



TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

Lehrstuhl für Analytische Chemie

Aufkonzentrierung und Detektion viraler und bakterieller Pathogene in Trinkwasser

Andreas Kunze

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

Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

genehmigten Dissertation.

Vorsitzende(r): Univ.-Prof. Dr. Johannes Buchner

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Niessner

2. Priv.-Doz. Dr. Michael Seidel

Die Dissertation wurde am 29.09.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 02.11.2016 angenommen.

Meiner Frau Christine und meiner Familie

Danksagung

Diese Arbeit entstand in der Zeit vom Februar 2013 bis Februar 2016 am Lehrstuhl für Analytische Chemie der TU München unter der Leitung von Herrn Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner. Die Arbeit wurde durch das Projekt „EDIT - Entwicklung und Implementierung eines Anreicherungs- und Detektionssystems für das Inline-Monitoring von wasserbürtigen Pathogenen in Trink- und Rohwasser“ des BMBFs gefördert, dem ich auf diesem Wege für die Unterstützung danken möchte.

Mein Dank gilt Herrn Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner für die Möglichkeit, dieses sehr interessante und vielfältige Projekt durchführen zu können. Darüber hinaus danke ich Ihm besonders für die Bereitstellung der guten Rahmenbedingungen, der Möglichkeit zur Erweiterung der Laborausstattung, sowie der zusätzlichen Förderungen, wie Tagungsbesuche, Forschungsreisen, sowie Vorträge von Gastwissenschaftlern. Dies alles hat maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Besonders bedanken möchte ich mich bei PD Dr. Michael Seidel für seine intensive Betreuung und Unterstützung im Rahmen der Promotion, sowie den vielfältigen Aufgaben im Projekt. Des Weiteren bedanke ich mich für die zahlreichen Anregungen und Diskussionen, die produktive, angenehme Atmosphäre in der Arbeitsgruppe und besonders für den Freiraum zur selbstständigen Arbeit und den zahlreichen Gelegenheiten zur Erweiterung der eigenen Kenntnisse über das Fachliche hinaus.

Dennis Elsässer gehört mein besonderer Dank für die gute Labornachbarschaft und besonders für die gegenseitige Unterstützung bei der Bearbeitung des Projektes EDIT und im Verlauf der gesamten Dissertation. Auch den anderen Projektpartnern möchte ich in diesem Zusammenhang für ihre Unterstützung und interessanten Projekttreffen danken. Mein besonderer Dank gilt hierbei Johannes Otto, Dr. Ahmed Abd El Wahed, Dr. Meik Dilcher und Dr. Gregory Dame.

Susanna Mahler danke ich besonders für die Unterstützung bei den Auftragsmessungen und gemeinsam mit Anika Wunderlich, Klemens Thaler, Elisangela Linares, Alda Gega, Carmen Torggler, Maria Hübner, Anna-Cathrine Neumann, Catharina Kober und allen anderen Mitarbeitern und Doktoranten des Instituts für die immerwährende Unterstützung und eine schöne Zeit.

Roland Hoppe und Sebastian Wieseemann danke ich für ihre Unterstützung und Kreativität beim Umsetzen meiner Ideen in die Realität.

Mein ganz besonderer Dank gilt vor allem meiner Frau Christine und meinen Eltern Mathias und Renate, sowie meiner Schwester Ricarda, ihrem Mann Andreas und besonders meinem Neffen Mirco und meinen Freunden. Ohne euch wäre ich nicht soweit gekommen und ihr erinnert mich immer daran wie wichtig es ist oft und ausgiebig zu lachen.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits veröffentlicht

Kunze, A., Pei, L., Elsässer, D., Niessner, R., Seidel, M., *High Performance Concentration of Viruses in Drinking Water*. Journal of Virological Methods, 2015. 222: p. 132-137.

Kunze, A., Dilcher, M., Abd El Wahed, A., Hufert, F., Niessner, R., Seidel, M., *On-Chip Isothermal Nucleic Acid Amplification on Flow-Based Chemiluminescence Microarray Analysis Platform for the Detection of Viruses and Bacteria*, Analytical Chemistry, 2016. 88: p. 898-905.

Erklärung

Ich erkläre, die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben. Die vorgelegte Arbeit wurde an keiner anderen Hochschule zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht. Von den vorgesehenen Rechtsfolgen in § 25 Abs. 5 wurde Kenntnis genommen.

München, 15. September 2016

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1.	Einleitung: Pathogene im Trinkwasser	1
1.2.	Zielsetzung	2
2.	Theoretische Grundlagen	3
2.1.	Relevante Pathogene für die Trinkwasserhygiene	3
2.1.1.	Bakterien.....	3
2.1.2.	Viren und Bakteriophagen.....	10
2.1.3.	Weitere relevante Bakterien und Viren für die Tinkwasserhygiene	16
2.1.4.	Die Rolle von Biofilmen für die Trinkwasserhygiene.....	17
2.2.	Nachweis von Pathogenen in Trinkwasser: Anreicherungsverfahren.....	19
2.2.1.	Ultrafiltration.....	20
2.2.2.	Adsorptions-/ Elutionsmethoden	24
2.2.3.	Monolithische Aufkonzentrierung	28
2.2.4.	Weitere (v.a. sekundäre) Aufkonzentrierungsverfahren	29
2.3.	Nachweis von Pathogenen in Trinkwasser: Detektionsmethoden.....	31
2.3.1.	Nachweis von Pathogenen mittels (Zell)-Kultur	32
2.3.2.	Molekularbiologischer Nachweis von Pathogenen	36
2.4.	Nachweis von Pathogenen in Trinkwasser: Bewertung der Ergebnisse.....	62
3.	Ergebnisse und Diskussion	68
3.1.	Machbarkeitsstudie: Aufkonzentrierung von Bakteriophage MS 2 in Wasserproben großer Volumina.....	68
3.1.1.	Ultrafiltration.....	69
3.1.2.	3-Stufiger Aufkonzentrierungsprozess	71

3.2.	Nachweis von Pathogenen auf dem Mikroarray-Chipreadersystem MCR 3 mittels On-Chip RPA.....	77
3.2.1.	Aufbau des Assays.....	77
3.2.2.	DNA-Mikroarrays: Oberflächenchemie	80
3.2.3.	DNA-Mikroarrays: Spotten von DNA mittels <i>InkJet</i> -Verfahren	82
3.2.4.	Signaltransduktion: DIG / Anti-DIG-Detektion vs. Biotin / Streptavidin-Detektion	84
3.2.5.	Unspezifische Hintergrundsignale	85
3.2.6.	Optimierung der On-Chip-RPA: Primerverhältnisse	89
3.2.7.	Optimierung der On-Chip-RPA: Statische vs. Dynamische Inkubation.....	91
3.2.8.	Optimierung der On-Chip-RPA: Inkubationstemperatur und Inkubationszeit..	93
3.2.9.	Optimierung der On-Chip-RPA: Quantifizierung.....	95
3.2.10.	Finale Fluidik und finales On-Chip-RPA-Messprogramm	99
3.2.11.	Quantifizierung von Bakteriophage Φ X 174 in Flusswasser	100
3.2.12.	Multiplex-Detektion von Viren und Bakterien mittels On-Chip-RPA.....	102
3.2.13.	Lebend / Tot-Unterscheidung mit PMA.....	109
4.	Zusammenfassung und Ausblick.....	114
5.	Summary and Outlook	121
6.	Experimenteller Teil	127
6.1.	Geräte und Materialien	127
6.1.1.	Chemikalien und Reagenzien	127
6.1.2.	Pufferlösungen und Medien	128
6.1.3.	Kits.....	130
6.1.4.	Referenzstämme	131
6.1.5.	Geräte und Verbrauchsmaterial	131
6.1.6.	Software	133
6.2.	Molekularbiologische Techniken.....	133

6.2.1.	Bakterienkultur und Konzentrationsbestimmung.....	133
6.2.2.	Bakteriophagenkultur mittels Plaque-Assay	135
6.2.3.	Nukleinsäureextraktion	137
6.2.4.	cDNA-Synthese mit DyNAmo cDNA Synthesis Kit von Thermo Fischer Scientific..	138
6.2.5.	Quantitative real-time PCR (qPCR) mit LightCycler® 480 SYBR Green® I von Roche	139
6.2.6.	On-Chip-Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA).....	140
6.3.	Aufkonzentrierung von Viren und Mikroorganismen in großen Wasservolumina .	143
6.3.1.	Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration	143
6.3.2.	Aufkonzentrierung mittels monolithischer Adsorptionsfiltration (MAF).....	146
6.3.3.	Zentrifugale Ultrafiltration (CeUF)	148
6.4.	Munich Chip-Reader 3 (MCR 3)	148
6.4.1.	Mikroarray-Herstellung	148
6.4.2.	On-Chip-RPA-Messung am MCR 3.....	155
6.4.3.	Auswertung einer On-Chip-RPA-Messung	157
6.5.	Statistische Angaben und Auswertung.....	158
7.	Abkürzungsverzeichnis	159
8.	Anhang.....	162
i.	Technische Zeichnungen.....	162
	Hydrobox (Technische Zeichnung von R. Hoppe)	162
	MCR 3 – Fluidikplan	163
ii.	Programm für das Spotten von DNA-Oligonukleotiden mit dem sciFLEXARRAYER S1	164
9.	Literaturverzeichnis	165

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1. Einleitung: Pathogene im Trinkwasser

Trotz der heutzutage sehr gut ausgebauten und modernen Trinkwasserversorgungssysteme, kommt es auch in den Industrienationen regelmäßig zu großflächigen Krankheitsausbrüchen durch viral oder bakteriell verunreinigtes Trinkwasser [1, 2]. So kam es beispielsweise in den USA in den Jahren 1997 bis 2006 zu insgesamt 833 Krankheitsausbrüchen, deren Ursache in mikrobiell verunreinigtem Trinkwasser zu suchen war [3]. Allein im Verlauf des Jahres 1999 kam es durch bakteriell verunreinigtes Trinkwasser zu 39 Krankheitsausbrüchen in 25 Staaten, bei denen teilweise bis zu 2000 Menschen betroffen waren [1]. Auch nach Verbesserung der Infrastruktur und den Meldesystemen blieb die Zahl der gemeldeten Ausbrüche im Jahr 2011 in 14 Staaten bei 32 Ausbrüchen [4]. Weltweit steigt die Sensibilität für die Relevanz der Versorgung mit sicherem Trinkwasser. Die Vereinbarung der Millenniums-Entwicklungsziele durch die Vereinten Nationen sieht den Zugang zu sicherem Trinkwasser als wesentlichen Bestandteil für die Sicherung der Lebensgrundlage an [5, 6].

Der Eintrag von Krankheitserregern in trinkwasserführende Systeme kann über viele Verbreitungswege, wie beispielsweise eine unzureichende Abwasseraufbereitung geschehen [7, 8]. Eine weitere Quelle sind fäkale Einträge aus der Landwirtschaft in Oberflächenwässer [9, 10] oder Grundwässer [11], die für die Herstellung von Trinkwasser verwendet werden. Auch beim direkten Kontakt zu verunreinigten Oberflächenwässern (wie z.B. Badegewässer) besteht ein erhöhtes Gesundheitsrisiko [12]. Neben natürlichen und zufälligen Gefährdungen der Trinkwasserhygiene, spielen auch Sicherheitserwägungen [13] (Stichwort: „Bioterrorismus“) sowie die Folgen des Klimawandels [14, 15] und demographische Entwicklungen [16, 17] (insbesondere regionaler Bevölkerungsrückgang) eine Rolle. So kam es beispielsweise nach der Überflutung der Stadt Halle (Saale) im August 2013 zu einem deutlichen Anstieg der Krankheitsfälle durch Infektion mit dem Parasiten *Cryptosporidium hominis* [18]. Dieser war in der Lage auch nach dem Austrocknen der überfluteten Gebiete lange Zeit zu überleben und infizierte die sich in diesen Gebieten aufhaltenden Personen (v. a. Kinder) [18]. Da im Zuge des Klimawandels mit der Zunahme solcher

Extremwetterereignisse (z.B. Dürren, Starkregenfälle) zu rechnen ist, wird eine Beeinträchtigung der Trinkwasserhygiene als wahrscheinlich angesehen [14, 19, 20]. Des Weiteren könnte die Erhöhung der weltweiten Durchschnittstemperatur das Wachstum Trinkwasser-relevanter Pathogene begünstigen [21-24]. Um diesen Herausforderungen zu begegnen, wird eine Ausweitung der Hygieneüberwachung für Trinkwasser aus Sicht der Verbraucher, aber auch der Produzenten als sinnvoll und notwendig erachtet [5, 25] und ist derzeit Gegenstand vieler Forschungsprojekte in Deutschland [13, 25-29].

1.2. Zielsetzung

Am Lehrstuhl für Analytische Chemie & Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie (IWC) der Technischen Universität München befassten sich bereits mehrere Forschungsarbeiten mit der Entwicklung von Komponenten für den Aufbau eines Überwachungssystems für die Trinkwasserhygiene. Dabei stand die Aufkonzentrierung von Pathogenen in verschiedenen Matrices (selektiv und unselektiv) ebenso im Fokus [30-32], wie die Chemilumineszenz-DNA-Mikroarray-basierte Multipathogen-Detektion auf der Mikroarray-Analysenplattform MCR 3 [33, 34]. Im Rahmen dieser Forschungsarbeit sollten die von MARTIN RIEGER (2011) und LU PEI (2015) entwickelten Aufkonzentrierungsmethoden zusammengeführt und für Trinkwasserproben mit einem Volumen größer als 1000 L angewendet werden [31, 32]. Darüber hinaus sollte die Genom-basierte Multipathogen-Detektion auf dem MCR 3 weiter entwickelt werden. Durch Verwendung einer isothermen Amplifikationsmethode sollte die bisher separat ablaufende Nukleinsäure-Amplifikation integriert und somit der Automatisierungsgrad der Detektion erhöht werden. Schließlich sollten Multipathogen-Aufkonzentrierung und -Detektion kombiniert und somit die Anwendbarkeit der Methoden für ein Hygiene-Monitoring gezeigt werden.

2. Theoretische Grundlagen

2.1. Relevante Pathogene für die Trinkwasserhygiene

Im Rahmen dieser Arbeit wurden wasserrelevante Bakterien, Viren und Bakteriophagen untersucht. Darüber hinaus stellen auch Protozoen wie *Giardia lamblia* oder *Cryptosporidium parvum* eine Gesundheitsgefahr in Trinkwasser oder Badegewässern dar [13], welche in dieser Arbeit jedoch nicht berücksichtigt wurden.

2.1.1. Bakterien

Die deutsche Trinkwasserverordnung schreibt die Überwachung der Trinkwasserhygiene durch regelmäßige Überprüfung sog. Indikatorkeime/Indikatorparameter vor (siehe Tabelle 1) [35].

Tabelle 1: Bakterielle Indikatororganismen für die Trinkwasserhygiene gemäß deutscher Trinkwasserverordnung (TrinkwV 2001)

Bakterium	Grenzwert	Anmerkung/Referenz
Coliforme Bakterien	0 / 100 mL	TrinkwV 2001
<i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>)	0 / 100 mL	TrinkwV 2001
<i>Enterokokken</i>	0 / 100 mL	TrinkwV 2001
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	0 / 250 mL	TrinkwV 2001 (Abfüllung in geschlossene Behältnisse)
<i>Legionella spec.</i>	100 / 100 mL	(Technischer Maßnahmenwert, Anlagen der Trinkwasser-Installation)
<i>Clostridium perfringens</i> (inkl. Sporen)		TrinkwV 2001 (Kontakt mit Oberflächenwasser)

Das Spektrum der potentiell durch Wasser übertragbaren Krankheitserreger geht weit über die in der Tabelle genannten Mikroorganismen hinaus und umfasst derzeit insgesamt 28

Pathogene, sowie 18 weitere Organismen für die eine Übertragung durch Trinkwasser in Frage kommen [25]. Auf Grund unterschiedlicher Verbreitungsgebiete, sowie ihrer klinischen und epidemiologischen Eigenschaften sind jedoch nicht alle Pathogene für Deutschland relevant [25, 35]. Die laut Trinkwasserverordnung für das Hygiene-Monitoring in Deutschland relevanten Bakterien, werden in Folgendem näher beschrieben.

Coliforme Bakterien

Die Gruppe der Coliforme besteht aus Bakterien mit bestimmten biochemischen Charakteristika und Wachstumseigenschaften [36-38]:

1. Alle aeroben und fakultativ anaeroben, gramnegativen, nicht sporenbildende, Stäbchen-förmige Bakterien die Laktase (in 48 h, bei 35 °C) fermentieren können.
2. Alle aeroben und viele fakultativ anaeroben, gramnegativen, nicht sporenbildende, Stäbchen-förmige Bakterien die auf einem Endo-Typ-Medium mit Laktase in 24 h, bei 35 °C eine rote Kolonie mit metallischem Glanz entwickeln.

Es handelt sich hierbei nicht um eine taxonomische Einteilung, sondern um eine technische, aus Hygiene-relevanten Bakterien zusammengetragene Indikatorliste [39]. Die Zusammenstellung dieser Liste unterscheidet sich von Land zu Land. Beispielsweise wird die obig gegebene Definition der biochemischen Eigenschaften in den USA und Kanada verwendet. Die französische Standardisierungsbehörde AFNOR erweiterte die Gruppe der Coliforme und schloss Hitze-tolerante Coliforme zusätzlich mit ein [40]. Coliforme werden als Indikatorparameter betrachtet, da sie Bakterien aus dem Verdauungstrakt von Vertebraten (Mensch und Tier), sowie Bodenkeime umfassen [39]. Die Gruppe beinhaltet alle Arten der *Enterobacteriaceae* Familie, sowie weitere fäkale Bakterien. Die Hauptvertreter sind die Gattungen *Escherichia*, *Enterobacter*, *Citrobacter*, *Klebsiella* und *Salmonella* [39]. Während die *Enterobacteria* als Indikatoren für den Eintrag vertebrater Fäkalien dienen, kann die Anwesenheit des Bodenkeims *Citrobacter* den Eintrag von Düngemitteln von Landwirtschaftlichen Nutzflächen anzeigen [41].

Escherichia coli (E. coli)

Bei *E. coli* handelt es sich um den prominentesten Vertreter der Coliforme aus der gramnegativen Familie der *Enterobacteriaceae* [42]. Es ist eine der häufigsten Spezies im Verdauungstrakt warmblütiger Tiere und gilt bei menschlichen Neugeborenen oft als

Erstbesiedler des Darmes [43]. Auf Grund dieser Lebensweise, wird der Nachweis von *E. coli* in Trinkwasser mit einer fäkalen Verunreinigung korreliert [26, 44]. Morphologisch sind *E. coli* gerade, abgerundete Stäbchen mit einer Länge von 1 bis 4 μm , die üblicherweise einzeln oder als Paare vorliegen. Die gramnegative Zellwand ist üblicherweise aus drei Schichten aufgebaut und beinhaltet Flagellen, die der Fortbewegung des Bakteriums dienen [45]. Das Genom dieser prokaryotischen Art ist sowohl in chromosomaler DNA, als auch in extrachromosomalen Plasmiden kodiert. Plasmide sind ringförmige, sich autonom replizierende doppelsträngige (ds) DNA-Moleküle, welche zusätzliche Gene kodieren und zwischen Bakterien übertragen werden können [42]. Dieser Mechanismus, der sog. horizontale Gentransfer, ermöglicht den Bakterien die Erweiterung ihrer genetischen Diversität und trägt beispielsweise zur Ausbildung von Antibiotikaresistenzen oder Pathogenitätsfaktoren in erheblichem Maße bei (siehe Abbildung 1) [46, 47].

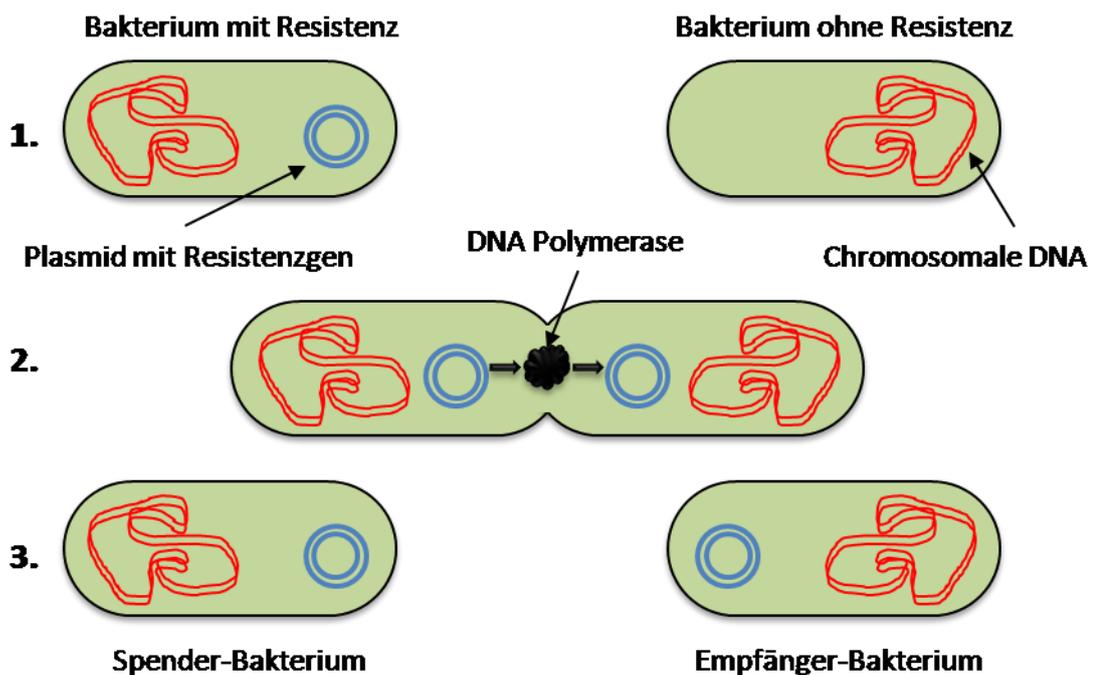


Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung des horizontalen Gentransfers zwischen zwei Bakterien. Abbildung frei nach PURVES ET AL. (2006) [42].

Auf Grund der Manipulierbarkeit des Genoms findet *E. coli* in vielen Bereichen der Biotechnologie Anwendung und die Mehrzahl der Stämme wird als nicht pathogen eingestuft [43]. Des Weiteren gelten bestimmte *E. coli*-Stämme (z.B. *E. coli* Nissle 1917 (Mutaflor)) sogar als probiotisch [48]. Andererseits gibt es aber auch pathogene *E. coli*-Stämme, welche für drei klinische Syndrome verantwortlich sein können [43]: Darm- und

Durchfallerkrankungen, Harnwegsinfektionen und Sepsis/Meningitis. Im Zusammenhang mit Darmerkrankungen wurden von KAPER ET AL. (2004) und NATARO ET AL. (1998) sechs pathogene *E. coli*-Stämme, sowie deren pathogene Mechanismen eingehend beschrieben [43, 49]: EPEC (enteropathogenic *E. coli*), EHEC (enterohemorrhagic *E. coli*), ETEC (enterotoxigenic *E. coli*), EAEC (enteroaggregative *E. coli*), EIEC (enteroinvasive *E. coli*) und DAEC (diffusely adherent *E. coli*). Die Gefahr, die von mit pathogenen *E. coli* kontaminierten Lebensmitteln ausgeht, zeigte sich während eines Ausbruchs in Deutschland im August 2011. Hier waren mit dem *E. coli*-Stamm O104:H4 (EHEC) verunreinigte Sprossen für 833 Fälle des hämolytisch urämisches Syndroms, sowie einer blutigen Durchfallerkrankung verantwortlich, deren Verlauf in 39 Fällen sogar tödlich endete [50, 51].

Enterokokken

Enterokokken kommen ubiquitär in der Umwelt, sowie in Tier und Mensch vor [52]. Darüber hinaus sind sie in vielen tierischen Produkten/ Lebensmitteln (z.B. Käse, Milch), sowie im menschlichen Nasen-Rachen-Raum zu finden [53]. Es handelt sich um grampositive, fakultativ anaerobe, kugelförmige (kokkoide) Bakterien, welche in Paaren oder kurzen Ketten vorkommen [52]. Die taxonomische Abgrenzung der Gattung *Enterococcus* von der Gattung *Streptococcus* wurde erst im Jahr 1995 vorgenommen [52]. Bei Menschen und Tieren sind vor allem die Arten *E. faecalis* und *E. faecium* von wichtiger Bedeutung im Verdauungssystem [52], weswegen einige Stämme (z.B. *E. faecalis* Symbioflor 1) als probiotische Nahrungsergänzungsmittel eingesetzt werden [54]. Neben diesen positiven Eigenschaften sind aber auch einige pathogene Stämme bekannt. So sind beispielsweise Erkrankungen auf Grund einer Infektion mit Enterokokken zu 90 % auf die Art *E. faecalis* zurückzuführen [55]. Auf Grund ihrer natürlichen Resistenz gegenüber verschiedenen Antibiotika (Glykopeptide, Aminoglykoside) wie Vancomycin spielen sie vor allem als sog. „Krankenhauskeime“ eine wichtige Rolle [56-59]. Insbesondere immuninsuffiziente Patienten können durch eine Enterokokken-Infektion an Harnwegsinfektionen bis hin zur Sepsis erkranken. Man spricht in diesem Zusammenhang von der „Enterokokkenlücke“ von Antibiotika [55]. Da die Resistenzgene auf Plasmiden kodiert sind, ermöglicht der obig beschriebene Mechanismus des horizontalen Gentransfers einen Austausch der Gene in besonderem Maße, sodass diese Gene auch an Populationen außerhalb von Krankenhäusern übertragen werden können [56].

Pseudomonas aeruginosa

Pseudomonas aeruginosa sind ubiquitär in der Umwelt (v.a. in feuchten Habitaten) vorkommende, gramnegative, nicht sporenbildende, begeißelte Stäbchenbakterien mit einer Länge von 1 bis 3 µm [55]. Darüber hinaus sind sie in Tier, Mensch und Pflanze ebenso wie in Salz- und Süßwasser verbreitet [55, 60]. Ihr Stoffwechsel ist aerob, kann aber in Gegenwart von Nitrat auch anaerob stattfinden [55]. Es wird vermutet, dass die hohe Verbreitung und Anpassungsfähigkeit („Umwelttoleranz“) von *Pseudomonas aeruginosa* mit der Größe des Genoms von 6,5 bis 6,7 Mbp im Zusammenhang steht [55, 61]. Als Krankheitserreger stellt er vor allem für immuninsuffiziente Menschen eine Gefahr dar. Unter anderem führt er zu Lungenentzündungen, Harnwegsinfektionen und Wund- bzw. Brandwundinfektionen. Besonders kritisch ist die Gefahr einer Sepsis, da die Mortalität hierbei sehr hoch ist [55]. Auf Grund ihrer hohen Umwelttoleranz, sowie einer hohen Antibiotikaresistenz, die sich sogar während der Therapie entwickeln kann, gilt *Pseudomonas aeruginosa* ebenfalls als sog. „Krankenhauskeim“. Da er sich sogar in destillierten Wässern [60, 62] und manchen Desinfektionsmitteln [55] vermehren kann, stellt er besonders für Intensiv-Stationen und chirurgische Abteilungen eine Gefahr dar. Die Verbreitung erfolgt unter anderem über Beatmungsgeräte oder in vielen Fällen über Leitungswasser (bzw. Waschbecken) [55]. So kam es beispielsweise in einer pädiatrisch chirurgischen Einheit und einer Intensiv-Station in Frankreich in den Jahren 1994 und 1995/1996 zu Infektionen mit multiresistenten *Pseudomonas aeruginosa* [63, 64]. In beiden Fällen konnte verunreinigtes Leitungswasser als Ursache eindeutig identifiziert werden.

Trotz des hohen Gefährdungspotentials wird eine gezielte Entfernung (z.B. durch Desinfektion) dieses ubiquitären Erregers aus Trinkwasser in der Literatur auch kritisch betrachtet [65]. Es wird argumentiert, dass die Desinfektion besonders resistente Spezies oder infektiöse Nebenprodukte hervorbringen könnte und dass eine Reinfektion mit *Pseudomonas aeruginosa* nach der Desinfektion dennoch sehr wahrscheinlich ist [65]. Eine gezielte Desinfektion könnte sich daher sogar eher negativ auswirken [65].

Legionella spec.

Legionella sind gramnegative, aerobe, nicht sporenbildende, begeißelte Stäbchenbakterien [55]. Sie sind ubiquitär in der Umwelt (v.a. in Frischwasserhabitaten oder Böden) verbreitet [66] und meist mit autotrophen Mikroorganismen (Eisen-Mangan-Bakterien) oder freilebenden Protozoen (*Acanthamoeba*, *Naegleria*-Algen) vergesellschaftet [45, 55]. Der

bekannteste Vertreter der Legionellen ist *Legionella pneumophila*, welcher als Verursacher für ca. 95 % aller Legionellosen (Legionärskrankheit) gilt [67, 68]. Die Legionärskrankheit geht meist mit einer schweren Pneumonie (Lungenentzündung) einher, von wo aus sich die Legionellen in weiteren inneren Organen ausbreiten können (z.B. Herz, Leber, Darm etc.) [45, 55]. Besondere Gefährdung besteht vor allem für immunsuffiziente Patienten über 50 Jahre, sowie Raucher und Alkoholiker. Der Verlauf einer Legionellose kann in schweren Fällen bis zum Tod führen [55, 69]. Die Ausbrüche von Legionellosen treten sowohl sporadisch als auch epidemisch auf. So wird beispielsweise geschätzt, dass 15 % aller Pneumonien in den USA auf eine Legionellen-Infektion zurückzuführen ist [55]. In Deutschland werden vom Robert-Koch Institut jährlich zwischen 15 000 und 30 000 ambulant erworbene Fälle der Legionärskrankheit berichtet [66]. Eine weitere durch Legionellen verursachte Krankheit ist das Pontiac-Fieber [55].

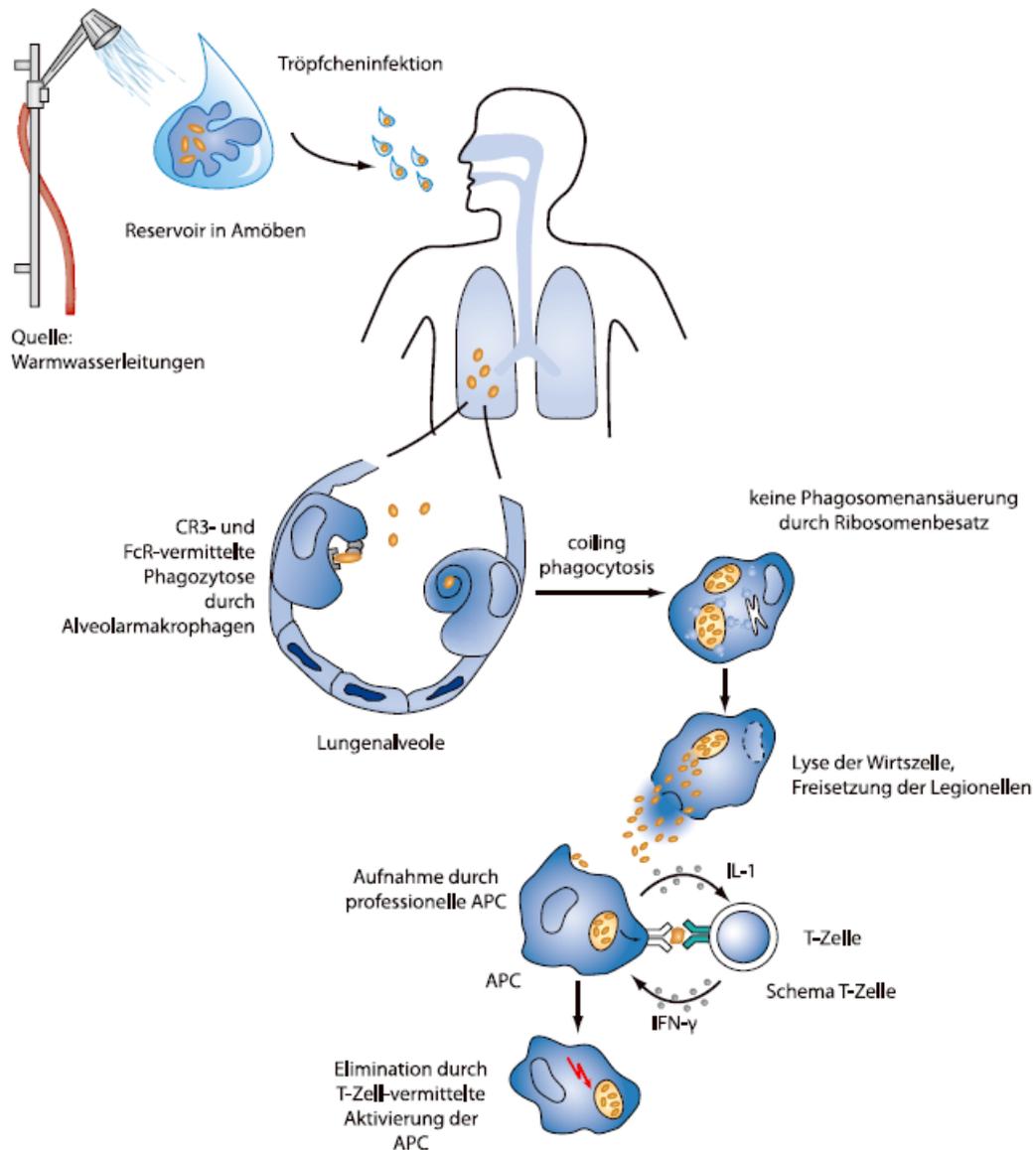


Abbildung 2: Pathogenese der Legionellenpneumonie [55].

Die Übertragung von pathogenen Legionellen geschieht aerogen durch Einatmen kontaminierter Aerosole aus Duschen, Luftbefeuchtern oder Verdunstungskühlanlagen [66, 68] (siehe Abbildung 2). Dabei geht für den Menschen besonders von großen Leitungssystemen für die Warmwasserverteilung (z.B. Duschen, Whirlpools etc.) eine besondere Gefährdung aus, da die hier meist herrschenden Temperaturen von 25 bis 45 °C ideale Wachstumsbedingungen für Legionellen bieten [70].

2.1.2. Viren und Bakteriophagen

In der deutschen Trinkwasserverordnung werden coliforme Bakterien und insbesondere *E. coli* als Indikatororganismen für die Trinkwasserhygiene angesehen [35]. Insbesondere gelten sie als Indikatoren für eine fäkale Verunreinigung trinkwasserführender Systeme und werden auch für die Überprüfung der Effizienz von Desinfektions- oder Filtrationssystemen verwendet. Es gibt daher in der deutschen Trinkwasserverordnung bislang keine Grenzwerte für wasserbürtige Viren oder Bakteriophagen. Von wissenschaftlicher, wie von institutioneller Seite (WHO) wird jedoch zunehmend angezweifelt, dass die Abwesenheit von Indikator-Bakterien wie *E. coli* zwingend mit der Abwesenheit anderer Kontaminanten viraler, oder protozoer Natur korreliert werden kann [7, 25, 71]. Zum Einen besitzen sie gegenüber Bakterien vollkommen unterschiedliche Eigenschaften (Größe, Form, Pathogenität, Epidemiologie, Genom) [72], sind wesentlich robuster gegenüber Desinfektionsmethoden [73] und können im Wasser lange Zeit persistieren [74, 75]. Zum Anderen ist das Risiko einer viralen Erkrankung durch Konsum kontaminierten Trinkwassers, 10- bis 10 000-fach höher als das Risiko einer bakteriellen Erkrankung [76], da wenige Virenpartikel ausreichen, um eine Krankheit zu induzieren [77, 78]. Von den über 100 bekannten Virenspezies, die im Abwasser gefunden werden können [7], geht für den Menschen von den enteralen Viren eine besonderes Gesundheitsgefahr aus. Dies liegt begründet in ihrem hohen Verbreitungspotential durch fäkal-verunreinigtes Trinkwasser und durch die Ausbreitung von Mensch zu Mensch (fäkal oral) nach der Infektion [53, 55, 79]. Zu den häufigsten von enteralen Viren verursachten Krankheiten gehören virale Gastroenteritis, Diarrhoe, Meningitis sowie Hepatitis [53, 55], welche in vielen Entwicklungsländern (z.B in den Tropen) noch heute die Hauptursache der hohen Säuglings- und Kleinkindersterblichkeit darstellen [5, 55]. Ein Überblick der relevanten, wasserbürtigen, pathogenen Viren ist in Tabelle 2 dargestellt und basiert auf Dokumenten der WHO [25]. Von der Vielzahl der durch Wasser übertragbaren Viren werden in diesem Kapitel exemplarisch die (auch in den Industrieländern) häufigsten Erreger z.T. großflächiger Ausbrüche eingehender dargestellt.

