1 Stamm	mAb 81/2	mAb 3/1	mAb 3	mAb 10/6	mAb 8/4	mAb 20/1	mAb 26/1
Philadelphia	1	1	0	0	1	0	0
Allentown	1	1	0	0	1	0	0
Benidorm	1	1	0	0	1	1	0
Knoxville	1	1	1	0	1/0 ^a	0	0
France	1	1	0	0	0	0	0
OLDA	1	0	0	0	1	1	1
Oxford	1	0	0	0	1	0	1
Heysham	1	0	1	0	0	0	0
Camperdown	1	0	0	0	0	0	0
Bellingham	1	0	0	1	0	1	1

a) variable Ergebnisse mit verschiedenen Stämmen

Aktuell gibt es nach wie vor keine Antikörper zur Detektion aller Legionellen, die routinemäßig eingesetzt und zur Verfügung gestellt werden. Oft arbeiten die verschiedenen Forschungsanstalten mit ihrem eigenen Panel bzw. beziehen ihre Antikörper kommerziell und etablieren diese dann in ihrem eigenen Routine-Analytik-Prozess.

In der Medizin bezieht sich die Sensitivität und Spezifität einer Untersuchungsmethode immer auf eine vorausgegangene Diagnose oder einen Befund. Wenn man fiktiv von 1.000 Personen ausgeht, von denen 100 Menschen erkrankt sind, kann ein sensitiver Test mindestens 95 % der erkrankten Personen erkennen. Diese Eigenschaft definiert die Sensitivität eines Tests. Wenn der gleiche Test dann noch in der Lage ist, von den 900 nicht-erkrankten Personen mindestens 95 % als negativ zu bestimmen, weist er zusätzlich eine hohe Selektivität auf.

In der Chemie hingegen, wird die Sensitivität als Steigung einer Messkurve bzw. Kalibriergerade definiert. Die Selektivität ist eine Eigenschaft, die es ermöglicht, aus einer Menge von Objekten mehrere Objekte zweifelsfrei zu bestimmen. Die Spezifität wählt hingegen aus den verschiedenen Objekten ein ganz bestimmtes Objekt zielgerichtet aus. Man kann also sagen, dass eine angewandte analytische Methode selektiv ist, wenn verschiedene Analyten in einer Mischung (z.B. verschiedene Antigene in einer Realprobe) nebeneinander und eindeutig ohne Störungen bestimmt werden können. Die verwendete Methode kann zusätzlich als spezifisch bezeichnet werden, wenn ein gewünschter Analyt aus der Mischung eindeutig nachgewiesen werden kann.

2.3.3.3. *Limulus Amöbozyten-Lysat-Test*

Der Pfeilschwanzkrebs (lat. *Limulus polyphemus*) ist an der südamerikanischen Atlantikküste beheimatet und wurden 1819 das erste Mal wissenschaftlich erwähnt. Eine Infektion des Pfeilschwanzkrebses mit gramnegativen Bakterien führt zu einer Blutgerinnung. Später konnte gezeigt werden, dass diese Koagulation durch eine Reaktion des bakteriellen Endotoxins mit einem Gel bildenden Protein in den Blutzellen (Amöbozyten) des Tieres hervorgerufen wird. Das wässrige Extrakt aus den Blutzellen (Limulus Amöbozyten-Lysat) wird für den LAL-Test eingesetzt. Bei Vorhandensein von Endotoxinen wird LAL trüb und kann ein festes Gel bilden. Das Testprinzip beruht auf Trübungsmessung (Turbidimetrie). Je höher die Endotoxin-

Konzentration in der untersuchten Probe ist, desto schneller entwickelt sich eine Trübung. Die entstehende Trübung wird dann zur Quantifizierung des enthaltenen Endotoxins verwendet. Bei der kinetisch-turbidimetrischen LAL-Methode wird entweder die Steigerungsrate der Trübung oder die Zeitspanne (Anfangszeit = *onset time*) bestimmt, die notwendig ist, um eine bestimmte Trübungsstufe zu erreichen. Eine höhere Endotoxin-Konzentration ergibt eine kürzere *onset time*. Der *Log-onset-time* wird graphisch gegen die Log-Konzentration des eingesetzten Standard-Endotoxins aufgetragen. Anhand solch einer Kalibriergeraden lässt sich dann die Endotoxin-Konzentration in der untersuchten Probe berechnen. Die turbidimetrische LAL-Methode ist schnell, spezifisch, leicht ausführbar und höchst empfindlich. Die Nachweisgrenze hängt von der verwendeten Methode, der Kontaminationsfreiheit der eingesetzten Komponenten und den verwendeten Instrumenten ab und liegt in einem Bereich von 0,001 bis 0,005 (engl. endotoxin units) (EU/mL) [gemäß: Website Charles River].

Der LAL-Test findet Anwendung in der Pharmazie, Medizin und bei der Herstellung von Medizinprodukten. Er wird von der FDA (engl. Food and Drug Administration) unter anderen für die Quantifizierung von Endotoxinen in Rohstoffen, die für die Produktion von Medikamenten eingesetzt werden, empfohlen. Der LAL-Test stellt die empfindlichste und spezifischste Methode für die Detektion und Quantifizierung von Endotoxinen dar.

Die spezifischen LPS-Strukturen an der äußeren Zellmembran der Legionellen-Zelle sind Endotoxine, wenn sie in gelöster Form vorliegen. Aus diesem Grund wurde der LAL-Test in dieser Arbeit eingesetzt, um die Konzentration der freigesetzten LPS-Antigene, in Abhängigkeit der verwendeten *L. pneumophila*-Stämme, bestimmen zu können. Damit lassen sich unterschiedliche Testsysteme wie BINAX®E.I.A. oder CL-SMIA miteinander vergleichen.

2.3.4. Molekularbiologische Methoden

Bei den molekularbiologischen bzw. genetischen oder Nukleinsäure-basierten Methoden werden die zu untersuchenden Organismen anhand ihrer spezifischen Nukleinsäuresequenz des Erbmaterials identifiziert und/oder quantifiziert.

2.3.4.1. Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction, PCR) handelt es sich um ein Verfahren, um einzelsträngige DNA zu vervielfältigen und anschließend zu identifizieren. Einsträngige, synthetisch hergestellte DNA-Endstücke, auch Primer genannt, liegen während einer PCR im Überschuss vor und lagern sich an einem komplementären DNA-Einzelstrang an. Durch die verwendeten Primer wird der Startpunkt der Vervielfältigung, der sogenannten Amplifikation, bestimmt. Die Synthese des komplementären DNA-Stranges wird durch ein Enzym katalysiert. Die thermostabile DNA-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und wird häufig auch Taq-Polymerase genannt. Für die Durchführung einer PCR ist meist schon eine sehr geringe Menge an Ausgangssubstanz ausreichend. Die Polymerase-Kettenreaktion läuft grundsätzlich in mehreren Schritten ab:

Zuerst erfolgt eine Aufschmelzung der DNA-Doppelhelix bei 95 °C, die sogenannte Denaturierung. Anschließend lagern sich die Primer an die DNA-Einzelstränge an. Dieser Hybridisierungsschritt findet immer bei dem Temperaturoptimum des verwendeten Primers statt. Meist sind dann Temperaturen zwischen 55 °C und 65 °C vorherrschend. Das Temperaturoptimum wird von der Sequenz und der Länge des verwendeten Primers bestimmt. Das gewählte Temperaturoptimum verhindert unspezifische Anlagerung an der Zielsequenz. Im nachfolgenden Replikationsschritt (Elongation) wird der DNA-Einzelstrang bei ca. 72 °C repliziert. Der vorliegend DNA-Einzelstrang wird dann am 3'-Ende des Primers beginnend mit komplementären Basen aufgefüllt. Nach ca. 50 Zyklen ist die DNA-Vervielfältigung abgeschlossen.

Mittlerweile gibt es bei der PCR verschiedene Durchführungsvarianten, die sich entweder durch alternative Detektionsmethoden oder Nachweisstrategien unterscheiden. Besonders häufige Anwendung findet unter anderem die quantitative PCR (qPCR). Bei der qPCR lässt sich die Amplifikation der DNA direkt verfolgen, weil aufgrund einer Fluoreszenz-Markierung, z.B. mit SYBR®Green, die Beobachtung der gesamten Reaktion in Echtzeit möglich ist. Der Farbstoff interkaliert in die doppelsträngige DNA des Gens des Zielorganismus. Bei jedem Zyklus der Replikation entsteht mehr doppelsträngige DNA, sodass mehr Farbstoff eingebaut und damit das Fluoreszenzsignal gesteigert wird. In dieser Form kann die erfolgte Amplifikation je Zyklus

über die entstehende Fluoreszenz mitverfolgt werden. Durch die Verwendung von Kalibrierstandards werden Kalibrierkurven erzeugt, welche einen quantitativen Nachweis von Bakterien ermöglichen. Je nach verwendetem Kalibrierstandard wird die Konzentration in der Einheit genomische Einheiten, Kolonien oder Kopienzahl angegeben. Diese Einheiten korrelieren nicht miteinander. Es konnten Nachweisgrenzen zwischen 6,85 Kopien pro Well und 7,5 koloniebildenden Einheiten pro Milliliter [Yanez et al., 2005; Yang et al., 2010] erreicht werden. Die Detektion und Quantifizierung per qPCR wird dann über qPCR-Analyseplattformen, wie z.B. dem Lightcycler (Roche), durchgeführt.

Eine andere Detektionsmöglichkeit basiert auf dem Einsatz von FRET-Sonden (engl. fluorescence resonance energy transfer), die aus zwei verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen bestehen. Der erste Farbstoff wird angeregt und daher als Donor eingesetzt. Es erfolgt ein strahlungsloser Energietransfer auf einen zweiten Farbstoff, den Akzeptor. Der Transfer findet statt, wenn sich beide Moleküle sehr nahe (Abstand im Nanometerbereich) beieinander befinden. Der Akzeptor-Fluoreszenzfarbstoff emittiert nun Photonen bei einer höheren Wellenlänge. Am häufigsten wird hierfür das Donor/Akzeptor-Paar Fluorescein und Rhodamin eingesetzt [Didenko et al., 2001].

Legionellen können über das *dotA*- und *mip*-Gen sowie die 16S rRNA und 23S rRNA nachgewiesen werden [Yanez et al., 2005; Bauer et al., 2008; Huang et al. 2011; Haroon et al., 2012; Wellinghausen et al., 2001]. Das *dotA* (defective organelle trafficking)-Gen wird als Verursacher der Virulenz von *Legionella spp.* vermutet, wohingegen das *mip* (macrophage infectivity potentiator)-Gen als Grund für die erhöhte Infektiösität von *L. pneumophila* angesehen wird. Sowohl das *mip*-Gen, welches spezifisch für *L. pneumophila* ist, als auch das *dotA*-Gen tragen beide einen Anteil an dem Mechanismus, der die Einzeller-Invasion und die intrazelluläre Vermehrung verursacht [Bumbaugh et al., 2002]. Das *mip*-Gen ist in fast allen *Legionella spp.* zu finden, hat jedoch einige Sequenzunterschiede zu dem in *L. pneumophila* codierten Gen [Wilson et al., 2003]. Daher wird es für eine spezifische Detektion von *L. pneumophila* eingesetzt. Dieses Gen codiert für ein 24 kDa großes Protein, welches als essentieller Virulenzfaktor agiert. Es erleichtert den Legionellen das Eindringen und Verschanzen in Amöben sowie das Einnisten in die Makrophagen der Lunge.

Für die Detektion von Legionellen in Trinkwasser- und Bioaerosolproben findet man sowohl für die PCR als auch für deren Varianten (z.B. qPCR) sehr viele Versuchsbeschreibungen. Die Quantifizierung erfolgt meist mittels Kalibrierlösungen, die bei jedem Experiment mitlaufen. Ebenso ist die Verwendung eines internen Standards möglich [Welsh et al., 1990; Williams et al., 1990].

Um diese Methoden zu vereinfachen, wurde in Frankreich erstmals eine Norm erarbeitet, die für den molekularbiologischen Nachweis von *Legionella spp.* und *L. pneumophila* im Wasser verwendet werden kann [AFNOR, 2006]. Ebenso kann sie als Grundlage für die Entwicklung von PCR-basierten Testsystemen zum Nachweis von Legionellen dienen. Die Anforderungen an kommerziell erhältliche PCR-Kits wurden mit der AFNOR NF T90-471 in puncto Durchführung, Zusammensetzung und Bewertung normiert.

Einige kommerziell erhältliche molekularbiologische Nachweissysteme für *L. pneumophila* und *Legionella spp.* sind nach der AFNOR NF T90-471 validiert worden. Diese vereinen einen Filtrations- und Extraktionsprozess sowie eine nachgeschaltete Nachweismethode, sodass eine Detektion im Trinkwasser möglich ist. Anbieter von diesen Verbundverfahren sind z.B. Pall oder BioRad. Bei BioRad ist das DNA-Extraktionskit unabhängig vom Detektionsequipment erhältlich, wogegen das System bei Pall® als Gesamt-Set angeboten wird [Dussere et al., 2007]. Die Gewinnung des Analyten funktioniert bei beiden Systemen gleich und basiert auf einer Filtration der genommenen Wasserprobe durch einen Membranfilter angeschlossen an eine Vakuumpumpe. Die anschließende DNA-Extraktion des Analyten kann mit standardmäßigen DNA-Extraktionskits erfolgen (z.B. Aquadien® DNA extraction kit von BioRad®). Hierbei wird die DNA des Analyten auf dem Filter mittels eines Lysepuffers freigelegt und befindet sich dann frei im Puffer. Anschließend wird die DNA denaturiert und mit der vorliegenden einsträngigen DNA kann die PCR durchgeführt werden. Mit dem BioRad® Testsystem iQ-Check® und der Kombination aus Filtration und Detektion über die GeneDisc® von Pall® können Wasserproben gemäß AFNOR untersucht werden.

In einem europäischen Ringversuch in 6 Ländern wurden verschiedene Realproben auf *Legionella spp.* untersucht und je nach untersuchter Wasserprobe wurden Nachweisgrenzen von 190 genomischen Einheiten pro Liter (für Wasser aus Kühltürmen) bis zu 750 genomischen Einheiten pro Liter für Trinkwasser aus Warm- und Kaltwasseranschlüssen bestimmt [Lee et al.,

2011]. Die Grenzen einer PCR liegen unter anderem auch in der fehlenden Möglichkeit, lebende von bereits toten Bakterien in einer untersuchten Probe zu unterscheiden. Auch wenn von einer toten Legionelle keine Infektionsgefahr mehr für den Menschen ausgeht, wird ihre DNA dennoch mit amplifiziert. Dieses Amplifizieren von „toter DNA“ liefert in einer PCR falsch-positive Ergebnisse und kann zu einer Überschätzung der Anzahl führen. Eine Möglichkeit zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen ist hierbei die Behandlung der Probe vor der DNA-Extraktion mit einem der DNA-interagierenden Farbstoffe, an die eine Azidgruppe gekoppelt wurde, um photochemisch die Amplifikation der Ziel-DNA zu inhibieren [Qin et al., 2011]. Die bekanntesten Moleküle sind Propidium-Monoazid (PMA) bzw. Ethidiumbromid-Monoazid (EMA). Die Probe wird mit einer der Reagenzien inkubiert und mehrere Minuten mit blauem Licht bestrahlt. Das Reagenz kann die intakte Zellmembran der lebenden Zellen nicht durchdringen. Somit werden bei der nachfolgenden PCR nur lebende Zellen detektiert. Wenn vorab eine Gesamtquantifizierung durchgeführt wurde, lassen sich sowohl Aussagen über die Gesamtanzahl an Bakterien sowie die noch intakten, lebenden treffen. Somit sind auch erste Aussagen über Infektiösität und VBNC-Status möglich. In der nachfolgenden Tabelle 2 sind alle hier verglichenen PCR-Methoden für *Legionella spp.* und *L. pneumophila* mit den verwendeten Abschnitten und Nachweisgrenzen/Wiederfindungen aufgeführt.

Tabelle 2: PCR für *Legionella spp.* und *L. pneumophila* im Überblick

Detektierte Spezies	Abschnitt	Nachweisgrenze	Literaturzitat
<i>Legionella spp.</i> <i>L. pneumophila</i>	16S rRNA <i>mip</i> -Gen	23 KBE/ 100 mL	Wellinghausen et al., 2001
<i>L. pneumophila</i>	<i>dotA</i> -Gen <i>mip</i> -Gen	-	Bumbaugh et al., 2002
<i>L. pneumophila</i> <i>Legionella spp.</i>	<i>mip</i> -Gen 5S rRNA/ 16S rRNA	10 KBE pro Well	Wilson et. al., 2003
<i>L. pneumophila</i>	<i>dotA</i> -Gen	6,85 Kopien pro Well	Yanez et. al., 2005
<i>Legionella spp.</i> <i>L. pneumophila</i>	23S-5S rRNA <i>mip</i> -Gen	7,5 KBE/ mL	Yang et al., 2010
<i>Legionella spp.</i>	16S rRNA	-	Huang et al., 2011
<i>Legionella spp.</i>	<i>mip</i> -Gen	-	Haroon et al., 2012

2.3.4.2. *Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung*

Für die Identifizierung und Visualisierung von verschiedenen Mikroorganismen wird die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) verwendet. Durch sie können verschiedene Analyten parallel untersucht werden. Das Detektionsprinzip beruht auf der Verwendung von Nukleotid-Sonden, die mit verschiedenen Fluoreszenz-Farbstoffen markiert sind. Die markierte Sonde diffundiert in die Bakterienzellen, in denen anschließend die Hybridisierungsreaktion stattfindet. Nach erfolgter Hybridisierung der Sonden an die Ziel-DNA des Analyten in der intakten Bakterienzelle kann eine Visualisierung mit Fluoreszenz- oder Laserscannern erfolgen [Brecevic et al., 2006].

Das Standard-FISH-Protokoll besteht aus 2 verschiedenen Schritten, der Fixierung und Permeabilisierung des Analyten. Somit wird gewährleistet, dass die Hybridisierung stattfinden kann, die mit synthetischen Oligonukleotiden (15 – 30 Basenpaare lang) durchgeführt wird. Die Oligonukleotide sind mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert und komplementär gegen die 16S rRNA der Bakterienprobe gerichtet. Häufig werden z.B. DAPI, SYBR®Green oder Fluorescein als Fluoreszenzfarbstoffe eingesetzt. Nachfolgend werden verschiedene Waschschrte durchgeführt, um ungebundenes Probenmaterial zu entfernen. Die Detektion des markierten Analyten kann anschließend mittels Durchflusszytometrie oder Mikroskopie erfolgen [Gehring et al., 2006; Ristagno et al., 1985; Fuchslin et al., 2010].

Die rRNA als Zielsubstanz im Bakterium weist einige Vorteile auf. Sie ist in jeder Legionellenzelle in hoher Anzahl vorhanden (10^3 bis 10^5 Mal pro Zelle). Dadurch sind langwierige und schwierige Amplifikationen wie z.B. für eine PCR nicht nötig. Weiterhin besitzt rRNA natürlicherweise auch Einzelstrangabschnitte, sodass die Analyse direkt im Mikroorganismus erfolgen kann. Hinzu kommt, dass eine vorherige Kultivierung der Zielzellen auf Selektivnährmedium unnötig ist, da auch nicht kultivierbare Organismen erfasst werden (VNBC) [Levsky et al., 2003]. Zusätzlich zeigen nur lebende Zellen ein Signal, da die ribosomale RNA in toten Zellen sehr schnell abgebaut wird. Die Detektion des Analyten erfolgt mittels Epifluoreszenzmikroskop. Die eindeutige Auswertung ist deswegen möglich, weil die eingesetzten Sonden fluoreszenzmarkiert werden. Nicht-Legionella-Stämme werden bei der Detektion nicht miterfasst, weil sie nicht mit der Zielsonde hybridisieren [Motter et al., 2000].

Die Identifikation von *Legionella* spp. in Biofilmen und Wasser lässt sich sehr gut mittels FISH durchführen. Eine Quantifizierung ist damit ebenso möglich [Manz et al., 1995]. Es werden Fluoreszenz-markierte, gegen die 16S rRNA gerichtete Oligonukleotide verwendet. Diese hybridisieren an Ribosomen ganzer Zellen nach der Fixierung auf einem Filter mit para-Formaldehyd [Whiley et al., 2011; Buchbinder et al., 2002]. In einer Studie [Bauer et al., 2008] wurde das Infektionsrisiko für Pontiac-Fieber untersucht und dafür FISH mit Kultur verglichen. Zur Detektion von *L. pneumophila* werden in der Routine-Diagnostik auch oft kommerziell erhältliche FISH-Assays (z.B. von Vermicon [Website Vermicon, 2016]) verwendet. Ein Ergebnis kann hier bereits innerhalb von drei Stunden vorliegen. Um die in der untersuchten Probe enthaltenen *L. pneumophila* mit Hilfe der Sonde nachzuweisen, wird die fluoreszierende Gensonde in die Proben-Lösung gegeben. Sofern sie auf Ziel-RNA trifft, dockt sie an. Anhand der Einfärbung ist dann unter dem Mikroskop erkennbar, ob Legionellen enthalten sind oder nicht (siehe Abbildung 21).

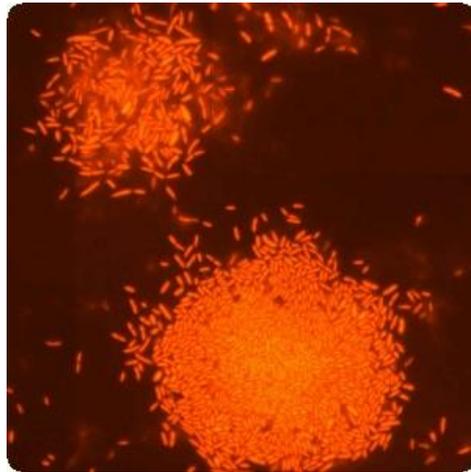


Abbildung 21: FISH-markierte Legionellen unter dem Mikroskop [Website biovisible, 2016].

Als Standardanalytik-Methode ist der FISH-Assay jedoch noch nicht empfehlenswert, da noch keine Unterscheidung aller verschiedenen Serogruppen möglich ist.

Ein CARD-FISH-Protokoll (CARD – engl. catalyzed reporter deposition) wurde für die Quantifizierung von *L. pneumophila* etabliert [Kirschner et al., 2012]. Die Probensequenz der Zielsubstanz wurde wie folgt definiert: LEGPNE1 5'-ATC TGA CCG TCC CAG GTT-3'. An das 5'-Ende der Probensequenz wurde Meerrettichperoxidase gekoppelt. Durch die Kopplung an ein

Enzym anstatt an einen Fluoreszenzfarbstoff wurde ein bis zu 1000-fach verstärktes Signal des Fluoreszenzsubstrates DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol) erhalten. Weiterhin konnte eine reduzierte Temperatur und höhere Stringenz erreicht werden. In dieser Studie konnte unter anderem gezeigt werden, dass sich der Großteil aller im Wasser von Kühltürmen detektierten *L. pneumophila* in einem nicht-kultivierbaren (VBNC) Zustand befunden haben. Es wurde eine theoretische Nachweisgrenze von $1,7 \times 10^3$ Zellen pro $346,5 \text{ mm}^2$ (Filteroberfläche) ermittelt.

2.3.5. Vergleichstabelle aller Methoden

Um einen allgemeinen Überblick zu erhalten, welche Nachweismethoden für *Legionella spp.* und *L. pneumophila* es gibt und welche Performance sie liefern, werden alle wichtigen Kenngrößen in nachfolgender Tabelle gegenüber gestellt:

Tabelle 3: Vergleich der verschiedenen Analyseverfahren für *L. pneumophila* oder *Legionella spp.*

Nachweismethode	Analysedauer	Nachweisgrenze	Detektierter Organismus	Literatur
GVPC- Selektivnährmedium	7-10 d	1 KBE/mL	<i>Legionella spp.</i>	[Buse et al., 2012; Umweltbundesamt; DIN EN ISO 11731:2015-12]
Latex- Agglutinationstest	10 min	keine Quantifizierung	<i>L. pneumophila</i> SG 1	[Holliday et al., 1990; Loni et al., 2005]
Teststreifen IA Duopath-Test	10 min	keine Quantifizierung	<i>Legionella spp.</i> und <i>L. pneumophila</i>	[Helbig et al. 2006]
ELISA	~ 4 h	je nach pAb/mAb zwischen 10^3 und 10^4 KBE/mL	Je nach Fänger- Antikörper <i>Legionella spp.</i> und <i>L. pneumophila</i>	[Darwish et al., 2006; Para et al., 1983; Watkins et al., 1985; Joly et al., 1986; Helbig et al., 1997, 2002, 2012]
Teststreifen IA BinaxNOW®	~ 10 min	keine Quantifizierung	<i>L. pneumophila</i> SG 1	[Benson et al., 2000; Edelstein et al.; 1993]
ELISA BINAX® E.I.A.	~ 3 h	keine Quantifizierung	<i>L. pneumophila</i> SG 1	[Website mikrogen.de, 2016]
qPCR	3-8 h	7,5 KBE/ mL	<i>Legionella spp.</i> und <i>L. pneumophila</i>	[Yang et al., 2010]
FISH	~ 1 d	5×10^3 KBE/mL	<i>Legionella spp.</i>	[Bauer et al., 2008]
CARD-FISH	~ 1 d	$3,5 \times 10^2$ KBE/mL	<i>L. pneumophila</i> (Sonde: LEGPNE1 5'-ATC TGA CCG TCC CAG GTT-3')	[Kirschner et al., 2012]
Durchflusszytometrie (in Kombination mit IMS)	~ 1 h	$10^4 - 10^5$ KBE/mL	<i>Legionella spp.</i> (SYBR Green + pAb IgG rabbit) (FITC + pAb IgG rabbit) (SYTO9/PI)	[Tyndall et al., 1986; Ingram et al., 1982; Füchslin et al., 2010; Giao et al., 2008]
Mikroskopie (vorher Kultur)	~ 1 h	1 KBE/mL	<i>Legionella spp.</i>	[DIN EN ISO 11731- 2:2008]
MALDI-TOF (vorher Kultur)	~ 10 min	nur Typisierung	<i>Legionella spp.</i>	[Gaia et al., 2011]

2.4. Mikroarray-Technologie

2.4.1. Begriffserklärung

Mit dem Begriff „Mikroarray“ werden Untersuchungssysteme aus dem Bereich der Molekularbiologie bezeichnet (engl.: micro = klein, array = Anordnung). Sie ermöglichen eine parallele Analyse von vielen Einzelnachweisen. Dafür wird eine sehr kleine Menge an biologischem Ausgangsmaterial (z.B. Wasser, Gewebe, Bakterienlösung, usw.) benötigt.

2.4.2. Analytische Mikroarrays

Analytische Mikroarrays werden eingesetzt, um die Nachteile von konventionellen Analysemethoden zu beseitigen. So können die aufwendige Aufarbeitung der Probe, eine eindimensionale Fokussierung auf einen Analyten, sowie zu kostenintensive Techniken vermieden werden. Durch die parallele Untersuchung von mehreren Analyten finden Mikroarrays besonders in der Lebensmittel- und Trinkwasseranalytik Anwendung [Rodriguez-Mozaz et al., 2006]. Auch in der klinischen Diagnostik kann eine Multiplex-Anwendung eine große Erleichterung im Arbeitsaufwand bewirken. Konventionelle Untersuchungsmethoden können durch analytische Mikroarrays ergänzt oder bestenfalls ersetzt werden. Besonders bei hohem Probendurchsatz und/oder einer aufwendigen Probenaufarbeitung kann mit einem Mikroarray eine Kostenreduktion und deutliche Zeitersparnis erreicht werden. Eine Mikroarray-Plattform bietet eine Vielzahl an Verwendungsmöglichkeiten und ist aufgrund ihrer zuverlässigen und robusten Ergebnisse in der Welt der Analytik sehr geschätzt. Da ein Mikroarray mit Standard-Detektionsmethoden kombiniert werden kann, findet er immer mehr Anwendung.

Ein analytischer Mikroarray hat eine Grundfunktion, die Quantifizierung von mehreren Analyten aus einer Probe [Seidel und Niessner, 2008]. Für eine quantitative Aussage müssen für jeden Analyten Kalibrierungen mit definierten Analyt-Standards durchgeführt werden. Um vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, ist ein analytischer Mikroarray immer nach dem gleichen Grundprinzip aufgebaut: Zuerst werden die Fängermoleküle auf eine homogene Matrix aufgebracht. Die Immobilisierung der Fänger-Antikörper kann z.B. durch Mikrokontaktdruck

geschehen. Danach erfolgt die Detektion des Mikroarray mit anschließender Datenauswertung (siehe Abbildung 22).

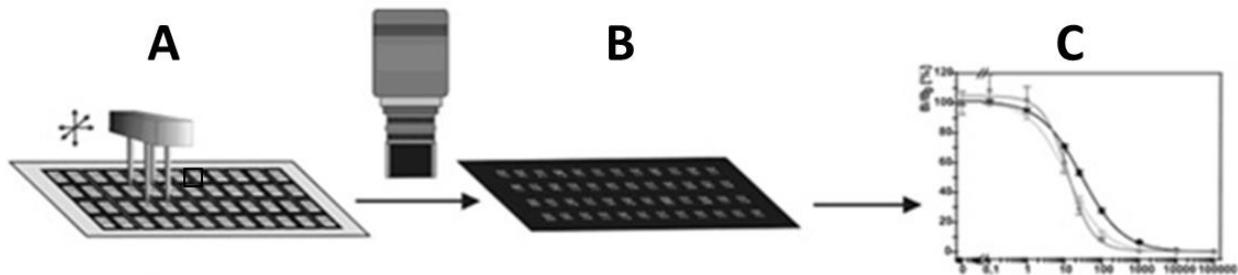


Abbildung 22: Schematisches Prinzip eines analytischen Mikroarrays: (A) Chip-Herstellung mittels Kontakt-Printer, (B) Auslesen des Chips über eine CCD-Kamera, (C) Erstellen einer Kalibrierung mittels einer Auswertesoftware [gemäß Seidel und Niessner, 2008].

Die nachfolgende Auswertung des analytischen Mikroarrays kann sehr vielseitig erfolgen. Standardmäßig werden Fluoreszenz, Chemilumineszenz, elektrochemische Markierungen oder auch markierungsfreie Detektionsformen eingesetzt.

Wenn beispielsweise Bakterien über einen DNA-Mikroarray detektiert und quantifiziert werden sollen, ist meist eine DNA-Sonde als Gegenstück zu einem PCR-Fragment eines hochkonservierenden Gens auf dem Mikroarraychip immobilisiert. Damit wird eine eindeutige und hochspezifische Zuordnung zu dem entsprechenden Bakterienstamm ermöglicht. Bei der Hybridisierung werden markierte, einzelsträngige DNA-Fragmente auf dem Glasträger immobilisiert. Nach einem Waschschrift, der nicht gebundene Sequenzen entfernt, kann das Signal mittels eines Imaging-Verfahrens ausgelesen werden. Dieses Auslesen kann mithilfe eines Lasers, mit Chemilumineszenz oder Elektrodenarrays erfolgen. Das erhaltene Signal wird anschließend normiert und ausgewertet.

Bei einem Protein-Mikroarray werden im Gegensatz zur DNA-Variante auf jedem Spot kleinste Mengen an proteinhaltigem Probenmaterial fixiert [Malone et al., 2011]. Zur Immobilisierung des zu untersuchenden Probenmaterials ist ein spezielles Gerät notwendig. Weil der Protein-Chip nur eine kleine Testfläche und geringe Abstände zwischen den Probenspots aufweist, ist höchste Präzision beim Spotting-Vorgang erforderlich. Das kann am besten durch den Einsatz von Spotting-Robotern bzw. Mikrodosier-Maschinen gewährleistet werden. Das Immobilisieren

des Probenmaterials auf dem Glasträger kann mittels zwei möglicher Verfahren erfolgen, kontaktlos [Barbulovic-Nad et al., 2006] oder durch Kontaktdrucken. Am Institut wird eine Immobilisierung von Antikörpern mit einem Kontaktdrucker durchgeführt. Je nach gewählter Detektionsmethode ist dann eine Unterscheidung zwischen den Spots mit und ohne Antigen-Protein-Wechselwirkung möglich. Die dabei detektierte Signalintensität ist von der Selektivität und Sensitivität der Antikörper abhängig.

Wenn der kontaktlose Spotting-Prozess angewandt wird, gelangt die Moleküllösung nicht durch direkten Kontakt auf die aktivierte Oberfläche, sondern durch die Erzeugung von einzelnen Tröpfchen. Diese fallen auf eine vorher definierte Position auf dem Mikroarraychip herunter. Eine Erzeugung dieser Tröpfchen kann durch thermische-, Magnet- oder piezoelektrische Pumpen erfolgen. Vorteilhaft ist die wesentlich kürzere Dauer des Spotting-Prozesses, trotz wesentlich höheren technischen Aufwands. Weiterhin ist eine Verstopfung der Spotter-Düsen möglich, da oft mit salz- oder proteinhaltigen Spotting-Lösungen gearbeitet wird.

2.4.2.1. *Statische analytische Mikroarrays*

Bei statischen analytischen Mikroarrays findet die Reaktion auf der Oberfläche statt. Alle benötigten Reagenzien werden auf den Mikroarray dosiert und nach einer bestimmten Inkubationszeit wieder heruntergewaschen. Da keine Fluidik vorhanden ist, muss mit Zugabe der Lösungen sichergestellt werden, dass alle Reagenzien dort sind, wo die zu detektierende Reaktion des Analyten stattfinden soll. Die Verwendung von statischen Mikroarrays ist für Routineanwendungen nicht praktikabel, weil sowohl die Inkubation als auch die nachfolgenden Waschschriffe alle manuell durchgeführt werden müssen. Um robuste, vertrauenswürdige und vor allem vergleichbare Ergebnisse zu erhalten, müssten diese Vorgänge immer gleich durchgeführt werden. Statisch inkubierte Assays in Mikrotiterplatten oder kleinen Reaktionsgefäßen wären als alternative Lösung denkbar.

2.4.2.2. Flussbasierte analytische Mikroarrays

Für die Detektion von *L. pneumophila* wurde im Rahmen dieser Arbeit ein flussbasierter analytischer Mikroarray verwendet. Zur Detektion wurde hierbei auf die Auswertung eines Chemilumineszenzsignals über eine CCD-Kamera zurückgegriffen.

Die Technik des flussbasierten Mikroarrays mit einer Detektion über Chemilumineszenz-Imaging wurde erstmals am Lehrstuhl für Analytische Chemie der TU München publiziert [Weller et al., 1999]. Der Mikroarray besteht aus einem oberflächenchemisch behandelten Glasträger, der Mikrokanäle enthält und auf dem verschiedene Antikörper immobilisiert sind. Der Durchfluss über den Mikroarraychip wird durch eine Mikrofluidik, durch die alle benötigten Reagenzien und Probenlösungen geleitet werden, gewährleistet. Die Pumpen und Ventile des Gerätes können mit einer Software programmiert werden. Die Etablierung von eigenen Messprogrammen, abgestimmt für verschiedene Analyten auf Basis von verschiedenen Assay-Formaten, ist problemlos möglich. Das beschriebene Messgerät MCR 3 wurde im Laufe der Jahre am Institut immer weiter verbessert und für verschiedene Anwendungen etabliert [Seidel et al., 2014]. In der Baureihe, mit der in dieser Arbeit gearbeitet wurde, ergänzen eine Probenschleife und eine beheizbare Flusszelle das Geräteportfolio. Die Bezeichnung MCR 3 SLT steht für Munich Chip Readers der 3. Generation, 'SL' bedeutet dabei sample loop und 'T' Temperatur. Die Detektionseinheit besteht aus einer CCD-Kamera, die das emittierte Chemilumineszenzsignal aufzeichnet. Eine Ergebnisauswertung kann dann mittels der Software erfolgen, die auch für das Programmieren der Pumpen und Ventile der Analysenplattform eingesetzt wird. Basis für die Immobilisierung der Analyten ist eine immer gleichbleibende Oberflächenchemie, mit der eine einheitliche Produktion der verwendeten Glasträger gewährleistet werden konnte. Diese ist im folgenden Abschnitt in allen einzeln durchgeführten Schritten beschrieben.

2.4.3. Oberflächenchemie

Eine der wichtigsten Faktoren für die Herstellung von Mikroarray-Chips gleichbleibender Qualität ist die Oberflächenchemie. Nur durch eine fortwährend gleichbleibende Herstellungsmethodik ist eine reproduzierbare Analytik des Mikroarrays möglich. Die

Oberfläche des Glasträgers muss eine effiziente Immobilisierung der verschiedenen Analyten gewährleisten. Die unspezifische Adsorption von anderen Molekülen an der Chip-Oberfläche muss so gering wie möglich gehalten werden. Nur so wird ein besonders hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis ermöglicht.

Es können verschiedene Methoden und Trägermaterialien für eine Immobilisierung der Fänger-Moleküle verwendet werden. Geeignete Materialien für das nichtkovalente Binden von Fängermolekülen in Mikrotiterplatten sind unter anderem Polyvinylidenfluorid [Holt et al., 2000] oder Polystyrol [Feng et al., 2004]. Eine weitere Möglichkeit sind Blotting-Membranen aus Nitrocellulose [Zhu et al., 2003]. Ebenso möglich ist eine Immobilisierung, die auf indirekter, nichtkovalenter Bindung des Analyten an die hydrophobe Oberfläche eines Glasträgers basiert. Eine chemische Vorbehandlung der Analyten ist dann meist nicht notwendig, meistens kann jedoch eine konstante Reproduzierbarkeit des Immobilisierungsprozesses nicht gewährleistet werden. Zusätzlich sind auch hohe Hintergrundsignale möglich, was eventuell zu Schwierigkeiten bei der Signalauswertung führen kann.

Aus diesem Grund wird für die Immobilisierung von Analyten meistens die kovalente Bindung gewählt. Die Bindung ist sehr stabil und daher auch für viele Chargen von Mikroarray-Chips durchzuführen. Eine kovalente Immobilisierung ist jedoch nur möglich, wenn sowohl Chipoberfläche als auch der zu immobilisierende Analyt funktionelle Gruppen aufweisen, die miteinander binden können. Ist dies nicht der Fall, müssen die terminalen Gruppen entsprechend aktiviert bzw. modifiziert werden.

In dieser Arbeit wurde Glas als Chipoberfläche eingesetzt. Es ist kostengünstig, leicht kommerziell erhältlich sowie chemisch, thermisch und physikalisch äußerst stabil. Aufgrund all dieser Eigenschaften ist es sehr gut für die Modifikationen aufgrund von oberflächenchemischen Behandlungen geeignet [Holt et al., 2000]. Weiterhin kann eine Beeinflussung des Hintergrundsignals aufgrund der Transparenz so gut wie ausgeschlossen werden. Sehr oft werden die Glasoberflächen eines Mikroarrays chemisch aktiviert. Aktivierte Glasoberflächen weisen freie Hydroxylgruppen auf. Diese sind relativ leicht modifizierbar und daher sehr gut aktivierbar für eine Bindung mit funktionellen Gruppen. Silane mit funktionellen Gruppen wie Amin-, Aldehyd-, Epoxid- oder Thiolgruppen finden sehr oft Anwendung für eine

Modifizierung [Angenendt et al., 2005]. Wenn solche endständige funktionellen Gruppen kovalent an den Glasträger gebunden sind, sind Fängermoleküle wie Proteine oder Antikörper, sofern diese eine endständige Aminogruppe aufweisen, auf der Oberfläche leicht immobilisierbar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die am Institut etablierte, stufenweise oberflächenchemische Behandlung durchgeführt [Wolter et al., 2007]. Dabei wurde eine Modifikation angewandt. Anstatt einer Diamino-Polyethylenglykol (DAPEG)-Beschichtung auf dem silanisierten Glasträger zu erzeugen, wurde stattdessen ein Diamino-Polypropylenglykol-Polyethylenglykol-Copolymer (Jeffamine® ED-2003), zur Vereinfachung nachfolgend als DAPPG bezeichnet, als Schutzschicht verwendet (siehe Abbildung 23).

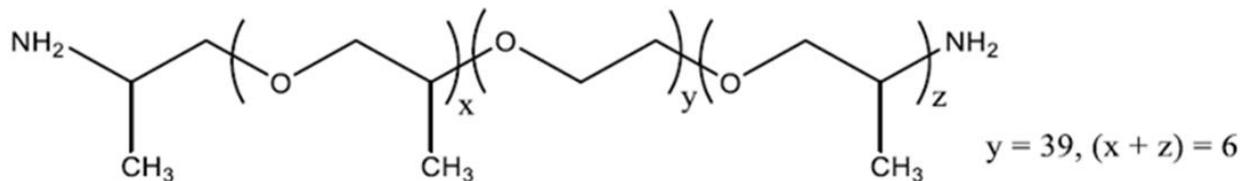
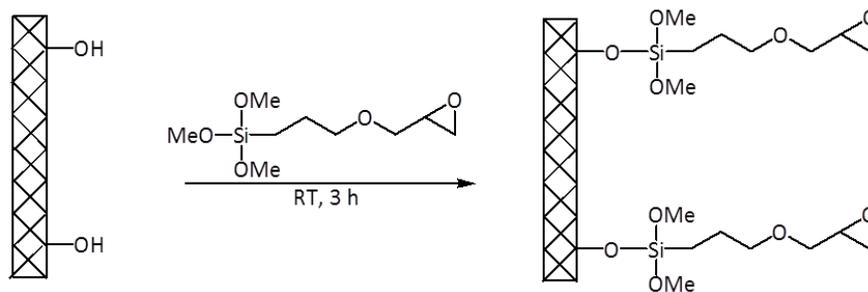


Abbildung 23: Strukturformel des verwendeten Jeffamine® ED-2003 zur Herstellung der DAPPG-Chipoberflächen.

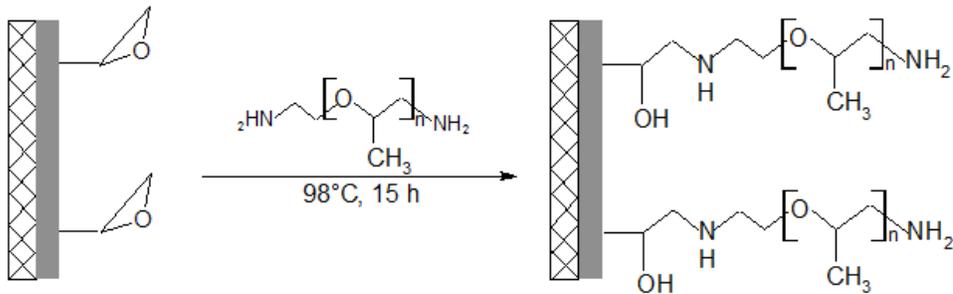
Anschließend erfolgte eine Aktivierung der Schutzschicht durch Beschichtung mit einem Kopplungsreagenz für Peptidbindungen, welche die kovalente Bindung der verschiedenen Fänger-Antikörper ermöglicht.

Für die Silanisierung der angeätzten Oberfläche des Glasträgers wird 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) verwendet (siehe Reaktionsgleichung 3).



Reaktionsgleichung 3: Silanisierung eines angeätzten Glasträgers mit GOPTS [gemäß Wolter et al., 2007].

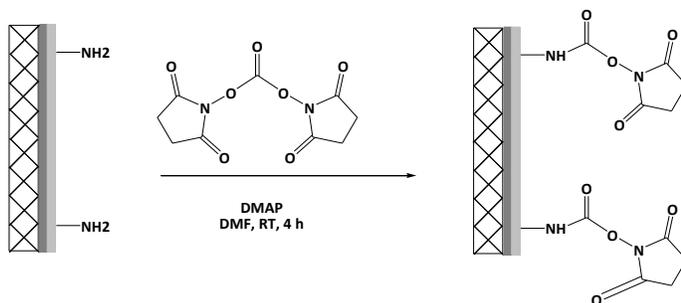
Nach einem weiteren Waschschrift mit ultrareinem Wasser werden die terminalen Epoxygruppen mit DAPPG (Diamino-Polypropylenglycol) zur Reaktion gebracht (Reaktionsgleichung 4). Dabei wird ein sekundäres Amin gebildet. Diese entstehende PPG-Schicht verhindert unter anderem die unspezifische Bindung von Proteinen.



Reaktionsgleichung 4: Beschichtung der vorher silanisierten Glsträger mit DAPPG (Jeffamine-ED 2003®).

Nach einem erneuten Waschschrift mit ultrareinem Wasser und Trocknung im Stickstoffstrom sind die beschichteten Glaschips im Exsikkator unter Vakuum für mehrere Wochen lagerfähig.

Beim durchgeführten Assay werden Antikörper mit Kontakt-Spotting-Verfahren auf der Oberfläche des Glsträgers immobilisiert. Dafür ist zunächst ein weiterer Schritt notwendig: Die Aktivierung der Oberfläche, die eine kovalente Bindung von Antikörpern an die Mikroarray-Oberfläche ermöglicht. Dafür wird Di-(N-succini-imidyl)-carbonat (DSC) verwendet. Dieses homobifunktionale Kopplungsreagenz bindet an Nukleophile, wie z.B. die Aminogruppen der DAPPG-Oberfläche. Da DSC über 2 reaktive Gruppen verfügt, kann es zunächst an das sekundäre Amin binden, welches sich terminal an der DAPPG-Oberfläche befindet (siehe Reaktionsgleichung 5). Anschließend ist eine Reaktion mit einer nukleophilen Seitengruppe oder dem N-Terminus des eingesetzten Fänger-Antikörpers möglich.



Reaktionsgleichung 5: Aktivierung des DAPPG-beschichteten Glsträgers mit DSC [gemäß Wolter et al., 2007].

2.4.4. Immobilisierung der Antikörper

Damit die immobilisierten Fänger-Antikörper und das Antigen miteinander reagieren können, müssen die Antikörper auf den oberflächenchemisch vorbehandelten und mittels NHS-Chemie aktivierten Glasträger aufgebracht werden. Dies wird mittels Immobilisierung der Antikörper nach einem vorher festgelegten Muster durchgeführt. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kontakt-Mikrodosierverfahren werden die Fängermoleküle aufgrund vorhandener Kapillarkräfte der Antikörper-Lösung auf die Glasträger-Mikroarray-Oberfläche übertragen. Das geschieht durch Eintauchen der entsprechend geformten Dosiernadel in die Antikörperlösung und das anschließende Absetzen der aufgenommenen Antikörperlösung auf der Chip-Oberfläche. Es kommt zu einem direkten Kontakt zwischen Spotter-Nadel und Chip-Oberfläche (Abbildung 24).

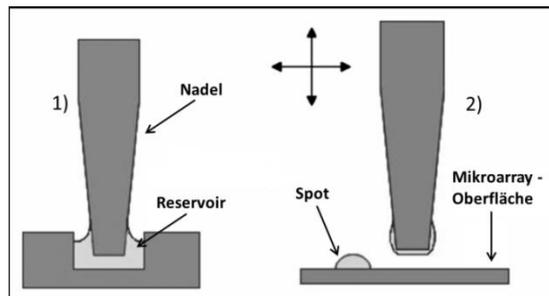


Abbildung 24: Prinzip des Kontakt-Druckverfahrens; (1) Aufnahme der Flüssigkeit mithilfe von Kapillarkräften, (2) ein Flüssigkeitstropfen wird an der vorher festgelegten Position (x;y) durch direkten Kontakt der Spotter-Nadel mit der aktivierten Mikroarray-Oberfläche abgesetzt [gemäß Barbulovic-Nad et al., 2006].

Dieses technische Verfahren wird als Mikrokontaktdrucken bezeichnet. Bei diesem Verfahren handelt es sich um ein sogenanntes Mikrodosierverfahren, welches von einem Computer mittels Software gesteuert wird. Die computergesteuerte Einheit entnimmt mit einer Spotting-Nadel ein sehr geringes Volumen der vorher bereitgestellten Antikörper-Lösung aus einem bereitgestellten Reservoir. In dieser Arbeit wurde eine 384-well ELISA-Platte mit sehr geringer Bindungskapazität und konisch zulaufendem Boden gewählt. Die aufgenommenen Lösungen werden dann auf das Trägermaterial übertragen.

Die konische Spitze der Spotter-Nadel wird in die, im Reservoir bereitgestellten Antikörper-Lösung, eingetaucht. Wenige Nanoliter der Lösung haften an der Nadel und können nur

entsprechend der vorher definierten Position (x: Längsposition, y: Querposition) abgesetzt werden. Es kommt nun zu einer Reaktion der vorher aktivierten Oberflächenmoleküle mit den Molekülen der Antikörper-Lösung. Eine Bindung wird ausgebildet. Diese funktionalisierten Bereiche werden Spots genannt und weisen je nach verwendeter Nadel und Durchmesser der Spitze einen Durchmesser von ca. 100 – 800 µm auf.

Der Immobilisierungsprozess wurde mit dem vollautomatischen Kontaktpotter *BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer* (BioRad Laboratories) durchgeführt. Es wurden die Luftfeuchtigkeit und das Spottingmuster mit den Abmessungen der Spots genau definiert. In der folgenden Abbildung 25 ist der Aufbau des verwendeten Kontaktpotters veranschaulicht:



Abbildung 25: Foto des verwendeten Kontaktpotters BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer (BioRad Laboratories).

2.4.5. Chemilumineszenz-Detektion

Bei den durchgeführten Sandwich-Mikroarray-Immunoassay-Messungen wurde die Qualifizierung und Quantifizierung der an der Chip-Oberfläche stattfindenden Antikörper-Antigen-Bindung mittels Chemilumineszenz-Detektion durchgeführt. Bei der Chemilumineszenz-Reaktion wird Licht emittiert. Dessen Detektion erfolgt auf Basis einer 2D-Auslesung mit einer hoch sensitiven CCD-Kamera.

2.4.6. MCR 3 – Aufbau und Messprinzip

Bei dem MCR 3 (Munich Chip Readers – 3. Generation) handelt es sich um eine Analyseplattform für flussbasierte Chemilumineszenz-Mikroarrays, auf der bioanalytische Testprinzipien

automatisch prozessiert werden können. Neben Hybridisierungsassays auf DNA-Mikroarrays sind es hauptsächlich Mikroarray-Immunoassays, die auf dem MCR 3 durchgeführt werden.

Bei einem flussbasierten Mikroarray sind sowohl der Mikroarray als auch die Flusszelle Bestandteile eines fluidischen Systems. Dies kann durch die automatische Zufuhr von allen benötigten Assay-Reagenzien realisiert werden. Bei einem Antikörper-Mikroarray sind alle Fänger-Antikörper auf der aktivierten Chip-Oberfläche immobilisiert. Der Analyt in der untersuchten Probe wird bei der Messung im Flusskanal des Mikroarray-Chips über die Oberfläche gepumpt. Mittels Optimierung der Flussrate der einzelnen Reagenzien kann der Massentransport positiv beeinflusst werden. Eine höchstmögliche Signalintensität ist dadurch erreichbar. Weiterhin ist aufgrund des hohen Automatisierungsgrades der Analysen-Plattform eine intuitive, leicht erlernbare Bedienung möglich. Die Detektion der emittierten Chemilumineszenz-Signale erfolgt mittels einer CCD-Kamera, deren Aufzeichnungen mit einer Auswertesoftware am implementierten PC angesehen, ausgewertet und weiter verarbeitet werden können.

2.4.6.1. Aufbau MCR 3

In Zusammenarbeit mit der Firma GWK Präzisionstechnik wurde am Institut eine kommerziell erhältliche Mikroarray-Analysenplattform entwickelt, welche auf flussbasierten Chemilumineszenz-Mikroarrays beruht. Bei diesem Gerät wird die Fließinjektion mit einer Chemilumineszenzreaktion verbunden. Unterschiedliche bioanalytische Testprinzipien können über Computer-gesteuerte Pumpen und Ventile automatisch prozessiert werden, sodass keine manuellen Schritte mehr notwendig sind. Damit wird ein sehr breites Anwendungsspektrum ermöglicht, welches die Routine-Analytik erweitern kann. Der gesamte Ablauf der einzelnen Messprogramme ist mittels implementierter Software anpass- sowie änderbar. Einzelne Programmschritte sind austauschbar, können gelöscht und neu geschrieben werden. Die unterschiedlichen Messparameter, wie Temperatur der Flusszelle und der Antikörper-Spritzen, Pumpenvolumina, Wartezeiten und Flussraten der verschiedenen Antikörper-Lösungen und Puffer werden hierbei individuell über die Software gesteuert, geändert und optimiert. Der Zusatz SLT (SL: sample loop, T: temperature) bezeichnet die Elemente einer Probenschleife und

die beheizbare Flusszelleneinheit, deren Temperatureinstellung eine Optimierung der Antikörper-Effizienz ermöglicht. Dies wird u.a. durch die Steigerung der Enzymaktivität und der Bindekinetik beeinflusst. In folgender Abbildung 26 ist der verwendete MCR 3 mit all seinen Einzelkomponenten dargestellt:

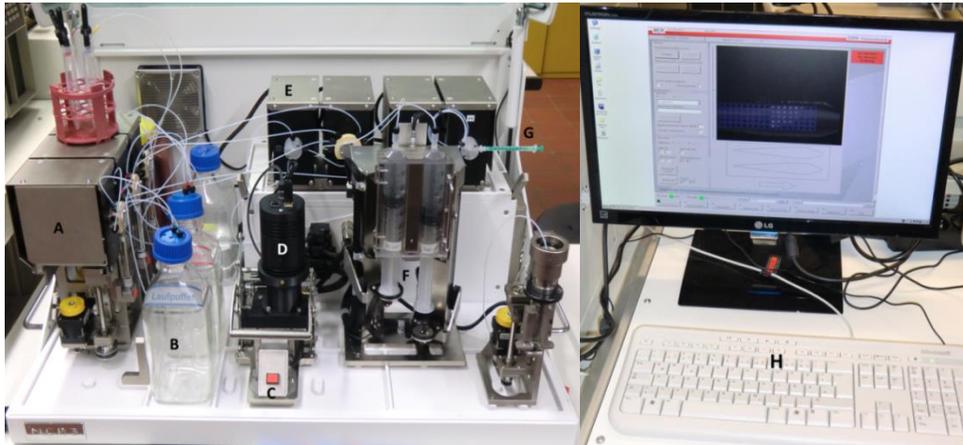


Abbildung 26: Aufbau des MCR 3 SLT: (A) Pumpeneinheit, (B) Reservoir für Pufferlösungen, (C) Klappe für Mikroarray-Chip mit beheizbarer Flusszelle, (D) Detektionseinheit mit CCD-Kamera (USB 2.0), (E) Ventileinheit für Reagenzienzugabe, (F) Antikörperspritzen, (G) manuelle Injektionsspritze für die Bakterienprobe, (H) Software-gestützte Ansteuerung und Auswertung.

Der MCR 3 SLT ist grundlegend aus acht verschiedenen Einzelementen aufgebaut. Das Gerät verfügt über eine Pumpeneinheit (A). Drei motorbetriebene Spritzenpumpen können Reagenzien und Pufferlösungen in das fluidische System abgeben. Die dafür benötigten Lösungen können aus dem Reservoir für Pufferlösungen (B) aufgenommen und mit entsprechend vorher programmierter Flussrate und definiertem Volumen über das Schlauchsystem in eine Flusszelle des Mikroarray-Chips geleitet werden. Der Chip befindet sich in der dafür vorgesehenen Schublade, deren Temperatur sich über die Software einstellen lässt (C). Die CL-Signale werden mit einer 16-Bit-CCD Kamera aufgezeichnet, die über einen USB 2.0-Anschluss mit dem PC verbunden ist (D). Über 4 verbaute PTFE-Drehventile ist eine Steuerung der Reagenzien- und Pufferlösungszufuhr möglich (E). Die Lösungen von Detektionsantikörper und markiertem Konjugat für die CL-Reaktion (Streptavidin-poly-Meerrettich-Peroxidase) werden über zwei kühlbare Antikörperspritzen-Pumpen zugeführt (F). Über eine 1-mL-Einmalspritze (G) wird die zu analysierende Probenlösung über das PTFE-Schlauchsystem bis zur

Flusszelle befördert. Die individuelle und computergestützte Ansteuerung der Pumpen, Ventile, Spritzen und der CCD-Kamera erfolgt über eine spezielle, nur auf Geräten dieser Bauart implementierte, Software. Die Fluidik des verwendeten MCR 3 SLT ist in nachfolgender Abbildung 27 schematisch dargestellt:

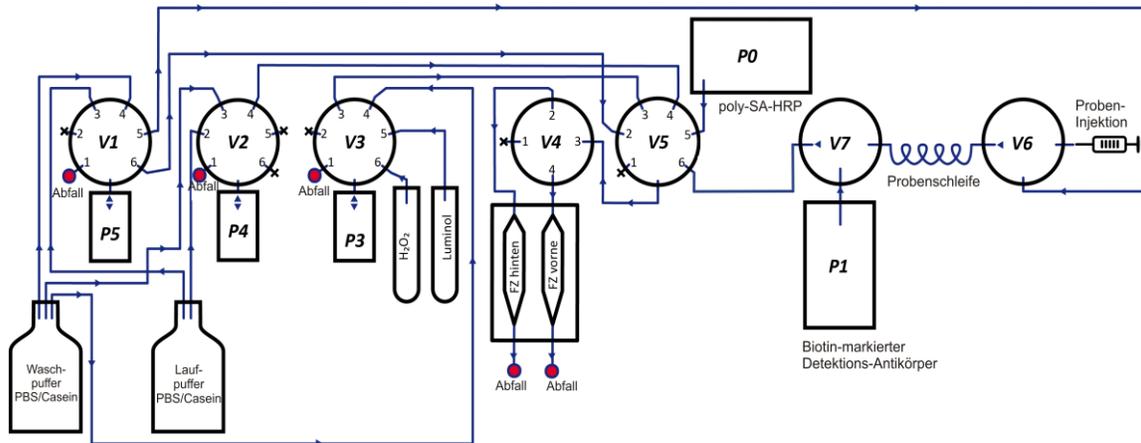


Abbildung 27: Schematische Darstellung der Fluidik des MCR 3 SLT.

2.4.6.2. Sandwich-Mikroarray-Immunoassay (SMIA)

Das verwendete Messprinzip der durchgeführten Versuche in dieser Arbeit beruht auf einem Sandwich-ELISA. In der Prozessführung wurde ein aus der eigenen Masterarbeit vorliegendes Programm abgewandelt. Die verschiedenen monoklonalen und polyklonalen Fänger-Antikörper wurden auf Polypropylenglycol-modifizierten Glaträgern immobilisiert und dienen als selektive und sensitive Fängermoleküle für *L. pneumophila*-Antigene. Durch die Zugabe eines polyklonalen, Biotin-markierten Detektions-Antikörpers wird die Bildung des Sandwich-Immunoassay an den Stellen des Mikroarrays, wo Legionellen-LPS am Fänger gebunden ist, ermöglicht. Das Signal wird anschließend durch die Verwendung eines Streptavidin-poly-Meerrettich-Peroxidase (SA-poly-HRP)-Konjugats, welches hoch spezifisch an das Biotin-Molekül des Detektions-Antikörpers bindet, erzeugt. Die emittierten Photonen der poly-HRP-katalysierten Chemilumineszenzreaktion werden mittels einer CCD-Kamera aufgezeichnet. Der angewandte SMIA mit der nacheinander erfolgenden Injektion von Probe, Antikörper und Substrat ist in nachfolgender Abbildung 28 schematisch dargestellt:

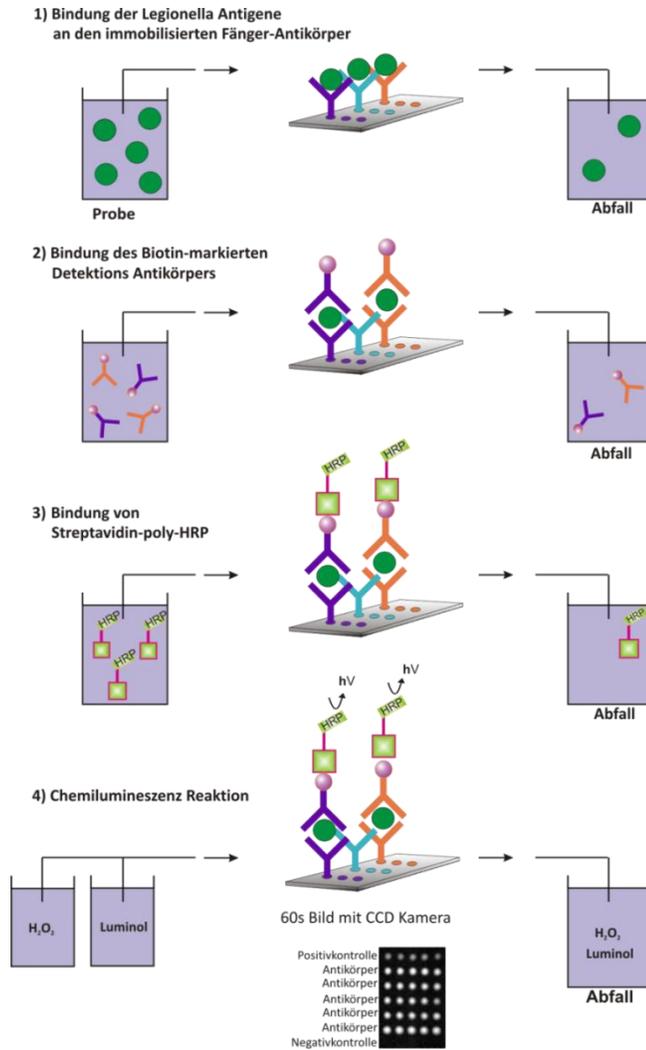


Abbildung 28: Nachweisprinzip von *L. pneumophila* mittels Sandwich-Mikroarray-Immunoassay in einem flussbasierten Chemilumineszenz-Mikroarray.

2.5. Aufkonzentrierungsmethoden für Bakterien im Trinkwasser

Oftmals reicht bereits ein Keim oder der Bruchteil eines Mikroorganismus im Trinkwasser aus, um bei einem Menschen eine Infektion auszulösen [WHO, 2011]. Da es die Nachweisgrenze von Standard-Analysemethoden oft nicht ermöglicht, diesen einen Keim zu detektieren, müssen größere Probenvolumina aufkonzentriert werden, um eine Detektion zu bewerkstelligen. Dabei macht man sich oftmals die physikalischen und chemischen Eigenschaften der Mikroorganismen zunutze, um diese aus großem Volumen zu separieren. Um sicherzustellen, dass die

Detektionsmethode alle beinhaltenen Mikroorganismen erfasst, ist es wichtig, ein großes Probenvolumen aufzukonzentrieren. Der damit erreichte Aufkonzentrierungsfaktor sollte also möglichst groß sein. Eine zügige Verarbeitung der Proben ist besonders wichtig, damit es zu keiner Vermehrung der Mikroorganismen im untersuchten Wasser kommt. Dafür förderlich sind nährstoffreiches Wasser und erhöhte Temperaturen, wobei hier auch Zimmertemperatur ausreichend ist. Weiterhin wäre es sinnvoll, wenn das Probenwasser ohne Vorbereitung direkt zur Untersuchung eingesetzt werden könnte.

Um Aufkonzentrierungsfaktoren jenseits der 10^4 zu erreichen, werden sehr oft verschiedene Verfahren miteinander kombiniert. Eine Möglichkeit für den ersten Prozessschritt ist beispielsweise die Ultrafiltration [Cashdollar et al., 2013]. Nachfolgend kann dann zum Beispiel die Oberflächenladung von Pathogenen ausgenutzt werden, um eine weitere Aufkonzentrierung zu erreichen. Eine Aufkonzentrierung über Größenausschluss ist ebenso eine Möglichkeit.

2.5.1. Monolithische Adsorptions-Filtration

Als Adsorption bezeichnet man den physikalischen Prozess der Anreicherung von Stoffen aus Flüssigkeiten an der Oberfläche eines Festkörpers, der sogenannten Phasen-Grenzfläche. Bei der Adsorptions-Filtration macht man sich genau diese Adsorptionskräfte zunutze, um eine Aufkonzentrierung der im Wasser enthaltenen Mikroorganismen zu erreichen. Die Monolithische Adsorptions-Filtration nutzt als Festkörper einen Monolithen. Darunter versteht man chromatographische Trennphasen aus einem durchgehenden Material. Der Name „Monolith“ stammt aus dem Griechischen und bedeutet „einheitlicher Stein“. In der zweiten Hälfte der 1980er Jahre wurden Monolithe das erste Mal als Separationsphasen eingeführt und galten sehr schnell als vielversprechende Alternative zu den bisher standardmäßig verwendeten partikulären Säulen [Xie et al., 2002; Jungbauer et al., 2004]. Die Aufkonzentrierung geschieht hierbei hauptsächlich durch ionische und hydrophobe Wechselwirkungen an der Oberfläche des Monolithen [Peskoller et. al, 2009; Pei et al., 2012]. Ein weiterer Vorteil der eingesetzten Monolithen ist auch, dass die Limitierungen überwunden werden, die oft bei gepackten Säulen auftreten. In konventionellen Chromatographie-Säulen werden die zu separierenden Moleküle aufgrund von Diffusion sehr langsam transportiert. Dafür ist ein langer Kontakt zwischen

Molekül und aktivierter Oberfläche notwendig. Bei der Separation mit einem Monolithen wird die Flüssigkeit durch die Kanäle gepresst, sodass die zu trennenden Moleküle durch Konvektion an die aktive Oberfläche der Kanäle transportiert werden. Somit ist eine schnelle und effektive Trennung der Moleküle auf Basis von hohen Flussraten und niedrigem Rückdruck möglich [Podgornik et al., 2000]. Je nach gewähltem Mikroorganismus, der untersuchten Matrix und den herrschenden Arbeitsbedingungen können unterschiedliche funktionelle Gruppen an die Oberfläche des Monolithen gebunden werden.

2.5.2. Zentrifugale Ultrafiltration

Von einer zentrifugalen Ultrafiltration spricht man, wenn man sich die Zentrifugalkraft wie z.B. in einer Laborzentrifuge für die Aufkonzentrierung zunutze macht. Dabei wird eine Suspension aus Flüssigkeit und Feststoffen durch eine durchlässige Membran geleitet, wo je nach Größe der Poren die Feststoffe zurückgehalten werden. Die Probe trennt sich in Filtrat und Retentat. Die Unterscheidung erfolgt hierbei nach Porengröße, wobei die Ultrafiltration eine Porengröße von 2 – 100 nm in der Membran aufweist. Somit können Moleküle zu einer Molekülmasse von mit bis 5.000 kDa von der Flüssigkeit abgetrennt werden.

2.5.3. Kombination aus Monolithischer Adsorptionsfiltration und Zentrifugaler Ultrafiltration zur Aufkonzentrierung von L. pneumophila-haltigen Realproben

Um *L. pneumophila* auch in Realproben nachzuweisen und zu zeigen, dass der entwickelte Sandwich-Mikroarray-Immunoassay auch für Oberflächenwasser und Abwasser funktioniert, wurde in Kooperation mit anderen Arbeitsgruppen-Mitgliedern an einem kombinierten Verfahren aus Monolithischer Adsorptions-Filtration (MAF) und Zentrifugaler Ultrafiltration (ZeUF) gearbeitet. Da sowohl Oberflächen-, als auch Abwasser eine sehr komplexe Zusammensetzung aufweist, ist es für eine anschließende Detektion durchaus sinnvoll, die enthaltenen Bakterien aufzukonzentrieren und Matrixeffekte so weit wie möglich zu minimieren. Nach Durchführung von MAF und ZeUF wurde der entwickelte CL-SMIA am MCR 3 als Detektionsmethode nachgeschaltet. Oberstes Ziel sollte sein, Legionellen in Realproben aufzukonzentrieren, Matrixeffekte durch Begleitflora zu reduzieren, schwebende Partikel und

Wasserverunreinigungen u. ä. zu minimieren und eine anschließende Antikörper-basierte Detektion durchzuführen. Es wurde weiterhin darauf hingearbeitet, den von der aktuell geltenden Trinkwasserverordnung (TrinkwV) vorgeschriebenen Maßnahmenwert von 1 KBE/mL als Nachweisgrenze für die Kombimethode zu erreichen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Epoxy-basierte Polymer-Monolithe hergestellt und zur Aufkonzentrierung von *L. pneumophila* verwendet. Sie bestehen aus einer festen Phase, die von einem Netzwerk aus Poren und Durchflusskanälen mit einem Durchmesser von ca. 20 µm durchzogen ist (siehe Abbildung 29).

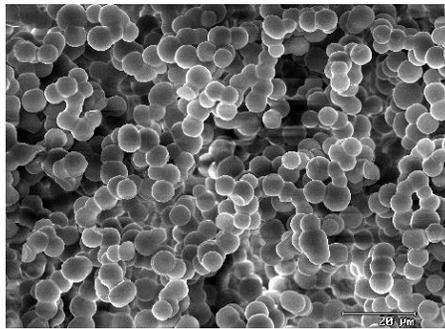


Abbildung 29: REM-Aufnahme der makroporösen Struktur des Monolithen; gewählte Vergrößerung: 1.000x [gemäß Peskoller et al., 2009].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Epoxy-Gruppen an der Oberfläche hydrolysiert. Die dabei entstehenden Hydroxylgruppen wirken als ein schwacher Kationenaustauscher, die bei dem eingesetzten pH-Wert von 3 eine negative Oberflächenladung aufweisen. Aufgrund von elektrostatischen Interaktionen auf der Oberfläche können Mikroorganismen an die Oberfläche des Monolithen binden, weil sie aufgrund der leicht positiven Ladung der LPS-Strukturen an ihrer Zellmembran eine spezifische Oberflächenladung aufweisen. *L. pneumophila* kann an der Oberfläche eine polare Flagelle ausbilden [Cianciotto et al., 2001; Rodgers et al., 1979]. Diese polare Ladung hängt vom pH-Wert der Umgebungsmatrix ab. Bei der Probenvorbereitung vor der Monolithischen Adsorptions-Filtration (MAF) wurde dieser sauer auf pH 3 eingestellt.

Als zweiter Aufkonzentrierungsschritt wurde die erhaltene Probenlösung mit einer Zentrifugalen Ultrafiltration (ZeUF) weiter aufkonzentriert [Kunze et al., 2015]. Anschließend konnte die Messung mit dem etablierten CL-SMIA am MCR 3 erfolgen.

3. Ergebnisse und Diskussion

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Quantifizierung von *L. pneumophila*-Stammlösungen

Während der ganzen Arbeit wurde mit *L. pneumophila*-Stammlösungen gearbeitet. Diese wurden für die Charakterisierung der erhaltenen monoklonalen Antikörper, Kalibrierungsmessungen am MCR 3 SLT sowie als Stammlösungen für die MAF-Aufkonzentrierungsmethode eingesetzt. Diese Lösungen wurden am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) hergestellt und quantifiziert. Ziel dabei war es, gleichbleibende Lösungen herzustellen, die als stabiler Standard für alle Messungen verwendet werden konnten.

3.1.1. Kultivierung von *Legionella pneumophila*

Der Stamm *L. pneumophila* SG 1 ST Bellingham wurde vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit auf GVPC-Selektivnährmedium ausplattiert und inkubiert (siehe Abbildung 30). Dieser Stamm konnte dann für alle weiteren Versuche eingesetzt werden. Die Stammlösungen zur Optimierung des Messprogrammes am MCR 3 SLT wurden im Legionellenlabor des LGL hergestellt. Danach wurden die Lösungen entweder durch Erstellen einer Verdünnungsreihe und anschließender Kultivierung bzw. per Durchflusszytometrie quantifiziert. Im Laufe der Arbeit kam es zu einem technischen Defekt am Durchflusszytometer, weswegen die Stammlösungen erst per Durchflusszytometrie, später dann nur noch durch Kultur quantifiziert wurden.



Abbildung 30: GVPC-Selektivnährmedium bewachsen mit *L. pneumophila* SG 1 ST Bellingham.

Da sich eine Stammlösung mit lebenden Zellen nicht dauerhaft im Kühlschrank hält, wurde in regelmäßigen Abständen eine neue Stammlösung hergestellt. Diese wurde dann über Verdünnungsstufen per Kultur quantifiziert und anschließend für nachfolgende Messungen hitzeinaktiviert. Die erhaltenen Stammlösungen wiesen unterschiedliche Konzentrationen auf. Die ermittelte Konzentration der Stammlösung wurde dabei als Ausgangskonzentration betrachtet und für alle weiteren Experimente angegeben.

3.1.2. Verdünnungsreihe von Stammlösungen

Da während der gesamten Arbeit immer wieder eine neue Stammlösung verwendet wurde, wird an einem Beispiel die Herstellung der Stammlösung aufgezeigt. Bei der Kultivierung auf Selektivnährmedium werden alle 3 vorliegenden Zelltypen der Legionelle, d.h. lebende Zellen, tote Zellen und VBNC-Status (lebend, aber nicht kultivierbar) auf der Platte inkubiert. Tote und VBNC-Zellen werden jedoch nicht wachsen und sich vermehren, sodass nur lebende, kultivierbare Zellen über diese Messmethode erfasst werden können. Man kann also davon ausgehen, dass die untersuchte Lösung die ausgezählten, kultivierbaren und lebenden Zellen enthält, jedoch auch die Zellen im VBNC-Stadium, die bei der Auszählung nicht erfasst werden.

Für die Stammlösung wurden Kolonien des ausplattierten Stammes geerntet und in Sterilwasser aufsuspendiert. Anschließend wurde mit dieser Stammlösung eine Verdünnungsreihe in Zehnerschritten hergestellt. Die Stufen 6 bis 10 wurden auf Selektivnährmedium ausplattiert und bebrütet. Nach 7 Tagen Inkubation bei 37 °C konnten die Platten ausgezählt werden. Nach Zurückrechnen des Verdünnungsfaktors konnte folgende Konzentration für die Stammlösung ermittelt werden:

$$C_{\text{ Stammlösung G}} = \frac{(4,5 * 10^8) + (5,0 * 10^8)}{2} = 4,75 * 10^8 \frac{KBE}{mL} \quad \text{(Formel 2)}$$

Formel 2: Berechnung der Konzentration einer Stammlösung in KBE/mL aus den ermittelten Konzentrationen der einzelnen Verdünnungsstufen.

3.1.3. Quantifizierung am Durchflusszytometer

Während der gesamten Doktorarbeit wurde mit Lösungen gearbeitet, für die kultivierte Legionellen vom GVPC-Nährmedium in Sterilwasser aufsuspendiert wurden. Mit der somit erhaltenen Stammlösung wurde eine Verdünnungsreihe erstellt. Diese Verdünnungen wurden mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff SYTO 9 inkubiert und am Durchflusszytometer Cell Lab Quanta SC qualifiziert und quantifiziert. Bei allen Proben wurde mit einer SYTO 9-Verdünnung von 1:10 gearbeitet. Über die Auswertesoftware am Durchflusszytometer lässt sich errechnen, wie viele angefärbte Zellen über ihre Fluoreszenz insgesamt über das Zytometer als lebende Legionellen qualifiziert und quantifiziert werden. Der Faktor F_{FCM} wird als Quotient mit folgender Formel 3 bestimmt:

$$F_{FCM} = \frac{\text{gezählte angefärbte Legionellen}}{\text{gezählte angefärbte Gesamtereignisse}} \quad (\text{Formel 3})$$

Formel 3: Faktor F_{FCM} zur Bestimmung der angefärbten und als lebend quantifizierten Legionellen mittels Durchflusszytometrie.

Es ist davon auszugehen, dass in der resuspendierten Lösung sowohl lebende als auch tote Legionellen sowie Bruchstücke derer vorzufinden sind. Auch diese Bruchstücke enthalten DNA oder DNA-Fragmente, an die SYTO 9 bindet. Trotzdem weisen diese Bruchstücke nicht die gleichen Fluoreszenzeigenschaften bei 488 nm wie intakte lebende Zellen auf, daher werden diese angefärbten Bruchstücke zwar als angefärbte Zellen detektiert und zu der Gesamtanzahl der Ereignisse addiert, jedoch von der Auswertesoftware des Zytometers nicht als lebende Legionellenzellen eingeordnet. Diese Zellbruchstücke werden in der Ansicht bei der Dot-Plot-Wolke in einem anderen Areal abgebildet. Die nachfolgende Abbildung 31 verdeutlicht die Ansicht einer Zytometermessung im Rahmen der Auswertesoftware:

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

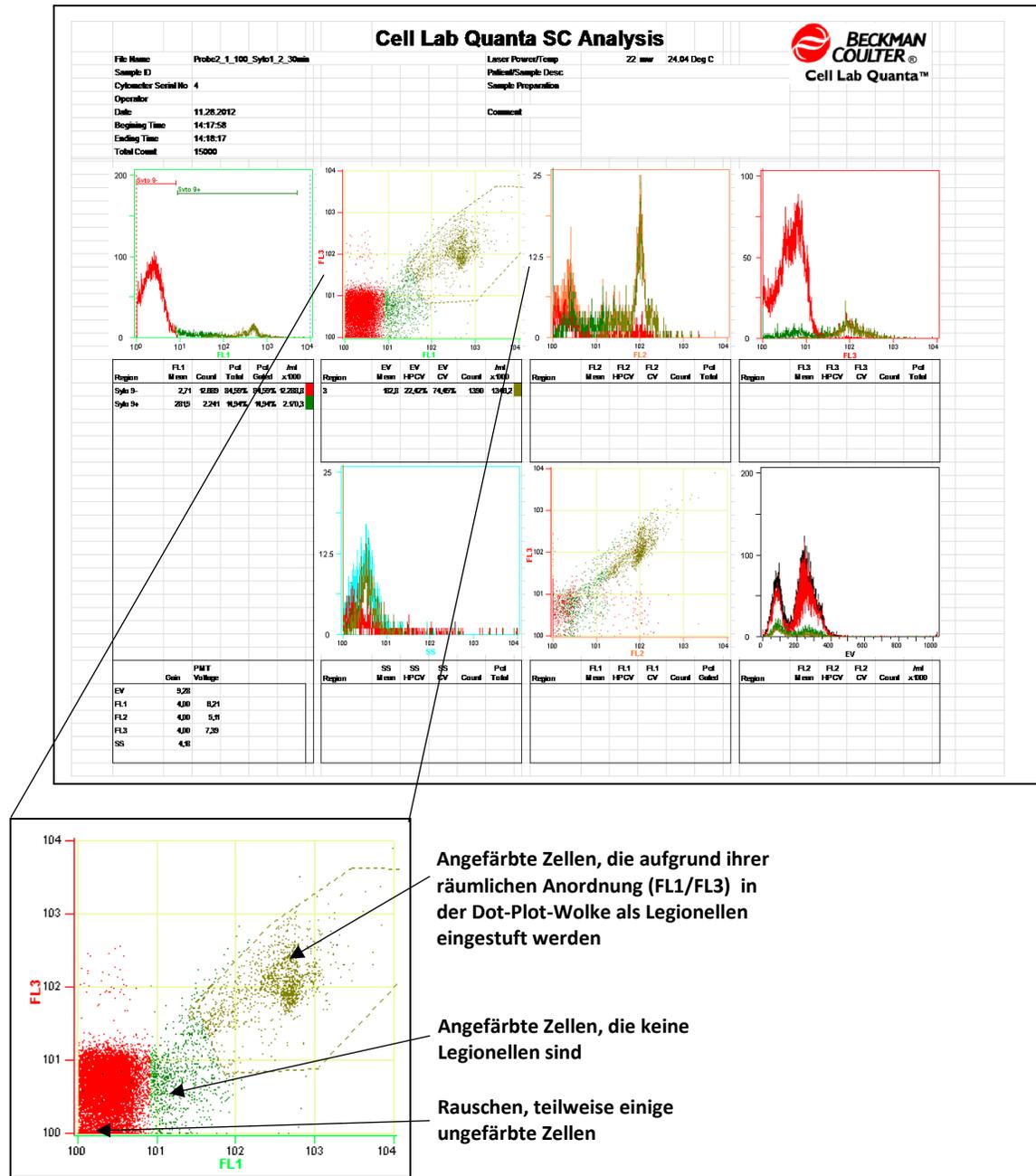


Abbildung 31: Beispiel einer Messung am Durchflusszytometer mit Vergrößerung der Dot-Plot-Wolke FL1 / FL3.

Vorab wurde im Rahmen der Masterarbeit eine Inkubationszeit von 30 Minuten sowie eine SYTO 9-Konzentration von 1:10 als optimal bestimmt. Alle weiteren Quantifizierungen von frisch hergestellten Stammlösungen wurden mit diesen beiden Parametern am Durchflusszytometer durchgeführt.

Es wurden im Rahmen dieser Arbeit mehrere Stammlösungen hergestellt. Nach einer Aufbewahrung von ca. 6 – 8 Wochen wurde die Stammlösung vor einer neuen Messreihe gewechselt. Dafür wurde eine neue Kultur angezchtet und eine Stammlösung hergestellt. Somit konnte sichergestellt werden, dass die Konzentration der verwendeten Stammlösung immer annähernd konstant blieb.

Vorab wurde bereits in der Masterarbeit ein Faktor festgelegt, der die Ergebnisse der Kultur mit der Quantifizierung über die Durchflusszytometrie korreliert. Dieser Faktor F wurde wie folgt bestimmt:

$$\text{Faktor } F = \frac{\text{quantifizierte Zellen am Durchflusszytometer } \left[\frac{\text{KBE}}{\text{mL}} \right]}{\text{ausgezählte Zellen auf GVPC - Nährmedium } \left[\frac{\text{KBE}}{\text{mL}} \right]} \quad (\text{Formel 4})$$

Formel 4: Berechnung des Faktors zur Korrelation zwischen Kultur und Durchflusszytometrie

Bei den durchgeführten Messungen wurde ein Faktor von 1,18 ermittelt. Für alle über Kultur und Durchflusszytometrie quantifizierten Stammlösungen wurde dieser Faktor eingesetzt, um die Konzentration zu bestimmen. Dabei wurden für alle hergestellten Stammlösungen folgende Konzentrationen ermittelt (siehe Tabelle 4). Die Tabelle weist eine Unterteilung in hellgrau und weiß auf, weil während der Doktorarbeit das Durchflusszytometer beschädigt wurde und nachfolgende Stammlösungen nur noch über eine Kultur und anschließende Kultur der Verdünnungsstufen quantifiziert und eingestellt werden konnten.

Tabelle 4: Hergestellte Stammlösungen im Rahmen dieser Arbeit mit Bezeichnung des mikrobiologischen Namens und der ermittelten Konzentration je nach gewähltem Verfahren.

Hergestellte Stammlösung	Ermittelte Konzentration [KBE/mL]	Quantifizierungsmethode
SL 1 (<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Bellingham)	$2,37 \times 10^8$	Durchflusszytometrie
SL 2 (<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Bellingham)	$1,82 \times 10^7$	Durchflusszytometrie
SL 3 (<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Bellingham)	$4,01 \times 10^7$	Durchflusszytometrie

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

SL A <i>(L. pneumophila SG 1, ST Bellingham)</i>	$2,24 \times 10^8$	Durchflusszytometrie
SL B <i>(L. pneumophila SG 1, ST Bellingham)</i>	$6,59 \times 10^7$	Durchflusszytometrie
SL C <i>(L. pneumophila SG 1, ST Bellingham)</i>	$5,15 \times 10^8$	Durchflusszytometrie
SL D <i>(L. pneumophila SG 1, ST Bellingham)</i>	$1,63 \times 10^8$	Durchflusszytometrie
SL E <i>(L. pneumophila SG 1, ST Bellingham)</i>	$1,18 \times 10^8$	Durchflusszytometrie
SL F <i>(L. pneumophila SG 1, ST Bellingham)</i>	$1,19 \times 10^8$	Durchflusszytometrie
SL OLDA <i>(L. pneumophila SG 1, ST OLDA)</i>	$1,00 \times 10^8$	Kultur/ Verdünnungsreihe
SL Heys. <i>(L. pneumophila SG 1, ST Heysham)</i>	$1,00 \times 10^8$	Kultur/ Verdünnungsreihe
SL Phil. <i>(L. pneumophila SG 1, ST Philadelphia)</i>	$1,00 \times 10^8$	Kultur/ Verdünnungsreihe
SL Beni. <i>(L. pneumophila SG 1, ST Benidorm)</i>	$3,00 \times 10^8$	Kultur/ Verdünnungsreihe
SL SG 9 <i>(L. pneumophila SG 9)</i>	$6,00 \times 10^8$	Kultur/ Verdünnungsreihe
SL SG 5 <i>(L. pneumophila SG 5)</i>	$2,00 \times 10^8$	Kultur/ Verdünnungsreihe
SL Knox. <i>(L. pneumophila SG 1, ST Knoxville)</i>	$4,00 \times 10^7$	Kultur/ Verdünnungsreihe
SL G <i>(L. pneumophila SG 1, ST Bellingham)</i>	$4,75 \times 10^8$	Kultur/ Verdünnungsreihe
SL H <i>(L. pneumophila SG 1, ST Bellingham)</i>	$1,00 \times 10^8$	Kultur/ Verdünnungsreihe
SL SG 4, LA. <i>(L. pneumophila SG 41, Los Angeles)</i>	$5,90 \times 10^7$	Kultur/ Verdünnungsreihe
SL Phil. 2 <i>(L. pneumophila SG 1, ST Philadelphia)</i>	$2,00 \times 10^8$	Kultur/ Verdünnungsreihe
SL Knox.2 <i>(L. pneumophila SG 1, ST Knoxville)</i>	$6,00 \times 10^7$	Kultur/ Verdünnungsreihe
SL Ox. <i>(L. pneumophila SG 1, ST Oxford)</i>	$2,00 \times 10^7$	Kultur/ Verdünnungsreihe

Die hergestellten Stammlösungen wurden im Rahmen dieser Arbeit für diverse Fragestellungen eingesetzt und am MCR 3 SLT vermessen.

3.2. Entwicklung eines Messprogramms zur Detektion von *L. pneumophila* am MCR 3

Ziel der Arbeit war es, ein Schnellprogramm zu etablieren, mit dem eine sensitive, selektive und vor allem zeitsparende Detektion von *L. pneumophila* möglich ist. Dafür wurde als erster Schritt das in der Masterarbeit entwickelte Messprogramm auf Tauglichkeit dafür untersucht.

3.2.1. Vorversuche Masterarbeit

Im Rahmen der Masterarbeit an diesem Institut wurde ein, von einer Vorgängerin etabliertes Messprogramm, vom Immunomat [Langer et al., 2011] auf den MCR 3 SLT übertragen. Das am Ende der Masterarbeit entwickelte Messprogramm zur Detektion von *L. pneumophila* wies folgende Parameter auf:

- Temperatur Flusszelle 35 °C
- Vorinkubation von 1 mL Probe zusammen mit 1 mL Detektionsantikörper in einer Inkubationsschleife
- Proben-Antikörper-Gemisch (2 mL) mit 0,2 µL/s Flussrate in 50 µL Inkrementen über Chip gepumpt (43 Wiederholungen)
- Stopp-Flow-Modus mit 10 s Interaktionszeit
- 1 mL Streptavidin-HRP als sekundärer Antikörper mit 10 µL/s gepumpt
- je 300 µL Luminol und Peroxid als Chemilumineszenz-Substrate mit 10 µL/s Flussrate
- 60 s Bild mit CCD-Kamera aufgenommen
- Assay-Gesamtdauer: 196 min

3.2.2. Optimierung des Messprogrammes

Im Rahmen der Doktorarbeit sollte auf Basis des in der Masterarbeit entwickelten Messprogrammes für *L. pneumophila* am MCR 3 SLT eine Optimierung durchgeführt werden. Angestrebt wurde hierbei, dass eine schnellere Messung mit weniger Probenmaterial möglich ist. Weiterhin wurde ausprobiert, ob eine Vorinkubation für diesen Assay-Typ ideal ist, oder ob man mit nacheinander erfolgreichem Pumpen von Probe und Detektionsantikörper bessere Ergebnisse erzielen kann. Aus diesem Grund wurde zuerst das Messprogramm am MCR 3 SLT

optimiert. Für die Optimierung wurde für alle Schritte eine Stammlösung von *L. pneumophila* Serogruppe 1, monoklonaler Subtyp Bellingham, eingesetzt, die zuvor am Durchflusszytometer quantifiziert wurde. Zur Detektion wurde ein Antikörper-Paar aus polyklonalem Fänger-Antikörper (pAb anti-*L. pneumophila*, Meridian) mit einer Konzentration von 2,5 mg/mL in der Spotting-Lösung und einem Biotin-markierten Detektions-Antikörper (pAb anti-*L. pneumophila*, Meridian) mit einer Konzentration von 4 – 5 µg/mL verwendet. Alle durchgeführten Optimierungsschritte zielten darauf ab, eine Erhöhung des Chemilumineszenzsignals bei möglichst geringem Chemikalieneinsatz, kurzer Messzeit und höchstmöglicher Sensitivität zu erreichen.

Entsprechend einer analytischen Vorgehensweise wurde für die Optimierung des Messprogramms jeweils ein Parameter verändert, um dessen Einfluss auf die Intensität des CL-Signals herauszufinden. Folgende Parameter des Messprogramms wurden hierbei einer Optimierung unterzogen: Kontinuierlicher Fluss oder Stopp-Flow für das Markierungsenzym Streptavidin-HRP, Inkubationszeit für die Probeninkremente in der Flusszelle, Fließgeschwindigkeit der Probeninkremente über den Chip, Kombination aus reduzierter Flussrate und Inkubationszeit der Probeninkremente, Fließgeschwindigkeit des Waschschrtes, Austausch des Markierungsenzyms: Streptavidin-poly-HRP anstatt Streptavidin-HRP, Konzentrationsbestimmung von Streptavidin-poly-HRP und die Optimierung der Konzentration des Detektions-Antikörpers.

Bei dem verwendeten Begriff Probeninkrement handelt es sich um ein Teilvolumen (hier 60 µL) der injizierten Stammlösung (750 µL Gesamtvolumen, bestehend aus 600 µL reiner Probenlösung plus 150 µL Totvolumen aufgrund der Verschlauchung). Ein Flusskanal des Messchips umfasst 60 µL Volumen. Ein Inkrement bedeutet hierbei also eine Füllung der Probenzelle. Die Analyten in der Probenlösung können dann mit den immobilisierten Antikörpern auf der Chip-Oberfläche interagieren, bis nach Ablauf der Wartezeit das nächste Probeninkrement in die Flusszelle gepumpt wird. Diesen Ablauf bezeichnet man als Stopp-Flow-Assay.

3.2.2.1. Vergleich von kontinuierlichem Fluss und Stopp-Flow für Streptavidin-HRP

Im Rahmen der Optimierung des bestehenden Programms zur Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham ($c = 2,37 \times 10^8$ KBE/mL), wurde zuerst überprüft, ob eine Signalsteigerung möglich ist, wenn anstatt kontinuierlichem Fluss das Markierungsenzym Streptavidin-HRP (SA-HRP) mit einem Stopp-Flow mit 60- μ L-Probeninkrementen mit 5 s Interaktionszeit und 12 Schleifen durch die Flusszelle gepumpt wird. Für die Messungen wurde eine SA-HRP Konzentration von 4 μ g/mL in der Spottinglösung verwendet. Die Konzentration des immobilisierten Fänger-Antikörpers betrug 2,5 mg/mL und die des Detektions-Antikörpers 4 – 5 μ g/mL. Nach einer durchgeführten Dreifach-Bestimmung des CL-Signals wurde für die kontinuierliche Leitung des Markierungsenzym SA-HRP eine Signalintensität von 400 a.u. ermittelt. Bei dem Stopp-Flow-Modus konnte lediglich eine Signalintensität von 75 a.u. bestimmt werden. Das CL-Signal bei kontinuierlichem Fluss des Markierungsenzyms ist deutlich höher (Faktor 5). Es ist zu vermuten, dass beim Stopp-Flow-Modus die Wartezeit zwischen den Inkrementen eher hinderlich für das Einstellen des Gleichgewichts aus Adsorption und Diffusion ist. Aus diesem Grund wurde der Stopp-Flow-Modus für das Enzym zur Markierung nicht weiter verfolgt.

3.2.2.2. Einfluss von verschiedenen Inkubationszeiten der Proben-Inkmente

In den durchgeführten Messungen sollte untersucht werden, inwieweit mit einer Verlängerung bzw. Verkürzung der Interaktionszeit des Probeninkrements auf dem Chip eine CL-Signalsteigerung erreicht werden konnte (siehe Abbildung 32). Dafür wurden 5 s, 10 s, 15 s, 20 s, 30 s, 60 s und 120 s Interaktionszeit für jedes 60 μ L Inkrement untersucht. Für die Messungen wurde eine Flussrate von 2 μ L/s verwendet. Es wurden die gleiche *L. pneumophila*-Stammlösung ($c = 2,37 \times 10^8$ KBE/mL) verwendet. Die Konzentration des Fänger-Antikörpers in der Spotting-Lösung betrug 2,5 mg/mL, die Konzentration des Detektions-Antikörpers 4 – 5 μ g/mL.

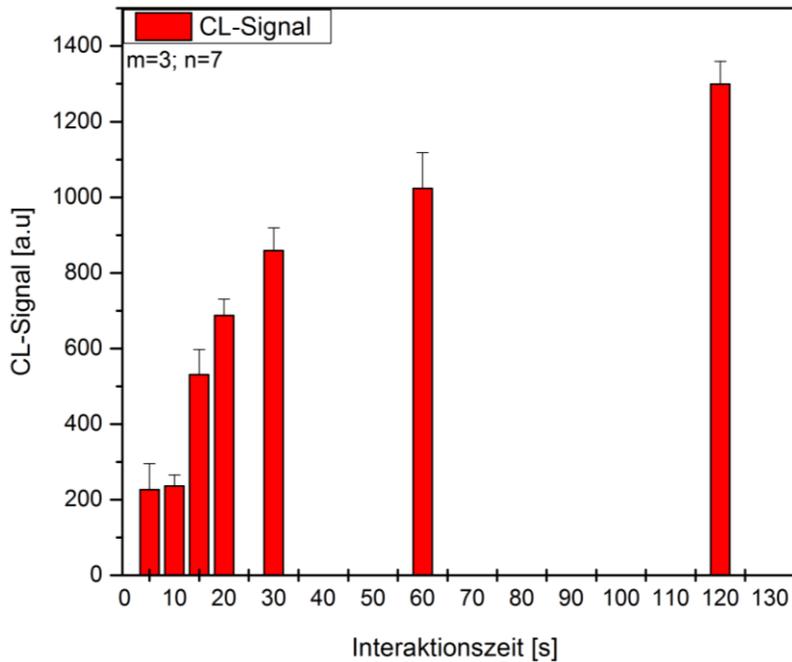


Abbildung 32: Einfluss der Interaktionszeit der Probeninkremente auf das Chemilumineszenz-Signal.

Zwischen 5 und 10 Sekunden Wartezeit wurde nur eine minimale Signalsteigerung erreicht, bei allen anderen untersuchten Interaktionszeiten ließ sich eine kontinuierliche Steigerung des Probensignals ermitteln (bis zu Faktor 6 von kürzester zu längster Interaktionszeit). Parallel dazu erhöht sich auch die Gesamtdauer des Messprogramms. Die Dauer des Messprogramms bei einer Interaktionszeit von 5 s betrug 11 Minuten, bei einer Interaktionszeit von 120 s muss schon mit einer Gesamtdauer von 32 Minuten gerechnet werden. Da die Entwicklung eines Schnellnachweises für *L. pneumophila* im Mittelpunkt steht und davon ausgegangen wird, dass weitere eventuelle Programm-Optimierungen ebenfalls eine Verlängerung des Messprogramms nach sich ziehen, wurde für alle weiteren Messungen eine Interaktionszeit von 30 s zwischen den Inkrementen gewählt.

3.2.2.3. Fließgeschwindigkeit der Probeninkremente

In den durchgeführten Messungen sollte untersucht werden, inwieweit die Signalintensität von der Fließgeschwindigkeit der Probeninkremente beeinflusst wird. Es wurden 5 verschiedene Flussraten für die Probeninkremente untersucht: 0,5 $\mu\text{L/s}$, 1 $\mu\text{L/s}$, 2 $\mu\text{L/s}$, 5 $\mu\text{L/s}$ und 10 $\mu\text{L/s}$.

0,5 μL war die langsamste Geschwindigkeit, die für die Probenpumpe am MCR 3 eingestellt werden konnte. Die Interaktionszeit zwischen den Probeninkrementen blieb bei jeder Messung konstant bei 5 s. Als Analyt wurde eine *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham-Stammlösung ($c = 1,82 \times 10^7$ KBE/mL), verwendet. Die Konzentration von Fänger- und Detektions-Antikörper wurden entsprechend der vorherigen Versuchsreihe gleich belassen.

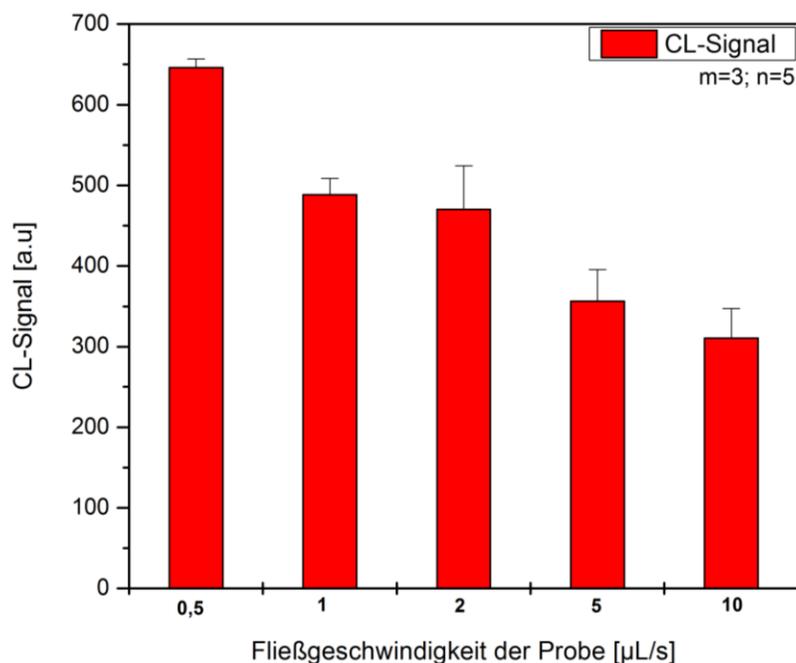


Abbildung 33: Einfluss der Fließgeschwindigkeit der Probeninkremente auf das Chemilumineszenzsignal.

In oben aufgeführter Abbildung 33 ist ersichtlich, dass eine Steigerung des CL-Signals von 310 a.u. auf 640 a.u. erreicht werden konnte, wenn die Flussrate der Probeninkremente von 10 $\mu\text{L/s}$ auf 0,5 $\mu\text{L/s}$ reduziert wurden. Für eine maximale Signalausbeute in zukünftigen Messungen wurde daher für die Probenlösung eine Fließgeschwindigkeit von 0,5 $\mu\text{L/s}$ gewählt.

3.2.2.4. Kombination aus reduzierter Flussrate und verschiedenen Inkubationszeiten

Bei den durchgeführten Messungen wurde die Flussrate der Probeninkremente konstant bei 0,5 $\mu\text{L/s}$ beibehalten und die Inkubationszeit variiert. Für den Vergleich der Signalintensitäten wurden Inkubationszeiten von 5 s, 30 s und 60 s gewählt. Die Konzentrationen der verwendeten Antikörper und der Stammlösung (*L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham) blieben

bei dieser Versuchsreihe gleich. Bei einer Inkubationszeit von 60 s im Vergleich zu 5 s konnte das Signal von 1450 auf 1875 a.u. gesteigert werden. Hierbei ist jedoch zu berücksichtigen, dass sich aufgrund der längeren Inkubation der Probeninkremente die Gesamtdauer des Assays verlängert. In Anbetracht des Forschungsziels, einen Schnellnachweis für *L. pneumophila* auf dem Chip zu etablieren, sollte die Assay-Gesamtdauer in die Betrachtungen mit einbezogen werden.

Bei einer Inkubationszeit von 5 s zwischen den Probeinkrementen dauert das Messprogramm 24 min, wogegen eine Verlängerung der Inkubation auf 30 s eine 36-minütige Messung bedeutet. Bei einer Minute Inkubation zwischen den einzelnen Probeinkrementen würde der gesamte Assay 44 Minuten Messdauer benötigen. Aufgrund des angestrebten Ziels, einen Schnellnachweis für *L. pneumophila* zu entwickeln, wurde beschlossen, eine Inkubationszeit von 30 s auszuwählen.

3.2.2.5. Einfluss der Waschgeschwindigkeit auf das Chemilumineszenzsignal

In dem nachfolgenden Experiment wurde untersucht, ob eine Verringerung der Flussrate des Waschpuffers über den Chip einen Einfluss auf die Intensität des Chemilumineszenzsignals hat. Hierbei wurden Flussraten von 100 $\mu\text{L/s}$ und 500 $\mu\text{L/s}$ näher betrachtet. Die verwendete *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham-Stammlösung, wies eine Konzentration von $4,01 \times 10^7$ KBE/mL auf und wurde mit 0,5 $\mu\text{L/s}$ über den Chip gepumpt. Die Konzentration des verwendeten Fänger- und Detektions-Antikörpers in der Spotting-Lösung betrug 2,5 mg/mL bzw. 4 – 5 $\mu\text{g/mL}$. Für das Markierungsenzym wurde SA-HRP mit 4 $\mu\text{g/mL}$ eingesetzt.

Mit der Reduzierung der Fließgeschwindigkeit des Waschschrilles von 500 $\mu\text{L/s}$ auf 100 $\mu\text{L/s}$ wurde lediglich eine Signalerhöhung von ca. 10 % erreicht. Dieser Schritt hat offensichtlich wenig Einfluss auf die Signalintensität. Da im Rahmen der Doktorarbeit die Etablierung des Messprogramms essentiell ist, wird zukünftig trotz nur geringer Signalsteigerung eine Flussrate von 100 $\mu\text{L/s}$ für die Waschschrilles verwendet

3.2.2.6. Austausch des Markierungs-Enzyms: SA-poly-HRP anstatt SA-HRP

Bei der nächsten Änderung wurde das Markierungsenzym Streptavidin-poly-HRP anstatt dem Markierungsenzym SA-HRP eingesetzt. 5 Poly-Meerrettichperoxidase Homopolymere koppeln mit Streptavidin zu einem Streptavidin-poly-(40)-Meerrettichperoxidase-Molekül (siehe Abbildung 14 in Kapitel 2.3.3.1.1.3). Da mehr Streptavidin mit Luminol und H_2O_2 in einer Chemilumineszenzreaktion umgesetzt wird (siehe Abbildung 34), ist ein deutlich höheres CL-Signal zu erwarten.

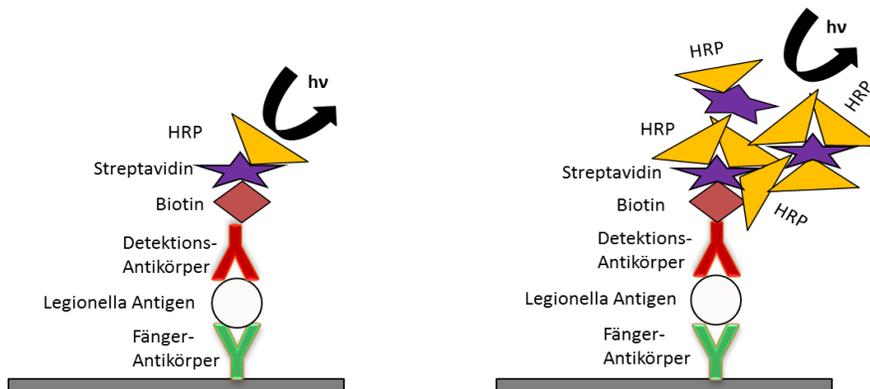


Abbildung 34: Darstellung des durchgeführten Sandwich-ELISA und die Erhöhung des Chemilumineszenzsignals durch Nutzung von SA-poly-HRP.

Es wurde eine *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham-Stammlösung, von $2,24 \times 10^8$ KBE/mL verwendet. Die Inkubationszeit der Probe betrug 30 s, die Konzentration von Detektions- und Fänger-Antikörper betrug 4 – 5 $\mu\text{g/mL}$ bzw. 2,5 mg/mL in der Spotting-Lösung. Für die Konzentration von SA-poly-HRP wurde 1/10 der Konzentration ausgewählt, welche beim Markierungsenzym SA-HRP zum Einsatz gekommen war ($c = 0,4 \mu\text{g/mL}$).

Bei den durchgeführten Messungen konnte eine Signalsteigerung von 2.500 a.u. auf 25.000 a.u. erreicht werden, was dem Faktor 10 entspricht. Es ist deutlich erkennbar, dass die Verwendung des Markierungsenzyms einen sehr großen Einfluss auf die Höhe des CL-Signals mit sich bringt. In weiteren Messungen sollte überprüft werden, welche Konzentration an Poly-Streptavidin-HRP für eine hohe Signalintensität mit geringen Hintergrundsignalen am besten geeignet ist.

3.2.2.7. *Optimierung der Konzentration an SA-poly-HRP*

Für die Optimierung der SA-poly-HRP Konzentrationen wurden 0,2 µg/mL und 0,4 µg/mL eingesetzt. Es wurde eine *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham-Stammlösung ($c = 6,59 \times 10^7$ KBE/mL), verwendet. Die Konzentration des biotinylierten Detektionsantikörpers betrug 4 – 5 µg/mL, die des immobilisierten Fänger-Antikörpers 2,5 mg/mL in der Spotting-Lösung. Es wurde eine Fließgeschwindigkeit von 0,5 µl/s und eine Inkubationszeit von 30 s gewählt.

Für eine SA-poly-HRP-Konzentration von 0,2 µg/mL wurde ein CL-Signal von 2.700 a.u. bestimmt. Mit einer Konzentration von 0,4 µg/mL eingesetzt konnte eine Signalintensität von 5.850 a.u. erreicht werden. Das entspricht einer Signalsteigerung um den Faktor 2. Bei solchen Untersuchungen muss jedoch auch das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis berücksichtigt werden. Dafür wurde von jeder SA-poly-HRP-Konzentration (0,2 µg/mL und 0,4 µg/mL) jeweils eine Dreifach-Bestimmung mit 3 verschiedenen Chips durchgeführt.

In der nachfolgenden Tabelle 5 ist erkennbar, dass zwar eine Signalsteigerung erreicht werden konnte, jedoch bei allen durchgeführten Messungen das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis annähernd konstant bleibt. Das bedeutet, dass ein höheres Probensignal automatisch einen höheren Hintergrund mit sich bringt, was eine erschwerte Detektion und Quantifizierung von niedrigen Bakterienkonzentrationen bedeutet, weil die Sensitivität verloren geht.

Tabelle 5: Vergleich von Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis durch Einsatz von 2 verschiedenen Konzentrationen SA-poly-HRP.

Konzentration SA-poly-HRP	0,4 µg/mL	0,2 µg/mL
Signalintensität Probe	5.800 a.u.	2.800 a.u.
Signalintensität Hintergrund	1.450 a.u.	580 a.u.
Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis	4,00	4,83

Für die untersuchte Stammlösung nimmt das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis bei höherem Probensignal leicht ab. Man kann also davon ausgehen, dass mit einer Steigerung der SA-poly-HRP Konzentration auch das Probensignal zunimmt, jedoch im gleichen Rahmen auch das

Hintergrundsignal. Insgesamt ist das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis also annähernd gleich. Möglicherweise kann sogar eine verringerte Sensitivität für niedrige Konzentrationen die Folge sein. Welchen Einfluss eine Erhöhung der SA-poly-HRP Konzentration zusätzlich noch auf die Auswertbarkeit des Chips hat, sollen nachfolgenden Bilder 35 A und B bei unterschiedlicher SA-poly-HRP Konzentration verdeutlichen:



Abbildung 35 A und B: Bild der CCD-Kamera von Mikroarray-Messungen mit SA-poly-HRP-Konzentrationen von 0,2 und 0,4 µg/mL (Setup: Stammlösung: *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham ($c = 6,59 \times 10^7$ KBE/mL), Detektions-Antikörper: pAb anti-*L. pneumophila*, biotinyliert ($c = 4 - 5$ µg/mL); Fänger-Antikörper: pAb anti-*L. pneumophila*, unmarkiert ($c = 2,5$ mg/mL); Fließgeschwindigkeit: 0,5 µl/s; Inkubationszeit: 30 s).

Die Fotos zeigen deutlich, dass bei einer erhöhten Konzentration des Markierungsenzyms unerwünschte Nebeneffekte auftreten, die eine gute Auswertung des Chips mittels Auswertesoftware erschweren. Es ist eine starke Schlierenbildung erkennbar, die sich über dem gesamten Chip ausgebreitet hat. Die Auslesesoftware passt ein Gitter an die Auswertesignale an, die sich in einer Reihe befinden. Die 10 hellsten Pixel eines Spots im Gitter werden ausgewertet. Durch die hohen Hintergrundsignale könnte es zum Auslesen eines falsch-erhöhten Messsignals kommen, das durch eine Verdünnung des Markierungsenzyms vermieden werden kann. Aufgrund der beiden Nachteile einer höheren SA-poly-HRP-Konzentration, wird bei allen weiteren Messungen eine SA-poly-HRP-Konzentration von 0,2 µg/mL gewählt.

3.2.2.8. Optimierung der Konzentration des Detektions-Antikörpers

Bei den durchgeführten Messungen wurde untersucht, wie das Probensignal sich in seiner Intensität verändert, wenn verschiedene Konzentrationen des biotinylierten Detektions-Antikörpers eingesetzt werden. Dafür wurden drei verschiedene Konzentrationen (2 – 2,5, 4 – 5

und 8 – 10 µg/mL) getestet. Es wurde eine Stammlösung von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham mit einer Konzentration von $5,15 \times 10^8$ KBE/mL, verwendet. Die Konzentration an SA-poly-HRP wurde bei 0,2 µg/mL belassen. Die Fließgeschwindigkeit der Stammlösung betrug 0,5 µL/s, die Inkubationszeit wurde mit 30 s definiert.

Bei einer Detektions-Antikörper-Konzentration von 2 – 2,5 µg/mL wurde ein CL-Signal von 26.800 a.u. bestimmt, bei 4 – 5 µg/mL betrug das Signal 40.000 a.u. und bei 8 – 10 µg/mL konnte sogar eine Signalintensität von 45.200 a.u. ermittelt werden. Es lässt sich gut erkennen, dass eine maximale Signalsteigerung von 50 % erreicht werden kann, wenn die Konzentration des Detektions-Antikörpers verdoppelt wird. Das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis wurde ebenfalls betrachtet, denn es nimmt auch Einfluss auf die Festlegung einer Konzentration des biotinylierten Detektions-Antikörpers für alle weiteren Messungen. Hierfür wurde eine Stammlösung mit einer Konzentration von $1,63 \times 10^8$ KBE/mL verwendet. Denn nur mit einem hohen Verhältnis zwischen Signal und Hintergrund kann gewährleistet werden, dass auch kleine Konzentration im Schnellnachweisverfahren detektiert werden können, ohne durch Schlieren oder erhöhten Hintergrund beeinflusst zu werden (siehe Tabelle 6). Die Signalintensität des Hintergrundes wurde in zwei „leeren“ Reihen bestimmt, wo kein Antikörper immobilisiert wurde.

Tabelle 6: Vergleich von Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis für die verschiedenen eingesetzten Konzentrationen des biotinylierten Detektions-Antikörpers.

Konzentration Detektions-Antikörper	2 – 2,5 µg/mL	4 – 5 µg/mL	8 – 10 µg/mL
Signalintensität Probe	2.650 a.u.	4.100 a.u.	4.550 a.u.
Signalintensität Hintergrund	565 a.u.	863 a.u.	985 a.u.
Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis	4,69	4,75	4,62

Die oben angeführte Tabelle 6 zeigt, dass eine Veränderung der Detektions-Antikörper-Konzentration ebenso keinen Einfluss auf das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis hat. Da das Ziel der Programmetablierung das höchste CL-Probensignal ist, wird in zukünftigen Messungen mit der höchsten Antikörper-Konzentration von 8 – 10 µg/mL gearbeitet. Die nachfolgenden CCD-

Kamera-Messbilder der 3 verschiedenen Detektions-Antikörper-Konzentrationen sollen das ermittelte Ergebnis bestätigen (Abbildung 36 A, B und C).

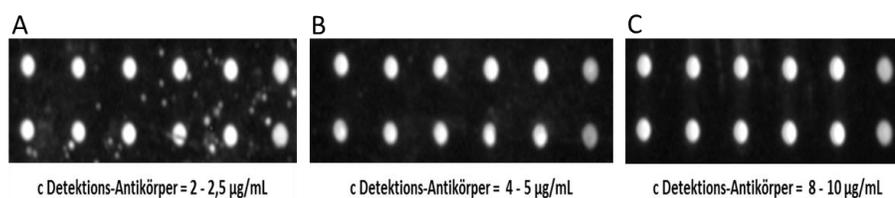


Abbildung 36 A, B und C: Bilder der CCD-Kamera für Mikroarray-Messungen mit verschiedenen Konzentrationen des biotinylierten Detektions-Antikörpers. (Setup: Stammlösung: *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham ($c = 5,15 \times 10^8$ KBE/mL); Fänger-Antikörper: pAb anti-*L. pneumophila*, unmarkiert ($c = 2,5$ mg/mL); Markierungsenzym SA-poly-HRP ($c = 0,2$ µg/mL); Fließgeschwindigkeit: 0,5 µl/s; Inkubationszeit: 30 s).

Anhand der oben aufgeführten Bilder ist ersichtlich, dass trotz Erhöhung der Detektions-Antikörper-Konzentration die Spots klar definiert und mit der Auswertesoftware gut zu rastern und auszuwerten sind. Es sind keine unspezifischen Bindungen an der Chip-Oberfläche erkennbar.