Neben viralen Pathogenen werden zwei beispielhafte Bakteriophagen in der Tabelle genannt, da diese vielerseits als alternative Indikatoren für die fäkale Kontamination von Trinkwasser und damit einer möglichen viralen Kontamination diskutiert werden [80].

Tabelle 2: Relevante, durch Wasser übertragbare virale Pathogene und Indikatoren.

Art	Taxonomie	Gesundheitsrisiko gemäß WHO [25]
Humanes Rotavirus	Familie: <i>Reoviridae</i> Gattung: <i>Rotavirus</i>	Hoch
Humanes Norovirus*	Familie: <i>Caliciviridae</i> Gattung: <i>Norovirus</i>	Hoch
Humanes Sapovirus	Familie: <i>Caliciviridae</i> Gattung: <i>Sapovirus</i>	Hoch
Coxsackie-Virus* ECHO-Virus* Humanes Enterovirus*	Familie: <i>Picornaviridae</i> Gattung: <i>Enterovirus</i>	Hoch
Hepatitis-A-Virus Hepatitis-E-Virus	Familie: <i>Picornaviridae</i> Gattung: <i>Hepatovirus</i>	Hoch
Humanes Adenovirus*	Familie: <i>Adenoviridae</i> Gattung: <i>Mastadenovirus</i>	Mäßig
Humanes Astrovirus	Familie: <i>Astroviridae</i> Gattung: <i>Mamastrovirus</i>	Mäßig
Bakteriophage MS 2*	Familie: <i>Leviviridae</i> Gattung: <i>Levivirus</i>	Indikator für virale Abwasserunreinigungen [80]
Bakteriophage Φ X 174*	Familie: <i>Microviridae</i> Gattung: <i>Microvirus</i>	Indikator für virale Abwasserunreinigungen [80]

*Auf Grund ihrer Relevanz für die Trinkwasser-Hygiene in Europa wurden die markierten Viren/Bakteriophagen näher beschrieben

Humanes Norovirus

Das humane Norovirus, wie auch das Sapovirus, sind die humanpathogenen Gattungen der Virus-Familie *Caliciviridae*. Sie besitzen sphärisch ikosaedrische Kapside ohne Hülle mit Kelch-förmigen Eindellungen und einer Größe von 27 bis 34 nm. Ihr Genom ist in einem (+)-*single strand* (ss)-RNA-Strang mit einer Länge von ~ 7,7 kb kodiert [55, 72]. Das Norovirus gilt als wichtigster Erreger viraler Gastroenteritis-Erkrankungen beim Menschen, welche meist mit Diarrhoe, sowie Fieber und Magen- Darmkrämpfen einhergeht [55]. Er ist weltweit verbreitet und umweltstabil. Da Noroviren im Stuhl erkrankter Personen in großen Mengen

ausgeschieden werden, kommt es durch Schmierinfektionen (fäkal oral) häufig zu Lokalepidemien in Familien, Heimen oder Schulen [55]. Eine weitere Quelle sind fäkal kontaminierte Lebensmittel wie Salat, Meeresfrüchte und Wasser. Regelmäßige Ausbrüche treten auch in Ländern mit hoher Trinkwasserqualität (Europa, USA) auf. Beispielsweise untersuchten MANNULA ET AL. (2005) insgesamt 41 Ausbrüche in Finnland im Zeitraum von 1998 bis 2003 [81]. In 18 Fällen wurden Noroviren mittels RT-PCR in Patientenproben nachgewiesen und somit als Auslöser identifiziert. In 10 Fällen standen zudem Wasserproben aus den entsprechenden Zeiträumen und Regionen zur Verfügung. Bis auf einen Fall, konnten in allen Wasser- und Patientenproben die gleichen Noroviren nachgewiesen werden, wodurch die Ausbreitung der Noroviren durch kontaminiertes Trinkwasser bestätigt wurde [81]. In weiteren Beispielen aus Schweden, Finnland und dem Vereinigten Königreich konnte ebenfalls ein eindeutiger Zusammenhang zwischen epidemischen Noroviren-induzierten Ausbrüchen und kontaminiertem Trinkwasser hergestellt werden [82-84]. Auch in den USA treten jährlich etwa 25 Millionen Noroviren-Infektionen auf [72]. Auf Grund ihrer hohen Umweltstabilität wird die Ausbreitung von neuen Varianten des Norovirus durch die Globalisierung besonders begünstigt und führte in der Vergangenheit schnell zu europaweiten Anstiegen viraler Gastroenteritis-Erkrankungen [84, 85]. Ein weiteres Gefahrenpotential ergibt sich aus dem zunehmend diskutierten und beobachteten zoonotischen Potentials von (Schweine und Rinder-)Noroviren und -Sapoviren auf den Menschen. In mehreren Studien konnten in Schweinen Antikörper gegen humane Noroviren und umgedreht nachgewiesen werden [86]. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass humane Noroviren sich in Schweinen vermehren können [87]. Daher wird die Rolle von Schweinen als Reservoir für humane Noroviren in zunehmendem Maße diskutiert [86-88].

Enterovirus

Enteroviren stellen eine Gattung der *Picornaviridae* dar. Zu ihren humanpathogenen Vertretern gehören vor allem die Arten: Poliovirus, Coxsackie-Virus (v.a. A, B), ECHO-Virus und Enterovirus (v.a. 70, 71). Wie der Name vermuten lässt, handelt sich bei den *Picornaviridae* um kleine (Durchmesser: 20 bis 30 nm), sphärisch ikosaedrische Viren, deren Genom in einem (+)-ss-RNA-Strang kodiert ist [53, 55]. Sie sind empfindlich gegenüber Austrocknen und mäßigem Erhitzen (~50 °C), jedoch säure- und ätherresistent und persistieren lange Zeit in Abwasser [55]. Alle Enteroviren kommen zwar nur beim Menschen vor, aber da sie vor allem durch Schmierinfektion (fäkal oral) und Tröpfcheninfektion

übertragen werden, besitzen sie ein hohes Verbreitungspotential [55].

Das Poliovirus ist der prominenteste Vertreter der Enteroviren und der Erreger der sog. spinalen Kinderlähmung (Poliomyelitis). Neben der direkten Übertragung zwischen Individuen, erfolgt seine Ausbreitung durch Ausscheidung in Abwässer oder auch Freibäder und Oberflächenwässer [55]. Durch große, weltweite Impfkampagnen gelang es in den 1950er-Jahren (1955 bis 1960), die Infektionsrate weltweit von 13,9 Fällen pro 100 000 Einwohner auf 0,5 Fälle zu senken. Nach Einführung der Sabin-Schluckimpfung konnte diese Zahl bis zum Jahr 2005 auf 1951 Erkrankungsfälle weltweit gesenkt werden. Seit dem Jahr 2006 gilt das Virus in weiten Teilen der Welt als ausgerottet und ist lediglich in vier Staaten endemisch [55].

Coxsackie-Virus (v.a. A, B), ECHO-Virus und Enterovirus (v.a. 70, 71) sind typische Erreger der sog. „Sommergrippe“, welche in Europa vor allem im Frühjahr und Sommer vermehrt auftritt [53]. Darüber hinaus können sie Krankheiten wie Meningitis, Diabetes mellitus oder auch die Hand-Fuß-Mund-Krankheit (Exanthema) auslösen. Ihre weltweite Verbreitung geschieht wie beim Poliovirus hauptsächlich durch Schmier- (fäkal oral) und Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch [55]. Besonders nennenswert in dieser Viren-Gruppe sind ECHO-Viren, da diese zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung im Jahre 1951 noch keine Krankheitssymptome verursachten und Infektionen auch heute teilweise symptomlos verlaufen [53]. Es wird davon ausgegangen, dass ca. 7 % der Bevölkerung der USA regelmäßig und unbemerkt ECHO-Viren ausscheiden [72]. Da sich zwischenzeitlich ein Krankheitsbild für eine ECHO-Viren-Infektion entwickelt hat (v.a. Meningitis), sind sie ein hervorragendes Beispiel für die zeitliche Veränderung der Pathogenitätsprofile von mikrobiellen Trinkwasserkontaminanten und die Notwendigkeit der regelmäßigen Überprüfung von Risikoabschätzungen und Überwachungskriterien.

Im Bezug auf die größere Resistenz viraler Trinkwasserkontaminanten gegenüber etablierten Desinfektionsmethoden dienen Enteroviren ebenfalls als hervorragendes Beispiel. So berichteten mehrere Studien den Nachweis von Polioviren und anderen Viren in chlorierten Trinkwasserproben, obwohl die üblichen mikrobiellen Indikatoren einen negativen Befund lieferten [71, 89]. Payment et al. gingen noch einen Schritt weiter und untersuchten in einer epidemiologischen Studie den Zusammenhang zwischen der Art des konsumierten Wassers und der Häufigkeit gastrointestinaler Erkrankungen [90]. Insgesamt 1400 Familien im Bereich der gleichen Trinkwasseraufbereitungsanlage in Nordamerika nahmen über einen Zeitraum

von 16 Monaten an der Studie teil. Sie wurden in vier Gruppen eingeteilt und konsumierten verschiedene Wässer: Leitungswasser, Leitungswasser aus einem ständig laufenden Hahn, abgefülltes Leitungswasser, sowie nochmals (durch Umkehrosmose etc.) speziell gereinigtes Leitungswasser (Kontrollgruppe). Alle verwendeten Wässer enthielten dabei die zum Zeitpunkt der Studie erlaubten Mengen an Chlor, bzw. enthielten keine coliforme Bakterien. Ein Vergleich der gastrointestinalen Erkrankungen der Konsumenten aller Wässer war gegenüber der Kontrollgruppe um 14 bis 19 % erhöht. Bei Kindern von 2 bis 5 Jahren wurde sogar ein Anstieg um bis zu 40 % registriert. Als Hauptursache wurde neben der Trinkwasseraufbereitung auch eine mögliche Reinfektion des Trinkwassers im Verteilungsnetz identifiziert [90].

Humanes Adenovirus

Das humane Adenovirus gehört gemeinsam mit den Adenoviren für andere Säugetiere zur Gattung der *Mastadenoviren* und umfasst aktuell insgesamt 52 Typen in den sechs Serogruppen (A bis F) [72]. Die umwelt- und ätherstabilen Viren haben einen Durchmesser von 70 bis 110 nm und besitzen eine sphärisch ikosaedrische Gestalt aus 252 Kapsomeren ohne Hülle. Das Genom ist in einem linearen dsDNA-Strang mit einer Länge von 36 bis 38 kp kodiert [53, 72]. Humane Adenoviren werden unter anderem mit Erkältungskrankheiten, Erkrankungen der Atemwege oder Bindehaut, Meningitis, sowie Gastroenteritis in Verbindung gebracht [55]. Darüber hinaus sind sie immunmodulatorisch aktiv, was bedeutet, dass sie mehrjährig im Körper persistieren und durch Immundefekte reaktiviert werden können. Hiermit stellen sie besonders für HIV- oder Krebspatienten eine Gefahr dar [55]. Bei Nagetieren wurde überdies erstmalig eine Viren-induzierte Tumorbildung beobachtet [72]. Die Übertragung von Adenoviren findet mittels Schmier- (fäkal oral) oder Tröpfcheninfektion statt. Augenkrankheiten werden durch die Typen 3, 7, 8, 11, 19 und 37 verursacht und häufig durch unvollständige Sterilisation von Untersuchungsgeräten übertragen [55]. Eine Übertragung durch kontaminiertes Trinkwasser wird häufig mit humanen Adenoviren der Gruppe F (Typ 40 und 41) in Verbindung gebracht [79] und verursacht vor allem bei Kindern meist gastrointestinale Erkrankungen [91-93]. Auf Grund seiner ubiquitären Präsenz in Fluss und Küstengewässern, aber auch in Swimmingpools und Trinkwässern weltweit [79, 94, 95], gilt er nach dem Rotavirus als zweithäufigster Erreger gastrointestinaler Erkrankungen [95, 96]. Ähnlich wie bei anderen Viren, wurde auch für Adenoviren eine deutliche Resistenz gegenüber etablierten Desinfektionsmethoden für

Trinkwasser beobachtet [97]. Aus diesen Gründen gelten Adenoviren zunehmend als starker Leitindikator für virale Kontaminationen in Trinkwässern [98].

Bakteriophage MS 2, Φ X 174

Bakteriophagen sind die Viren, welche Bakterien infizieren [72]. Sie werden seit längerer Zeit als alternative Indikatoren für enterale Viren in Wasser diskutiert, da sie diesen in Morphologie und physikalischen Eigenschaften stark ähneln [80, 99, 100]. Zu den für Wasser interessanten Kandidaten gehören die somatischen Coliphagen (z. B. Φ X 174), F+ RNA-Coliphagen (z. B. MS 2) und *Bacteriodes fragilis*-infizierende Bakteriophagen [80]. Der Bakteriophage MS 2 ist ein häufig als Modellorganismus gewählter Vertreter der F+ RNA-Coliphagen [80] und ähnelt in seiner Morphologie stark den Enteroviren (z. B. dem Poliovirus), da er über ein sphärisch ikosaedrisches Kapsid verfügt, ungefähr 25 nm groß ist und sein Genom in einem einzelnen ss-RNA-Strang kodiert [80]. Der Bakteriophage Φ X 174 gehört zu der heterogenen Gruppe der somatischen Coliphagen, welche alle die gleichen Rezeptoren der Bakterienzellwand für die Infektion von Bakterien nutzen. Φ X 174 verfügt ebenfalls über eine ikosaedrisches Kapsid, was von einer Protein-Hülle umgeben ist. Seine Größe beträgt ungefähr 25 nm und sein Genom ist in einem ringförmigen ss-DNA-Strang kodiert [53]. Neben der Morphologie können zwischen Viren und den genannten Bakteriophagen MS 2 und Φ X 174 weitere Eigenschaften gefunden werden, die sie als Indikatoren für virale Kontaminationen besser qualifizieren als fäkale Bakterien. So können sich Bakteriophagen im menschlichen Verdauungstrakt vermehren, wobei sie meist nicht humanpathogen sind. Sie werden daher ins Abwasser ausgeschieden, wo sie meist in deutlich größerer Zahl als enterale Viren vorkommen [53]. Ein Nachweis von Bakteriophagen im Trinkwasser kann zwar nicht direkt mit einer viralen Kontamination in Verbindung gebracht werden, zeigt jedoch eine fäkale Kontamination an. Des Weiteren sind sie gegenüber vielen Desinfektionsmethoden ebenso resistent wie viele Viren [80] und können mit einfachen Kulturmethoden (z. B. Plaque Assay) oder (RT)-PCR leicht nachgewiesen werden [42, 101, 102]. Auf Grund dieser Eigenschaften werden sie von wissenschaftlicher, wie von institutioneller Seite als sehr gute Indikatoren für eine potentielle, virale Kontamination von Trinkwasser angesehen [25]. Des Weiteren dienen sie auf Grund der zahlreichen, einfach anwendbaren Nachweismethoden oftmals als Modellorganismen für die Entwicklung und Überprüfung von Filtrations- und Desinfektionsmethoden [25, 80, 101, 103].

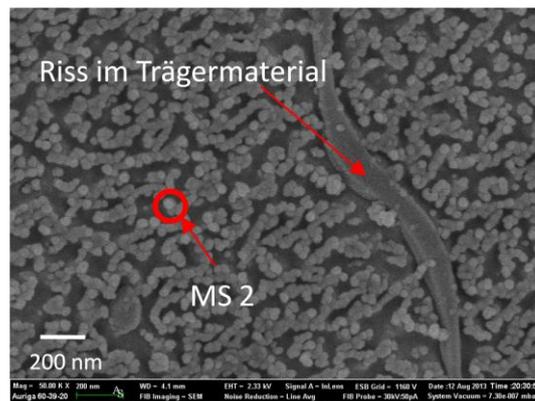


Abbildung 3: Rasterelektronenmikroskopische (REM)-Aufnahme von Bakeriophage MS 2. Freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Natalia P. Ivleva (Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, TU München).

2.1.3. Weitere relevante Bakterien und Viren für die Trinkwasserhygiene

Im Vergleich zu anderen Ländern ist die Auswahl der überwachten Bakterien in Deutschland deutlich geringer. Wasserbürtige, humanpathogene Viren werden in der deutschen Trinkwasserverordnung (TrinkwV) derzeit nicht berücksichtigt [35]. In anderen Ländern, wie z.B. den Vereinigten Staaten von Amerika (USA), werden neben den in Tabelle 1 genannten Bakterien, noch weitere als relevant für die Trinkwasserhygiene angesehen [44]: *Campylobacter jejuni*, *Entamoeba histolytica*, *Helicobacter pylori*, *Naegleria fowleri*, *Salmonella enterica*, *Shigella sonnei* und *Vibrio cholerae* (obig genannte Bakterien wurden hier nicht erneut genannt). Eine ebenfalls weiterführende Liste, welche auch die Überwachung wasserbürtiger Viren vorschlägt, ist der Trinkwasser-Richtlinie der WHO (2011) zu entnehmen [25]. Im Rahmen aktueller Forschungsinitiativen, wie beispielsweise der Initiative *Risikomanagement von neuen Schadstoffen und Krankheitserregern im Wasserkreislauf (RiSKWa)* werden aber auch in Deutschland die derzeitigen Bewertungskonzepte für die Trinkwasserhygiene überprüft [104]. Neben den Bewertungskonzepten ist die Integration neuer Krankheitserreger ebenfalls von zentraler Bedeutung [104]. Diese wurden in drei Kategorien eingeteilt und mit Hinblick auf ihre Relevanz für die Trinkwasserhygiene bewertet [104]:

- Humanpathogene Erreger, die vollkommen neu sind (z.B. HIV),

- humanpathogene Erreger, die zwar als Mikroorganismen beschrieben wurden, aber erst kürzlich als Krankheitserreger identifiziert wurden (z.B. *Helicobacter pylori*, *Cryptosporidium*),
- humanpathogene Erreger, die aufgrund von Umweltveränderungen und verbesserten Vermehrungsmöglichkeiten an Bedeutung gewonnen haben (z.B. Legionellen, Antibiotika-resistente Erreger).

Ein wesentliches Ergebnis aus *RiSKWa* waren die aus heutiger Sicht relevanten Charakteristika von wasserbürtigen Pathogenen, wie niedrige Infektionsdosen, hohe Chlorresistenzen, Reservoirbildung in lebenden Tieren und diffuser Eintrag in Gewässer (z.B. durch Überschwemmungen) [104]. Im Rahmen der durchgeführten Forschungsprojekte wurden Lösungsansätze erarbeitet, aber auch Wissenslücken aufgezeigt, deren Schließung eine zentrale Rolle für eine zukünftige Bewertung der Trinkwasserhygiene spielen wird [104].

2.1.4. Die Rolle von Biofilmen für die Trinkwasserhygiene

Als Biofilme bezeichnet man Aggregate von Mikroorganismen, die sich an Grenzflächen in wässrigen Systemen (oftmals als „Schleimschicht“) ansiedeln [105]. Sie sind ubiquitär in der Umwelt vorhanden und stellen die erfolgreichste Form des Lebens dar [105]. Biofilme sind unter anderem für das Selbstreinigungspotential von Böden, Sedimenten und Wasser verantwortlich und werden sogar technisch zur Wasseraufbereitung eingesetzt (z.B. Biofiltration) [105].

Die Mikroorganismen in einem Biofilm leben in einer Matrix aus extrazellulären, polymeren Substanzen (EPS), welche unter anderem den Wassergehalt, die Hydrophobizität, die Ladung, die Porosität und die mechanische Stabilität des Biofilms definieren [106, 107]. Darüber hinaus wurde sogar eine gewisse enzymatische und regulatorische Aktivität in Biofilmen beobachtet [108].

Auch in technischen Systemen sind Biofilme weit verbreitet [109]. Sie treten sowohl in Abwassersystemen (z.B. in Rohrleitungen und Behältern), als auch in medizinischen Geräten zur Produktion hochreinen Wassers auf [109]. Hier können sie für das sog. *Biofouling*, also die biologische Verunreinigung technischer Systeme verantwortlich sein [109]. Die typische Entwicklung eines Biofilms ist in Abbildung 4 dargestellt. Sie beginnt mit dem Transport von Mikroorganismen zur Oberfläche durch Diffusion, Sedimentation oder aktive Bewegung

(Abbildung 4, Induktionsphase) [110, 111]. Die Mikroorganismen binden dabei zunächst unspezifisch und teilweise reversibel an die Oberfläche [110]. Es kommt jedoch auch zur irreversiblen Anhaftung mit Makromolekülen der Zelloberfläche (wie z.B. Polysacchariden oder Fimbrien) [111]. Gelingt die Induktionsphase, wächst der Biofilm zunächst an (siehe Abbildung 4, Bild 3 Akkumulationsphase / Kolonisation) und erreicht schließlich eine Plateauphase (siehe Abbildung 4, Bild 4-5 Existenzphase) in welcher sich das Biofilmwachstum und die Abtrennung von Biofilmbestandteilen im Gleichgewicht befinden [111].

In den letzten Jahren wurde immer offener, dass Biofilme in Trinkwassersystemen als Habitate für hygienisch relevante Mikroorganismen und Viren dienen können [105]. So können sich fäkale Indikatorkeime (z.B. *E. coli*) und Pathogene fäkalen Ursprungs (z.B. *Campylobacter spp.*), aber auch Umweltkeime (z.B. *Legionella spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*), sowie Enteroviren (z.B. Adenovirus, Rotavirus und Norovirus) und parasitäre Protozoen (z.B. *Cryptosporidium parvum*) in existierende Biofilme integrieren und über mehrere Wochen persistieren [105, 112].

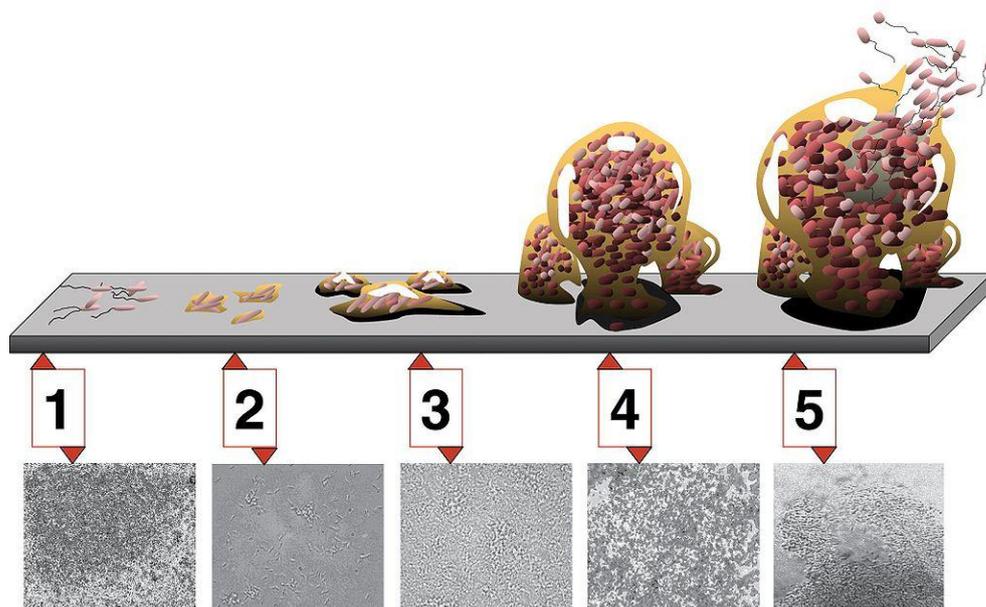


Abbildung 4: Phasen und mikroskopische Aufnahmen der Biofilmentwicklung. Es werden 3-Phasen unterschieden: (1-2) Induktionsphase, (3) Akkumulationsphase und Existenzphase (4-5) Bildquelle: www.wikipedia.org.

In Trinkwassersystemen kann somit eine Akkumulation von pathogenen Bakterien und Viren in Biofilmen stattfinden [113, 114]. Eine plötzliche Freisetzung der Pathogene (z.B. durch Abreißen des Biofilms) kann ein erhebliches Gesundheitsrisiko darstellen, da kurzzeitig eine

große Anzahl an Pathogenen im Trinkwassersystem verteilt wird [113]. Andererseits kann die Konkurrenz der Mikroorganismen in Biofilmen auch zur Inaktivierung von Pathogenen (z.B. Viren) führen [113].

Da der Ort der Ansiedlung von Biofilmen in Trinkwassersystemen (z.B. in Rohrleitungen, Ventilen, Verzweigungen) unter anderem von der Gestalt und den Werkstoffen des Verteilungssystems abhängt, können Biofilme (und damit die Pathogene) eine Desinfektion oder Spülung der Systeme unbeschadet überstehen [114]. Des Weiteren persistiert ein Teil des Biofilms in einem Status extrem reduzierter Stoffwechselaktivität (*viable but non-culturable*, VBNC) und wird daher von den bislang üblichen Kultur-basierten Detektionsmethoden eventuell nicht erfasst [105]. Eine Kontaminationsquelle in einem Trinkwassersystem kann daher oftmals nur durch ein repräsentatives Monitoring identifiziert und somit entfernt werden [109, 114]. Biofilme in Trinkwassersystemen können daher als Reservoir für wasserbürtige Pathogene dienen und stellen eine potentielle Quelle für die Kontamination von Trinkwasser dar [105, 114].

2.2. Nachweis von Pathogenen in Trinkwasser: Anreicherungsverfahren

Auf Grund des obig beschriebenen hohen Infektions- und Ausbreitungspotentials wasserbürtiger Pathogene (v.a Viren) und Protozoen, wurden die Risikoabschätzungen für Infektionen durch kontaminiertes Trinkwasser von der WHO in den Jahren 2008 bis 2011 überarbeitet [25, 27]. Wurde die maximale Zahl von z.B. Rotaviren im Trinkwasser im Jahr 2008 noch mit 1 Virus pro 32 m³ angegeben [27], so wurde diese Zahl im Jahr 2011 auf 1 Virus pro 90 m³ erhöht [25], was einer Konzentration von 1×10^{-8} Viren/ml entspricht. Diese Zahl ist zwar eher als ein Maß für die notwendige Reduktionsleistung (entspricht 5,96 log₁₀-Stufen, oder 99,999 89 %) bei der Verarbeitung von kontaminiertem Rohwasser zu Trinkwasser zu verstehen, jedoch verdeutlicht sie die analytischen Herausforderungen für Hygiene-Monitoringsysteme [25]. Darüber hinaus verdeutlicht sie die Notwendigkeit für die Verwendung präparativer Aufkonzentrierungssysteme, da kein gegenwärtig verfügbares Detektionssystem in der Lage ist, die notwendigen Konzentrationen direkt nachzuweisen [115]. Um die notwendigen Nachweisgrenzen dennoch zu erreichen, wird zunehmend die modulare Aufkonzentrierung großer Volumina an Trinkwasser (z.T. >> 1000 L) in

mehrstufigen Prozessen unterschiedlicher Selektivität diskutiert [116-118].

Bei der Wahl geeigneter Aufkonzentrierungsmethoden für Viren und Bakterien aus großen Trinkwasservolumina muss den unterschiedlichen Eigenschaften der Analyte (z. B. Größe, Form, Oberflächenladung, Umweltstabilität, pH-Mobilität etc.) Rechnung getragen werden. Dennoch wäre eine gemeinsame Aufkonzentrierung verschiedener Analyte mit hoher oder zumindest möglichst reproduzierbarer Wiederfindung wünschenswert. Ein Zeitvorteil gegenüber gegenwärtigen Methoden, sowie hohe Aufkonzentrierungsfaktoren (d. h. Prozessierung großer Probenvolumina und Elution in möglichst kleinen Volumina) sind weitere, wichtige Kriterien für den von der WHO angeregten Ausbau der Überwachung der Trinkwasserhygiene [5]. Aktuell ist jedoch keine Aufkonzentrierungsmethode in der Lage, alle Kriterien gleichzeitig zu erfüllen. Daher werden oftmals primäre Aufkonzentrierungsmethoden (z. B. Ultrafiltration oder Adsorptions/Elutionsmethoden) eingesetzt, um Wasserproben mit einem Volumen > 100 L oder > 1000 L auf ein Volumen \leq 100 mL aufzukonzentrieren [116, 119]. Durch Kombination mit sekundären, oder sogar tertiären Aufkonzentrierungsmethoden (z. B. Immunofiltration, Flockung, monolithische Filtration...) erhält man Konzentrate von wenigen Millilitern, welche in die verschiedenen Kulturmethoden oder molekularbiologischen Detektionsmethoden eingesetzt werden können [80, 101, 115, 120].

Da im Rahmen dieser Arbeit der Nachweis von Pathogenen in Trinkwasser hauptsächlich anhand von Viren und Bakteriophagen stattfand und diese auf Grund der obig genannten Eigenschaften die messtechnisch größere Herausforderung darstellen, werden in Folgendem hauptsächlich Aufkonzentrierungsmethoden für Viren eingehender dargestellt. Jedoch sind für Bakterien vielmals die gleichen Selektionsmechanismen und Methoden anwendbar [121], was sich in den angegebenen Literaturstellen oftmals widerspiegelt.

2.2.1. Ultrafiltration

Bei der Ultrafiltration handelt es sich um eine größenspezifische, durch Druck oder Vakuum angetriebene Anreicherungsmethode an einer porösen physikalischen Barriere [122], welche meist ohne Vorkonditionierung bzw. ohne chemische Veränderung (wie beispielsweise pH-Wert) der Probe durchgeführt werden kann [123, 124]. Die Probe wird dabei in Filtrat und Retentat getrennt [125]. Da alle Partikel zurückgehalten werden, die größer als der Porendurchmesser sind, kann sie für die gleichzeitige Aufkonzentrierung verschiedener

Pathogene (Viren und Bakterien, Protozoen) verwendet werden [126-128]. Abhängig von der Porengröße der verwendeten Membran unterscheidet man von Nano- bis Mikrofiltration (siehe Abbildung 5). Für die Aufkonzentrierung von Viren und Bakterien in Wasserproben, welche in der Regel eine Größe von 20 nm bis 5 µm besitzen, kommt meist die Ultrafiltration zur Anwendung [129].

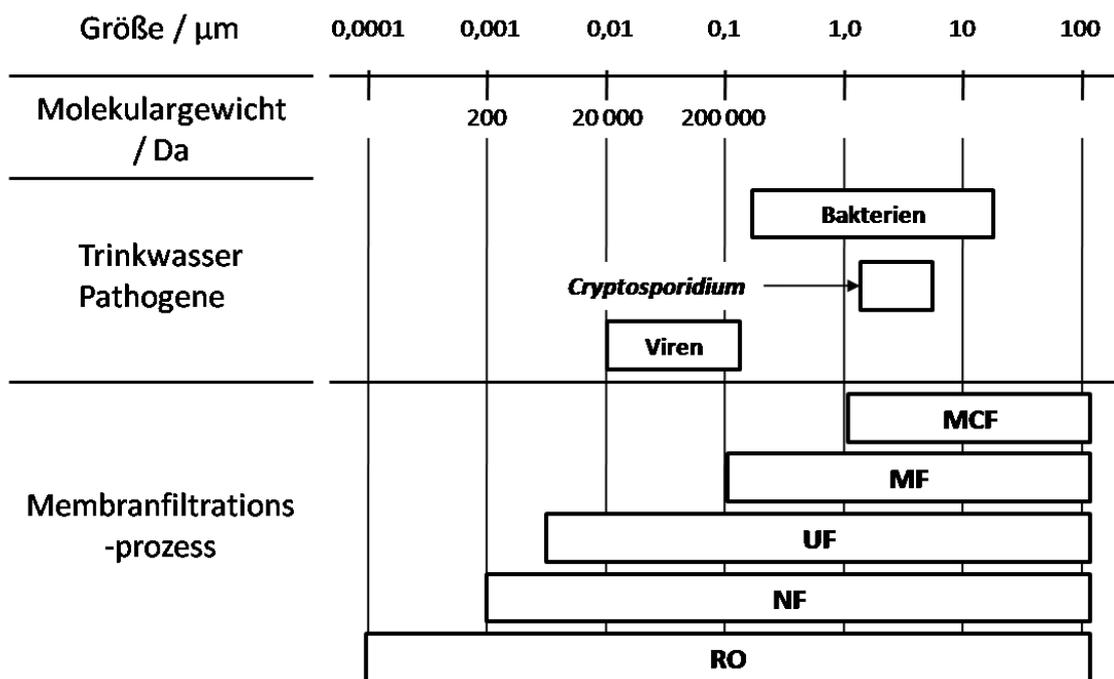


Abbildung 5: Anwendungsbereiche für die Membranfiltration für die Entfernung von Pathogenen aus Trinkwasser. Abbildung frei nach ALLGEIER ET AL. (2005) [122]. MCF (Magnetisch gekoppelte Filtration), MF (Mikrofiltration), UF (Ultrafiltration), NF (Nanofiltration) und RO (Umkehrosiose).

Die Triebkraft der Filtration ist der Transmembrandruck (TMP, oder ΔP_{tm}), welcher aus dem Druckunterschied zwischen Filtratseite ($P_{Filtrat}$) und Retentatseite ($P_{Retentat}$) der Membran berechnet werden kann [125]:

$$\text{Gleichung (1)} \quad TMP (\Delta P_{tm}) = P_{Retentat} - P_{Filtrat}$$

Da die Ultrafiltration im Rahmen dieser Arbeit nur am Rande Verwendung fand, wird für eine eingehendere Betrachtung der physikalischen Grundlagen auf die Dissertationen von CAROLINE PESKOLLER (2010) UND MARTIN RIEGER (2012), sowie auf HOWELL ET AL. (2012), RIPPERGER (1993) UND RIPPERGER ET AL. (2007) verwiesen [30, 31, 125, 130, 131]. Der Betrieb der Ultrafiltration findet hauptsächlich im *Crossflow*- (CUF) oder im *Dead-end*-Modus (DEUF)

statt (siehe Abbildung 6). Bei der CUF (siehe Abbildung 6, A) wird die Membran tangential angeströmt, wobei es durch Partikel, die größer als die Porengröße sind, zur Ausbildung einer Deckschicht bzw. eines Filterkuchens kommt. Erreicht diese Schicht eine bestimmte Dicke, wird sie durch die Scherkräfte des Volumenstroms abgerissen [125]. Dies verhindert eine Verblockung der Membran bei Wasserproben mit hoher Partikelfraktion [132]. Diese beiden Mechanismen wiederholen sich solange, bis sich ein Gleichgewicht zwischen Bildung der Deckschicht und Abtragung durch die Scherkräfte eingestellt hat [125]. Bei der DEUF (siehe Abbildung 6, B) wird die Membran orthogonal angeströmt. Die Ausbildung einer Deckschicht bzw. eines Filterkuchens findet hier ebenfalls statt. Da jedoch kein oder nur ein geringer tangentialer Fluss stattfindet, wird diese nicht abgetragen und wächst im Verlauf der Filtration weiter an [125]. Im Vergleich mit CUF werden bei der DEUF deutlich höhere Flussraten erreicht [133], jedoch ist die Gefahr einer Verblockung der Membran bei Proben mit hoher Partikelfraktion deutlich höher [132]. Neben CUF und DEUF kann die Ultrafiltration auch im *Vortexflow*-Modus betrieben werden, welcher vor allem für Wasserproben mit hoher Trübung, wie Seewasser Anwendung findet [134, 135].