3.2.2.9. Gesamtdarstellung aller Optimierungsschritte

In Rahmen der durchgeführten Assay-Optimierungen wurden alle Messparameter mit Einfluss auf die Intensität des Chemilumineszenz-Signals überprüft und so weit angepasst, um das höchstmögliche Messsignal bei gleichzeitig minimaler Messzeit zu erreichen.

Nach Durchführung aller Optimierungsschritte konnte eine Steigerung des Chemilumineszenzsignals von ca. 200 a.u. auf ca. 45.000 a.u. erzielt werden. Das entspricht einer Signalintensitäts-Steigerung in Höhe von Faktor 225. Die größte Steigerung der CL-Signalintensität wurde durch die Verwendung von SA-poly-HRP anstatt SA-HRP erreicht. Der Einfluss von SA-poly-HRP auf die Signalintensitätssteigerung beläuft sich auf ca. 900 %. Weiterhin einen Einfluss haben die Interaktionszeit der Probeninkremente in der Flusszelle, die Flussrate der Probe über den Chip, die Konzentration von SA-poly-HRP sowie die Konzentration des biotinylierten Detektionsantikörpers. Zusammengefasst konnte ein schnelles und effektives

Messprogramm für die Bestimmung und Quantifizierung von *L. pneumophila* etabliert werden. In nachfolgender Abbildung 37 sind die Anteile der Einflussfaktoren nochmal dargestellt:

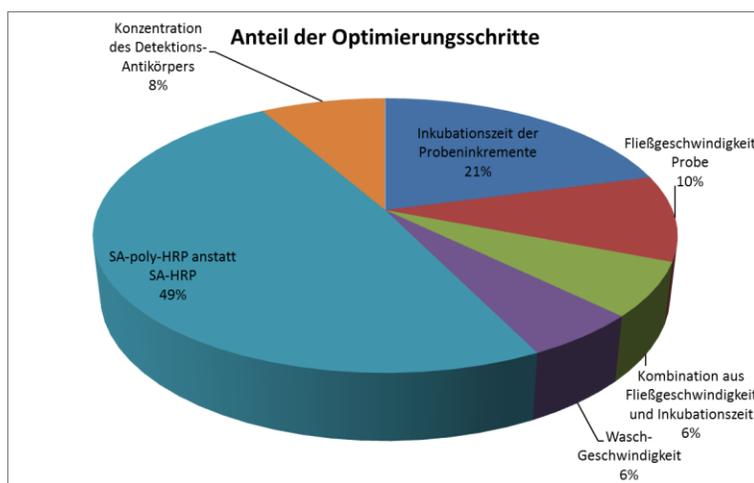


Abbildung 37: Die Anteile der einzelnen Optimierungsfaktoren an der Erhöhung des Chemilumineszenz-Signals der Probe.

3.2.2.10. Etabliertes Messprogramm für die Bestimmung von *L. pneumophila*

Die erste Aufgabe war es, ein Messprogramm zur schnellen Detektion von *L. pneumophila* zu etablieren. Das fertige Messprogramm wurde unter der Bezeichnung „Legionella_Anika_2014_Fzv/h“ am MCR 3 abgespeichert und kann von jedem Nutzer aufgerufen werden. Die Abfolge im Legionellen-Messprogramm ist folgende:

600 µL Probe mit enthaltenem Antigen (LPS-Strukturen von *L. pneumophila*) werden nach der manuellen Injektion über die Flusszelle gepumpt. Dies geschieht mit einer Flussrate von 0,5 µL/s im Stopp-Flow-Modus mit 60-µL-Inkrementen und 30 s Interaktionszeit. Nach einem Waschschrift mit 2.000 µL Laufpuffer bei einer Flussrate von 100 µL/s werden 600 µL des Biotin-markierten Detektionsantikörpers mit 2 µL/s und 5 s Interaktionszeit zwischen 60-µL-Inkrementen durch das System gepumpt. Danach erfolgt ein weiterer Waschschrift. Zur Detektion nutzt man die starke Bindung von Streptavidin und Biotin und leitet Streptavidin-poly-HRP durch das fluidische System. Ungebundenes SA-poly-HRP wird durch einen weiteren Waschschrift mit Laufpuffer (2.000 µL, 100 µL/s) entfernt. Zuletzt werden die Chemilumineszenz-Reagenzien (je 200 µL Luminol und Wasserstoffperoxid) durch die Flusszelle geleitet (20 µL/s). Das emittierte Chemilumineszenzsignal wird dann von einer CCD-Kamera für

eine Dauer von 60 s aufgezeichnet. Nach dem Experiment wird die gesamte Flusszelle dreimal mit 1.000 µL Laufpuffer und einer Flussrate von 68 µL/s gespült. Die gesamte Messdauer für eine Probe beträgt 36 Minuten (siehe Tabelle 7).

Tabelle 7: Übersicht der Einzelschritte des etablierten Legionellen-Messprogrammes am MCR 3.

	Volumen	Flussrate
Probeninjektion	600 µl	stop-flow Modus mit 0,5 µl/s und 30s Interaktionszeit; 12 loops
Waschschritt	2000 µl	100 µl/s
Biotin-markierter Detektions-Antikörper	600 µl	stop-flow Modus mit 2µl/s und 5s Interaktionszeit; 12 loops
Waschschritt	2000 µl	20 µl/s
SA-poly-HRP	600 µl	20 µl/s kontinuierlicher Fluss
Waschschritt	2000 µl	100 µl/s
Chemilumineszenzsubstrate Luminol und Peroxid	200 µl von jedem Substrat	20 µl/s
Bild mit CCD-Kamera	-	60 s
Waschschritt	1500 µl	500 µl/s
	3 x 1000 µl	68 µl/s
Programm-Dauer	36 min	

Im Anhang A ist die Programmierabfolge des Legionellen-Messprogramms aufgeführt. Dieses kann mit Hilfe der Bediensoftware und beiden vorliegenden Dateien (Source-Datei und Binär-Datei) auf jedes beliebige MCR 3-Gerät mit Beckhoff-Steuerung aufgespielt werden. In nachfolgender Tabelle 8 wird nochmal dargestellt, in welchen Konzentrationen (bzw. Verdünnungen) alle einzelnen Antikörper und Reagenzien für das etablierte Messprogramm eingesetzt werden:

Tabelle 8: Aufstellung der verwendeten Reagenzien für das etablierte Legionellen-Messprogramm mit deren Konzentration (bzw. Verdünnung).

Antikörper/ Reagenz	Konzentration [µg/mL] (Verdünnung)
Detektions-Antikörper (pAb-Biotin)	8-10 µg/mL (1:500)
SA-poly-HRP	0,2 µg/mL (1:5000)
Luminol/ Peroxid	unverdünnt
Laufpuffer	0,5 % Casein in PBS

3.3. Charakterisierung der einzelnen Antikörper

Für die Entwicklung des Sandwich-Mikroarray-Immunoassays war es wichtig, ein geeignetes Panel an Antikörpern zu charakterisieren. Dieses Panel sollte dann in Multiplex-Anordnung auf einem Mikroarray-Chip immobilisiert werden. Zum Anfang der Arbeiten lag nur ein Stamm von *L. pneumophila* SG 1 vor. Daher wurden die ersten Charakterisierungsuntersuchungen mit *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, durchgeführt (zur Verfügung gestellt vom LGL, Legionellenlabor, Oberschleißheim). Da die Antikörper die Lipopolysaccharidstrukturen (LPS) detektieren, wurden für die meisten Messungen am MCR 3 hitzeinaktivierte Stammlösungen von *L. pneumophila* eingesetzt.

3.3.1. Polyklonaler Antikörper

Im Rahmen der Verifizierung des etablierten CL-SMIA wurde mit einem Set aus polyklonalem, unmarkierten Fänger-Antikörper und polyklonalem, biotinylierten Detektions-Antikörper gearbeitet. Ziel war es, den polyklonalen Fänger-Antikörper zu testen. Als erster Schritt wurde eine Kalibriergerade aufgenommen.

3.3.1.1. Kalibrierung von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, mit polyklonalem Fänger-Antikörper in ultrareinem Wasser

Zur Verifizierung des Sandwich- Mikroarray-Immunoassay für *L. pneumophila* mit polyklonalem, unmarkierten Fänger-Antikörper und biotinyliertem, polyklonalen Detektionsantikörper wurde eine Kalibrierung von *L. pneumophila* SG 1, St Bellingham in ultrareinem Wasser aufgenommen. Die hergestellte Stammlösung wurde zuerst mittels Durchflusszytometrie quantifiziert und danach hitzeinaktiviert. Die so ermittelten Konzentrationen der anschließend am MCR 3 gemessenen Kalibrierlösungen waren 0 KBE/mL, $1,6 \times 10^2$ KBE/mL, $1,6 \times 10^3$ KBE/mL, $1,6 \times 10^4$ KBE/mL, $1,6 \times 10^5$ KBE/mL, $1,6 \times 10^6$ KBE/mL, $1,6 \times 10^7$ KBE/mL und $1,6 \times 10^8$ KBE/mL. Durch semilogarithmische Auftragung der Chemilumineszenz-Signale gegen die Legionellenkonzentration wurde eine sigmoidale Kalibrierfunktion erhalten (siehe Abbildung 38).

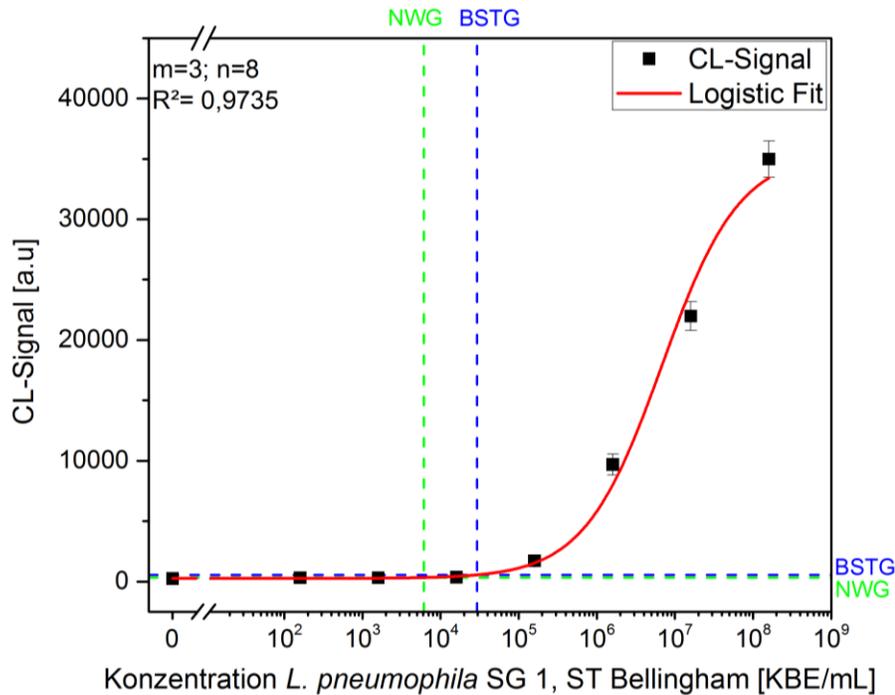


Abbildung 38: Detektion von verschiedenen Konzentrationen von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham (hitzeinaktiviert in ultrareinem Wasser) mit polyklonalem Fänger-Antikörper (pAb); Kalibrierkurve mit sigmoidaler Fitfunktion.

Die Nachweisgrenze (NWG) definiert sich aus CL-Signal der Nullprobe (Blank) plus 3-facher Standardabweichung, die Bestimmungsgrenze (BSTG) hingegen wurde mit Nullprobe und 10-facher Standardabweichung bestimmt. Als Nachweisgrenze für den polyklonalen Fänger-Antikörper wurde eine *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham-Konzentration von $6,1 \times 10^3$ KBE/mL, ermittelt. Die Bestimmungsgrenze lag bei einer Konzentration von $2,9 \times 10^4$ KBE/mL. Die Steigung des linearen Bereichs der Kalibrierkurve belief sich auf 0,44. Der Testmittelpunkt betrug $6,8 \times 10^6$ KBE/mL.

Andere ELISA-Testformate, bei denen die Detektion mit einem polyklonalen Antikörper durchgeführt wird, können Nachweisgrenzen von 10^3 bis 10^4 KBE/mL liefern. Es ist ersichtlich, dass der etablierte CL-SMIA in dieser Konstellation im gleichen Konzentrationsbereich der Nachweisgrenze liegt. Er ist also generell geeignet, um eine Quantifizierung von *L. pneumophila* SG 1 durchzuführen. Jedoch ist lediglich eine Ja/Nein-Antwort in Bezug auf das Vorkommen von *L. pneumophila* SG 1 möglich. Im Rahmen eines Schnell-Nachweisverfahrens ist dieses Assay-Format jedoch einer Kultivierung auf Selektiv-Nährmedium vorzuziehen, allein wegen der

Zeitersparnis von mehreren Tagen im Vergleich zu einer Detektion mit Kultur. Aufgrund des eingeschränkten Arbeitsbereiches innerhalb von einer Logstufe sollte zusätzlich zur Detektion mit Sandwich-Mikroarray-Immunoassay immer eine weitere Vergleichsmethode zur Quantifizierung benutzt werden.

3.3.1.2. Kalibrierung von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, mit polyklonalem Fänger-Antikörper in Oberflächenwasser

Um zu überprüfen, ob die Antikörper-Kombination aus unmarkiertem polyklonalem Fänger-Antikörper und biotinyliertem, polyklonalem Detektionsantikörper auch auf andere Wasser-Matrices übertragbar ist, wurde die gleiche Kalibrierung in Oberflächenwasser (Flusswasser aus der Würm) durchgeführt. Es ist davon auszugehen, dass bei der Blindprobe ein höheres CL-Signal erwartet werden kann, weil *L. pneumophila*-LPS scheinbar natürlicherweise im Oberflächenwasser vorkommen.

Für die Kalibrierung wurde eine Stammlösung von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, erstellt, am Durchflusszytometer quantifiziert und anschließend hitzeinaktiviert. Die hergestellte Kalibrierlösung wurde am Durchflusszytometer quantifiziert. Anschließend wurden verschiedene Verdünnungen der Kalibrierlösung hergestellt. Die so eingestellten Konzentrationen waren 0 KBE/mL, 10 KBE/mL, $1,0 \times 10^2$ KBE/mL, $1,0 \times 10^3$ KBE/mL, $1,0 \times 10^4$ KBE/mL, $1,0 \times 10^5$ KBE/mL, $1,0 \times 10^6$ KBE/mL, $1,0 \times 10^7$ KBE/mL und $1,0 \times 10^8$ KBE/mL. Die am Messtag vor der Versuchsreihe gesammelten Würm-Oberflächenwasserproben wurden mit den Kalibrierlösungen aufgestockt. Die somit erhaltenen Oberflächenwasserproben mit verschiedenen Konzentrationen an *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, wurden für die Messungen am MCR 3 eingesetzt. Durch semilogarithmische Auftragung der Chemilumineszenz-Signale gegen die Legionellenkonzentration wurde eine sigmoidale Kalibrierfunktion erhalten (siehe Abbildung 39).

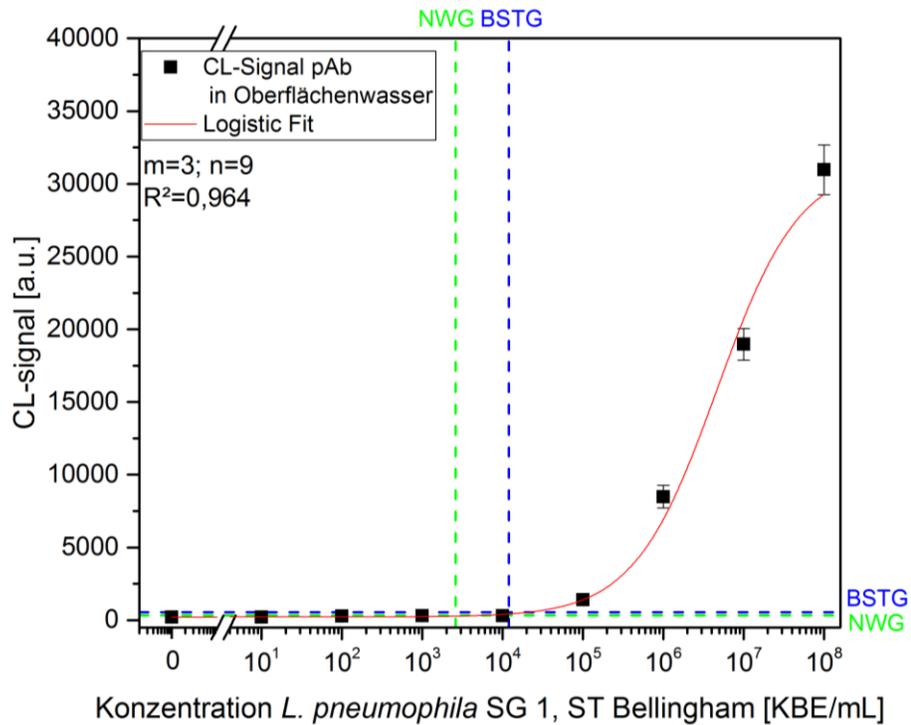


Abbildung 39: Detektion mit polyklonalem Fänger-Antikörper (pAb) von verschiedenen Konzentrationen von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham (hitzeinaktiviert), zugegeben in Oberflächenwasser (Fluss Würm); Kalibrierkurve mit sigmoidaler Fitfunktion.

Für die Kalibrierung des polyklonalen Fänger-Antikörpers in Oberflächenwasser wurde die Nachweisgrenze bei einer *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham-Konzentration von $2,6 \times 10^3$ KBE/mL ermittelt. Die Bestimmungsgrenze wurde bei einer Konzentration von $1,2 \times 10^4$ KBE/mL gefunden. Der ermittelte Testmittelpunkt der Kalibrierkurve lag bei $4,7 \times 10^6$ KBE/mL und die Steigung des linearen Bereichs der Kalibrierung betrug 0,27.

Um beide Kalibrierkurven zu vergleichen und damit zu beurteilen, ob der polyklonale Fänger-Antikörper in Oberflächenwasser die gleiche Performance bietet wie in ultrareinem Wasser, wurden beide Kalibrierkurven in einer Tabelle gegenübergestellt (siehe Tabelle 9).

Tabelle 9: Gegenüberstellung von NWG, BSTG, Testmittelpunkt und Steigung der beiden Kalibrierkurven des polyklonalen Fänger-Antikörpers aufgenommen in Reinstwasser und Oberflächenwasser.

Merkmal Kalibrierkurve	Polyklonaler Fänger-Antikörper (pAb) in ultrareinem Wasser	Polyklonaler Fänger-Antikörper (pAb) in Oberflächenwasser (Würm)
Nachweisgrenze (NWG)	$6,1 \times 10^3$ KBE/mL	$2,6 \times 10^3$ KBE/mL
Bestimmungsgrenze (BSTG)	$2,9 \times 10^4$ KBE/mL	$1,2 \times 10^4$ KBE/mL
Testmittelpunkt	$6,8 \times 10^6$ KBE/mL	$4,7 \times 10^6$ KBE/mL
Steigung	0,44	0,27

Wenn man beide Kalibrierkurven miteinander vergleicht, wird deutlich, dass der Testmittelpunkt der Kalibrierkurve in Oberflächenwasser sich um den Faktor 1,4 nach links geschoben hat. Die Nachweisgrenze des polyklonalen Fänger-Antikörpers in ultrareinem Wasser lag bei $6,1 \times 10^3$ KBE/mL, wohingegen im Oberflächenwasser eine Nachweisgrenze von $2,6 \times 10^3$ KBE/mL erreicht werden konnte.

Die verminderte Signalintensität für den polyklonalen Fänger-Antikörper in ultrareinem Wasser hat mehrere mögliche Ursachen: Zum ersten wurden die Experimente mit dem polyklonalen Antikörper pAb in ultrareinem Wasser zu einem früheren Zeitpunkt als die Experimente mit pAb in Oberflächenwasser durchgeführt. Es kann also sein, dass sich die Lagerungsbedingungen des Antikörpers zum Messzeitpunkt unterschieden haben. Weiterhin wurde für die Messungen zwar wieder ein Stamm *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, verwendet, jedoch wurde für die Kalibrierkurve in Oberflächenwasser eine andere Stammlösung verwendet. Dies war nötig, um Alterungserscheinungen bei den verwendeten Stammlösungen auszuschließen. Es ist auch denkbar, dass bei einer Kultivierung von lebenden Zellen mal mehr und mal weniger LPS an der Zellmembran generiert wird (je nach optimalen Wachstumsbedingungen). Die Anzahl der gebildeten LPS-Strukturen an der Membranoberfläche entscheidet über die Signalintensität bei den Messungen, da der Antikörper die LPS-Strukturen an der Bakterienmembran detektiert. Die Methode funktioniert in Oberflächenwasser nicht schlechter als in ultrareinem Wasser.

Eine quantitative Aussage kann nur mit hochselektiven monoklonalen Antikörpern erfolgen, weil über den verwendeten polyklonalen Fänger-Antikörper immer der Summenparameter an *L. pneumophila* SG 1 – 12 detektiert wird.

Das Verwenden eines polyklonalen Antikörpers bringt Risiken mit sich. Bei dem hier verwendeten polyklonalen Detektions-Antikörper ist lediglich eine Ja/Nein-Aussage über das Vorkommen von *L. pneumophila* SG 1 – 12 möglich. Es ist keine Differenzierung in Subgruppen möglich. Die notwendige Konzentration für ein CL-Signal mit dem verwendeten Fänger-Antikörper wurde durch die Bestimmung der Nachweisgrenze mit der Kalibrierung definiert. Somit ist eine quantitative Aussage auch mit einer Screening-Methode möglich, wenn die vorab definierten Schwellenwerte überschritten werden. Weiterhin weist der polyklonale Fänger-Antikörper Kreuzreaktivitäten mit anderen Serogruppen auf. Er ist kommerziell für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1 – 12 erhältlich. Das heißt jedoch, dass bei einer unbekanntem Umweltprobe keine Aussage über *L. pneumophila* SG 1 getroffen werden kann. Der Screening-Charakter dieser Methode bleibt davon jedoch unberührt. Eine Subtypisierung ist nur durch die Verwendung von monoklonalen Fänger-Antikörpern möglich, die selektiv bestimmte *L. pneumophila* SG 1-Subgruppen detektieren.

Der verwendete polyklonale Fänger-Antikörper wurde bisher nur für Patientenurin eingesetzt. Mit der Kalibrierkurve in Oberflächenwasser konnte nachgewiesen werden, dass mit dem etablierten CL-SMIA unter Verwendung des polyklonalen Fänger-Antikörpers auch Umweltproben vermessen werden können. Als nächster Schritt wird daher untersucht, ob neben hitzeinaktivierten *L. pneumophila* auch lebende Mikroorganismen in Oberflächenwasser detektiert werden können.

*3.3.1.3. Aufkonzentrierung von Oberflächenwasser mit einer neuen
Kombinationsmethode aus Monolithischer Adsorptions-Filtration (MAF) und
Zentrifugaler Ultrafiltration (ZeUF)*

Im Rahmen einer Prinzipstudie wurde Wasser mit einem neu entwickelten Kombinationsverfahren aus MAF, ZeUF und CL-SMIA untersucht. Ziel war es hierbei, große Mengen an Oberflächenwasser soweit aufzukonzentrieren, so dass auch eine Detektion einer sehr geringen *L. pneumophila*-Konzentration ermöglicht werden konnte. Es wurden Wasserproben mittels monolithischer Adsorptions-Filtration aufkonzentriert. Anschließend wurde eine zentrifugale Ultrafiltration durchgeführt, um das endgültige Probenvolumen auf 1

mL einzuengen. Diese Probe wurde schließlich mit dem etablierten CL-SMIA am MCR 3 vermessen. Hierbei sollte untersucht werden, ob diese neu etablierte Kombinationsmethode aus MAF, ZeUF und CL-SMIA in der Lage ist, eine Sensitivitätssteigerung zu ermöglichen. Weiterhin sollte parallel dazu untersucht werden, ob der verwendete polyklonale Fänger-Antikörper neben Urinen und hitzeinaktivierten Zellen auch für lebende Mikroorganismen eingesetzt werden kann. Die Kalibrierkurven ohne und mit vorgeschalteter Aufkonzentrierung wurden mit Oberflächenwasser (Würm) aufgenommen. Diese beiden Kalibrierkurven wurden danach miteinander verglichen. Für die Messungen wurde eine *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham-Stammlösung verwendet. Die Vorgehensweise für die Herstellung der Kalibrierstandards wurde außer der fehlenden Hitzeinaktivierung beibehalten, und somit Konzentrationen der Kalibrierlösungen auf 0 KBE/mL, 10 KBE/mL, $1,0 \times 10^2$ KBE/mL, $1,0 \times 10^3$ KBE/mL, $1,0 \times 10^4$ KBE/mL, $1,0 \times 10^5$ KBE/mL, $1,0 \times 10^6$ KBE/mL und $1,0 \times 10^7$ KBE/mL eingestellt. Das Oberflächenwasser für die Aufkonzentrierungsexperimente wurde mit den Kalibrierlösungen aufgestockt. Für die Experimente ohne vorherige Aufkonzentrierung wurden die Stammlösungen in Oberflächenwasser direkt vermessen. Vor den Aufkonzentrierungs-Experimenten wurde der pH-Wert der 10-Liter-Wasserproben auf pH 3 eingestellt. In nachfolgender Abbildung 40 sind beide Kalibrierkurven dargestellt:

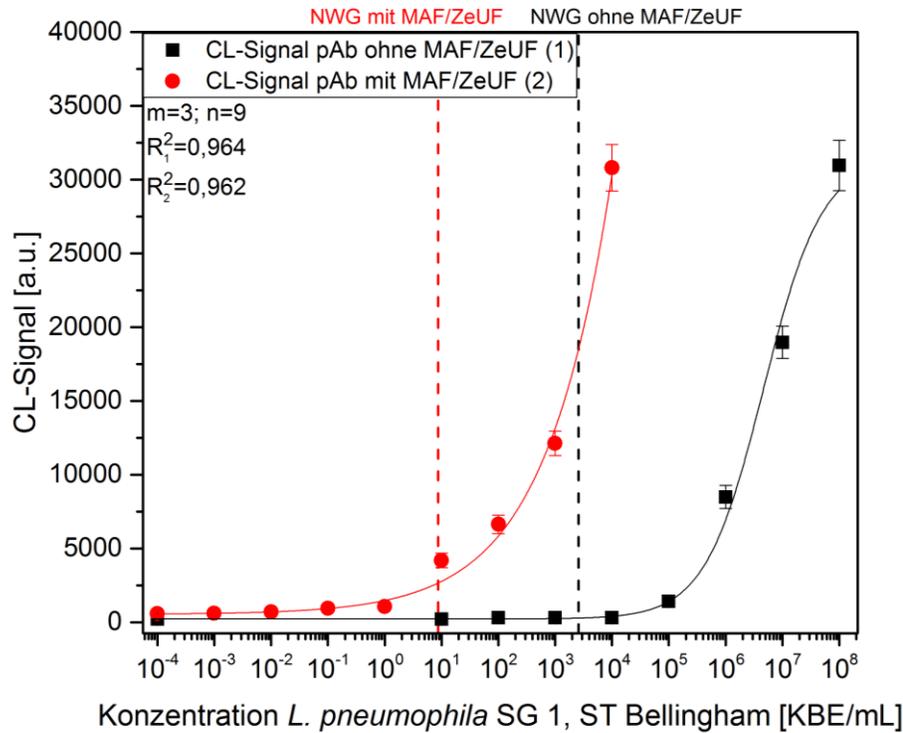


Abbildung 40: Detektion von verschiedenen Konzentrationen von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, in Oberflächenwasser (Würm) mit polyklonalem Antikörper pAb mit und ohne vorherige Aufkonzentrierung; Kalibrierkurven mit sigmoidaler Fitfunktion.

Es wurden die Nachweisgrenzen für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, mit dem polyklonalen Fänger-Antikörper pAb in Oberflächenwasser ermittelt. Dafür wurde die Nachweisgrenze ohne und mit vorgeschalteter Aufkonzentration bestimmt. Für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, in Oberflächenwasser ohne MAF/ZeUF konnte eine Nachweisgrenze von $2,6 \times 10^3$ KBE/mL ermittelt werden. Die Nachweisgrenze für pAb mit MAF/ZeUF beläuft sich auf 8,7 KBE/mL. Der Arbeitsbereich für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, mit pAb ohne vorherigen Aufkonzentration umfasst einen Konzentrationsbereich von $0,9 \times 10^5$ KBE/mL bis $8,9 \times 10^7$ KBE/mL, wohingegen mit vorheriger Aufkonzentration im Konzentrationsbereich von 87 KBE/mL bis $2,1 \times 10^3$ KBE/mL eine Quantifizierung erfolgen kann. Die Testmittelpunkte der Kalibrierkurven befanden sich bei $4,7 \times 10^6$ KBE/mL für pAb ohne vorherige Aufkonzentrierung und bei $1,5 \times 10^3$ KBE/mL, wenn die Aufkonzentrierung vorab angewendet wurde. Die Steigungen im linearen Bereich der beiden

Kalibrierkurven wurden ohne Aufkonzentrierung bei 0,27 und mit Aufkonzentrierung bei 0,69 bestimmt.

Wenn man diese beiden Kalibrierkurven miteinander vergleicht, wird sehr schnell deutlich, welche Sensitivitätssteigerung durch die Anwendung einer vorherigen Aufkonzentrierung möglich ist. Mit dem polyklonalen Fänger-Antikörper werden *L. pneumophila* SG 1 – 12 nachgewiesen. Durch die Durchführung der Aufkonzentrierungsmethode (Kombination aus monolithischer Adsorptionsfiltration und zentrifugaler Ultrafiltration vor dem Messen der Oberflächenwasser-Probe am MCR 3, kann die Nachweisgrenze von $2,6 \times 10^3$ KBE/mL auf 8,7 KBE/mL abgesenkt werden. Das entspricht einer Sensitivitätssteigerung um den Faktor 300 bzw. 2,5 Logstufen.

Wenn nach vorheriger Aufkonzentrierung einer (Oberflächen)Wasserprobe bei der anschließenden Messung am MCR 3 mit dem polyklonalen Fänger-Antikörper ein positives Chemilumineszenz-Signal erhalten wird, kann man davon ausgehen, dass sich über 8,7 KBE/mL *L. pneumophila* SG 1 – 12 in der untersuchten Probe befinden. Es wurde erstmals mit Realproben und lebenden Bakterien gearbeitet. Es konnte nachgewiesen werden, dass der polyklonale Fänger-Antikörper nicht nur LPS-Strukturen erkennt.

3.3.1.4. Zusammenfassung

In den durchgeführten Messungen für den polyklonalen Fänger-Antikörper konnte vor allem nachgewiesen werden, dass ein Screening von Realproben mit dem etablierten CL-SMIA möglich ist. Da der verwendete Fänger-Antikörper eine breite Spezifität für *L. pneumophila* SG 1 – 12 aufweist, kann er für Screening-Anwendungen gut eingesetzt werden. Nachteilig ist die vergleichsweise hohe Fehlerrate, da nicht alle Serogruppen von *L. pneumophila* gleich abgedeckt werden. Weiterhin ist nur im Rahmen der vorab definierten Nachweisgrenze eine Quantifizierung möglich, da alle Proben mit CL-Signalen oberhalb dieser Grenze als positiv eingestuft werden können.

Da auf den Subtyp Bellingham kalibriert wurde, ist zumindest für diesen Typ eine quantitative Aussage möglich. Sobald jedoch in einer Realprobe mehrere *L. pneumophila*-Subtypen und Serogruppen vorliegen, kann nur noch ein Summenparameter von *L. pneumophila* SG 1 – 12

angegeben werden. Um dieses Problem zu lösen, wird im nächsten Kapitel ein Panel an monoklonalen Antikörpern charakterisiert. Es wurden verschiedene Versuche mit einem Panel an selektiven und hochsensitiven monoklonalen Fänger-Antikörpern, die spezifisch nur eine Subgruppe von *L. pneumophila* SG 1 detektieren, durchgeführt.

3.3.2. Monoklonale Antikörper

Bei der Etablierung eines Multiplex-Chips für die Detektion von *L. pneumophila* wurde zuerst mit *L. pneumophila* SG 1 und deren Subtypen begonnen, da *L. pneumophila* SG 1 für mehr als 80 % aller Legionellose-Ausbrüche in Nordamerika und Europa verantwortlich und damit von besonderer Bedeutung ist. Für den Nachweis von *L. pneumophila* SG 1 reicht ein Paar aus unmarkiertem polyklonalen Fänger-Antikörper und biotinyliertem polyklonalen Detektionsantikörper nicht aus. Eine erste Identifikation und Zuordnung zu einer Subgruppe im Rahmen eines schnellen Screenings im Ausbruchsfall sollte mit dem Legionella-Multiplex-Chip ermöglicht werden. Grundlage hierfür war das Dresden-Panel des Legionella-Konsiliarlabors in Dresden. Bei dem Panel handelt es sich um Zellkulturüberstände, die unaufgereinigt in einem ELISA routinemäßig nur für Patientenurin eingesetzt wurden. Im Rahmen der Doktorarbeit wurden diese Zellüberstände durch einen externen Partner aufgereinigt und erstmals für den etablierten CL-SMIA eingesetzt. Es sollte ein Antikörper-Panel charakterisiert werden, welches dann im Rahmen eines Schnellnachweisverfahrens für die routinemäßige Untersuchung von verschiedenen Realproben eingesetzt werden kann. Als weiterer Aspekt wurde betrachtet, ob mit einem monoklonalen Antikörper eine selektive Zuordnung zu einer Subgruppe erfolgen kann. Weiterhin sollte überprüft werden, ob die etablierte Kombinationsmethode aus MAF-ZeUF und CL-SMIA auch für monoklonale Antikörper einsetzbar ist. Ebenso sollten verschiedene Realproben mit dem Antikörper-Panel getestet werden.

Für eine erste Einschätzung der Antikörper-Performance wurden mit den monoklonalen Antikörpern mAb 10/6, mAb 20/1, mAb 8/4 und mAb 3/1 Kalibrierkurven in ultrareinem Wasser aufgenommen. Diese Ergebnisse sollten anschließend mit den erhaltenen Werten der Kalibrierung mit dem polyklonalen Fänger-Antikörper pAb für *L. pneumophila* SG 1 – 12 verglichen werden.

Für die Messungen wurden zuerst die monoklonalen Antikörper mAb 10/6 und mAb 20/1 für *L. pneumophila* SG 1, die vom Legionella-Konsiliarlabor in Dresden zur Verfügung gestellt wurden, auf dem Messchip immobilisiert. Der Antikörper-Sandwich wurde dann mit dem bereits etablierten biotinyliertem polyklonalen Detektionsantikörper (Meridian Lifescience) gebildet. Die Detektion erfolgte gemäß des etablierten Assay-Protokolls mit SA-poly-HRP und den Chemilumineszenzsubstraten Luminol und Wasserstoffperoxid. Als Stammlösung wurde der bereits für die Assayoptimierung verwendete *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham-Stamm, in verschiedenen Verdünnungen eingesetzt.

3.3.2.1. Kalibrierung der monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6 und mAb 20/1

Zur Charakterisierung des Sandwich-Mikroarray-Immunoassay für *L. pneumophila* mit den monoklonalen Fänger-Antikörpern mAb 10/6 und mAb 20/1 und biotinyliertem, polyklonalen Detektionsantikörper wurde eine Kalibrierkurve von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, in ultrareinem Wasser aufgenommen. Die beiden verwendeten Antikörper detektieren beide *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham (siehe Übersicht Dresden Panel im Kapitel 2.3.3.2). Der monoklonale Antikörper mAb 10/6 ist hierbei hochselektiv für Bellingham, mit mAb 20/1 ist noch eine Detektion von OLDA und Bellingham möglich. Ein gleichzeitiges Positivsignal von mAb 10/6 und mAb 20/1 erlaubt laut Clusteranalyse eine eindeutige Identifizierung von ST Bellingham. Das bedeutet, wenn ein positives Signal von diesen beiden Antikörpern vorliegt, müssen in der untersuchten Probe *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, enthalten sein.

Die Kalibrierlösungen der *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham-Stammlösung, wurde nach etabliertem Protokoll hergestellt. Die Konzentrationen der Kalibrierlösungen wurden auf 0 KBE/mL, $1,0 \times 10^2$ KBE/mL, $1,0 \times 10^3$ KBE/mL, $1,0 \times 10^4$ KBE/mL, $1,0 \times 10^5$ KBE/mL, $1,0 \times 10^6$ KBE/mL, $1,0 \times 10^7$ KBE/mL und $1,0 \times 10^8$ KBE/mL eingestellt. Es wurde der monoklonale Fänger-Antikörper mAb 10/6 in einer Konzentration von 0,74 mg/mL auf dem Chip immobilisiert. Die Durchführung des CL-SMIA am MCR 3 erfolgte mit den etablierten Parametern des Messprogramms (siehe Abbildung 41).

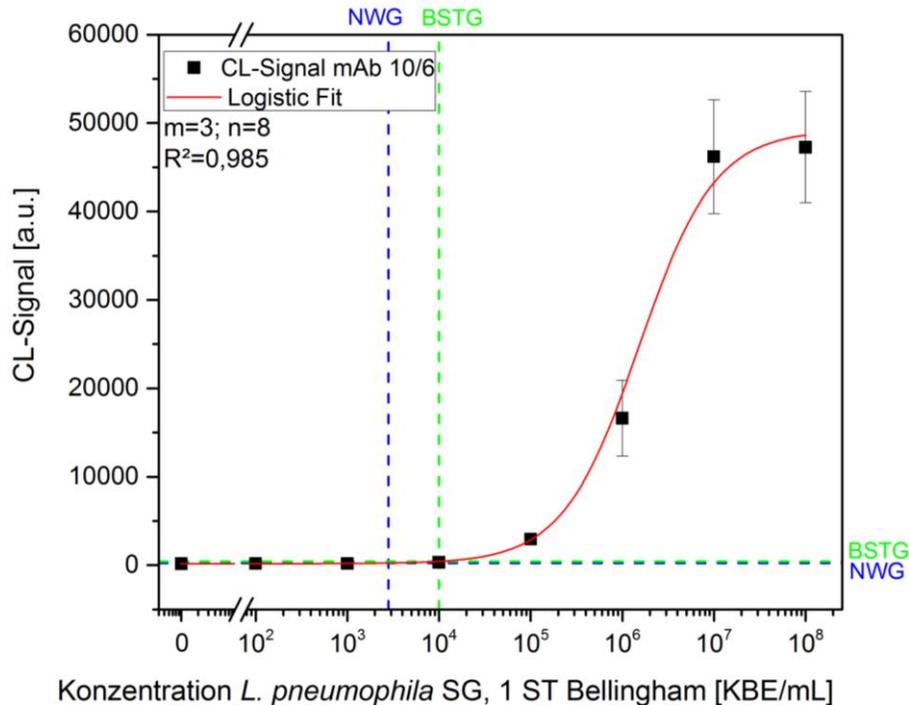


Abbildung 41: Detektion von verschiedenen Konzentrationen von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham (hitzeinaktiviert), in ultrareinem Wasser mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6; Kalibrierkurve mit sigmoidaler Fitfunktion.

Die Nachweisgrenze wurde aus der Signalintensität der Blindprobe plus der dreifachen Standardabweichung bestimmt. Die Bestimmungsgrenze definierte sich durch das Chemilumineszenzsignal der Blindprobe plus der 10-fachen Standardabweichung. Für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6 wurde eine Konzentration von $2,8 \times 10^3$ KBE/mL als Nachweisgrenze ermittelt. Die Bestimmungsgrenze wurde bei einer Konzentration von $1,0 \times 10^4$ KBE/mL definiert. Für die Steigung des linearen Bereichs wurde ein Wert von 0,60 bestimmt. Der Testmittelpunkt der Kalibrierkurve für den Nachweis von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham in ultrareinem Wasser mit dem monoklonalen Antikörper 10/6 (mAb) lag bei $1,5 \times 10^6$ KBE/mL.

Für die Aufnahme der Kalibrierkurve des monoklonalen Fänger-Antikörpers mAb 20/1 wurde identisch verfahren. Die verwendete Konzentration des monoklonalen Antikörpers mAb 20/1 lag hierbei bei 0,36 mg/mL in der Spotting-Lösung. Durch semilogarithmische Auftragung der Chemilumineszenz-Signale von mAb 20/1 gegen die Konzentration von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham erhält man eine sigmoidale Kalibrierfunktion (siehe Abbildung 42).

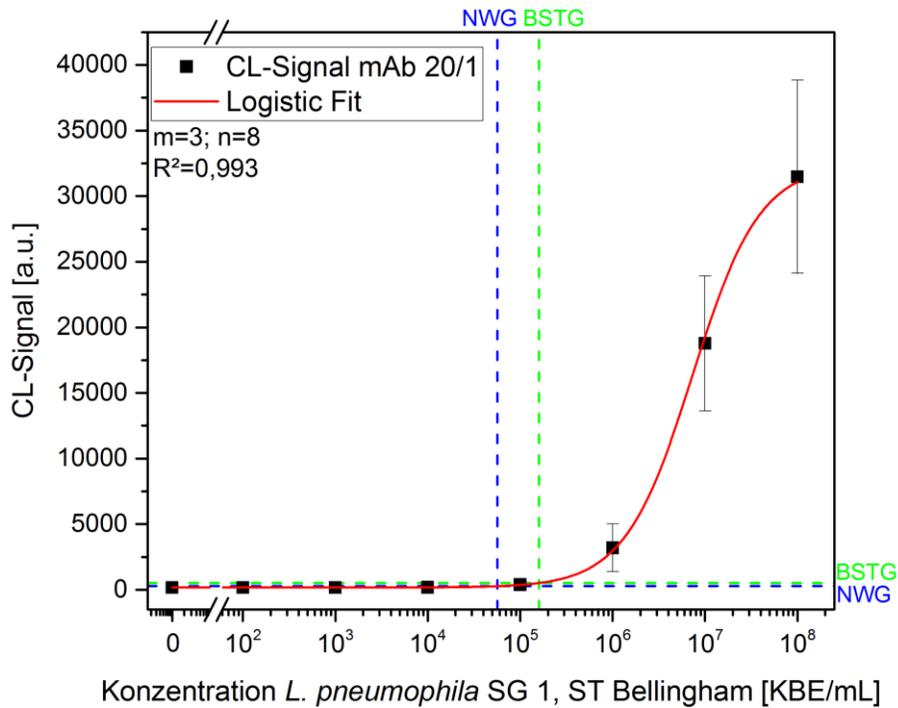


Abbildung 42: Detektion von verschiedenen Konzentrationen von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham (hitzeinaktiviert) in ultrareinem Wasser mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 20/1; Kalibrierkurve mit sigmoidaler Fitfunktion.

Es wurde für *L. pneumophila* SG 1, St Bellingham, eine Konzentration von $5,6 \times 10^4$ KBE/mL als Nachweisgrenze für die Detektion mit mAb 20/1 ermittelt. Die Bestimmungsgrenze wurde bei einer Konzentration von $1,6 \times 10^5$ KBE/mL definiert. Der Anstieg des linearen Bereichs für den Nachweis von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, mit dem monoklonalen Antikörper 20/1 (mAb) lag bei 0,83. Der Testmittelpunkt der Kalibrierkurve wurde bei $7,30 \times 10^6$ KBE/mL ermittelt.

Es wurden zwei Kalibriergeraden mit dem Stamm *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, für die monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6 und mAb 20/1 in ultrareinem Wasser aufgenommen. Beide wurden mit einem polyklonalen biotinylierten Detektions-Antikörper (pAb) gegen *L. pneumophila* SG 1 – 12 detektiert. Zuerst konnte gezeigt werden, dass beide monoklonalen Antikörper eine gute Performance in ultrareinem Wasser bieten. Eine Verwendung der monoklonalen Antikörper ist auch außerhalb des Mediums Urin möglich. Ein Einsatz als monoklonale Antikörper zum Aufbau eines Testpanels für ein schnelles Screening von *L. pneumophila* SG 1 ist auf alle Fälle möglich.

Die beiden monoklonalen Antikörper weisen eine sehr unterschiedliche Sensitivität gegen *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, auf. Die Nachweisgrenze für mAb 10/6 liegt bei $2,8 \times 10^3$ KBE/mL, für mAb 20/1 liegt sie hingegen bei $5,6 \times 10^4$ KBE/mL. Die Nachweisgrenze unterscheidet sich also beim gleichen Legionellen-Stamm um eine Logstufe, was dafür spricht, dass der monoklonale Antikörper mAb 10/6 eine weitaus höhere Selektivität für *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, besitzt. Jeder monoklonale Antikörper weist eine spezielle Affinität zu einem bestimmten Analyten auf. Das ist jedoch von Stamm zu Stamm sehr unterschiedlich und stark abhängig von der Affinität. Ein Einsatz der beiden Antikörper in Kombination auf einem Multiplex-Chip ist trotzdem sinnvoll, weil beim Einsatz eines Antikörper-Panels eine eindeutige Zuordnung zu einem Subtyp von *L. pneumophila* SG 1 erfolgen kann.

3.3.2.2. Kalibrierung des monoklonalen Fänger-Antikörpers mAb 8/4

Es sollte eine Charakterisierung des Sandwich-Mikroarray-Immunoassay für *L. pneumophila* mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 8/4 und dem biotinylierten polyklonalen Detektionsantikörper (pAb) außerhalb der Matrix Urin durchgeführt werden. Dafür wurde eine Kalibrierkurve von *L. pneumophila* SG 1, ST OLDA, in ultrareinem Wasser aufgenommen. Der monoklonale Fänger-Antikörper mAb 8/4 wurde mit einer Konzentration von 0,26 mg/mL immobilisiert. Die Kalibrierlösungen wurden nach etabliertem Protokoll auf folgende Konzentrationen eingestellt: 0 KBE/mL, $1,0 \times 10^2$ KBE/mL, $1,0 \times 10^3$ KBE/mL, $1,0 \times 10^4$ KBE/mL, $1,0 \times 10^5$ KBE/mL, $1,0 \times 10^6$ KBE/mL, $1,0 \times 10^7$ KBE/mL und $1,0 \times 10^8$ KBE/mL. Die Messung am MCR 3 erfolgte mit dem Messprogramm und allen definierten Parametern.

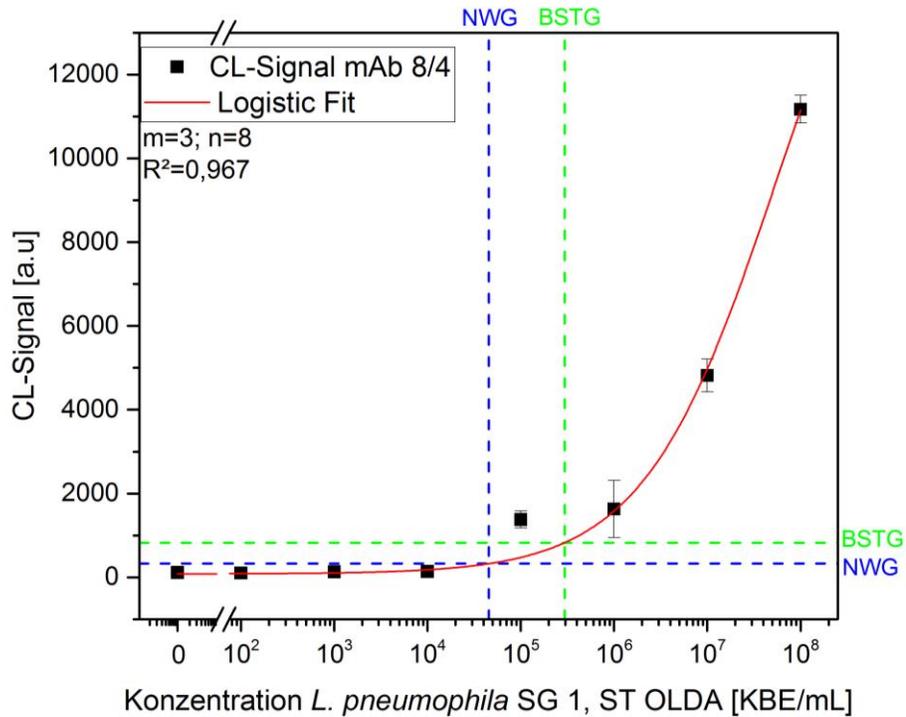


Abbildung 43: Detektion von verschiedenen Konzentrationen von *L. pneumophila* SG 1, ST OLDA (hitzeinaktiviert), in ultrareinem Wasser mit dem monoklonalen Antikörper mAb 8/4; Kalibrierkurve mit sigmoidaler Fitfunktion.

Die Ermittlung der Nachweis- und Bestimmungsgrenzen erfolgte analog zu mAb 10/6 und mAb 20/1. Für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST OLDA mit mAb 8/4 wurde eine Nachweisgrenze von $4,5 \times 10^4$ KBE/mL ermittelt. Die Bestimmungsgrenze wurde bei einer Konzentration von $2,9 \times 10^5$ KBE/mL definiert. Die Steigung des linearen Bereichs lag bei 0,37. Der Testmittelpunkt der Kalibrierkurve wurde bei $5,55 \times 10^7$ KBE/mL bestimmt.

Die Detektion und Quantifizierung von *L. pneumophila* SG 1, ST OLDA, mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 8/4 auf Basis des CL-SMIA ist gut möglich. Um eine eindeutige Zuordnung zur monoklonalen Subgruppe OLDA im Gegensatz zu Oxford machen zu können, ist der Einsatz eines weiteren selektiven monoklonalen Antikörpers (hier mAb 20/1) notwendig. Nur wenn mAb 8/4 und mAb 20/1 zusammen ein positives Signal geben, ist im Rahmen einer Clustererkennung eine eindeutige Identifizierung von OLDA möglich. Es wird ersichtlich, dass

durch den Einsatz eines hoch selektiven, sehr affinen Antikörper-Panels eine gute Differenzierung zwischen den verschiedenen *L. pneumophila* SG 1-Subtypen erfolgen kann.

3.3.2.3. Kalibrierung des monoklonalen Fänger-Antikörpers mAb 3

Im nachfolgenden Experiment wurde der monoklonale Fänger-Antikörper mAb 3 charakterisiert und eine Kalibrierkurve von *L. pneumophila* SG 1, ST Heysham, aufgenommen. Die Wahl fiel auf diesen Stamm, weil es sich hierbei um einen in der Umwelt relativ häufig vorkommenden Stamm handelt. Weiterhin konnte der andere mögliche Stamm, Knoxville, zu diesem Zeitpunkt noch nicht erfolgreich kultiviert werden. Die Konzentrationen der Kalibrierlösungen wurden analog zum etablierten Protokoll eingestellt. Der monoklonale Fänger-Antikörper mAb 3 wurde mit einer Konzentration von 2,3 mg/mL auf den Chips immobilisiert. Die Erstellung der Kalibrierkurve mit dem CL-SMIA am MCR 3 erfolgte analog zu den Messungen für die anderen monoklonalen Fänger-Antikörper. Die Nachweis- und Bestimmungsgrenze wurden mit der Signalintensität der Blindprobe plus der 3-fachen bzw. 10-fachen Standardabweichung bestimmt.

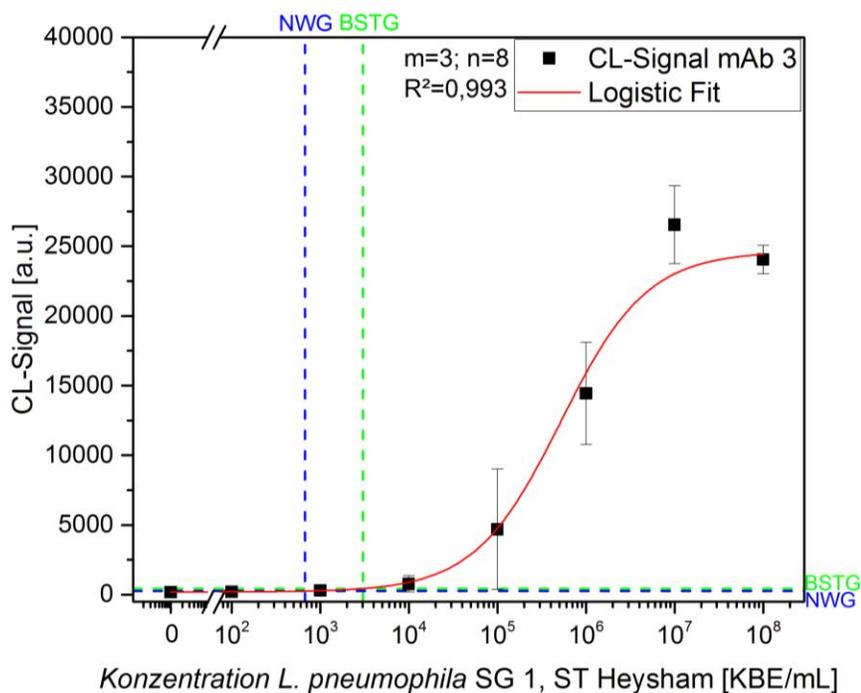


Abbildung 44: Detektion von verschiedenen Konzentrationen von *L. pneumophila* SG 1, ST Heysham (hitzeinaktiviert), in ultrareinem Wasser mit dem monoklonalen Antikörper mAb 3; Kalibrierkurve mit sigmoidaler Fitfunktion.

Als Nachweisgrenze für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Heysham, mit mAb 3 wurde eine Legionellen-Konzentration von $6,7 \times 10^2$ KBE/mL ermittelt. Die Bestimmungsgrenze wurde bei einer Konzentration von $3,0 \times 10^3$ KBE/mL definiert. Der Testmittelpunkt der Kalibrierkurve lag bei $5,2 \times 10^5$ KBE/mL. Die Steigung des linearen Bereiches wurde mit 0,27 bestimmt.

Zur Unterscheidung von *L. pneumophila* SG 1, ST Knoxville, von ST Heysham, die beide mit mAb 3 selektiv nachgewiesen werden können, empfiehlt sich die Verwendung des monoklonalen Antikörpers mAb 3/1. Dieser wird in der nachfolgenden Studie untersucht.

3.3.2.4. Kalibrierung des monoklonalen Fänger-Antikörpers mAb 3/1

Anhand des verwendeten Antikörper-Panels (siehe Kapitel 2.3.3.2) kann man erkennen, dass durch die Verwendung des monoklonalen Fänger-Antikörpers mAb 3/1 eine Unterscheidung zwischen der Pontiac- und Nicht-Pontiac-Gruppe erfolgen kann.

Laut Statistik ist dokumentiert, dass mehr ambulant erworbene und reiseassoziierte Legionellose-Erkrankungen von mAb 3/1-positiven *L. pneumophila*-Stämmen (Pontiac-Gruppe), als von mAb 3/1 negativen Stämmen (Nicht-Pontiac-Gruppe, Umwelt-Stämme) ausgelöst werden [Helbig et al., 2003; Olsen et al., 2009].

Daher ist eine gute Sensitivität und Selektivität des monoklonalen Antikörpers mAb 3/1 für die Pontiac-Stämme (*L. pneumophila* SG 1, ST Philadelphia, Knoxville, Benidorm, France und Allentown) notwendig. Um im Falle eines Screenings im Ausbruchmanagement eine schnelle Aussage über das Vorhandensein dieser infektiösen Stämme treffen zu können, ist es daher sehr wichtig, verlässliche Kalibrierkurven zu haben, mit denen eine eindeutige Unterscheidung möglich ist.

Um dies zu gewährleisten, wurden mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 3/1 und dem biotinylierten polyklonalen Detektionsantikörper (pAb) Kalibrierkurven mit den Stämmen Philadelphia, Knoxville und Benidorm von *L. pneumophila* SG 1 in ultrareinem Wasser aufgenommen. Die Stämme France und Allentown konnten im Zeitraum dieser Arbeit nicht kultiviert werden. Für eine bessere Übersichtlichkeit werden alle 3 Kalibrierkurven nacheinander aufgeführt.

Die hergestellten Stammlösungen von *L. pneumophila* SG 1, ST Philadelphia, Knoxville und Benidorm, wurden nach Standardprotokoll eingestellt. Die Konzentrationen der Kalibrierlösungen waren 0 KBE/mL, $1,0 \times 10^2$ KBE/mL, $1,0 \times 10^3$ KBE/mL, $1,0 \times 10^4$ KBE/mL, $1,0 \times 10^5$ KBE/mL, $1,0 \times 10^6$ KBE/mL, $1,0 \times 10^7$ KBE/mL und $1,0 \times 10^8$ KBE/mL. Es wurde der monoklonale Fänger-Antikörper mAb 3/1 für alle 3 Kalibrierkurven auf den Chips immobilisiert. Die dabei verwendete Konzentration betrug 0,22 mg/mL. Nachfolgend sind alle 3 Kalibrierkurven aufgeführt (siehe Abbildung 45 – 47).

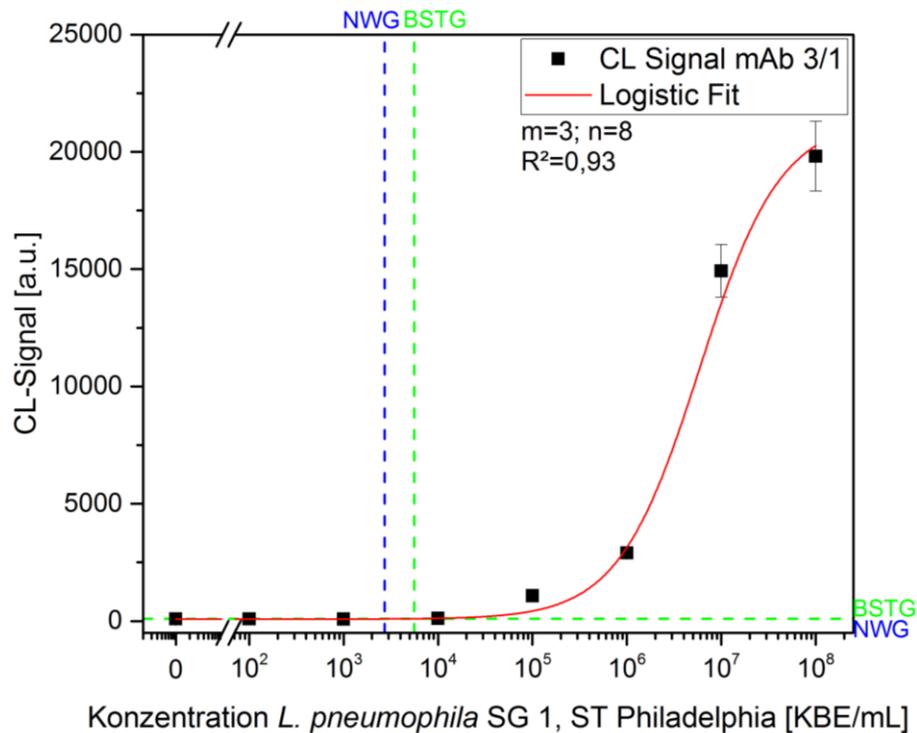


Abbildung 45: Detektion von verschiedenen Konzentrationen von *L. pneumophila* SG 1, ST Philadelphia (hitzeinaktiviert), in ultrareinem Wasser mit dem monoklonalen Antikörper mAb 3/1; Kalibrierkurve mit sigmoideal Fitfunktion.

Für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Philadelphia, wurde die Nachweisgrenze bei einer Konzentration von $2,7 \times 10^3$ KBE/mL ermittelt. Die Bestimmungsgrenze wurde bei einer Konzentration von $5,6 \times 10^3$ KBE/mL definiert. Der Testmittelpunkt der Kalibrierkurve lag bei $5,82 \times 10^6$ KBE/mL. Die Steigung im linearen Bereich wurde mit 0,68 bestimmt.

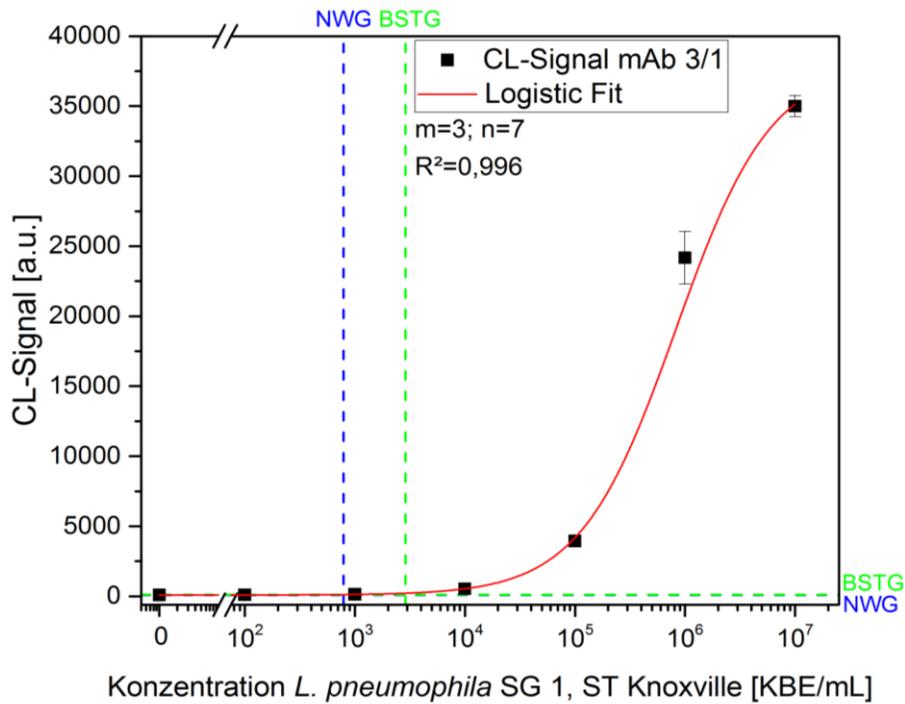


Abbildung 46: Detektion von verschiedenen Konzentrationen von *L. pneumophila* SG 1, ST Knoxville (hitzeinaktiviert), in ultrareinem Wasser mit dem monoklonalen Antikörper mAb 3/1; Kalibrierkurve mit sigmoidaler Fitfunktion.

Für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Knoxville, mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 3/1 wurde die Nachweisgrenze bei einer Legionellen-Konzentration von $7,9 \times 10^2$ KBE/mL ermittelt. Die Bestimmungsgrenze wurde bei einer Konzentration von $2,8 \times 10^3$ KBE/mL definiert. Der Testmittelpunkt der Kalibrierkurve konnte bei $8,2 \times 10^5$ KBE/mL bestimmt werden und die dazugehörige Steigung im linearen Bereich lag bei 0,53.

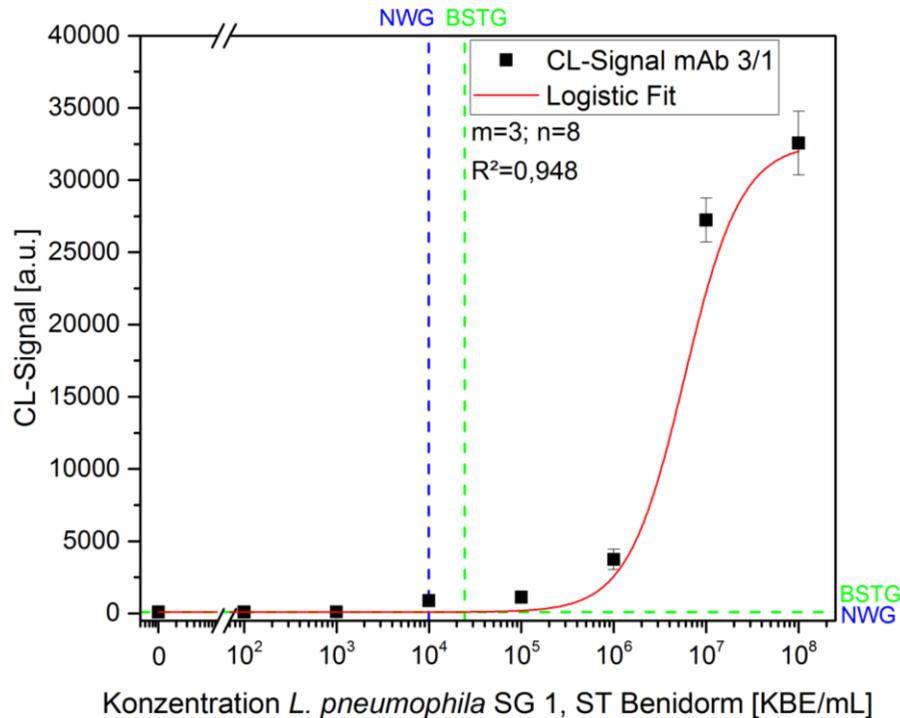


Abbildung 47: Detektion von verschiedenen Konzentrationen von *L. pneumophila* SG 1, ST Benidorm (hitzeinaktiviert), in ultrareinem Wasser mit monoklonalen Antikörper mAb 3/1; Kalibrierkurve mit sigmoidaler Fitfunktion.

Als Nachweisgrenze für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Benidorm, mit mAb 3/1 wurde eine Legionellen-Konzentration von $9,9 \times 10^3$ KBE/mL ermittelt. Die Bestimmungsgrenze wurde bei einer Konzentration von $2,4 \times 10^4$ KBE/mL definiert. Die Steigung des linearen Bereiches konnte mit 0,69 bestimmt werden, der dazugehörige Testmittelpunkt wurde bei $5,87 \times 10^6$ KBE/mL definiert.

Der monoklonale Fänger-Antikörper mAb 3/1 detektiert 5 Subtypen von *L. pneumophila* SG 1, nämlich Knoxville, Philadelphia, Benidorm, France und Allentown. Da die letzten beiden während dieser Arbeit nicht als Stammlösung vorlagen, wurden nur mit den anderen 3 Stämmen (Knoxville, Philadelphia, Benidorm) Kalibrierkurven aufgenommen. Die ermittelten Nachweisgrenzen aller 3 Subtypen lagen zwischen $7,9 \times 10^2$ KBE/mL und $9,9 \times 10^3$ KBE/mL. Die Bestimmungsgrenzen wurden zwischen $2,8 \times 10^3$ KBE/mL und $2,4 \times 10^4$ KBE/mL bestimmt.

Mit dem monoklonalen Antikörper mAb 3/1 kann die sogenannte Pontiac-Gruppe detektiert werden. Wenn man ein eindeutiges Chemilumineszenzsignal mit mAb 3/1 erhält, kann man

zunächst davon ausgehen, dass in der untersuchten Probe *L. pneumophila* SG 1, ST Philadelphia, Knoxville, Benidorm, France oder Allentown enthalten ist. Da man diese fünf Stämme nur mit anderen monoklonalen Antikörpern qualifizieren und somit unterscheiden kann, sollte man die positive Detektion einer Realprobe mit mAb 3/1 als einen Summenparameter betrachten. Da diese 5 monoklonalen Subtypen als infektiös gelten und schon öfter mit Ausbrüchen im Zusammenhang standen, ist bei mAb 3/1-positiven Realproben besonders vorsichtig und umsichtig zu verfahren.

In der nachfolgenden Tabelle 10 werden die ermittelten Parameter der untersuchten monoklonalen Antikörper noch einmal gegenüber gestellt.

Tabelle 10: Gegenüberstellung von NWG, BSTG, Testmittelpunkt und Steigung der beiden Kalibrierkurven des polyklonalen Fänger-Antikörpers aufgenommen in Reinstwasser und Oberflächenwasser.

Monoklonaler Antikörper mit <i>L. pneumophila</i> Stamm	Nachweisgrenze (NWG)	Bestimmungsgrenze (BSTG)	Testmittelpunkt	Steigung
mAb 10/6 (Bellingham)	$2,8 \times 10^3$ KBE/mL	$1,2 \times 10^4$ KBE/mL	$1,5 \times 10^6$ KBE/mL	0,6
mAb 20/1 (Bellingham)	$5,6 \times 10^4$ KBE/mL	$1,6 \times 10^5$ KBE/mL	$7,3 \times 10^6$ KBE/mL	0,83
mAb 8/4 (OLDA)	$4,5 \times 10^4$ KBE/mL	$2,9 \times 10^5$ KBE/mL	$5,6 \times 10^7$ KBE/mL	0,37
mAb 3 (Heysham)	$6,7 \times 10^2$ KBE/mL	$3,0 \times 10^3$ KBE/mL	$5,2 \times 10^5$ KBE/mL	0,27
mAb 3/1 (Philadelphia)	$2,7 \times 10^3$ KBE/mL	$5,6 \times 10^3$ KBE/mL	$5,82 \times 10^5$ KBE/mL	0,68
mAb 3/1 (Knoxville)	$7,9 \times 10^2$ KBE/mL	$2,8 \times 10^3$ KBE/mL	$8,2 \times 10^5$ KBE/mL	0,53
mAb 3/1 (Benidorm)	$9,9 \times 10^3$ KBE/mL	$2,4 \times 10^4$ KBE/mL	$5,87 \times 10^6$ KBE/mL	0,69

3.3.2.5. *MAF und ZeUF in Kombination mit CL-SMIA-Detektion mit monoklonalen Fänger-Antikörpern*

3.3.2.5.1. *Kalibrierkurve für mAb 10/6 in Oberflächenwasser*

Die etablierte Kombinationsmethode aus MAF, ZeUF und CL-SMIA sollte ebenso für den monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6 verwendet werden. Es wurde Oberflächenwasser am Fluss Würm gesammelt, mit *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, aufgestockt und danach vergleichsweise mit und ohne Aufkonzentrierung mit CL-SMIA am MCR 3 vermessen. Es sollte dabei herausgefunden werden, ob sich die monoklonalen Fänger-Antikörper auch für andere Realproben eignen. Weiterhin wurde untersucht, ob auch lebende Mikroorganismen nachgewiesen werden können.

Um die Performance der neu etablierten Kombinationsmethode aus MAF, ZeUF und SMIA mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6 zu ermitteln, wurde eine Kalibrierkurve in Würm-Oberflächenwasser aufgenommen. Diese wurde mit der bereits erstellten Kalibrierkurve ohne Kombinationsmethode verglichen. Es sollte so herausgefunden werden, ob mit der Aufkonzentrierungsmethode vor der Detektion mittels SMIA eine Erhöhung der Sensitivität erreicht werden kann. Die *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham-Stammlösung, wurde nach etabliertem Protokoll hergestellt, quantifiziert und die Konzentrationen der Kalibrierlösungen eingestellt. Die Stammlösungen wurden nicht hitzeinaktiviert, sondern lebend quantifiziert. Die eingestellten Konzentrationen waren 0 KBE/mL, 10 KBE/mL, $1,0 \times 10^2$ KBE/mL, $1,0 \times 10^3$ KBE/mL, $1,0 \times 10^4$ KBE/mL, $1,0 \times 10^5$ KBE/mL, $1,0 \times 10^6$ KBE/mL, $1,0 \times 10^7$ KBE/mL und $1,0 \times 10^8$ KBE/mL. Die Oberflächenwasserproben wurde mit den Stammlösungen aufgestockt und der pH-Wert der 10 L-Proben auf einen Wert von 3 eingestellt. Danach wurden die Stammlösungen aufkonzentriert bzw. für die Experimente ohne vorherige Aufkonzentrierung wurden aufgestockte Oberflächenwasserproben direkt mit dem etablierten CL-SMIA am MCR 3 vermessen. Zum Vergleich werden beide Kalibrierkurven für mAb 10/6 in der Abbildung 48 zusammen dargestellt:

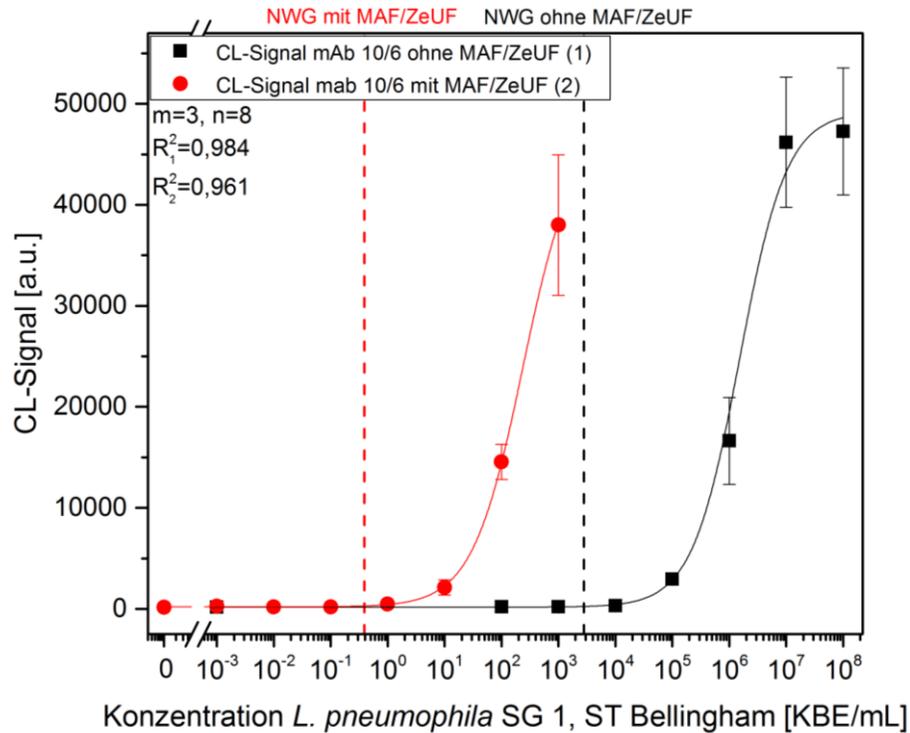


Abbildung 48: Detektion von verschiedenen Konzentrationen von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, in Oberflächenwasser (Würem) mit dem monoklonale Fänger-Antikörper mAb 10/6 mit und ohne vorherige Aufkonzentrierung; Kalibrierkurven mit sigmoidaler Fitfunktion.

Es wurden die Nachweisgrenzen für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, in Oberflächenwasser ermittelt. Dafür wurden die Nachweisgrenzen für den monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6 ohne und mit vorgeschalteter Aufkonzentrierung bestimmt. Für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, mit mAb 10/6 in Oberflächenwasser ohne MAF/ZeUF konnte eine Nachweisgrenze von $2,8 \times 10^3$ KBE/mL ermittelt werden. Die Nachweisgrenze für mAb 10/6 mit MAF/ZeUF beläuft sich auf 0,4 KBE/mL. Der Arbeitsbereich für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, mit mAb 10/6 ohne vorherigen Aufkonzentration umfasst einen Konzentrationsbereich von $4,0 \times 10^5$ KBE/mL bis $5,7 \times 10^6$ KBE/mL, wohingegen mit vorheriger Aufkonzentration im Konzentrationsbereich von $5,7 \times 10^1$ KBE/mL bis 980 KBE/mL eine Quantifizierung erfolgen kann. Der Arbeitsbereich umfasst also bei beiden Methoden eine Logstufe. Die Testmittelpunkte beider Kalibrierkurven wurden bei $1,5 \times 10^6$ KBE/mL für mAb 10/6 ohne vorherige Aufkonzentrierung und $2,4 \times 10^2$ KBE/mL mit

vorheriger Aufkonzentrierung ermittelt. Die Steigung des linearen Bereichs belief sich auf 0,6 ohne Aufkonzentrierung bzw. 0,64 mit MAF/ZeUF.

Die Steigung bei beiden Kalibrierkurven hat sich somit nicht verändert. Der Arbeitsbereich wurde durch Aufkonzentrierung jedoch um 4 Logstufen hin zu kleineren Konzentrationen verschoben, was ungefähr dem Aufkonzentrierungsfaktor entspricht (es werden 10 Liter auf 1 mL aufkonzentriert). Im Vergleich der beiden Kalibrierkurven für den monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6 mit und ohne vorherige Aufkonzentrierung wird deutlich, dass eine enorme Sensitivitätssteigerung erreicht werden kann. Diese bedeutet eine Senkung der Nachweisgrenze von $2,8 \times 10^3$ KBE/mL ohne MAF/ZeUF auf 0,4 KBE/mL mit Anwendung der Aufkonzentrationsmethode (MAF/ZeUF) vor der Messung am MCR 3. Die Sensitivität wird hierbei um den Faktor 7.000 gesteigert. 0,4 KBE/mL von *L. pneumophila* können mit dieser Methode nachgewiesen werden, das heißt, das entwickelte Verbundverfahren ist für diesen monoklonalen Fänger-Antikörper um den Faktor 2,5 sensitiver als der Kulturnachweis, der nach wie vor als Gold-Standard für die Detektion von Legionellen gilt.

3.3.2.5.2. Wiederfindungsbestimmung für MAF, ZeUF und CL-SMIA mit mAb 10/6

Im Rahmen der Betreuung der Masterstudentin Carmen Torggler wurde zusammen anschließend die Reproduzierbarkeit der Kombinationsmethode aus MAF, ZeUF und CL-SMIA untersucht. Dafür wurden Wiederfindungsexperimente in Oberflächenwasser des Flusses Würm durchgeführt.

Für die Multiplex-Analyse wurde auf Mikroarray-Chips der monoklonale Fänger-Antikörper mAb 10/6 immobilisiert. In Wiederfindungsexperimenten wurde Würm-Oberflächenwasser mit Kalibrierlösungen lebender *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, aufgestockt und nach durchgeführter Aufkonzentrierung mit MAF und ZeUF mit dem etablierten CL-SMIA am MCR 3 vermessen.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

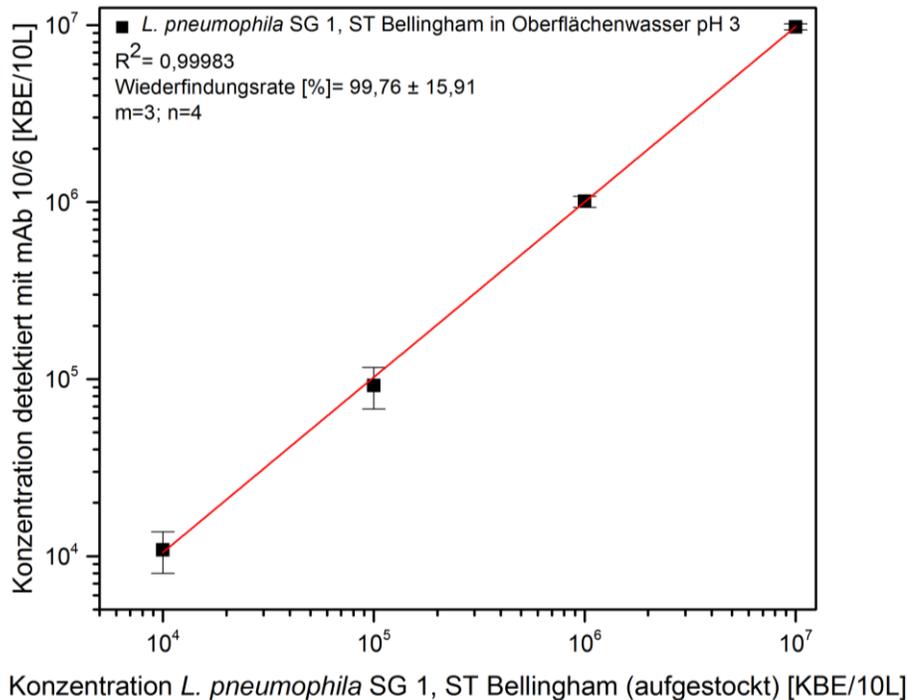


Abbildung 49: Wiederfindungsexperimente von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, in Oberflächenwasser nach MAF, ZeUF und CL-SMIA [gemäß Masterarbeit Carmen Torggler].

Bei den Wiederfindungsexperimenten wurden für Legionellenkonzentrationen von 10^4 , 10^5 , 10^6 und 10^7 KBE/10 L Wiederfindungsraten von $108,5 \pm 28,5$ %, $91,9 \pm 24,2$ %, $100,9 \pm 7,2$ % und $97,8 \pm 3,8$ % ermittelt. Mit diesen Ergebnissen konnte eine durchschnittliche Wiederfindungsrate von $99,8$ % \pm $15,9$ % ermittelt werden. Somit wurde gezeigt, dass diese Kombinationsmethode für die Aufkonzentrierung, bestehend aus MAF und ZeUF, sehr gut reproduzierbar ist. Die Methode weist eine hohe Genauigkeit und Reproduzierbarkeit auf und ist deswegen auch bei hochkomplexen Wasser-Matrices wie z.B. Oberflächenwasser einsetzbar.

Ein Nachweis von *L. pneumophila* mit der Kombinationsmethode aus MAF, ZeUF und CL-SMIA konnte erstmals mit Realproben und dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6 gezeigt werden. Weiterhin wurde mit lebenden Bakterienlösungen aufgestockt. Der verwendete monoklonale Fänger-Antikörper mAb 10/6 erkennt also nicht nur LPS-Strukturen, die in hitzeinaktivierten Stammlösungen frei vorliegen. Um diese Aussage zu untermauern, wurden die MAF-ZeUF-Experimente verifiziert, indem Versuche mit lebenden Bakterien, hitzeinaktivierten Bakterien und reinem LPS durchgeführt wurden.

3.3.2.5.3. Einfluss von lebenden und hitzeinaktivierten Zellen sowie aufgereinigtem LPS auf die Kombinationsmethode aus MAF, ZeUF und CL-SMIA

Es sollte evaluiert werden, ob die etablierte Kombinationsmethode aus MAF, ZeUF und CL-SMIA nur für lebende Bakterien funktioniert, oder ob eventuell auch hitzeinaktivierte Zellen und freies LPS an den Monolithen adsorbieren. Dafür wurde die Kombinationsmethode mit drei verschiedenen Analyten durchgeführt. Die Vorgehensweise war analog zu den vorherigen Experimenten. Es wurde Oberflächenwasser des Flusses Würm gesammelt und dann mit einer *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham-Stammlösung, einmal lebend und einmal hitzeinaktiviert, aufgestockt. Weiterhin wurde künstliches LPS generiert, indem die Methode des Legionellen-Konsiliarlabors aus Dresden adaptiert wurde. Dieses LPS wurde ebenso zu den Oberflächenwasserproben dazu gegeben. Diese drei verschiedenen Wasserproben wurden anschließend auf pH 3 eingestellt und entsprechend mit MAF und ZeUF prozessiert, ehe sie zur Messung am MCR 3 eingesetzt wurden. Auf den Chips wurde der monoklonale Fänger-Antikörper mAb 10/6 immobilisiert. Nachfolgend wird in Abbildung 50 dargestellt, wie sich die Signalintensitäten im Vergleich zu den eingesetzten Ausgangskonzentrationen an *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, verhalten haben.

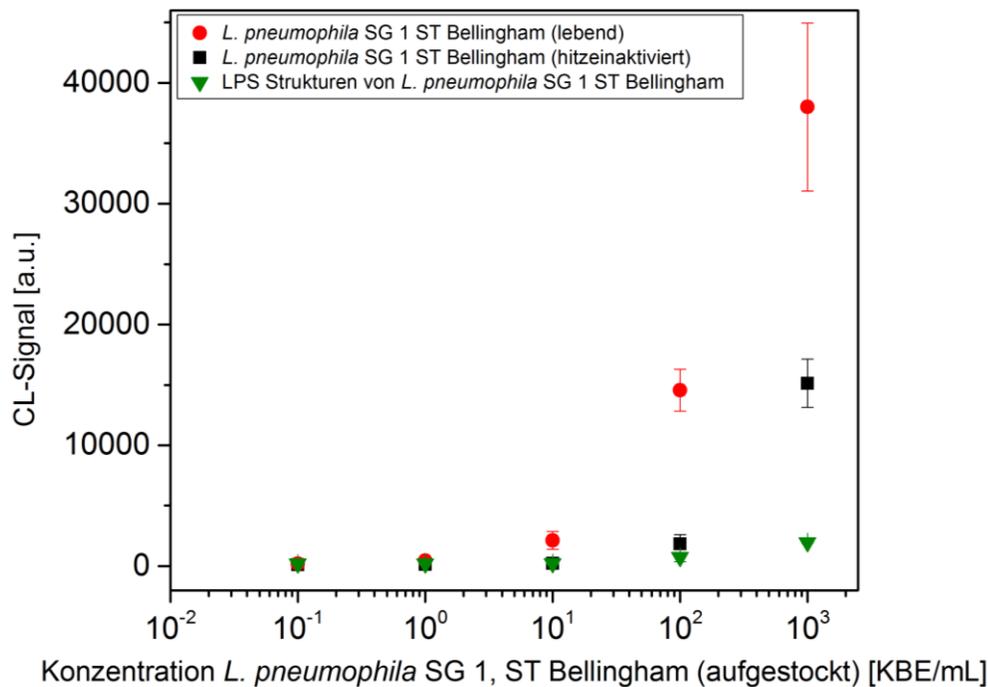


Abbildung 50: Einfluss von hitzeinaktivierten und lebenden Bakterienzellen sowie LPS-Strukturen von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham auf die Signalintensität nach MAF, ZeUF und CL-SMIA [gemäß Masterarbeit Carmen Torggler].

Das CL-Signal wurde für lebende und hitzeinaktivierte Zellen sowie reine LPS-Strukturen von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham bestimmt. Es ist erkennbar, dass das CL-Signal im Vergleich zu lebenden Zellen bei hitzeinaktivierten Zellen bei den Konzentrationen zwischen 10^1 KBE/mL und 10^3 KBE/mL zwischen 60 % und 89 % reduziert ist. Weiterhin lässt sich auch feststellen, dass die Signalintensität der Chemilumineszenz für die freien LPS-Strukturen sogar um 90 bis 95 % niedriger ist. Man kommt zu dem Schluss, dass hitzeinaktivierte Legionellen nicht effizient genug an den Monolithen adsorbieren und somit auch nur unzureichend aufkonzentriert werden können. Freie LPS-Strukturen diffundieren praktisch durch die Poren des Monolithen durch und werden so gut wie gar nicht mit der Kombinationsmethode aufkonzentriert und dementsprechend auch nicht detektiert. Eine mögliche Erklärung wäre, dass die LPS-Strukturen keine Oberflächenladung aufweisen und demnach auch nicht mit den Ladungen des Monolithen in Wechselwirkung treten können, sondern hindurch gehen. Die geringere Adsorption der hitzeinaktivierten Bakterienzellen könnte an der Exprimierung von LPS während der Hitzeinaktivierung erklärt werden. Ebenso ist eine Veränderung der Oberflächenladung der Bakterien während der Hitzeeinwirkung denkbar. Somit könnten die hydrophoben Wechselwirkungen zwischen Bakterienzelle und Monolith nicht effizient genug ausgebildet werden.

Mit allen Resultaten lässt sich bestätigen, dass mit der Etablierung der Aufkonzentrierungsmethode, aus MAF und ZeUF kombiniert mit dem CL-SMIA, eine effektive Methode etabliert wurde, um lebende *L. pneumophila* in Oberflächenwasser anzureichern und zu detektieren. Mit dem monoklonalen Antikörper mAb 10/6 ist eine Subgruppen-spezifische Detektion und Quantifizierung möglich, wenn vorab eine Kalibrierung erstellt wurde. Eine Anwendung im Ausbruchmanagement wäre denkbar, um Patientenproben mit Umweltproben zu korrelieren und schnell den Ausbruchsherd zu identifizieren.

3.3.2.5.4. Untersuchung verschiedener Realproben vom Fluss Isar

Im Rahmen einer Prinzipstudie wurde Oberflächenwasser aus dem bayerischen Fluss Isar mit dem neu entwickelten Kombinationsverfahren aus MAF und ZeUF aufkonzentriert und anschließend mit dem etablierten CL-SMIA am MCR 3 auf enthaltene *L. pneumophila*

untersucht. Das hauptsächliche Ziel hierbei war es, herauszufinden, ob diese Methode auch unter realen Bedingungen ohne künstliches Aufstocken mit *L. pneumophila* Anwendung finden kann. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine anschließende Legionellen-Detektion mit den Fänger-Antikörpern pAb und mAb 10/6 gelingt.

Für die Probenahme an der Isar wurden an 7 verschiedenen Probenahmestellen von der Quelle des Flusses bis hinter München jeweils 3 x 10 Liter Flusswasser entnommen. Dabei sollte vor allem der Fragestellung nachgegangen werden, inwieweit sich die Konzentration an *L. pneumophila* entlang des Flusslaufs verändert. Dafür wurden Sammelstellen ausgewählt, die entweder immer kurz vor bzw. kurz nach einer einleitenden Kläranlage positioniert waren. Die Kläranlagen wurden so ausgewählt, dass das gereinigte Wasser nach dem Prozess in den Fluss Isar eingeleitet wurde. Alle untersuchten Proben wurden dabei mit dem gesammelten Quellwasser des Flusses korreliert. Bei der Probenahme kurz hinter der Quelle kann man davon ausgehen, dass noch kein urbaner Einfluss durch Kläranlagen vorliegt. In der nachfolgenden Abbildung wird die Probenahmeroute graphisch dargestellt (siehe Abbildung 51).

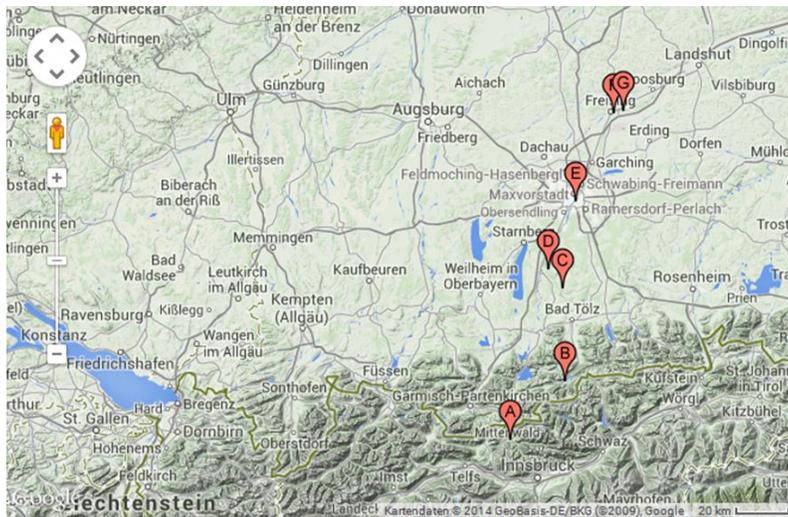


Abbildung 51: Probenahmeroute am Fluss Isar mit 7 markierten Probenahmestellen (erstellt mit Hilfe der Website: www.gps0.de/maps).

In den nachfolgenden Abbildungen 52 A-D werden einige ausgewählte Probenahmestellen an der Isar gezeigt.



Abbildung 52 A-D: Probenahmestellen für Oberflächenwasser an der Isar (Fotos: Anika Wunderlich, Andreas Kunze).

Je 500 μL des gesammelten Wassers wurden zuerst auf Selektivnährmedium GVPC ausplattiert und kultiviert. Der Rest des Wassers wurde auf pH 3 eingestellt und anschließend mittels MAF filtriert. Danach erfolgte eine Desorption der adsorbierten Bakterien vom Monolithen mit 20 mL Glycin-Rinderextrakt-Elutionspuffer und Aufkonzentration des Eluats mittels ZeUF auf ein Endvolumen von 1 mL. Zur Detektion von *L. pneumophila* wurde der CL-SMIA am MCR 3 durchgeführt. Der gesamte Prozess aus Aufkonzentrierung und Detektion dauerte ca. 90 Minuten.

Mittels Kultivierung der Realproben auf GVPC-Selektivnährmedium konnte bezüglich des Vorkommens von *L. pneumophila* keine Aussage getroffen werden. Neben einer stark wuchernden Begleitflora ist nicht eindeutig erkennbar, ob detektierbare Legionellen auf den Platten gewachsen sind (siehe Abbildung 53).



Abbildung 53: Kultur von Oberflächenwasser aus dem Fluss Isar (Sammelstelle 4, 7 und 1) ausplattiert auf GVPC-Selektivnährmedium.

Auch ein erneuter Ausstrich auf Blutagar (Nachweis von Legionellen in 2. Instanz) brachte kein Resultat. Es ist festzustellen, dass die Kultivierung auf Selektivnährmedium nach der anerkannten Methode des Umweltbundesamtes für Trinkwasser/Leitungswasser zwar gut funktioniert, jedoch für Realproben mit Oberflächenwasser nicht so leicht übertragbar ist. Es kommt zu einer Überwucherung der Platte mit Begleitflora, schnell wachsenden Bakterien und Schimmelpilzen. Eine Kolonie von *L. pneumophila* benötigt zum Wachstum 7 – 10 Tage. Daher ist eine Detektion von *L. pneumophila* über Kultivierung in Umweltproben nur schwer zu bewerkstelligen, weil die Begleitflora die Platten überwuchert und die somit nicht eindeutig nachweisbar sind. Aus diesem Grund macht es Sinn, immer eine weitere Detektionsmethode durchzuführen, wenn Realproben auf *L. pneumophila* untersucht werden.

Auf dem Chip zur Detektion von *L. pneumophila* am MCR 3 wurden der monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6 sowie der polyklonale unmarkierte Fänger-Antikörper (pAb) immobilisiert. Die Auswertung der erhaltenen Chemilumineszenz-Signale erfolgte über die installierte Auswertesoftware am Gerät. Der polyklonale Fänger-Antikörper (pAb) wurde auf *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, kalibriert. Da in realem Oberflächenwasser jedoch verschiedene *L. pneumophila*-Spezies vorkommen können und pAb *L. pneumophila* SG 1 – 12 detektiert, ist hierfür nur eine Aussage für das Vorkommen von *L. pneumophila* SG 1 – 12 möglich. Für *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, detektiert mit mAb 10/6, kann man eine quantitative Aussage treffen. Es wurde eine Kalibrierung in Oberflächenwasser durchgeführt, bei der dargestellt werden konnte, dass der monoklonale Antikörper spezifisch in Oberflächenmatrix *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, nachweisen kann. Sollte in einer der Wasserproben von der Isar mAb 10/6 ein positives CL-Signal geben, kann man mit diesem eine Quantifizierung für Bellingham treffen. In der nachfolgenden Tabelle sind alle Chemilumineszenz-Signale oberhalb der Nachweisgrenze der Antikörper mAb 10/6 und pAb bzw. oberhalb deren Hintergrundsignal aufgeführt (siehe Tabelle 11).

Tabelle 11: Darstellung aller ermittelten Chemilumineszenz-Signale oberhalb der NWG für alle immobilisierten monoklonalen und polyklonalen Fänger-Antikörper; die Detektion erfolgt immer mit polyklonalem biotinylierten Detektions-Antikörper.

Probenahmestelle	CL-Signal polyklonaler Fänger-Antikörper(pAb) [a.u.]	CL-Signal monoklonaler Fänger-Antikörper (mAb) [a.u.]
1 (Quelle)	236 ± 109	-
2	5.403 ± 1.339	mAb 10/6: 588 ± 110
3	8.266 ± 2.276	-
4	18.960 ± 8.615	-
5	5.378 ± 2.372	-
6	7.051 ± 2.956	-
7	6.226 ± 1.986	-
1 (nicht aufkonzentriert)	158 ± 35	-

Es wurde Flusswasser von 7 verschiedenen Sammelstellen mit MAF und ZeUF aufkonzentriert und am MCR 3 mittels SMIA vermessen. Dabei wurden Chemilumineszenz-Signale für den polyklonalen Fänger-Antikörper zwischen 236 und 18.960 a.u. bestimmt. In einer Probe (Sammelstelle 2) wurde mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6 ein Chemilumineszenzsignal von 588 a.u. detektiert. Zum Vergleich der Signalintensität wurde die Wasserprobe der Quelle auch nicht aufkonzentriert vermessen. Hierbei wurde eine Signalintensität von 158 a.u. ermittelt. Dieser Wert liegt weit unter dem CL-Signal, welches im Rahmen der Kalibrierung als Nachweisgrenze definiert wurde (335 a.u.). Es ist ersichtlich, dass in einer Probe des Quellwassers, welches nicht aufkonzentriert wurde, keine *L. pneumophila* SG 1 – 12 nachgewiesen werden können. Diese sind so gering konzentriert, dass der eingesetzte polyklonale Fänger-Antikörper keine ausreichende Sensitivität bietet, um diese kleine Konzentration zu detektieren. Es zeigt sich weiterhin, dass im Quellwasser nur eine sehr geringe Konzentration an *L. pneumophila* vorliegt, weil hier noch keine Kläranlagen und anthropogenen Einflussfaktoren vorliegen. Nach der Quelle sind alle detektierten CL-Signale und Konzentrationen ähnlich hoch. Man kann also davon ausgehen, dass sich die Signale nicht akkumulieren. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass mit dem polyklonalen Fänger-Antikörper pAb keine Aussagen getroffen werden können, welcher monoklonale Subtyp von *L. pneumophila* in der untersuchten Probe vorhanden ist. Erst die zusätzliche Antwort durch

den monoklonalen Antikörper mAb 10/6 zeigte, dass im Flusswasser an einer Stelle *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, zu finden ist. Das bedeutet, dass hier ein höheres Risiko besteht.

Weiterhin konnte bestätigt werden, dass die Kombinationsmethode aus MAF und ZeUF positive Auswirkung auf die Signalintensität mit sich bringt. Nach der Aufkonzentration wurden bei der Detektion mit dem etablierten CL-SMIA immer CL-Signale oberhalb der Nachweisgrenze des polyklonalen Fänger-Antikörpers pAb erhalten. Zusätzlich zum Vorkommen von *L. pneumophila* SG 1 – 12 in allen Wasserproben konnte mittels mAb 10/6 in einer Isar-Wasserprobe auch *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, nachgewiesen werden. Dieser monoklonale Subtyp ist ein Stamm, der häufig in der Umwelt vorkommt und weniger im Ausbruchsgeschehen detektiert wird. Auch hier wurde keine Korrelation zwischen mAb 10/6 und dem polyklonalen Fänger-Antikörper pAb festgestellt. Mit dem hochselektiven und spezifischen monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6 konnte ein Chemilumineszenzsignal von 588 a.u. bestimmt werden. Aufgrund der durchgeführten Kalibrierung von mAb 10/6 für die Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, war eine quantitative Aussage möglich. In der untersuchten Oberflächenwasserprobe des Flusses Isar an Sammelstelle 2 wurden 238 KBE/mL *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, gefunden. Ein Nachweis von *L. pneumophila*-Subgruppen wurde somit erbracht. Zusätzlich zu einer Ja/Nein-Antwort über den polyklonalen Antikörper ist eine Zuordnung zu einem Subtyp möglich. Weiterhin wurde so gezeigt, dass für die Untersuchung von Oberflächenwasser die Kultivierung auf Selektivnährmedium nicht die alleinige Methode der Wahl sein darf. Für die Bewertung von Kontaminationen an *L. pneumophila* in Oberflächenwasser ist das Hinzuziehen eines SMIA durchaus sinnvoll und erfolgsversprechend.

3.3.2.5.5. Kläranlagen-Proben von Projektpartnern

Im Rahmen der Realproben-Untersuchungen für die Aufkonzentrierung über MAF und ZeUF wurden von externen Kooperationspartnern 2 Kläranlagen-Proben zugeschickt, die ebenso mit dem etablierten CL-SMIA am MCR 3 untersucht wurden. Diese werden hier als Kläranlage 1 und 2 aufgeführt. Die Probenahmen wurden durch externe Partner vorgenommen. Vor der Messung

am MCR 3 mit CL-SMIA wurde das Kombinationsverfahren aus MAF und ZeUF durchgeführt. Da es sich bei dem Zulauf von Kläranlage 1 um stark Schwebstoff-belastetes Wasser handelt, wurde diese Probe 1:10 verdünnt, bevor eine Aufkonzentrierung und anschließende Messung am MCR 3 durchgeführt wurde. Alle anderen Wasserproben wurden direkt aufkonzentriert und dann zur Messung am MCR 3 eingesetzt. Für die Bestimmung von *L. pneumophila* wurde ein Legionella-Multiplex-Chip verwendet. Alle immobilisierten Antikörper werden in Tabelle 12 als Übersicht gezeigt.

Tabelle 12: Übersicht der immobilisierten Antikörper für die *L. pneumophila*-Untersuchung durch CL-SMIA am MCR 3; Kläranlagen-Proben von externen Partnern.

Immobilisierter Fänger-Antikörper	Was wird detektiert?
mAb 7/4	<i>L. pneumophila</i> SG 4 (Los Angeles)
mAb 5/2	<i>L. pneumophila</i> SG 5 (Dallas 1 E)
mAb 17/2	<i>L. pneumophila</i> SG 10 (Leiden 1)
mAb 4/4	<i>L. pneumophila</i> SG 2 – 15 (außer SG 7 und 10)
mAb 37/2	<i>L. pneumophila</i> SG 9
mAb 4/7	<i>L. pneumophila</i> SG 3 (Bloomington 1)
mAb 10/6	<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Bellingham
mAb 26/1	<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST OLDA <i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Oxford
mAb 20/1	<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Bellingham
mAb 8/4	<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST OLDA, <i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Oxford <i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Knoxville
mAb 3	<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Knoxville <i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Heysham
mAb 81/2	<i>L. pneumophila</i> SG 1
pAb	<i>L. pneumophila</i> SG 1 – 12

Die immobilisierten Antikörper wurden vom Legionella-Konsiliarlabor in Dresden für Versuchszwecke zur Verfügung gestellt. Um eine breitgefächerte Aussage treffen zu können, wurden alle Antikörper auf dem Multiplex-Chip immobilisiert (siehe Tabelle 13). Weil die

Antikörper teilweise erst später im Rahmen dieser Doktorarbeit zur Verfügung standen, konnten nicht von allen monoklonalen Fänger-Antikörpern Kalibrierkurven aufgenommen werden. Aus diesem Grund sind bei positivem Signal für diese Antikörper nur qualitative Aussagen möglich.

Tabelle 13: Ergebniszusammenfassung der Kläranlagen-Proben (externe Partner), welche mittels CL-SMIA am MCR 3 auf Anwesenheit von *L. pneumophila* untersucht wurden.

Realprobe	Probenart	CL-Signal pAb (<i>L. pneumophila</i> SG 1 – 12)	CL-Signal (mAb)	<i>L. pneumophila</i> Subgruppe
Kläranlage 1	Ablauf Wasser 1	8.935 a.u.	537 a.u. (mAb 4/4)	<i>L. pneu.</i> SG 2 – 15 (außer SG 7 und 10)
			4.556 a.u. (mAb 26/1)	<i>L. pneu.</i> SG 1, ST OLDA
			10.578 a.u. (mAb 3/1)	<i>L. pneu.</i> SG 1, Pontiac-Gruppe
			11.517 a.u. (mAb 81/2)	<i>L. pneu.</i> SG 1
	Zulauf Wasser 2 (1:10 verd.)	1.975 a.u.	739 a.u. (mAb 26/1)	<i>L. pneu.</i> SG 1, ST OLDA
			311 a.u. (mAb 81/2)	<i>L. pneu.</i> SG 1
Kläranlage 2	Wasser 1	21.410 a.u.	1.923 a.u. (mAb 10/6)	<i>L. pneu.</i> SG 1, ST Bellingham
	Wasser 2	11.349 a.u.	405 a.u. (mAb 10/6)	<i>L. pneu.</i> , SG 1, ST Bellingham

In den beiden beprobten Kläranlagen wurden sehr hohe CL-Signale detektiert, die weit oberhalb des ermittelten Schwellenwertes für den polyklonalen Fänger-Antikörper (pAb) lagen. Ebenso wurden auch stark positive Chemilumineszenz-Signale für verschiedene monoklonale Fänger-Antikörper (mAb) ermittelt. In der Ablaufprobe von Kläranlage 1 wurde für den polyklonalen Fänger-Antikörper eine Signalintensität von 8.935 a.u. gemessen. Das weist auf ein erhöhtes Vorkommen von *L. pneumophila* SG 1 – 12 hin. Durch die monoklonalen Antikörper mAb 4/4 (537 a.u.), mAb 26/1 (4.556 a.u.), mAb 3/1 (10.578 a.u.) und mAb 81/2

(11.517 a.u.) wurden im Ablauf von Kläranlage 1 *L. pneumophila* SG 1, SG 2 – 15 sowie die Subtypen OLDA und die Pontiac-Gruppe nachgewiesen. Im Zulauf von Kläranlage 1 wurde mit dem polyklonalen Fänger-Antikörper pAb ein Chemilumineszenzsignal von 1.975 a.u. ermittelt. Die monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 26/1 (739 a.u.) und mAb 81/2 (311 a.u.) detektierten *L. pneumophila* SG 1 und SG 1, ST OLDA.

Bei Kläranlage 2 wurden 2 verschiedene Wasserproben aus der gleichen Entnahmestelle analysiert. Hierbei konnten für den polyklonalen Fänger-Antikörper Chemilumineszenz-Signale zwischen 11.349 und 21.410 a.u. detektiert werden. Mit dem monoklonalen Antikörper mAb 10/6 war eine Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham möglich (1.923 bzw. 405 a.u.). Da für diesen monoklonalen Antikörper eine Kalibrierkurve in Oberflächenwasser vorlag (mit Aufkonzentrierung), war bei dieser Probe eine quantitative Aussage möglich. In den Proben 1 und 2 von Kläranlage 2 wurden 8,15 bzw. 0,85 KBE/mL *L. pneumophila* SG 1, St Bellingham detektiert. Da eine Aufkonzentrierung durchgeführt wurde, müssen die entsprechenden Aufkonzentrierungsfaktoren mit berücksichtigt werden. Somit kommt man auf eine *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham-Konzentration von 81,5 bzw. 8,5 KBE/mL.

Bei den Proben aus Kläranlage 1 und 2 ist eindeutig ersichtlich, und konnte auch mit den Untersuchungen fehlerfrei nachgewiesen werden, dass eine hohe Belastung an *L. pneumophila* in den untersuchten Wasserproben vorliegt. Da der Nachweis auf qualitativer Ebene in Form einer Ja/Nein-Antwort stattfand, konnte nur anhand der Signalintensität oberhalb des Schwellwertes abgelesen werden, wie stark die vorliegende Kontamination war. Im Rahmen der Auswertung dieser beiden Realproben wurde an die Kontaktpersonen dringender Handlungsbedarf für Dekontaminationsmaßnahmen kommuniziert. Da weitere Hintergründe der Proben nicht bekannt sind, muss aktuell davon ausgegangen werden, dass die beiden Kläranlagen unter Beobachtung stehen und Desinfektionsmaßnahmen eingeleitet wurden.

3.3.2.5.6. Wasserfall-Proben

Im Rahmen eines Auftragsgutachtens wurden an einem Wasserfall Wasserproben genommen und zusätzlich noch Bioaerosolproben gesammelt. Nach einer Aufkonzentrierung aller Proben mit dem Kombinationsverfahren aus MAF und ZeUF wurden die Proben mit dem etablierten CL-

SMIA am MCR 3 vermessen. Es ist zu beachten, dass aufgrund des geringen Volumens des Sammelgefäßes, bei den Bioaerosol-Proben nur eine Aufkonzentrierung um den Faktor 10 erreicht werden konnte. Alle ermittelten Chemilumineszenz-Signale werden in nachfolgender Tabelle 14 dargestellt.

Tabelle 14: Ergebniszusammenfassung der Wasserfallproben, welche mittels CL-SMIA am MCR 3 auf Anwesenheit von *L. pneumophila* untersucht wurden.

Realprobe	Probenart	CL-Signal (pAb <i>L. pneumophila</i> SG 1 – 12)	CL-Signal (mAb)	Monoklonale <i>L. pneumophila</i> Subgruppe
Wasserfall (aufkonzentriert)	Wasser	660 a.u.	540 a.u. (mAb 26/1)	<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST OLDA
	Bioaerosol	740 a.u.	-	-

Bei dem untersuchten Wasser des Wasserfalls wurden neben positiven Signalen für den polyklonalen Fänger-Antikörper pAb sogar positive Signale mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 26/1 ermittelt. Dieser detektiert *L. pneumophila* SG 1, ST OLDA. Da keine Kalibrierung für diesen monoklonalen Fänger-Antikörper vorlag, konnte nur eine qualitative Aussage getroffen werden. Es wurde nachgewiesen, dass Legionellen natürlich in Oberflächengewässer vorkommen. In dem Bioaerosol des Wasserfalls waren keine Legionellen enthalten, sodass nur ein geringes Infektionsrisiko bestand.

3.3.2.6. Untersuchung von Realproben mit verschiedenen monoklonalen Fänger-Antikörpern

Das Panel an monoklonalen Antikörpern wurde für diese Doktorarbeit vom Legionella-Konsiliarlabor in Dresden zur Verfügung gestellt. Es fand dort bisher nur Anwendung als aufgereinigte Zellkulturüberstände für die klinische Routinediagnostik von Legionellose-Infektionen. Der monoklonale Fänger-Antikörper mAb 10/6 wurde im Rahmen der Aufkonzentrierungsmethode MAF und ZeUF zur anschließenden Detektion über SMIA am MCR

3 verwendet. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Antikörper auch für Oberflächenwasser und lebende Bakterienzellen geeignet war. Nun sollte untersucht werden, ob auch die anderen, zuvor kalibrierten monoklonalen Fänger-Antikörper sich für Realproben, fernab der Urin-Diagnostik, eignen.

Im Rahmen einer Studie zusammen mit dem Projektpartner Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit“ (LGL) wurden verschiedene Wasserproben aus Flüssen, Kläranlagen und Duschen sowie Bioaerosolproben aus der Luft untersucht. Aufgrund der Beschreibung des Projektes und dem im Projektplan definierten und verbindlichen Ablauf, wurde bei allen untersuchten Proben für dieses Projekt keine Aufkonzentrierung mit MAF und ZeUF durchgeführt. Der Vollständigkeit halber wurde zusätzlich zu den monoklonalen Fänger-Antikörpern immer der polyklonale Fänger-Antikörper pAb mit auf den Chips immobilisiert. Die damit ermöglichte Aussage über das Vorhandensein von *L. pneumophila* SG 1 – 12 sollte das erhaltene Untersuchungsergebnis vervollständigen.

3.3.2.6.1. *Definition von Nachweisgrenzen für die immobilisierten Fänger-Antikörper*

Alle untersuchten Realproben wurden am MCR 3 mit dem etablierten SMIA analysiert. Zuvor wurde für jeden Fänger-Antikörper über Nullproben (Blank + 3 × Standardabweichung des Blanks) eine Nachweisgrenze definiert (siehe Tabelle 15). Für die bereits kalibrierten monoklonalen Fänger-Antikörper wurden die Nachweisgrenzen aus der Kalibrierkurve übernommen. Alle erhaltenen Chemilumineszenz-Signale der untersuchten Proben oberhalb dieser vorab definierten Nachweisgrenzen sind als positiver Befund für das Vorkommen von *L. pneumophila* gewertet worden. Eine zusätzliche Aussage über den monoklonalen Subtyp wurde durch die entsprechenden Fänger-Antikörper ermöglicht.

Tabelle 15: Nachweisgrenzen für positiven Befund der untersuchten Realproben in Abhängigkeit von Fänger-Antikörper und Nullprobe, welche mit Leitungswasser bestimmt wurden.

Fänger-Antikörper	Nachweisgrenze (CL-Signal [a.u.])
pAb	335
mAb 10/6	247
mAb 3	226
mAb 3/1	289
mAb 26/1	276
mAb 4/4	370
mAb 81/2	287
Nullprobe	159

3.3.2.6.2. Umweltwasserproben und Bioaerosolproben

Im Rahmen des LGL-Projektes „BALU-Klär“ wurden zusammen mit dem Projektpartner LGL Realproben aus Kläranlagen verschiedener Industriebetriebe gesammelt. Dabei handelte es sich um Prozesswasser, Wasser aus dem Belebungsbecken der Kläranlage, Bioaerosolproben sowie gereinigtes Abwasser nach dem vollständigen Klärprozess.

Zusätzlich zu diesen Proben wurden zur Methodvalidierung weitere Realproben mit dem etablierten CL-SMIA untersucht. Dabei handelte es sich um Oberflächenwasser aus bayerischen Flüssen, Proben aus anderen Kläranlagen sowie Dusch- und Leitungswasserproben. Für die CL-SMIA-Messung wurde der Legionella-Mikroarray-Chip verwendet. Auf diesem waren die Fänger-Antikörper mAb 10/6, mAb 20/1, mAb 8/4, mAb 3, mAb 3/1, mAb 81/2 und pAb immobilisiert. Alle Proben wurden am MCR 3 mit dem etablierten Messprogramm analysiert. Alle ermittelten Chemilumineszenz-Signale oberhalb der Nachweisgrenze wurden als positiv eingestuft. Die untersuchten Kläranlagen, wie auch die der BALU-Studie, werden hier anonymisiert aufgeführt. Von allen untersuchten Realmessungen wird die CL-Intensität am MCR 3 für alle positiven Fänger-Antikörper angegeben.

3.3.2.6.2.1. *Papierfabriken*

Im Rahmen der BALU-Klär Studie wurden insgesamt 3 Kläranlagen von Papierfabriken getestet (4 insgesamt vom LGL beprobt, bei einer konnte der Messtermin seitens IWC-TUM nicht wahrgenommen werden). Dabei wurden sowohl Wasser-, als auch Bioaerosolproben gesammelt und mittels CL-SMIA am MCR 3 untersucht. Damit keine Wiedererkennung stattfinden kann, werden nur Bildausschnitte der Probenahmestellen aufgeführt, die keine Rückschlüsse auf die Probenahmestelle zulassen (siehe Abbildung 54 A-D).



Abbildung 54 A-D: Probenahmestellen für Wasser und Bioaerosolproben in Kläranlagen von Papierfabriken (anonymisiert).

Die gesammelten Wasser- und Bioaerosolproben wurden direkt zur CL-SMIA-Messung mit dem Legionella-Mikroarray-Chip am MCR 3 eingesetzt. Die erhaltenen Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle 16 dargestellt und werden mit den qPCR-Ergebnissen des LGL verglichen.