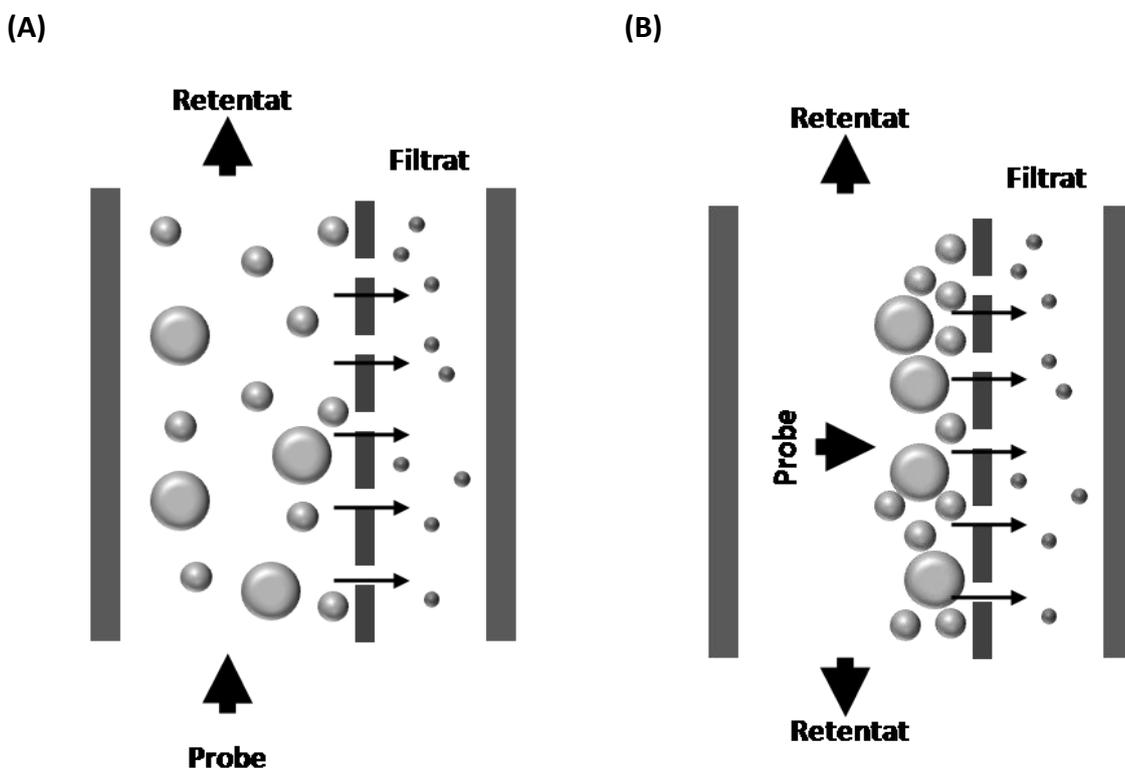


Abbildung 6: Schematische Darstellung der (A) *Crossflow*- und (B) *Dead-end*- Ultrafiltration.

Für die Aufkonzentrierung von Pathogenen (v.a. Viren) in großen Wasserproben werden zunehmend Hohlfaser-Ultrafiltrationsmembranen verwendet [133, 136]. Durch die Möglichkeit der Regeneration der Ultrafiltrationsmembranen nach Elution und Desinfektion von über 30 Zyklen [137], können die höheren Anschaffungskosten relativiert werden [138]. Darüber hinaus findet die Ultrafiltration bei der Entfernung partikulärer und mikrobieller Verunreinigungen in der Trinkwasseraufbereitung vor allem für Kapazitäten über 100 000 m³/d bereits breite Anwendung [139], was die Anschaffungskosten weiter reduzieren wird. Die Aufkonzentrierung erfolgt dabei durch einen Rückspülvorgang nach der Filtration der zu beprobenden Wassermenge [140]. Auf Grund der einfachen Handhabung können UF-Module gut in automatisierten Filtrationssystemen verwendet werden [141, 142]. So kombinierten PEI ET AL. (2012) CUF als primäre Aufkonzentrierungsstufe in einem automatisierten System mit monolithischer Filtration als sekundäre Stufe. Durch Aufkonzentrierung von Bakteriophage MS 2 in 10-L-Proben konnte die Nachweisgrenze um den Faktor $1,4 \times 10^4$ gesenkt werden. Der volumetrische Aufkonzentrierungsfaktor betrug 10^4 und die Wiederfindungsrate ungefähr 98 % [143]. LESKINEN ET AL. (2012) nutzten Ultrafiltration in einem automatisierten System für die Aufkonzentrierung fäkaler Indikatororganismen, sowie Legionellen in Grund-, Oberflächen- und Kühlturm-Wasserproben mit einem Volumen von 100 L [142]. Die Ergebnisse wurden mit Stichproben verglichen, die während der Filtrationszeit genommen wurden. In allen Wassermatrizes konnte die automatisierte Filtration von größeren Volumina fäkale Indikatoren feststellen, während die Stichproben negativ waren [142].

Ultrafiltration ist auf Grund des einfachen Setups für die Prozessierung sehr großer Probenvolumina (> 100 L) als primäre Stufe ebenso geeignet wie für die Nutzung als sekundäre Aufkonzentrierungsstufe [124]. So gelang es RUTJES ET AL. (2005) Enteroviren in Flusswasser mit einem Volumen von 600 L durch Kombination zweier Ultrafiltrationen zunächst auf ein Volumen von 1,8 L und anschließend auf 40 mL aufzukonzentrieren [144]. Daraus ergab sich ein Aufkonzentrierungsfaktor von $1,5 \times 10^4$. DIVIZIA ET AL. (2003) verwendeten Ultrafiltration einmal als primäre Stufe für das Monitoring von Hepatitis A-Viren in Tiber-Flusswasserproben mit einem Volumen von 50 L bis 125 L [145]. In einer anderen Studie wurden Hepatitis A und Polioviren ebenfalls mittels Ultrafiltration als sekundäre Stufe in 1-L-Wasserproben aufkonzentriert [145].

Neben der Anwendung als Hohlfaser, werden Ultrafiltrationsmembranen häufig für

zentrifugale Ultrafiltrationen angewendet. Die treibende Kraft ist hier die Zentrifugalkraft [146]. Die Größe der Poren wird häufig mit dem *Nominal Molecular Weight Limit* (NMWL) in Dalton angegeben. Sie wird in der Bioanalytik häufig für die Aufreinigung, bzw. die Aufkonzentrierung von Lipiden, Proteinen oder Nukleinsäuren eingesetzt [146]. Auch in der Viren-Analytik von Lebensmitteln spielt sie eine wichtige Rolle, da sie einfach durchzuführen ist und hohe Wiederfindungen bietet [147]. Auf Grund des begrenzt einsetzbaren Probenvolumens (max. 15 mL) wird die zentrifugale Ultrafiltration jedoch meist als sekundäre bzw. tertiäre Aufkonzentrierungsmethode eingesetzt [147]. Darüber hinaus ist sie anfällig für eine Verblockung der Membran, da die Filtration auf Grund der Geometrie nur im Dead-end-Modus stattfinden kann.

2.2.2. Adsorptions-/ Elutionsmethoden

Neben der Ultrafiltration gehören Adsorptions-/ Elutionsmethoden zu den am häufigsten verwendeten Aufkonzentrierungsmethoden für Pathogene in Wasser [118] und finden als primäre, wie sekundäre Aufkonzentrierungsstufen Verwendung [116, 118]. Der Einsatz von mikroporösen Filtern wird in der sog. VIRADEL-Methode (*virus adsorption and elution*) der US-amerikanischen Gesundheitsbehörde als Standardmethode für die Aufkonzentrierung von Viren in Wasserproben beschrieben [38] und ist als Methode 1651 der US-amerikanischen Umweltbehörde definiert [148, 149]. Die Entwicklung dieser Methode geht auf WALLIS UND MELNICK (1967) zurück und verwendet positiv geladene Filter (z. B. Virozorb 1MDS und NanoCeram) [150-152]. Daneben werden auch negativ geladene Filter (z. B. HA-Filter), sowie Glaswolle-Filter verwendet. Allen Methoden gemeinsam ist die Adsorption der Viren an die Säule über elektrostatische Wechselwirkungen [118]. Auf Grund der Proteinhülle der Viren, besitzt ihre Oberfläche eine von dem pH-Wert der Umgebung abhängige Ladung bzw. einen isoelektrischen Punkt (IEP), welcher im Mittel bei $\text{pH} = 5 \pm 1$ liegt [153]. Durch Einstellung des pH-Wertes des umgebenden Mediums kann somit die Adsorption an positiv oder negativ geladene Filter gesteuert werden (siehe Abbildung 7). Die Elution erfolgt anschließend durch pH-Änderung in organischen/proteinreichen (z. B. Rinderextrakt) oder anorganischen (z. B. PBS, Natriumpyrophosphat) Lösungen, welche Puffersubstanzen (z. B. Glycin) oder Detergenzien (z. B. Tween 80) enthalten können [154, 155].

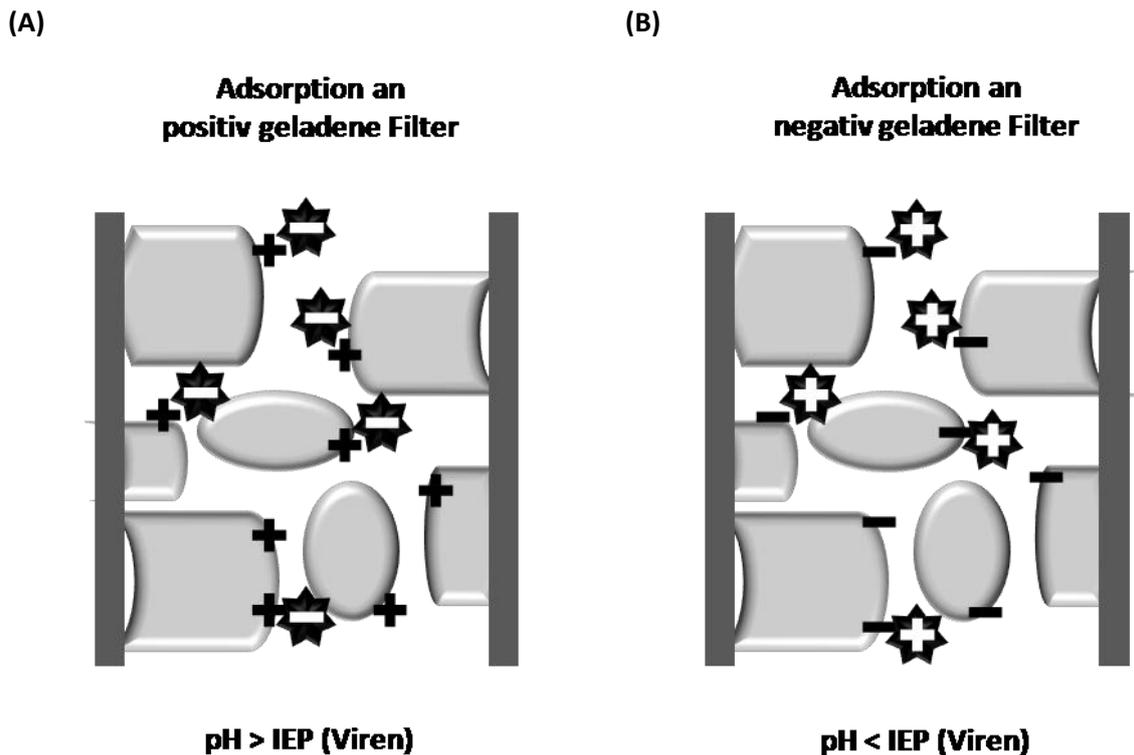


Abbildung 7: Adsorption von Viren an geladene Filtrationssäulen in Abhängigkeit des pH-Wertes der Umgebung. Bei einem pH-Wert $<$ IEP (Isoelektrischen Punkt) sind die Viren positiv geladen. Bei einem pH-Wert $>$ IEP sind sie negativ geladen.

Positiv geladene Filter

Positiv geladene Filter können, wenn der pH-Wert der Probe zwischen pH 6,5 und 7,5 liegt ohne weitere Einstellung des pH-Wertes direkt für die Adsorption von Viren verwendet werden [156]. Da der pH-Wert über dem IEP der meisten Viren liegt (s.o.), sind diese negativ geladen und adsorbieren an die positiv geladenen Filter. Zu den bekanntesten Vertretern gehören die von der US-amerikanischen Umweltbehörde für die Aufkonzentrierung von Enteroviren in großen Trinkwasservolumina vorgeschlagenen 1MDS-Filter (Virozorb oder Zeta-Plus) [157]. Sie besitzen eine mittlere Porengröße von $0,2\ \mu\text{m}$ [158] und können Trinkwasser mit einer Geschwindigkeit von $11\ \text{L}/\text{min}$ filtrieren [157]. Auf Grund der einfachen Anwendbarkeit und der Möglichkeit der Prozessierung großer Wasserproben, werden sie oftmals für die Untersuchung Wasser-assoziiertes Krankheitsausbrüche verwendet. So untersuchten PARSHIONIKAR ET AL. (2003) im Auftrag der Gesundheitsbehörde von Wyoming (USA) einen akuten Gastroenteritis-Ausbruch, welcher innerhalb eines Monats (Oktober 2011) im Umfeld des gleichen Restaurants insgesamt 84 Personen betraf [159]. Insgesamt 6 Wasserproben (Trinkwasserbrunnen) aus dem betreffenden Restaurant mit

einem Volumen von je 2010 L wurden mittels 1MDS-Filtern als primäre Stufe aufkonzentriert. Durch die weitere Aufkonzentrierung auf ein Endvolumen von 32 mL, mittels *Celite*-Filter und zentrifugaler Ultrafiltration als sekundärer und tertiärer Stufe, wurde ein Aufkonzentrierungsfaktor von 6×10^4 erreicht. Die Identifizierung des Pathogens erfolgte mittels quantitativer (q) PCR. Obwohl die Indikatorkeime (Coliforme Bakterien) für den beobachteten Zeitraum keine Überschreitung der Grenzwerte anzeigten, wurden Noroviren in den Proben als Krankheitsursache identifiziert. Diese zeigten eine fäkale Verunreinigung des Trinkwasserbrunnens an [159]. In einer anderen Studie von BORCHARDT ET AL. (2004) wurden 1MDS-Filter für die Untersuchung der Virentransmission in städtische Trinkwasserbrunnen durch Flusswasser angewendet [160]. Über einen Zeitraum von einem Jahr wurden insgesamt 48 Wasserproben aus den Trinkwasserbrunnen, sowie 12 Wasserproben aus dem nahegelegenen Fluss mit einem Volumen von je 1500 L genommen und mittels 1MDS-Filtern aufkonzentriert. Durch die Kombination mit saurer, bzw. organischer Flockung wurde ein Aufkonzentrierungsfaktor von 10^5 erreicht. Mittels quantitativer Reverse Transkriptase (qRT)-PCR konnten enterale Viren (Norovirus, Enterovirus, Rotavirus, Hepatitisvirus A) in 50 % der Trinkwasserbrunnen und 83 % der Flusswasserproben nachgewiesen werden. Die Resultate für Indikatororganismen (coliforme Bakterien, somatische-, F-spezifische Coliphagen) in den Trinkwasserbrunnen-Proben waren im gleichen Zeitraum stets negativ [160]. Die gezeigten Studien verdeutlichen erneut das Potential und die Notwendigkeit der Anwendung von Aufkonzentrierungsmethoden für die Überwachung oder Aufklärung mikrobieller Kontaminationen oder Transmissionen trinkwasserführender Systeme.

Die hohen Kosten für 1MDS-Filter von \$ 200 bis 300 pro Filter limitieren jedoch eine flächendeckende Anwendung für das Routine-Monitoring [116]. NanoCeram-Filter stellen hier mit einem Preis von ungefähr \$ 40 pro Filter eine kostengünstigere Alternative dar [116, 155]. Dabei handelt es sich um Tiefenfilter aus Mikroglassfasern, welche mit Al_2O_3 -Nanofibrillen beschichtet sind [155] und eine nominale Porengröße von $2,0 \mu m$ besitzen [161]. Die Wiederfindungsraten für enterale Viren (inkl. Noroviren) in 100-L-Leitungswasserproben waren vergleichbar mit 1MDS-Filtern [162]. Im Rahmen der Überprüfung/ Optimierung der U.S EPA Methode 1615: *Untersuchung von Entero- und Noroviren in Wasser mittels Kultur und RT-qPCR* erreichten CASHDOLLAR ET AL. (2013) durch Filtration von 1500 L bis 1900 L Grundwasser mittels NanoCeram-Filtern in Kombination mit

saurer Flockung einen Aufkonzentrationsfaktor von ungefähr 10^4 [149]. Die Wiederfindungen für Poliovirus lagen beispielsweise für Kultur und (RT)-qPCR zwischen 20 % und 58 %. Schwächen zeigte die Methode jedoch für die Detektion in Oberflächenwasser, da hier auf Grund der hohen Turbidität maximal 80 L filtriert werden konnten und die Wiederfindungen lediglich bei ungefähr 10 % lagen [149]. NanoCeram-Filter scheinen für die Aufkonzentrierung von Viren in großen Wasserproben ebenso gut geeignet zu sein wie 1MDS-Filter, jedoch muss die Anwendbarkeit für verschiedene Viren in verschiedenen Wässern noch weiter erforscht werden [116]. So schwankten beispielsweise die Wiederfindungsraten in einer Studie von GIBBONS ET AL. (2010) in 40-L-Meerwasserproben zwischen > 96 % für Noroviren und F-spezifische Coliphagen und < 3 % für Adenoviren, obwohl die Adsorptionsrate für Adenoviren bei > 98 % lag [163].

Eine weitere, kostengünstige und einfache Alternative zu 1MDS-Filtern stellt die Glaswolle-Filtration dar. Ein weiterer Vorteil besteht in der einfachen Modifizierung durch z. B. eine Beschichtung mit Mineralöl oder die Filtration bei kleinen pH-Werten [164-166]. Polioviren, Noroviren, aber auch Adenoviren konnten in verschiedenen Wassermatrizes und hohen Probenvolumina bis zu 1500 L mit hohen Wiederfindungen zwischen 30 % und 98 % aufkonzentriert werden [138, 167]. Die dabei erzielten Aufkonzentrationsfaktoren betragen bis zu 10^5 [138]. Ein Nachteil der Glaswolle-Filter ist die zumeist eigenhändige Befüllung, wodurch die Vergleichbarkeit und Reproduzierbarkeit dieser Methode zwischen verschiedenen Laboren stark schwanken kann [116].

Negativ geladene Filter

Die Adsorption von Viren an negativ geladene Filter (z. B. Filter aus Cellulosenitrat) erfordert die vorherige Einstellung des pH-Wertes der Probe auf einen Wert unterhalb des IEPs (meist pH 3,5) [118]. Die positiv geladenen Viren adsorbieren an die negativ geladenen Filter (siehe Abbildung 7, B) und werden durch Erhöhung des pH-Wertes in Kombination mit einem proteinhaltigen Puffer wieder eluiert [151, 168]. Auf Grund der Porengröße von meist $0,45 \mu\text{m}$, werden negativ geladene Filter meist für Proben mit hoher Turbidität (Partikelfraktion) wie Meerwasser, oder Zelllysate verwendet [115, 169]. Hier erzielten negativ geladene HA-Filter für Enteroviren, Noroviren und Rotaviren teilweise bessere Ergebnisse als positiv geladene Filter [170]. So konnten von KATAYAMA ET AL. (2001) Polioviren in aufgestockten Meerwasserproben mit einer Rate von 62 % wiederfinden, während positiv geladene Filter lediglich 6 % Wiederfindung erreichten [171]. Die Effizienz der Filter konnte

durch Modifikationen mittels Aluminium- oder Magnesiumsalzen [172], oder Detergenzien wie Tween 80 [173], deutlich gesteigert werden. Dennoch ergeben sich aus der Geometrie der HA-Filter (meist Dead-end-Filtration) Limitierungen für das Probenvolumen und die Filtrationsoberfläche [118]. Eine weitere Limitierung der Probenmenge ergibt sich aus der Notwendigkeit der pH-Wert-Einstellung [116, 118]. Durch Änderung der Filtergeometrie waren WALLIS ET AL. (1972) mit Cellulosenitrat-Filtern in der Lage, Polio- und Enteroviren in Leitungswasserproben mit einem Volumen von 1800 L auf ein Volumen von 5 mL aufzukonzentrieren, was einem Faktor von 4×10^5 entspricht [174]. Die Wiederfindung betrug dabei 88 bis 94 % [174]. In einer anderen Studie kombinierten HARAMOTO ET AL. (2004) mit Aluminiumsalzen-modifizierte HA-Filter mit zentrifugaler Ultrafiltration und konnten diesen Prozess für die Aufkonzentrierung von Noro- und Polioviren in Leitungswasserproben bis zu einem Volumen von 500 L anwenden [175]. Diese Beispiele zeigen, dass negativ geladene Filter durch Änderung der Filtergeometrie und trotz der notwendigen Vorkonditionierung der Probe für die Aufkonzentrierung von großen Probenvolumina eingesetzt werden können [118].

2.2.3. Monolithische Aufkonzentrierung

Neben den klassischen Filtermedien kommt den Monolithen in der Bioanalytik für die Separation von Biomolekülen seit einigen Jahren eine zunehmend größere Bedeutung zu [176]. Durch die verbundenen Poren steht eine vergleichsweise große Oberfläche zur Verfügung [177]. Des Weiteren können Größe und Gestalt der Poren (auch $> 1 \mu\text{m}$) während der Synthese meist ohne Funktionalitätsverlust modifiziert werden [119, 178]. Dies erlaubt die Anpassung an eine Vielzahl von Anwendungen wie Chromatographie von Biopolymeren [179, 180], Aufreinigung von Plasmid-DNA [181] oder auch Aufkonzentrierung von Pathogenen in Trinkwasser [143]. Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten Monolithen, sowie deren Anwendung in der Bioanalytik ist in der Dissertation von LU PEI (2015) zu finden [32].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde für die Aufkonzentrierung von Viren und Bakterien in Wasser eine Monolith-basierte Adsorptions-/Elutionsmethode verwendet, welche am IWC entwickelt wurde [182]. Der verwendete Monolith besteht aus einem Epoxidpolymer mit einer mittleren Porengröße von $\sim 20 \mu\text{m}$ [182]. Die Größe der Poren erlaubt den Durchtritt von Mikroorganismen, sowie die Filtration von Proben mit großem Volumen. Für

Trinkwasser konnten bislang Probenvolumina bis zu 100 L erreicht werden, während das Probenvolumen für Oberflächenwasser auf Grund der höheren Partikelfracht 1 L bis 10 L betrug [183]. Die Epoxy-Gruppen an der Oberfläche des Monolithen können nach der Synthese modifiziert werden, sodass bereits eine Vielzahl möglicher Anwendungen adressiert werden konnte. So verwendeten PESKOLLER ET AL. (2009) den Monolithen für die Affinitätschromatographie von *E. coli* [182]. Hierfür wurde der Monolith mit dem Polypeptid-Antibiotikum Polymyxin B modifiziert, welches sich in die Zellmembran gramnegativer Bakterien einlagern kann. Die Wiederfindungsrate für *E. coli* in 50 mL-Proben betrug $97 \pm 3 \%$ [182]. In einer weiteren Studie von OTT ET AL. (2011) wurde der Monolith für die Immunofiltration von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) verwendet [184]. Durch die Immobilisierung spezifischer Antikörper konnte das für die Lebensmittelsicherheit wichtige Bakterium in einem Probenvolumen von 1 L angereichert werden. Der Anreicherungsfaktor betrug 10^3 und die Wiederfindungsrate $74 \pm 4 \%$ [184]. Neben diesen sehr spezifischen Anwendungen, konnte der Monolith auch für die Aufkonzentrierung verschiedener Bakterien und Viren verwendet werden. So kombinierten PEI ET AL. (2012) und KUNZE ET AL. (2015) einen mit Hydroxid-Gruppen modifizierten Monolithen mit weiteren Aufkonzentrierungsmethoden wie Hohlfaser-Ultrafiltration und zentrifugaler Ultrafiltration [119, 141]. Die Modifikation mit Hydroxid-Gruppen erlaubt dabei die Adsorption von Viren über deren Oberflächenladung ähnlich negativ geladenen Filtern (siehe Kapitel 2.2.2). Auf diese Weise konnte der als Modellvirus dienende Bakteriophage MS 2 in Leitungswasser mit einem Volumen von 100 L bis 98 000 L aufkonzentriert werden. Derselbe Monolith konnte ebenfalls für die Aufkonzentrierung von Bakteriophage Φ X 174, HAdV und Norovirus verwendet werden [32]. Schließlich kombinierten WUNDERLICH ET AL. (2016) die monolithische Filtration sogar mit einem Mikroarray-basierten Immunoassay zur Detektion von *Legionella pneumophila* in Oberflächenwasser [183].

2.2.4. Weitere (v.a. sekundäre) Aufkonzentrierungsmethoden

Flockung

Im Gegensatz zur Fällung, handelt es sich bei der Flockung nicht um einen Phasenübergangsprozess, sondern um ein technisches Verfahren in dessen Verlauf feinste, ungelöste Feststoffe in größere Verbände überführt (koaguliert) und anschließend durch Sedimentation oder Filtration abgeschieden werden [185]. Allgemein kann die Flockung

durch Aussalzen, Zugabe von organischen Lösemitteln oder pH-Wert-Änderung angeregt werden, wobei die Aggregation durch Ladungstrennung oder hydrophobe Effekte thermodynamisch begünstigt wird [146, 185]. In der Abwasserbehandlung werden Fällung und Flockung parallel für die Abscheidung organischer, kolloidaler Partikel (Plankton, Huminstoffe etc.) und gelöster, anorganischer Metallverbindungen eingesetzt [185]. In der Analytik wird Flockung häufig für die grobe Aufreinigung von Proteinen und Nukleinsäuren verwendet [146], kann aber auch für die Aufkonzentrierung von Viren und Bakterien angewendet werden [186]. Als sekundäre Anreicherungsstufe für die VIRADEL-Methode bietet sich die Flockung besonders an, da das Eluat einen hohen Proteinanteil und pH-Wert hat [148, 187, 188]. Eine Senkung des pH-Wertes führt zur Koagulation der Pathogene mit anderen organischen Partikeln [148, 187, 188]. Die Aufkonzentrierung erfolgt durch Aufnahme der sedimentierten Flocken in kleinen Flüssigkeitsvolumina [160]. Als Flockungsmittel für die Aufkonzentrierung von Viren in Wasserproben werden verschiedene Metallsalze [189, 190], Polyelektrolyte [191], Ammoniumsulfat [192] und Polyethylenglykole [193] (auch Hydroextraktion genannt) verwendet. Ein der Flockung ähnliches Prinzip kam auch in einer Studie von CALGUA ET AL. (2008) bei der Aufkonzentrierung von Adenoviren in Meerwasserproben zur Anwendung [194]. Durch Adsorption der Viren an ausgeflockte Milchproteine aus Magermilchpulver konnten diese durch Sedimentation von der Probe abgetrennt werden. Die Wiederfindungsraten zwischen 42 und 52 %, sowie die geringen Kosten und der geringe experimentelle Aufwand zeigen das Potential dieser Methode [194].

Antikörper-basierte Aufkonzentrierung

Antikörper-basierte Aufkonzentrierungsmethoden beruhen meist auf Prinzipien der Immunofiltration und der immunomagnetischen Separation [195, 196]. Mikroben können dabei durch Antikörper sehr selektiv an modifizierte Oberflächen (z. B. magnetische Nanopartikel) adsorbiert werden [146]. Hierdurch werden störende Matrix-Komponenten entfernt und durch Elution in einem kleinen Volumen eine Aufkonzentrierung erreicht [195]. Jedoch können diese Methoden auf Grund der aufwendigen und kostenintensiven Herstellung der Antikörper bislang nur für kleine Probenvolumina (wenige Milliliter) angewendet werden [197]. Vor allem die Menge der verfügbaren Antikörper ist hierbei meist der limitierende Faktor. Durch neue Ansätze für die Herstellung rekombinanter Antikörper in transgenen Pflanzen (sog. *Plantibodies*) könnten diese Limitierung zukünftig entfallen [198-200]. Das Ergebnis wären neuartige Filtermedien, die definierte Pathogene

auch in großen Probenvolumina sehr selektiv aufkonzentrieren und gleichzeitig störende Matrix-Komponenten entfernen können. Trotz des großen Potentials dieser Methoden sollte bedacht werden, dass die Intaktheit der gebundenen Antigene von fundamentaler Bedeutung ist. Da sich Bakterien im Trinkwasser allerdings oftmals im Hungerzustand befinden, kann es zum Verlust der als Antigen dienenden Oberflächenproteine kommen [45]. Hierdurch wird die Effizienz der Aufkonzentrierung erheblich vermindert.

2.3. Nachweis von Pathogenen in Trinkwasser: Detektionsmethoden

Für den Nachweis von Pathogenen (Viren und Bakterien) in Wasser- oder Umweltproben stehen heutzutage eine Vielzahl von Methoden zur Verfügung [37, 115]. Bislang hat sich jedoch noch keine Detektionsmethode durchgesetzt, welche Viren und Bakterien gleichermaßen nachweisen kann und gleichzeitig für ein Hygiene-Monitoring geeignet ist. Dies ist zum einen der vollkommen unterschiedlichen Natur von Bakterien und Viren zuzuschreiben, wodurch sie selten mit der gleichen Methode nachgewiesen werden können. Zum anderen liefern die Detektionsmethoden unterschiedliche Informationen über beispielsweise [37]:

- An- / Abwesenheit (intakter) Viren oder Bakterien
- Kultivierbarkeit
- Enzymatische Aktivität
- Vitalität/Integrität
- Infektiösität
- An- / Abwesenheit spezifischer Oberflächen-Moleküle oder Stoffwechsel-Produkte
- An- / Abwesenheit des Genoms
- ...

Dies geht einher mit unterschiedlichen Einheiten und Informationen, deren Interpretation für eine Risikoanalyse mittels Hygiene-Monitoring essentiell wäre, jedoch nicht immer eindeutig möglich ist. In diesem Kapitel werden einige „klassische“ und etablierte (Stichwort: „Goldstandard“), sowie neue Technologien für die Detektion von Pathogenen in Trinkwasser gesammelt und dargestellt. In einem weiteren Kapitel werden diese Methoden bezüglich

ihres Informationsgehaltes / -inhaltes diskutiert und miteinander verglichen. Im Fokus der Diskussion steht dabei immer die Anwendbarkeit für das Hygiene-Monitoring von Trinkwasser und die Erfüllung der folgenden Kriterien:

- Dezentral einsetzbar (auch in kleinen Wasserbetrieben ohne eigenes Labor),
- einfache Handhabbarkeit (wenige Arbeitsschritte).
- zeitnahe Ergebnisse (innerhalb von Stunden bis wenigen Tagen)
- Nachweis von Viren (DNA und RNA-Viren) und Bakterien (gleichzeitig).

2.3.1. Nachweis von Pathogenen mittels (Zell)-Kultur

Die klassischen und anerkannten Nachweismethoden für bakterielle Pathogene, wie Coliforme Bakterien sind *Multiple-tube fermentation* (MTF) und die Membranfiltration (MF). MTF wird bereits seit über 80 Jahren für das Hygiene-Monitoring von Wasser eingesetzt [37]. Sie beruht auf der Eigenschaft der coliformen Bakterien, Laktose bei 35 °C unter Säure und Gasbildung zu fermentieren [38]. Der Ablauf ist in Abbildung 8 schematisch dargestellt. Die Probe wird in einer dekadischen Verdünnung mit Laktose- und Lauryl-Tryptose-Nährmedien versetzt. Die nach 48 h positiven Verdünnungen werden einem Bestätigungstest unterzogen. Sie werden mit Brilliant-Green-Laktose-Nährmedium versetzt und erneut für 48 h bei 35 °C inkubiert. Gasbildung zeigt jeweils einen positiven Nachweis an. Der Test kann auch für fäkale Coliforme Bakterien angewendet werden. Die Angabe der Ergebnisse erfolgt nach der statistischen Methode der *most probable number* (MPN) [37]. Darüber hinaus wird der Nachweis von nicht coliformen Mikroorganismen stark beeinflusst, weshalb die MTF mittlerweile durch die Membranfiltration abgelöst wurde [201, 202]. Bei dieser Methode wird die Probe durch einen Sterilfilter mit einer Porengröße von 0,45 µm filtriert. Die durch den Filter zurückgehaltenen Bakterien werden durch Inkubation des Filters auf selektiven Medien identifiziert [37]. Die Identifizierung erfolgt nach mind. 24 h anhand der Morphologie der gebildeten Kolonien (Farbe, Form), was nur durch geschultes und erfahrenes Personal erfolgen kann. Allein für coliforme Bakterien gibt es eine Vielzahl von optimierten Medien (z. B. m-Endo-type-Medium oder Tergitol-TTC) [40, 203, 204], deren Selektivität jedoch besonders bei Anwesenheit von Laktose angezweifelt wird [37]. Gegenüber der MTF weist die MF eine größere Sensitivität auf, da die Bakterien während der Filtration auf dem Filter aufkonzentriert werden. Dennoch erfordert sie auf Grund der

mangelnden Selektivität eine Bestätigung, welche eine erneute Inkubationszeit von 24 h erfordert [37]. Ein Ergebnis ist daher mit diesen Methoden frühestens nach zwei Tagen zu erwarten.

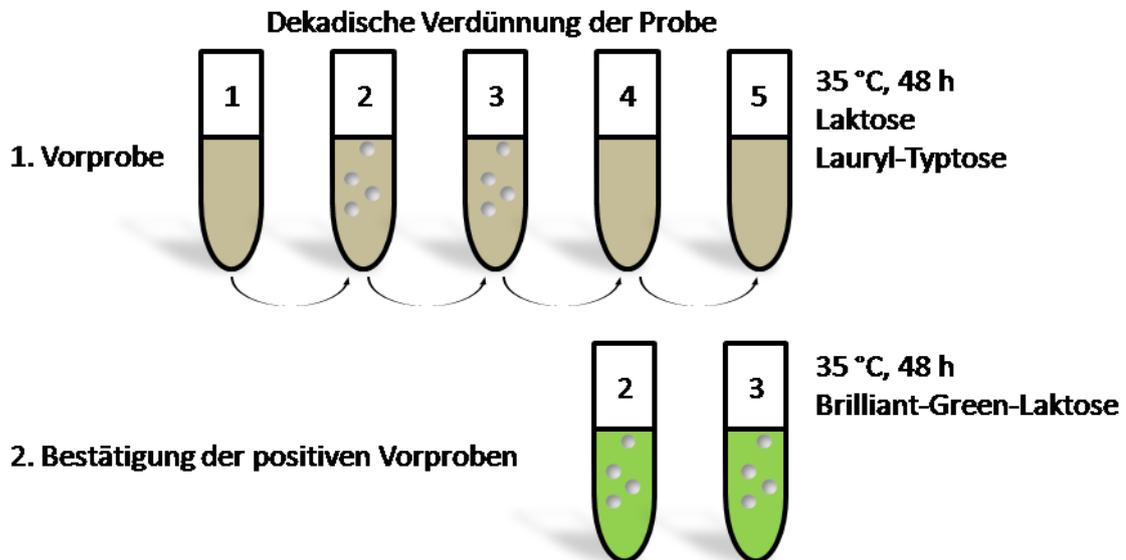


Abbildung 8: Nachweis von coliformen Bakterien mit *Multiple-tube fermentation* (MTF).

Durch die Identifizierung von Bakterien anhand ihres Enzym-Profiles konnte die Spezifität der klassischen Membranfiltration deutlich verbessert werden [37]. Enzymatische Reaktionen können Spezies-, Gruppen-, oder Klassen-spezifisch sein, wodurch sich viele Möglichkeiten der Modifikation ergeben [42]. So können coliforme Bakterien mit Hilfe des Enzyms β -Galaktosidase über einen Farbttest identifiziert werden [205]. Das Substrat o-Nitrophenol- β -D-Galaktopyranosid (NPG) wird dabei in das gelbe o-Nitrophenol umgewandelt. Dieser Farbttest kommt im sog. Colilert[®]/Quanti-Tray (IDEXX, USA) für die Detektion von coliformen Bakterien zur Anwendung und ist auch in der deutschen Trinkwasserverordnung akzeptiert [206]. Als weiteres Substrat wird hier 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid (MUG) eingesetzt, welches nach Umsetzung durch *E. coli* ein fluoreszierendes Produkt ergibt. Das verantwortliche Enzym, die β -D-Glucuronidase, ist allen *E. coli* gemeinsam und spezifisch [207, 208]. Die Sensitivität der Colilert-Methode beträgt 1 Koloniebildende Einheit (KBE) pro 100 mL und detektiert nur lebende, metabolisch aktive Bakterien [206]. Bakterien mit einem reduzierten Stoffwechsel werden hier nicht abgebildet [37]. Auf Grund der einfachen Handhabbarkeit, sowie der guten Selektivität und Sensitivität findet die Colilert-Methode, sowie die für Enterobakterien verfügbare Enterolert-Methode für das Monitoring

wasserbürtiger Pathogene in verschiedenen Wässern breite Anwendung und liefert vergleichbare Ergebnisse wie die etablierten Standard-Methoden [209-212].

Membranfiltration in Kombination mit Kultur gilt aktuell auch für die Detektion von Legionellen und speziell für *Legionella pneumophila* als „Gold Standard“ [213]. Die Nachweisgrenze dieser Methoden liegt bei 100 KBE in 100 mL [214]. Die Inkubationszeit beträgt hier teilweise 48 h bis zu 10 Tagen, da Legionellen sehr langsam wachsen [214]. In Wasser- und Umweltproben werden Legionellen in der Kultur daher oft von anderen Mikroorganismen überwachsen, was die Auswahl geeigneter Kulturmedien und –bedingungen zusätzlich erschwert [214]. Darüber hinaus liegen Legionellen in Wasserproben oft in einem metabolischen Ruhezustand vor (sog. *viable but not culturable*, VBNC), wodurch selbst lebendige Legionellen in der Kultur nicht nachgewiesen werden können [215].

Auch einige wasserrelevante, humanpathogene Viren können mittels Kulturmethoden nachgewiesen werden (siehe Tabelle 3) [216]. Die Voraussetzung für den Nachweis ist eine etablierte Zellkultur, da sich Viren nicht ohne einen Wirt fortpflanzen können [72]. Methodenbedingt zeigen diese immer nur den Anteil an infektiösen Viren nach Animpfen einer Zellkultur mit Virus-haltigen Proben [115]. Die oftmals verwendeten Einheiten sind entsprechend: TCID-*tissue culture infectivity dose* [72], oder PFU-*plaque forming unit* [217].

Tabelle 3: Verfügbare Zellkulturen für wasserrelevante, pathogene Viren.

Virus	Zellkulturassay	Referenz
Norovirus	Nein	
Adenovirus	Ja	[218], [217]
Enteroviren (Coxsackievirus, ECHO-Virus, Humanes Enterovirus)	Ja	[219]
Rotavirus	Nur Vermehrung	[220]

Eine besonders gut etablierte Zelllinie für die Detektion von enteralen Viren in Umweltproben (inklusive Wasser) stellt die *Buffalo green monkey* (BGM)-Zelllinie dar [219, 221]. Sie reagiert sehr sensitiv gegenüber Enteroviren und wird daher für die Detektion in Umweltproben, aber auch in Wasser- und Abwasserproben eingesetzt [222]. Die Etablierung als Standard-Zelllinie erfolgte im Rahmen einer Ringstudie, an welcher insgesamt 58 Labore

in den Vereinigten Staaten teilnahmen und sich auf Wachstums- und Infektionsbedingungen verständigten [219]. Auch für Adenoviren wurde ein Zellkultur-basierter Nachweis entwickelt. Für die wasserrelevanten Adenovirus Serogruppe F (HAdV 40, 41) wird die Zelllinie PLC/PRF/5 am häufigsten verwendet [217, 218]. Die Detektion erfolgt typischerweise mit Hilfe des sog. Plaque-Assays (siehe Abbildung 9). Dabei wird eine dekadische Verdünnungsreihe der Probe hergestellt, mit dem Wirt gemeinsam vorinkubiert und schließlich auf einer mit Agar-Medium beschichteten Platte inkubiert. Durch das Wachstum der Viren werden die Wirtszellen zerstört und es entstehen Löcher („plaques“) im Zellrasen. Diese werden gezählt [218]. Mit Hilfe dieser Technik können auch Bakteriophagen (wie MS 2 oder Φ X 174) als Indikatoren für enterale Viren in Wasser- und Umweltproben nachgewiesen werden [80, 99]. Die Nachweisgrenze der meisten Kulturmethoden liegt im Bereich von 1 lebenden Zelle in 1 mL bis 100 lebende Zellen in 100 mL [37].

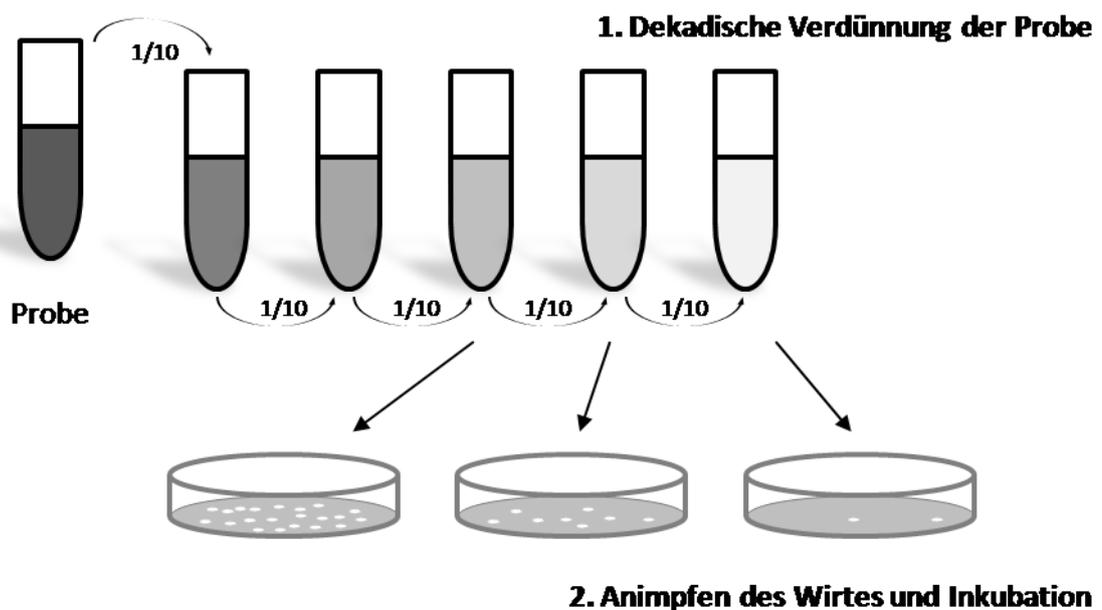


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Quantifizierung mittels Plaque-Assay.

Neben dem direkten Nachweis von Viren mittels Zellkultur, wird sie auch als Anreicherungsmethode im Vorfeld der Detektion verwendet. So werden beispielsweise Rotaviren in CaCo2-Zellen angereichert, während die Detektion infizierter Zellen schließlich mit indirekter Immunofluoreszenz und Durchflusszytometrie erfolgt [220]. Dieses Beispiel verdeutlicht die vielfältigen Anwendungsmöglichkeiten der (Zell)-Kultur als Detektions-, aber auch als Anreicherungsmethode für wasserbürtige Pathogene. Über Inkubation in selektiven

Medien oder Wirten, kann somit der Anteil bestimmter Pathogene erhöht und somit die Sensitivität der Detektionsmethode gesteigert werden [223]. Darüber hinaus decken sie die gegenwärtig von der TrinkwV geforderten bakteriellen Indikatoren gut ab [35]. Betrachtet man aber die Gesamtheit aller publizierten Kulturverfahren für Bakterien (nicht nur wasserrelevante), so gehören diese mit einer Quote von 95 % lediglich zu 5 von 53 bekannten Bakterien-Phyla [224]. Die Zahl der nicht abgebildeten, potentiellen Pathogene ist daher sehr hoch. Auch die Mehrheit der wasserbürtigen, pathogenen Viren kann mit Kulturverfahren nicht erfasst werden [2, 216]. Der verhältnismäßig hohe Aufwand für die Unterhaltung einer Zellkultur für die Virendetektion, sowie die teilweise sehr langen Inkubationszeiten (siehe Legionellen) zeigen andererseits deutliche Limitierungen für die Verwendung als Monitoring-Methode [225, 226]. Schließlich ist die (Zell)-Kultur oftmals nicht in der Lage, gestresste oder verwundete Bakterien nachzuweisen, da diese oftmals keine Kolonien bilden können [37, 215]. Das ist aber im Trinkwasser besonders häufig der Fall, da die Bakterien auf Grund von Nährstoffmangel meist hungern [224], oder ihre enzymatische Aktivität beispielsweise durch Chlorierung herabgesetzt ist [227]. Es wird daher angenommen, dass in Umweltproben maximal 1 % der im Mikroskop sichtbaren Mikroorganismen in der Kultur ein positives Ergebnis erzeugen [228]. Dennoch können sie ihre Infektösität behalten und unter entsprechenden Bedingungen wieder aktiv werden [224] (siehe Kapitel 2.1).

2.3.2. Molekularbiologischer Nachweis von Pathogenen

Nukleinsäure-Amplifikations-Tests (NAATs) sind die Methode der Wahl für die Detektion von Pathogenen (v.a. Viren) in Wasser- oder Umweltproben und gewinnen auch für die Untersuchung von Krankheitsausbrüchen, sowie das Hygiene-Monitoring zunehmend an Bedeutung [7, 229-232]. Mit ihrer Hilfe können Mikroorganismen und Viren anhand Spezies-spezifischer Sequenzen in ihrem Genom (z. B. Pathogenitätsfaktoren) identifiziert werden [42]. Nach der Extraktion der Nukleinsäuren aus den Proben und einer eventuellen Aufreinigung, erfolgt die Vermehrung bestimmter Abschnitte der Nukleinsäuren [146]. Hierdurch erfolgt zum einen die Identifizierung der Spezies, Gattung oder Familie etc. der Pathogene. Zum anderen wird die detektierbare Menge an Nukleinsäure erhöht, was auf Grund der geringen Menge an Nukleinsäure pro Bakterium und Virus (oftmals nur ein Molekül pro Individuum) notwendig ist [42, 72]. Als Voraussetzung für die Ablösung

etablierter Kulturmethode durch NAATs sind einfache Handhabung, geringe Kosten pro Messung und die Vergleichbarkeit zwischen verschiedenen Laboren wichtige Kriterien [230, 233, 234]. Die mögliche Verkürzung der Zeitintervalle für die Analyse der Proben, könnte die Etablierung eines Hygiene-Monitorings im Trinkwasser begünstigen. In diesem Zusammenhang werden Miniaturisierung und Automatisierung in geschlossenen Systemen ebenso als essentiell angesehen [235-237], wie die Möglichkeit der (idealerweise gleichzeitigen) Detektion von Viren und Bakterien mit der gleichen Methode [238].

2.3.2.1. Zellaufschluss und Nukleinsäureextraktion

Die Extraktion der Nukleinsäuren spielt für die Detektion und Identifikation von Pathogenen eine zentrale Rolle. Sie besteht aus zwei Phasen, dem Zellaufschluss und der anschließenden Reinigung der Nukleinsäuren. Zellaufschlussverfahren können in mechanische und chemische Verfahren eingeteilt werden [146]. Eine Auswahl häufig verwendeter Methoden ist in Tabelle 4 zusammengefasst. Da die genomische DNA und besonders RNA durch mechanische Beanspruchung leicht zerstört werden kann und deren Menge in Mikroorganismen und Viren begrenzt ist, werden chemische Extraktionsmethoden hier meist bevorzugt [146].

Nach der chemisch/enzymatischen Zellyse werden die Lysate meist durch einen Zentrifugationschritt geklärt, um anschließend die Nukleinsäuren aufzureinigen. Während der Reinigung werden Kontaminanten (wie z.B. DNAsen, RNAsen, Proteine, Kohlenhydrate, Lipide und andere Nukleinsäuren) entfernt, da sie die Detektion stören könnten [146]. Zusätzlich findet dabei oftmals eine gezielte, enzymatische Denaturierung von Proteinen mit z.B. *Proteinase K* statt [146]. Eine Zusammenstellung häufig verwendeter Trennprinzipien und Methoden ist in Tabelle 5 dargestellt.

Kommerzielle Kits zur Extraktion von Nukleinsäuren, wie sie auch in dieser Arbeit zum Einsatz kamen, nutzen meist eine Festphasenextraktion. Diese ist im Allgemeinen schneller und effizienter als Lösungs-basierte Methoden und kann für hohe Probendurchsätze in automatisierten Systemen angewendet werden [239, 240]. Das Trennprinzip beruht hierbei meist auf der Adsorption von Nukleinsäuren an Silikamatrizes in Zentrifugensäulchen oder magnetischen Silika-Nanopartikeln [239, 241]. Durch die (enzymatische) Lyse in einem Puffer mit hoher Konzentration an chaotropem Salz wird die elektrostatische Abstoßung zwischen Nukleinsäuren und der Silikaoberfläche herabgesetzt. Die Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen zwischen dem Zucker-Phosphat-Rückgrat der Nukleinsäure

und der Silikaoberfläche führt schließlich zur Adsorption [242]. Proteine werden unter diesen Bedingungen denaturiert und durch Waschschrte entfernt. Die Elution der Nukleinsäuren erfolgt in Lösungen geringer Ionenstärke. Weitere, geeignete Festphasen für die Adsorption von Nukleinsäuren sind Glasfasern oder (Amino)modifizierte Oberflächen [243, 244].

Tabelle 4: Auswahl mechanischer und chemischer Zellaufschlussverfahren [146, 240, 245].

Zellaufschluss	Methode	Beschreibung
Mechanisch	Mechanische Mühlen und Mörser	Zerreiben des biologischen Materials
	Ultraschall	Zerschmettern der Zellen durch Kavitationskräfte
	Potter-Elvehjem Verfahren	Zerstören der Zellen durch Scherkräfte
	Homogenisieren	Pressen des Materials durch eine kleine Öffnung mit hohem Druck
	Einfrieren und Auftauen	Perforation der Zellwände durch Eiskristalle
Chemisch	Erhitzen	Denaturierung der Zellmembran
	Phenol-Chloroform-Extraktion	Herauslösen der Membranlipide aus der Zellmembran
	Detergenzien (z.B. Natriumdodecylsulfat, Triton X-100)	Störung der Integrität der Zellmembran
	Komplexbildner (z.B. Ethylendiamintetraessigsäure)	Herauslösen von Lipopolysacchariden aus der Zellmembran
	Chaotrope Salze (z.B. Guanidiniumhypochlorid)	Denaturierung der Proteine in der Zellmembran
	Enzymatisch (z.B. Lysozym)	Denaturierung von Proteinen in der Zellmembran

Im Bereich des Trinkwassermonitorings wäre eine Übertragung von Extraktionsmethoden auf Mikro(fluidik)systeme von großem Vorteil, da somit eine große Probenzahl zeitnah, reproduzierbar und automatisiert bearbeitet werden könnten. Vielversprechende Ansätze verwenden meist Festphasenextraktion oder Gelelektrophorese [244, 246]. Weiterführende Literaturstudien zur Integration von Nukleinsäureextraktionsmethoden in Mikro(fluidik)systeme wurden von KIM ET AL. (2009) UND PRICE ET AL. (2009) verfasst [247, 248]. Die Auswahl der geeigneten Extraktionsmethode hängt sowohl vom Zielpathogen (Bakterium, Virus) und der Nukleinsäure (DNA oder RNA), als auch im besonderen Maße von der Probenmatrix ab. Bei der Quantifizierung der DNA-/RNA-Menge (und damit des Pathogens) mit Amplifikations-basierten Methoden, stellt die Extraktion der Nukleinsäuren einen kritischen Schritt im analytischen Gesamtprozess dar. Störsubstanzen (z.B. hohe Salzgehalte, Huminsäuren, komplexe Polysaccharide, Detergenzien) müssen während der Extraktion unbedingt entfernt werden, da sie die Ziel-DNA/-RNA, oder die Polymerase direkt beeinflussen können [249]. Die Konsequenz ist eine Inhibition der Amplifikationsreaktion und eine Verminderung der Amplifikationsrate. Dies führt zur Verfälschung der Quantifizierung und zur Verschlechterung der Nachweisgrenze [249, 250]. Da sich die Art der Störsubstanzen in jeder Probenmatrix (z.B. Blut, Fäzes, Flusswässer) unterscheiden, muss die Extraktionsmethode für eine bestimmte Anwendung stets optimiert und validiert werden. Durch Anpassung der verwendeten Reagenzien, Materialien und Automatisierung erreichen kommerzielle Kits Ausbeuten von annähernd 100 % [251]. Beispielsweise erreichte das auch in dieser Arbeit verwendete NucliSENS®-Extraktionskit von bioMérieux (Paris, Frankreich) für die Extraktion von Viren-DNA/RNA aus klinischen Proben (z.B. Plasma) über einen breiten Konzentrationsbereich hinweg eine Ausbeute von 96 % bis 107 % [251]. Darüber hinaus besteht die Möglichkeit, die Effizienz der Extraktionsmethode durch einen internen Standard bekannter Menge zu verfolgen [250]. Die Auswahl der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Extraktionsmethoden erfolgte auf Basis der Ergebnisse aus dem BMBF-Projekt PATH₂OGENSCAN, in welchem die Ausbeuten verschiedener, kommerzieller Kits für die Extraktion von viraler/bakterieller DNA aus Leitungswasser verglichen wurden. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Wahl und Optimierung der richtigen Extraktionsmethode einen wesentlichen Einfluss auf die Präzision und Reproduzierbarkeit Amplifikations-basierter Detektionsmethoden hat.

Tabelle 5: Auswahl gängiger Nukleinsäureextraktionsmethoden [146, 240, 245]

Trennprinzip/Methode	Beschreibung
Extraktion mit organischen Lösungen/ Phenol-Chloroform-Extraktion	Bildung eines Zwei-Phasen-Systems; Denaturierung von Proteinen durch starke Wasserstoffbrückenbindungen des Phenols führt zur Anreicherung in der organischen Phase; Lösung von Nukleinsäuren in der wässrigen Phase aus Tris/EDTA* (pH 7,5 bis 8); Verstärkung des Effektes durch chaotrope Verbindungen
Präzipitation/ Isopropanol- oder Ethanol-Fällung	Präzipitation durch Herabsetzen der Löslichkeit der Nukleinsäuren
Dichte/ (CsCl)-Dichtegradientenzentrifugation	Bildung eines stabilen Dichtegradienten in einer CsCl-Lösung; Trennung nieder- und hochmolekularer Nukleinsäuren durch Verteilung im Dichtegradienten
Molekulargewicht (hydrodynamisches Volumen)/ (Agarose)-Gelelektrophorese	Synthese einer Gelmatrix (aus z.B. Agarose, SDS-PAA*) mit modifizierbaren Eigenschaften (z.B. Porengröße, pH-Wert, denaturierende Komponenten); Trennung der Nukleinsäuren durch unterschiedliche Mobilität im elektrischen Feld
Adsorption an einer Festphase/ Ionentauscher, Silikamatrices	Ionentauscher: Bindung der negativ-geladenen Phosphatgruppen an positiv-geladene Ionentauscher; Elution durch Variation des pH-Wertes und Salzgehaltes des Laufmittels Silikamatrices: Adsorption von Nukleinsäuren an Silikaoberflächen in chaotropen Salzlösungen durch reduzierte elektrostatische Abstoßung; Elution in Lösungen mit geringem Salzgehalt durch elektrostatische Abstoßung

*Abkürzungen: EDTA – Ethylendiamintetraessigsäure; Tris - Tris(hydroxymethyl)-aminomethan; SDS - Natriumdodecylsulfat, PAA - Polyacrylamid

2.3.2.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Polymerase-Kettenreaktion-basierte Detektionsmethoden stellen aktuell die am besten etablierten Methoden für die Detektion von Pathogenen in Wasser- und Umweltproben dar [231]. Auf Grund der großen Zahl der verfügbaren PCR-basierten Detektionsmethoden, wird im Folgendem lediglich auf die häufigsten für die Detektion von Pathogenen in Wasser eingesetzten Methoden näher eingegangen. Das Prinzip der PCR ist in Abbildung 10 dargestellt. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten (Denaturierung, Anlagerung der Primer, Elongation) und wird so lang wiederholt bis ein Bestandteil des Reaktionsgemisches aufgebraucht ist (üblicherweise zwischen 35 und 45 Zyklen, 2 bis 3 Stunden) [146]:

1. Denaturierung (Schmelzen): Der als Vorlage dienende DNA-Doppelstrang wird durch Hitze (bis zu 95 °C) in zwei Einzelstränge getrennt. Dabei werden die Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Nukleotid-Basen aufgebrochen.
2. Anlagerung/Hybridisierung der Primer (*Annealing*): Durch Absenken der Temperatur auf 35 bis 65 °C wird die Anlagerung kurzer Oligonukleotide definierter Sequenz an die komplementären Stellen der Ziel-DNA gefördert. Diese markieren Start- und Endpunkt der zu amplifizierenden Sequenz.
3. Elongation (Polymerisation): Ausgehend von den angelagerten Primern beginnt eine Polymerase mit dem Einbau der zur Zielsequenz komplementären Nukleotid-Base und synthetisiert so den Antistrang / Gegenstrang. Je nach Temperaturoptimum der verwendeten Polymerase findet dieser Schritt bei 68 bis 72 °C statt.

Die meisten in der PCR eingesetzten Polymerasen können nur DNA amplifizieren. Soll RNA amplifiziert werden, so muss diese zuvor oder während der PCR mit Hilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden (RT-PCR) [42].

Polymerasekettenreaktion - PCR

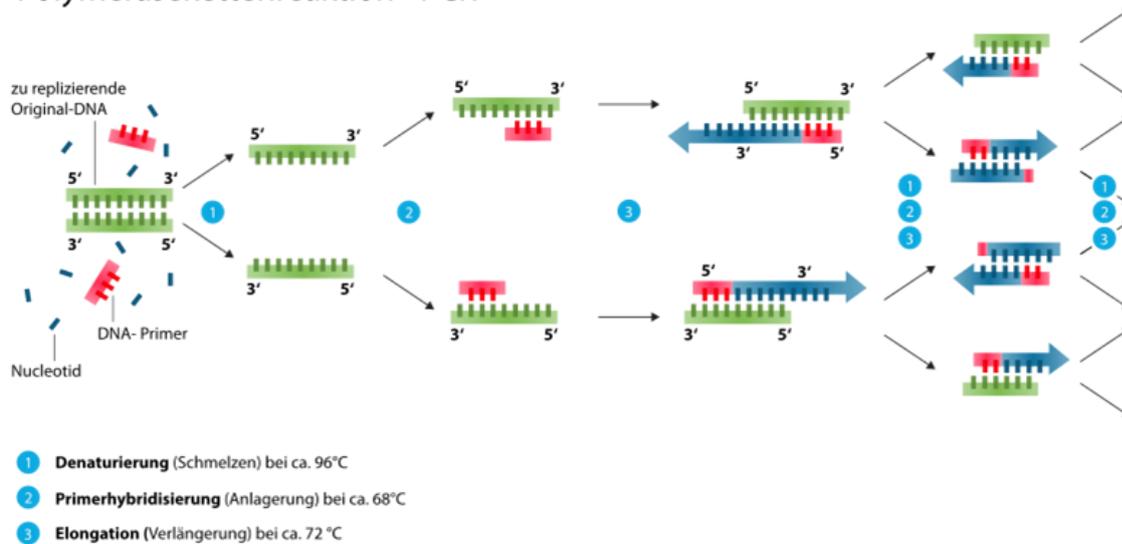


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Polymerase-Kettenreaktion. Bildquelle: www.Wikipedia.org [178]

Quantifizierung

Die Quantifizierung der Pathogene erfolgt entweder während der Amplifikation in der homogenen Phase (meist Fluoreszenz-basiert) [252] oder im Nachhinein durch Analyse der Amplifikationsprodukte. Hierfür werden die Amplifikate oftmals im Agarose-Gel oder in einer Kapillare [253] elektrophoretisch nach ihrer Größe getrennt, angefärbt (z. B. mit SYBR Green, Ethidiumbromid, Silberfärbung) und mit einem Größenstandard verglichen [146, 254]. Hierbei können auch eingeschränkte Aussagen über amplifizierte DNA-Menge getroffen werden [146]. Zu den neueren analytischen Möglichkeiten gehören Hybridisierungsassays (siehe unten), Biosensoren und Massenspektrometrie [255].

Die Quantifizierung der gewonnenen DNA während der Amplifikation wird als quantitative Echtzeit-PCR (qPCR, *real-time* PCR) bezeichnet und erfolgt meist unter Verwendung von Fluoreszenz-Markern. Dabei kommen meist interkalierende Marker, sowie molekulare Sonden zum Einsatz [146]. Interkalierende Farbstoffe (wie SYBR Green) lagern sich in dsDNA ein, wodurch sich ihre Fluoreszenz erhöht [256]. Da nach jedem Amplifikationszyklus mehr dsDNA in der Probe vorliegt, steigt auch das Fluoreszenzsignal mit jedem Zyklus an. Die Messung der Fluoreszenz erfolgt nach jedem Elongationsschritt durch Anregung der Fluoreszenz von SYBR Green bei einer Wellenlänge von 494 nm. Das bei 521 nm emittierte Licht wird von einem Photomultiplier aufgenommen und ist proportional zur Menge an

dsDNA in der Probe [146]. Eines der bekanntesten qPCR-Messsysteme, das SYBR Green für die Quantifizierung verwendet, ist der LightCycler 480 von Roche Diagnostics (Deutschland), welcher auch im Rahmen dieser Arbeit zum Einsatz kam [257].

Bei der Quantifizierung mit molekularen Sonden wird meist der Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) ausgenutzt [258, 259]. Die bekannteste Variante sind Hydrolyse- oder *TaqMan*-Sonden. Molekulare Sonden sind Oligonukleotide, deren Sequenz inmitten der amplifizierten DNA-Sequenz liegt. Außerdem besitzen sie einen Fluoreszenzfarbstoff (sog. *Reporter*) wie beispielsweise Fluoreszein, sowie einen Quencher. Bindet die Sonde während des *Annealing* an die Zielsequenz, so wird sie während der anschließenden Elongation durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase in einzelne Nukleotide gespalten. Auf diese Weise werden Fluorophor und Quencher räumlich getrennt und Fluoreszenz kann angeregt und aufgezeichnet werden [258]. Der Vorteil einer Sonde gegenüber einem interkalierenden Farbstoff liegt in der größeren Spezifität des Messsignals, da die Fluoreszenz nur nach korrekter Amplifikation erzeugt wird. Andererseits erfordert das Design entsprechender Sonden zusätzlichen Aufwand, was sich meist in den Kosten dieser Methoden widerspiegelt. Weitere häufig verwendete molekulare Sonden sind *Molecular beacons*, *Scorpions* und *Lux primers* [260, 261].

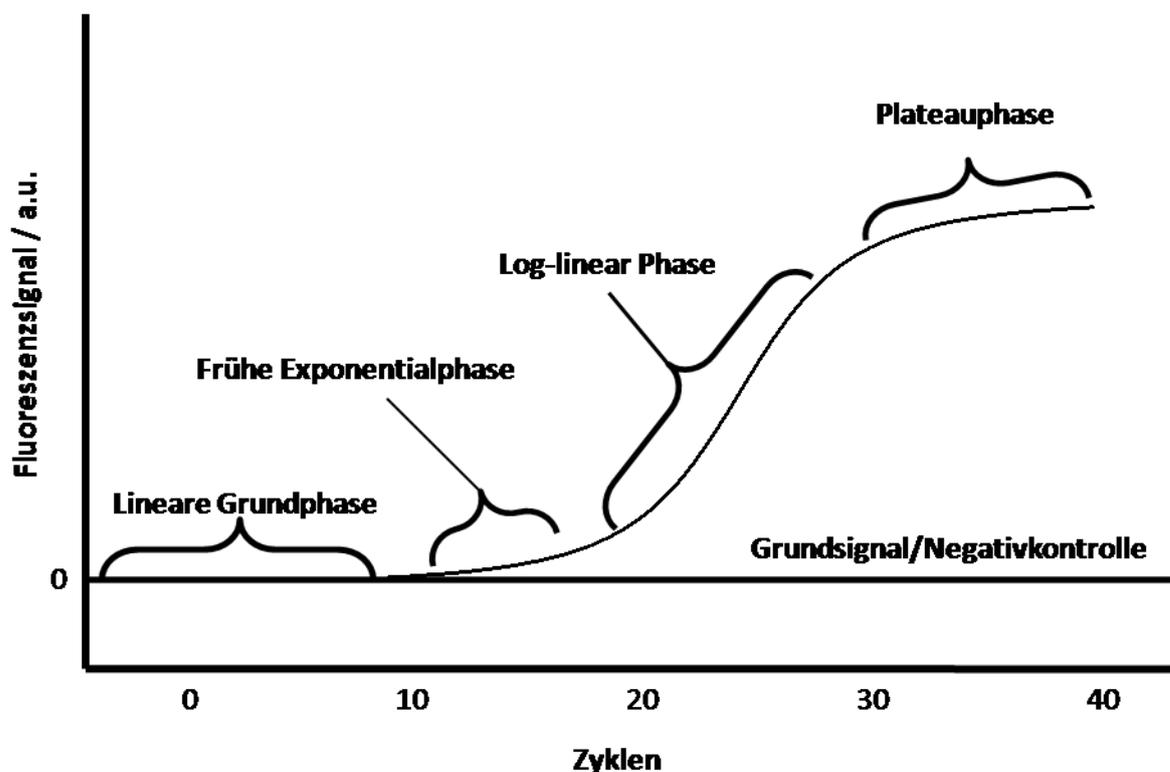


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer qPCR-Amplifikationskurve. Abbildung frei nach PURVES ET AL. (2006) [42] und LOTTSPREICH ET AL. (1998) [146].

Eine typische qPCR-Amplifikationskurve ist schematisch in Abbildung 11 dargestellt [260]. Sie beginnt mit einer linearen Grundphase, in welcher auf Grund der geringen Menge an DNA keine Fluoreszenz zu beobachten ist. Mit dem Eintritt in die Exponentialphase (Verdopplung der DNA-Moleküle mit jedem Zyklus) überschreitet das Fluoreszenzsignal das Hintergrundsignal und kann detektiert werden. Der Zyklus, in welchem das geschieht, wird als *crossing point* oder C_p -Wert bezeichnet und wird meist für die Auswertung der qPCR verwendet [262, 263]. Nach der exponentiellen Phase erreicht das Fluoreszenzsignal einen Maximalwert (Plateauphase), was einen Verbrauch der PCR-Reagenzien anzeigt [146, 260]. Die Berechnung des C_p -Wertes erfolgte in dieser Arbeit durch Bestimmung des Maximums der zweiten Ableitung der Amplifikationskurve (sog. *2nd-derivative maximum*-Methode) [262, 263]. Dieser Punkt kann mit anderen Kurven verglichen und so als relative Referenz für die eingesetzte DNA-Menge verwendet werden. Je kleiner der C_p -Wert einer Kurve ist, desto mehr DNA befand sich in der eingesetzten Probe. Die Quantifizierung von Proben mit unbekannter DNA-Menge erfolgt durch Vergleich des C_p -Wertes mit einer Standardkurve, welche aus einer Verdünnungsreihe mit bekannter DNA-Menge generiert wurde. Die erreichten Nachweisgrenzen der qPCR für Adeno-, Noro- und Enteroviren in verschiedenen Wassermatrizes liegen im Mittel bei 1 bis 10 Kopien/*genomic units* (GU) und einem mittleren Volumen von 10 bis 50 μL pro qPCR-Reaktion [32]. Die Standardkurve muss bei jeder Messung neu aufgenommen werden, da die Einstellung der verschiedenen Temperaturen (sog. *Thermocycling*) und damit die Aktivität der Enzyme stets leichten Schwankungen unterworfen ist [264].

Anwendungsbeispiele

qPCR und RT-qPCR finden für die Detektion von wasserbürtigen pathogenen Viren und Bakterien breite Anwendung. Ziele sind dabei oftmals Stellen des Genoms, die für spezifisch-vorkommende Enzyme oder Proteine kodieren. So verwendeten BEJ ET AL. (1990) beispielsweise für den Nachweis coliformer Bakterien und *E. coli* das für β -Galaktosidase kodierende Gen *lacZ* [265]. Durch Verwendung des Lambda (*lamB*)-Gens konnten sie neben den coliformen Bakterien und *E. coli* auch *Shigella spp.* und *Salmonella* detektieren [265]. Für die Detektion von *E. coli* in Wasser kommt häufig das spezifische Enzym β -Glucuronidase (Gen: *uidA*) zur Anwendung [266]. Auch Pathogenitätsfaktoren wie das *mip*-Gen

(*macrophage infectivity potentiator*) von *Legionella pneumophila* können für den Nachweis von pathogenen Spezies einer Art herangezogen werden [267]. So untersuchten MORIO ET AL. (2008) mit Hilfe des *mip*-Gens und qPCR über einen Zeitraum von ungefähr einem Jahr insgesamt 120 Wasserproben aus einem französischen Krankenhaus, um die Gefahr einer Legionellose-Ansteckung in diesem Umfeld zu analysieren [268]. Die Nachweisgrenze betrug 100 Genomische Einheiten (GU) pro Liter. Die Methode war insgesamt sensitiver als die Standard-Kulturmethode laut AFNOR (AFNOR T90-431), jedoch konnte keine 100-prozentige Korrelation zwischen Kultur und PCR gezogen werden [268]. Wie eine andere Studie von YARADOU ET AL. (2006) zeigte, hängt dies oftmals mit der Probenatur zusammen [269]. Hier wurden insgesamt 136 Heißwasserproben und 49 Kühlturmproben mittels qPCR und Kultur auf *Legionella pneumophila* hin untersucht. Die qPCR erwies sich dabei auch für große Probenzahlen und über einen langen Zeitraum (insgesamt 13 Monate) hinweg als praktikabel und reproduzierbar. Die Ergebnisse der Kultur und qPCR für die Heißwasserproben waren vergleichbar, während sich die Ergebnisse der Kühlturmproben stark unterschieden. Die qPCR detektierte deutlich mehr Pathogene als die Kultur, jedoch war der zeitliche Verlauf über 13 Monate hinweg in beiden Methoden gleich [269]. Es wurde daher vermutet, dass die Legionellen durch die zwischenzeitliche Desinfektion nicht in der Kultur nachgewiesen werden konnten, obwohl sie wie von der qPCR eindeutig angezeigt noch präsent waren [269]. Betrachtet man die langen Inkubationszeiten bei der Kultur von Legionellen, so erweist sich die qPCR ebenfalls als vorteilhaft.

Für die Detektion der Mehrzahl von wasserbürtigen, pathogenen Viren spielt die qPCR eine besonders wichtige Rolle, da oftmals passende Kulturmethode fehlen (siehe Kapitel 2.3.1). Heutzutage kommen qPCR-Methoden bei der Untersuchung von Viren, wie Noro-, Polio-, oder Enteroviren in großen Wasservolumina (> 1000 L) zum Einsatz [116, 138, 159, 160] und finden zunehmend Anwendung als Standardmethode [149]. Die Detektion erfolgt dabei nicht nur in Trinkwasser, sondern auch in Flusswasser [115, 216, 270], Oberflächenwasser [271, 272] und Abwasser [273]. Darüber hinaus wurde sie auch für die Überprüfung der Viren-Reduktionsleistung von Wasseraufbereitungsanlagen erfolgreich eingesetzt [274].