Tabelle 16: Ergebnisse der Untersuchungen von Kläranlagen, welche mittels CL-SMIA am MCR 3 auf Anwesenheit von *L. pneumophila* untersucht wurden; Vergleich CL-SMIA am MCR 3 mit qPCR.

Realprobe	Probenart	CL-Signal pAb (<i>L. pneumophila</i> SG 1 – 12)	CL-Signal (mAb)	<i>L. pneumophila</i> Subgruppe	qPCR-Ergebnisse vom LGL (detektiert <i>Legionella spp.</i>)
Papier 1	Wasser	448 a.u.	-	-	5,4 x 10 ⁷ Kopien/100 mL
	Luft	351 a.u.	-	-	8,8 x 10 ¹ Kopien/m ³
Papier 2	Wasser	515 a.u.	-	-	4,7 x 10 ⁷ Kopien/100 mL
	Luft	293 a.u.	-	-	7,8 x 10 ¹ Kopien/m ³
Papier 3	Wasser	5.092 a.u.	-	-	6,5 x 10 ⁶ Kopien/100 mL
	Luft	4.285 a.u.	535 a.u. (mAb 3/1)	<i>L. pneumophila</i> SG 1, Pontiac-Gruppe	-

In den untersuchten Kläranlagen der Papierfabriken konnte in allen Wasser- und Bioaerosolproben mittels qPCR *Legionella spp.* nachgewiesen werden. Bei den CL-SMIA-Messungen wies der polyklonale Fänger-Antikörper (pAb) in jeder Probe ein CL-Signal oberhalb der Nachweisgrenze auf. Der Vergleich von qPCR und pAb zeigt, dass der polyklonale Fänger-Antikörper nicht alle *Legionella spp.* erfasst. Daraus kann man schlussfolgern, dass in der Probe Papier 1 und 2 keine *L. pneumophila* enthalten waren. In der Probe Papier 3 waren die Signale höher, sodass man hier davon ausgehen kann, dass *L. pneumophila* in der Probe enthalten war. Untermauert wird dieses Ergebnis zusätzlich noch durch ein positives CL-Signal für den monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 3/1, der die Pontiac-Gruppe detektiert, die als infektiös gilt und häufig im Ausbruchsgeschehen detektiert wird. Dieses Signal wurde im Bioaerosol detektiert. Von einem Bioaerosol geht eine erhöhte Infektionsgefahr aus, wenn *L. pneumophila* detektiert werden können. Für weitere Aussagen über das Infektionsrisiko müssten jedoch noch weitere Untersuchungen erfolgen. Für die Infektiösität sind z.B. auch Aussagen von Nöten, ob es sich um lebende Legionellen oder lediglich um die LPS-Strukturen der Zellmembran handelt. Diese LPS-Strukturen werden über die monoklonalen Fänger-Antikörper detektiert. Das Vorhandensein von Legionellen-LPS ermöglicht noch keine Aussage über einen potentiellen Infektionsherd. Dafür sind auch Aussagen über lebende bzw. tote Zellen und ein Vorhandensein

von *L. pneumophila* in der Aerosolfraktion, die durch Einatmen in die Lunge gelangen kann, nötig. Jedoch kann zumindest davon ausgegangen werden, dass bei diesem Papierbetrieb ein höheres Infektionsrisiko bestehen könnte, wenn man auf der Kläranlage über dem Belebungsbecken das aufsteigende Bioaerosol inhaliert.

3.3.2.7. Brauereien

Im Rahmen der BALU-Klär-Studie wurden insgesamt 2 Kläranlagen von regionalen Brauereien getestet. Dabei wurden ebenso sowohl Wasser-, als auch Bioaerosolproben gesammelt und mittels CL-SMIA am MCR 3 untersucht. Eine weitere Untersuchung fand per qPCR durch das LGL statt. In nachfolgender Abbildung 55 werden die Probenahmestellen anonymisiert dargestellt.



Abbildung 55 A-D: Probenahmestellen für Wasser und Bioaerosolproben in Kläranlagen von Brauereien (anonymisiert).

Der CL-SMIA wurde mit dem Legionella-Mikroarray-Chip am MCR 3 durchgeführt. Die Ergebnisse der qPCR wurden vom LGL ausgewertet. In nachfolgender Tabelle 17 sind alle ermittelten Ergebnisse gegenübergestellt.

Tabelle 17: Ergebniszusammenfassung der Kläranlagen von Brauereien, welche mittels CL-SMIA am MCR 3 auf Anwesenheit von *L. pneumophila* untersucht wurden; Vergleich CL-SMIA am MCR 3 mit qPCR.

Realprobe	Probenart	CL-Signal pAb (<i>L. pneumophila</i> SG 1 – 12)	CL-Signal (mAb)	<i>L. pneumophila</i> Subgruppe	qPCR-Ergebnisse vom LGL (detektiert <i>Legionella spp.</i>)
Brauerei 1	Wasser	344 a.u.	-	-	1,7 × 10 ⁷ Kopien/100 mL
	Luft	333 a.u.	-	-	-
Brauerei 2	Wasser	383 a.u.	-	-	2,6 × 10 ⁷ Kopien/100 mL
	Luft	-	-	-	-

In den untersuchten Kläranlagen der Brauereien konnte in beiden Wasserproben und in einer Bioaerosolprobe *L. pneumophila* SG 1 – 12 nachgewiesen werden. Der polyklonale Fänger-Antikörper pAb wies in diesen Proben ein Chemilumineszenzsignal auf, welches sich leicht oberhalb der Nachweisgrenze befand. Es ist jedoch davon auszugehen, dass alle untersuchten Proben nur als leicht positiv zu bewerten sind, denn der Unterschied zwischen den gemessenen Chemilumineszenz-Signalen und der Nachweisgrenze des polyklonalen Antikörpers ist sehr gering. Für monoklonale Fänger-Antikörper konnte gar kein Signal als positiv bewertet werden. Für die Untersuchungen mittels qPCR durch das LGL wurden Konzentration zwischen 1,7 und 2,7 × 10⁷ Kopien/100 mL ermittelt. Diese beinhalten jedoch alle vorkommenden *Legionella spp.* Daher ist auch hier keine Korrelation zwischen dem ermittelten CL-Signal für *L. pneumophila* SG 1 – 12 und der ermittelten Konzentration an *Legionella spp.* möglich. Man kann eine vorsichtige Prognose aussprechen, dass bei diesen Kläranlagen kein Infektionsrisiko besteht, da insbesondere die Bioaerosolproben keine Legionellen enthalten.

3.3.2.8. Schweinestall

Im Rahmen einer Prinzipstudie zusammen mit dem LGL und dem LfU wurde ein Luftwäscher sowie Luft in einem Schweinestall getestet. Ziel war es hierbei, herauszufinden, in welchem Maß sich das Wasser des Luftwäschers durch den vorliegenden Kreislaufbetrieb mit Legionellen anreichert. Für die Untersuchung wurden Wasserproben aus dem Luftwäscher sowie

Bioaerosolproben im Stall und Luftauslass entnommen und mittels CL-SMIA am MCR 3 untersucht.



Abbildung 56 A-D: Probenahmestellen für Wasser und Bioaerosolproben im Schweinestall (anonymisiert).

Die gesammelten Proben wurden direkt zur Messung am MCR 3 mit dem *Legionella*-Mikroarray-Chip eingesetzt. Parallel dazu erfolgte eine Detektion per qPCR durch das LGL. Die Ergebnisse der qPCR wurden anschließend vom LGL ausgewertet und sind in nachfolgender Tabelle 18 gegenübergestellt.

Tabelle 18: Ergebniszusammenfassung der untersuchten Wasser- und Bioaerosolproben aus dem Schweinestall, welche mittels CL-SMIA am MCR 3 auf Anwesenheit von *L. pneumophila* untersucht wurden.

Realprobe	Probenart	CL-Signal pAb (<i>L. pneumophila</i> SG 1 – 12)	CL-Signal (mAb)	<i>L. pneumophila</i> Subgruppe	qPCR-Ergebnisse vom LGL (detektiert <i>Legionella</i> spp.)
Schweine-stall	Wasser 1	578 a.u.	-	-	-
	Wasser 2	615 a.u.	226 a.u. (mAb 3)	<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Heysham oder <i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Knoxville	$5,0 \times 10^4$ Kopien/mL
	Luft 1	415 a.u.	269 a.u. (mAb 3)	<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Heysham oder <i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Knoxville	$7,3 \times 10^3$ Kopien/m ³

In den untersuchten Proben aus dem Schweinestall wurden positive Chemilumineszenz-Signale für den polyklonalem Fänger-Antikörper (pAb) nachgewiesen. Ebenso für die Proben Wasser 2 und Luft 1 wurden positive Signale für den monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 3 ermittelt. Diese lagen bei einer Probe genau im Bereich der Nachweisgrenze für mAb 3, bei der anderen Probe leicht darüber. Damit kann ein Vorkommen von *L. pneumophila* SG 1 – 12 sowie *L. pneumophila* SG 1, ST Heysham oder Knoxville angenommen werden. Da die Kalibrierung für mAb 3 nur für ultrareines Wasser vorliegt, kann keine quantitative Aussage für die Proben Wasser 2 und Luft 1 getroffen werden. Das Signal für den polyklonalen Fänger-Antikörper pAb lag oberhalb der Nachweisgrenze von 276 a.u. Auch hier fällt auf, dass ein Vergleich von den Ergebnissen der *Legionella spp.* PCR durch das LGL keiner Korrelation mit den Ergebnissen des CL-SMIA unterliegt. Mit den Ergebnissen der PCR lässt sich lediglich die Einschätzung treffen, dass *Legionella spp.* in den untersuchten Proben vorkommen. Eine Abschätzung der Verteilung zwischen den einzelnen Spezies ist nicht möglich.

L. pneumophila kommen in technischen wasserführenden Anlagen vor, in denen sich Biofilm bildet und die Wasserprobe höhere Temperaturen (25 – 45 °C) aufweist. Bei diesen Wasserproben wird das Wasser in einem Luftwäscher im Kreis gepumpt und nur bei Bedarf (z.B. Verdunstung, starke Verschmutzung, starker Geruch) ausgetauscht. Es ist also durchaus nachvollziehbar, dass eine Anreicherung mit Legionellen stattfindet, wenn das Wasser nicht erneuert wird. Da Legionellen natürlich im Trinkwasser vorkommen können, ist einleuchtend, dass Initialkeime bei jeder Wassererneuerung mit in das Wasser gelangen. Die Signalintensität für mAb 3 ist bei einer Probe direkt an der Nachweisgrenze, bei der anderen Probe etwas höher. Man kann also hier davon ausgehen, dass eine leichte Kontamination des Waschwassers vorliegt.

3.3.2.9. Zusammenfassung

Zusammenfassend kann man sagen, dass in fast allen untersuchten Realproben *L. pneumophila* SG 1 – 12 gefunden wurden. Diese konnten mit dem eingesetzten polyklonalen Fänger-Antikörper pAb eindeutig nachgewiesen werden. *Legionella spp.* kommen in geringen Konzentrationen natürlicherweise im Wasser vor. Besonders, wenn das Wasser unter

anthropogenem Einfluss steht, ist eine höhere Legionellenkonzentration wahrscheinlich. Der hochselektive polyklonale Fänger-Antikörper detektiert die Lipopolysaccharid (LPS)-Struktur der Oberfläche der Bakterien-Zellmembran. Daher kann man davon ausgehen, dass sowohl Membranfragmente als auch freies LPS durch den polyklonalen Antikörper erfasst werden. Ein positiver Nachweis durch pAb bedeutet also noch nicht zwangsläufig, dass lebende und humanpathogene Legionellen vorliegen, von denen ein Infektionsrisiko ausgeht. Daher wurde auf quantitative Angaben bei den untersuchten Proben verzichtet. Es wird empfohlen, parallele Methoden zum Legionellennachweis durchzuführen (z.B. Kultur auf Selektivnährmedium).

Für die Untersuchungen hier war der Fokus auf die Übertragbarkeit der Methode von ultrareinem Wasser auf Realproben gelegt. Weiterhin sollte untersucht werden, ob es aufgrund von Matrixeffekten durch verschiedene Realproben zu Inhibition der Messmethode am MCR 3 kommt.

Weiterhin wurden in den untersuchten Realproben auch mittels verschiedenen monoklonalen Fänger-Antikörpern positive Chemilumineszenz-Signale detektiert. Es konnten *L. pneumophila* SG 1 ST Bellingham, ST Heysham, ST OLDA, die Pontiac-Gruppe, als auch SG 2 – 15 (außer 7 und 10) nachgewiesen werden. Es wurde somit gezeigt, dass der Einsatz von verschiedenen monoklonalen Fänger-Antikörpern auf einem Mikroarray-Chip eine erste qualitative Aussage über das Vorhandensein von unterschiedlichen Subgruppen von *L. pneumophila* ermöglicht. Quantitative Aussagen waren bisher nur für *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, möglich, da eine Kalibrierkurve in Oberflächenwasser vorlag. Mit dem CL-SMIA wurde eine kulturunabhängige Nachweismethode für Legionellen etabliert. Es konnte außerdem bestätigt werden, dass sich die etablierte Messmethode (CL-SMIA) am MCR 3 auch für Oberflächenwasser eignet und eine Detektion von Legionellen in verschiedenen Matrices möglich ist.

Zukünftig wäre es denkbar, einen Abgleich zwischen Patientenisolat und Umweltprobe durchzuführen. Um diesen Denkansatz weiter auszuführen, wurden im Rahmen einer Prinzipstudie zusammen mit der TU Dresden Experimente durchgeführt, die zeigen sollten, dass eine Subtypisierung für *L. pneumophila* auch direkt aus Patientenmaterial möglich ist.

3.4. Urinproben von Legionellose-Patienten

Im Rahmen dieser Prinzipstudie wurde das Dresden-Panel, welches bisher vom Legionella-Konsiliarlabor ausschließlich im ELISA für Patientenurin eingesetzt wurde, mittels des etablierten CL-SMIA auch zur Detektion am MCR 3 eingesetzt. Es sollte untersucht werden, ob ein schnelles Screening von Legionellose-positiven Urinen am MCR 3 machbar ist. Dabei lag der Fokus zuerst auf der Vergleichbarkeit der Aussagen von BINAX®E.I.A. und dem polyklonalen Fänger-Antikörper. Weiterhin wurde überprüft, ob die Ja/Nein-Antwort des BINAX®E.I.A. mit der Aussage von pAb über das Vorkommen von *L. pneumophila* SG 1 – 12 korreliert. In einem zweiten Schritt wurde dann untersucht, ob auch eine Aussage zur vorhandenen Subgruppe von *L. pneumophila* getroffen werden konnte. Dafür wurde der BINAX®E.I.A. mit dem Legionella-Mikroarray-Chip verglichen, auf dem die drei monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6, mAb 3 und mAb 8/4 immobilisiert waren. Dieser Mehrwert an Information in Form der Zuordnung der Urinprobe zu einer Subgruppe über das Signal von monoklonalen Fänger-Antikörpern ist bis dato an keiner Forschungseinrichtung etabliert worden.

Es wurden verschiedene positive Patientenproben sowie negative Blindproben mit dem CL-SMIA am MCR 3 untersucht. Weiterhin wurden künstliche LPS-Standards generiert und diese vergleichsweise mit dem etablierten Schnelltest BINAX®E.I.A. sowie dem CL-SMIA am MCR 3 vermessen. Der BINAX®E.I.A.-Test wird als Schnelltest in der klinischen Diagnostik eingesetzt. Er detektiert *L. pneumophila* SG 1. Es handelt sich um einen ELISA, der lediglich eine Ja/Nein-Antwort über das Vorkommen von Legionellen-Antigen im Urin des Patienten gibt [Website alere, 2016].

3.4.1. Entwicklung eines Binärcodes für die monoklonale Subtypisierung von *L. pneumophila* in Patientenerin auf dem MCR 3

Im Rahmen dieser Studie wurde zuerst ein Binärcode entwickelt, der eine Detektion von *L. pneumophila* SG 1 – 12, sowie eine gruppenspezifische Einordnung in Subtypen von *L. pneumophila* SG 1 ermöglichen sollte. Es wurde für die jeweilige Gruppe ein Binärcode entwickelt, der positive bzw. negative Signale zu einer Gruppe zuordnet. Da es sich bei diesen Experimenten um eine Prinzipstudie handelte, wurden im Rahmen der Etablierung des

Binärcodes 3 monoklonale (mAb 8/4, mAb 3 und mAb 10/6) und der polyklonale Fänger-Antikörper pAb auf dem Multiplexchip immobilisiert. Eine Übersicht über die Zuordnung in Subgruppen, das Schema, welches auf einem Binärcode basiert, sowie alle verwendeten Antikörper werden in Abbildung 57 dargestellt:

	8/4	10/6	3	pAb	Subtypisierung	Gruppe
<p>1 0 NK 8/4 10/6 3 pAb Cut-off</p>	0	0	0	0	Non- <i>L. pneumophila</i> SG 1 – 12	1
<p>1 0 NK 8/4 10/6 3 pAb Cut-off</p>	0	0	0	1	<i>L. pneumophila</i> SG 1 – 12	2
<p>1 0 NK 8/4 10/6 3 pAb Cut-off</p>	1	0	0	1	<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Philadelphia <i>L. pneumophila</i> SG 1, ST OLDA <i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Oxford	3
<p>1 0 NK 8/4 10/6 3 pAb Cut-off</p>	0	0	1	1	<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Knoxville <i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Heysham	4
<p>1 0 NK 8/4 10/6 3 pAb Cut-off</p>	0	1	0	1	<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Bellingham	5

Abbildung 57: Binärcode zur Eingruppierung monoklonaler Subtypen von *L. pneumophila*.

Mit dem Binärcode ist mittels des Einsatzes von verschiedenen monoklonalen Antikörpern eine grobe Zuordnung zu Subtypen-Gruppen möglich. Wenn kein CL-Signal bei pAb, mAb 8/4, mAb 10/6 und mAb 3 detektiert werden kann, liegen keine *L. pneumophila* SG 1 – 12 in der untersuchten Probe vor. Wenn ein monoklonaler Antikörper und der polyklonale Fänger-Antikörper ein Signal oberhalb des Cut-off liefern, kann man die untersuchte Probe der Subtyp-Gruppe 3 bis 5 zuordnen. Wenn bei dem Patienten eine Mischinfektion vorliegt, ist es auch möglich, dass mehrere monoklonale Fänger-Antikörper ein positives Signal liefern. Um eine Aussage treffen zu können, ob ein ermitteltes CL-Signal als positiv oder negativ einzuordnen ist,

mussten als zweiter Schritt Nachweisgrenzen für die verschiedenen Fänger-Antikörper im Urin definiert werden.

3.4.2. Festlegung der individuellen Nachweisgrenzen für die Fänger-Antikörper

Da es sich bei Urin um eine sehr stark proteinhaltige Realprobe handelt, wurden mittels vieler verschiedener Blindproben individuelle Nachweisgrenzen für die verschiedenen monoklonalen Fänger-Antikörper bestimmt. Hierfür wurden 12 verschiedene Blank-Urine (bekannt, dass keine Legionellose-Infektion vorliegt) mit dem Multiplex-Chip auf *L. pneumophila* untersucht. Die Nachweisgrenzen für den entsprechenden Fänger-Antikörper wurden mit dem Chemilumineszenzsignal aller Blindproben plus der dreifachen Standardabweichung der Blindprobe definiert. Alle ermittelten Nachweisgrenzen werden in nachfolgender Tabelle 19 dargestellt.

Urin Probe	MCR 3-Ergebnisse				
	CL-Intensität Negativ-Kontrolle	CL-Intensität mAb 8/4	CL-Intensität mAb 10/6	CL-Intensität mAb 3	CL-Intensität pAb anti-Lp
BL 1	184	201	144	148	157
BL 2	208	188	164	173	234
BL 3	154	222	133	169	153
BL 4	165	183	163	150	192
BL 5	224	216	221	235	282
BL 6	371	452	415	420	610
BL 7	193	194	181	192	202
BL 8	256	263	246	256	281
BL 9	240	229	199	207	238
BL 10	216	169	148	151	176
BL 11	240	232	315	390	358
BL 12	343	327	344	343	365
Nachweisgrenze	430	477	494	526	655

Tabelle 19: Getestete Blank-Urine mit CL-SMIA am MCR 3; Bestimmung der festgelegten Nachweisgrenzen für 3 monoklonale und einen polyklonalen Fänger-Antikörper.

In der oben aufgeführten Tabelle 19 sind 12 untersuchte Blank-Urine aufgelistet. Diese wurden alle vorab mit BINAX®E.I.A. als negativ bezüglich *L. pneumophila* bestimmt. Dies wurde mit klinischen Isolaten bestätigt, indem gezeigt wurde, dass keine Kolonien angezüchtet werden konnten. Anschließend wurden die Urine mit dem etablierten CL-SMIA am MCR 3 vermessen

und das Chemilumineszenzsignal jedes immobilisierten Fänger-Antikörpers notiert. Die CL-Signale aller untersuchten Blank-Urine wurden gemittelt. Anschließend wurden aus den Mittelwerten der Einzelsignale und deren dreifacher Standardabweichung die Nachweisgrenze für die monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 8/4, mAb 10/6, mAb 3 und den polyklonalen Fänger-Antikörper pAb bestimmt. Sie wurden bei 477 a.u., 494 a.u., 526 a.u. sowie 655 a.u. festgesetzt.

Als nächster Schritt sollte ein künstliches LPS generiert werden, um für jeden monoklonalen Antikörper einen Kalibrierstandard zu erhalten. Es besteht die Möglichkeit, dass jeder *L. pneumophila*-Stamm bei der Kultivierung auf Selektivnährmedium eine unterschiedliche Anzahl an LPS-Strukturen exprimiert. Dieser Kalibrierstandard ermöglicht nach Quantifizierung dann weitere Aussagen über die Menge an LPS in der Kalibrierlösung. Weiterhin sollte ermöglicht werden, ein vorab auf dem MCR 3 mit CL-SMIA gemessenes Signal, mit einer definierten LPS-Konzentration zu korrelieren. Dafür wurden an der TU Dresden im Legionella-Konsiliarlabor künstliche LPS-Standards in Urin generiert, welche mit dem LAL-Nachweis für Endotoxine quantifiziert wurden.

3.4.3. Vermessung von Urin-Realproben mit BINAX®E.I.A. und CL-SMIA am MCR 3

14 verschiedene Realproben wurden mittels CL-SMIA am MCR 3 analysiert. Weiterhin wurde eine Vorcharakterisierung mittels BINAX®E.I.A., sowie ein ELISA des klinischen Isolats durchgeführt. Für die Messungen am MCR 3 wurden die monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 8/4, mAb 10/6, mAb 3 sowie der polyklonale Fänger-Antikörper pAb auf dem Mikroarray-Chip immobilisiert. In nachfolgender Tabelle 20 werden die Ergebnisse des Vortests mittels BINAX®E.I.A. mit den Ergebnissen des CL-SMIA mit dem polyklonalen Fänger-Antikörper pAb verglichen.

Tabelle 20: Getestete Patienten-Urine mit BINAX®E.I.A. und CL-SMIA mit pAb am MCR 3.

	Vortest-Methode	MCR 3	Übereinstimmung
Urin-Probe	BINAX E.I.A. Legionella	pAb - anti-Lp	MCR3 übereinstimmung mit BINAX E.I.A. Legionella
1	+	32.637	+
2	+	21.760	+
3	+	9.037	+
4	+	14.872	+
5	+	27.336	+
6	+	24.468	+
7	+	1.990	+
8	+	14.786	+
9	-	1.171	-
10	-	220	+
11	-	225	+
12	+	7.257	+
13	-	4.743	-
14	-	424	+
Nachweisgrenze		655	12/14

Es wurden 14 verschiedene Patientenerine mit BINAX®E.I.A. vorgetestet, davon enthalten 9 *L. pneumophila* SG 1. Diese müssen von BINAX®E.I.A. als positiv bewertet werden. BINAX®E.I.A. hat alle 9 Proben als positiv eingestuft. Ein Urin (Urin 14) wurde als *S. pneumoniae* definiert. Dieser wurde von BINAX®E.I.A. auch richtigerweise als Nicht-*L. pneumophila* SG 1 eingeordnet.

Der polyklonale Fänger-Antikörper pAb hat bei 11 von den 14 getesteten Patientenerinen ein CL-Signal oberhalb der Nachweisgrenze detektiert. Das entspricht 2 falsch-positiven Proben durch den polyklonalen Fänger-Antikörper pAb.

In den nachfolgenden Untersuchungen wurde von den 14 Urinproben klinische Isolate angelegt und über ELISA mit dem Dresden-Panel vorgetestet. Diese Tests wurden vom Legionella-Konsiliarlabor vorab durchgeführt. Die entsprechende Bewertung wurde anschließend mit der Gruppenzuordnung auf Basis des CL-SMIA am MCR 3 mit den 3 verschiedenen monoklonalen Fänger-Antikörpern verglichen. Von den 14 untersuchten Patientenerinen konnte von 13 ein klinisches Isolat angelegt werden. Diese wurden mit einem ELISA vorgetestet und entsprechend subtypisiert. Diese Bewertung wurde anschließend auf die 5 Gruppen übertragen, die im Rahmen dieser Arbeit definiert wurden. Als nächster Schritt erfolgte die Analyse der Proben mit CL-SMIA am MCR 3. Die erhaltenen Ergebnisse werden in nachfolgender Tabelle 21 dargestellt:

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Tabelle 21: Vermessung der Urinproben mit CL-SMIA am MCR 3 und die dabei ermittelten CL-Signale für mAb 8/4, mAb 10/6 und mAb 3.

Urin-Probe	MCR 3-Ergebnisse		
	CL-Intensität mAb 8/4	CL-Intensität mAb 10/6	CL-Intensität mAb 3
1	186	160	164
2	190	9953	215
3	188	161	163
4	212	194	9567
5	268	196	395
6	731	198	116
7	119	119	1279
8	216	215	208
9	182	154	211
10	167	173	177
11	191	165	186
12	396	238	663
13	176	155	172
14	176	155	172
Nachweisgrenze	406	387	408

Die erhaltenen Signalintensitäten für jeden immobilisierten Fänger-Antikörper wurden anschließend mit den Nachweisgrenzen verglichen und normiert. Alle Werte oberhalb davon wurden als positiv „1“ bewertet, Signale unter der Nachweisgrenze wurden mit „0“ negativ bewertet. In der nachfolgenden Tabelle 22 sind alle erhaltenen Ergebnisse gegenübergestellt.

Tabelle 22: Vergleich des ELISA-Ergebnisses der klinischen Isolate mit der Gruppenzuordnung auf Basis des CL-SMIA mit 3 verschiedenen monoklonalen und einem polyklonalen Fänger-Antikörper am MCR 3.

Urin-Probe	ELISA Vortest Konsilialabor		Negativ-Kontrolle	MCR 3-Ergebnisse				monoklonale Subtypisierung (CL-SMIA)	Übereinstimmung MCR 3 Übereinstimmung mit ELISA
	klinisches Isolat	monoklonale Subtypisierung v. klin. Isolat (ELISA)		mAb 8/4	mAb 10/6	mAb 3	pAb - anti-Lp		
1	+	Lp SG 1, Benidorm (Gruppe 2)	0	0	0	0	1	Gruppe 2	+
2	+	Lp SG 1, Bellingham (Gruppe 5)	0	0	1	0	1	Gruppe 5	+
3	+	Lp SG 1, Camperdown (Gruppe 2)	0	0	0	0	1	Gruppe 2	+
4	+	Lp SG 1, Knoxville (Gruppe 4)	0	0	0	1	1	Gruppe 4	+
5	+	Lp SG 1, Allentown/France (Gruppe 2)	0	0	0	0	1	Gruppe 2	+
6	+	Lp SG 1, OLDA (Gruppe 3)	0	1	0	0	1	Gruppe 3	+
7	+	Lp SG 1, Heysham (Gruppe 4)	0	0	0	1	1	Gruppe 4	+
8	+	Lp SG 1, Philadelphia (Gruppe 3)	0	0	0	0	1	Gruppe 2	-
9	+	Lp SG 9 (Gruppe 2)	0	0	0	0	1	Gruppe 2	+
10	+	Lp SG 5 (Gruppe 2)	0	0	0	0	0	Gruppe 1	-
11	+	Lp SG 4 (Gruppe 2)	0	0	0	0	0	Gruppe 1	-
12	+	Lp SG 1, OLDA (Gruppe 3)	0	0	0	1	1	Gruppe 4	-
13	-	N.A.	0	0	0	0	1	Gruppe 2	N.A.
14	+	S. pneumoniae (Gruppe 1)	0	0	0	0	0	Gruppe 1	+
Nachweisgrenze			430	477	494	526	655		9/13

Wenn man die Resultate, die mit dem CL-SMIA am MCR 3 erzielt wurden, mit den Ergebnissen der Vortypisierung über ELISA vergleicht, konnte eine Übereinstimmung von 69,2 % erreicht werden. Das heißt im Detail, dass bei 9 von 13 untersuchten Patientenurinen sowohl mit CL-SMIA als auch mit ELISA eine gleiche Eingruppierung bestimmt wurde.

Die restlichen 5 untersuchten Urine konnten entweder nicht subtypisiert werden oder sie wurden anhand der erhaltenen Ergebnisse einer falschen Gruppe zugeordnet. Bei einem Urin konnte seitens des Legionella-Konsiliarlabors in Dresden vorab kein Isolat angezüchtet werden, somit war bei diesem Urin keine Vorab-Typisierung möglich. Bei diesem Urin kann man also positiverweise davon ausgehen, dass Informationen hinzugewonnen wurden, nachdem der CL-SMIA durchgeführt wurde. Dieser Urin wird jedoch als abseits der Statistik betrachtet, weil keine Vorinformationen vorlagen.

3.4.4. Charakterisierung der künstlichen LPS-Standards mittels LAL-Endotoxin-Nachweis

Der LAL-Endotoxin-Nachweis detektiert Endotoxine. Die LPS-Strukturen von *L. pneumophila* können als Endotoxine betrachtet werden. Entsprechend ist der LAL-Test sehr gut dafür geeignet, die künstlich hergestellten LPS-Standards von *L. pneumophila* zu quantifizieren. Somit sind Aussagen über das exprimierte LPS von verschiedenen *L. pneumophila*-Subtypen möglich und man muss nicht auf kultivierte Bakterienzellen zurückgreifen.

Es wurden 3 Stammlösungen sowie steriler Urin als Blank mit dem LAL-Test auf Basis von Endosafe®-PTS in einem externen Labor vermessen. Dafür wurde ein Arbeitsbereich der Testpackung zwischen 0,1 und 10 (EU/mL) mittels der ausgewählten Kartusche festgelegt. Die Durchführung erfolgte nach Versuchsanleitung, die der Packung beilag. Die künstlichen LPS-Standards wurden alle nach einem ersten Vortest zur Orientierung über die Signalintensität in Zehnerstufen verdünnt. Alle erhaltenen Endotoxin-Konzentrationen (entspricht hier LPS-Konzentration der hergestellten *L. pneumophila*-Kalibrierstandards) sind in nachfolgender Tabelle 23 aufgeführt.

Tabelle 23: Tabelle der ermittelten LPS-Konzentrationen der künstlich generierten LPS Standards, detektiert mit dem LAL-Endotoxin-Nachweis.

Untersuchte Probe	Konzentration der eingesetzten Bakterienlösung	Verdünnungsfaktor	Bestimmter Endotoxingehalt	Berechneter Endotoxingehalt
LAL Wasser	-	Unverdünnt	< 0,05 EU/mL	< 0,05 EU/mL
Sterilurin	-	100	39,80 EU/mL	3.980 EU/mL
<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Bellingham	$1,04 \times 10^{10}$ Zellen/mL	10.000	2,11 EU/mL	21.100 EU/mL
<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST Heysham	$1,14 \times 10^{10}$ Zellen/mL	10.000	3,70 EU/mL	37.000 EU/mL
<i>L. pneumophila</i> SG 1, ST OLDA	$6,95 \times 10^9$ Zellen/mL	50.000	6,78 EU/mL	339.000 EU/mL

Nach Abzug des Wertes für den Sterilurin wurden LPS-Konzentrationen zwischen 17.200 EU/mL für den monoklonalen Subtyp Heysham bis 335.020 EU/mL für OLDA bestimmt. Da im Rahmen dieser Studie die künstlichen LPS-Standards erstmalig hergestellt wurden, liegen keine Vergleichswerte für LPS-Konzentrationen in einer Legionellen-Stammlösung vor. Durch diese Experimente ersichtlich gemacht wurde jedoch, dass jeder Stamm von *L. pneumophila* die LPS-Strukturen an der Zellmembran unterschiedlich exprimiert. Das heißt, jede Zelle hat keine gleichbleibende Anzahl an LPS auf ihrer Zellwand. Somit lässt eine Quantifizierung, die auf Zellanzahlen zugrunde liegt, keine Rückschlüsse auf einen LPS-Gehalt zu und umgekehrt.

Mithilfe dieser quantitativen Angabe konnten nun weitere Experimente durchgeführt werden. Es sollten einerseits Realproben von infizierten Patienten mittels CL-SMIA am MCR 3 durchgeführt werden. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine Subtypisierung direkt aus dem Urin möglich ist. Dafür wurden die Realproben der infizierten Patienten sowie das künstlich generierte LPS verwendet. Anschließend sollte ein Vergleich möglich sein, ob die Nachweisstärke von BINAX®E.I.A. oder CL-SMIA am MCR 3 höher ist.

3.4.5. Vergleich der Nachweisstärke von BINAX®E.I.A. und CL-SMIA mittels Testung von künstlichen LPS-Standards

In weiteren Experimenten sollte untersucht werden, inwieweit die Sensitivitäten der beiden *L. pneumophila* Nachweismethoden für Urin, BINAX®E.I.A. und CL-SMIA am MCR 3, miteinander vergleichbar sind. Es wurde untersucht, bis zu welcher LPS-Konzentration die Standards verdünnt werden konnten, sodass die beiden angewandten Untersuchungsmethoden immer noch ein positives Ergebnis lieferten. Dafür wurden die LPS-Standards in verschiedenen Stufen verdünnt und anschließend mit BINAX®E.I.A. und CL-SMIA am MCR 3 vermessen. Auf dem Legionellen-Chip wurden die monoklonalen Antikörper mAb 10/6, mAb 8/4 und mAb 3 sowie der polyklonale Fänger-Antikörper pAb immobilisiert. Aufgrund der geringen Menge an künstlichem LPS konnte pro Verdünnungsstufe nur eine Einfachbestimmung durchgeführt werden. Die BINAX®E.I.A. *ratio* ist die Nachweisgrenze, welcher durch den Hersteller des Tests vorgegeben ist. Die Korrelation zwischen CL-Signal der Fänger-Antikörper sowie BINAX®E.I.A. *ratio* ist für jeden monoklonalen Antikörper separat in einer Abbildung gegenübergestellt. Die BINAX®E.I.A.-Nachweisgrenze wird in der Anleitung der Testpackung bei 3 definiert. Die Nachweisgrenzen der drei monoklonalen Fänger-Antikörper wurden aus den vorherigen Untersuchungen der Blank-Urine übernommen (Blank-Urine gemittelt plus dreifache Standardabweichung derselben). Sie wurden bei 494 a.u. für mAb 10/6, 477 a.u. für mAb 8/4, 526 a.u. für mAb 3 und 655 a.u. für pAb bestimmt.

Zuerst wurden die Nachweis-Sensitivitäten von monoklonalem Fänger-Antikörper mAb 10/6 mit pAb und BINAX®E.I.A. verglichen. Dafür wurde der künstliche LPS-Standard in Urin von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham in verschiedenen Stufen verdünnt und mit beiden Methoden vermessen. Die Nachweisgrenzen von mAb 10/6 und pAb sind zu 494 bzw. 655 a.u. bestimmt worden. Um die drei Experimente miteinander vergleichen zu können, wurde die Nachweisgrenze der entsprechenden Endotoxin-Konzentration des *L. pneumophila*-Stammes betrachtet. Die erhaltenen Nachweisgrenzen an detektierbarer LPS-Konzentration sind in nachfolgenden Abbildungen für mAb 10/6, pAb und BINAX®E.I.A. aufgeführt (siehe 58 A, B und C).

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

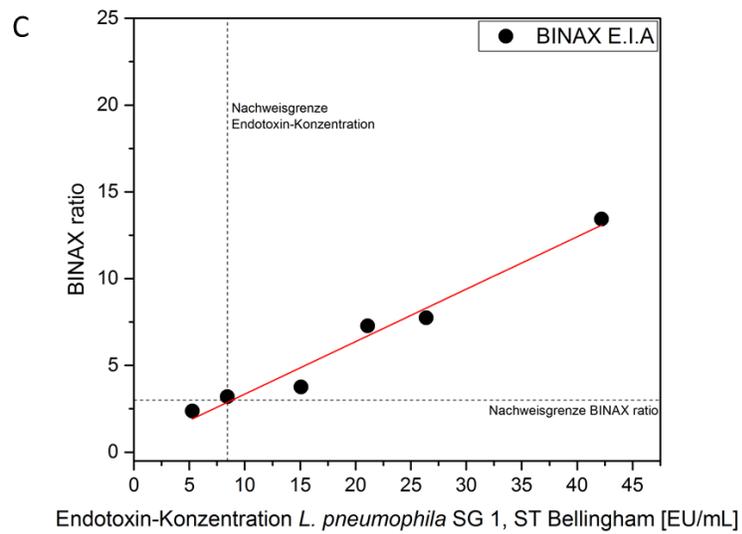
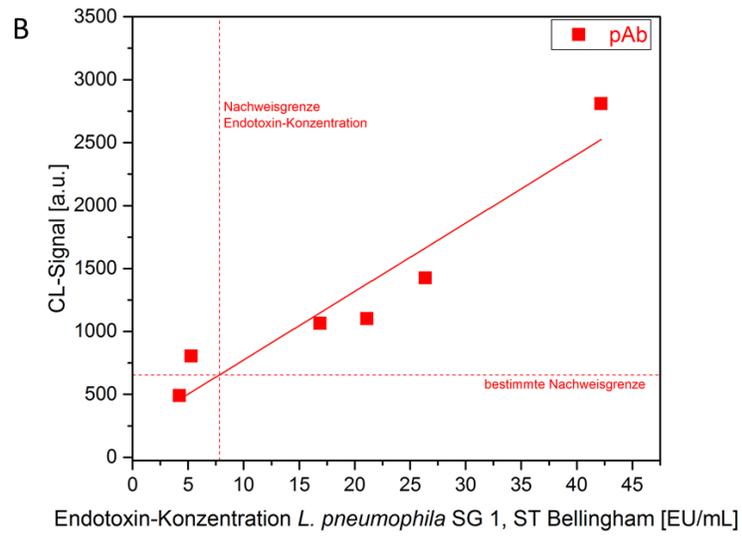
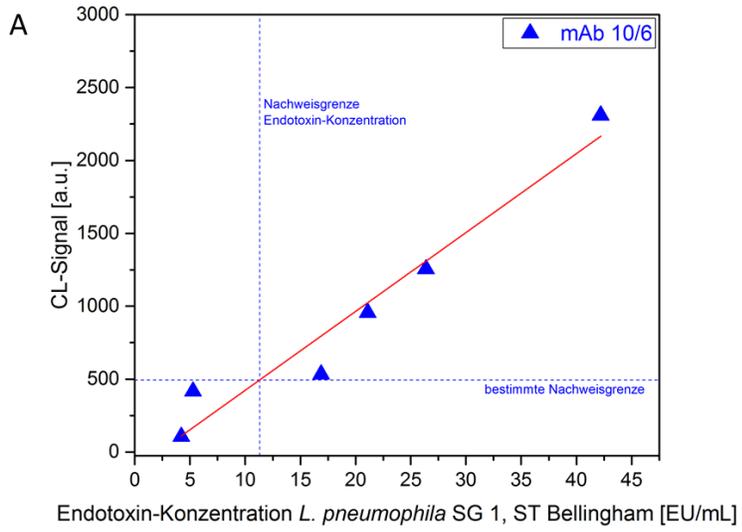


Abbildung 58 A, B und C: Vergleich der Nachweisstärke von mAb 10/6, pAb und BINAX®E.I.A. für den künstlich generierten LPS-Standard von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham.

Mittels BINAX®E.I.A.-Nachweis war eine Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham-LPS bis zu einer Konzentration von 8,8 EU/mL möglich. Bei Anwendung des CL-SMIA am MCR 3 wurde eine Nachweisgrenze für den monoklonalen Antikörper mAb 10/6 von 7,9 EU/mL und für den polyklonalen Fänger-Antikörper von 2,4 EU/mL bestimmt. Es wurde also bestätigt, dass sich beide Fänger-Antikörper sowie der BINAX®E.I.A. für den Nachweis von LPS direkt im Urin eignen. Weiterhin wurde nachgewiesen, dass der etablierte CL-SMIA am MCR 3 für *L. pneumophila* viel nachweisstärker ist. Vergleichend hierzu lag die Nachweisgrenze von pAb für *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, in ultrareinem Wasser, bei $6,1 \times 10^3$ KBE/mL. Die Nachweisgrenze für *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, detektiert mit mAb 10/6 wurde bei $2,8 \times 10^3$ KBE/mL bestimmt. Der LAL-Test für die Korrelation zwischen EU/mL und KBE/mL wurde nur einmalig durchgeführt. Daher lässt sich anhand der Größenordnung der Bakterienkonzentration trotzdem die Aussage treffen, dass eine Detektion des künstlich generierten LPS mit einer höheren Nachweisstärke möglich zu sein scheint. Um diese Aussage zu untermauern müssen mehr vergleichende Untersuchungen zwischen LAL und CL-SMIA durchgeführt werden.

Um zu überprüfen, ob die Nachweisstärke des CL-SMIA auch für andere monoklonale Fänger-Antikörper höher lag, als vergleichsweise für den BINAX®E.I.A., werden die gleichen Untersuchungen für die monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 8/4 und mAb 3 durchgeführt. Es sollte untersucht werden, ob der BINAX®E.I.A. für jeden *L. pneumophila*-Organismus andere Nachweisstärken aufweist.

Für den monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 8/4 wurden Verdünnungen des künstlichen LPS-Standards von *L. pneumophila* SG 1, ST OLDA mit BINAX®E.I.A. und CL-SMIA (mAb 8/4 und pAb) untersucht. Die ermittelten Ergebnisse für mAb 8/4, pAb und BINAX®E.I.A. für OLDA sind in nachfolgenden Abbildungen 59 A, B und C aufgeführt:

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

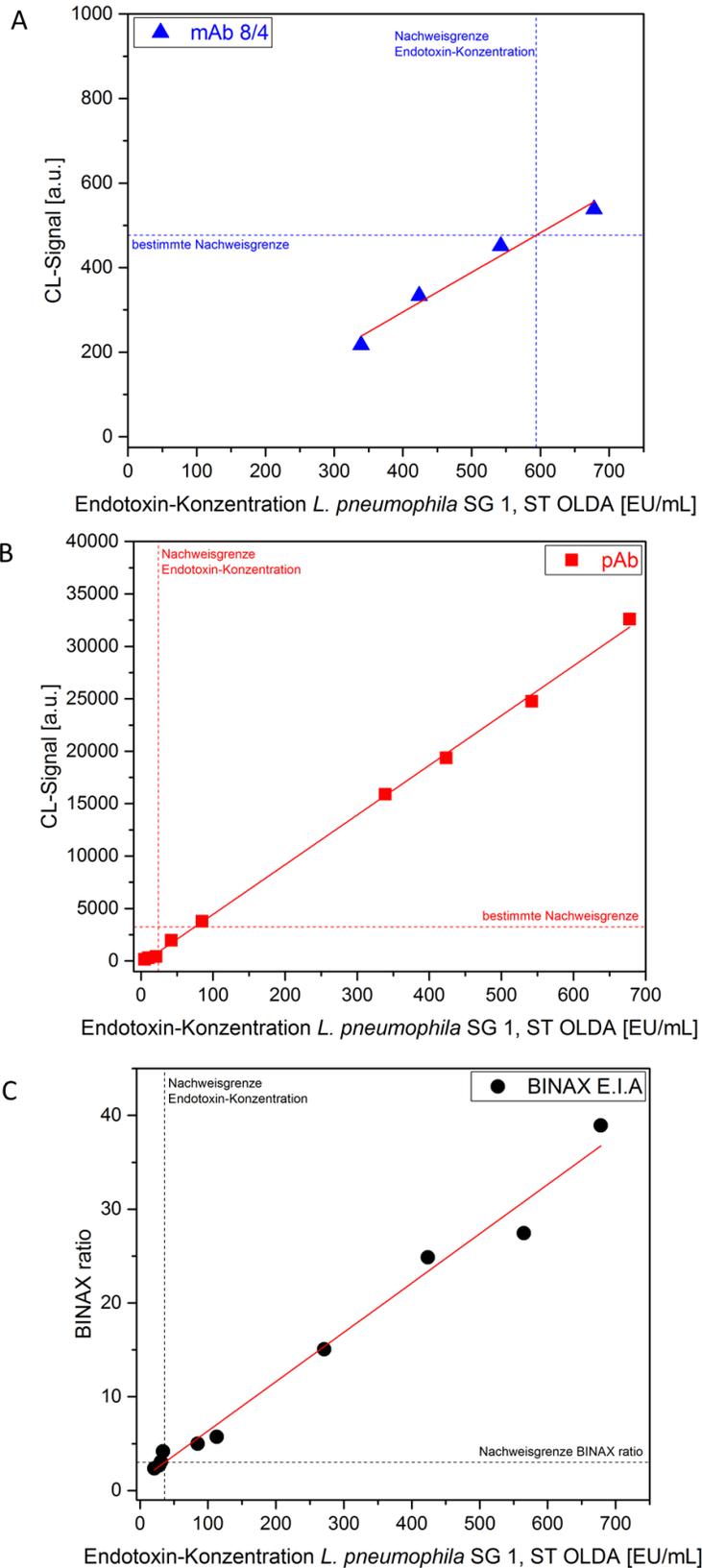


Abbildung 59 A, B und C: Vergleich der Nachweisstärke von mAb 8/4, pAb und BINAX®E.I.A. für den künstlich generierten LPS-Standard von *L. pneumophila* SG 1, ST OLDA.

Mittels CL-SMIA-Nachweis am MCR 3 durch mAb 8/4 ist eine Detektion von *L. pneumophila* SG 1, ST OLDA-LPS bis zu einer Konzentration von 593,9 EU/mL möglich. Der BINAX®E.I.A.-Schnelltest weist eine Nachweisgrenze von 36 EU/mL auf. Eine noch Nachweisstärke wurde mit dem polyklonalen Fänger-Antikörper pAb im CL-SMIA erreicht. Hierbei wurde eine Nachweisgrenze von 24,19 EU/mL bestimmt. Auch für diesen LPS-Standard konnte im Urin gezeigt werden, dass sich sowohl der monoklonale Fänger-Antikörper mAb 8/4, der polyklonale Fänger-Antikörper als auch BINAX®E.I.A. für den Nachweis von LPS direkt im Urin eignen. Es zeigte sich, dass der polyklonale Fänger-Antikörper für OLDA-LPS ähnliche Sensitivitäten wie der Antikörper im BINAX®E.I.A. aufweist. Die höchste Nachweisgrenze konnte mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 8/4 ermittelt werden. Vergleichend hierzu kann man Rückschlüsse ziehen auf die Nachweisgrenze des monoklonalen Antikörpers mAb 8/4 in ultrareinem Wasser, für den hitzeinaktivierte *L. pneumophila* SG 1, ST OLDA, untersucht wurden. Dafür wurde eine Nachweisgrenze von $4,5 \times 10^4$ KBE/mL bestimmt. Inwiefern diese mit den gemessenen 593,9 EU/mL korrelieren, müsste in weiteren Studien untersucht werden. Die Bestimmung von Bakterienkonzentration im Vergleich zu Endotoxin-Einheiten (EU/mL) wurde bisher nur einmal durchgeführt.

In einer letzten Untersuchung wurde ermittelt, ob die Nachweisstärke des CL-SMIAs für den monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 3 im Vergleich zu BINAX®E.I.A. höher ist. Hierfür werden Verdünnungen des künstlichen LPS-Standards von *L. pneumophila* SG 1, ST Heysham, mit BINAX®E.I.A. und CL-SMIA (mAb 3 und pAb) untersucht. In nachfolgenden Abbildungen 60 A, B und C sind die Nachweisgrenzen für die Konzentration an Heysham-LPS für die Detektion mit mAb 3, pAb und BINAX®E.I.A. aufgeführt.

ERGEBNISSE UND DISKUSSION

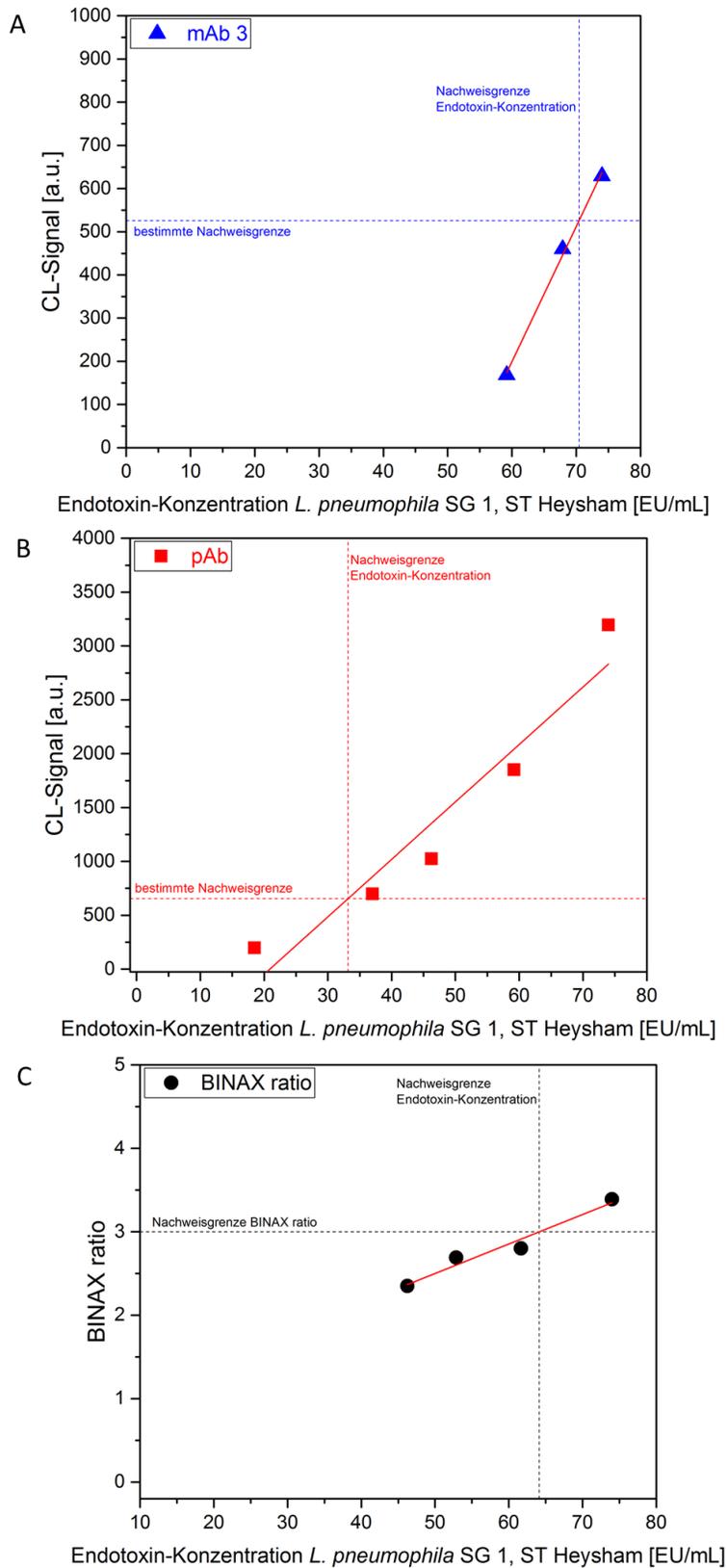


Abbildung 60: Vergleich der Sensitivität von mAb 3, pAb und BINAX®E.I.A. für den künstlich generierten LPS-Standard von *L. pneumophila* SG 1, ST Heysham.

Mittels BINAX®E.I.A.-Nachweis wurde die Nachweisgrenze für *L. pneumophila* SG 1, ST Heysham-LPS bei 64,1 EU/mL bestimmt. Der CL-SMIA am MCR 3 erreichte für den monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 3 eine Nachweisgrenze von 63,7 EU/mL und für den polyklonalen Fänger-Antikörper pAb von 27,7 EU/mL. Es konnte gezeigt werden, dass der etablierte CL-SMIA am MCR 3 für *L. pneumophila* die in einer Probe beinhaltenden LPS-Strukturen nachweisstärker detektiert als der BINAX®E.I.A. Bei den Untersuchungen von hitzeinaktivierten *L. pneumophila* SG 1, ST Heysham, detektiert mit mAb 3, wurde eine Nachweisgrenze von $6,7 \times 10^2$ KBE/mL bestimmt. Die Korrelation zwischen der bestimmten Bakterien- und Endotoxin-Konzentration muss in weiteren Experimenten untersucht werden, weil im Rahmen dieser Studie der LAL-Nachweis nur einmal durchgeführt wurde. Somit kann nur die Aussage getroffen werden, dass 63,7 EU/mL der Nachweisgrenze $6,7 \times 10^2$ KBE/mL gegenüberstehen.

Wenn man alle drei durchgeführten Vergleichsexperimente betrachtet, schneidet die Detektion von LPS mittels CL-SMIA auf dem MCR 3 immer am besten ab. Der kommerziell erhältlich polyklonale Fänger-Antikörper pAb bietet konstant die höchste Nachweisstärke. Die verwendeten monoklonalen Fänger-Antikörper können mit dem Schnellnachweisverfahren BINAX®E.I.A. aber mithalten. Aus diesem Grund macht es Sinn, neben dem polyklonalen Fänger-Antikörper auch die einzelnen monoklonalen Fänger-Antikörper auf den Mikroarray-Chip mit zu immobilisieren.

Zusammenfassend lässt sich auf jeden Fall eindeutig erkennen, dass eine Detektion von künstlichem LPS sowohl mittels BINAX®E.I.A. als auch mittels CL-SMIA am MCR 3 möglich ist. Weiterhin kann man schlussfolgern, dass der Vergleich der LPS-Standards über den LAL Endotoxin-Test zu bewerten sehr sinnvoll ist. Denn damit können verschiedene Testsysteme miteinander verglichen werden. Solch ein Vergleich ist mit hitzeinaktivierten Zellen nämlich nicht möglich.

3.4.6. Zusammenfassung zum Urintest

Die erste Information, die man durch alle Urin-Versuche erhält, ist dass die verschiedenen *L. pneumophila*-Stämme eine unterschiedliche Menge an Lipopolysaccharidstrukturen an der

Oberfläche der Zellmembran exprimieren. Mit dem LAL-Test konnte nachgewiesen werden, dass die Endotoxin-Konzentration eines jeden *L. pneumophila*-Stammes unterschiedlich ist. Weiterhin kann die Aussage getroffen werden, dass der Nachweis von *L. pneumophila* direkt im Urin mit dem etablierten CL-SMIA am MCR 3 möglich ist. Eine Einsortierung in *L. pneumophila*-positive und -negative Proben, wie sie mit BINAX®E.I.A. ebenfalls durchgeführt wird, ist ohne Einschränkungen möglich. Da weist der CL-SMIA am MCR 3 noch Verbesserungspotential auf, da er nur so gut ist wie die verwendeten Antikörper. Das bedeutet, dass mit einer besseren Auswahl der Fänger-Antikörper, eine Steigerung der Nachweistärke durchaus möglich ist.

Zusätzlich zu einer Ja-/Nein-Information über die untersuchte Urin-Probe konnte durch den Einsatz der monoklonalen Fänger-Antikörper eine Zusatzinformation generiert werden. Man bekommt eine Aussage über die Zugehörigkeit zu einer Subgruppe von *L. pneumophila*, die man mit dem BINAX®E.I.A. nicht erhält.

Der polyklonale Fänger-Antikörper bietet keine optimale Leistungsfähigkeit, weil er nicht für jede Subgruppe die gleiche Nachweistärke mit sich bringt. Die Kombination aus monoklonalen und polyklonalem Fänger-Antikörper erhöht die Nachweistärke und Aussagefähigkeit. Durch weniger falsch positive und falsch negative Ergebnisse wird die Datenlage eindeutiger und eine Zuordnung zu einer Subgruppe ermöglicht weiteren Handlungspielraum. Um diese Aussage zu untermauern sind jedoch weitere Untersuchungen möglich. Diese waren aus Zeit- und Kostengründen (LAL-Test) im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich.