Miniaturisierung und Multiplexing

Der Arbeitsaufwand einer qPCR ist relativ hoch und im Vergleich mehrerer Labore kommt es oftmals zu großen Schwankungen in den Ergebnissen [33, 275]. Dies ist eine Konsequenz der aufwendigen Steuerung des *Thermocyclings*, wodurch auch der Aufbau von qPCR-

Messgeräten meist sehr komplex ist [264]. Sie sind daher für dezentrale Messungen eher ungeeignet [231, 264]. Es gibt jedoch zahlreiche Anpassungen der konventionellen PCR im Bereich der Miniaturisierung, Automatisierung und Multiparameteranalyse, welche Anpassungen an die Erfordernisse eines Routine-Monitoring-System ermöglichen könnten [276, 277]. Miniaturisierte, PCR-Detektionssysteme basieren oftmals auf der Detektion der Amplifikationsprodukte mit Hybridisierungsassays. Hierfür kommen unter anderem Biosensoren [278], Mikroarray-Chips [237], Lateral-Flow-Dipsticks [279] und Mikrobeads [280] zum Einsatz. Die Detektion erfolgt entweder Label-abhängig mit Fluoreszenz [281], Chemilumineszenz [282], elektrochemischer Detektion [283] oder Label-unabhängig (SPR, RIFS etc.) [284]. Viele dieser Methoden können für die Multiparameteranalyse verwendet werden. Dennoch gehen ihnen meist eine/oder mehrere konventionelle PCR-Reaktionen voraus, was den Arbeitsaufwand kaum reduziert. Andererseits gibt es zahlreiche Chip-basierte, miniaturisierte PCR-Methoden, da die Reaktionsgeschwindigkeit durch Reduzierung des Volumens erheblich gesteigert werden kann. Eine ausführliche Zusammenfassung über miniaturisierte PCR-Chips wurde von ZHANG UND XING (2007) verfasst [277].

Multiplex-qPCR-Methoden können beispielsweise mit molekularen Sonden (z. B. *TaqMan*-Sonden) durchgeführt werden [285]. Die *TaqMan*-Sonden werden dabei mit verschiedenen Fluorophoren markiert und können so gleichzeitig detektiert werden [260, 286]. Auf diese Weise konnten beispielsweise *E. coli* O175:H7, *Salmonella* spp. und *L. monocytogenes* in verschiedenen Lebensmitteln parallel nachgewiesen werden [287-289]. Die Anzahl der gleichzeitig nachweisbaren Analyte ist für diese Methoden jedoch durch die verfügbare Zahl der Fluoreszenzlabel limitiert [290]. Diese Limitierung konnte von PEMOV ET AL. (2005) durch Einbettung der qPCR auf einem Mikroarray überwunden werden [291]. Auf Hydrogel-Pads wurden Analyt-spezifische Primer immobilisiert, wodurch eine räumliche Trennung der Multiplex-qPCR in mehrere *pseudo singleplex-qPCR-Reaktionen* erreicht wurde (sog. *multiplex microarray-enhanced PCR*, MME-PCR) [291]. Die Multiplex-qPCR für sechs Gene von *Bacillus subtilis* wurde so in 60 unabhängige qPCR Reaktionen unterteilt. Da pro Gelpad nur ein spezies-spezifischer Primer immobilisiert ist und daher nur eine Amplifikationsreaktion stattfindet, konnte SYBR Green für die Detektion verwendet werden [291]. KHODAKOV ET AL. (2008) verwendeten ebenfalls MME-PCR für die gleichzeitige Detektion von HIV-1, sowie Hepatitis B und C Viren (HBV, HCV) [292].

2.3.2.3. Isotherme Amplifikationsmethoden

Auf Grund der Limitierungen der PCR für die Anwendung in dezentral einsetzbaren Messsystemen, finden isotherme Amplifikationsmethoden in solchen Systemen zunehmend Anwendung [293, 294]. Im Unterschied zur PCR erfolgt die Steuerung der Amplifikationsreaktion nicht durch Temperatur, sondern durch zusätzliche Enzyme und andere Proteine [295]. Eine Integration in kompakte, automatisierte (mikrofluidische) Messsysteme ist erheblich leichter, da keine komplexe Temperatursteuerung erforderlich ist und keine Temperaturschwankungen auftreten [296]. Darüber hinaus können die Enzyme dauerhaft bei optimaler Temperatur arbeiten, was die Reaktionszeit gegenüber der PCR erheblich verkürzt [297]. In den letzten Jahren wurde eine Vielzahl an isothermen Amplifikationsmethoden für den Einsatz in dezentralen Messsystemen entwickelt, deren Vorstellung in ihrer Gesamtheit den Rahmen dieser Arbeit jedoch deutlich übersteigen würde. Es wird an dieser Stelle daher auf die Zusammenfassungen von ASIELLO UND BAEUMNER (2011) [295], CRAW UND BALACHANDRAN (2012) [296], GILL UND GHAEMI (2013) [293], KHODAKOV UND ELLIS (2013) [294], sowie LI UND MACDONALD (2014) [298] verwiesen und nur ausgewählte Methoden eingehender dargestellt und verglichen.

Die Einteilung isothermer Amplifikationsmethoden erfolgt oftmals auf Grund ihres enzymatischen Mechanismus in vier Kategorien [233]:

- Methoden basierend auf RNA-Transkription,
- Methoden basierend auf DNA-Replikation mit enzymatischer Trennung der dsDNA / Anlagerung der Primer,
- Methoden basierend auf der Verdrängung produzierter DNA-Stränge (linear/ringförmig) durch die DNA-Polymerase,
- Methoden basierend auf Polymerase-Extension / Strangverdrängung und Einzelstrangschnitt.

Methoden basierend auf RNA-Transkription

Isotherme Amplifikationsmethoden dieser Kategorie können zwei Mechanismen nutzen. Zum einen wird die Ziel-RNA oder -DNA nach vorheriger cDNA-Synthese direkt amplifiziert. Zum anderen wird von der Ziel-Nukleinsäure ein RNA-Signal erzeugt, welches entweder zur Detektion oder zur Multiplikation des RNA-Signals genutzt wird [298]. Nukleinsäure-Sequenz-basierte Amplifikation (NASBA, siehe Abbildung 12) wird häufig für die Amplifikation *in vitro* eingesetzt [299]. Das Reaktionsschema ähnelt dem RNA-Replikationsschema von

Retroviren und verläuft über cDNA-Intermediate [299]. Es ist besonders gut für RNA-Analyte geeignet, benötigt jedoch leichte Temperaturanpassungen, da die erste Primer-Anlagerung bei 65 °C (P 1) stattfindet. Darüber hinaus muss der DNA-Strang vor der Reaktion bei 95 °C aufgeschmolzen werden. Die restliche Reaktion findet bei 41 °C statt [299].

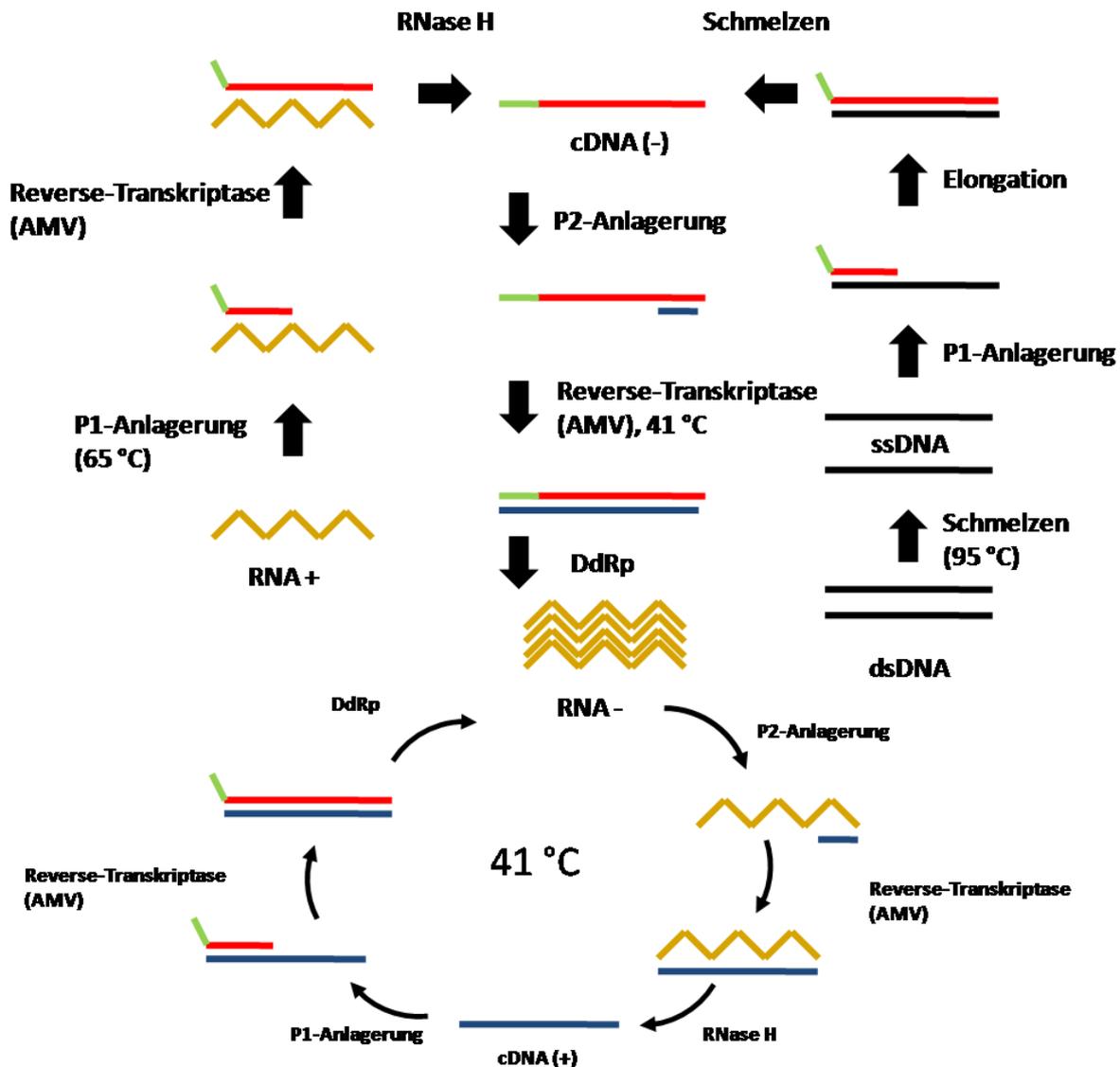


Abbildung 12: *Nucleic acid sequence-based amplification* (NASBA). Abbildung nach LI UND MACDONALD (2014) [298].

Zunächst bindet Primer P1 an die *sense*-RNA (RNA+). Hierfür trägt der Primer am 5'-Ende die Startsequenz für die T7-RNA-Polymerase. Eine AMV-Reverse-Transkriptase synthetisiert daraus ein RNA/cDNA-Hybrid. Ein Teil des Hybrides wird von RNase H degradiert, damit Primer 2 (P2) sich anlagern kann. Eine Reverse-Transkriptase aus dem Avian Myeloblastosis Virus (AMV) generiert nun ein DNA-Templat, welches die Startsequenz für die T7-RNA-

Polymerase besitzt. Das DNA-Templat wird schließlich von einer Nukleinsäure-abhängigen RNA-Polymerase (DdRp) in den *antisense*-RNA-Strang (RNA -) transkribiert [298]. Hierdurch entsteht ein Amplifikationszyklus. Soll DNA mit NASBA amplifiziert werden, so wird der Doppelstrang zunächst aufgeschmolzen und durch eine DNA-Polymerase in einen cDNA-Strang mit T7-RNA-Polymerase-Promoter umgeschrieben. Das Reaktionsprodukt der NASBA ist ssRNA, welche meist mit klassischen Methoden wie Gel-Elektrophorese und Ethidiumbromid-Färbung nachgewiesen werden [298]. Weiterhin erfolgt die Detektion zunehmend durch Hybridisierungsassays auf verschiedenen Plattformen mittels Lateral-Flow [300], Elektrochemilumineszenz [301-303] und elektrochemischer Detektion im Fluidiksystem [304]. Mit Hilfe molekularer Sonden (*molecular beacons*) konnte auch eine *real-time* NASBA entwickelt werden [305]. DOBNIK ET AL. (2014) entwickelten außerdem eine Mikroarray-basierte Multiplex-NASBA [306]. Eine weitere, häufig genutzte Amplifikationsmethode dieser Kategorie ist *signal-mediated amplification of RNA technology* (SMART) [307].

Methoden basierend auf DNA-Replikation mit enzymatischer Trennung der dsDNA / Anlagerung der Primer

Alternativ zur Denaturierung der dsDNA mittels Temperatur, können auch Enzyme diese Aufgabe übernehmen. Hierdurch vereinfacht sich das Reaktionsschema erheblich und die Amplifikation findet wahrhaft isotherm statt [298]. Der Reaktionsmechanismus der *helicase-dependent amplification* (HDA, siehe Abbildung 13) ähnelt der Replikationsgabel der *in vivo* DNA-Replikation [298, 308]. Die Denaturierung der dsDNA übernimmt dabei das Enzym Helikase, gemeinsam mit dem Hilfsprotein MutL (*methyl-directed mismatch repair protein*) und ATP (Adenosin-Triphosphat) als Cofaktor. Die Stabilisierung der getrennten Einzelstränge übernehmen Einzelstrang-bindende Proteine (SSB, *single strand binding proteins*), welche somit die Anlagerung von Primern ermöglichen. Diese Proteine können beispielsweise aus dem Bakteriophagen T 4 (z.B. die Proteine TA 32 oder RB 49 gene 32) gewonnen werden [298]. Die Primer werden von einer DNA-Polymerase (dem exo-Klenow-Fragment) verlängert, wodurch die Verdopplung des DNA-Templates erfolgt. Nach Beendigung der Replikation beginnt der Amplifikationszyklus von neuem [308]. Die gesamte Reaktion findet abhängig von den verwendeten Enzymen bei 37 °C oder 65 °C statt [295]. Die HDA wird üblicherweise mit Lateral-Flow [309, 310]- oder *real-time*- Detektion [311] gekoppelt. Durch die Weiterentwicklung der Enzyme (mittels Fusionierung) konnte Effizienz

der Amplifikation gesteigert werden. In der moderneren, sog. tHDA können so Amplifikate mit einer Länge von 2,3 Kilobasen generiert werden, während das Maximum in den ersten Anwendungen bei 400 Basen lag [308, 312]. Mit der tHDA gelang es GOLDMEYER ET AL. (2007) erstmals eine *real-time* RT-tHDA für die Detektion verschiedener RNAs aufzubauen und diese für die Detektion Methicillin-resistenter *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Blutproben einzusetzen [313, 314]. Durch Immobilisierung eines Primers auf einem Mikroarray, entwickelten ANDRESEN ET AL. (2009) eine On-Chip-HDA für die Einzel- und Parallel-Messung von MRSA und *Neisseria gonorrhoeae* (NG) [315]. RAMALINGAM ET AL. (2009) verfolgten für die Multiparametermessung einen anderen Ansatz und entwickelten einen 4-kanaligen mikrofluidischen Chip für eine *real-time* HDA [311]. Die Primer für verschiedene Reaktionen wurden lyophilisiert vorgelegt und die Probe an einer Stelle in den Chip injiziert. Auf Grund der Kapillarkräfte verteilte sich die Probe auf die vier Reaktionskammern und wurde prozessiert [311]. Weitergehende Studien implementierten sogar die Extraktion der Nucleinsäuren und zeigten somit das große Potential der HDA für den Einsatz in integrierten (mikrofluidischen) Messsystemen [316].

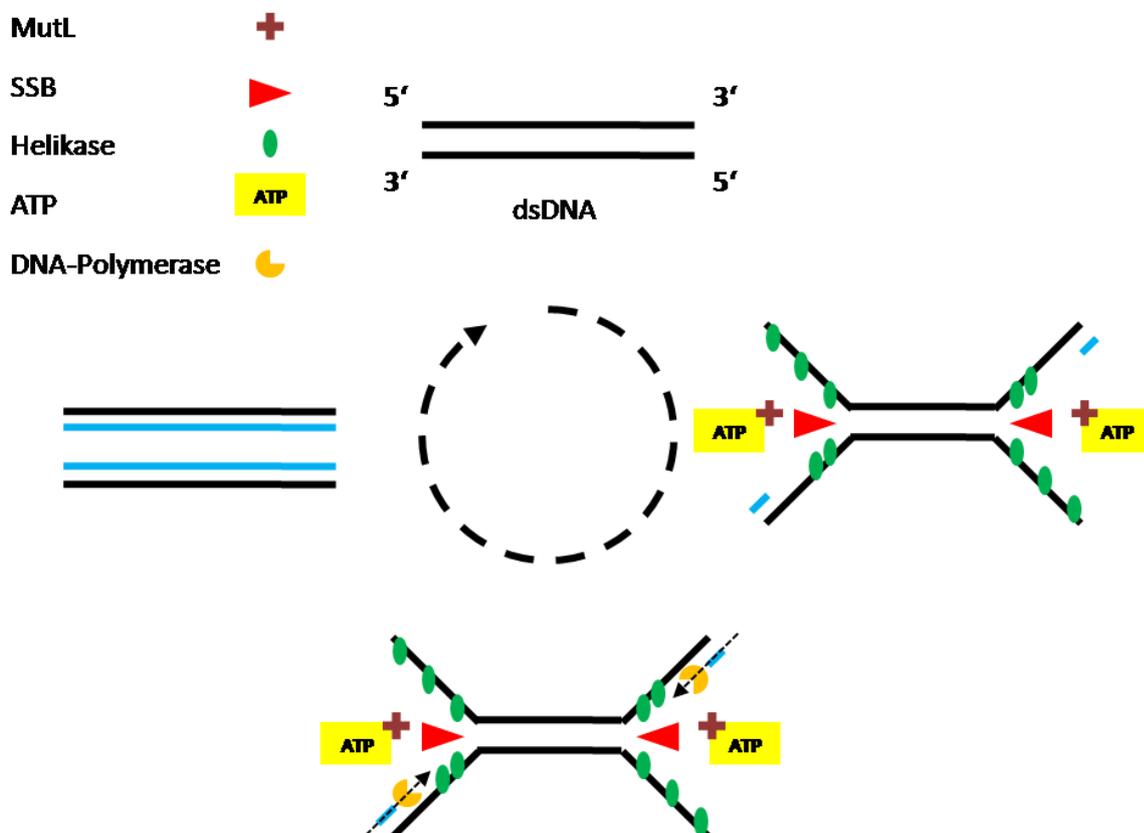


Abbildung 13: *Helicase-dependent amplification* (HDA). Abbildung nach LI UND MACDONALD (2014) [298].

PIEPENBURG ET AL. (2006) revolutionierten das HDA-System durch die Einführung der wesentlich effizienteren *recombinase polymerase amplification* (RPA, siehe Abbildung 14) [298, 317]. Ähnlich wie bei HDA wird die Denaturierung doppelsträngiger DNA enzymatisch, hierbei aber mit Hilfe sog. Rekombinasen katalysiert. Die dabei eingesetzten, Phagen-kodierten Rekombinasen sind in der Lage, alle für die Replikation der Phagen-DNA essentiellen Schritte wie Synthese, Reparatur und Rekombination durchzuführen [318]. Das Protein UvsX, welches beispielsweise in der Bakteriophage T4 oder T6 zu finden ist, spielt durch seine ATP-abhängige Strangaustausch-Aktivität (unter physiologischen Bedingungen) eine zentrale Rolle [318]. Die in der RPA eingesetzte T4 oder T6 UvsX-Rekombinase wird zusätzlich mit einem sog. UvsY-Protein aus der Bakteriophage Rb oder T4 (Rb 69 gp 32 UvsY, T4 gp 32 UvsY) kombiniert [317, 319]. Das Hilfsprotein unterstützt die Initialisierung und die Elongationsphase der DNA-Strangsynthese, wodurch die minimal notwendige Enzymmenge gesenkt und die Sensitivität der Rekombinase gesteigert wurden [320].

Der essentielle Schritt der RPA-Reaktion ist die Einstellung der Gleichgewichtsreaktion für die Bildung und den Zerfall eines Rekombinase-Primer-Komplexes (siehe Abbildung 14 A). Neben Hilfsproteinen und ssDNA-bindenden Proteinen (z.B. T4 gp 32) werden auch sog. *Crowding*-Reagenzien (z.B. Carbowax20M, Polyethylenglykol) eingesetzt [317, 319]. Mit ihrer Hilfe wird die natürliche Anwesenheit von Makromolekülen im umgebenden Medium der Enzyme (in der Zelle) simuliert, was sich positiv auf die Enzymaktivität auswirkt [321].

Die Rekombinase bindet in Anwesenheit von ATP kooperativ an Oligonukleotide (hier Primer) (siehe Abbildung 14 A). Der resultierende Nukleoprotein-Komplex hydrolysiert aktiv ATP. Durch spontanes Lösen des Komplexes kann es zum Austausch der Rekombinase durch ssDNA-bindende T4 gp32 Proteine (SSB) kommen, was essentiell für die Reaktion ist.

Der Rekombinase-Primer-Komplex scannt das dsDNA-Templat und katalysiert die Primer-Anlagerung (siehe Abbildung 14 B). Die getrennten ssDNA-Stränge werden durch die SSB-Proteine stabilisiert. Nach der Anlagerung des Primers löst sich die Rekombinase und eine DNA-Polymerase (wie z.B. *Bacillus subtilis* Pol I (Bsu) oder *S. aureus* Pol 1 (Sau polymerase) elongiert den Primer [317].

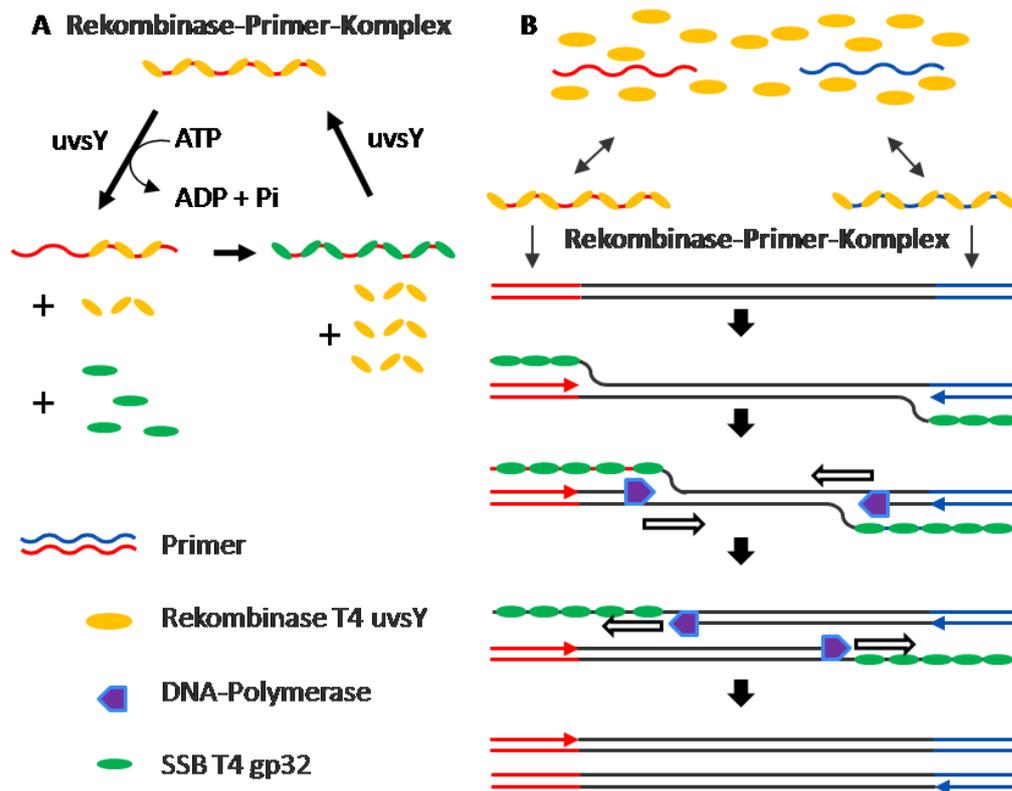


Abbildung 14: *Recombinase polymerase amplification* (RPA). Abbildung nach PIEPENBURG ET AL. (2006) [317].

Die optimale Arbeitstemperatur der RPA liegt zwischen 37 bis 42 °C und eine Reaktionszeit ab 20 min ist ausreichend, kann aber auf bis zu 60 min erhöht werden [293, 295]. Um bei der geringen Temperatur eine ausreichende Selektivität zu gewährleisten, sind RPA-Primer deutlich länger als PCR-, oder HDA-Primer (30 bis 35 bp). Die Detektion der Amplifikationsprodukte erfolgt ähnlich der PCR und HDA, meist durch Lateral-Flow [322-324] oder *real-time* Detektion mit Hydrolyse-Sonden [325, 326], elektrochemischer Detektion [327] oder auch Label-freier Detektion [328]. Des Weiteren hinaus besteht die Möglichkeit RNA ohne vorherige cDNA-Synthese zu amplifizieren. Hierfür muss lediglich eine Reverse-Transkriptase zur RPA-Reaktionsmischung hinzugefügt werden [325, 326, 329]. Auf Grund des einfachen Reaktionsschemas, der Robustheit gegenüber Inhibitoren und der Möglichkeit auf RNA zu detektieren ist RPA hervorragend für integrierte Lab-on-Chip-Systeme, sowie Point-of-Care-Systeme geeignet [298, 329]. So gelang AB DEL WAHED ET AL. (2013) die Entwicklung einer *Diagnostics-in-a-Suitcase*-Anwendung für die Diagnostik des Aviären Influenzavirus (H7N9) mittels RPA und zeigten die Anwendbarkeit der Methode im Ressourcen-armen Umfeld [330]. In einer ähnlichen Studie im Umfeld eines Ausbruchs der

Maul-und-Klauen-Säuche in Ägypten im Jahr 2013, konnten mittels RPA 98 % der positiven qPCR-Funde bestätigt werden, wobei die Messzeit pro Probe lediglich 10 min betrug [329]. Neben diesen Anwendungen für die homogene *real-time* (RT)-RPA, findet die RPA auch für integrierte Messsysteme breite Anwendung in Lab-on-Disk [297] oder Lab-on-Chip-Systemen [331], in welchen zunehmend auch die Probenvorbereitung automatisiert stattfindet. Diese Systeme sind auch für die Multiparameteranalyse geeignet. Viele Systeme verwenden jedoch meist homogene Formate, was die Zahl der parallel messbaren Parameter einschränkt [324]. Daher wird auch die Entwicklung Mikroarray-basierter On-Chip-RPA-Methoden vorangetrieben [324], welche jedoch aktuell nicht automatisiert sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RPA eingesetzt, um diese Lücke durch die Entwicklung einer automatisierten, Mikroarray-basierten On-Chip-RPA-Methode zu schließen [332].

Methoden basierend auf der Verdrängung produzierter DNA-Stränge (linear/ringförmig) durch die DNA-Polymerase

Neben der Adaption natürlicher Amplifikationsmechanismen, nutzen einige isotherme Amplifikationsmethoden während der Amplifikation ringförmige Nukleinsäure-Strukturen. Die verwendeten DNA-Polymerasen besitzen eine strangverdrängende Aktivität und generieren kontinuierlich wachsende Nukleinsäuren [298]. Zwei der häufig verwendeten Vertreter dieser Kategorie sind die *rolling circle amplification* (RCA) [333, 334] und die *loop-mediated isothermal amplification* (LAMP, siehe Abbildung 15) [335]. Die Reaktion besteht aus einem nichtzyklischen (Abbildung 15) und einem zyklischen (nicht dargestellt) Amplifikationsschritt, die beide durch eine *Bst* DNA-Polymerase (besitzt Strangverdrängende Aktivität) katalysiert werden [298, 335]. Die Reaktion findet bei 65 °C statt, da dies einerseits dem Temperaturoptimum des Enzyms entspricht und andererseits die Anlagerung der LAMP-Primer an die dsDNA ohne Denaturierungsschritt erfolgen kann.

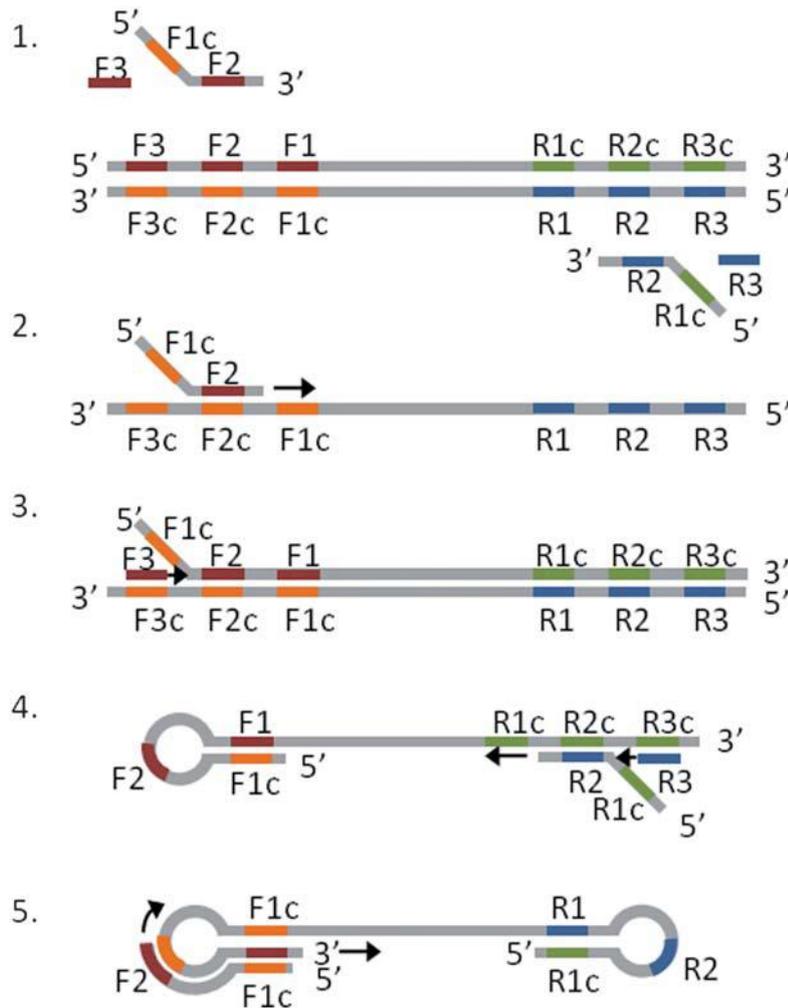


Abbildung 15: Loop-mediated isothermal amplification (LAMP). Nur der durch den *forward*-Primer initialisierte Prozess ist dargestellt. Bildquelle: ASIELLO ET AL. (2011) [295]. F und R stehen für *forward*- und *reverse*-Primer.

LAMP-Primer bestehen aus zwei Primerpaaren (Schritt 1): einem inneren (F1c-F2; R1c-R2) und einem äußeren (F3; R3). Während der nichtzyklischen Phase erkennt der innere *forward*-Primer (F2) die Zielsequenz auf der Ziel-DNA (F2c) und wird von der Polymerase amplifiziert (Schritt 2). Der äußere Primer (F3) bindet anschließend außerhalb des soeben generierten Amplifikates an seine Ziel-Sequenz (F3c, Schritt 3) und durch seine Elongation wird das in Schritt 2 generierte Amplifikat verdrängt. Durch die Hybridisierung der Sequenz F1c und F1 auf dem in Schritt 2 generierten Amplifikat entsteht eine Schleife (Schritt 4). Am anderen Ende dieses Amplifikates wird der R1c-R2-Primer verlängert und anschließend durch die Elongation des äußeren Primers R3 verdrängt (Schritt 4). Die resultierende Struktur mit Schleifen an beiden Enden tritt in die zyklische Phase ein und es entsteht eine Haarnadel-Struktur, in welcher die Ziel-DNA durch einen Zyklus aus Primer-Elongation und

Strangverdrängung multipliziert wird (Schritt 5) [295, 335]. LAMP ist die am häufigsten verwendete isotherme Amplifikationsmethode [298] und wurde mit diversen Detektionsmethoden (Endpunkt- und *real-time*) kombiniert [336, 337]. Die Detektion kann auch visuell erfolgen, da während der Amplifikation eine Trübung der Lösung durch Magnesiumpyrophosphat entsteht [338]. So entwickelten MORI ET AL. (2004) eine *real-time* Multiparameter-LAMP-Methode auf einem Mehrkanal-Turbidimeter [339]. Ein großer Vorteil von LAMP ist die hohe Selektivität, da eine Amplifikation nur nach erfolgreicher Anlagerung von 6 Primern erfolgt. Durch das Hinzufügen weitere Primer kann die Selektivität sogar noch erhöht werden [303, 340]. Daher wird sie oft für die Detektion von Pathogenen (Viren, Bakterien, Parasiten, Protozoen) eingesetzt [341, 342]. Durch die Integration in mikrofluidische Systeme wurde LAMP auch für Multiparameter-, Hochdurchsatz-Messmethoden etabliert [343, 344].

Methoden basierend auf Polymerase-Extension / Strangverdrängung und Einzelstrangsnitt

Methoden dieser Kategorie nutzen für die Multiplikation der Ziel-DNA eine Endonuklease-Restriktionsenzyme und eine strangverdrängende Polymerase [295]. Bekanntester Vertreter ist die *strand displacement amplification* (SDA, siehe Abbildung 15) [345, 346].

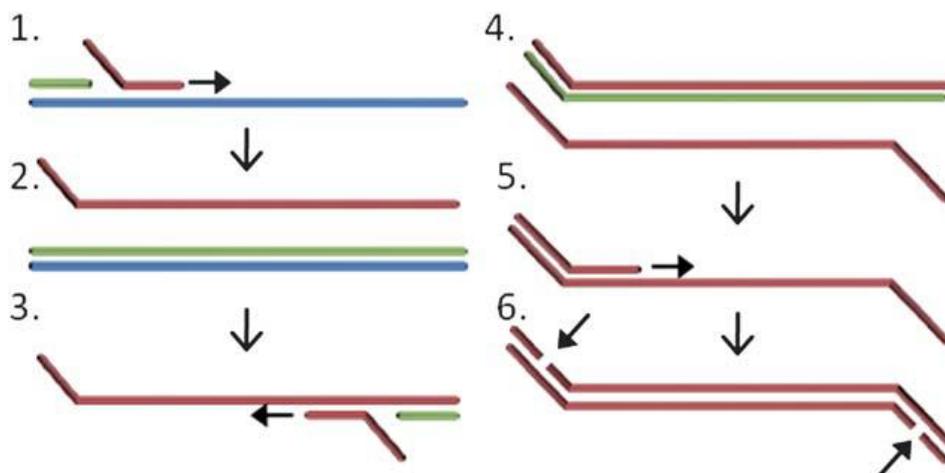


Abbildung 16: Strand displacement amplification (SDA). Es sind nur die initialen Prozessschritte dargestellt. Bildquelle: ASIELLO ET AL. (2011) [295].

Nach einer initialen Denaturierung der Ziel-DNA erfolgt die Anlagerung der *forward*-SDA-Primer (rot), welche zusätzlichen Zielsequenzen für Restriktionsenzyme besitzen (Schritt 1). Ähnlich wie bei LAMP wird der neu generierte Strang durch Elongation eines äußeren

Primers (*bumper primer*) verdrängt (Schritt 2). Der *reverse*-Primer und *reverse-bumper* Primer lagern sich an das amplifizierte Produkt an und Schritt 1 und 2 erfolgen, wobei während Schritt 2 ein ssDNA-Produkt verdrängt wird (Schritt 4). Ein *forward*-Primer bindet an dieses Produkt und ein dsDNA-Produkt mit Ziel-Sequenzen für das Restriktionsenzym wird generiert (Schritt 5). Das Restriktionsenzym schneidet (Pfeile) und durch erneute Anlagerung und Elongation entsteht ein neues ssDNA-Produkt (Schritt 6), das in einen Amplifikationszyklus aus Schneiden, Elongation und Verdrängung eintritt [295]. Die Detektion der Amplifikationsprodukte kann mit Hilfe der genannten Methoden erfolgen. SDA kann als alternative Vorstufe für LAMP oder *multiple displacement amplification* (MDA) dienen und spielt vor allem für die Entwicklung von Point-of-Care-Geräten für die klinische Diagnostik eine wichtige Rolle [298]. So wird seit 1999 ein kommerzielles Hochdurchsatz-Diagnosesystem für *Clamidia trachomatis* (CT), NG und das Humane Papilloma Virus (HPV) angeboten [347]. Darüber hinaus gibt es auch Multiplex-SDA-Systeme [348].