Weiterhin hat sich abgezeichnet, dass der polyklonale Fänger-Antikörper nicht die Leistungsfähigkeit liefert, die er zeigen soll. Bei den untersuchten Urinen von Patienten hätten die Proben, die als *L. pneumophila*-Serogruppen 2 – 15 vorab bestimmt wurden, detektiert werden müssen. Es ist anzunehmen, dass der polyklonale Fänger-Antikörper pAb nicht die gleiche Selektivität und Sensitivität für alle *L. pneumophila* Serogruppen sowie Subgruppen von *L. pneumophila* SG 1 mit sich bringt. Eine Untersuchung dieser Leistungsfähigkeit wäre im Rahmen einer anderen Studie auf jeden Fall sinnvoll.

3.5. Entwicklung und Aufbau einer Bioaerosolkammer

In der Vergangenheit kam es immer wieder zu Legionellose-Ausbrüchen, die in Zusammenhang mit Infektionen über kontaminierte Duschen stehen. Da durch wasserführende Anlagen mit einer Temperatur zwischen 25 und 45 °C besonders für immunsupprimierte Menschen ein erhöhtes Infektionsrisiko besteht, wurde der Charakterisierung von Duschwasser und dem dabei ebenso entstehenden Aerosol eine erhöhte Aufmerksamkeit gewidmet. Duschwasser wird in der Dusche vernebelt und bildet so ein leicht zu inhalierendes Aerosol. Wenn in dem vernebelten Wasser lebende und infektiöse Legionellen vorkommen, können diese durch die feinen Verästelungen der Lunge sehr leicht in die Bronchien gelangen. Im Rahmen eines LGL-geförderten Projektes wurde in Zusammenarbeit mit Frau Bettina Kiwull (Aerosol-Arbeitsgruppe am IWC) eine Bioaerosolkammer entwickelt, die Untersuchungen von *L. pneumophila*-haltigen Duschbioaerosolen ermöglicht, die der Risikogruppe 2 angehören. Es sollte unter anderem untersucht werden, wie ein Duschaerosol generiert wird und ob nach dem Duschvorgang überhaupt noch lebende Mikroorganismen detektiert werden können. Da die Entwicklungsarbeit der Duschbioaerosolkammer einen Großteil der Aufgaben von Frau Kiwull betrifft, werden nur die Arbeiten im Ergebnisteil aufgeführt, welche gemeinsam durchgeführt wurden. Der Aufbau der Kammer sowie die Vorcharakterisierung der entstehenden Bioaerosole sind dementsprechend nur in der Doktorarbeit von Frau Kiwull zu finden.

3.5.1. Dichtigkeitsüberprüfung - Ultrareines Wasser mit *Escherichia coli*

Um Duschaerosole auf ihre Größe und Zusammensetzung hin analysieren zu können, wurde eine Bioaerosolkammer konstruiert. Zur Gewährleistung eines sicheren Umgangs mit gesundheitsgefährdenden luftgetragenen Mikroorganismen wurde diese Kammer in Kombination mit einer Biosicherheitskammer verwendet (Kammer-in-Kammer-Prinzip). Dies war notwendig, um sicher mit Organismen der Sicherheitsstufe Bio 2 arbeiten zu können. Dabei ist es ausschlaggebend, dass sowohl die äußere Sicherheitskammer als auch die innere Aerosolkammer frei von Leckagen sind. Auf diese Weise ist die Laboratmosphäre über eine doppelte Trennwand von dem potentiell infektiösen Aerosol isoliert. Zur Überprüfung der

Bioaerosolkammer auf Undichtigkeiten wurden Duschaerosole erzeugt, die *E. coli* als Modellorganismus enthielten. Über Kultivierung auf Agarplatten wurden pro Platte 0 bis 8 Kolonien nachgewiesen (siehe Abbildung 61).

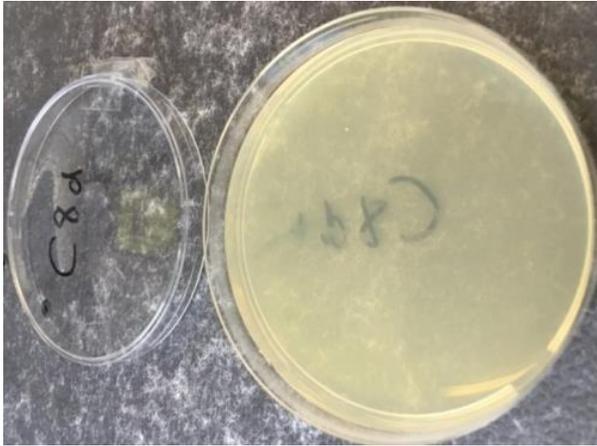


Abbildung 61: Beispiel einer gewachsenen *E. coli*-Kolonie auf einer Agar-Platte; Experiment mit *E. coli*-haltigem Duschaerosol.

Bei der Detektion von *E. coli* in der Biosicherheitskammer ist vor allem zu beachten, dass weniger als 1 % der Oberfläche der Sicherheitskammer betrachtet wurde. Geht man von einer vollständigen Abscheidung und gleichmäßigen Verteilung von Bakterien-haltigen Aerosolpartikeln auf der Oberfläche der äußeren Biosicherheitskammer aus, so lässt sich die Konzentration in der Sicherheitskammer berechnen. Es ergeben sich im Vergleich zur maximal möglichen Konzentration Verdünnungsfaktoren von 3×10^5 und 4×10^5 für Bakterien aus. Dieser Befund lässt die Schlussfolgerung zu, dass sich in der Bioaerosolkammer noch Leckagen befanden und eine Optimierung des Aufbaus für eine Anwendung von Aerosolen, die Legionellen enthalten, erforderlich war.

In einem finalen Schritt wurden die Endstopfen, welche die Löcher in der Bioaerosolkammer abdichten sollen, bei denen keine Bioaerosolprobenahme erfolgt, als ein Hauptverursacher identifiziert und ausgewechselt. Durch Verwendung von Dichtringen wurde diese Undichtigkeit behoben. Zusätzlich dazu wurden sowohl die Dichtung als auch Halterung der Frontscheibe der Bioaerosolkammer optimiert. Eine nachfolgende Wiederholung der Experimente mit *E. coli*

zeigte, dass aus der Bioaerosolkammer keine ungewollten Bioaerosole mehr entweichen konnten.

Nach Verwendung bakterienhaltiger Wasserproben wurden Oberflächen und wasserführende Bestandteile des Systems mit 70 %-igem Ethanol beziehungsweise Natriumhypochlorit-Lösung, gereinigt. Es zeigte sich, dass für Probenahmestellen, an denen zuvor mittels Abklatschprobe *E. coli* nachgewiesen werden konnten, nach Desinfektion ein negativer Befund vorlag. Auch im Abwasser des Duschmodells ergab der Colilert-Wassertest einen negativen Befund. Vor der Dekontamination ergab sich im Abwasser eine Konzentration von $2 \times 10^4 - 2 \times 10^5$ KBE/L. Es erfolgte also eine Reduktion um den Faktor 10^4 bis 10^5 . Bei der Oberflächenreinigung wurden schwer zugängliche Stellen nicht beachtet. Hier ist eine Vernebelung von 30 %-iger Wasserstoffperoxid-Lösung von Vorteil. Dafür kann z.B. ein Ultraschall-Zerstäuber, der mit wässriger Wasserstoffperoxid-Lösung betrieben wird, in die Biosicherheitskammer integriert werden.

3.5.2. *E. coli* als Modellorganismus für Dusch-Bioaerosole

Im Projekt wurde auf lebende *E. coli* als Modellorganismus für Legionellen zurückgegriffen, um erste Untersuchungen von Duschbioaerosolen durchzuführen. Dabei wurden *E. coli*-haltige Duschaerosole mit einer Konzentration von 7×10^7 Zellen/L (photometrisch über optische Dichte bestimmt) im Leitungswasser erzeugt. Über eine Pumpe wurde Luft mit einer Ansaugflussrate von 98 L/min über den Coriolis-Probenahmekopf angesaugt, wodurch Aerosolpartikel über Impingement in einem mit Flüssigkeit gefüllten Sammelgefäß abgeschieden werden konnten. Über den *E. coli*-Test (Colilert) wurde die Anzahl der koloniebildenden Einheiten in der Sammelflüssigkeit bestimmt und über das gesammelte Luftvolumen (686 L) die Konzentration an *E. coli* in der Aerosolphase der Bioaerosolkammer errechnet.

In dem vorgelegten Sammelgefäß konnte eine Konzentration von 8.726 KBE/100 mL bestimmt werden. Während der Sammlung wurde auch Duschwasser angesaugt. Somit vergrößerte sich das Volumen im Sammelgefäß um den Faktor 2,5. Die Sammeleffizienz des Coriolis μ wurde laut Carvalho et al. für Aerosole mit Durchmessern zwischen 2 μ m und 6 μ m auf 41 % bis 84 %

definiert [Carvalho et al., 2008]. Im Rahmen einer früheren Studie wurde für den Coriolis μ eine Sammeleffizienz von 42 % bestimmt. Auf Basis eines Sandwich-Immunoassay wurden hierfür 3 m³ Luft mit einem Ansaugstrom von 300 L/m³ gesammelt [Langer et al., 2012]. Mit diesen beiden Werten konnte die Konzentration der *E. coli*-haltigen Duschaerosole mit 3 × 10⁴ KBE/m³ berechnet werden. Auf Grundlage der angenommenen Aerosolpartikelgröße von 2 μ m wurde der Verteilungskoeffizient definiert (siehe Formel 5):

$$\text{Verteilungskoeffizient} = \frac{\text{mittlere Bakteriendichte in der Luft [CFU} \times \text{m}^{-3}\text{]}}{\text{mittlere Bakteriendichte im Wasser [CFU} \times \text{L}^{-1}\text{]}}$$

(Formel 5)

Formel 5: Berechnung des Verteilungskoeffizienten gemäß: [Schoen et al., 2011]

Er wurde bei 4 × 10⁻⁴ KBE m⁻³/Zellen L⁻¹ bestimmt. Bei einem Duschvorgang von 7 min (Fließgeschwindigkeit 7 L/min) konnte man also davon ausgehen, dass insgesamt 0,6 ‰ aller *E. coli* aus dem Leitungswasser als Bioaerosol gesammelt werden konnten. Bei der Annahme einer Aerosolpartikelgröße von 6 μ m sinkt dieser Wert auf 0,3 ‰. Für eine genauere Gefährdungsbeurteilung müsste jedoch die Sammeleffizienz in Abhängigkeit der Partikelgröße beurteilt werden. In bisherigen Studien wurde bisher nur ein Vorhersagemodell für *Legionella spp.* in wasserführenden Anlagen bestimmt [Schoen et al., 2011]. In einer Altenheimstudie wurde eine nicht gröbenselektive Sammelmethode verwendet [Bauer et al., 2008], die auch größere, nicht lungengängige Partikel quantifiziert. Derselbe Effekt kann beobachtet werden, wenn, wie auch in dieser Studie, die Sammlung der Aerosolpartikel mit dem Coriolis μ erfolgt. Die Frage nach der Lungengängigkeit ist nur zu beantworten, wenn eine Größenverteilung der Aerosolpartikel vorliegt. Anhand derer lässt sich beurteilen, wie groß der Anteil der lungengängigen Aerosole ist. Entsprechend muss zukünftig untersucht werden, wie die Bakterien in den Größenfraktionen von Aerosolpartikeln verteilt sind.

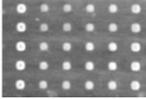
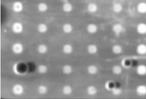
3.6. Etablierung eines Sandwich-Immunoassay-Mikroarrays zur Detektion von *Cronobacter sakazakii*

Im Rahmen einer Prinzipstudie für das BMBF-Projekt LEVERA (Lebensmittelversorgung & Analytik) sollte untersucht werden, ob der etablierte CL-SMIA für *L. pneumophila* sich am MCR 3 auch für andere Mikroorganismen eignet. Dafür sollte das Nachweisverfahren für das lebensmittelrelevante Bakterium *Cronobacter sakazakii* verwendet werden. Im besonderen Fokus stand hierbei, eine schnelle Methode zu etablieren, mit der der Nachweis von *C. sakazakii* in verschiedenen Milchproben ermöglicht werden sollte.

Für die Untersuchungen wurden 2 monoklonale, Biotin-markierte sowie jeweils 2 unmarkierte, poly- und monoklonale anti-*C. sakazakii*-Antikörper vom Lehrstuhl für Milchwissenschaften von Prof. Usleber in Gießen, sowie dem Lehrstuhl für Milchhygiene von Prof. Märtlbauer in Oberschleißheim, zur Verfügung gestellt. Weiterhin konnte mit verschiedenen Stämmen von *C. sakazakii* Serogruppe O1 und O2 gearbeitet werden. Diese wurden im gesamten Experiment hitzeinaktiviert eingesetzt.

In einem ersten Test wurden das bestehende *L. pneumophila*-Messprogramm am MCR 3 (Messprogramm A) sowie ein Schnellprogramm auf Basis des CL-SMIA (Messprogramm B) zur Detektion von *C. sakazakii* verwendet. Der Unterschied beider Messprogramme beruht auf der unterschiedlichen Fließgeschwindigkeit der Probenvolumeninkremente über den Chip. Bei Messprogramm A wird die Probe mit 0,5 $\mu\text{L/s}$ und Inkubationszeiten von 30 s über den Chip gepumpt. Bei Messprogramm B hingegen wird ein schnellerer Probenfluss mit 10 $\mu\text{L/s}$ und nur 5 s Inkubationszeit gewählt. Für die *C. sakazakii*-Messungen am MCR 3 wurden jeweils 2 unmarkierte, mono- und polyklonale Fänger-Antikörper auf dem Multiplex-Chip immobilisiert und mit den beiden Biotin-markierten, monoklonalen Antikörpern detektiert. In einem zweiten Schritt wurden anschließend drei verschiedene Methoden zum Abblocken der Chip-Oberfläche miteinander verglichen. In nachfolgender Tabelle 24 sind die Abbildungen der vermessenen Mikroarraychips für beide Messprogramme mit den durchgeführten Optimierungsschritten gegenübergestellt.

Tabelle 24: Verschiedene Kombinationen aus Fänger- und Detektions-Antikörper und Markierungsenzym für *C. sakazakii* SG O1 (hitzeinaktiviert) am MCR 3 mit CL-SMIA-Messprogramm A und B.

Optimierungsschritt	Messprogramm A	Messprogramm B
Setup 1 - Detektion SA-poly HRP (c = 2µg/mL) pAb 104-Biotin (c = 21,2 µg/mL)		
Setup 2 - Detektion SA-poly HRP (c = 4µg/mL) pAb 104-Biotin (c = 21,2 µg/mL)		
Blockingmethode 1 TRIS/HCl (pH 8,5)		
Blockingmethode 2 PBS/0,5% Casein		
Blockingmethode 3 PBS/ 5% BSA		

Es ist ersichtlich, dass das Hintergrundsignal bei Verwendung des Messprogramms A wesentlich höher ausfällt, als bei Messprogramm B. Das lässt sich folgendermaßen erklären: Bei Messprogramm A wird der Detektionsantikörper sowie das Markierungsenzym im Stopp-Flow-Modus über den Chip gepumpt. Das bedeutet, es gibt immer eine Inkubationszeit von mehreren Sekunden, in der der Antikörper mit der Oberfläche wechselwirken kann, bis sich ein Gleichgewicht einstellt. Bei den verwendeten Antikörpern für *C. sakazakii* scheint eine längere Verweilzeit auf der Chip-Oberfläche eine unspezifische Bindung an der Chip-Oberfläche zu verursachen. Aus diesem Grund wird zukünftig das Messprogramm B für die Messung von *C. sakazakii* verwendet.

Weiterhin ist ersichtlich, dass ein Abblocken der Chip-Oberfläche mit dem Einsatz von TRIS/HCl bei pH 8,5 die besten Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse bietet. Im Messprogramm B kann für das Blocken mit PBS/5% BSA ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von 3,9 erreicht werden. Bei PBS/0,5 % Casein wurde das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis bei 4,6 definiert. Eine weitere Steigerung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses auf 5,1 wurde beim Blocken mit TRIS/HCl (pH 8,5) erreicht. Auf Basis der erhaltenen Erkenntnisse wird folgendes CL-SMIA-

Messprogramm für die Messung von *C. sakazakii* am MCR verwendet (siehe Tabelle 25). Weiterhin werden die Chips mit TRIS-HCl bei pH 8,5 geblockt, ehe sie zur Messung eingesetzt werden.

Tabelle 25: Etabliertes Messprogramm für die Detektion von *Cronobacter sakazakii* (hitzeinaktiviert) am MCR 3; Kurzzeichen: CL-SMIA_{Cron}.

	Volumen	Flussrate
Probeninjektion	600 µl	Stopp-Flow-Modus mit 10 µl/s und 5 s Interaktionszeit; 10 Wdh.
Waschschritt	2000 µl	100 µl/s
Biotin-markierter Detektions-Antikörper	600 µl	Stopp-Flow-Modus mit 10 µl/s und 2 s Interaktionszeit; 10 Wdh.
Waschschritt	2000 µl	100 µl/s
HRP-markiertes Streptavidin	600 µl	10 µl/s kontinuierlicher Fluss
Waschschritt	2000 µl	100 µl/s
Chemilumineszenz-Substrate Luminol und Wasserstoffperoxid	200 µl von jedem Substrat	20 µl/s
Bild mit CCD-Kamera	-	60 s
Waschschritt	1500 µl	500 µl/s
	3 x 1000 µl	68 µl/s
Programm-Dauer	12 min	

Auf Basis des etablierten Messprogramms werden für *C. sakazakii* SG O1 und O2 Kalibrierkurven aufgenommen. Hierfür werden die Fänger-Antikörper mAb 1C4, mAb 2F8, pAb 104 und pAb 105 auf dem Chip immobilisiert.

Begonnen wurde mit dem Nachweis von *C. sakazakii* SG O2. Dafür wurde der Stamm DB 255/5-05 in verschiedenen Konzentrationen am MCR 3 vermessen. Grundlage war das Cronobacter-Messprogramm CL-SMIA_{Cron}. Die Detektion erfolgt mit dem polyklonalen Detektions-Antikörper pAb 105, kombiniert mit anti-Kaninchen-HRP als Markierungsenzym. Die ermittelten Konzentrationen der Cronobacter-Kalibrierlösungen waren 0 KBE/mL, $1,0 \times 10^2$ KBE/mL, $1,0 \times 10^3$ KBE/mL, $1,0 \times 10^4$ KBE/mL, $1,0 \times 10^5$ KBE/mL, $1,0 \times 10^6$ KBE/mL und $1,0 \times 10^7$ KBE/mL. Durch die semilogarithmische Auftragung der erhaltenen Chemilumineszenz-Signale gegen die eingesetzte Cronobacter-Konzentration erhielt man die sigmoidale Kalibrierfunktion für mAb 2F8 (siehe Abbildung 62).

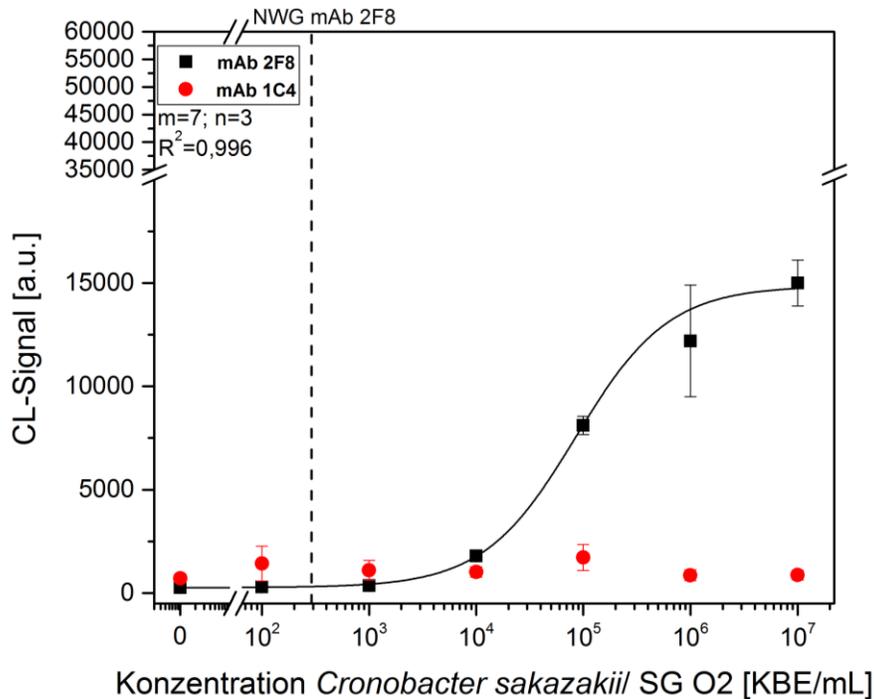


Abbildung 62: Detektion von verschiedenen Konzentrationen von *C. sakazakii* SG O2 (DB 255/5-05) (hitzeinaktiviert) in ultrareinem Wasser mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 2F8 und dem Detektions-Antikörper pAb 105 + anti-Kaninchen-HRP; Kalibrierkurve mit sigmoidaler Fitfunktion.

Es wurde für den monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 2F8, detektiert mit polyklonalem Fänger-Antikörper pAb 105 und anti-Kaninchen-HRP in ultrareinem Wasser, eine Nachweisgrenze von $2,9 \times 10^2$ KBE/mL ermittelt. Der Arbeitsbereich für den Nachweis von *C. sakazakii* SG O2 mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 2F8 umfasst einen Konzentrationsbereich zwischen $2,1 \times 10^4$ KBE/mL und $3,4 \times 10^5$ KBE/mL.

Der monoklonale Fänger-Antikörper mAb 1C4 gab mit dem getesteten Setup keine Signale. Dies war auch so zu erwarten, denn mAb 1C4 fängt spezifisch nur *C. sakazakii* SG O1. In einem zweiten Versuch wird eine weitere Kalibrierkurve für *C. sakazakii* O2 aufgenommen. Hierbei wurde die Detektion mit dem biotinylierten Detektions-Antikörper mAb 2F8 sowie Streptavidin-HRP durchgeführt, um zu überprüfen, ob mit dem monoklonalen Antikörper mAb 2F8, als Fänger und als Detektor eingesetzt, eine höhere Signalintensität erreicht werden kann. Die ermittelten Konzentrationen der Cronobacter-Kalibrierlösungen waren 0 KBE/mL, $1,0 \times 10^2$ KBE/mL, $1,0 \times 10^3$ KBE/mL, $1,0 \times 10^4$ KBE/mL, $1,0 \times 10^5$ KBE/mL, $1,0 \times 10^6$ KBE/mL und $1,0 \times 10^7$

KBE/mL. Die ermittelten Signalintensitäten, aufgetragen gegen die eingesetzte Konzentration werden in Abbildung 63 dargestellt.

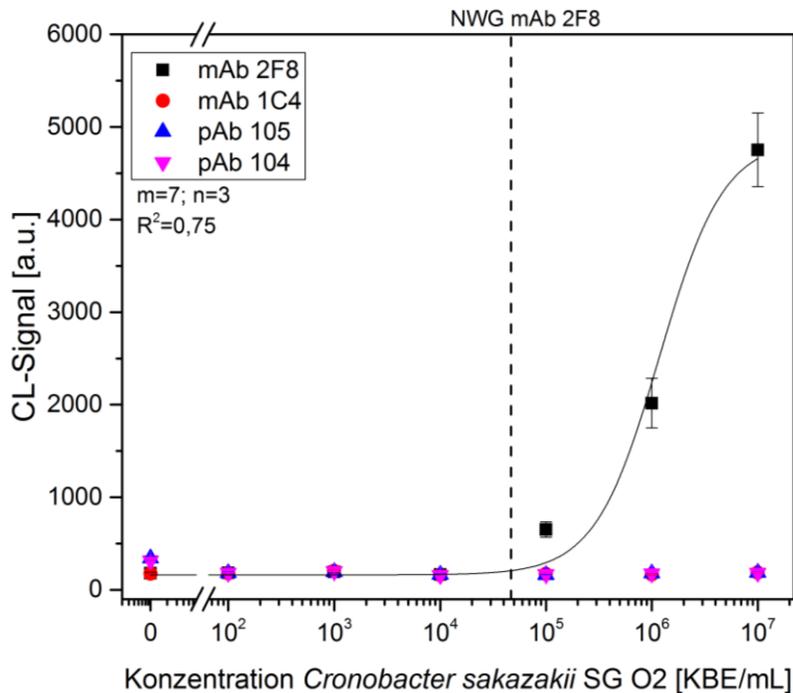


Abbildung 63: Detektion von verschiedenen Konzentrationen von *C. sakazakii* SG O2 (DB 255/5-05) (hitzeinaktiviert) in ultrareinem Wasser mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 2F8 und dem Detektions-Antikörper mAb 2F8-Biotin + Streptavidin-HRP; Kalibrierkurve mit sigmoideal Fitfunktion.

Als Nachweisgrenze für den monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 2F8 kombiniert mit dem monoklonalen Detektionsantikörper mAb 2F8-Biotin plus Streptavidin-HRP wurde in ultrareinem Wasser ein Wert von $4,7 \times 10^4$ KBE/mL ermittelt. Der Arbeitsbereich für den Nachweis von *C. sakazakii* SG O2 mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 2F8 und mAb 2F8/SA-HRP als Detektions-Antikörper umfasst einen Konzentrationsbereich zwischen $4,5 \times 10^5$ KBE/mL und $3,1 \times 10^6$ KBE/mL.

Für die polyklonalen Fänger-Antikörper pAb 104 und pAb 105 konnte mit diesem Setup auf dem MCR 3 kein Signal ermittelt werden. Das bedeutet, dass diese beiden Antikörper als Fänger-Antikörper für Durchfluss-Mikroarrays nicht geeignet waren.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität wurden weitere Experimente mit verschiedenen *C. sakazakii*-Stämmen der Serogruppe O2 durchgeführt. Hierfür wurden ebenso beide Setups

zur Detektion (pAb 105 + Anti-Kaninchen HRP und mAb 2F8-Biotin + Streptavidin-HRP) verwendet. Die Signalintensitäten für den monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 1C4 (detektiert spezifisch nur SG O1) im Vergleich zu Fänger-Antikörper mAb 2F8 wird in der nachfolgenden Abbildung 64 dargestellt. Die Höhe der prozentualen Kreuzreaktivität ist ebenso angegeben:

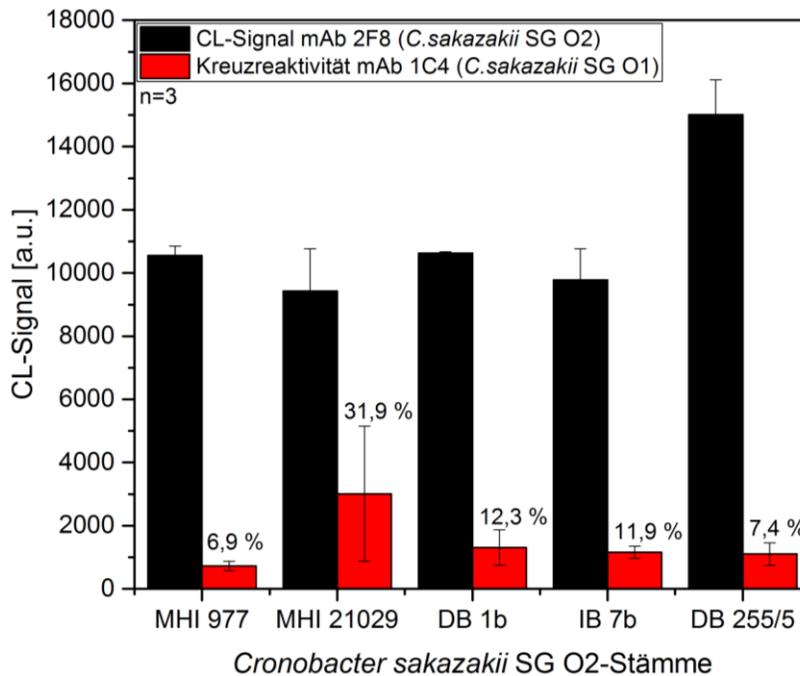


Abbildung 64: Prozentuale Angabe der Kreuzreaktivität von verschiedenen Stämmen von *C. sakazakii* SG O2 (hitzeinaktiviert) in ultrareinem Wasser mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 2F8 und dem Detektions-Antikörper pAb 105 + anti-Kaninchen-HRP.

Anhand des durchgeführten Experiments lässt sich erkennen, dass durchaus eine Kreuzreaktivität zwischen *C. sakazakii* SG O1 und O2 vorhanden ist. Die variiert zwischen 6,9 % für Stamm MHI 977 und 31,9 % für Stamm MHI 21029. Bei einer Probe, die sowohl *C. sakazakii* SG O1 als auch O2 aufweist, sind bis zu 30 % falschpositive Ergebnisse zu erwarten. Da keine anderen Fänger- und Detektions-Antikörper zur Analyse vorlagen, lässt sich keine weitere Aussage darüber treffen, ob für ein anderes Antikörper-Paar die Kreuzreaktivität in einem ähnlichen Rahmen anzusiedeln wäre.

Für die andere Detektions-Antikörper Kombination mit mAb 2F8-Biotin und Streptavidin-HRP wird die Kreuzreaktivitätsüberprüfung ebenso durchgeführt. Die Signalintensitäten für den

monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 1C4 (detektiert spezifisch nur SG O1) im Vergleich zu Fänger-Antikörper mAb 2F8 wird in der nachfolgenden Abbildung 65 dargestellt. Die Höhe der prozentualen Kreuzreaktivität ist ebenso angeführt:

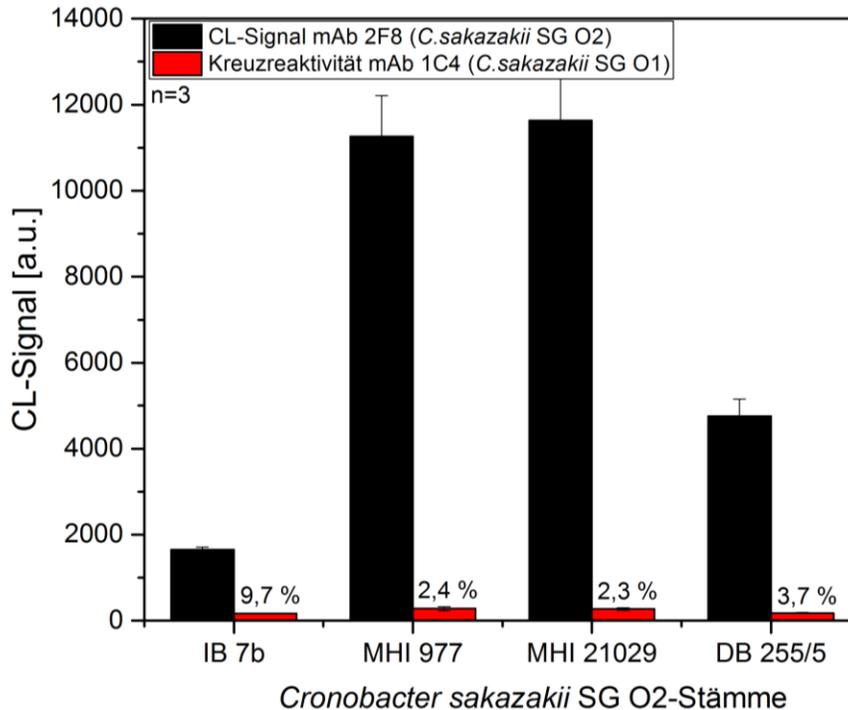


Abbildung 65: Prozentuale Angabe der Kreuzreaktivität von verschiedenen Stämmen von *C. sakazakii* SG O2 (hitzeinaktiviert) in ultrareinem Wasser mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 2F8 und dem Detektions-Antikörper mAb 2F8-Biotin + Streptavidin-HRP.

Die oben aufgeführte Abbildung zeigt, dass nur eine minimale Kreuzreaktivität zwischen *C. sakazakii* SG O1 und O2 vorhanden ist, wenn diese mit mAb 2F8-Biotin und Streptavidin-HRP detektiert werden. Diese variiert zwischen 2,3 % für Stamm MHI 21029 und 9,7 % für Stamm IB 7b. Bei einer Probe, die sowohl *C. sakazakii* SG O1 als auch O2 aufweist werden maximal 10 % falschpositive Ergebnisse zu erwarten sein.

In weiteren Experimenten wurde das etablierte Setup nun ebenso auf *C. sakazakii* SG O1 übertragen und eine Kalibrierkurve aufgenommen. Hierfür wurden ebenso die Fänger-Antikörper mAb 1C4, mAb 2F8, pAb 104 und pAb 105 auf dem Chip immobilisiert.

Für die Kalibrierkurve wurde der Stamm MHI 21001 in verschiedenen Konzentrationen am MCR 3 vermessen. Die Detektion erfolgte mit dem monoklonalen Biotin-markierten Detektions-

Antikörper mAb 1C4, kombiniert mit Streptavidin-HRP als Markierungsenzym. Die ermittelten Konzentrationen der Cronobacter-Kalibrierlösungen waren 0 KBE/mL, $1,0 \times 10^3$ KBE/mL, $1,0 \times 10^4$ KBE/mL, $1,0 \times 10^5$ KBE/mL, $1,0 \times 10^6$ KBE/mL, $1,0 \times 10^7$ KBE/mL, $1,0 \times 10^8$ KBE/mL und $1,0 \times 10^9$ KBE/mL. Durch die semilogarithmische Auftragung der erhaltenen Chemilumineszenz-Signale gegen die eingesetzte Cronobacter-Konzentration erhält man die sigmoide Kalibrierfunktion für mAb 1C4 (siehe Abbildung 66).

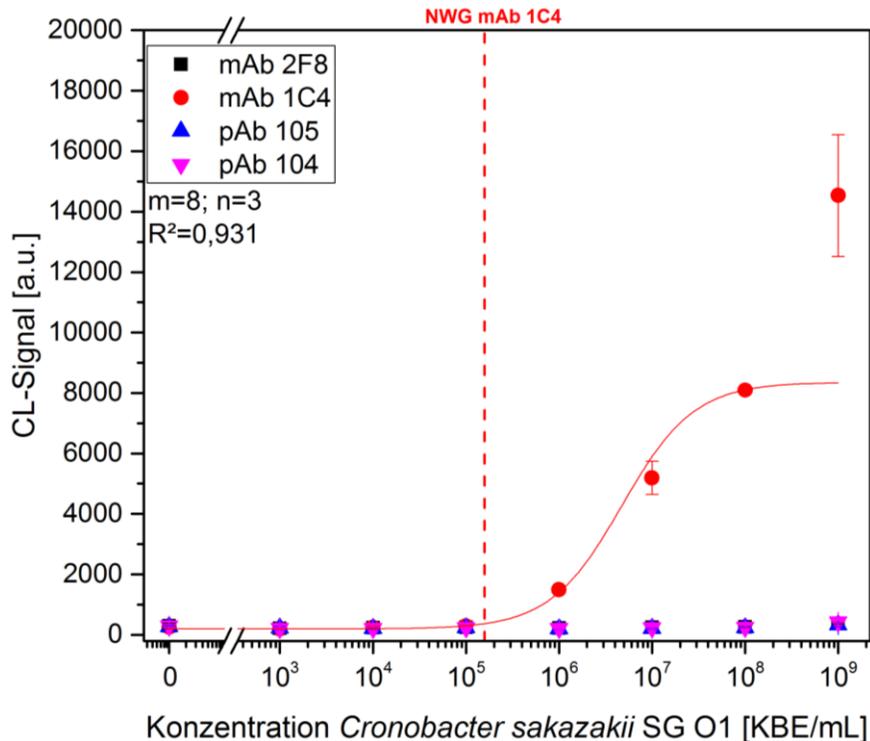


Abbildung 66: Detektion von verschiedenen Konzentrationen von *C. sakazakii* SG O1 (MHI 21001) (hitzeinaktiviert) in ultrareinem Wasser mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 1F4 und dem Detektions-Antikörper mAb 1C4-Biotin + Streptavidin-HRP; Kalibrierkurve mit sigmoidealer Fitfunktion.

Als Nachweisgrenze für den monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 1C4 kombiniert mit dem monoklonalen Detektionsantikörper mAb 1C4-Biotin mit SA-HRP als Markierungsenzym wurde ein Wert von $1,6 \times 10^5$ KBE/mL ermittelt. Der Arbeitsbereich für den Nachweis von *C. sakazakii* SG O1 umfasst einen Konzentrationsbereich zwischen $1,4 \times 10^6$ KBE/mL und $1,6 \times 10^7$ KBE/mL. Der monoklonale Fänger-Antikörper mAb 2F8 gab hier keine Signale, denn mAb 2F8 fängt spezifisch nur *C. sakazakii* SG O2. PAb 104 und pAb 105 wiesen auch hier keine Signalintensität

auf. Das bedeutet, dass diese beiden Antikörper als Fänger-Antikörper im flussbasierten CL-SMIA auch für *C. sakazakii* SG O1-Stämme nicht geeignet sind.

Zur Bestimmung der Kreuzreaktivität wurden anschließend Experimente mit verschiedenen *C. sakazakii*-Stämmen der Serogruppe O1 durchgeführt. Hierfür wurden mAb 1C4-Biotin und Streptavidin-HRP zur Detektion verwendet. Die Signalintensitäten sowie die Kreuzreaktivität für den monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 2F8 (detektiert spezifisch nur SG O2) im Vergleich zu Fänger-Antikörper mAb 1C4 werden in der nachfolgenden Abbildung 67 dargestellt.

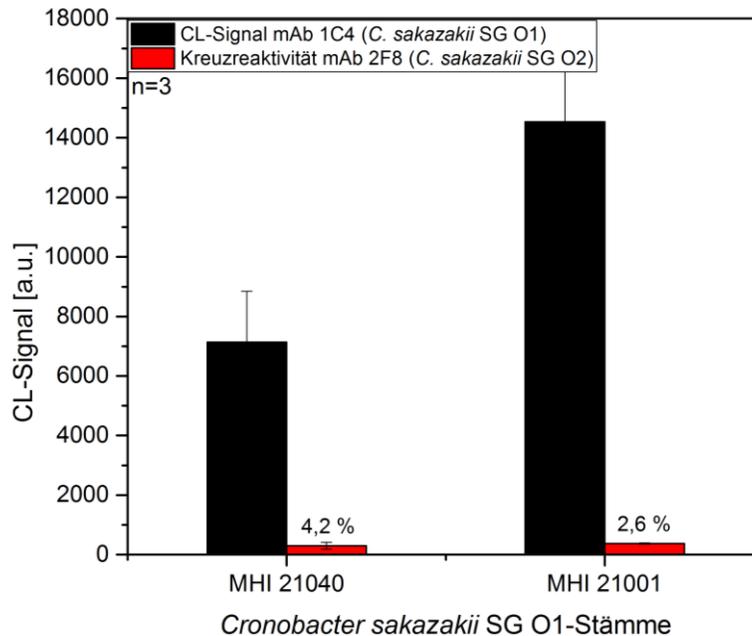


Abbildung 67: Nachweis der Kreuzreaktivität verschiedener Stämme von *Cronobacter sakazakii* SG O2 (hitzeinaktiviert) in ultrareinem Wasser mit dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 2F8 und dem Detektions-Antikörper mAb 2F8-Biotin + Streptavidin-HRP.

Anhand des durchgeführten Experiments lässt sich erkennen, dass eine minimale Kreuzreaktivität zwischen *C. sakazakii* SG O1 und O2 vorhanden ist, wenn die Detektion mit mAb 1C4 und Streptavidin-HRP erfolgt. Diese variiert zwischen 2,6 % für Stamm MHI 21001 und 4,2 % für Stamm MHI 21040. Diese niedrige Kreuzreaktivität und hohe Selektivität der Fänger- und Detektions-Antikörper lässt sich auf einen sehr hoch konzentrierten, gut aufgereinigten und sehr selektiven monoklonalen Antikörper (mAb 1C4) zurückführen. Mit ihm als Fänger- und Detektions-Antikörper kommt es in 4,2 % der Experimenten zu falsch positiven Ergebnissen bei

einer Probe, die SG O1 beinhaltet und wo mAb 2F8 (detektiert SG O2) auf dem Chip immobilisiert ist.

Im Rahmen einer Prinzipstudie für das BMBF-Projekt LEVERA sollte der etablierte CL-SMIA für den Nachweis von Legionellen für das lebensmittelrelevante Bakterium *C. sakazakii* genutzt werden. Es wurde ein optimiertes Schnellprogramm etabliert. Statt des Stopp-Flow-Modus mit langen Interaktionszeiten zwischen Antikörper und Chip-Oberfläche, wurden ein kontinuierlicher Fluss sowie maximal kurze Interaktionszeiten für den Detektionsantikörper eingeführt. Somit wurde eine Reduktion des Hintergrundsignals ermöglicht, sowie das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis maximiert. In einem weiteren Schritt konnte die Methode des Abblockens der Chip-Oberfläche optimiert werden. Zukünftig wird bei Cronobacter-Multiplex-Chips mit TRIS-HCl bei pH 8,5 geblockt.

Nach Etablierung des Messprogramms sowie Optimierung der Chip-Fertigung wurden 3 Kalibrierkurven für *C. sakazakii* SG O1 und O2 aufgenommen. Weiterhin wurde die Kreuzreaktivität der Fänger- und Detektions-Antikörper für die beiden Serogruppen näher untersucht. Wenn eine Detektion von *C. sakazakii* SG O2 angestrebt ist, sind eindeutig der monoklonale Fänger-Antikörper mAb 2F8 und der Detektions-Antikörper pAb 105 kombiniert mit anti-Kaninchen-HRP als Signalverstärker besser geeignet. Das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis ist relativ niedrig und eine Kreuzreaktivität bewegt sich im Rahmen von 6,9-31,9 %. Die Nachweisgrenze für dieses Setup wurde bei $2,9 \times 10^2$ KBE/mL bestimmt. Die Intensitäten des CL-Signals bei einer Verwendung des monoklonalen Antikörpers mAb 2F8 als Fänger und Detektor (Biotin-markiert) sind niedriger, auch wenn die Kreuzreaktivitäten sich hier im einstelligen Bereich bewegen. Die ermittelte Nachweisgrenze beläuft sich hier hingegen jedoch auf $4,7 \times 10^4$ KBE/mL, was zwei Logstufen mehr ausmacht. Aufgrund der aufgeführten Vorteile empfiehlt sich die Verwendung des anderen Setups.

Für die Detektion von *C. sakazakii* SG O1 wurde die Kombination aus dem monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 1F4 und dem Detektions-Antikörper mAb 1C4-Biotin mit Streptavidin-HRP etabliert. Aufgrund mangelnder Vergleichsmethoden muss bei der gewünschten Detektion von *C. sakazakii* SG O1 zu diesem Setup gegriffen werden. Die polyklonalen Antikörper pAb 104 und pAb 105 eignen sich nicht zur Verwendung in einem Durchfluss-Mikroarray.

4. Zusammenfassung und Ausblick / Summary and Outlook

4. Zusammenfassung und Ausblick / Summary and Outlook

Eine Überwachung der Konzentration an freien und infektiösen Legionellen gewinnt im öffentlichen Leben immer mehr an Bedeutung. Legionellen kommen ubiquitär in allen wasserführenden Systemen vor. Da sie Infektionen beim Menschen auslösen können, auftretend als Legionellose oder Pontiac-Fieber, müssen die Risikofaktoren wie z.B. Biofilmwachstum in den Rohrleitungen, erhöhte Wassertemperaturen zwischen 25 und 42 °C, ein starkes Nährstoffangebot in alten Rohren sowie Wasserstagnation und tote Endstücke streng überwacht werden.

Die meisten Infektionen werden von der Spezies *L. pneumophila* und hierbei besonders der Serogruppe 1 verursacht. Da die Infektion in den meisten Fällen durch Einatmen von kontaminierten Aerosolen erfolgt, müssen alle möglichen Quellen besonders beobachtet werden. Dazu gehören zum Beispiel Kühltürme, Rückkühlwerke, Duschen, Vernebler oder Kompostieranlagen.

Die neuen gesetzlichen Richtlinien, z.B. die Trinkwasserverordnung 2011, sowie die aktuellsten VDI-Vorschriften zum hygienegerechten Betrieb von Kühltürmen und zur Untersuchung von legionellenhaltigen Bioaerosolen rücken vermehrt in den Fokus der Medien. Dadurch erhöht sich auch der Druck auf die Wissenschaft für eine schnelle und verlässliche Legionellen-Nachweismethode. Nachdem der Goldstandard immer noch das kulturbasierte Nachweisverfahren auf Selektivnährmedium ist, welches 7 – 10 Tage dauert, ist ein neues und schnelles Verfahren dringend notwendig. Gerade im Ausbruchsfall möchte man nicht eine Woche auf ein zuverlässiges Ergebnis warten müssen. Hinsichtlich dieser Anforderungen ist ein Mikroarray-basiertes Nachweisverfahren eine schnelle und effektive Methode, um einzelne Legionellen-Subtypen nachzuweisen. Es werden sowohl die parallele Immobilisierung von verschiedenen Antikörpern auf der Chip-Oberfläche als auch der parallele Nachweis von vielen verschiedenen Ziel-Antigenen ermöglicht.

Die Zielsetzung dieser Forschungsarbeit bestand in der Etablierung eines Chemilumineszenz-Sandwich-Mikroarray-Immunoassays (CL-SMIA) am MCR 3 zur Detektion von *L. pneumophila*. Das Prinzip des eingesetzten Mikroarray-Nachweises basierte auf einem Sandwich-ELISA, der auf die Mikroarray-Plattform MCR 3 übertragen wurde. Verschiedene Antikörper gegen

L. pneumophila wurden als Fänger-moleküle auf einer DAPPG-modifizierten Glasoberfläche immobilisiert. Die Verwendung eines Biotin-markierten Detektions-Antikörpers vollendete die Ausbildung eines Sandwich-Immunoassays an den Stellen, wo Legionella-Antigene auf dem Mikroarray gebunden worden sind. Die Signalerzeugung erfolgte unter Verwendung eines Streptavidin-poly-HRP-Konjugats. Das emittierte Chemilumineszenzsignal von Luminol und H₂O₂ wurde mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet.

Im Rahmen der Vorarbeiten wurden die verwendeten Stämme von *L. pneumophila* kultiviert und mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Aus der Stammlösung wurden Verdünnungsreihen erstellt, die anschließend am MCR 3 vermessen werden konnten. Auf Basis des etablierten Messprogramms aus der Masterarbeit wurden alle Anforderungen an das neue Messprogramm definiert. Ziel der Programmentwicklung war hierbei, ein Nachweisprogramm zu entwickeln, welches mit hohen Chemilumineszenz-Signalintensitäten und geringem Hintergrundsignal den Nachweis von *L. pneumophila* ermöglicht. Es wurde zu Beginn der Doktorarbeit eine Optimierung aller einzelnen Assay- und Programm-Parameter durchgeführt. Untersucht wurden hierbei u. a. die flussbasierten Inkubationsbedingungen (kontinuierlich oder Stopp-Flow), die Dauer der Interaktionszeit zwischen Chip-Oberfläche und durchgepumptem Antikörper, die Fließgeschwindigkeiten der einzelnen Assay-Komponenten, die verschiedenen Waschschriffe, die Verwendung eines anderen Konjugat-Enzyms (Streptavidin-poly-HRP anstatt Streptavidin-HRP) sowie die Bestimmung aller erforderlichen Konzentrationen der einzelnen Komponenten. Als Resultat daraus entstand ein Assay mit einer Gesamtdauer von 36 Minuten, mit welchem *L. pneumophila* bei einer Messtemperatur von 35°C direkt auf dem Mikroarray-Chip nachgewiesen werden konnten. Die Signalintensität konnte nach allen Optimierungsschritten von 100 a.u. auf 45.000 a.u. gesteigert werden. Das entsprach dem Faktor 450. Dieses etablierte Messprogramm wurde für alle weiteren Messungen verwendet.

Es wurden Kalibrierkurven mit verschiedenen Fänger-Antikörpern aufgenommen. Für den polyklonalen Fänger-Antikörper pAb konnte eine Nachweisgrenze von $6,1 \times 10^3$ KBE/mL definiert werden. Für die monoklonalen Fänger-Antikörper mAb 10/6, mAb 20/1, mAb 8/4, mAb 3 und mAb 3/1 wurden ebenso Kalibrierkurven aufgenommen. Hierbei lagen die Nachweisgrenzen für *L. pneumophila*, abhängig von verwendetem *L. pneumophila*-Stamm und Fänger-Antikörper, zwischen $6,7 \times 10^2$ KBE/mL für mAb 3 und $5,6 \times 10^4$ KBE/mL für mAb 20/1. Es

konnte gezeigt werden, dass eine Detektion von verschiedenen *L. pneumophila*-Subtypen durch die Immobilisierung von verschiedenen Fänger-Antikörpern auf einem Mikroarray-Chip möglich ist.

Im Rahmen einer Masterarbeitsbetreuung wurde eine Aufkonzentrierungsmethode für Oberflächenwasser etabliert. Dabei wurden verschiedene Realproben aus bayerischen Flüssen und einem Wasserfall mit einem neu etablierten Verbundverfahren untersucht. Die dabei verwendete Aufkonzentrierungsmethode kombinierte die monolithische Adsorptions-Filtration (MAF) mit der Zentrifugalen Ultrafiltration (ZeUF) und ermöglichte somit eine Aufkonzentrierung von Legionellen in der zu untersuchenden Wasserprobe. Die Detektion der Proben erfolgte anschließend am MCR 3 mit dem etablierten CL-SMIA. Mittels der Kombination beider Methoden konnten in allen untersuchten Oberflächengewässern *L. pneumophila* nachgewiesen werden. Eine Verringerung der Nachweisgrenze wurde in einer Prinzipstudie für einen monoklonalen Fänger-Antikörper (mAb 10/6) gezeigt. In diesem Rahmen wurde eine Reduzierung der Nachweisgrenze von $2,8 \times 10^3$ KBE/mL auf 0,4 KBE/mL erreicht, was in etwa mit dem Aufkonzentrierungsfaktor 10.000 korreliert. Diese Nachweisgrenze entspricht den Anforderungen der Trinkwasserverordnung (1 KBE/mL) und zeigt das herausragende Potenzial dieser neuen Methode. Alle erhaltenen Ergebnisse dieser Studie wurden in der Fachzeitschrift „Analytical and Bioanalytical Chemistry“ publiziert [Wunderlich et al., 2016].

Parallel zur Etablierung des Messprogramms sollten verschiedene Realproben vermessen und hinsichtlich des Vorkommens von *L. pneumophila* eingeordnet werden. Die Anwendbarkeit des CL-SMIA am MCR 3 wurde mit vielen verschiedenen Realproben untersucht. Hierbei wurden Proben aus Kläranlagen verschiedener Industriebetriebe, Bioaerosolproben, Oberflächenwasser und Leitungswasser getestet. In fast allen untersuchten Proben konnten *L. pneumophila* erfolgreich detektiert werden. In einigen Proben gelang es sogar, mittels des eingesetzten Antikörper-Panels eine erste Subtypisierung durchzuführen.

Weiterhin wurde im Rahmen einer Prinzipstudie auch Urin von Legionellose-infizierten Patienten untersucht. Es wurde ein künstlicher LPS-Standard in Negativ-Urin generiert. Anschließend erfolgte eine Konzentrationsbestimmung der darin enthaltenen LPS-Strukturen mittels LAL-Test. Der etablierte CL-SMIA wurde zum Detektieren von Negativ-Urin, Positiv-Urin

erkrankter Patienten sowie für die künstlichen LPS-Standards am MCR 3 verwendet. Neu und bisher einmalig ist hierbei, dass es gelungen ist, LPS-Strukturen direkt im Urin von Legionellose-infizierten Patienten nachzuweisen. Der qualitative Nachweis mit dem polyklonalen Fänger-Antikörper ist fast gleichwertig mit dem Standard-Nachweisverfahren BINAX®E.I.A., geht aber viel schneller (36 min im Vergleich zu 3 – 4 Stunden). Mittels eines Panels an verschiedenen monoklonalen Fänger-Antikörpern lässt sich aus den Antigenen im Urin sogar eine Zuordnung von Subgruppen von *L. pneumophila* durchführen.

Aus den Ergebnissen der untersuchten Realproben lässt sich schlussfolgern, dass Antikörper-Mikroarrays im Zusammenhang mit dem MCR 3 eine geeignete Schnellmessmethode für Routineuntersuchungen darstellen. Die zusätzlich entwickelte Aufkonzentrierungsmethode aus MAF und ZeUF ermöglicht es, dass ab einer Legionellenkonzentration von über 1 KBE/mL ein positiver Befund in einer Wasserprobe bestimmt werden kann. Gleichzeitig ist eine Subtypisierung denkbar. Somit konnte gezeigt werden, dass die kulturunabhängige Messmethode mittels MAF-ZeUF-SMIA leistungstärker als der aktuelle Goldstandard ist, da erst nach 7 bis 10 Tagen Kultivierung auf Selektivnährmedium eine Bestimmung von *Legionella spp.* möglich ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Nachweis von Legionellen-Antigen direkt im Urin von infizierten Patienten möglich ist. Mit der Erweiterung des Panels durch verschiedene Fänger-Antikörper sollte es zukünftig möglich sein, eine eindeutige Zuordnung zu den unterschiedlichen *L. pneumophila*-Subgruppen durchzuführen.

Für zukünftige Untersuchungen von legionellenhaltigen Aerosolen wurde eine Aerosolkammer für die Generierung eines legionellenhaltigen Bioaerosols im Rahmen des LGL-Projektes entwickelt. Auf Basis eines Kammer-in-Kammer-Prinzips wurde eine Bioaerosolkammer etabliert, mit der die sichere Arbeit mit Bio-2-Organismen gewährleistet werden kann. Der Aufbau der Kammer, die Definition des Duschaerosols sowie die Charakterisierung dessen wurden von Frau Bettina Kiwull (IWC) durchgeführt. Zusammen mit ihr wurden danach Experimente durchgeführt, die dazu dienten, die Modelldusche zu evaluieren. Dafür wurde Leitungswasser mit lebenden *E. coli* versetzt. Zuerst wurde unter Bio-1-Sicherheitsbedingungen die Dichtigkeit der Kammer untersucht, sowie ein mögliches Dekontaminationskonzept erarbeitet. Nach einer Optimierung des verwendeten Aufbaus ist in Zukunft eine Herstellung und sichere Handhabung von Aerosolen, die potentiell *L. pneumophila* (Organismen der

Risikostufe 2) zum Beispiel aus Biofilm enthalten können, möglich. Es wäre denkbar, in zukünftigen Untersuchungen den Zustand der Legionellen (lebend, tot, VBNC) zu untersuchen. Weiterhin könnte man mit einem fraktionierten Sammler, der verschiedene Partikelfractionen nach Größe aufgetrennt sammelt, ein künstlich erzeugtes Legionellen-Bioaerosol sammeln, um Aussagen über die Größenverteilung der Legionellen im Aerosol zu erhalten.

Zusammenfassend kann man sagen, dass im Rahmen dieser Doktorarbeit ein CL-SMIA Messprogramm etabliert wurde, das am MCR 3 innerhalb von 36 Minuten die schnelle Detektion von *L. pneumophila* ermöglicht. Je nach verwendetem Panel an immobilisierten Fänger-Antikörpern wird eine Zuordnung zu verschiedenen Subgruppen ermöglicht. In zukünftigen Arbeiten sollte das Panel an immobilisierten Antikörpern erweitert werden. Somit könnte neben einer vollständigen Subtypisierung auch eine Quantifizierung der untersuchten Proben erfolgen. Weiterhin wäre es denkbar, im Ausbruchsfall einen Abgleich zwischen Patientenprobe und Umweltisolat durchzuführen. Das schnelle Aufklären im Rahmen eines Ausbruchsmanagements wäre nur eine mögliche Anwendung für den etablierten Assay. Zusätzlich dazu sollte weiter an der Untersuchung von Patienten-Urinen mit dem CL-SMIA gearbeitet werden. Mit einem erweiterten Antikörper-Panel ist es sogar denkbar, die Routine-Diagnostik mit BINAX®E.I.A. und Teststreifen komplett durch den CL-SMIA am MCR 3 zu ersetzen.

Fernab dieses LGL-geförderten Projektes sollte für das Projekt LEVERA untersucht werden, ob die Übertragung des entwickelten Schnellnachweises auf Basis eines CL-SMIA auch für *Cronobacter sakazakii* anwendbar ist. Es wurde gezeigt, dass ein Messprogramm, welches auf dem etablierten CL-SMIA basiert, so optimiert werden konnte, dass eine Detektion von *C. sakazakii* möglich war. Es wurden 3 Kalibrierkurven mit verschiedenen Detektionsantikörpern aufgenommen und die beste Kombination aus Fänger- und Detektions-Antikörper etabliert. Weiterhin wurde die Kreuzreaktivität zwischen den Serogruppen O 1 und O bestimmt.

Summary and Outlook

A monitoring of the concentration from free and infectious legionella becomes more and more important. They appear ubiquitous in all aquiferous systems. They can cause Pontiac Fever and Legionnaire's disease. That's why, all risk factors, like the growth of biofilm in pipe systems, higher water temperatures between 25 and 42°C, a high nutrient supply in old water distribution systems, and water stagnation in dead ends have to be monitored strictly.