2.3.2.4. Vergleich der Amplifikationsmethoden

In Tabelle 6 sind die wichtigsten Informationen für die verschiedenen Amplifikationsmethoden nochmals zusammengefasst [293, 295, 296, 298]. In diesem Kapitel sollen sie im Bezug auf ihre Anwendbarkeit in dezentralen Detektionssystemen für das Hygiene-Monitoring verglichen werden. Der Fokus liegt dabei auf der Perspektive für die Entwicklung automatisierter, integrierter (mikrofluidischer) Systeme, in denen auch die Probenvorbereitung (wie Nukleinsäure-Extraktion) stattfinden soll. Wie bereits in Kapitel 2.3.2.2 hinlänglich beschrieben, ist die PCR auf Grund der komplexen Steuerung des *Thermocyclings* für dezentrale Systeme nur unzureichend geeignet [264]. Darüber hinaus stellen die schwankenden Temperaturen bei der Automatisierung in Fluidiksystemen ein Problem dar [264]. Durch Temperaturen bis zu 95 °C kann es zu Undichtigkeiten im System, sowie zum Ausgasen der Puffer kommen. Des Weiteren erfordert die Temperaturänderung eine komplexere Steuerung. Dies gilt ebenso für isotherme Amplifikationsmethoden mit einem initialen Heizschritt für die Denaturierung des Templates wie SDA, NASBA, sowie *rolling circle amplification* (RCA) [333] und *isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids* (ICAN) [349]. NASBA ist darüber hinaus eher für RNA geeignet, was das Anwendungsspektrum dieser Methode vor allem für die Multiparameteranalyse verringert.

Tabelle 6: Verschiedene Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden im Vergleich.

	PCR	NASBA	HDA	RPA	LAMP	SDA
Templat	DNA, (RNA)	RNA, (DNA)	DNA, (RNA)	DNA, (RNA)	DNA, (RNA)	DNA, (RNA)
Vortemperierung	Ja, 95 °C	Ja, 95 °C, 65 °C	Nein	Nein	Nein	Ja
Reaktionstemperatur	95 °C, 35 - 65 °C, 68 - 72 °C	37 – 42 °C	37 °C; 60 – 65 °C	37 – 42 °C	60 – 65 °C	37 °C
Anzahl der Enzyme	1 (2 für RNA)	2 - 3	2 (3 für RNA)	2 (3 für RNA)	1 (2 für RNA)	2 (3 für RNA)
Anzahl der Primer	2	2	2	2	Random Hexamers, 4 (6 - 8)	4
Primer-Design	Einfach	Einfach	Einfach	Einfach	Komplex	Komplex
Denaturierung	Hitze	Hitze, RNaseH	Helikase	Rekombinase	Hitze	Restriktionsenzyme <i>Bumper</i> Primer
Nachweisgrenze	10 Kopien/μL	10 Kopien/μL	10 Kopien/μL	10 Kopien/μL	10 Kopien/μL	10 Kopien/μL
Multiplex-Amplifikation	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Entwicklungsjahr	1983	1991	2004	2006	2000	1992
Wichtigste Literaturstelle	[350]	[299]	[351]	[317]	[335]	[345, 346]
Kommerziell erhältlich	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Anerkannt	Ja	teilweise	teilweise	Nein	teilweise	teilweise

HDA, RPA und LAMP erscheinen daher besser geeignet und wurden bereits in vielfältiger Form in dezentralen Messsystemen (inklusive *real-time*- und Multiplex-Anwendungen) eingesetzt. LAMP ist dabei sehr selektiv, jedoch sind das Primer-Design und das Reaktionsschema sehr komplex. Dagegen besitzen HDA und RPA ein einfaches Reaktionsschema und benötigen lediglich zwei Primer. Dabei sind sie sehr robust gegenüber Inhibitoren, wie dies auch für LAMP gilt. Bedenkt man, dass für ein Hygiene-Monitoring von Trinkwasser Viren eine wichtige Rolle spielen, so könnte das einfachere Primer-Design für RPA und HDA einen Vorteil bieten. Da das Genom von Viren sehr klein sein kann, könnte es für manche Viren schwer fallen, einen ausreichend großen, konservierten Bereich für LAMP zu finden. Des Weiteren lassen sich HDA und RPA durch Immobilisierung eines Primers sehr einfach für den Aufbau einer Multiparameteranalyse einsetzen. Da zudem die Sensitivität aller isothermen Amplifikationsmethoden ähnlich ist, erscheinen HDA und RPA aus praktischer Sicht als vielversprechendste Kandidaten für den Aufbau integrierter Multiparameter-Detektionssysteme, wobei die RPA die biochemisch effizientere der beiden Methoden darstellt.

2.3.2.5. Weitere Detektionsmethoden

Neben den (Zell)-Kultur-basierten und Genom-basierten Detektionsmethoden für Pathogene in Trinkwasser und anderen Wassermatrizes spielen immunologische Methoden eine wichtige Rolle [2, 37]. So wurden für coliforme Bakterien mehrere Antikörper entwickelt. Da es sich aber nicht um eine taxonmische Gruppe handelt, besitzen sie meist eine geringe Spezifität [37]. Beispielsweise erkennt der monoklonale Antikörper gegen das Antigen *enterobacteraceae common antigen* (ECA) nicht nur coliforme Bakterien, sondern auch *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Bacillus* und weitere Nichtcoliforme [352]. In Trinkwasser erreichte er eine Nachweisgrenze von 10^3 bis 10^7 Zellen/mL. Eine weitere Möglichkeit der immunologischen Detektion von coliformen Bakterien ist mittels ELISA. So kann *Raoultella planticola* beispielsweise durch einen ELISA-Test gegen das von ihm produzierte Histamin nachgewiesen werden [353]. Auch Viren (wie z. B. das Rotavirus) können immunologisch detektiert werden, wobei ELISA-Methoden, sowie Durchflusszytometrie angewendet werden [220, 354]. Im Vergleich zu Genom-basierten Methoden können immunologische je nach Format zwischen intakten und nicht intakten Bakterien unterscheiden, indem die verwendeten Antikörper beispielsweise gegen Antigene im Inneren des Bakteriums gerichtet sind. Mit Hilfe eines konjugierten Fluoreszenzlabels können somit lebende und tote

Bakterien mittels Durchflusszytometrie unterschieden werden [355]. Besonders die Durchflusszytometrie ist daher als schnelle Alternative zur Kultur, beispielsweise für die Serotypisierung von Legionellen gut akzeptiert [356]. Als Anpassung immunologischer Methoden für die dezentrale Analytik wurden auch Mikroarray-basierte Methoden [183], sowie Mischformen aus Genom-basierter und immunologischer Detektion (z. B. DNA-Immuno-Mikroarrays) entwickelt [357, 358].

Durch den Fortschritt in der Computer-Technologie werden auch Sequenzierungsmethoden zunehmend für Routine-Anwendungen interessant. Zudem ergibt sich durch *next generation sequencing*-Methoden die Möglichkeit, große Probenzahlen bei geringen Kosten zu prozessieren [359], was bei der traditionellen Sanger-Sequenzierung [360] nur eingeschränkt möglich war. Die Sequenzierung spielt besonders im Umfeld von Krankheitsausbrüchen auch für die Entdeckung neuer Pathogene eine wichtige Rolle, was mit allen anderen Methoden kaum möglich ist [159, 361, 362]. Schließlich werden auch Hybridisierungsmethoden wie die *fluorescence in situ hybridization* (FISH) für die Detektion von pathogenen Bakterien in Wassermatrizes eingesetzt [37, 363].

2.3.2.6. Lebend / Tod-Unterscheidung

Die Bestimmung der Vitalität von Mikroorganismen durch das Auszählen der Kolonien auf Agar-Platten mit nährstoffreichen, selektiven Medien nach einer gewissen Inkubations- und Vermehrungszeit ist weltweiter Standard [224]. Auf Grund der Limitierungen der Kultur, wie der unvollständigen Aussagekraft über metabolisch weniger oder inaktive Mikroorganismen oder das Fehlen von Zellkulturen für den Großteil pathogener Viren (siehe Kapitel 2.3.1), wurden alternative molekularbiologische Methoden für die schnelle Lebend / Tod-Unterscheidung entwickelt. Diese basieren oftmals auf der Exklusion, Aufnahme oder Metabolisierung gefärbter, fluoreszierender oder fluorogener Farbstoffe die eine Aussage über die reproduktive Vitalität der Mikroben zulassen [224]. Die Analyse dieser Färbemethoden erfolgt klassischerweise mikroskopisch, was zwar gegenüber der Kultur einen Zeitvorteil bietet, jedoch bei großer Probenzahl sehr arbeitsaufwendig ist und als sehr subjektiv betrachtet wird [224]. Abhilfe schaffen hierbei automatisierte Bildanalyse-Methoden [364] oder die (meist Antikörper-basierte) Durchflusszytometrie (siehe Kapitel 2.3.2.5). Durchflusszytometrie ermöglicht darüber hinaus die Betrachtung der Heterogenität einer Probe, da eine Einzel-Zell-Analyse stattfindet [224]. So ist sie in der Lage, nicht nur die Unterscheidung zwischen lebenden und toten Mikroorganismen zu treffen, sondern durch

Kombination mehrerer Marker auch die „Zwischenstufen“ aufzuzeichnen [224]. Die untersuchten Prozesse umfassen beispielsweise metabolische Aktivität, Membran-Aktivität / -Integrität oder Nukleinsäure-Gehalt. Eine ausführliche Beschreibung der verwendeten Reagenzien, sowie Anwendungen wurde von DAVEY ET AL. (2011) zusammengestellt [224].

Auch Genom-basierte Detektionsmethoden sind in der Lage, die Vitalität von Mikroben zu detektieren [365]. Da jedoch sowohl lebende als auch tote Mikroorganismen über Nukleinsäuren verfügen und besonders DNA in der Umwelt lange Zeit stabil ist, kann eine konventionelle PCR nicht zwischen lebenden und toten Mikroorganismen unterscheiden [365]. Auch die Detektion von mRNA als Vitalitätsmarker ist umstritten [365]. Eine potentielle Alternative stellen die EMA- oder PMA-PCR dar [365, 366]. Das Prinzip ist in Abbildung 17 dargestellt.

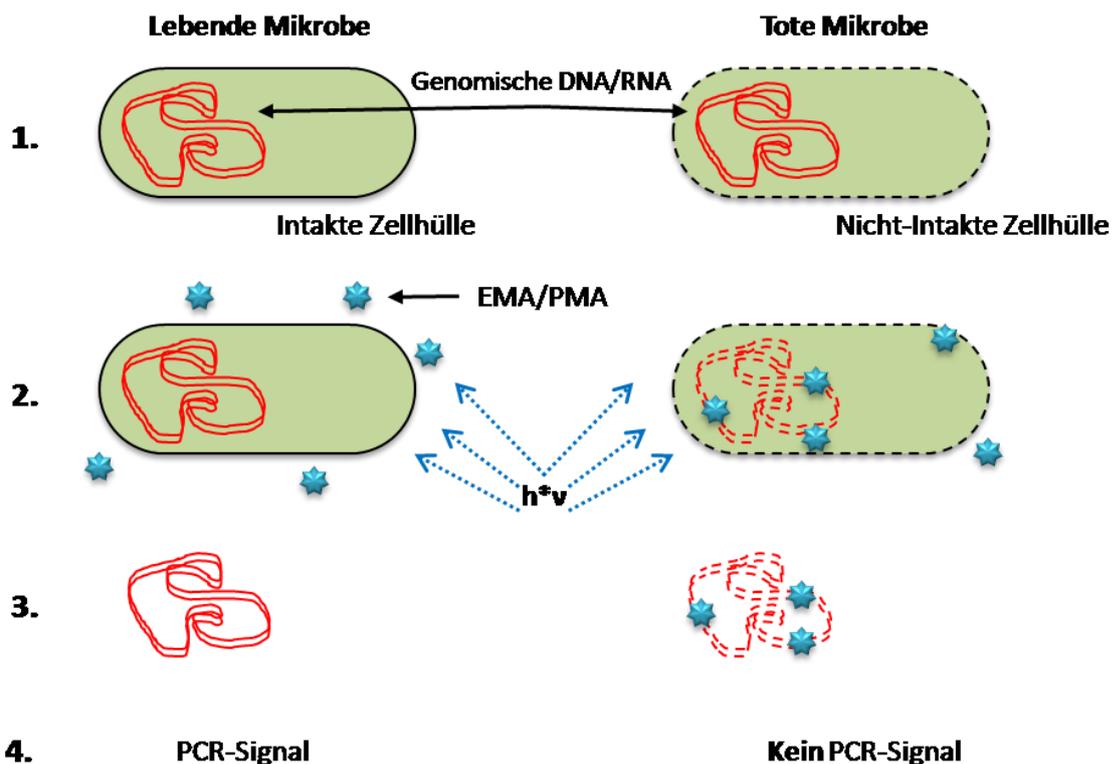


Abbildung 17: Schematische Darstellung der EMA- / PMA-PCR.

Die Proben werden vor der Nukleinsäure-Extraktion mit Ethidiummonoazid (EMA) oder Propidiummonoazid (PMA) vorinkubiert [366, 367]. Ist die Membranintegrität der Mikrobe gestört, kann EMA / PMA eindringen und interkaliert mit der DNA / RNA. Darüber hinaus werden auch freie Nukleinsäuren gebunden. Durch Photoaktivierung (EMA bei 460 nm; PMA

bei 510 nm) erfolgt die Ausbildung einer kovalenten Bindung zwischen der Azid-Gruppe und der DNA. Nach der Extraktion der Nukleinsäuren, werden die Proben einer PCR unterzogen. Dabei erhält man nur von der DNA intakter Mikroben ein Signal, da die kovalente Bindung der DNA bei toten Mikroben eine Amplifikation verhindert [366]. Da EMA auch in lebende Zellen eindringen kann und somit falsch negative Signale liefert, wird es in den meisten Anwendungen mittlerweile durch PMA ersetzt [366]. Darüber hinaus kann die PMA-PCR sowohl Bakterien, als für Viren verwendet werden [368, 369]. Auch die Kombination von PMA mit isothermen Amplifikationsmethoden wie NASBA oder LAMP wurde gezeigt [303, 370]. Der Nachweis der Vitalität mit PMA-PCR ist indirekt und die Ergebnisse kaum mit Kultur-Methoden vergleichbar, da kein Nachweis der Reproduzierbarkeit erfolgt. Stattdessen wird die Integrität der Zellmembran / Virenhülle als Indikator für die Vitalität untersucht. Im direkten Vergleich fallen die Ergebnisse für die PMA-PCR meist höher aus, da nicht alle lebenden Mikroben in der (Zell)-Kultur detektiert werden (siehe Kapitel 2.3.2.6.).

Eine größere Korrelation zwischen Kultur und molekularbiologischer Bestimmung der Vitalität kann für Viren die *integrated cell culture* PCR (ICC-PCR) liefern [371]. Sie überwindet zum einen Unfähigkeit der PCR, zwischen infektiösen und nichtinfektiösen Viren unterscheiden zu können. Zum anderen überwindet sie den Nachteil der kleinen Probenmengen (meist 10 bis 50 µL pro PCR-Reaktion), welche der Grund für die im Vergleich zur Kultur größere Nachweisgrenze der PCR ist. REYNOLDS ET AL. (1996) verwendeten die ICC-PCR für die Detektion von Poliovirus I in 20-L-Abwasserproben einer Trinkwasseraufbereitungsanlage in Honolulu, Hawaii [371]. Nach der Probenahme infizierten sie eine BGM-Zellkultur mit den Viren und inkubierten sie für 24 Stunden [371]. Nach der Extraktion der Nukleinsäuren wurde mittels RT-PCR die Virenkonzentration bestimmt. Dabei wurden Proben vor und nach der 24-stündigen Zellkultur, jedoch noch vor Ausbildung von Plaques durch Lyse der BGM-Zellen, verglichen. In den Proben vor der Inkubation wurden keine Viren detektiert, während die Proben nach 24-stündiger Zellkultur positiv waren. Die Ausbildung von Plaques konnte dagegen erst nach 3 Tagen Inkubation beobachtet werden [371]. Diese Methode hat den Vorteil einer direkten Korrelation zwischen der Infektiösität und dem PCR-Signal, bei einem gleichzeitigen Zeitvorteil gegenüber der Kulturmethode. Darüber hinaus wurden die Viren durch die Zellkultur angereichert [371].

2.4. Nachweis von Pathogenen in Trinkwasser: Bewertung der Ergebnisse

Um eine Bewertung oder einen Vergleich der Ergebnisse der vorgestellten Detektionsmethoden vornehmen zu können, ist es von fundamentaler Bedeutung, sich die verschiedenen Analyt-Eigenschaften vor Augen zu führen, die mit ihnen adressiert werden [25]. Die generierten Informationen, sowie die wichtigsten Vergleichsparameter sind daher in Tabelle 7 zusammengefasst dargestellt. Da dieses Kapitel eine Zusammenfassung darstellt, sei an dieser Stelle für die Einzelnachweise auf die entsprechenden Kapitel verwiesen.

Bakterien, Viren und Bakteriophagen werden durch (Zell)-Kultur-Methoden aufgrund ihres Wachstums, ihrer Reproduktionsfähigkeit oder Infektiösität nachgewiesen [25]. Bei den klassischen Kulturmethoden für Bakterien (MTF, MF) erfolgt die Selektion und Identifizierung meist aufgrund der Kulturbedingungen (z. B. spezifische Enzym-Profile) bzw. der Morphologie (Farbe, Form). Die Quantifizierung erfolgt durch Bestimmung des sog. Titers [372]: Die Probe wird dekadisch verdünnt und es wird die Verdünnung bestimmt, welche gerade noch eine biologische Wirksamkeit entfaltet. Der Titer errechnet sich aus der noch detektierbaren Verdünnung und dem Verdünnungsfaktor. Die Konzentration ist der Kehrwert des Titers. Eine statistisch abgesicherte Erweiterung des Titers ist die Bestimmung der *most probable number* (MPN) [373]. Die Bakterienkonzentration wird meist in koloniebildenden Einheiten pro Volumen-Einheit [KBE / V] und die Nachweisgrenze mit 1 KBE / 100 mL angegeben. Kulturmethoden für Bakterien können allerdings nur lebende, metabolisch aktive Bakterien detektieren. Darüber hinaus können Ergebnisse frühestens nach zwei Tagen erwartet werden. Dennoch sind sie einfach handhabbar und besitzen eine gute Selektivität und Sensitivität. Die Quantifizierung von Viren und Bakteriophagen erfolgt mit Hilfe einer etablierten Zellkultur, welche nur für eine geringe Zahl der wasserrelevanten Viren zur Verfügung steht. Die Detektion erfolgt meist mittels Plaque-Assay, wobei die Probe in dekadischer Verdünnung gemeinsam mit den Wirtszellen auf Agar-Platten kultiviert wird. Nach mind. 24 h werden die Löcher („plaques“) im Zellrasen gezählt und unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Konzentration bestimmt. Die Korrelation zwischen der Anzahl der Viren und Plaques ist jedoch nicht eindeutig. Darüber hinaus erfolgt der cythopathische Effekt (CPE) teilweise erst nach längerer Inkubationszeit [55, 374]. Die gängigen Einheiten sind [TCID₅₀]-*tissue culture infective dose* und [PFU]-*plaque forming unit*

[375]. Der $TCID_{50}$ stellt dabei den Titer des Virus dar, bei welchem 50 % der Wirtszellen zerstört sind. Im Vergleich zur Kultur von Bakterien ist eine Zellkultur deutlich aufwendiger.

Mikroskopie (z. B. nach zytologischer Färbung), Nukleinsäureamplifikation oder immunologische Detektion weist dagegen die physikalische Anwesenheit der Pathogene, jedoch nicht automatisch deren Infektiosität oder Lebensfähigkeit nach [25].

Genom-basierte Detektionsmethoden sind sowohl für Bakterien, als auch Viren und Bakteriophagen anwendbar. Die Selektion und Identifizierung erfolgt anhand von Spezies-spezifischen Sequenzen in ihrem Genom. Hiermit ist die Identifizierung von Spezies, Gattung und Familie möglich, wodurch das Anwendungsspektrum deutlich breiter ist als bei der Kultur. Darüber hinaus können mehrere Viren und Bakterien gleichzeitig detektiert werden. Durch die Verwendung von Sequenzierungsmethoden lässt sich das Spektrum sogar auf neue Spezies ausweiten. Die Messzeit ist im Vergleich zu (Zell)-Kulturmethoden wesentlich kürzer. Genom-basierte Detektionsmethoden verwenden meist eine Nukleinsäure-Amplifikation (PCR oder isotherme Amplifikation), da auf diese Weise eine definierte Sequenz selektiv vermehrt und detektierbar gemacht werden kann. Die gängigen Einheiten sind [*copies / V*], *genomic units* [GU / V] und DNA-Menge [g / V] und hängen von der Quantifizierungsmethode für den Vergleichs-Standard ab. Daher kann bei einer Quantifizierung des Standards mit Kultur auch KBE / V angegeben werden. Die Einheit [*copies*] entspricht der Anzahl der DNA-Moleküle in der Probe, wogegen [GU] die Anzahl der Kopien eines Gens darstellt. Wenn die Sequenz des Gens pro DNA-Molekül nur einmal vorkommt, so sind [*copies*] und [GU] als äquivalent zu betrachten. Ein Kritikpunkt an der PCR im Bezug auf die Verwendung als Detektionsmethode für Pathogene ist der nicht eindeutige Zusammenhang zwischen PCR-Signal und der absoluten, partikulären Anzahl. Da Bakterien einen Teil ihres Genoms als Plasmide kodieren und diese austauschen können, ist die Anzahl eines Gens pro Individuum nicht unbedingt konstant (Stichwort: „Horizontaler Gentransfer“). Bei Viren mit einem einzelsträngigen Genom ist die Korrelation leichter. Hier entspricht 1 GU einem Viruspartikel. Die Korrelation zwischen dem PCR-Signal und der tatsächlichen Anzahl der Pathogene ist also vom Analyten, sowie der Wahl des Gens abhängig. Im Vergleich zur Kultur können Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden allerdings nur die Ab- bzw. die Anwesenheit des Pathogen-Genoms detektieren und geben keine Auskunft über dessen Vitalität und Infektiosität. Ein negatives Ergebnis entspricht jedoch auf jeden Fall einem

negativen Kulturergebnis [224]. Um diese Lücke zu schließen, wurden Methoden für die Lebend / Tod-Unterscheidung mittels Nukleinsäure-Amplifikation, wie EMA- / PMA-PCR oder ICC-PCR entwickelt. Die EMA- / PMA-PCR nutzt einen interkalierenden Farbstoff, welcher nur bei fehlerhafter Integrität der Zellmembran oder Virushülle in das Bakterium oder den Virus eindringen kann und dort kovalent an das Genom bindet. Die Integrität der Zellmembran / Virushülle gilt dabei als Parameter für Vitalität / Funktionsfähigkeit. In der Folge werden in der EMA- / PMA-PCR nur lebende / intakte Mikroben detektiert. Das Prinzip ist auch mit isothermen Amplifikationsmethoden kompatibel, welche vor allem für den Einsatz in dezentralen Detektionssystemen zunehmend Verwendung finden. Mittels ICC-PCR kann sogar die Infektiosität von Viren bestimmt werden. Hierfür erfolgt zunächst eine Zellkultur der Probe, wobei nur infektiöse Viren selektiv vermehrt werden. Die Ergebnisse der anschließenden PCR entsprechen daher der Anzahl der infektiösen Viren in der Probe, sollten jedoch genauer als ein Plaque-Assay sein, da jeder Virus von der PCR erfasst wird.

Zytologische Färbemethoden können prinzipiell für Viren und Bakterien angewendet werden. Durch die Verwendung mehrerer Farbstoffe können Informationen über metabolische Aktivität, Membran-Aktivität / Integrität, sowie Nukleinsäure-Gehalt gewonnen werden, wodurch auch „Zwischenstufen“ von Vitalität (z.B. VNBC-Status) festgestellt werden können [224]. Die Detektion erfolgt meist mittels Durchflusszytometrie und wird als Ergänzung zur Kultur häufig angewendet [224]. Die lichtmikroskopische Analyse ist nur für Bakterien möglich und für eine große Probenanzahl zeit- und arbeitsaufwendig. Für Viren müssen besondere Techniken (wie Rasterelektronenmikroskopie) verwendet werden. Besonders für Viren ist jedoch die optische Bestimmung der Anzahl in Zweifel zu ziehen. Beispielsweise erzeugt HIV nach einer Infektion eine große Anzahl an leeren Virushüllen, um das Immunsystem des Wirtes zu überlasten [72]. Nur ein Bruchteil der optisch sichtbaren Viruspartikel ist daher tatsächlich infektiös [72], was die Aussagekraft der Mikroskopie relativiert.

Immunologische Detektionsmethoden werden sowohl für Bakterien, als auch Viren eingesetzt. Mit ihnen werden beispielsweise Metabolite im Kulturüberstand detektiert; oder sie sind gegen spezifische Proteine an der Oberfläche oder im Inneren der Pathogene gerichtet. Als Detektionsmethoden kommen oftmals ELISA oder Durchflusszytometrie zum Einsatz. Sie können daher die An-/ Abwesenheit von Pathogenen, sowie die metabolische

Aktivität von Bakterien detektieren. Jedoch ist die Verfügbarkeit, sowie die Spezifität der Antikörper ein limitierender Faktor.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass keine derzeit verfügbare Detektionsmethode in der Lage ist, alle Anforderungen für ein Hygiene-Monitoring und besonders für die damit zusammenhängende Risikobewertung zu erfüllen [25]. Da außerdem verschiedene Informationen generiert werden, ist eine direkte Vergleichbarkeit der Ergebnisse kaum möglich [224]. Genom-basierte Verfahren und besonders Nukleinsäure-Amplifikationsmethoden sind kein unbedingter Ersatz für Kulturmethoden, können aber vor allem für das Monitoring und bei Ausbrüchen eine wertvolle Ergänzung sein, da sie schnell und sehr variabel sind [268]. Da Viren als Hygiene-Parameter immer stärker in den Fokus rücken, müssen die aktuellen Methoden ergänzt werden [79].

Tabelle 7: Vergleich und Informationsgehalt verschiedener Detektionsmethoden für Pathogene in Trinkwasser.

Methoden	Analyt	Selektion	Was wird gemessen?	Gängige Einheiten /Sensitivität* ¹	Messzeit/ Probenvolumen	Information/ Ergebnis* ²
(Zell)-Kultur-basiert						
MTF	Ganze Bakterien	Kulturbedingungen	Enzymatische Spaltung von Laktose	Titer, MPN 1 Zelle/100 mL (Coliforme Bakterien) [37]	2 x 48 h Meist 100 mL	Met. A.(Vitalität), Rep.
MF	Ganze Bakterien	Kulturbedingungen	Enzym-Profil, Morphologie (Farbe, Form)	KBE/V, MPN 1 Zelle/100 mL (Coliforme Bakterien) [37]	> 24 h bis Tage z.T. ≥ 100 mL	Met. A.(Vitalität), Rep.
Zellkultur	Ganze Viren, Bakteriophagen	Kulturbedingungen, Zelllinie	Plaques in einem Zellrasen	PFU/V, TCID ₅₀ 1 PFU/100 mL [206]	> 24 h ≥ 1 mL	Inf., Rep.
Molekularbiologisch						
PCR	DNA, RNA von Bakterien, Viren, Bakteriophagen	Genomsequenz	Menge eines Amplifikates definierter Sequenz	<i>Copies</i> (Kopien)/V, GU/V, DNA-Menge [g]/V, KBE/V, weitere 10 copies/ µL (siehe Tabelle 4)	10 min bis 3 h ICC-PCR (24 h) Wenige µL	An- / Abwesenheit des Genoms Mem. I.(Vitalität)
Iso Amp. Sequenzierung	s.o.	s.o.	s.o.			
EMA/PMA- PCR/IsoAmp	s.o.	s.o.	s.o.			
ICC-PCR	Ganze Bakterien, Viren	Kulturbedingungen, Zelllinie, Genomsequenz	s.o.			An- / Abwesenheit des Genoms, Inf., Rep.
FISH	Ganze Bakterien, Viren	Genomsequenz	mRNA	1 Zelle/mL (Coliforme Bakterien) [37, 363]	Mehrere Stunden Wenige mL	Met. A.(Vitalität)

Methode	Analyt	Selektion	Was wird gemessen?	Gängige Einheiten /Sensitivität* ¹	Messzeit	Information/ Ergebnis* ²
Zytologische Färbung	Bakterien	Farbstoffeigenschaften	Ort, An/Abwesenheit des Farbstoffs	Zellen/V 20 CFU/100 mL (Coliforme Bakterien) [37]	min bis h ≤ 100 mL	Met. A., Mem. A./I., Nukleinsäure- Gehalt (Abstufungen der Vitalität)
Immunologisch						
ELISA	Ganze Bakterien, Viren	Antikörper	Stoffwechselprodukte, Antigene (außen, innen)	Zellen/V 10 ³ Zellen/mL (ELISA, Coliforme Bakterien) [37]	min bis h 50 µL bis wenige mL	Met. A.(Vitalität), An- /Abwesenheit
Durchflusszytometrie	s.o.	s.o.	s.o.	10 ⁴ Zellen/mL (Zytometrie, Legionella p.) [376]	s.o.	s.o.

*¹ Angegeben ist jeweils die bestmögliche Sensitivität der in dieser Arbeit verwendeten Literaturstellen. *²Abkürzungen: (Met. A.) Metabolische Aktivität; (Mem. A.) Membranaktivität; (Mem. I.) Membranintegrität; (Rep.) Reproduktionsfähigkeit; (Inf.) Infektiösität;

3. Ergebnisse und Diskussion

3.1. Machbarkeitsstudie: Aufkonzentrierung von Bakteriophage MS 2 in Wasserproben großer Volumina

Die deutsche Trinkwasserverordnung (Trinkwasserverordnung – TrinkwV 2001) beurteilt die Trinkwasserhygiene anhand einiger weniger bakterieller Indikatororganismen (z. B. *E. coli*, *Enterokokken*). Pathogene Viren besitzen im Vergleich zu Bakterien jedoch ein 10 bis 10 000-fach höheres Infektionspotential [76] und sind teilweise stabil gegenüber verschiedenen Desinfektionsmethoden [377]. Aus diesen Gründen kann die Anwesenheit viraler Pathogene nicht mit bakteriellen Indikatoren korreliert werden [378]. Um diesen Bedingungen gerecht zu werden, nahm die WHO eine Anpassung der Risikobewertung für Viren (beispielsweise Rotaviren) in Trinkwasser vor. Die hier zu erwartenden Virenkonzentrationen sind zwar sehr gering, stellen aber auf Grund des direkten Konsums eine erhebliche Gesundheitsgefahr dar [76, 378]. Der Richtwert von < 1 Rotavirus in 32 m³ Trinkwasser (2008) [27] wurde daher auf < 1 Rotavirus in 90 m³ Trinkwasser (2011) [25] gesenkt. Die notwendige Probenmenge, wie auch die notwendige Nachweisgrenze sind jedoch mit den aktuell verfügbaren Detektionsmethoden für Viren nicht ohne weiteres vereinbar. Eine Aufkonzentrierung der Viren im Vorfeld der Detektion ist unabdingbar und die Wahl einer geeigneten Methode ist von vielen Parametern (wie Art der Wasserprobe, Zielvirus / Zielmikrobe etc.) abhängig [143].

Im Rahmen der Dissertation von LU PEI (2015) wurde ein 3-stufiger Prozess entwickelt, welcher die Aufkonzentrierung von Pathogenen in Trinkwasservolumina von > 10 m³ ermöglichte [32]. Durch Kombination einer unselektiven Ultrafiltration mit einer Monolith-basierten, selektiven Adsorptionsfiltration und einer zentrifugalen Ultrafiltration wurde ein Aufkonzentrierungsfaktor von $2,4 \times 10^5$ ermöglicht. Des Weiteren konnte der Prozess auch auf Trink- und Grundwasser bis zu einem Volumen von 30 m³ angewendet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Anwendbarkeit des Prozesses auf Volumina von bis zu 90 m³ Trinkwasser, wie von der WHO vorgeschlagen, hin überprüft. Die experimentellen Details sind in Kapitel 6.3 dargestellt. Dies geschah im Umfang einer Machbarkeitsstudie, da

der gesamte Aufkonzentrierungsprozess im Zuge des Projektes EDIT, sowie in einer weiteren Doktorarbeit weiterentwickelt wurde. Als Modellmikrobe wurde die Bakteriophage MS 2 gewählt. Auf Grund ihrer geringen Größe von ca. 25 nm, ihrer Nichtpathogenität gegenüber Menschen und ihrer Verbindung zu fäkalen Verunreinigungen stellt sie die ideale Modellmikrobe für Viren im Allgemeinen dar [99, 379]. Darüber hinaus konnte die Quantifizierung der Bakteriophage MS 2 mittels Kulturverfahren (Plaque Assay, siehe Kapitel 6.2.2) und mittels qPCR erfolgen, woraus sich die Möglichkeit des Vergleichs beider Methoden ergab. Im Plaque Assay konnten die Proben ohne weitere Vorbereitung eingesetzt werden. Für die Quantifizierung mittels qPCR wurde die RNA der Bakteriophagen MS 2 zunächst extrahiert (NucliSens® -Kit von BioMérieux) und anschließend in cDNA revers transkribiert. Da dies eine Machbarkeitsstudie darstellte, wurde die aufgestockte Bakteriophagen-Menge hoch genug eingesetzt, sodass sie im 20-L-Eluat der Ultrafiltration mit ausreichender Sicherheit quantifiziert werden konnte (LOD der verwendeten qPCR: 10^2 GU/ μ L).

3.1.1. Ultrafiltration

Den ersten Teilprozess der Aufkonzentrierung stellt eine Ultrafiltration dar. Diesem Teilprozess kommt eine wichtige Rolle zu, da hier die Probenahme stattfindet. Aus Probenvolumina von bis zu 98 m^3 wurde ein transportfähiges Konzentrat von ca. 20 L gewonnen, welches im Labor weiter aufkonzentriert werden konnte. Das hierfür verwendete Instrumentarium wurde im Rahmen der Doktorarbeit von MARTIN RIEGER (2011) entwickelt und ist in Kapitel 6.3.1 dargestellt und beschrieben [31]. An einer Polyethersulfon-Hohlfasermembran sollten alle Partikel, die größer als die Porengröße der Membran sind, zurückgehalten und im fluidischen System angesammelt (Membranfläche: 6 m^2 , Porengröße: 20 nm). Die Filtration konnte im sog. *Crossflow*- oder *Dead-end*- Modus durchgeführt werden. Die Filtrationsgeschwindigkeit betrug 23 bis 26 L/min. Auf Grund der großen Probenvolumina konnte die Probe nicht vorab hergestellt werden. Darüber hinaus betragen die zu erwartenden Prozesszeiten z. T. mehrere Tage. Daher wurde der Versuchsaufbau im Freigelände des Institutes platziert und das Ultrafiltrations-Setup direkt an eine Trinkwasserleitung des Institutes angeschlossen. Das Trinkwasser wurde im Institut analysiert und ergab folgende Ergebnisse: pH 7,6; $< 0,01$ NTU Turbidität; $0,461 \pm 0,032$ mg/L TOC; $433\ \mu\text{S/cm}$ Leitfähigkeit. Während der Filtration wurde kontinuierlich eine

Bakteriophagensuspension in den Stoffstrom gegeben. Durch ständiges Rühren der Suspension und regelmäßige Beprobung sowie Austausch der Feed-Lösung, wurde die Qualität bzw. Konzentration der Suspension verfolgt und bei der Auswertung der Ergebnisse berücksichtigt. Dies war besonders wichtig, da eine Abschirmung des experimentellen Aufbaus gegenüber den Witterungsverhältnissen nicht möglich war. Nach der Filtration wurde das Retentat durch einen Rückspülschritt von der Filtratseite mit ~ 20 L filtriertem Leitungswasser und einem Druck von 2,5 bar eluiert. Das Volumen des Eluates wurde bei der Auswertung ebenfalls berücksichtigt. Die Ergebnisse der Machbarkeitsstudie für die Aufkonzentrierung von Bakteriophage MS 2 in Trinkwasserproben von bis zu 90 m^3 sind in Tabelle 8 (Plaque-Assay) und Tabelle 9 (qPCR) zusammengefasst. Die Filtration von 32 m^3 und 34 m^3 Trinkwasser benötigte sowohl im *Crossflow*-, als auch im *Dead-end*-Modus, zwischen 22 h und 24 h. Die Filtration von 98 m^3 gelang ohne Verblocken der Membran in 69 h bis 72 h (ca. 3 Tage). Die Aufkonzentrierung mittels *Dead-end*-Ultrafiltration erzielte insgesamt höhere Wiederfindungen als *Crossflow*-Filtration. Dies wurde mit beiden Quantifizierungsmethoden beobachtet und könnte durch höhere Scherkräfte während der *Crossflow*-Filtration erklärt werden. Die besten Wiederfindungen ergab die *Dead-end*-Filtration von 34 m^3 mit $32 \pm 4 \%$ (qPCR) und $11 \pm 5 \%$ (Plaque Assay). Die *Dead-end*-Filtration von 98 m^3 ergab vergleichbare Ergebnisse in der qPCR ($21 \pm 3 \%$). Die geringe Wiederfindung im Plaque Assay ($0.8 \pm 0.3 \%$) deutet jedoch eine Inaktivierung der Bakteriophagen auf Grund der langen Verweilzeit im experimentellen Setup an. Physikalischer Stress, sowie Agglomeration könnten hierfür verantwortlich sein. Dennoch wurde ein Netto-Aufkonzentrierungsfaktor (AF) von $1,0 \times 10^3$ erzielt, welcher vergleichbar mit dem volumetrischen Aufkonzentrierungsfaktor war ($4,9 \times 10^3$). Insgesamt fallen die mittels qPCR ermittelten Wiederfindungen und Aufkonzentrierungsfaktoren höher aus, als die Ergebnisse des Plaque-Assays. Der Unterschied zwischen qPCR und Plaque-Assay wird mit steigendem Probenvolumen deutlich größer. Dies ist mit der unterschiedlichen Art der Detektion zu erklären. Während die qPCR das Genom intakter, sowie nicht intakter Phagen quantifiziert, werden im Plaque-Assay lediglich infektiöse Phagen detektiert. Eine Beeinträchtigung der Infektiosität durch die längere Verweilzeit während der 98-m^3 -Filtration wirkt sich folglich stärker auf den Plaque-Assay aus als auf die qPCR. Es scheint folglich von Vorteil zu sein, die Dauer der Filtration als zeitlich intensiven Schritt zugunsten der Wiederfindung zu minimieren.

Tabelle 8: Aufkonzentrierung von Bakteriophage MS 2 in Leitungswasserproben mittels Ultrafiltration. Ergebnisse der Analyse mittels Plaque-Assay. AF (brutto) ist der volumetrische Aufkonzentrierungsfaktor, während AF (netto) den tatsächlichen Aufkonzentrierungsfaktor darstellt. m = 3, n = 1.

V / m ³	UF	Fluss / m ³ h ⁻¹	MS 2 (Probe) / PFU	MS 2 (Eluat) / PFU	AF (brutto)	Wiederfindung / %	AF (netto)
32	CF	1.35	6 × 10 ⁹ ± 1 × 10 ⁹	64 × 10 ⁶ ± 6 × 10 ⁶	1,6 × 10 ³	1.1 ± 0.3	18
34	DE	1.54	2,4 × 10 ⁹ ± 3 × 10 ⁸	2,6 × 10 ⁸ ± 8 × 10 ⁷	1,7 × 10 ³	11 ± 5	186
98	CF	1.36	1,2 × 10 ¹⁰ ± 6 × 10 ⁸	1 × 10 ⁷ ± 1 × 10 ⁷	4,9 × 10 ³	0.1 ± 0.1	5
98	DE	1.42	1,8 × 10 ¹⁰ ± 2 × 10 ⁹	1,3 × 10 ⁸ ± 4 × 10 ⁷	4,9 × 10 ³	0.8 ± 0.3	96

Tabelle 9: Aufkonzentrierung von Bakteriophage MS 2 in Leitungswasserproben mittels Ultrafiltration. Ergebnisse der Analyse mittels qPCR. AF (brutto) ist der volumetrische Aufkonzentrierungsfaktor, während AF (netto) den tatsächlichen Aufkonzentrierungsfaktor darstellt. m = 3, n = 1.

V / m ³	UF	Fluss / m ³ h ⁻¹	MS 2 (Probe) / GU	MS 2 (Eluat) / GU	AF (brutto)	Wiederfindung / %	AF (netto)
32	CF	1.35	1,4 × 10 ¹² ± 3 × 10 ¹⁰	5 × 10 ⁶ ± 3 × 10 ¹⁰	1,6 × 10 ³	4 ± 2	0,06 × 10 ²
34	DE	1.54	1,4 × 10 ¹² ± 3 × 10 ¹⁰	4,4 × 10 ¹¹ ± 5 × 10 ¹⁰	1,7 × 10 ³	32 ± 4	0,5 × 10 ²
98	CF	1.36	1,1 × 10 ¹² ± 4 × 10 ¹⁰	2 × 10 ¹⁰ ± 1 × 10 ¹⁰	4,9 × 10 ³	1.8 ± 1,4	0,9 × 10 ²
98	DE	1.42	5,2 × 10 ¹² ± 7 × 10 ¹⁰	1,1 × 10 ¹² ± 1 × 10 ¹¹	4,9 × 10 ³	21 ± 3	1,0 × 10 ³

3.1.2. 3-Stufiger Aufkonzentrierungsprozess

Im Anschluss an die Ultrafiltration, wurden die Proben mit Monolithischer Adsorptionsfiltration (MAF) und zentrifugaler Ultrafiltration (CeUF) weiter aufkonzentriert. Durch die Verwendung von MAF als selektive Aufkonzentrierungsmethode, kann neben der

Aufkonzentrierung eine Reinigung der Probe durchgeführt werden [143]. Matrixbestandteile, welche die Detektion stören könnten, werden auf diese Weise entfernt. Noch selektivere Aufkonzentrierungsmethoden wären beispielsweise immunofiltration [380], Immunomagnetische Separation [381] und organische Flockung [95]. Im Vergleich mit anderen Methoden bietet MAF jedoch den Vorteil einer modifizierbaren Oberfläche, welche für die Aufkonzentrierung von verschiedenen Mikroben angepasst werden kann. Beispielsweise wurde MAF durch Immobilisierung von Antikörpern [184] oder selektiven Liganden wie Polymyxin B [182] für die Affinitätsfiltration bestimmter Mikroorganismen eingesetzt. Des Weiteren konnte durch Hydrolysierung der Oberfläche eine parallele Aufkonzentrierung mehrerer Mikroben (z. B. Viren und Bakterien) ermöglicht werden [143, 183]. Wie bei der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten MAF-Säule, basierte die Adsorption auf der Änderung der Oberflächenladung der Viren mit dem pH-Wert der Lösung. Auf der anderen Seite können die Eigenschaften der Monolithe (z.B. funktionelle Gruppen, Dimension, Porengröße) den Erfordernissen der Probe (z.B. Volumen, Turbidität) bei der Synthese angepasst werden.

Nach der Entnahme einer Probe aus dem 20-L-Eluat der Ultrafiltration (siehe Kapitel 3.1.1), wurde der pH-Wert der Probe auf pH 3 eingestellt. Die Probe wurde über eine MAF-Säule filtriert (1 L/min), wobei ein hydrolysiertes Monolith (Funktionelle Gruppe: -OH) zum Einsatz kam. Die Synthese des Monolithen, sowie die Bauteile einer MAF-Säule sind in Kapitel 6.3.2 beschrieben. Auf Grund der bei pH 3 positiven Oberflächenladung der Bakteriophagen [153] werden diese durch hydrophile und hydrophobe Wechselwirkungen an der Monolith-Oberfläche zurückgehalten [143]. Nach Beendigung der Filtration wurden die adsorbierten Viren in ca. 20 mL Glycin-haltigem Rinderextrakt-Puffer bei pH 9,5 eluiert. Die Änderung des pH-Wertes bewirkt dabei eine Änderung der Oberflächenladung der Viren, was die Elution erleichtert. Schließlich wurde das MAF-Eluat mittels zentrifugaler Ultrafiltration (Molekulargewichtsgrenze: 50 kDa) auf ein Endvolumen von ca. 1 mL aufkonzentriert. Die individuellen Elutionsvolumina wurden bei der Berechnung der Ergebnisse berücksichtigt. Die Ergebnisse der Machbarkeitsstudie für die Aufkonzentrierung von Bakteriophage MS 2 in Trinkwasserproben bis zu 90 m³ mit Hilfe des 3-stufigen Aufkonzentrierungsprozesses auf UF, MAF und CeUF sind in Tabelle 10 (Plaque Assay) und Tabelle 11 (qPCR) zusammengefasst.

Tabelle 10: Aufkonzentrierung von Bakteriophage MS 2 in Leitungswasserproben mit Hilfe des 3-stufigen Prozesses aus UF-MAF-CeUF. Ergebnisse der Analyse mittels Plaque Assay. AF (brutto) ist der volumetrische Aufkonzentrierungsfaktor, während AF (netto) den tatsächlichen Aufkonzentrierungsfaktor darstellt. m = 3, n = 1.

V / m ³	UF	Fluss / m ³ h ⁻¹	MS 2 (Probe) / PFU	MS 2 (Eluat) / PFU	AF (brutto)	Wiederfindung / %	AF (netto)
32	CF	1.35	6 × 10 ⁹ ± 1 × 10 ⁹	3,6 × 10 ⁷ ± 1,2 × 10 ⁷	3,2 × 10 ⁷	0.6 ± 0.3	2 × 10 ⁵
34	DE	1.54	2,4 × 10 ⁹ ± 3 × 10 ⁸	3 × 10 ⁸ ± 2 × 10 ⁸	3,4 × 10 ⁷	13 ± 12	4 × 10 ⁶
98	CF	1.36	1,2 × 10 ¹⁰ ± 6 × 10 ⁸	2,4 × 10 ⁷ ± 5 × 10 ⁶	9,8 × 10 ⁷	0.2 ± 0.1	2 × 10 ⁵
98	DE	1.42	1,8 × 10 ¹⁰ ± 2 × 10 ⁹	2 × 10 ⁸ ± 1 × 10 ⁸	9,8 × 10 ⁷	1.1 ± 0.9	1 × 10 ⁶

Tabelle 11: Aufkonzentrierung von Bakteriophage MS 2 in Leitungswasserproben mit Hilfe des 3-stufigen Prozesses aus UF-MAF-CeUF. Ergebnisse der Analyse mittels qPCR. AF (brutto) ist der volumetrische Aufkonzentrierungsfaktor, während AF (netto) den tatsächlichen Aufkonzentrierungsfaktor darstellt. m = 3, n = 1.

V / m ³	UF	Fluss / m ³ h ⁻¹	MS 2 (Probe) / GU	MS 2 (Eluat) / GU	AF (brutto)	Wiederfindung / %	AF (netto)
32	CF	1.35	1,4 × 10 ¹² ± 3 × 10 ¹⁰	1,3 × 10 ¹⁰ ± 4 × 10 ⁹	3,2 × 10 ⁷	0,9 ± 0,3	3 × 10 ⁵
34	DE	1.54	1,4 × 10 ¹² ± 3 × 10 ¹⁰	5 × 10 ¹⁰ ± 9,6 × 10 ⁹	3,4 × 10 ⁷	3,6 ± 0,9	1 × 10 ⁶
98	CF	1.36	1,1 × 10 ¹² ± 4 × 10 ¹⁰	1,3 × 10 ¹⁰ ± 7,7 × 10 ⁹	9,8 × 10 ⁷	1,2 ± 0,7	1 × 10 ⁶
98	DE	1.42	5,2 × 10 ¹² ± 7 × 10 ¹⁰	1 × 10 ¹⁰ ± 5 × 10 ⁹	9,8 × 10 ⁷	0,2 ± 0,1	2 × 10 ⁵

Wie auch die Ultrafiltration, so konnte der 3-stufige Aufkonzentrierungsprozess erfolgreich für Trinkwasserproben bis zu einem Volumen von 98 m³ angewendet werden. Mit Ausnahme der qPCR-Ergebnisse für die Filtration von 98 m³ Trinkwasser, zeigte sich die *Dead-end*-Ultrafiltration gegenüber der *Crossflow*-Filtration erneut als überlegen. Die höchste Wiederfindung ergab sich für die *Dead-end*-Filtration von 34 m³. Die qPCR ergab eine Wiederfindung von 3,6 ± 0,9 %, während im Plaque Assay 13 ± 12 % Wiederfindung

erreicht wurden. Betrachtet man die Aufkonzentrierungsfaktoren, so bewegen sie sich für ein Volumen von $\sim 33 \text{ m}^3$ im Bereich von 2×10^5 bis 4×10^6 . Eine Vergrößerung des filtrierten Volumens von ~ 33 auf 98 m^3 brachte keine signifikante Verbesserung, da die Wiederfindung im Vergleich zum volumetrischen Aufkonzentrierungsfaktor sinkt. Hier ergaben sich tatsächliche Aufkonzentrierungsfaktoren von 2×10^5 bis 1×10^6 . Dies hängt wahrscheinlich mit der Beeinträchtigung der Bakteriophagen durch die deutlich längere Filtrationszeit zusammen (siehe oben). Da die weitere Aufkonzentrierung mittels MAF selektiv auf der Oberflächenladung der Viren basiert, ist sie für MS 2-Fragmente und freie Nukleinsäuren weniger effizient. Auch aus der Machbarkeitsstudie für den 3-stufigen Aufkonzentrierungsprozess scheint gefolgert werden zu können, dass die Dauer der Filtration als derzeitig zeitlich intensivster Schritt zugunsten der Wiederfindung minimiert werden sollte.

Die Machbarkeitsstudie war sowohl für die Ultrafiltration, als auch den 3-stufigen Aufkonzentrierungsprozess für Trinkwasservolumina bis zu 98 m^3 erfolgreich. Des Weiteren wurde gezeigt, dass der Ultrafiltration innerhalb des Prozesses eine wichtige Rolle zukommt. Die Ergebnisse deuteten an, dass für Trinkwasser die *Dead-end*-Filtration der *Crossflow*-Filtration vorzuziehen ist. Außerdem scheint die Filtrationszeit und Filtrationsmethode unter den gegenwärtigen Bedingungen erhebliche Auswirkungen auf die Infektiosität der Bakteriophagen zu haben. Die Quantifizierung mittels Plaque-Assay und qPCR ergaben vergleichbare Resultate, jedoch scheint bei beiden Methoden eine Beeinträchtigung durch die Aufkonzentrierungsmethode aufgetreten zu sein. Um diese Fragen eingehender zu beleuchten, sind jedoch weitere Daten erforderlich, welche auch eine konzentrationsabhängige Aussage zulassen. Die ermöglichten Aufkonzentrierungsfaktoren sind im Vergleich zu relevanter Literatur dennoch gut (siehe Tabelle 12).

Die Ergebnisse und Erkenntnisse der Machbarkeitsstudie über die Aufkonzentrierung von MS 2 Bakteriophagen in Wasserproben großer Volumina mittels Ultrafiltration wurden im Rahmen des Projektes EDIT für die Neukonstruktion des experimentellen Setups verwendet. Eine Zeichnung des neuen Setups ist in Abbildung 18 dargestellt. Das Hauptaugenmerk lag dabei einerseits auf der Notwendigkeit der vollständigen Desinfektion des gesamten Systems. Auf diese Weise sollte eine Verschleppung der angereicherten Mikroben zwischen zwei aufeinander folgenden Filtrationen, sowie die Anlagerung eines Biofilms innerhalb der

Anlage vermieden werden. Daher wurde der bisher für die Rückspülung verwendete Druckbehälter durch einen Rückspülkreislauf ersetzt (siehe Abbildung 18, 1). Darüber hinaus wurden zwei Überlauf tanks aus Edelstahl für Beprobung und Filtratablauf hinzugefügt (siehe Abbildung 18, 2). Andererseits sollten die Überwachungsparameter des Filtrationsprozesses, sowie die Filtrationsgeschwindigkeit ausgebaut werden. Daher wurde der Durchmesser des Rohrleitungssystems vergrößert, was sich in einer geringeren Filtrationszeit widerspiegeln sollte. Außerdem wurden weitere Manometer auf der Filtratseite hinzugefügt, um die Rückspülung durch Anpassung des Druckes optimieren zu können (siehe Abbildung 18, 3). Mit Hilfe von programmierbaren Flussmessern soll die Reproduzierbarkeit der Filtrationsbedingungen verbessert werden (siehe Abbildung 18, 4). Schließlich wurde die Geometrie des gesamten Systems auch für die Aufnahme alternativer Ultrafiltrationsmodule angepasst. Die Neukonstruktion der Ultrafiltrationsanlage wurde in Zusammenarbeit mit Dennis Elsässer und GWK Präzisionstechnik (München, Deutschland) vorangetrieben. Die genaue Beschreibung sowie weitere experimentelle Daten sind derzeit Gegenstand einer weiteren Dissertation (D. Elsässer) und werden daher an dieser Stelle nicht eingehender beschrieben.

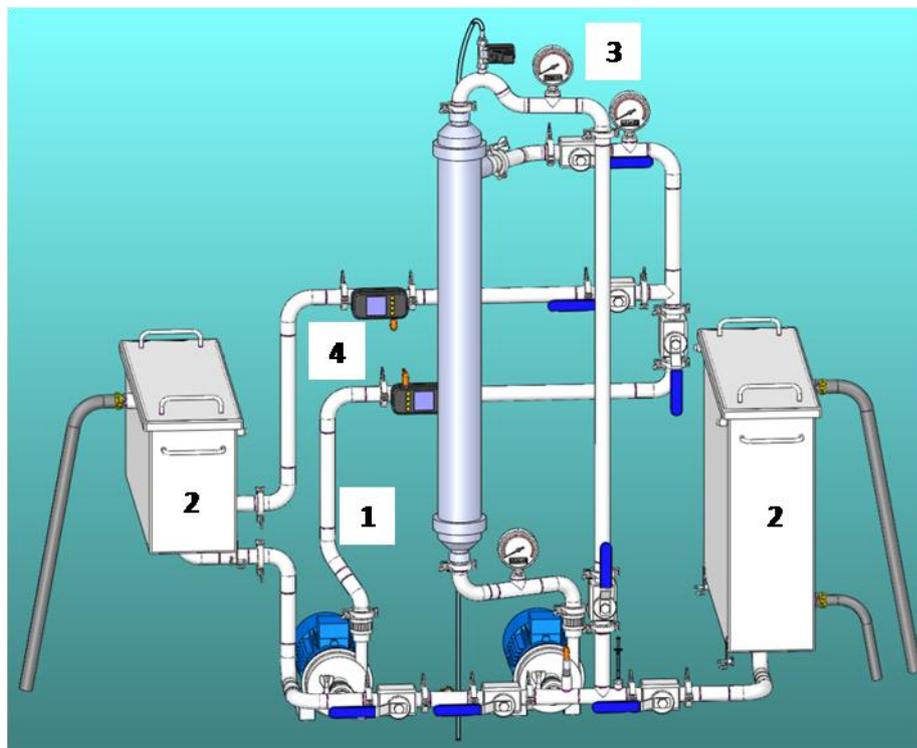


Abbildung 18: Im Rahmen von EDIT weiterentwickeltes Setup für die Ultrafiltration von Mikroorganismen in Wasserproben großer Volumina. Bild freundlicherweise zur Verfügung gestellt von GWK Präzisionstechnik (München, Deutschland).

Tabelle 12: Zusammenstellung relevanter Literatur zur Aufkonzentrierung von Viren in Probenvolumina $\geq 1 \text{ m}^3$. Tabelle nach KUNZE ET AL. 2015 [119]

Filtriertes Volumen	1. Konzentrationsmethode	2. Konzentrationsmethode	Wasser	AF (brutto)	Zielanalyt	Detektion	Wiederfindung	Referenz
2010 L	MDS-Filter	Kieselgur	Brunnen-	$\sim 10^4$	Norovirus	PCR	-	[159]
1900 L	Zellulose-Membran	Membranfilter	Trink-	$\sim 10^5$	Poliovirus	Kultur	92%	[174]
1500 – 1900 L	Nanoceram Filter	Flockung	Grund-	$\sim 10^4$	Poliovirus Norovirus	PCR Kultur	20% (PCR) 30% (PCR)	[149]
1500 L	Glasswolle	Flockung	Brunnen-	$\sim 10^5$	Poliovirus AdV Enterovirus	PCR	56% 28%	[138]
1500 L	MDS-Filter	Flockung (sauer) Flockung (PEG)	Grund-	$\sim 10^5$	HAdV Rotavirus Norovirus	PCR	-	[160]
1000 L	ALCL ₃ -Membran Filter	AL(OH) ₃ -Adsorption	Trink-	$\sim 10^4$	Poliovirus	Kultur	70%	[382]
600 L	UF ¹ (negativ geladen)	UF ¹	Fluss-	$\sim 10^3 - 10^4$	Enterovirus	PCR	-	[383]
100 – 532 L	HA-Filter	2. HA Filter 3. CeUF	Leitungs-	$\sim 10^4 - 10^5$	Norovirus	PCR	-	[175]
19 – 1000 L	Fieberglas-Tiefenfilter	Flockung	Leitungs- Meer- Abwasser	$\sim 10^2$	Poliovirus	Kultur	50%	[384]

¹UF = Ultrafiltration; CeUF = zentrifugale Ultrafiltration;

3.2. Nachweis von Pathogenen auf dem Mikroarray-Chipreadersystem MCR 3 mittels On-Chip RPA

Der bisherige Nachweis von DNA auf dem MCR 3 erfolgte durch Quantifizierung der Produkte einer zuvor durchgeführten PCR bzw. stopped-PCR [282, 385]. Um die Hybridisierungsbedingungen zu verbessern, wurde von LENGGER ET AL. (2014) eine Temperatureinheit hinzugefügt, welche die Flusszellentemperatur mit einer Präzision von ± 1 °C regelt [34]. Auf Basis dieser Vorarbeiten wurde ein Assay entwickelt, welcher neben dem DNA-Nachweis auch die Amplifikation der DNA mittels Rekombinase Polymerase Amplifikation (RPA) integriert.

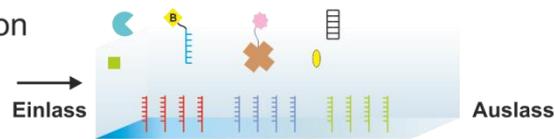
3.2.1. Aufbau des Assays

Abbildung 19 zeigt den Ablauf des entwickelten Assay als schematische Darstellung. Die Grundlage des Assays bildet ein DNA-Mikroarray, auf welchem definierte Mengen der *reverse*-Primer (RW-Primer) für verschiedene Zielmikroben (Bakterien, Viren, Bakteriophagen) an bestimmten Positionen immobilisiert sind. Die räumliche Trennung der Amplifikationsreaktionen ermöglicht die Zuordnung zwischen Chemilumineszenz-Signal und Mikrobe.

Zunächst erfolgt die Präparation des Reaktionsmixes außerhalb des MCR 3s. Der Reaktionsmix enthält alle für die RPA-Reaktion notwendigen Enzyme und Reagenzien (Rekombinase T4 *UvsY*, ssDNA-bindendes Protein T4 gp32, Polymerase, *Crowding*-Reagenz), sowie die DNA-Probe. Darüber hinaus enthält er am 3'-Ende mit Biotin markierte *forward*-Primer (FW-Primer) und unmarkierte RW-Primer für jeden Zielanalyten. Der präparierte Reaktionsmix wurde nach dem Starten der Reaktion in den Mikroarray injiziert (siehe Abbildung 19, 1) und die RPA-Reaktion unter definierten Bedingungen gestartet (siehe Abbildung 19, 2). Das Schema der ablaufenden RPA-Reaktion wurde von KERSTING ET AL. (2014) postuliert und besteht aus einer homogenen und einer heterogenen Teilreaktion, in deren Verlauf Biotin-markierte Amplifikationsprodukte an den passenden RW-Primern auf der Mikroarrayoberfläche immobilisiert werden (siehe Abbildung 20) [386]. Der unmarkierte RW-Primer (immobilisiert auf der Oberfläche und in der Flüssigphase), sowie der Biotin-

markierte FW-Primer formen zunächst einen Komplex mit der Rekombinase (siehe Abbildung 20, 1).

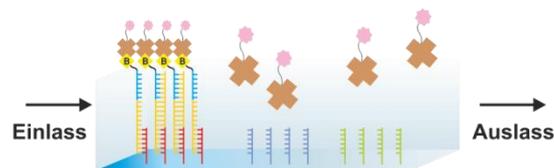
1. Probeninjektion



2. Amplifikation und Immobilisierung von Biotin



3. Markierung von Biotin mit Strep-HRP



4. Chemilumineszenz-Reaktion

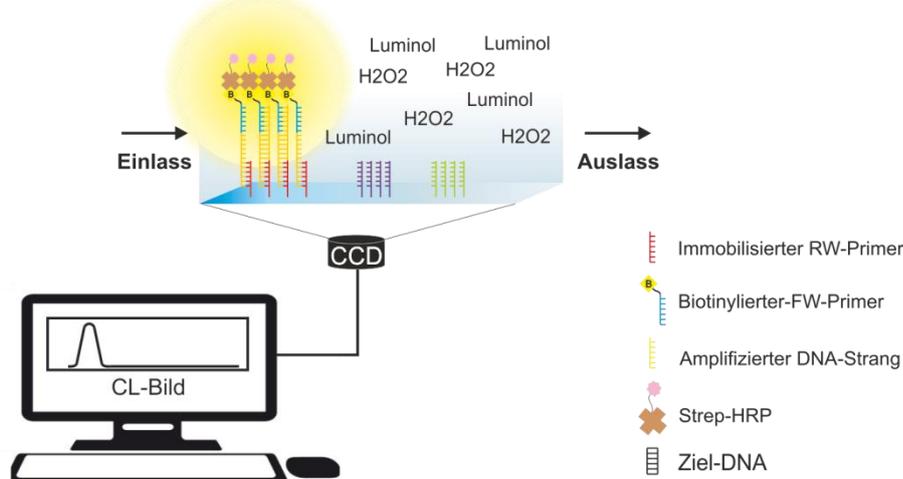


Abbildung 19: Schematische Darstellung des On-Chip-RPA-Assays.

Der Rekombinase/Primer-Komplex scannt das DNA-Templat nach homologen Sequenzen und katalysiert die Primerhybridisierung (siehe Abbildung 20, 2). Der verdrängte DNA-Strang wird von ssDNA-bindenden Proteinen gebunden (siehe Abbildung 20, 3) und der hybridisierte Primer durch eine Polymerase entlang des DNA-Templates verlängert (siehe Abbildung 20, 4). Durch Hinzufügen von zusätzlichem RW-Primer im Reagenzgemisch wird die On-Chip-RPA-Reaktion (siehe Abbildung 20, rechter Zyklus), bei welcher die Synthese des neuen DNA-Stranges direkt an der Oberfläche stattfindet, durch einen Amplifikationszyklus in der

Flüssigphase ergänzt (siehe hierzu auch Kapitel 3.2.6). Hierbei entstehen Biotin-markierte Amplifikationsprodukte, welche die zum immobilisierten RW-Primer komplementäre Sequenz enthalten und durch Hybridisierung ebenfalls auf der Mikroarrayoberfläche immobilisiert werden (siehe Abbildung 20, linker Zyklus). Weitergehende Details zur Aufgabe der einzelnen Enzyme der RPA-Reaktion, sowie deren Cofaktoren sind in Kapitel 2.3.2.3 beschrieben. Nach Beendigung der RPA-Reaktion werden die ungebundenen Reaktionsprodukte, sowie Reagenzien gewaschen. Die Signaltransduktion erfolgt durch das Reportersystem Biotin / Streptavidin [387]. Somit werden immobilisierte, biotinylierte Amplifikationsprodukte über eine starke, nicht-kovalente Bindung mit Streptavidin markiert (siehe Abbildung 19, 3).

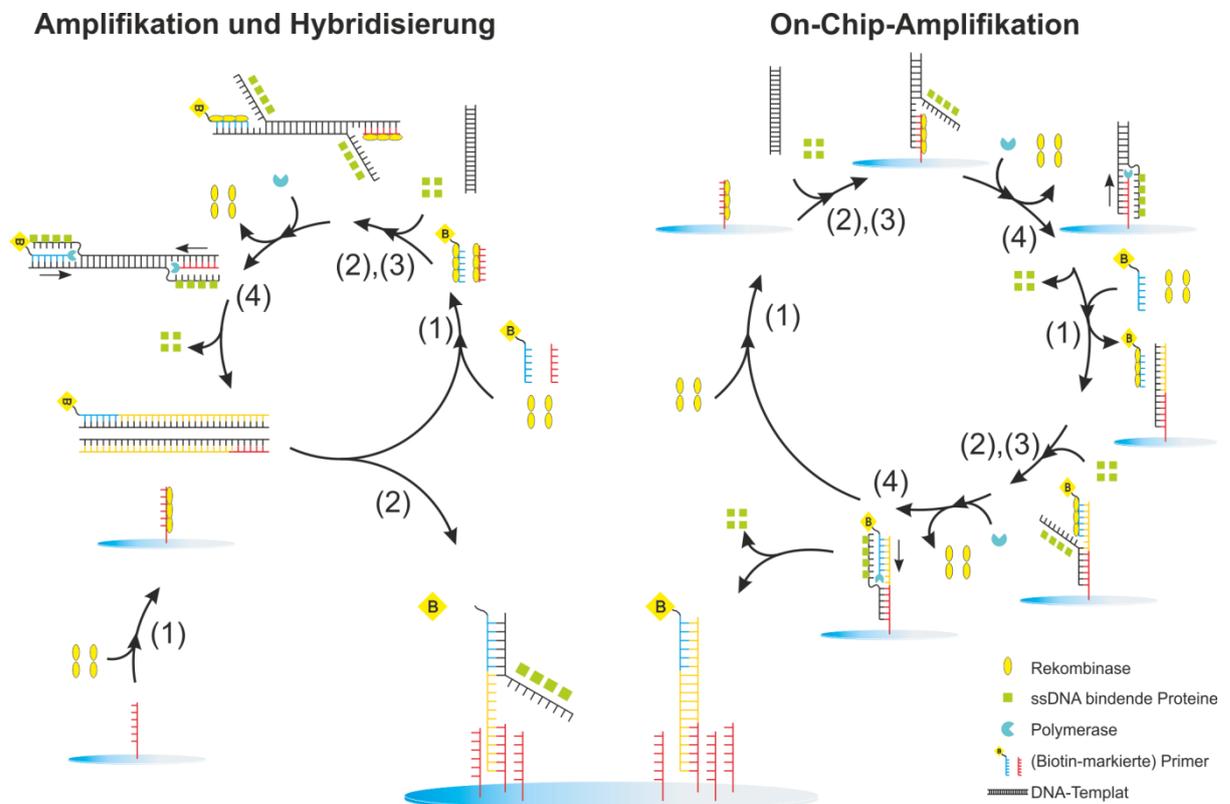


Abbildung 20: Reaktionsschema für die On-Chip-RPA: Der unmarkierte *reverse*-Primer (immobilisiert auf der Oberfläche und in der Flüssigphase), sowie der Biotin-markierte *forward*-Primer formen zunächst einen Komplex mit der Rekombinase (1). Der Rekombinase/Primer-Komplex scannt das DNA-Templat nach homologen Sequenzen und katalysiert die Primerhybridisierung (2). Der verdrängte DNA-Strang wird von ssDNA-bindenden Proteinen gebunden (3) und der hybridisierte Primer durch eine Polymerase entlang des DNA-Templates verlängert (4). Grafik angelehnt an KERSTING ET AL. (2014) [386].

Das verwendete Streptavidin ist dabei an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert, welches die Chemilumineszenzreaktion von Luminol (5-Amino-2,3-

dihydrophthalazin-1,4-dion) mit Wasserstoffperoxid katalysiert (siehe Abbildung 19, 4) [388]. Das bei der CL-Reaktion entstehende Licht wird von einer CCD-Kamera aufgezeichnet und ausgewertet. Nachfolgend wird der stufenweise Aufbau des Assays auf dem MCR 3 durch die Entwicklung / Anpassung der Teilkomponenten (DNA-Mikroarrays, Reportersystem etc.), die Optimierung der Reaktionsbedingungen für die RPA-Reaktion und des MCR 3-Messprogramms eingehend beschrieben. Dabei konnte teilweise auf bereits vorhandene Protokolle zurückgegriffen werden, welche im Rahmen dieser Arbeit angepasst und weiterentwickelt wurden.

3.2.2. DNA-Mikroarrays: Oberflächenchemie

Für die Herstellung von DNA-Mikroarrays wurde zunächst auf die im Institut entwickelten Protokolle zurückgegriffen (siehe Doktorarbeit SIMON DONHAUSER, 2015) [33]. Allerdings wurden im Zuge der Entwicklung der On-Chip-RPA starke, unspezifische Hintergrundsignale und Artefakte beobachtet. Im Laufe der Ursachenforschung wurde eine schwankende Qualität der DAPPG-Oberflächen, sowie ein nicht ausreichendes Blocken der aktivierten und gespotteten Oberfläche als Fehlerquellen identifiziert. Darüber hinaus wurde die bisher verwendete Aktivierung der Diamino-polypropylenglykol (DAPPG)-Oberfläche vor dem Spotten von DNA mittels DSC (*N, N'*-Disuccinimidylcarbonat) gegenüber einer Aktivierung mit Diepoxy-PEG (Poly (Ethylenglykol) Diglycidylether) verglichen.

Die Silanisierung der Glasobjektträger wurde als maßgeblicher Syntheseschritt für die Qualität der DAPPG-Oberflächen identifiziert. Dieser muss unter möglichst wasserfreien, stabilen Bedingungen (Luftfeuchtigkeit, Temperatur) stattfinden. Im Jahresverlauf wurden jedoch Schwankungen der Luftfeuchtigkeit in der umgebenden Raumluft festgestellt und konnten direkt mit der Qualität der Mikroarrayoberflächen in Verbindung gebracht werden. Bei höherer Luftfeuchtigkeit in der umgebenden Raumluft, war die Qualität DNA-Mikroarrays stets schlechter. Dies ging mit stärkeren unspezifischen Signalen sowie Artefakten im Zuge der On-Chip-RPA-Messung einher. Es wurde daher ein Inkubator entwickelt, dessen Atmosphäre auf eine Luftfeuchtigkeit unter 20 % getrocknet werden konnte. Ein Foto des Inkubators ist in Abbildung 48 (A) dargestellt. Die technische Zeichnung ist in Anhang i (Hydrobox) dargestellt. Der Inkubator wurde in der feinmechanischen Werkstatt des Instituts gefertigt und besitzt Maße von 450 × 300 × 300 mm. Als Material wurde durchsichtiges Acrylglas gewählt. Die Überwachung der Temperatur und

Luftfeuchtigkeit erfolgt mit einem handelsüblichen Haushaltsthermometer / -hygrometer. Neben dem Einsatz des Inkubators bei der Silanisierung der aktivierten Glasobjektträgeroberfläche, hat sich auch der Einsatz bei der Aktivierung der DAPPG-Oberflächen mittels DSC als vorteilhaft erwiesen. Ein detailliertes Protokoll für die Herstellung von DNA-Mikroarrays ist in Kapitel 6.4.1 gegeben. Abgesehen von der Verwendung eines Inkubators, wurde der Inaktivierungsschritt (Blocken) nach dem Spotten der DNA von 1 Minute auf 15 Minuten bei RT erhöht. Die Überprüfung der Auswirkungen des geänderten Herstellungsprotokolls für DNA-Mikroarrays erfolgte durch Vergleich der CL-Signale von Nullproben mit Hilfe des On-Chip-RPA-Assays. Hierfür wurden DAPPG-Oberflächen nach dem alten und neuen Protokoll hergestellt. Die Aktivierung erfolgte mittels DSC oder Diepoxy-PEG. Die Messung am MCR 3 erfolgte mit Hilfe des On-Chip-RPA Messprogramms (Details siehe Kapitel 3.2.10), wobei die Inkubationszeit / Amplifikationszeit auf 30 sec reduziert wurde. Als Probe wurde Wasser (MilliQ) verwendet. Die Ergebnisse sind in Abbildung 21 dargestellt.