Most of all infections are caused by *L. pneumophila* serogroup 1. As mostly all infections were caused by the inhalation of contaminated aerosols, all potential sources have to be investigated very thoroughly. In particular cooling towers, recooling plants, showers, nebulizers, or composting plants need much attention.

New legal guidelines, like the German Drinking Water Ordinance and the latest version of VDI guidelines for hygienically relevant operation of cooling plants and the investigation of legionella containing bioaerosols show, how high the pressure and attention from the media is. Therefore, also the pressure on science increases. A fast and reliable detection method for *Legionella* is needed. The gold standard for *Legionella* detection is still culture-based growth on selective media, which takes between 7 and 10 days. Especially in the case of a legionella outbreak, nobody has the time to wait up to one week until a result is given. Referring to these requirements for a sensitive detection method, a microarray-based detection method is a fast and effective method for legionella detection. A parallel immobilization of different capture-antibodies on the chip surface and a quick detection of the target-antigens were established.

The aim of this PhD work was the establishment of a chemiluminescence sandwich microarray immunoassay on the MCR 3 for the detection of *L. pneumophila*. The principle of the microarray detection bases on a sandwich ELISA, which has been transferred to the microarray analysis platform MCR 3. Different capture antibodies against *L. pneumophila* were immobilized on a DAPPG-modified glass surface. The sandwich immunoassay was performed by using a biotin-labelled detection antibody, which binds on all positions, where *L. pneumophila* antigens were captured on microarray chips. The signal generation occurs by means of the usage of streptavidin-poly-HRP as enzyme conjugate. The emitted chemiluminescence signal of luminol and peroxide is recorded by a CCD camera.

Preliminary work was, to cultivate different strains of *L. pneumophila* and to quantify the stock solutions by measuring with flow cytometry. All stock solutions were diluted 10-fold and used for the measurements on the MCR 3. Based on the established detection program of my previous master thesis, all requirements to the new program were defined. The aim was, to develop a fast and highly sensitive detection program which detects *L. pneumophila* with a high signal-to-noise ratio and a low background signal. At the beginning of the thesis, different optimization procedures of the program parameters and assay steps were performed. The flow-based incubation principle (stop-flow mode vs. continuous flow), duration of the interaction time of the increments, the flow rates of all used antibodies, all washings steps, the usage of another conjugated enzyme, and all antibody concentrations were determined. The result was a 36 min lasting CL-SMIA, which can detect *L. pneumophila* highly selective directly on the chip at a temperature of 35°C. The signal intensity could be increased from 100 a.u. to 45.000 a.u., equivalent to a factor of 450. This established detection program was used for all further measurements.

Calibration curves with different capture antibodies were recorded. For the polyclonal capture antibody, a limit of detection (LOD) of 6.1×10^3 CFU/mL was obtained. For other different monoclonal capture antibodies, detection limits between 6.7×10^2 CFU/mL for mAb 3 and 5.6×10^4 KBE/mL for mAb 20/1 were investigated, respectively. Due to the immobilization of more different capture antibodies on an antibody microarray, a subtyping for *L. pneumophila* could be possible.

As part of a master thesis of Carmen Torggler, a preconcentration method for surface water was established and combined with CL-SMIA. Different real water samples from different Bavarian rivers and lakes and one waterfall in South Tyrol have been preconcentrated with this newly developed analytical method. Therefore, monolithic adsorption filtration and centrifugal ultrafiltration were combined to maximize the concentration of *L. pneumophila*. Afterwards, the detection of the surface water samples was performed. Due to the combination of these two methods, in all investigated surface water samples, *L. pneumophila* was found. A reduction of the detection limit from 2.8×10^3 CFU/mL to 0.4 CFU/mL of *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham, could be achieved with the capturing antibody mAb 10/6. This detection limit satisfies the requirements of the German Drinking Water Ordinance (1 CFU/mL) and shows the high

potential of this new method. All results of these studies have been published in the journal "Analytical and Bioanalytical Chemistry" [Wunderlich et al., 2016].

Parallel to the establishments of this new method and the measuring program different real samples have to be tested with the CL-SMIA on the MCR 3. Therefore, different samples from waste water treatment plants, bioaerosol samples, surface water, and tap water were tested. In almost all investigated samples *L. pneumophila* have been found. Even in some samples a monoclonal subtyping could be enabled due to the use of different monoclonal capture antibodies.

Furthermore, as part of a principle study also urine of legionellosis infected patients were tested with the established CL-SMIA on the MCR 3. Artificial LPS structures in urine were generated. Afterwards the concentration of LPS was investigated using the LAL endotoxin quantification method. CL-SMIA was used for both analysis of blank urines, patient urines and artificial LPS structures in blank urine. The new and unique fact is that no one else was able to detect legionella antigens in urine with an automated microarray analysis direct in patient urine so far. The received yes/no answer of the polyclonal capture antibody is comparable with the standard urine analysis procedure BINAX®E.I.A. But the CL-SMIA on MCR 3 is faster: 36 minutes for CL-SMIA compared to 3 – 4 hours for BINAX®E.I.A. With a panel of different monoclonal capture antibodies a direct classification of serogroups of *L. pneumophila* can be enabled.

To sum up, antibody microarrays on the MCR 3 are a promising, sensitive and reliable method for routine legionella analysis. The additionally developed preconcentration method of MAF combined with CeUF enables positive results in water samples above 1 CFU/mL. In parallel, a subtyping to different *L. pneumophila* serogroups can be managed. It was shown, that the culture-independent analysis method with MAF-CeUF is more powerful than the actual gold standard with a result given at the earliest one week after incubation. Furthermore, a detection of legionella antigens directly in the urine of infected patients was made possible. By means of an enlargement of the capture antibody panel immobilized on the microarray, a clear assignment to one *L. pneumophila* subtype will be done.

For the detection of legionella containing bioaerosols, a bioaerosol chamber for the generation of legionella containing bioaerosols within the LGL project was developed. A bioaerosol

chamber was established based on a chamber-in-chamber-principle. The setup and the definition and characterization of the shower aerosol were done by a colleague, Bettina Kiwull (IWC). Experiments for evaluation of the shower model were done together with her. Therefore, tap water was spiked with living *E. coli*. Under Bio 1- conditions the impermeability of the chamber and a possible decontamination procedure were determined. After different optimization steps of the chamber setup, a safe production and handling of aerosols, which contain potential infectious *L. pneumophila* (organisms of risk level 2) from biofilms are possible in the future. It is equally conceivable to determine the status of legionella (living, dead, infectious, VBNC) in future studies. Furthermore sampling experiments with a size fractionating collector (like e.g. a cascade impactor) is possible. An artificial contaminated legionella containing aerosol could be analyzed for the size distribution in the aerosol.

To sum up, within this PhD thesis a CL-SMIA was established. It enabled the detection of *L. pneumophila* within 36 minutes. According to the immobilized capture antibodies on the microarray chip, a subtyping was possible. In future studies, the panel of immobilized antibodies has to be enlarged. For this reason parallel to monoclonal subtyping of legionella containing samples also a quantification of the determined species will be possible. Furthermore in case of an outbreak also the comparison between environmental sample and patient material is conceivable. In addition, more investigational work should be invested in further experiments with legionella detection in patient urine. With an enlarged panel of capture antibodies it is imaginable to replace standard immunoassays like BINAX®E.I.A. or test strips like BINAX®Now completely by the usage of CL-SMIA on the MCR 3.

Furthermore, within the LEVERA project it had to be investigated, whether the established CL-SMIA for *L. pneumophila* can be transferred for other microorganisms, too. The established rapid detection method should be transferred to the food relevant microorganism *C. sakazakii*. It was shown, that the established measuring program can be used for the detection of *C. sakazakii*. Three calibrations curves were obtained and also the cross reactivity of different *C. sakazakii* strains and antibodies was determined.

5. Experimenteller Teil

5. Experimenteller Teil

5.1. Verwendete Materialien

5.1.1. Verbrauchsmaterialien und Geräte

- Adapter (EH 30.1, Carl Roth, Karlsruhe Deutschland)
- BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer (Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland)
- Durchflusszytometer Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)
- Einmalspritze Injekt-F, PP/PE, 1 mL (T987.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Einmalspritze Injekt-F, PP/PE, 25 mL (T987.3, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Färbeschale und Einsätze für 20 Objektträger (2290.1 und 2291.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Graviergerät mit Diamantstift (Proxxon, Niersbach, Deutschland)
- Heizofen B6760 (Heraeus Holding GmbH, Hanau, Deutschland)
- Laborwaage AT 261 Delta Range (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland)
- Laborwaage Mettler PM 4600 Delta Range (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland)
- Klebefolie ARcare 90106, Acryl-Hybrid, doppelseitig (Adhesive Research Ireland Ltd., Limerick, Irland)
- Kunststoffgehäuse (EH 30.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Kunststoffträger, PMMA, schwarz (Institut für Wasserchemie und chemische Balneologie, München, Deutschland)
- Magnetrührer mit Heizung, RCT Basic (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland)
- MCR 3 SLT (GWK Präzisionstechnik GmbH, München, Deutschland)
- Mikrotiterplatte, BD Falcon TM, Polypropylen, 384-well, F-Boden (353265, BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA)
- Pumpdrive 5206 Peristaltic Pumpe (Heidolph, Schwabach, Deutschland)

- PTFE-Form (innerer Durchmesser 3,86 cm) (Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, München, Deutschland)
- PTFE-Halter (Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, München, Deutschland)
- Reinstwasseranlage MilliQ plus 185 (Millipore, Bedford, USA)
- Schüttler, Refrigerated Incubator Shaker C24KC (New Brunswick Scientific Corp., Edison, NJ, USA)
- Spotternadel Stealth Solid Pin SNS9 (ArrayIt, Sunnyvale, USA)
- Standard-Objektträger, Kalk-Natronglas, 76 x 26 x 1 mm (0656.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Trockenschrank, max. 120 °C (Memmert, Büchenbach, Deutschland)
- Ultraschallbad Sonorex RK510S (Bandelin, Berlin, Deutschland)
- Vario Pump-System (Ismatec (gehörend zu IDEX, Glattbrugg, Schweiz))
- Vortexer Top Mix FB15024 (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA)
- Zentrifuge Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen, PP, 15 mL (AN77.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Zentrifugenröhrchen, PP, 50 mL (AN79.1, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)

5.1.2. Chemikalien und Reagenzien

- 1,4-Dioxan (42510, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan, $\geq 97,0$ % (50040, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Bortrifluorid-Diethylether (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Casein aus Kuhmilch (C5890, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Di(N-succinimidyl)carbonat, $\geq 95,0$ % (A43720, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Ethanol, absolut, Reinheit $\geq 99,8$ % (32205, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

EXPERIMENTELLER TEIL

- Glycin p.a. (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Hellmanex (320.000, Hellma GmbH, Müllheim, Deutschland)
- Kaliumdihydrogencitrat (60214, Fluka, Buchs, Schweiz)
- Kaliumdihydrogenphosphat (60230, Fluka, Buchs, Schweiz)
- Methanol, $\geq 99,8$ (65548, Sigma-Aldrich Taufkirchen, Deutschland)
- N,N'-Dimethylformamid (40248, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Natriumazid (S2002, Sigma-Aldrich, Taufkirchen)
- Natriumcarbonat (73151, Fluka, Buchs, Schweiz)
- Natriumchlorid (71381, Fluka, Buchs, Schweiz)
- Natriumhydrogencarbonat (71628, Fluka, Buchs, Schweiz)
- Natriumhypochlorid (9062.4, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland)
- Polyethylenglykoldiamin 2000 Da (XTJ-502, Huntsman, Salt Lake City, USA)
- Polyglycerol-3-glycidyl (Polypox R9) (UPPC, Mietingen, Deutschland)
- Rinderextraktpulver (B4888 Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Rinderserumalbumin (BSA) (A3059, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Salzsäure rauchend, 37 % (84422, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Schwefelsäure, 95 – 97 % (84720, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Streptavidin, Peroxidase markiert (HRP) (1 mg/mL SA-5004, Vector Laboratories, Burlingame, USA)
- SYTO 9 (Bestandteil des LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits, L7012, Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland)
- Tert-Butyl-methylether (20249, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Triethylamin (471283, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Toluol (89677, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- WESTAR SUPERNOVA ELISA Luminol solution (XLSE2L, 0250, Cyanagen, Bologna, Italien)
- WESTAR SUPERNOVA ELISA Peroxide solution (XLSE2P, 0250, Cyanagen, Bologna, Italien)

5.1.3. Bakterienstämme

Alle verwendeten Legionellenstämme wurden am Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim kultiviert.

Der Stamm *L. pneumophila* SG 1, ST Bellingham wurde vom Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) in Oberschleißheim zur Verfügung gestellt.

Alle anderen *L. pneumophila*-Stämme wurden vom Legionella-Konsiliarlabor in Dresden zur Verfügung gestellt.

Tabelle 26: Liste der verwendeten *L. pneumophila*-Stämme während dieser Forschungsarbeit.

Spezies	Subspezies	Stamm Bezeichnung	Kultur-Nummer	Serogruppe
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Philadelphia 1	ATCC 33152	1
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Knoxville 1	ATCC 33153	1
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Heysham 1	ATCC 43107	1
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Benidorm 030 E	ATCC 43108	1
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	OLDA	ATCC 43109	1
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	France 5811	ATCC 43112	1
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Camperdown 1	ATCC 43113	1
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Allentown 1	ATCC 43106	1
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Oxford 4032 E	ATCC 43110	1
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Bellingham 1	ATCC 43111	1
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Philadelphia 1	ATCC 33152	1
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Knoxville 1	ATCC 33153	1
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Togus 1	ATCC 33154	2
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Bloomington 2	ATCC 33155	3
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Portland 1	LTC-14	4
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Cambridge 2	NCTC 11417	5
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Dallas 1E	ATCC 33216	5
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Chicago 2	ATCC 33215	6
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Chicago 8	ATCC 33823	7
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Concord 3	ATCC 35096	8
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	IN-23-G1-C2	ATCC 35289	9
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Leiden-1	ATCC 43183	10
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	797-PA-H	ATCC 43130	11
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	570-CO-H	ATCC 43290	12
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	82A3105	ATCC 43736	13
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	1169-MN-H	ATCC 43703	14
<i>L. pneumophila</i>	<i>pneumophila</i>	Lansing 3	ATCC 35251	15

LTC: Lyon Type Collection, Centre National de Reference des Legionelles (France)

ATCC: American Type Culture Collection (USA)

NCTC: National Collection of Type Culture (UK)

Tabelle 27: Liste der verwendeten *Cronobacter sakazakii*-Stämme während dieser Forschungsarbeit.

Spezies	Kultur-Nummer	Serogruppe	Institut
<i>C. sakazakii</i>	DB 1b-04	O2	Lehrstuhl für Milchwissenschaften, Professor Usleber, Gießen
<i>C. sakazakii</i>	IB 7b/4-2004	O2	Lehrstuhl für Milchwissenschaften, Professor Usleber, Gießen
<i>C. sakazakii</i>	DB 255/5-05	O2	Lehrstuhl für Milchwissenschaften, Professor Usleber, Gießen
<i>C. sakazakii</i>	MHI 977	O2	Lehrstuhl für Milchhygiene, Professor Märtlbauer, Oberschleißheim
<i>C. sakazakii</i>	MHI 21029	O2	Lehrstuhl für Milchhygiene, Professor Märtlbauer, Oberschleißheim
<i>C. sakazakii</i>	MHI 21001	O1	Lehrstuhl für Milchhygiene, Professor Märtlbauer, Oberschleißheim
<i>C. sakazakii</i>	MHI 21040	O1	Lehrstuhl für Milchhygiene, Professor Märtlbauer, Oberschleißheim

Die Stämme von *C. sakazakii* wurden in den entsprechenden Instituten kultiviert und als quantifizierte, teilweise auch bereits autoklavierte Stammlösung zur Verfügung gestellt.

5.1.4. Antikörper

- Anti-Kaninchen-Meerrettich-Peroxidase, (Ziege), 1 mg/mL (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Anti-Maus-Meerrettich-Peroxidase, (Ziege), 1 mg/mL (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
- Monoklonaler Antikörper (mAb) 17/2, anti-*L. pneumophila* SG 10, (Maus), 1,22 mg/mL (Technische Universität Dresden, Konsiliarlaboratium für Legionellen, Dresden, Deutschland)
- mAb 1C4, anti-*C. sakazakii* SG O1, unkonjugiert, (Maus), 0,57 mg/mL (Ludwig Maximilians-Universität München, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Prof. Märtlbauer, Oberschleißheim, Deutschland)

- mAb 1C4-Biotin, anti-*C. sakazakii* SG O1, Biotin-markiert, (Maus), 1,0 mg/mL (Ludwig Maximilians-Universität München, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Prof. Märtlbauer, Oberschleißheim, Deutschland)
- mAb 20/1, anti-*L. pneumophila* SG 1 ST Benidorm, (Maus), 0,728 mg/mL (Technische Universität Dresden, Konsiliarlaboratium für Legionellen, Dresden, Deutschland)
- mAb 26/1, anti-*L. pneumophila* SG 1 ST OLDA, (Maus), keine Konzentrationsangabe vorliegend (Technische Universität Dresden, Konsiliarlaboratium für Legionellen, Dresden, Deutschland)
- mAb 2F8, anti-*C. sakazakii* SG O2, unkonjugiert, (Maus), 0,57 mg/mL (Ludwig Maximilians-Universität München, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Prof. Märtlbauer, Oberschleißheim, Deutschland)
- mAb 2F8-Biotin, anti-*C. sakazakii* SG O2, Biotin-markiert, (Maus), 1,0 mg/mL (Ludwig Maximilians-Universität München, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Prof. Märtlbauer, Oberschleißheim, Deutschland)
- mAb 3, anti-*L. pneumophila* SG 1 ST Heysham und ST Knoxville, (Maus), 1,45 mg/mL (Technische Universität Dresden, Konsiliarlaboratium für Legionellen, Dresden, Deutschland)
- mAb 3/1 anti-*L. pneumophila* SG 1 Pontiac Gruppe, (Maus), 0,43 mg/mL (Technische Universität Dresden, Konsiliarlaboratium für Legionellen, Dresden, Deutschland)
- mAb 37/2, anti-*L. pneumophila* SG 9, (Maus), 0,61 mg/mL (Technische Universität Dresden, Konsiliarlaboratium für Legionellen, Dresden, Deutschland)
- mAb 4/4, anti-*L. pneumophila* SG 2-15 (außer SG 7 und 10) (Maus), keine Konzentrationsangabe vorliegend (Technische Universität Dresden, Konsiliarlaboratium für Legionellen, Dresden, Deutschland)
- mAb 4/7, anti-*L. pneumophila* SG 3, (Maus), 1,31 mg/mL (Technische Universität Dresden, Konsiliarlaboratium für Legionellen, Dresden, Deutschland)

- mAb 5/2, anti-*L. pneumophila* SG 5, (Maus), 0,96 mg/mL (Technische Universität Dresden, Konsiliarlaboratorium für Legionellen, Dresden, Deutschland)
- mAb 7/4, anti-*L. pneumophila* SG 4, (Maus), 1,66 mg/mL (Technische Universität Dresden, Konsiliarlaboratorium für Legionellen, Dresden, Deutschland)
- mAb 8/4, anti-*L. pneumophila* SG 1 ST OLDA, Oxford und Philadelphia, (Maus), 0,51 mg/mL (Technische Universität Dresden, Konsiliarlaboratorium für Legionellen, Dresden, Deutschland)
- mAb 81/2 anti-*L. pneumophila* SG 1, (Maus), 2,75 mg/mL (Technische Universität Dresden, Konsiliarlaboratorium für Legionellen, Dresden, Deutschland)
- mAb 10/6 anti-*L. pneumophila* SG 1 ST Bellingham, (Maus), 1,47 mg/mL (Technische Universität Dresden, Konsiliarlaboratorium für Legionellen, Dresden, Deutschland)
- pAb anti-*L. pneumophila*, Biotin-markiert, (Hase), 4-5mg/mL (BDB65051G, Meridian, Saco, ME, USA)
- pAb K104/14, anti-*C. sakazakii* SG O2, unkonjugiert, (Kaninchen) 10,6 mg/mL (Justus-Liebig-Universität Gießen, Professur für Milchwissenschaften, Prof. Usleber, Gießen, Deutschland)
- pAb K104/14-Biotin, anti-*C. sakazakii* SG O2, Biotin-markiert, (Kaninchen), 10,6 mg/mL (Justus-Liebig-Universität Gießen, Professur für Milchwissenschaften, Prof. Usleber, Gießen, Deutschland)
- pAb K105/14, anti-*C. sakazakii* SG O2, unkonjugiert, (Kaninchen), 9,9 mg/mL (Justus-Liebig-Universität Gießen, Professur für Milchwissenschaften, Prof. Usleber, Gießen, Deutschland)
- pAb K105/14-Biotin, anti-*C. sakazakii* SG O2, Biotin-markiert, (Kaninchen), 9,9 mg/mL (Justus-Liebig-Universität Gießen, Professur für Milchwissenschaften, Prof. Usleber, Gießen, Deutschland)
- Polyklonaler Antikörper (pAb) anti-*L. pneumophila*, unkonjugiert, (Hase), 4 – 5 mg/mL (B65051G, Meridian, Saco, ME, USA)

5.1.5. Puffer

Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Herstellung aller verwendeten Puffer das Wasser der Reinstwasseranlage MilliQ plus 185 eingesetzt. Folgende aufgeführte Puffer wurden verwendet:

Laufpuffer

- 2,50 g (0,5 % w/v) Casein
- Ad 500 mL PBS-Puffer
- Erhitzen

Phosphatpuffer (PBS)

- 244 g (70 mmol) K_2HPO_4
- 27,2 g (10 mmol) KH_2PO_4
- 170 g (145 mmol) NaCl
- Ad 2000 mL H_2O

Spottingpuffer

- 0,05 mg Pluronic F127
- 100 mg Trehalose-D(+) Dihydrat
- Ad 1 mL PBS

TRIS- HCl-Lösung (pH 8,5)

- TRIS (1M) 121,1 g
- Ad 1000 mL H_2O
- pH einstellen mit 37 - %iger Salzsäure

Elutionspuffer

- 0,5 M Glyzin
- 3 % (w/v) Rinderextrakt
- pH 9,5 mit NaOH einstellen

5.1.6. Software

- Adobe InDesign CS3 (Adobe Systems Software Ireland Limited, Dublin, Irland)
- Avis FITS Viewer (MSB di F. Cavicchio, Ravenna, Italien)
- BioOdyssey Calligrapher 2.0 (Bio-Rad Laboratories GmbH, München, Deutschland)
- Corel Draw X4 (Corel GmbH, München, Deutschland)
- MCRImageAnalyzer (ODEVIS AG, Burghausen)
- Microsoft Office 2010 (Microsoft, Redmond, WA, USA)
- Origin Pro 2015G und 2016G (OriginLab Corporation, Northampton, USA)

5.2. Standardisierte Herstellungsverfahren

5.2.1. Herstellung DAPPG-beschichteter Mikroarrays

5.2.1.1. Vorbehandlung der Glasobjektträger

Zur Unterscheidung der modifizierten und der unmodifizierten Objektträgerseite wurde mit einem Glasdiamantstift eine Chargennummer eingeritzt. Die nummerierte Seite stellt in allen folgenden Schritten die unbeschichtete Seite des Glasobjektträgers dar.

Um Rückstände und Verunreinigungen, die von der Herstellung herrühren, vollständig zu entfernen, wurden die Glasträger in einer 200-mL-Färbeschale gefüllt mit einer 2 %-igen Hellmanexlösung für eine Stunde ins Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurden sie für 18 h bei einer leichten Schüttelbewegung auf den Schüttler gestellt und danach 1 h erneut ins

Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurden die Glaschips mit 1 L destilliertem Wasser gespült, im Stickstoffstrom vollständig getrocknet und einer visuellen Kontrolle unterzogen.

5.2.1.2. Anätzen der Oberfläche

Die getrockneten, kontrollierten Glaschips wurden in einer Färbeschale mit 200 mL einer frisch vorbereiteten Mischung aus 37 % HCl und Methanol (1:1) für eine Stunde eingetaucht und auf dem Schüttler bei mäßiger Schüttelbewegung geschüttelt. Danach wurden die Glaschips mit 1 L Reinstwasser gespült und anschließend für 1 Stunde in einer Färbeschale mit 200 mL konzentrierter Schwefelsäure bei Raumtemperatur geschüttelt. Zum Schluss wurden die Objektträger mit 1 L Reinstwasser gespült und danach gründlich im Stickstoffstrom getrocknet.

5.2.1.3. Silanisierung mit GOPTS

Zur Silanisierung wurde die Sandwich-Technik verwendet. Dafür wurden zwei Objektträger mit der markierten Seite nach unten in eine große Petrischale gelegt, je Chip 600 µl GOPTS darauf pipettiert und dann mit einem weiteren Glasträger (mit der markierten Seite nach oben) belegt. In geschlossenen Petrischalen wurden diese Sandwich-Chips 3 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Sandwich-Chips manuell in Ethanol getrennt und in eine Färbeschale mit 200 mL Ethanol überführt. Darin wurden sie 15 min bei Raumtemperatur im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend wurde Ethanol durch Methanol ersetzt und der Schritt wiederholt. Zu guter Letzt wurden die Chips erneut in eine Färbeschale mit 200 mL Ethanol gegeben und 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Abschließend wurden die Mikroarray-Chips im Stickstoffstrom getrocknet und visuell auf Schlieren kontrolliert.

5.2.1.4. Beschichtung mit DAPPG

Für die Beschichtung von ca. 40 hergestellten Glaschips wurden ca. 20 g DAPPG im auf 98 °C vorgeheizten Trockenschrank geschmolzen. Die Chips wurden mit der markierten Seite nach unten in die Petrischalen gelegt. Für die Beschichtung wurde erneut die Sandwich-Technik angewendet. Es wurden pro Chip 600 µL flüssiges DAPPG aufpipettiert und darauf ein weiterer

Chip mit markierter Seite nach oben gelegt. Diese Sandwiches wurden in verschlossenen Petrischalen für 15 h bei 98 °C im Trockenschrank inkubiert. Anschließend wurden die Glaschips im heißen Zustand in Reinstwasser getrennt, in Färbeschalen gefüllt mit Reinstwasser überführt und darin zweimal (unter Austausch des Wassers) für 15 min zur Reinigung ins Ultraschallbad gestellt. Danach folgten eine letzte Spülung mit 1 L Reinstwasser sowie die anschließende Trocknung im Stickstoffstrom. Nach visueller Kontrolle können die DAPPG- belegten Glaschips in Plastikbehältern im Exsikkator aufbewahrt werden.

5.2.2. Aktivierung der Chips mit DSC

Zur Aktivierung der Oberfläche wurden 600 µL einer Lösung von 180 mg DSC, 10 mg DMAP und 225 µL Triethylamin in trockenem DMF (3 mL) auf jeden DAPPG-Glasträger aufgegeben. Nach dem Sandwich-Prinzip wurden erneut zwei Chips aufeinander positioniert. Die Inkubation erfolgte für 4 h bei RT in Petrischalen. Nach dem Trennen der Chips in Methanol wurden sie sofort in eine mit Methanol gefüllte Färbeschale überführt und zweimal für 5 min im Ultraschallbad gereinigt, wobei zwischen den beiden Reinigungsschritten das Methanol durch frisches ersetzt wurde. Nach Trocknung der Chips im Stickstoffstrom wurden sie erneut visuell auf Schlieren kontrolliert und kurzzeitig unter Stickstoffatmosphäre aufbewahrt.

5.2.3. Immobilisierung der Antikörper

Nach der Durchführung aller bisherigen Schritte war die Oberfläche der Glasobjektträger so aktiviert, dass Antikörper kovalent an der Oberfläche gebunden werden konnten und damit immobilisiert wurden.

Zur Mikrodosierung wurde das Gerät BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer verwendet.

Die Luftfeuchtigkeit wurde auf 50 % festgelegt, die Auflagefläche der Glasträger auf 15 °C gekühlt. Folgende Lösungen wurden bei der Herstellung des Mikroarrays verwendet:

- pAb anti-HRP (100 µg / mL in Spottingpuffer) = Positivkontrolle
- Spottingpuffer = Negativkontrolle
- pAb oder mAb anti-*L. pneumophila* in Spottingpuffer (Verdünnung 1:1)

Von diesen Lösungen wurden jeweils Aliquota von 35 µL in eine Kavität einer 384-well-Mikrotiterplatte überführt. Diese wurde an der dafür vorgesehenen Stelle des MiniArrayers platziert. Die Übertragung auf die aktivierten Glaschips erfolgte mit einer Mikrokontaktnadel. Dabei wurde jeweils etwa 1 nL Antikörperlösung aufgebracht.

Der Abstand zwischen den einzelnen Replikaten derselben Antikörper-Lösung betrug 1100 µm, der Abstand zwischen Reihen mit unterschiedlichen Antikörper-Lösungen betrug 1500 µm.

Nach dem Aufbringen der Antikörperlösungen wurden die Mikroarrays über Nacht bei Umgebungstemperatur in geschlossenen Petrischalen gelagert, die 500 µL Reinstwasser enthielten. Um freie Bindungsstellen auf der Mikroarray-Oberfläche abzusättigen und Hintergrundeffekte zu verringern, wurden die Glasräger für 15 min in einer TRIS-HCl-Lösung (pH 8,5) geschüttelt. Nach einem kurzen Spülschritt mit ultrareinem Wasser und anschließend Methanol wurden die Glaschips im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurden sie zu fertigen Chips weiterverarbeitet.

5.2.4. Kleben der Antikörper-Mikroarrays

Um einen Messvorgang durchführen zu können, war das Fertigen einer Durchflusszelle erforderlich. Eine doppelseitig klebende PE-Folie, aus der zwei Messkanäle (Flusszellen) mit einem Volumen von ca. 50 µL ausgeschnitten waren, wurde an einen planaren Kunststoffträger (PMMA) gekoppelt. Die aktivierte, danach gespottete und anschließend geblockte Antikörper-Mikroarray-Chipoberfläche wurde so auf den PMMA-Kunststoffträger gekoppelt, dass die beschichtete Chipseite direkt auf dem Träger haftete. Danach wurden in jeden Kanal des Chips 60 µL von 1 %-igem BSA (w/v) in PBS (pH 7,6) gefüllt und rückseitig mit Klebefolie verschlossen. Somit konnte ein Abblocken der freien Bindungsstellen sichergestellt werden. Die fertigen

Antikörper-Mikroarrays (siehe Abbildung 68) wurden bis kurz vor ihrer Verwendung in PBS bei 4 °C aufbewahrt.

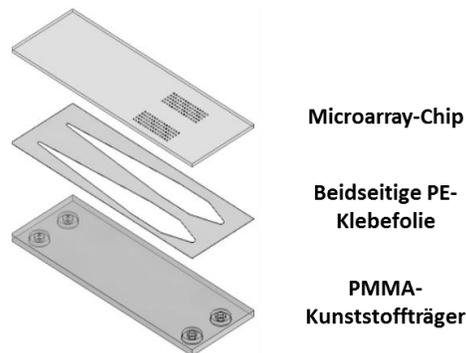


Abbildung 68: Schematische Abbildung des Mikroarray-Chips für die Messungen am MCR 3 SLT [gemäß Kloth et al., 2009 – modifiziert]

Der Chip wurde in der beheizbaren Schublade direkt an das fluidische System angeschlossen und besitzt deshalb Einlass- bzw. Auslassöffnungen. Der so hergestellte, dreiteilige Mikroarray-Chip mit zwei getrennten Flusszellen konnte nun zur Messung in die Schublade der Messeinheit am MCR 3 eingelegt werden.

5.3. Messungen am MCR 3 SLT

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Chemilumineszenz-Mikroarray-Auslesesystem handelte es sich um das am Institut zusammen mit der Firma GWK weiterentwickelte System MCR 3 SLT (siehe Fluidikplan Abbildung 27).

Die Messungen wurden mit frisch resuspendierten, am Durchflusszytometer vorquantifizierten und danach hitzeinaktivierten Stammlösungen von *L. pneumophila* von verschiedenen Serogruppen durchgeführt. Pro Messung wurden 600 µL Probe manuell per Einmalspritze dem System zugeführt. Vor Beginn der ersten Messung mit Legionellenproben wurde das Messgerät gründlich mit dest. Wasser durchgespült. Ein eigens dafür entwickeltes Spülprogramm wurde mehrere Male durchgeführt. Anschließend wurden die Antikörperreservoirs und die Probenflaschen mit allen notwendigen Reagenzien gefüllt. Es wurde ein Load-Programm

gestartet, um die Schläuche des MCR 3 mit allen Reagenzien zu füllen und das Spülwasser in den Abfall zu entsorgen.

Für die Probenmessungen wurde die laufende Nummer des Mikroarray-Durchfluss-Chips notiert und dieser anschließend in die Chipeinheit eingelegt und ein Hintergrundbild mit der CCD-Kamera aufgenommen. Nach diesen Vorbereitungen konnte die erste Messung gestartet werden.

Das durchgeführte Messprogramm am MCR 3 wurde während dieser Arbeit mehrfach modifiziert und umgeschrieben. Die einzelnen Parameter wurden entsprechend ihrer Modifikation verändert. Um einen allgemeinen Überblick über die angewendeten Messparameter und den Programmcode zu erhalten, wird in Anhang A das Beispiel eines verwendeten Programmcodes aufgezeigt. Die verwendeten Farben entsprechen hierbei den Farben der Programmsoftware.

Das erstellte Messprogramm wurde wie folgt durchgeführt (siehe Messprogramm Anhang A): Zuerst wurde die Flusszelle auf 35 °C erwärmt. Danach wurden 600 µL Bakterienprobe manuell mittels Einmalspritze in die Fluidik eingebracht. Die Pumpe 5 schob mit Laufpuffer (Caseinlösung 0,5 % in PBS (w/v)) die Probenlösung im Stopp-Flow-Modus mit 0,5 µL/s in 60-µL-Inkrementen über den Chip. Nach jedem Inkrement wurde eine Interaktionszeit von 30 s eingehalten. Diese Programmschleife wiederholte sich insgesamt zwölfmal (Gesamtmenge Probe 600 µL, 150 µL Leervolumen). Anschließend wurde die Flusszelle mit 2 mL Laufpuffer und einer Flussrate von 100 µL/s gespült. Nun gab die Antikörperspritze P1 750 µL des biotinylierten Detektions-Antikörpers an das System ab. 150 µL (Leervolumen) wurden direkt bis vor die Flusszelle gepumpt. Anschließend schob die Pumpe 5 die Antikörperlösung mit Laufpuffer (Caseinlösung 0,5 % in PBS (w/v)) im Stopp-Flow-Modus mit 2 µL/s in 60-µL-Inkrementen über den Durchflusschip. Nach jedem Inkrement wurde eine Interaktionszeit von 5 s eingehalten. Diese Prozessschleife wiederholte sich insgesamt zwölfmal (Gesamtmenge biotinylierter Detektions-Antikörper 600 µL). Dann wurden 150 µL von Streptavidin-poly-HRP (Verdünnung 1:5000 in PBS (v/v)) mit einer Geschwindigkeit von 20 µL/s zum Anfang der Flusszelle gepumpt. Die weiteren 600 µL wurden dann kontinuierlich mit einer Flussrate von 20 µL / s über den Mikroarray gepumpt. Die Flusszelle wurde wie zuvor gespült. Abschließend

wurden je 200 μL der Chemilumineszenzsubstrate Wasserstoffperoxid und Luminol als Gemisch aus Pumpe 3 mit einer Geschwindigkeit von 20 $\mu\text{L}/\text{s}$ über die Flusszelle gebracht und das Chemilumineszenzsignal mit einer CCD-Kamera bei einer Belichtungszeit von 60 s aufgenommen.

5.3.1. Auswertung der Messdaten am MCR 3 SLT

Die Auswertung der CL-Signale, die mit Hilfe der an USB angeschlossenen CCD-Kamera aufgezeichnet wurden, erfolgte mit Hilfe der Auswertesoftware MCRImageAnalyzer. Bevor die CL-Signale jeder Messung ausgewertet werden konnten, wurde automatisch das Rauschen der Kamera von jedem Messbild subtrahiert. Aufgrund des Vorhandenseins der Positivkontrolle konnte vom ordnungsgemäßen Ablauf des Immunoassays ausgegangen werden. Bei der Negativkontrolle wurde demnach kein Signal erhalten. Die Messsignale am MCR 3 SLT wurden mit Hilfe eines Rasters unterteilt und über eine automatische Berechnung der Auswertesoftware erhalten. Der Mittelwert der 10 hellsten Pixel stellte die Berechnungsgrundlage dar. Wie die Probensignale selbst, wurde mit Hilfe des angelegten Rasters auch eine Reihe des Hintergrund-Signals (Negativkontrolle) ausgewertet. Im Anschluss wurden die gemessenen Signale gemittelt und damit die Standardabweichung berechnet. Die Auswertungen wurden abgespeichert, in Microsoft Excel 2010 bearbeitet und mit Hilfe von Origin Pro 2015G graphische ausgewertet und als Diagramm dargestellt.

5.4. Arbeiten am LGL Oberschleißheim im Legionellenlabor

Mit den am gleichen Tag frisch hergestellten Legionellen-Stammlösungen wurde genauso verfahren wie mit den standardmäßig analysierten Trinkwasserproben im LGL Oberschleißheim. Zuerst wurde die Eingangstemperatur der Wasserprobe bestimmt. Danach wurden Etiketten erstellt, um die Probe eindeutig einem Herkunftsort und einer bestimmten Probenahmestelle zuordnen zu können. Danach unterschied man, ob die Wasserprobe auf GVPC-Selektivnährmedium ausplattiert, oder ob die Bebrütung eines Membranfilters durchgeführt werden sollte.

5.4.1. Ausplattieren der Legionellenlösung auf GVPC-Selektivnährmedium

Der Boden einer Nährmediumsplatte wurde etikettiert bzw. händisch beschriftet. Es wurde jeweils eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Dazu wurden 0,5 mL der zu untersuchenden Lösung auf die Platte pipettiert. Mittels eines sterilen Spatels wurde die Probe auf der gesamten Platte ausplattiert. Der Deckel wurde auf das Nährmedium gegeben und die Platte wurde gedreht. Auf dem Kopf stehend wurde die Platte nun bei 37 °C für 7 Tage inkubiert. In der Zeit vermehrten sich alle vorhandenen Mikroorganismen und wuchsen zu sichtbaren und vor allem zählbaren Kolonien heran.

Nach der Inkubationszeit wurden die Platten ausgewertet. Dies erfolgte mittels Auszählen der sichtbaren Kolonien. Diese Anzahl wurde notiert und unter Berücksichtigung einer entsprechenden Verdünnung und des entsprechenden Umrechnungsfaktors in die Einheit KBE/mL umgerechnet.

5.4.2. Membranfiltration der Legionellenlösung und Inkubation des Filters auf GVPC-Selektivnährmedium

Bei dieser Untersuchungsmethode wurde ebenfalls eine Dreifachbestimmung durchgeführt. Die Platten mit Nährboden wurden ebenfalls beschriftet bzw. etikettiert. Danach wurden auf eine desinfizierte Filtereinheit 3 neue, sterile Membranfilter mit vorgezeichnetem Auszählgitter gelegt. Es folgte das Aufstecken von Sammelbehältern auf die Filtereinheit. Die Filtereinheit war an eine Vakuumpumpe angeschlossen. Diese wurde angeschaltet und pro Sammelbehälter wurde ein Probengefäß mit 100 mL über den Filter gegeben. Die Lösung wurde sofort abgepumpt und im Sammelbehälter der Vakuumpumpe aufgefangen. Anschließend wurden 2 mL eines speziellen Säure-Puffers auf den Filter gegeben. Dieser wirkte mindestens eine Minute ein und bewirkte aufgrund seines niedrigen pH-Wertes von 2,0 ein erstes Abtöten der Begleitflora in der untersuchten Wasserprobe. Danach wurde der Puffer mit Sterilwasser abgespült, das durch die Membranpumpe zügig über den Filter geleitet wurde. Mit Hilfe einer sterilen Pinzette wurde je ein Filter auf die GVPC-Platte aufgebracht. Mit diesen Platten wurde genauso verfahren wie im vorangegangenen Abschnitt beschrieben. Es erfolgte eine Inkubation der Platten bei 37 °C für mindestens 7 Tage mit anschließendem Auszählen der gewachsenen

Kolonien. Mithilfe eines Faktors unter Berücksichtigung der Verdünnung und der filtrierten Flüssigkeitsmenge wurde das Ergebnis auf die Einheit KBE/mL umgerechnet.

5.4.3. Herstellen einer Stammlösung von *Legionella pneumophila*-Serogruppen und deren Konzentrationsbestimmung über eine Verdünnungsreihe

10 μL des aufgetauten, ausgewählten Legionellenstammes wurden auf GVPC-Selektivnährmedium ausplattiert und bei 37 °C für 7 – 10 Tage im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurde die Platte gesichtet. Bei dickem Ausstreichen der Bakterien auf der Platte kann man von einer Überbevölkerung ausgehen, d.h. die Platte ist nicht auszählbar. Dafür war als nächster Schritt ein Verdünnungsausstrich notwendig. Dafür wurde auf eine neue Platte eine Kolonie in drei Schritten ausplattiert. Zuerst verstrich man im ersten Drittel der Platte die Kolonie, die vorher mit einer Impföse aufgenommen wurde. Anschließend ging man für den weiteren Ausstrich mit einer neuen Öse einmal quer durch den bereits ausgestrichenen Bereich und plattiert dies im zweiten Drittel der Platte aus. Das wiederholt man nun und verfährt so mit dem letzten Drittel der Platte. Damit erreicht man eine Verdünnung der Bakterien, im besten Falle bis auf eine einzeln auszählbare Kolonie (siehe Abbildung 69).

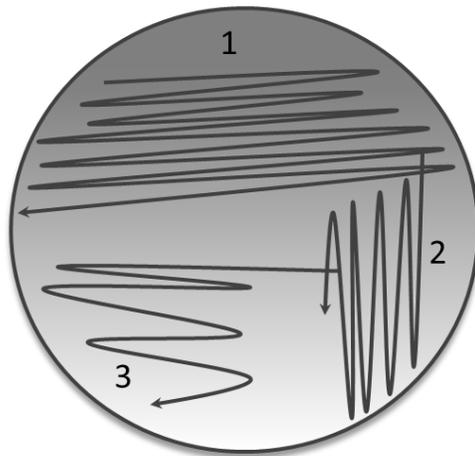


Abbildung 69: Verdünnungsausstrich von *L. pneumophila* auf GVPC-Selektivnährmedium zum Erhalten einzelner Kolonien (eigenes Bild).

Solch eine einzelne Kolonie wurde in 10 mL steril filtriertem Wasser aufgenommen und gut durchmischt. Anschließend wurde eine Verdünnungsreihe mit bis zu 10 Verdünnungsstufen

erstellt (-1 bis -10). Ausgehend von der gewünschten Konzentration der Stammlösung plattierte man 10 µL der Verdünnungsstufen 6 – 10 aus und inkubiert diese auf GVPC-Selektivnährmedium für 3 – 5 Tage bei 37 °C im Wärmeschrank.

Ziel war es, eine ein- bis zweistellige Anzahl an Kolonien zu erhalten, die sich gut auszählen lassen. Wenn man z.B. bei Verdünnungsstufe Nummer Sieben 35 auszählbare Kolonien erhielt, sollten es in Verdünnungsstufe Acht nur noch 3 – 4 Kolonien sein. Wenn dies der Fall war, hat bei der Verdünnungsreihe alles gut funktioniert. Zurückgerechnet ergäbe dies eine Konzentration von $3,5 \times 10^8$ KBE/mL. Genauso wurde bei den ausplattierten Stämmen von *L. pneumophila*-Serogruppen 1 – 15 vorgegangen. Anschließend konnte die zuvor hergestellte Stammlösung hitzeinaktiviert werden. Diese Lösung war nun einsatzbereit für Messungen am MCR 3.

5.5. Bestimmung der Legionellenkonzentration am Durchflusszytometer

Das Durchflusszytometer misst im Arbeitsbereich von 10^5 – 10^6 KBE/mL. Entsprechend dieses Arbeitsbereiches wurde die frisch hergestellte Stammlösung in verschiedene Verdünnungsstufen gebracht. Die Bakterienprobe wurde mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff SYTO 9 angefärbt.

3 µL von SYTO 9 (1:10-Verdünnung der Stammlösung in Sterilwasser) wurden zusammen mit 500 µL der Bakteriensuspension bei völligem Lichtausschluss für 30 min inkubiert. Danach konnte die Messung am Durchflusszytometer mit der Lösung durchgeführt werden. Entsprechend des Verdünnungsfaktors wurde die ermittelte Konzentration auf die eingesetzte Ausgangskonzentration der verwendeten Stammlösung zurückgerechnet.

5.6. Herstellung und Gebrauch der monolithischen Säulen

Die Herstellung der monolithischen Säulen beruhte auf den Arbeiten des Doktoranden Dennis Elsässer. Um den Monolithen zu synthetisieren, wurde das Monomer Polyglycerol-3-glycidyl (Polypox R9) polymerisiert. Die Reaktion wurde durch Bortrifluorid-diethylether ($\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$) katalysiert. Um ausreichend Poren in das Polymer zu bringen, gab man ein Gemisch

von Toluol und Tert-butyl-methylether zu. Anschließend wurden die Epoxygruppen an der Oberfläche der Poren hydrolysiert. Dies geschah durch die Zugabe von Schwefelsäure. Diese hydrolysierte Oberfläche war somit in der Lage, Bakterien und Viren durch elektrostatische Wechselwirkungen zurückzuhalten.

5.6.1. Synthese der Epoxy-basierten Monolithen

Für die Herstellung der monolithischen Säulen wurde ein 60:40-Gemisch (v/v) von Toluol und Tert-butyl-methylether als Porogen benutzt (siehe Tabelle 25). Dafür wurden 5,65 mL Toluol (auf Eis gekühlt) und 3,77 mL Tert-butyl-methylether in einem Zentrifugenröhrchen gemischt und bei 28 °C in einem kleinen Ofen für 60 min vortemperierte. Eine Mischung (v/v) aus Bortrifluorid-diethylether ($\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$) und auf Eis gekühltem 1,4-Dioxan wurde als Katalysator eingesetzt. Dafür mischte man 1.000 μL von 1,4-Dioxan mit 111 μL Bortrifluorid-diethylether und gab 150 μL der Mischung zum Porogen hinzu. Diese Mischung musste 20 s gründlich mittels eines Vortexers durchmischt werden. Anschließend pipettierte man mithilfe einer Viskospipette 2,4 mL des Monomers Polypox R9 zu und durchmischte intensiv für 1 min, um die Polymerisation einzuleiten. Dieses Gemisch wurde zügig in die vortemperierten Förmchen gegeben und bei 28 °C für eine Stunde inkubiert. Nach der Reaktionszeit wurde die Form auf Eis gebracht, um das vorsichtige Herauslösen des Monolithen mithilfe eines Spatels zu erleichtern. Die Monolithen wurden anschließend in einem mit Methanol gefüllten Becher über Nacht im Kühlschrank gelagert. Danach waren sie zur Hydrolyse einsetzbar, die zur Bildung von OH-Gruppen an der Porenoberfläche durchgeführt wurde.

5.6.2. Hydrolyse der Monolithen

Drei Monolithen wurden in das PTFE-Gehäuse eingelegt und an eine peristaltische Pumpe angeschlossen. Danach wurden 300 mL ultrareines Wasser durch die Monolithen gepumpt, um das Methanol aus der Lagerung auszuwaschen. Anschließend wurde das Wasser durch 0,5 M Schwefelsäure ersetzt. Diese befand sich zuvor auf einer Heizplatte und wurde mit Hilfe eines Temperaturfühlers auf 60 °C erhitzt. Nach Erhalt der gewünschten Temperatur wurden der Einlass des PTFE-Gehäuses mit den Säulen und der Verschlauchung im Kreislauf mit

Schwefelsäure durchgespült. Die monolithische Säule wurde so für 3 h bei 60 °C hydrolysiert. Nach der Hydrolyse, wurden die Monolithen mit Wasser durchspült und in ultrareinem Wasser im Kühlschrank bis zur Verwendung gelagert.

Tabelle 28: Lösemittelvolumen für eine monolithische Säule mit einem Gesamtvolumen von 11,97 mL

Chemikalie	Volumen
Toluol	5,65 mL
Tert-butyl-methylether	3,77 mL
BF ₃ Et ₂ O (1:10 (v/v) in 1,4-Dioxan)	0,15 mL
Polyglycerol-3-glycidylether (R9)	2,40 mL

5.6.3. Konstruktion der monolithischen Säule

Um sicherzustellen, dass das Gehäuse (1) dem angelegten Druck bei der Filtration standhalten würde, wurde das spitze Ende bei ca. 0,9 cm Länge abgeschnitten. Um die monolithische Säule zusammenzusetzen, wurde zuallererst der PTFE-Einsatz (2) im Gehäuse am unteren Ende platziert. Danach wurden ein O-Ring und der erste Monolith (3) darauf positioniert. Wenn die Kapazität eines Monolithen nicht ausreichte, konnte man einen weiteren O-Ring mit einem anschließenden weiteren Monolithen in das Gehäuse einbringen. Die O-Ringe waren nötig, um sicherzugehen, dass die filtrierte Probe nicht am Monolithen vorbei gepresst wurde, ohne hindurch zu gehen. Nachdem die Monolithen im Gehäuse positioniert wurden, wurden Stempel (4) und Adapter (5) am oberen Gehäuseende angebracht (siehe Abbildung 70).

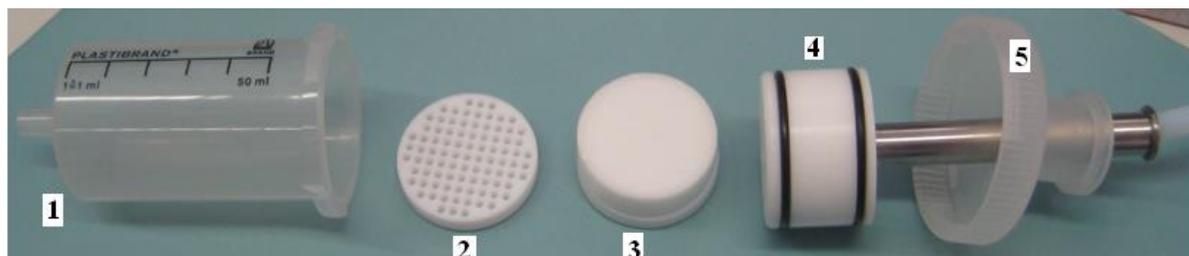


Abbildung 70: MAF-Säule bestehend aus: 1 - Gehäuse, 2 - PTFE-Einsatz, 3 - Monolithe, 4 - Stempel, 5 - Adapter.

Die monolithische Säule wurde nun am Gummischlauch der peristaltischen Pumpe angeschlossen. Der Ein- und Auslass der Pumpe wurden in Leitungswasser getaucht, welches auf pH 3 eingestellt wurde. Die MAF-Disk musste vor Probenaufgabe auf pH 3 eingestellt werden, um sicherzustellen, dass die Bakterien entsprechend zurückgehalten werden. Nachdem der Schlauch vollständig mit Wasser gefüllt war, wurde die Pumpe eingeschaltet. Die MAF-Säulen im Inneren des Gehäuses waren vollständig mit Flüssigkeit bedeckt, der Stempel wurde oben aufgesetzt. Wichtig war es, darauf zu achten, dass sich keine Luftblasen im Gehäuse befinden. So wurde der entsprechende Druck sichergestellt, mit dem die MAF-Säulen durchpumpt wurden. Zum Schluss wurde der Stempel mit dem Adapter fest verschraubt (siehe Abbildung 71).



Abbildung 71: Zusammensetzen und Fixieren der MAF-Säule mit Stempel und Adapter.

5.6.4. Filtration

Für den Filtrationsprozess wurden alle Proben auf pH 3 eingestellt. Die Säule wurde über einem Becherglas für das Eluat fixiert. Die Pumpe wurde an die Probe angeschlossen (siehe Abbildung 76). Es wurde eine Flussrate von 1 L/min eingestellt. Der Durchmesser der MAF-Säulen war für den ankommenden Kompressionsdruck optimiert, daher musste die Flussrate stabil eingestellt sein. Weiterhin war sicherzustellen, dass die Säule während des Filtrationsvorganges nicht trocken lief und keine Luft nach Beendigung der Filtration durchgepumpt wurde. Nach Beendigung der Filtration wurde der Auslass der Säule mit einer Gummikappe verschlossen, der Schlauch wurde von der Säule entfernt.



Abbildung 72: Aufbau des Filtrationsprozesses.

5.6.5. Elutionsprozess

Falls für die Filtration mehrere Monolithen benutzt wurden, musste jeder in einem separaten Gehäuse eluiert werden. Für die Elution wurden Schlauch und Stempel entfernt und 20 mL Elutionspuffer (0,5 M Glycin, 3 % Rinderextrakt, pH 9,5) mit Spritze und langer Injektionsnadel in das Gehäuse injiziert (Abbildung 73). Anschließend wurde der Schlauch wieder an den Adapter angeschlossen und die Verschlusskappe am Auslass entfernt. Für die Elution wurde eine Flussrate von 150 mL/min eingestellt. Nachdem ein Drittel des Elutionspuffers den Monolithen passiert hatte, wurde der Auslass erneut verschlossen und eine Inkubationszeit von 2 min abgewartet. Anschließend wurde der Auslass erneut geöffnet, sodass ein weiteres Drittel Elutionspuffer die Säule passieren konnte. Das wurde mit dem letzten Drittel des Puffers wiederholt. Nachdem der gesamte Puffer die Säule eluiert hatte, wurde das Eluat auf pH 7 eingestellt.

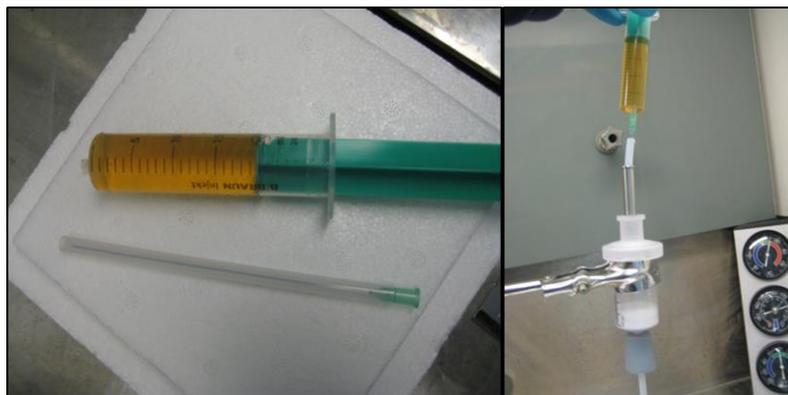


Abbildung 73: Injektion des Elutionspuffers.

5.6.6. *Reinigung der Geräte*

Nach der Filtration wurden Stempel, Adapter und PTFE-Halter mit 70 % Ethanol in ultrareinem Wasser gereinigt. Der Schlauch wurde mit 0,1 % Natriumhypochlorit desinfiziert und anschließend mit ultrareinem Wasser gespült. Die Bestandteile mit einmaliger Nutzung (Gehäuse, Monolithen) wurden genauso im Autoklav desinfiziert wie der PTFE-Halter. Die Flaschen mit Abfall wurden ebenso autoklaviert.

5.7. Aufreinigung von Hybridoma-Zellkulturüberständen für die Gewinnung monoklonaler Antikörper

5.7.1. *Probenvorbereitung*

Als erster Schritt wurden die Hybridoma-Zellkulturüberstände behutsam auf Eis aufgetaut. Alle weiteren Aufreinigungsschritte wurden dann bei 4 °C im Kühlraum durchgeführt. Zuerst wurde 1/12 des Gesamtvolumens von 6-fach PBS zum Zellkulturüberstand zugegeben, um einen neutralen pH zu erreichen. Anschließend wurden nun alle Zellkulturüberstände mit einem 0,22-µm-Membranfilter filtriert, um Zellrückstände zu entfernen.

5.7.2. *Reinigung, Equilibrierung und Beladung der Protein G-Sepharose-Säulen*

Um sicherzustellen, dass alle Rückstände der vorherigen Aufreinigungsprozeduren entfernt worden waren, wurden alle Schläuche mit 1 M NaOH gereinigt. Die Protein G-Säule wurde mit 10 mL Reinstwasser gespült, um die Lösung zur Säulenlagerung zu entfernen. Danach equilibrierte man die Säule mit 10 mL des zehnfachen PBS-Puffers. Anschließend wurde die Protein G-Säule an eine Peristaltikpumpe angeschlossen. Der Hybridoma-Zellkulturüberstand wurde mittels Kreislauf in ein Zentrifugenröhrchen und einer Flussrate von 0,2 mL/min über Nacht immer wieder über die Säule gepumpt. Wichtig war vor allem, darauf zu achten, dass die Säule nicht trocken lief, sondern dass der Zellkulturüberstand im ständigen Kreislauf umgepumpt wurde. Somit wurde ein optimales Anbinden des Antikörpers aus den Hybridoma-Zellen an die Protein G-Säule gewährleistet. Am nächsten Morgen wurde das Zentrifugenröhrchen ausgetauscht und der Zellkulturüberstand noch einmal komplett über die

Säule in ein neues Gefäß gepumpt. Anschließend wurde die Protein G-Säule mit 10 mL PBS-Puffer gewaschen. Alle nicht gebundenen Zellen und Antikörper wurden so von der Säule gespült. Nachfolgend erfolgte der Waschschrift mit 10 mL des 6-fach PBS-Puffers und danach 5 mL mit 0,5-fach PBS-Puffer. Damit wurde sichergestellt, dass die Bindekapazität der Protein G-Säule abgesenkt wurde, ehe man den Antikörper mit saurem pH von der Säule eluierte.

5.7.3. Elution der monoklonalen Antikörper

Es wurden 150 µL von 1 M TRIS-Puffer mit pH 9,0 in 1,5-mL-Reaktionsgefäßen vorgelegt. Die Antikörper wurden nun mit 100 mM Glycinpuffer bei pH 2,7 in die mit TRIS-Puffer befüllten Reaktionsgefäße eluiert. Nachdem ca. 1 mL Antikörper eluiert wurde, wurden die Reaktionsgefäße verschlossen und geschüttelt, sodass sich das Eluat gut mit dem vorgelegten Puffer mischte und der Antikörper neutralisiert wurde. Insgesamt wurden ca. 10 Fraktionen eluiert und durchmischt. Diese wurden bei 4 °C bis zum nächsten Aufreinigungsschritt gelagert.

5.7.4. Dialyse der monoklonalen Antikörper

Dialyseschläuche (Cutoff 3,5 kDa Molekulargewicht) wurden für eine halbe Stunde in Wasser hydratisiert. Die Schwermetallionen konnten somit aus den Schläuchen herausgelöst werden. Um diese zu binden, gab man 1 – 5 mL 5 mM EDTA hinzu, das die Schwermetalle komplexierte. Während der Hydratisierung sollte das Wasser zwei- bis dreimal gewechselt werden, um das EDTA und andere kleine Moleküle zu entfernen. Die gesammelten Fraktionen des monoklonalen Antikörpers wurden gegen PBS-Puffer dialysiert, um sicherzustellen, dass sich in der Antikörperlösung ein neutraler pH einstellte. Wichtig war vor allem, während der Dialyse (Dauer 2 – 3 Tage) den PBS-Puffer mehrmals zu wechseln. Die Entfernung von Glycin und anderen primären Aminen war notwendig, wenn der Antikörper nach Fertigstellung zum Mikrodosieren auf eine NHS-aktivierte Oberfläche eingesetzt werden sollte.

5.7.5. Aufkonzentrierung und Aliquotierung der Antikörper

Der Antikörper wurde nach der Dialyse aus der Dialysemembran pipettiert und bei $20.000 \times g$ für 30 min zentrifugiert, um verklumpte Proteine und Partikel zu entfernen. Die Antikörper wurden mit einem Amicon Centricon (z.B. Amicon Ultra 15 mL Concentrator) auf 0,5 – 1 mg/mL aufkonzentriert.

Danach wurden immer 100 – 200 μL des Antikörpers in 1,5-mL-Reaktionsgefäße aliquotiert, bis die gesamte Lösung aliquotiert war. Zur langen Lagerung wurden die Reaktionsgefäße unter Stickstoffkühlung bei $-80\text{ }^\circ\text{C}$ aufbewahrt. Für eine mittlere Lagerungszeit sollte der Antikörper bei $-20\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden. Wenn mit dem Antikörper gearbeitet wurde, wurden 0,02 – 0,1 % NaN_3 als antibakterieller Wirkstoff zugesetzt.

5.7.6. Neutralisierung und Lagerung der Protein G Säulen

Nach der Elution wurde die Protein G-Säule mit 5 – 10 mL Reinstwasser gespült und anschließend mit 10 mL unverdünntem PBS neutralisiert. Danach erfolgte ein weiterer Waschschritt mit 5 – 10 mL Reinstwasser und anschließend mit 20 %-igem Ethanol. Die Protein G-Säule wurde nun aus dem Halter entfernt und mit der beigefügten Kappe verschlossen. Eine Lagerung erfolgte bei $4\text{ }^\circ\text{C}$, bis sie das nächste Mal für den gleichen Antikörper benutzt werden konnte.

5.8. Herstellung von künstlichen LPS-Standards in sterilem Urin

Die *L. pneumophila*-SG 1-Stämme der Subtypen Bellingham (DSMZ 25214), Heysham (ATCC 43107) und OLDA (DSMZ 25200) wurden genutzt, um sterilen Urin aufzustocken. Die Stämme wurden auf Agar-Nährmedium (BCYE)- α (Oxoid, Wesel, Deutschland) für 72 h bei $37\text{ }^\circ\text{C}$ und 5 % CO_2 -Atmosphäre angezüchtet. Die gewachsenen Kolonien auf der Platte wurden aufgenommen und in 1,5 mL Reinstwasser suspendiert. Die erhaltenen Bakterienkonzentration wurden nephelometrisch bestimmt und bei $1,5 \times 10^{10}$ Zellen/mL eingestellt. Für die Herstellung der LPS-Standards wurden die Bakterienzellen in PBS suspendiert und für 14 h bei 850 rpm und $37\text{ }^\circ\text{C}$ geschüttelt. Somit sollte das Ablösen der LPS-Strukturen an der Zellmembran gefördert werden.

Nach Zentrifugation der Lösungen für 10 min bei $4.000 \times g$ wurde der Überstand durch einen $0,2\text{-}\mu\text{m}$ -Celluloseacetat-Filter (Sarstedt, Nürmbrecht, Deutschland) filtriert. Somit wurden die intakten Zellen und schwere Zelltrümmer von den löslichen Bestandteilen separiert. Die LPS-Standards wurden anschließend durch Mischen des gleichen Volumenanteils von sterilem Urin mit LPS-Stammlösung hergestellt.

Der sterile Urin wurde wie folgt gewonnen: Entnahme von Mittelstrahlurin einer gesunden Person und anschließende Inkubation bei $96\text{ }^{\circ}\text{C}$ für 30 min. Anschließend erfolgte eine Behandlung mit UV-Licht für 15 Minuten. Die Sterilität des Urins wurde getestet, indem 10, 100 und $500\text{ }\mu\text{L}$ des Urins auf Blutagar und MacConkey Agar (Oxoid, Wesel, Deutschland) ausplattiert wurden. Nach 48 h bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ sollte kein Bewuchs der Platte vorliegen. Danach konnte der Urin eingesetzt werden.

5.8.1. Charakterisierung der LPS-Standards mit dem LAL-Test

Die enthaltene Endotoxin-Konzentration, hierbei handelt es sich um die Konzentration an freiem LPS, wurde durch den *Limulus Amebocyte Lysate* (LAL)-Test bestimmt. Dafür wurden die künstlichen LPS-Standards sowie Urin, der negativ getestet wurde, mit dem Endosafe®-PTS-System vermessen (siehe Abbildung 74).



Abbildung 74: LAL-Test-Kartusche und Endosafe®-PTS-Messsystem.

Dabei wurde sich an die genaue Vorgabe des Herstellers gehalten (Charles River, Wilmington, USA). Die Nachweisgrenze des Kits lag bei 0,1 bis 10 Endotoxin-Einheiten (EU) pro Milliliter (mL).

Die LPS-Standards wurden anschließend für die Messungen mit CL-SMIA am MCR 3 in sterilem Urin verdünnt. Weiterhin wurden die Steril-Urine und künstlichen LPS-Standards mit dem BINAX®E.I.A. (Alere, Jena, Deutschland) entsprechend der Versuchsanleitung getestet.

5.8.2. Gewinnung der Urin-Proben der Patienten

14 Urine wurden von Legionellose-infizierten Patienten entnommen. Diese Urine konnten in Vortests mittels monoklonaler Subtypisierung als positiv detektiert werden. Weiterhin wurde ein Vortest mit BINAX®E.I.A. durchgeführt. Die Urine wurden abschließend mit Vivaspin 6-Säulen, mit einem molekularen Cut-off von 10 kDa um den Faktor 10 aufkonzentriert (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland). Alle erhaltenen Urine wurden mit dem CL-SMIA am MCR 3 getestet. Aufgrund der Aufkonzentrierung aller Urine auf 1 mL konnte jeder Urin nur einmal vermessen werden.

5.9. Duschmodell zur Charakterisierung von Bioaerosolen

In Zusammenarbeit mit Frau Bettina Kiwull wurde eine Bioaerosolkammer entwickelt, die Untersuchungen von Bioaerosolen ermöglicht, die der Risikogruppe 2 angehören. Es wurde eine Glovebox so umgebaut, dass sie als Biosicherheitskammer der Sicherheitsklasse Bio 2 genutzt werden konnte. Da der Aufbau der Kammer Aufgabe von Frau Kiwull war, werden hier im Experimentalteil nur Aufgaben erklärt, die gemeinsam durchgeführt wurden.

Eine funktionsfähige Bioaerosolkammer, basierend auf einem Kammer-in-Kammer-Prinzip (siehe Abbildung 75) wurde etabliert.

EXPERIMENTELLER TEIL

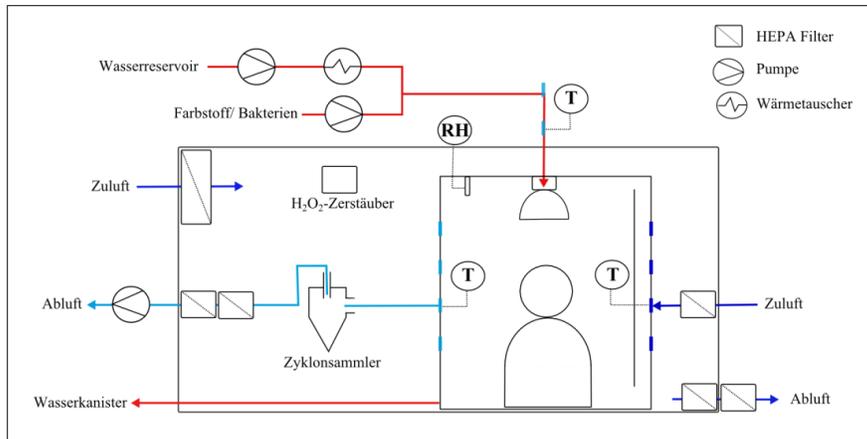


Abbildung 75: Schematische Darstellung von Biosicherheits- und Bioaerosolkammer (Bild entnommen aus LGL-Abschlussbericht, erstellt von Bettina Kiwull).

Mit dem fertig etablierten Duschmodell war es möglich, Duschaerosole mit Wasser von einem angeschlossenen Leitungswasserreservoir zu erzeugen (siehe Abbildung 76).

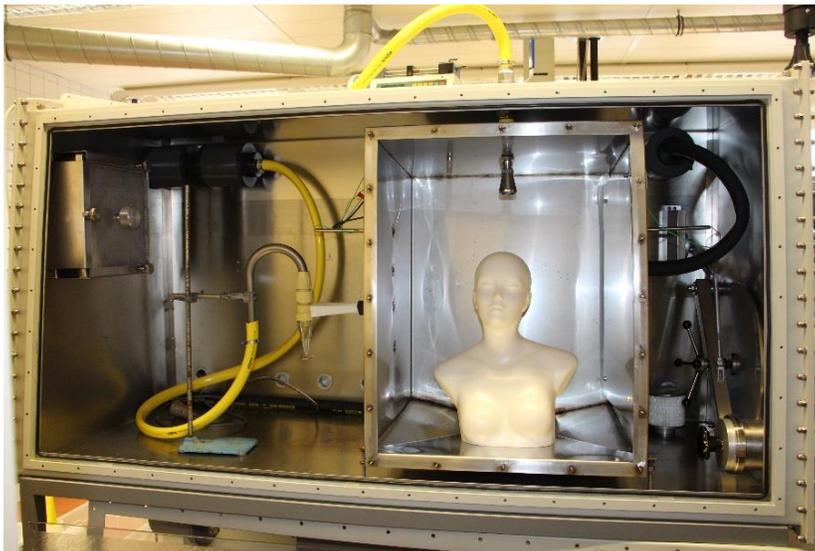


Abbildung 76: Darstellung der fertigen Bioaerosolkammer mit Kammer-in-Kammer-Prinzip; Duschaerosole der Risikoklasse Bio 2 können erzeugt werden (entnommen aus LGL-Abschlussbericht).

5.9.1. Erzeugung und Detektion von *E. coli*

Nach einer Dichtigkeitsprüfung mit Uranin (durchgeführt v. Frau Kiwull) wurden in der Kammer bakterienhaltige Duschaerosole hergestellt und anschließend überprüft, ob diese auch außerhalb der Duschaerosolkammer in der Biosicherheitskammer nachzuweisen waren.

Zur Herstellung *E. coli*-haltiger Duschaerosole wurde eine Übernacht-Kultur angesetzt. Dazu wurde eine Kryokultur von *E. coli* 423 in 150 mL NZCYM-Nährmedium (Sigma Aldrich, Deutschland) bei 37 °C über Nacht inkubiert (20 h). Anschließend wurden die Bakterien zentrifugiert (10 °C, 10 Minuten, 4.000 s⁻¹). Das entstandene Pellet wurde anschließend in 3 mL Saline-Magnesium-Puffer (0,58 g NaCl, 0,2 g MgSO₄·7 H₂O, 5 mL TRIS-HCl (pH 7,5), 0,5 mL 2 % Gelatine-Lösung, in 100 mL Wasser, steril filtriert (0,2 µm)) resuspendiert. Die Zellkonzentration konnte anschließend über die optische Dichte mittels eines Photometers (Specord 150 plus, Analytik Jena) bei einer Wellenlänge von 670 nm ermittelt werden.

Danach wurde die hergestellte und quantifizierte *E. coli*-Suspension mittels einer Spritzenpumpe (Harvard Apparatus, Model 11) und einer Flussrate von 1 mL/min zum Duschwasser (34 °C) hinzugefügt. Bei einem Volumenstrom von 6,8 L/min Leitungswasser ergab sich so eine Konzentration von $6,9 \times 10^7$ Zellen/L an *E. coli* 423.

Für die Detektion der vernebelten *E. coli* 423 wurden an Boden und Seitenwänden der Biosicherheitskammer 8 unterschiedliche Probenahmestellen ausgewählt. Luftgetragene *E. coli* wurden auf frisch gegossenen Agar-Platten (15,4 g NZCYM Medium, 10,4 g Agar-Agar, 700 mL ultrareines Wasser), die an den 8 Probenahmestellen platziert waren, gesammelt und für 36 h bei 37 °C im Klimaschrank inkubiert. Als Blindwert für die Experimente mit *E. coli* wurde Leitungswasser für die Erzeugung des Duschaerosols verwendet und mittels Agar-Platten eine Blind-Aerosolprobe genommen.

5.9.2. Desinfektion der Bioaerosol- und Biosicherheitskammer

Nach der Erzeugung von bakterienhaltigen Duschaerosolen ist eine Dekontamination des experimentellen Aufbaus unbedingt notwendig. Dazu wurden alle wasserleitenden Komponenten (Wasserpumpe, Schläuche, Duschkopf und Coriolis µ-Probenahmekopf) mit 48 L wässriger Natriumhypochlorit-Lösung (1:1000) gespült. Zugängliche Oberflächen im Innenraum der Sicherheitskammer wurden mit Ethanol (70 % in Wasser) gereinigt.

Um sicherzustellen, dass die Oberflächendekontamination erfolgreich war, wurden nach Herstellung von *E. coli*-Aerosolen sowie nach Behandlung mit Ethanol-Lösung an den 8 verschiedenen Probenahmestellen (14 cm x 14 cm) Abklatschproben (Glas-Objektträger mit

Agar-NZCYM-Medium beschichtet) genommen. Die Proben wurden anschließend bei 37 °C für 36 h inkubiert. Zur Evaluierung der Dekontamination von allen wasserleitenden Komponenten wurde die *E. coli*-Konzentration im Abwasser der Modelldusche mittels Colilert®-Wassertest bestimmt. Dazu erfolgte nach der Erzeugung bakterienhaltiger Aerosole ein Dekontaminationsschritt mit Natriumhypochlorit-Lösung. Anschließend wurde mit 48 L Wasser gespült, um alle Reste des verwendeten Desinfektionsmittels aus den wasserführenden Leitungen und dem Coriolis μ -Probenahmekopf zu entfernen. Es folgte ein weiterer Waschschrift mit 48 L Leitungswasser. Probenahmen für den Colilert®-Wassertest erfolgten aus dem *E. coli*-Duschwasser sowie dem Abwasser nach dem zweiten Spülschritt. Als Blindwert wurde jeweils eine Probe des verwendeten Leitungswassers genommen.

5.9.3. Bestimmung der *E. coli*-Konzentration im Duschaerosol

Während des Duschvorgangs mit *E. coli*-haltigem Wasser wurden mittels Coriolis μ -Probenahmekopf (98 L/min) und Sammelgefäß (10 mL PBS vorgelegt) Aerosolproben genommen. Die Bestimmung der Konzentration in der Sammelflüssigkeit erfolgte nach Verdünnung mit Leitungswasser mittels Colilert®-Wassertest. Für den Colilert®-Wassertest wurden 100 mL Probe in einem sterilen Gefäß mit dem Inhalt einer Einzelpackung Colilert®-18 vermischt. Anschließend wurde die Probe in den Probenbehälter Quantitray-2000 eingefüllt und mit einem Versiegelungsgerät verschlossen. Der Probenbehälter wurde für 18 h bei 37 °C im Wärmeschrank inkubiert. Anschließend wurden die gelb gefärbten, positiven Kavitäten ausgezählt und die wahrscheinlichste Anzahl an Bakterien pro 100 mL Probe (*most probable number*, MPN) aus der MPN-Tabelle abgelesen. Das Sammelvolumen im Probenahmekopf betrug nach 7 min Sammlung 25 mL. Dieser Verdünnungsfaktor wurde bei der Quantifizierung von *E. coli* einberechnet

6. Abkürzungsverzeichnis

6. Abkürzungsverzeichnis

AFNOR	französisches Normungsinstitut (<i>association française de normalisation</i>)
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	willkürliche Einheit (<i>arbitrary unit</i>)
BINAX®	Schnelltest für verschiedene Mikroorganismen der Firma Alere
BSTG	Bestimmungsgrenze
CARD	Enzym-katalysierte Hybridisierung (<i>catalyzed reporter deposition</i>)
CDC	amerikanische Zentren für Krankheitskontrolle und Prävention (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CCD	ladungsgekoppeltes Bauteil (<i>charge-coupled device</i>)
CL	Chemilumineszenz
DAPEG	Diamino-Polyethylenglykol
DAPPG	Diamino-Polypropylenglykol
DIN	Deutsches Institut für Normung
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	Di(<i>N</i> -succinimidyl)carbonat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzymgekoppelter Immunoassay (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
EN	Europäische Norm
FCM	Durchflusszytometrie (<i>flow cytometry</i>)
FISH	Fluoreszenz <i>in-situ</i> Hybridisierung (<i>fluorescence in-situ hybridization</i>)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer
GOPTS	3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan
GVPC	Glycin, Vancomycin, Polymyxin, Cyclohexamid
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
ICP-MS	Massenspektrometrie mit induktiv gekoppeltem Plasma (<i>inductively coupled plasma mass spectrometry</i>)
ISO	Internationale Organisation für Normung (<i>International Organization for Standardization</i>)
IWC	Institut für Wasserchemie der TU München
KBE	koloniebildende Einheit
LAL-Test	<i>Limulus-Amöbozyten-Lysat</i> -Test
LGL	Bayerisches Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
LPS	Lipopolysaccharid
m	Anzahl der Messwerte für einen einzelnen Punkt eines Graphen
mAb	monoklonaler Antikörper
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (<i>Matrix-assisted Laser Desorption/Ionization</i>)
MAF	Monolithische Adsorptionsfiltration
MCR 3	Munich Chip Reader, 3. Generation
mip	Makrophagen-Infektiösitäts-Potentiator (<i>macrophage infectivity potentiator</i>)
n	Anzahl der Messpunkte in einem Graphen
NWG	Nachweisgrenze
pAb	polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphatpuffer (<i>phosphate buffered saline</i>)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PMMA	Polymethylmethacrylat
PTFE	Polytetrafluorethylen
REM	Rasterelektronenmikroskop
RFLP	Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus (<i>restriction fragment length polymorphism</i>)
RKI	Robert Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
SA	Streptavidin
SERS	Oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie (<i>surface-enhanced Raman spectroscopy</i>)
SG	Serogruppe
SL	Stammlösung
SLT	Umbau des MCR 3 mit Probenschleife und beheizbarer Flusszelle (<i>sample-loop, temperature</i>)
SMIA	Sandwich-Immunoassay-Mikroarray
ST	Subtyp
spp.	species pluralis
SYTO 9	DNA-interkalierender Farbstoff für die Durchflusszytometrie
TEM	Transmissionselektronenmikroskop
TrinkwV	Trinkwasserverordnung
TUM	Technische Universität München
TOF	Flugzeitanalysator (<i>time of flight</i>)

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

UV	Ultraviolett
VBNC	lebend, aber nicht kultivierbar (<i>viable but non-culturable</i>)
VDI	Verein Deutscher Ingenieure
WHO	Weltgesundheitsorganisation (<i>world health organization</i>)
ZeUF	zentrifugale Ultrafiltration

7. Literaturverzeichnis

7. Literaturverzeichnis

Detection and quantification of *Legionella* and/or *Legionella pneumophila* by concentration and gene amplification by polymerase chain reaction (PCR), AFNOR Norme XP T 90-471, **2006**.

Angenendt, P., Progress in protein and antibody microarray technology, *Drug Discov. Today*, **2005**, *10*, 503-511.

Barbulovic-Nad, I., Lucente, M., Sun, Y., Zhang, Y., Wheeler, A. R., Bussmann, M., Bio - microarray fabrication techniques: a review, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **2006**, *26*, 237-259.

Bauer, M., Mathieu, L., Deloge-Arbarkan, M., Remen, T., Tossa, P., Hartemann, P., Zmirou-Navier, D., Legionella bacteria in shower aerosols increase the risk of Pontiac fever among older people in retirement homes, *J. Epidemiol. Commun. H.*, **2008**, *62*, 913-920.

Benson, R. F., Tang, P. W., Fields, B. S., Evaluation of the Binax and Biotest urinary antigen kits for detection of Legionnaires ' disease due to multiple serogroups and species of *Legionella*, *J. Clin. Microbiol.*, **2000**, *38*, 2763-2765.

Birtles, R. J., Harrison, T. G., Samuel, D., Taylor, A. G., Evaluation of urinary antigen ELISA for diagnosing *Legionella pneumophila* serogroup 1 infection, *J. Clin. Pathol.*, **1990**, *43*, 685-690.

Blatny, J. M., Reif, B. A., Skogan, G., Andreassen, O., Høiby, E. A., Ask, E., Waagen, V., Aanonsen, D., Aaberge, I. S., Caugant, D. A., Airborne Legionella bacteria from pulp waste treatment plant: aerosol particles characterized as aggregates and their potential hazard, *Environ. Sci. Technol.*, **2008**, *42*, 7360-7367.

Brecevic, L., Michel, S., Starke, H., Mrasek, K., Multicolor FISH used for the characterization of small Supernumerary Marker Chromosomes (sSMC) in commercially available immortalized cell lines, *Cytogenet. Genome Res.*, **2006**, *114*, 319-324.

Breiman, R. F., Cozen, W. B., Fields, S. T., Mastro, D., Carr, S. J., Spika, J. S., Mascola, L., Role of air sampling in investigation of an outbreak of Legionnaires' disease associated with exposure to aerosols from an evaporative condenser, *J. Infect. Dis.*, **1990**, *161*, 1257-1261.

Brodhun, B., Bucholz, U., Epidemiologie der Legionärskrankheit in Deutschland, *Bundesgesundheitsblatt*, **2011**, *54*, 680-687.

Buchbinder, S., Trebesius, K., Heesemann, J., Evaluation of detection of *Legionella spp.* in water samples by fluorescence in situ hybridization, PCR amplification and bacterial culture, *Int. J. Med. Microbiol.*, **2002**, *292*, 241-245.

Bumbaugh, A. C., McGraw, E. A., Page, K. L., Selander, R. K., Whittam, T. S., Sequence polymorphism of dotA and mip alleles mediating invasion and intracellular replication of *Legionella pneumophila*, *Curr. Microbiol.*, **2002**, *44*, 314-322.

Buse, H. Y., Schoen, M., Ashbolt, N., *Legionellae* in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure, *Water Res.*, **2012**, *46*, 921-933.

Carvalho, E., Sindt, C., Verdier, A., Galan, C., O'Donoghue, L., Parks, S., Thibaudon, M., Performance of the Coriolis air sampler, a high-volume aerosol-collection system for quantification of airborne spores and pollen grains, *Aerobiologia*, **2008**, *24*, 191-201.

- Casati, S., Conza, L., Compost facilities as a reservoir of *Legionella pneumophila* and other legionella species, *Clin. Microbiol. Infect.*, **2010**, *16*, 945-947.
- Cashdollar, J. L., Wymer, L., Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies, *J. Appl. Microbiol.*, **2013**, *115*, 1-11.
- Cianciotto, N. P., Pathogenicity of *Legionella pneumophila*, *Int. J. Med. Microbiol.*, **2001**, *291*, 331-343.
- Ciesielski, C. A., Blaser M. J., Wang, W. L., Serogroup specificity of *Legionella pneumophila* is related to lipopolysaccharide characteristics, *Infect. Immun.*, **1986**, *51*, 397-404.
- Darwish, I. A., Immunoassay Methods and their Applications in Pharmaceutical Analysis: Basic Methodology and Recent Advances, *Int. J. Biomed. Sci.*, **2006**, *2*, 217-135.
- Deisingh, A. K., Thompson, M., Detection of infectious and toxigenic bacteria, *Analyst*, **2002**, *127*, 567-581.
- Legionelleninfektion Warstein, Größter Ausbruch in Deutschland, *Dtsch. Arztebl*, **2013**, *38*, A1736-1738.
- Deutsches Institut für Normung (DIN), Milch und Milcherzeugnisse - Nachweis von *Enterobacter sakazakii*, **2006**, ISO/TS 22964:2006-02.
- Deutsches Institut für Normung (DIN), Wasserbeschaffenheit – Nachweis und Zählung von Legionellen – Teil 2: direktes Membranfiltrationsverfahren mit niedriger Bakterienzahl, **2008**, DIN EN ISO 11731-2:2008.
- Deutsches Institut für Normung (DIN), Wasserbeschaffenheit – Zählung von Legionellen, **2015**, DIN EN ISO 11731:2015-12.
- Didenko, V. V., DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications, *Biotechniques*, **2001**, *31*, 1106-1121.
- Dominguez, J. A. Manterola, J. M., Blavia, R., Sopena, N., Belda, F. J., Padilla, E. Gimenez, M., Sabria, M., Morera, J., Ausina, V., Detection of *Legionella pneumophila* serogroup 1 antigen in non-concentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration, *J. Clin. Microbiol.*, **1996**, *34*, 2334-2336.
- Dominguez, J. A., Gali, N., Pedroso, P., Fargas, A., Padilla E., Manterola, J. N., Matas, L., Comparison of the Binax Legionella urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest Legionella urin antigen EIA for detection of Legionella antigen in both concentrated and non-concentrated urine samples, *J. Clin. Microbiol.*, **1998**, *36*, 2718-2722.
- Dusserre, E., Ginevra, C., Hallier-Soulier, S., Vandenesch, F., Festoc, G., Etienne, J., Jarraud, S., Molmeret, M., A PCR-based method for monitoring *Legionella pneumophila* in water samples detects viable but noncultivable *Legionellae* that can recover their cultivability, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2007**, *74*, 4817-4824.
- Edelstein, P. H., Legionnaires' disease – state-of-the-art clinical article, *Clin. Infect. Dis.*, **1993**, *16*, 741-749.

- Farmer, J. J., Asbury, M. A., Hickman, F. W., Brenner, D. J., *Enterobacter sakazakii*: A new species of "Enterobacteriaceae" isolated from clinical specimens, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **1980**, *30*, 569-584.
- Ferrè, M. R. S., Arias, C., Oliav, J. M., Pedrol, A., Garcia, M., Pellicer, T., Roura, P., Dominguez, A., A community outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Vic and Gurb, Catalonia (Spain) in 2005, *Eur. J. Clin. Microbiol.*, **2009**, *28*, 153-159.
- Feng, Y. F., Ke, X., Ma, R. S., Chen, P., Hu, G. G., Liu, F. Z., Parallel detection of autoantibodies with microarrays in rheumatoid diseases, *Clin. Chem.*, **2004**, *50*, 416-422.
- Fields, B. S., Benson, R. F., Besser, R. E., *Legionella* and Legionnaire's disease: 25 years of investigation, *Clin. Microbiol. Rev.*, **2002**, *15*, 506-526.
- Flint, S., Walker, K., Waters, B., Crawford, R., Description and validation of a rapid (1 h) flow cytometry test for enumerating thermophilic bacteria in milk powders, *J. Appl. Microbiol.*, **2006**, *102*, 909-915.
- Fox, E. M., Jordan, K. N., Towards a one-step *Enterobacter sakazakii* enrichment, *J. Appl. Microbiol.*, **2008**, *105*, 1091-1097.
- Freudenmann, M., Kurz, S., von Baum, H., Reick, D., Schreff, A. M., Essig, A., Lück, C., Gonser, T., Brockmann, S. O., Härter, G., Eberhardt, B., Embacher, A., Höller, C., Interdisziplinäres Management eines überregionalen Legionellenausbruchs, *Bundesgesundheitsblatt*, **2011**, *54*, 1161-1169.
- Füchslin, H.P., Kötzsch, S., Keserue, H.-A., Egli, T., Rapid and quantitative Detection of *Legionella pneumophila* applying immunomagnetic separation and Flow Cytometry, *Cytom. Part A*, **2010**, *77*, 264-274.
- Garcia-Campagna, A. M., Lara, F. J., Trends in the analytical applications of chemiluminescence in the liquid phase, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2007**, *387*, 165-169.
- Gaia, V., Casati, S., Tonolla, M., Rapid identification of *Legionella spp.* by MALDI-TOF MS based protein mass fingerprinting, *Syst. Appl. Microbiol.*, **2011**, *34*, 40-44.
- Gehring, A. G., Albin, D. M., Bhunia, A. K., Reed, S. A., Tu, S.-I., Uknalis, J., Antibody Microarray Detection of *Escherichia coli* O157:H7: Quantification, Assay Limitations, and Capture Efficiency, *Anal. Chem.*, **2006**, *78* 6601-6607.
- Giao, M. S., Wilks, S. A., Azevedo, N. F., Viera, N. F., Keevil, C. W., Validation of SYTO 9 / propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable *Legionella pneumophila*, *Microbial Ecol.*, **2008**, *58*, 56-62.
- Golden, J. P., Ligler, F. S., A comparison of imaging methods for use in an array biosensor, *Biosens. Bioelectron.*, **2002**, *17*, 719-725.
- Hägele, S., Köhler, R., Merkert, H., Schleicher, M., Hacker, J., Steinert, M., *Dictyostelium discoideum*: a new host model system for intracellular pathogens of the genus *Legionella*, *Cell. Microbiol.*, **2000**, *2*, 165-171.

- Haroon, A., Koide, M., Higa, F., Tateyama, M., Fujita, J., Identification of *Legionella pneumophila* serogroups and other *Legionella* species by *mip* gene sequencing, *J. Chemother.*, **2012**, *18*, 276-281.
- Hayden, R. T., Uhl, J. R., Qian, X., Hopkins, M. K., Aubry, M. C., Limper, A. H., Lloyd, R. V., Cockerill, F. R., Direct detection of *Legionella* species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture, *J. Clin. Microbiol.*, **2001**, *39*, 2618-2626.
- Helbig, J. H., Kurtz, J. B., Castellani Pastoris, M., Pelaz, C., Lueck, P. C., Antigenic lipopolysaccharide components of *Legionella pneumophila* recognized by monoclonal antibodies: Possibilities and limitations for division of the species into serogroups, *J. Clin. Microbiol.*, **1997**, *35*, 2841-2845.
- Helbig, J. H., Uldum, S. A., Lueck, C. P., Harrison, T. G., Detection of *Legionella pneumophila* antigen in urine simple by the BinaxNow immunochromatographic assay and comparison with both Legionella urinary Enzyme Immunoassay (EIA) Biotest Legionella urin Antigen EIA., *J. Med. Microbiol.*, **2001**, *50*, 509-516.
- Helbig, J. H., Bernander, S., Castellani Pastoris, M., Etienne, J., Gaia, V., Lauwers, S., Lindsay, D., Lueck, P. C., Marques, T., Mentula, S., Peters, M. F., Pelaz, C., Struelens, M., Uldum, S. A., Wewalka, G., Harrison, T. G., Pan-European study on culture-proven Legionnaires' disease: Distribution of *Legionella pneumophila* serogroups and monoclonal subgroups, *Euro. J. Clin. Microbiol.*, **2002**, *21*, 710-716.
- Helbig, J. H., Uldum, S. A., Bernander, S., Lueck, P. C., Wewalka, G., Abraham, B., Gaia, V., Harrison, T. G., *J. Clin. Microbiol.*, **2003**, *41*, 838-840.
- Helbig, J. H., Lück, P. C., Kunz, B., Bubert, A., Evaluation of the Duopath Legionella lateral flow assay for identification of *Legionella pneumophila* and *Legionella* species culture isolates, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2006**, *72*, 4489-4491.
- Helbig, J. H., Jacobs, E., Lueck, C., *Legionella pneumophila* urinary antigen subtyping using monoclonal antibodies as a tool for epidemiological investigations, *Euro. J. Clin. Microbiol.*, **2012**, *31*, 1673-1677.
- Holliday, M. G., Use of latex agglutination technique for detecting *Legionella pneumophila* (serogroup 1) antibodies, *J. Clin. Pathol.*, **1990**, *43*, 860-862.
- Holt, L. J., Bussow, K., Walter, G., Tomlinson, I. M., By-passing selection: direct screening for antibody-antigen interactions using protein arrays, *Nucleic Acids Res.*, **2000**, *28*, E72, 5 pages.
- Huang, S.-W., Hsu, B.-M., Huang, C.-C., Chen, J.-S., Utilization of polymerase chain reaction and selective media cultivation to identify *Legionella* in Taiwan spring water samples, *Environ. Monit. Assess*, **2011**, *174*, 427-437.
- Hussong, D., Colwell, R., O'Brien, M., Weiss, E., Pearson, A., Weiner, R., Burge, W., Viable *Legionella pneumophila* not detectable by culture on agar media, *Bio/Technol.*, **1987**, *5*, 947-950.
- Ingram, M., Cleary, T. J., Price, B. C., Price, R. L., Castro, A., Rapid detection of *Legionella pneumophila* by Flow Cytometry, *Cytom. Part A*, **1982**, *3*, 134-137.

- Jennings, C. D., Foon, K. A., Recent advances in flow cytometry. Application to the diagnosis of hematologic leukemia, *Blood*, **1998**, *90*, 2863-2892.
- Joly, J. R., Roger, I., McKinney, M., Tobin, J. O., Bibb, W. F., Watkins, I. D., Ramsay, D., Development of a standardized subgrouping scheme for *Legionella pneumophila* serogroup 1 using monoclonal antibodies, *J. Clin. Microbiol.*, **1986**, *23*, 768-771.
- Josephy, P. D., Eling, T., Mason, R. P., The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3, 5, 3',5'-tetramethylbenzidine. Free radical and charge-transfer complex intermediates, *J. Biol. Chem.*, **1982**, *257*, 3669-3675.
- Jungbauer, A., Hahn, R., Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology, *J. Sep. Sci.*, **2004**, *27*, 767-778.
- Kirschner, A., Rameder, A., Schrammel, B., Indra, A., Farnleitner, A., Sommer, R., Development of a new CARD-FISH protocol for quantification of *Legionella pneumophila* and its application in two hospital cooling towers, *J. Appl. Microbiol.*, **2012**, *112*, 1244-1256.
- Kloth, K., Niessner, R., Seidel, M., Development of an open stand-alone platform for regenerable automated microarrays, *Biosens. Bioelectron.*, **2009**, *24*, 2106-2112.
- Kunze, A., Pei, L., Elsässer, D., Niessner, R., Seidel, M., High performance concentration method for viruses in drinking water, *J. Virol. Methods*, **2015**, *222*, 132-137.
- Langer, V., Niessner, R., Seidel, M., Stopped-flow microarray immunoassay for the detection of viable *E. coli* by use of chemiluminescence flow-through microarrays, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2011**, *399*, 1041-1050.
- Leclerc, O., Fraisse, P. O., Labarraque, G., Oster, C., Pichaut, J. P., Baume, M., Jarraud, S., Fiscaro, P., Vaslin-Reimann, S., Method development for genomic *Legionella pneumophila* DNA quantification by inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Biochem.*, **2013**, *435*, 153-158.
- Lee, J. V., Lai, S., Exner, M., Lenz, J., Gaia, V., Casati, S., Hartemann, P., Lueck, C., Pangon, B., Ricci, M. L., Scaturro, M., Fontana, S., Sabria, M., Sanchez, I., Assaf, S., An international trial of quantitative PCR for monitoring Legionella in artificial water systems, *J. Appl. Microbiol.*, **2011**, *110*, 1032-1044.
- Levsky, J. M., Singer, R. H., Fluorescence in situ hybridization; past, present and future, *J. Cell Sci.*, **2003**, *116*, 2833-2838.
- Lindsay, D. S. J., Abraham, W. H., Findlay, W., Christie, P., Johnston, F., Edwards, G. F. S., Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease due to *Legionella pneumophila* serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods, *J. Med. Microbiol.*, **2004**, *53*, 183-187.
- Loni, E., Luca, G. D., Legnani, P. P., Sacchetti, R., Stampi, S., Zanetti, F., Legionella waterline colonization: Detection of *legionella* species in domestic, hotel and hospital hot water systems, *J. Appl. Microbiol.*, **2005**, *98*, 373-379.
- Lück, P. C., Steinert, M., Pathogenesis, diagnosis and therapy of Legionella infections, *Bundesgesundheitsblatt*, **2006**, *49*.

- Lück, C., Fry, N. K., Helbig, J. H., Jarraud, S., Harrison, T.G., Typing methods for legionella, *Method. Mol. Biol.*, **2013**, 954, 119-148.
- Malone, J. H., Oliver, B., Microarrays, deep sequencing and the true measure of the transcriptome, *BMC Biology*, **2011**, 9, 34-42.
- Manz, W., Amann, R., Szewzyk, R., Szewzyk, U., Stenstrom, T. A., Hutzler, P., Schleifer, K. H., In situ identification of *Legionellaceae* using 16S rRNA-targeted oligonucleotide probes and confocal laser scanning microscopy, *Microbiol.*, **1995**, 141, 29-39.
- Marquette, C. A., Blum, L. J., Applications of the Luminol chemiluminescent reaction in Analytical Chemistry, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, 385, 546-554.
- Mccormick, D., Thorn, S., Milne, D., Evans, C., Public health response to an outbreak of Legionnaire's disease in Edinburgh, United Kingdom, June 2012, *Eurosurveillance*, **2012**, 17, 6-9.
- Meyer, R., Legionnaires-Disease - Aspects of the nosocomial infection, *Am. J. Med.*, **1984**, 76, 657-663.
- Moll, H., Knirel, Y. A., Helbig, J. H., Zähringer, U., Identification of an α D-Manp-(1 \rightarrow 8)-Kdo disaccharide in the inner core region and the structure of the complete core region of the *Legionella pneumophila* serogroup 1 lipopolysaccharide, *Carbohyd. Res.*, **1997**, 304, 91-95.
- Monroe, D., Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms, *Public Library of Science (PLOS) Biology*, **2007**, 5, 2458-2461.
- Motter, A., Goebel, U. B., Fluorescence in situ hybridization (FISH) for direct visualization of microorganisms, *J. Microbiol. Method.*, **2000**, 41, 85-112.
- Nichkova, M., Dosev, D., Gee, J., Hammock, B. D., Kennedy, I. M., Microarray immunoassay for phenoxybenzoic acid using polymer encapsulated EU: GD203 nanoparticles as fluorescent labels, *Anal. Chem.*, **2005**, 77, 6864-6873.
- Olsen, C. W., Elverdal, P., Jørgensen, C. S., Uldum, S. A., Comparison of the sensitivity of the Legionella urinary antigen EIA kits from Binax and Biotest with urine from patients with infections caused by less common serogroups and subgroups of Legionella, *Euro. J. Clin. Microbiol.*, **2009**, 28, 817-820.
- Para, M. F., Plouffe, J. F., Production of monoclonal antibodies to *Legionella pneumophila* serogroups 1 and 6, *J. Clin. Microbiol.*, **1983**, 18, 895-900.
- Pei, L., Rieger, M., Lengger, S., Ott, S., Zawadsky, C., Hartmann, N. M., Selinka, H. C., Tiehm, A., Niessner, R., Seidel, M., Combination of crossflow ultrafiltration, monolithic affinity filtration, and quantitative reverse transcriptase PCR for rapid concentration and quantification of model viruses in water, *Environ. Sci. Technol.*, **2012**, 46, 10073-10080.
- Perkins, S., Mayfield, J., Fraser, V., Angnent, L., Potentially pathogenic bacteria in shower water and air of a stem cell transplant unit, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2009**, 75, 5363-5372.
- Peskoller, C., Niessner, R., Seidel, M., Development of an epoxy-based monolith used for the affinity capturing of *Escherichia coli* bacteria, *J. Chrom. A*, **2009**, 1216, 3794-3801.
- Podgornik, A., Barut, M., Štrancar, A., Josic, D., Koloini, T., Construction of large-volume monolithic columns, *Anal. Chem.*, **2000**, 72, 5693-5699.

- Qin, T., Tian, Z., Ren, H., Hu, Q., Zhou, H., Lu, J., Luo, C., Liu, Z., Shao, Z., Application of EMA-qPCR as a complementary tool for the detection and monitoring of *Legionella* in different water systems, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **2012**, *28*, 1881-1890.
- Rhame, F. S., Streifel, A., McComb, C., Boyle, M., Bubbling humidifiers produce microaerosols which can carry bacteria, *Infect. Cont.*, **1986**, *7*, 403-407.
- Ristagno, R. L., Saravolatz, L. D., A pseudoepidemic of Legionella infections, *Chest*, **1985**, *88*, 466-467.
- ROBERT KOCH INSTITUT (RKI), Aktuelle Daten und Informationen zu Infektionskrankheiten und Public Health, *Epidemiologisches Bulletin*, **2015**, *13*.
- Robinson J.P., *Encycl. Biomater. Biomed. Eng.*, **2004**, 630-640.
- Roda, A., Guardigli, M., Michelini, E., Mirasoli, M., Pasini, P., Analytical Bioluminescence and Chemiluminescence, *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 462a-470a.
- Rodriguez-Mozaz, S., Lopez de Alda, M. J., Barcelo, D., Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2006**, *386*, 1025-1041.
- Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M. R., Laurent, P., Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches, *J. Microbiol. Methods.*, **2002**, *49*, 31-54.
- Sabria, M., Alvarez, A. J., Dominguez, A., Pedrol, Sauca, G., Salleras, L., Lopez, A., Garcia-Nunez, M. A., Parron, I., Barrufet, M. P., A community outbreak of Legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source, *Clin. Microbiol. Inf.*, **2006**, *12*, 642-647.
- Sack, U., Tárnok, A., Rothe, G., *Angewandte Durchflusszytometrie*, Karger Verlag, Basel, **2007**.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B., Erlich, H. A., directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA Polymerase, *Science*, **1988**, *239*, 487-491.
- Schoen, M. E., Ashbolt, N. J., An in-premise model for *Legionella* exposure during showering events, *Water Res.*, **2011**, *45*, 5826-5836.
- Seidel, M., Niessner, R., Automated analytical microarrays: a critical review, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2008**, *391*, 1521-1546.
- Shapiro, H. M., *Practical flow cytometry*, Wiley Verlag, New York, **1995**.
- Shevchuk, O., Jaeger, J., Steinert, M., Virulence properties of the *Legionella pneumophila* cell envelope, *Front. Microbiol.*, **2011**, *2*, 74.
- Solomon, J. M., Isberg, R. R., Growth of *Legionella pneumophila* in *Dictyostelium discoideum*: a novel system for genetic analysis of host-pathogen interactions, *Trends Microbiol.*, **2000**, *8*, 478-480.
- Stocks, S. M., Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight, *Cytom. Part A*, **2004**, *61A*, 189-195.
- Sturm, R., Bioaerosole – was wir alles einatmen, *Biologie unserer Zeit*, **2011**, *41*, 256-261.

Szkola, A., Linares E. M., Worbs, S., Dorner, B. G., Dietrich, R., Maertlbauer, E., Niessner, R., Seidel, M., Rapid and simultaneous detection of ricin, staphylococcal enterotoxin B and saxitoxin by chemiluminescence-based microarray immunoassay, *Analyst*, **2014**, *139*, 5885-5892.

Nachweis von Legionellen in Trinkwasser und Badebeckenwasser - Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trink- und Badewasserkommission des Umweltbundesamtes, *Bundesgesundheitsbla.*, **2000**, *43*, 911-915.

Uldum, S., Methods for detection of 'pontiac' subgroups of *Legionella pneumophila* serogroup 1, *Google Patents*, **2008**.

Veal, D. A., Deere, D., Ferrari, B., Piper, J., Attfeld, P. V., Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells, *J. Immunol. Meth.*, **2000**, *243*, 191-210.

VERBAND DEUTSCHER INGENIEURE (VDI), Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft - Aktive Probenahme von Bioaerosolen - Abscheidung von luftgetragenen Schimmelpilzen auf Gelatine/Polycarbonat-Filtern, VDI 4252, **2004**, *Blatt 2*.

VERBAND DEUTSCHER INGENIEURE (VDI), Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft - Verfahren zum kulturellen Nachweis der Schimmelpilz-Konzentrationen in der Luft - Indirektes Verfahren nach Probennahme auf Gelatine/Polycarbonat-Filtern, VDI 4253, **2004**, *Blatt 2*.

VERBAND DEUTSCHER INGENIEURE (VDI), Rückkühlwerke – Sicherstellung des hygienegerechten Betriebs von Verdunstungskühlanlagen (VDI-Kühlturmregeln), VDI 2047, **2015**, *Blatt 2, Part 2*.

VERBAND DEUTSCHER INGENIEURE (VDI), Bioaerosole und biologische Agenzien, Umweltmedizinische Bewertung von Bioaerosol-Immissionen, Risikobeurteilung von legionellenhaltigen Aerosolen, VDI 4250, **2015**, *Blatt 2, Part 2*.

Vives-Rego, J., Lebaron, P., Nebe-von C. G., Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology, *FEMS Microbiol. Rev.*, **2000**, *24*, 429-448.

Wadowsky, R. M., Yee, R. B., Mezmar, L., Wing, E. J., Dowling, J., Hot water systems as sources of *Legionella pneumophila* in hospital and non-hospital plumbing fixtures, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1982**, *43*, 1104-1110.

Warren, L., Benoit, R., Jessee, J., Rapid Enumeration of Fecal Coliforms in Water by a Colorimetric β -Galactosidase Assay, *Appl. Environ. Microbiol.*, **1978**, *35*, 136-141.

Watkins, I. D., Tobin, J. O., Dennis, P. J., Brown, W., Newham, R., Kurtz, J. B., *Legionella pneumophila* serogroup 1 subgrouping by monoclonal antibodies-an epidemiological tool, *J. Hyg.*, **1985**, *95*, 211-216.

Weller, M. G., Schuetz, A. J., Winklmair, M., Niessner, R., Highly parallel affinity sensor for the detection of environmental contaminants in water, *Anal. Chim. Acta.*, **1999**, *393*, 29-41.

Wellinghausen, N., Frost, C., Marre, R., Detection of *Legionellae* in hospital water samples by quantitative real-time LightCycler PCR, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2001**, *67*, 3985-3993.

Welsh, J., McClelland, M., Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers, *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *18*, 7213-7218.

- Whiley, H., Taylor, M., Bentham, R., Detection of *Legionella* species in potting mixes using fluorescent in situ hybridization (FISH), *J. Microbiol. Meth.*, **2011**, *86*, 304-309.
- WHO (World Health Organization), *Guidelines for drinking-water quality*, **2011**, *23*, 1-564.
- WHO (World Health Organization), *Enterobacter sakazakii (Cronobacter spp.) in powdered follow-up formulae*, *Microbiological risk assessment series*, **2008**, *15*, 1-86.
- Williams, J. G. K., Kubelik, A. R., Livak, K. J., Rafalski, J. A., Tingerey, S. V., DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers, *Nucleic Acids Res.*, **1990**, *18*, 6531-6535.
- Wilson, D. A., Yen-Liebermann, B., Reischl, U., Gordon, S. M., Procop, G. W., *J. Clin. Microbiol.*, **2003**, *41*, 3327-3330.
- Wolter, A., Niessner, R., Seidel, M., Preparation and characterization of functional poly(ethylene glycol) surfaces for the use of antibody microarrays, *Anal. Chem.*, **2007**, *79*, 4529-4537.
- Wolter, A., Niessner, R., Seidel, M., Preparation and Characterization of Functional Poly(ethylene glycol) Surfaces for the Use of Antibody Microarrays, *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, 5854-5863.
- Wunderlich, A., Torggler, C., Elsässer, D., Lueck, C., Niessner, R., Seidel, M., Rapid quantification method for *Legionella pneumophila* in surface water, *Anal. Bioanal. Chem.*, **2016**, *408*, 2203-2213.
- Xie, S., Allington, R. W., Fréchet, J. M., Svec, F., Porous polymer monoliths: An alternative to classical beads, *Adv. Biochem. Eng. Biot.*, **2002**, *76*, 87-125.
- Yanez, M. A., Carrasco-Serrano, C., Barbera, V. M., Catalan, V., Quantitative detection of *Legionella pneumophila* in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the dotA gene, *Appl. Environ. Microbiol.*, **2005**, *71*, 3433-3441.
- Yang, G., Benson, R., Pelish, T., Brown, E., Winchell, J. M., Fields, B., Dual detection of *Legionella pneumophila* and *Legionella* species by real-time PCR targeting the 23 S - 5 S r - RNA gene spacer region, *Clin. Microbiol. Infec.*, **2010**, *16*, 266-261.
- Yu, F., Yao, D. F., Knoll, W., Surface plasmon field-enhanced spectroscopy studies of the interaction between an antibody and its surface-coupled antigen, *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 2610-2617.
- Zähringer, U., Knirel, Y. A., Lindner, B., Helbig, J. H., Sonesson, A., Marre, R., Rietschel, E. T., The lipopolysaccharide of *Legionella pneumophila* Serogroup 1 (strain Philadelphia 1): chemical structure and biological significance, *Prog. Clin. Biol. Res.*, **1995**, *392*, 113-139.
- Zhu, H., Snyder, M., Protein chip technology, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **2003**, *7*, 55-63.
- Zuvraleff, J. J., Yu, V. L., Shonnard, J. W., Davis, B. K., Rihs, J. D., Diagnosis of Legionnaires' disease - an update of laboratory methods with new emphasis on isolation by culture, *JAMA - J. Am. Med. Assoc.*, **1983**, *250*, 1981-1985.

Abschlussbericht

Niessner, R., Seidel, M., Abschätzung der umweltmedizinischen Relevanz von Verdunstungsrückkühlanlagen: Vergleichende Untersuchungen zum Austrag in die Umgebungsluft; Teilvorhaben: Lehrstuhl für Analytische Chemie und Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, Technische Universität München (IWC-TUM).

Websites

<http://www.alere.com/de/home/product-details/binaxnow-legionella.html>, **2016**.

<http://www.biograd.ru/content/legionella-urinary-antigen-test-eia-%D0%B8%D1%84%D0%B0>, **2016**.

<http://www.biovisible.com/indexleg.php?page=legfisheng>, **2016**.

<http://www.cdc.gov/features/cronobacter/>, **2016**.

<http://www.criver.com/products-services/rapid-micro/endsafe/endotoxin-rapid-testing-systems/endsafe-pts>, **2017**.

<http://www.dupont.com/products-and-services/food-protection/dupont-food-diagnostics/brands/bax/products/bax-assays/bax-product-details/bax-esak-std.html>, **2016**.

<http://web.ethlife.ethz.ch/articles/sciencelife/legionellenhilbi.html>, **2016**.

<http://www.interchim.fr/ft/c/CV3681.pdf>, **2016**.

<http://www.mikrogen.de/deutsch/deutschland/nc/produkte/produktuebersicht/testsystem/legionella-pneumophila-igg.html>, **2016**.

http://www.mpipz.mpg.de/44542/MALDI-TOF-TOF_MS_MS, **2016**.

<https://www.quidel.com/immunoassays/rapid-legionella-tests/sofia-legionella-fia>, **2016**.

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DR0800M>, **2016**.

<http://www.umweltdaten.de/wasser/themen/trinkwasserkommission/internet-legionellenempfehlung.pdf>, **2013**.

<http://www.vermicon.com/de/de/content/10/legionella-quantification.html>, **2016**.

Cell Lab Quanta(TM) - Instructions for Use, Beckman Coulter Company, **2005**.

8. Anhang

Anhang A – Legionella-Messprogramm für MCR 3

Legionellen-Messprogramm	Erläuterungen
Block start	
T 35°C	Beheizen der Flusszelle
V6, Pos 4	Probenweg
V7, pos 4	
V5, pos 6	
Message Probe eingespritzt; confirm	600 µl Probenvolumen
V6, Pos 1	
V4, Pos 1	FZ hinten
V1, Pos 3	
Pump 5, Intake 750µl, 68µl/s	Laufpuffer schiebt nach
V1, Pos 5	
Pump 5, Dispense 150µl, 50µl/s	Totvolumen bis zum Chip
Block start	
Pump 5, Dispense 60µl, 0,5µl/s	Stopp Flow für Probe; 60-µL-Inkrement
Wait 30 seconds	30s Interaktionszeit für Probe mit Fänger-AK
Block end; Loops 10	
Block end	
Block Start	Spülschritt
V2, Pos 2	
Pump 4, Intake 2000 µl, 500 µl/s	Spülpuffer aufziehen
V2, Pos 4	
V5, Pos 4	
Pump 4, Dispense, 2000 µl, 100 µl/s	Spülpuffer abgeben
Block end	
Block Start	
V5, Pos 1	
V4, Pos 1	
Pump 1, Dispense 150 µl; 50 µl/s	Detektions-AK
Block Start	
Pump 1, Dispense 60 µl; 2 µl/s	
Wait 5 seconds	
Block end; Loops 10	
V1, Pos 3	Laufpuffer schiebt nach
Pump 5, Intake, 1000 µl, 68 µl/s	
V1, Pos 6	
V5, Pos 2	

ANHANG

V4, Pos 1	
Pump 5, Dispense 1000µl, 20µl/s	Laufpuffer spült langsam nach
Block end; Loops 2	
Block start	
T 35°C	Flusszelle beheizt
V5, Pos 5	
Pump 0, Dispense 150 µl, 50 µl/s	SA-HRP Totvolumen zum Chip
Pump 0, Dispense 600 µl, 2 µl/s	SA-HRP über Chip; mittelschnell kont.
Block Start	
V2, Pos 2	
Pump 4, Intake 2000 µl, 500 µl/s	Spülpuffer aufziehen
V2, Pos 4	
V5, Pos 4	
Pump 4, Dispense, 2000 µl, 100 µl/s	Spülpuffer abgeben
Block end	
V3, Pos 5	
Pump 3, Intake 100 µl, 200 µl/s	H ₂ O ₂
V3, Pos 6	
Pump 3, Intake 100 µl, 200 µl/s	Luminol
V3, Pos 5	
Pump 3, Intake 100 µl, 200 µl/s	H ₂ O ₂
V3, Pos 6	
Pump 3, Intake 100 µl, 200 µl/s	Luminol
V3, Pos 3	
V5, Pos 3	
Pump 3, Dispense, 400µl, 20 µl/s	Abgabe H ₂ O ₂ /Luminol-Gemisch
Block end	
Block Start	
Camera, Exposure 60s, front channel	Kamera 60s
Buzzer Duration 2000	
Block end	
Block Start	
V2, Pos 2	
Pump 4, Intake 1500 µl; 500 µl/s	Waschpuffer aufziehen
V2, Pos 4	
V5, Pos 4	
Pump 4, Dispense, 1500 µl, 500 µl/s	Waschpuffer abgeben
Block end	
Block Start	
V1, Pos 3	

ANHANG

Pump 5, Intake 1000 µl; 68 µl/s	Laufpuffer aufziehen
V1, Pos 5	
V6, Pos 1	
V7, Pos 4	
V5, Pos 6	
Pump 5, Dispense, 1000 µl, 68 µl/s	Laufpuffer im kompletten System
Block end; loops 3	
Block Start	
Block end	