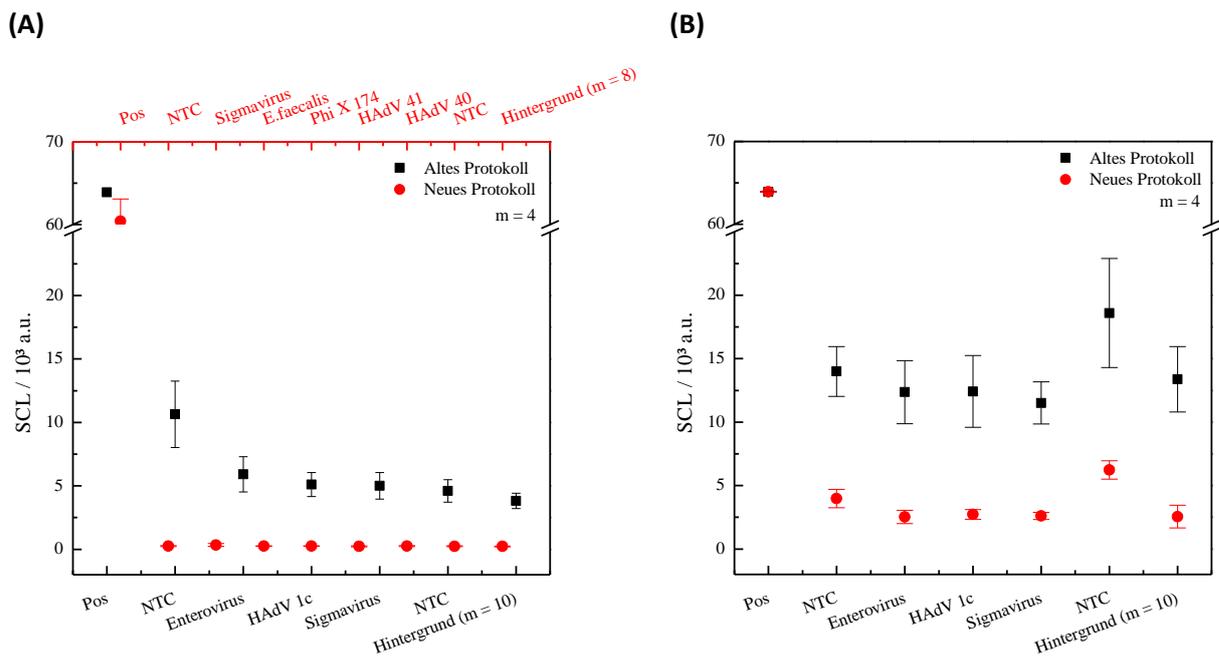


Abbildung 21: Vergleich des Hintergrundsignals für DNA-Mikroarrays, welche nach dem alten und neuen Protokoll hergestellt wurden. Die Immobilisierung von DNA erfolgte entweder nach Aktivierung mittels DSC (A) oder Diepoxy-PEG (B).

Abgesehen von der Negativkontrolle in Nachbarschaft zur Positivkontrolle ist die Höhe des CL-Signals für das alte Herstellungsprotokoll, unabhängig von der gespotteten Lösung in einen ähnlichen Intensitätsbereich von 3824 ± 601 bis 5913 ± 1384 a.u. Die Positivkontrolle

erreicht das maximale CL-Signal (63 000 a.u.). Die hohe Signalintensität der benachbarten Negativkontrolle von 10642 ± 2616 a.u., ist vermutlich auf eine Verschleppung der hohen Intensität des Signals der Positivkontrolle zurückzuführen. Im Vergleich dazu konnte das CL-Signal über alle Spots durch die Herstellung der DNA-Mikroarrays mit Hilfe des neuen Protokolls um den Faktor ~ 17 auf 230 ± 30 bis 344 ± 105 a.u. gesenkt werden. Eine Verschleppung der Positivkontrolle fand nicht statt, da die Verbesserung der Oberfläche zu einer geringeren Ausbreitung der gespotteten Lösungen führte. Die Verbesserung des Hintergrundsignals ist für die Aktivierung mit Diepoxy-PEG ebenfalls deutlich sichtbar. Das CL-Signal für DNA-Mikroarray nach dem alten Protokoll betrug 11513 ± 1664 bis 18593 ± 4299 a.u. und lag damit über dem Signal für die DSC-Aktivierung. Durch Verwendung des neuen Protokolls wurde das CL-Signal auf 2528 ± 527 bis 6234 ± 723 a.u. gesenkt. Das neue Herstellungsprotokoll konnte somit das Hintergrundsignal sowohl für die Aktivierung mit DSC, als auch mit Diepoxy-PEG deutlich reduzieren. Außerdem wurde die Reproduzierbarkeit für beide Aktivierungen verbessert, was auf eine gestiegene, gleichmäßigere Qualität der Mikroarrays hindeutet. Der Vergleich der Aktivierungsstrategien zeigt darüber hinaus, dass die Aktivierung mit DSC deutlich geringere Hintergrundsignale erzeugt und damit der Aktivierung mit Diepoxy-PEG vorzuziehen ist.

3.2.3. DNA-Mikroarrays: Spotten von DNA mittels *InkJet*-Verfahren

Die Menge der immobilisierten Primer auf der Mikroarrayoberfläche beeinflusst die Menge an Biotin, das während der Amplifikation gebunden werden kann und damit direkt die Sensitivität des Assays. Auf der anderen Seite findet die Amplifikation zum Teil direkt an der Mikroarrayoberfläche statt [386], wobei eine große Zahl an immobilisierten Primern pro Flächeneinheit zur Inhibition der Amplifikation auf Grund von sterischer Hinderung der Enzyme führen kann. Auf Grund dieser Annahmen wurden Mikroarrays für HAdV 41 mit verschiedenen Gesamtmengen (5 Spots) an RW-Primer von $2,8 \times 10^{-5}$ bis 28 pmol hergestellt und mit Hilfe des optimierten On-Chip-RPA-Messprogramms (siehe Kapitel 3.2.10) vermessen. Die gespottete Menge an Primer wurde durch das gespottete Volumen, sowie die Konzentration der Spottinglösung berechnet ($m = 31$). Der Biotin-markierte FW-Primer und der unmarkierte RW-Primer wurden in Konzentrationen von 0,93 bzw. 0,093 μM eingesetzt. Die eingesetzte Menge an HAdV 41 (Plasmid-Standard) betrug 10^6 GU/ μL . Die Ergebnisse sind in Abbildung 22 dargestellt. Um eine bessere Vergleichbarkeit der On-Chip-

RPA-Experimente zu ermöglichen, wurden die erhaltenen Chemilumineszenzsignale der immobilisierten *reverse*-Primer SCL_{Pathogen} auf das Maximalsignal (100 % Sättigung) der CCD-Kamera SCL_{max} normalisiert (siehe hierzu auch Kapitel 6.4.3).

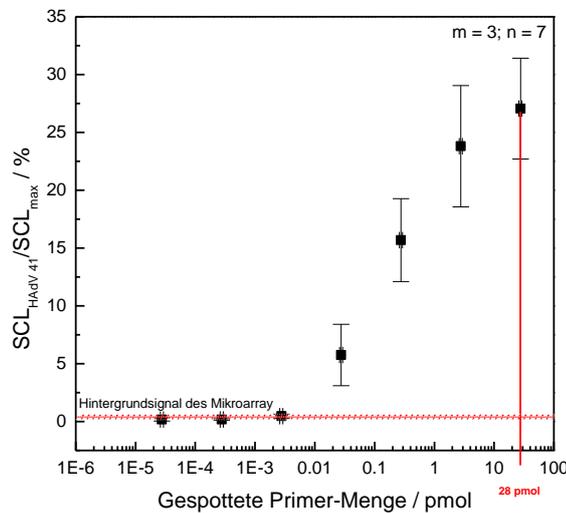


Abbildung 22: Immobilisierung von verschiedenen Mengen an *reverse*-Primer für HAdV 41. Die rote Linie markiert die aus praktischen Gründen maximal einsetzbare Menge.

Bei einer Primermenge von $2,8 \times 10^{-5}$ bis $2,8 \times 10^{-3}$ pmol ergab sich ein rel. CL-Signal von unter 1 % des Maximalsignals, welches damit im Bereich des Hintergrundsignals lag. Ab einer Primermenge von $2,8 \times 10^{-2} \pm 0,2 \times 10^{-2}$ pmol überstieg das rel. CL-Signal mit 6 ± 3 % erstmals das Hintergrundsignal von $0,4 \pm 0,2$ %. Eine weitere Steigerung der Primermenge auf 28 ± 2 pmol führt zur Steigerung des rel. CL-Signals um das ungefähr 5-fache auf 27 ± 4 %. Unter Berücksichtigung der Standardabweichung wurde festgestellt, dass das rel. CL-Signal zwischen $2,8 \pm 0,2$ pmol und 28 ± 2 pmol nicht mehr signifikant stieg, was auf eine Sättigung der Oberfläche hinweisen könnte. Da auf der anderen Seite keine Inhibition der Amplifikationsreaktion zu beobachten war, wurde für alle DNA-Mikroarrays eine Primermenge von 28 ± 2 pmol für das Spotten verwendet. Aus den obigen Ergebnissen, wurde die minimal notwendige Anzahl an immobilisiertem Primer, welche für die Generierung eines Messsignals notwendig ist, berechnet. Für ein Signal/Rausch-Verhältnis > 3 sind für die gespottete Fläche (ca. 5 mm^2) mindestens 4×10^{10} Primermoleküle notwendig (unter der Annahme, dass alle gespotteten Primer-Moleküle an die Mikroarrayoberfläche gebunden haben).

3.2.4. Signaltransduktion: DIG / Anti-DIG-Detektion vs. Biotin / Streptavidin-Detektion

Die Signaltransduktion des entwickelten Assays erfolgt generell über ein indirektes Reportersystem. Nach der Immobilisierung von markierten Amplifikationsprodukten an der Mikroarrayoberfläche, erfolgt die Detektion durch einen Protein-basierten Bindungsassay mit gekoppelter Enzymmarkierung (Meerrettichperoxidase). Die Entwicklung des Assays wurde zunächst mit der Vitamin / Protein-Kombination, Biotin / Streptavidin-HRP vorangetrieben, da die starke Bindungsaffinität eine hohe Sensitivität ermöglichen sollte. Als alternatives Reportersystem dient in der Bioanalytik häufig die Kombination Digoxigenin (DIG) / Anti-Digoxigenin-Antikörper (konjugiert mit HRP) [146]. Die Anwendbarkeit beider Reportersysteme für den entwickelten On-Chip-RPA-Assay wurde miteinander verglichen. Als DNA-Templat diente HAdV 41 (Plasmid-Standard) im mittleren und unteren Konzentrationsbereich des Assays (10^6 , 10^4 GU/ μ L). Die Mikroarrays trugen neben den Kontrollen, Primer für verschiedene Adenoviren (40, 41, 7 b, 1 c) und für die Bakteriophage Φ X 174. Die Amplifikation fand bei 37 °C für 20 min statt. Für die Detektion mit Streptavidin-HRP wurden Biotin-markierte FW-Primer verwendet, während Digoxigenin-markierte FW-Primer für die Detektion mit Anti-Digoxigenin-Antikörper eingesetzt wurden. Nach Beendigung der Amplifikation wurden 600 μ L Streptavidin-HRP (0,4 μ g/mL in Laufpuffer) bei 37 °C mit einer Geschwindigkeit von 2 μ L/s für die Detektion von Biotin über den Mikroarray geleitet. Anti-Digoxigenin-Antikörper (0,2 mg/mL) wurden für die Detektion von Digoxigenin in 43 Intervallen à 20 μ L (= 860 μ L Gesamtvolumen) und einer Geschwindigkeit von 20 μ L/s bei 40 °C über den Mikroarray geleitet.

Die Ergebnisse für eine HAdV 41-Konzentration von 10^6 GU/ μ L sind in Abbildung 26 (A) dargestellt. Das spezifische rel. CL-Signal für HAdV 41 lag für die Steptavidin-Detektion bei 22 ± 4 %, während der Anti-DIG-Antikörper ein rel. CL-Signal von 56 ± 40 % ergab. Des Weiteren zeigte das DIG-Reportersystem Kreuzreaktivitäten zu allen anderen Adenoviren mit rel. CL-Signalen von 28 ± 19 % (HAdV 40), 11 ± 10 % (HAdV 7b) und 20 ± 24 % (HAdV 1c). Für Φ X 174 ergab sich ein unspezifisches rel. CL-Signal von 4 ± 1 %. Im Vergleich dazu ergab das Biotin-Reportersystem für die anderen Adenoviren ein unspezifisches rel. CL-Signal < 1 %. Lediglich für HAdV 40 ergab sich ein leicht erhöhtes unspezifisches rel. CL-Signal von 3 ± 1 %. Bezüglich des Hintergrundsignals zeigen beide Reportersysteme geringe rel. CL-Signale von 2 bis 4 % für das DIG-System und ≤ 1 % für das Biotin-System. Im unteren

Konzentrationsbereich des Assays (10^4 GU/ μ L, Abbildung 23, B) ergab das Biotin-Reportersystem für HAdV 41 ein spezifisches rel. CL-Signal von 11 ± 7 %, während das DIG-System ein rel. CL-Signal im Bereich des Hintergrundes lieferte (1 ± 1 %). Es traten keine unspezifischen CL-Signale für beide Reportersysteme auf, jedoch war das Hintergrundsignal für das Biotin-System wiederum geringer und reproduzierbarer. Der Vergleich der beiden Reportersysteme zeigt, dass das Biotin-System eine deutlich höhere Reproduzierbarkeit bei geringerem Hintergrundsignal und höherer Sensitivität bietet. Es wurde daher weiterhin mit diesem Reportersystem gearbeitet.

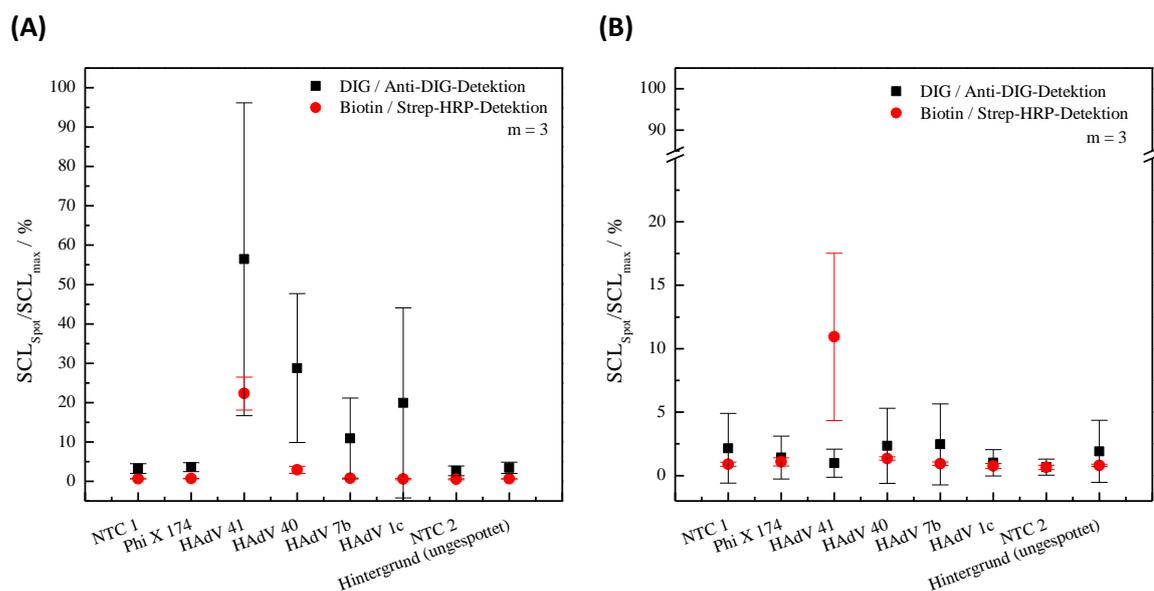


Abbildung 23: Vergleich der Reportersysteme Biotin / Streptavidin-HRP und Digoxigenin (DIG) / Anti-Digoxigenin (DIG)-Antikörper (HRP konjugiert) für HAdV 41 mit einer Konzentration von 10^6 GU/ μ L (A) und 10^4 GU/ μ L (B). NTC 1 und 2 steht für Negativkontrolle.

3.2.5. Unspezifische Hintergrundsignale

Auf der ungespotteten Mikroarrayoberfläche, sowie an den immobilisierten Primern traten starke unspezifische Signale (bis zu 15 % des Maximalsignals) auf. Eine Ursache für unspezifische Signale ergab sich aus der Überprüfung der Oberflächenchemie für die Mikroarray-Herstellung und ist in Kapitel 3.2.2 eingehend beschrieben. Eine weitere Vermutung lag in der unspezifischen Bindung eines Reagenzes der Rekombinase-Polymerase-Amplifikation. Für die Überprüfung der Vermutung wurden Mikroarrays hergestellt, welche eine Positivkontrolle, zwei Negativkontrollen (mit der Spottinglösung ohne DNA), sowie die RW-Primer für 4 verschiedene Viren (Enterovirus, HAdV 41, Norovirus

GGI, Sigmavirus) enthielten. Die getesteten Reagenzien waren Reinstwasser (Spottinglösung), Laufpuffer, Rehydrationspuffer (zum Lösen des Enzymmixes), t-RNA Lösung (Verdünnungslösung für DNA-Standards), sowie dsDNA (HAdV 41 Plasmid-Standard, 10^8 GU/ μ L) und der RPA-Enzymmix. Das entwickelte Protokoll und Messprogramm für eine On-Chip-RPA-Messung wurde wie in Kapitel 6.4.2 beschrieben, verwendet. Jedes Reagenz wurde in seiner laut Protokoll angegebenen Endkonzentration und einem Volumen von 52 μ L eingesetzt. Die Inkubation fand bei 37 °C für 20 min statt. Streptavidin-Poly-HRP wurde in einer Konzentration von 4×10^{-4} mg/mL eingesetzt. Jedes Reagenz wurde in drei unabhängigen Experimenten getestet und die Ergebnisse in Abbildung 24 dargestellt. Auf Grund der Übersichtlichkeit wurde jeweils nur ein Experiment pro Reagenz dargestellt, wobei diese als repräsentativ gelten.

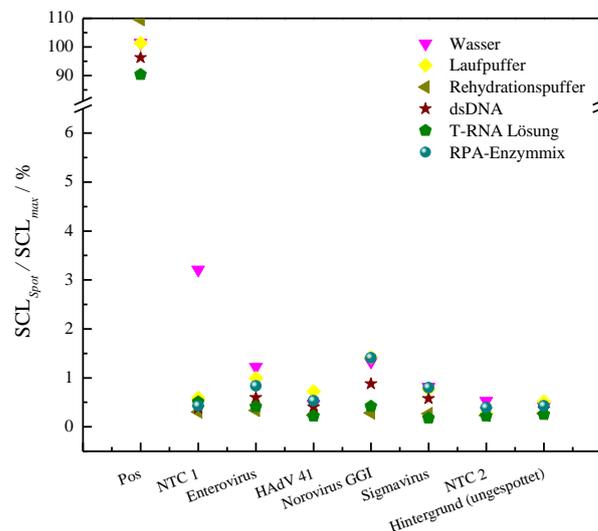


Abbildung 24: Injektion der einzelnen RPA-Reagenzien zur Ermittlung der Störkomponente. Jedes Reagenz wurde 3-mal getestet, ist aber aus Gründen der Übersichtlichkeit nur einmal dargestellt. Das Ergebnis war stets analog. Pos steht für Positivkontrolle. NTC 1 und 2 steht für Negativkontrolle.

Die Positivkontrolle zeigte stets die korrekte Funktionsweise des Assays an. Für alle getesteten Reagenzien und alle Spots ergab sich ein rel. CL-Signal $\leq 1,5$ % des maximal möglichen Signals. Lediglich die Negativkontrolle 1 ergab für die Injektion von Reinstwasser ein rel. CL-Signal von ~ 3 %. Da dies aber in der Negativkontrolle 2 nicht zu beobachten war, wird vermutet, dass die räumliche Nähe zwischen Negativkontrolle 1 und der Positivkontrolle bei diesen Mikroarrays zu einer Verschleppung des Signals geführt hat.

Da keines der untersuchten Reagenzien mit dem unspezifischen Signal in Verbindung

gebracht werden konnte, wurde der Biotin-markierte Primer (ssDNA) als nächstes untersucht. Alle obig beschriebenen Versuchsp Parameter wurden gleich gewählt. Biotin-markierter Primer für die Detektion von Sigmavirus wurde in Konzentrationen von 1 μM und 10 μM jeweils in Reinstwasser und Laufpuffer in den Assay eingesetzt. Im Vergleich dazu betrug die im Assay eingesetzte Konzentration an Biotin-markiertem Primer 0,93 μM . Die Ergebnisse sind in Abbildung 25 dargestellt. Für eine Konzentration von 1 μM in Reinstwasser oder Laufpuffer ergab sich unabhängig vom Spot ein rel. CL-Signal von $\leq 1\%$ des Maximalsignals. Auch für eine 10-fach höhere Konzentration in Laufpuffer ergab sich ein rel. CL-Signal von ca. 1 %. Lediglich für eine Konzentration von 10 μM in Laufpuffer ergab sich ein rel. CL-Signal von 1,6 bis 3 %. Obwohl das unspezifische Signal für den Biotin-markierten Primer auch in hohen Konzentrationen nur maximal 3 % des Maximalsignals erreichte, kann doch eine Korrelation zwischen der Menge an Primer und der Höhe des unspezifischen Signals festgestellt werden. Da dieses Signal jedoch unabhängig von dem auf der Oberfläche gespotteten Primer war, kann eine gleichmäßige Anhaftung auf der gesamten Mikroarrayoberfläche angenommen werden.

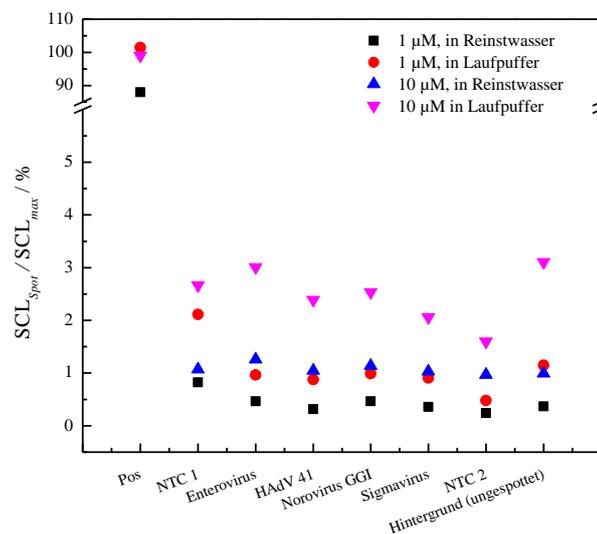


Abbildung 25: Injektion von Biotin-markiertem FW-Primer (SigV) zur Ermittlung der Störkomponente. Jede Lösung wurde 3-mal getestet, ist aber aus Gründen der Übersichtlichkeit nur einmal dargestellt. Das Ergebnis war stets analog. Pos steht für Positivkontrolle. NTC 1 und 2 stehen für Negativkontrolle.

Um zu überprüfen, ob die unspezifische Bindung an die Mikroarrayoberfläche durch Biotin, oder dem Oligonukleotid (ssDNA) ausgeht, wurden zwei Biotine unterschiedlicher Hydrophobizität (Amino-PEG₂-Biotin, D-Biotin) in vergleichsweise hohen Konzentrationen

analog zu obigen Experimenten untersucht. Die Biotine lagen entweder in Reinstwasser oder in Laufpuffer vor. Die Ergebnisse sind in Abbildung 26 dargestellt. Amino-PEG₂-Biotin zeigte in Laufpuffer und in Reinstwasser rel. CL-Signale < 1 % auf der gesamten Oberfläche. D-Biotin in Laufpuffer zeigte ähnliche CL-Signale. Auch eine äquimolare Mischung beider Biotine ergab rel. CL-Signale von ≤ 1 %. Auf Grund dieser Daten kann vermutet werden, dass die unspezifische Bindung der Biotin-markierten Primer nicht vom Biotin verursacht wurde.

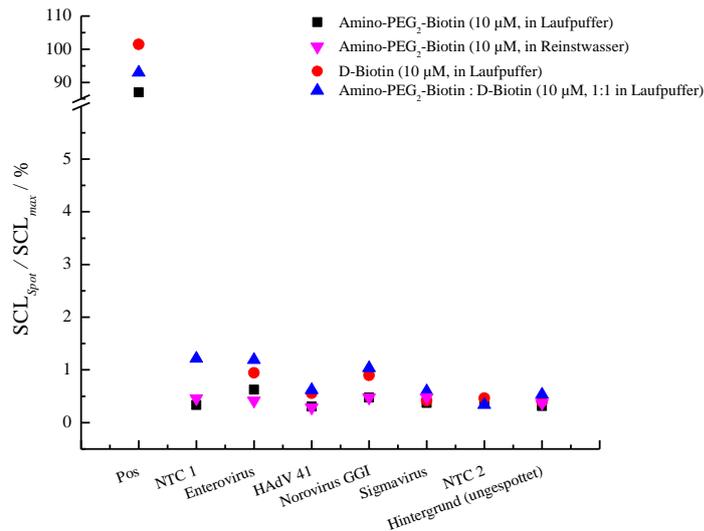


Abbildung 26: Injektion verschiedener Biotine zur Ermittlung der Störkomponente. Jede Lösung wurde 3-mal getestet, ist aber aus Gründen der Übersichtlichkeit nur einmal dargestellt. Das Ergebnis war stets analog. Pos steht ist die Positivkontrolle. NTC 1 und 2 steht für Negativkontrolle.

Zusammenfassend können aus der Überprüfung der einzelnen RPA-Reagenzien folgende Schlussfolgerungen gezogen werden: Durch die Überprüfung des Herstellungsprotokolls für DNA-Mikroarrays (v.a Luftfeuchtigkeit, Blocken) konnte das unspezifische Signal deutlich reduziert und die Qualität der Mikroarrays verbessert werden. Des Weiteren scheint eine unspezifische Anlagerung der Biotin-markierten Primer auf der Mikroarrayoberfläche stattzufinden. Die Hauptrolle spielen hierbei die einzelsträngigen Oligonukleotide, welche von Streptavidin gebunden werden können [389] und somit ein Hintergrundsignal verursachen. Da die Anlagerung der Biotin-markierten Primer auf der Mikroarrayoberfläche nicht verhindert werden kann, wurde das Streptavidin-Poly-HRP durch Streptavidin-HRP ersetzt. Hierdurch wurde das Hintergrundsignal reduziert, wogegen die Sensitivität der spezifischen Signale keine erkennbare Verminderung erfuhr.

3.2.6. Optimierung der On-Chip-RPA: Primerverhältnisse

(Enzymatische) Reaktionen an einer (Mikroarray-) Oberfläche sind gegenüber Reaktionen in der Flüssigphase im Nachteil. Zum einen ist die Diffusion der Reaktionsedukte und –produkte eingeschränkt. Zum anderen findet bei den in dieser Arbeit verwendeten DNA-Mikroarrays die Amplifikation auf Spots mit einer Fläche von ca. 0,8 mm² statt. Dem gegenüber steht eine Mikroarraygesamtfläche von 337 mm².

Um diese Hinderung der Amplifikationsreaktion an der Oberfläche zu überwinden, wurden der RPA-Reaktionsmischung verschiedene Mengen RW-Primer zusätzlich zu den immobilisierten RW-Primern auf der Mikroarrayoberfläche hinzugefügt und der Einfluss auf das CL-Signal untersucht. Die Menge an immobilisierten RW-Primern, sowie dem Biotinmarkierten FW-Primer im RPA-Reaktionsmix blieben konstant. Im Reaktionsmix ergaben sich somit Konzentrationsverhältnisse RW-Primer/FW-Primer von 0/1 bis 1/1 (siehe Tabelle 13). Die Amplifikationsreaktion fand für 20 min bei 37 °C statt. Als DNA-Templat wurden verschiedene Konzentrationen an HAdV 41 (Plasmid-Standard) im mittleren und unteren Messbereich des Assays eingesetzt (10⁴, 10⁶ GU/μL).

Tabelle 13: Eingesetzte Primerverhältnisse für HAdV 41 im RPA-Reaktionsmix.

Konzentration RW-Primer /μM	Konzentration FW-Primer /μM	Konzentrationsverhältnis RW-/FW-Primer
0	0,93	0/1
0,0186	0,93	1/50
0,0465	0,93	1/20
0,093	0,93	1/10
0,465	0,93	1/2
0,93	0,93	1/1

Die Ergebnisse sind in Abbildung 27 dargestellt. Bereits die Zugabe von RW-Primer im Verhältnis 1/50 führte zu einer deutlichen Signalsteigerung von < 1 % auf 16 ± 10 % des Maximalsignals für 10⁴ GU/μL HAdV 41 und von 30 ± 10 % auf 72 ± 20 % des Maximalsignals für 10⁶ GU/μL HAdV 41. Eine weitere Erhöhung der Menge an RW-Primer führte zur Verbesserung der Reproduzierbarkeit, jedoch zur Reduktion des Messsignals für 10⁶ GU/μL HAdV 41.

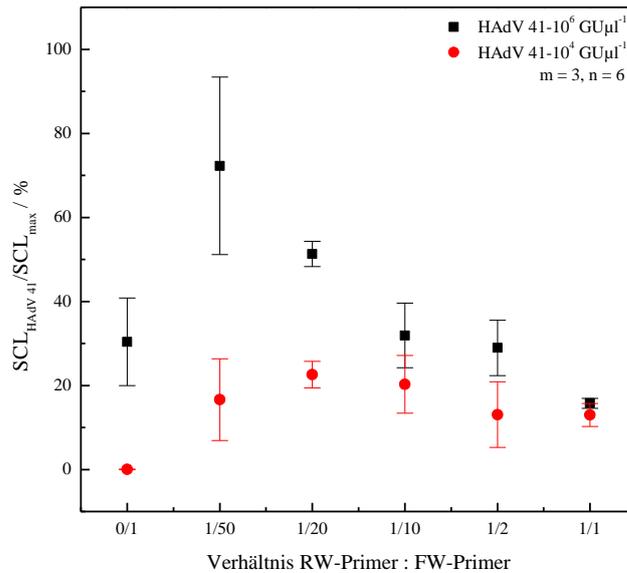


Abbildung 27: Verschiedene Verhältnisse von RW- und FW-Primer im RPA-Reaktionsmix.

Die Steigerung des Messsignals durch Zugabe selbst geringer Mengen an RW-Primer kann anhand des Reaktionsschemas (Abbildung 20) verdeutlicht werden. Befindet sich kein RW-Primer in der Flüssigphase, so kann die Amplifikation nur auf der Oberfläche stattfinden (siehe Abbildung 20, rechter Amplifikationszyklus). In den Arbeiten von KERSTING ET AL. (2014) [386] wurde postuliert, dass durch Hinzufügen von RW-Primer in der Flüssigphase ein weiterer Amplifikationszyklus im umgebenden Medium über der Oberfläche ermöglicht wird (siehe Abbildung 20, linker Amplifikationszyklus). Hierdurch werden weitere Biotin-markierte Amplifikationsprodukte erzeugt, welche durch Hybridisierung an den immobilisierten RW-Primer gebunden werden können. In der Studie wurde ein RW/FW-Primerverhältnis von 1:10 (v/v) eingesetzt, jedoch wurden keine Ergebnisse für verschiedene Primerverhältnisse präsentiert [386]. Auf Grund der oben gezeigten Ergebnisse konnte diese Annahme von KERSTING ET AL. jedoch bestätigt werden.

Das sinkende rel. CL-Signal bei steigendem RW/FW-Primerverhältnis kann mit der steigenden Gesamtmenge an DNA erklärt werden. Für andere Amplifikationsmethoden (PCR) ist bekannt, dass sich eine zu große DNA-Gesamtmenge (Primer und DNA-Template) negativ auf die Amplifikationseffizienz auswirkt, da es zur kompetitiven Inhibition der Enzyme kommt [390]. Das rel. CL-Signal für die höhere HAdV 41-Konzentration (10^6 GU/ μ L) sinkt bei steigendem RW/FW-Verhältnis deutlich stärker als das CL-Signal einer Konzentration von 10^4 GU/ μ L, was zu der obigen Annahme passen würde. Durch die Reduktion der Konzentration der Primer, könnte dies behoben werden. Jedoch würde auf

diese Weise weniger Biotin-markierter FW-Primer zur Verfügung stehen, was das CL-Signal ebenfalls reduzieren würde. Des Weiteren wurde bei der Übertragung des Assays auf die Multiplex-Detektion festgestellt, dass die Primerverhältnisse und Primerkonzentrationen für jede Kombination an Ziel-Analyten (DNA von Zielmikroben) erneut angepasst werden müssen (siehe hierzu auch Kapitel 3.2.12). Aus diesen Gründen konnte kein allgemeingültiges, optimales Primerverhältnis bzw. Primerkonzentration für die On-Chip-RPA bestimmt werden. Es wurde daher ein Primerkonzentrationsverhältnis RW-/FW-Primer von 1/10 gewählt, um die Amplifikation sowohl auf der Oberfläche, als auch im Medium zu ermöglichen, während die Gesamtmenge an DNA so gering wie möglich blieb.

3.2.7. Optimierung der On-Chip-RPA: Statische vs. Dynamische Inkubation

Wie in Kapitel 3.2.6 beschrieben, ist die Amplifikationsreaktion des Assays auf Grund der eingeschränkten Diffusion an der Mikroarrayoberfläche, sowie der geringen Reaktionsfläche im Vergleich zu einer homogenen Reaktion eingeschränkt. Durch eine zusätzliche Durchmischung des RPA-Reaktionsgemisches während der Inkubation sollte daher die Diffusion unterstützt werden. Hierfür wurden mehrere Durchmischungsszenarien getestet, welche in Tabelle 14 zusammengefasst dargestellt sind. Zum einen wurde die Reaktionsmischung entlang des Mikroarray hin und her gepumpt, wobei das bewegte Volumen, die Pumpgeschwindigkeit und die Anzahl dieser Mischschritte variiert wurden (2 bis 6). Zum anderen wurde die Reaktionsmischung sequenziell in eine Richtung über den Mikroarray transportiert (7). Dies sollte eine eventuelle Durchmischung mit Laufpuffer verhindern. (1) stellt die Inkubation ohne Durchmischung dar.

Tabelle 14: Szenarien für die Durchmischung des RPA-Reaktionsmixes während der Inkubation.

	Pump- richtung	Volumen/ Geschwindigkeit	Intervalle	Intervalle der Reaktionszeit	Mischvorgänge
1	Keine			1 × 20 min	0
2	Vorwärts und Rückwärts	10 µL / 10 µL*s ⁻¹	5	2 × 10 min	1x
3				3 × 6.7 min	2x
4				4 × 5 min	3x
5	Vorwärts und Rückwärts	10 µL / 5 µL*s ⁻¹	5	2 × 10 min	1x
6	Vorwärts und Rückwärts	5 µL / 10 µL*s ⁻¹	5	2 × 10 min	1x
7	Vorwärts (sequenziell)	2 µL / 5 µL*s ⁻¹	4	2 × 10 min	1x

Erneut wurde HAdV 41 (Plasmid-Standard) in einer Konzentration von 10^4 GU/µL als Ziel-DNA eingesetzt, was eine Konzentration im unteren Messbereich darstellt. Die Amplifikation fand bei 37 °C für 20 min statt. Die Ergebnisse der Durchmischungsexperimente sind in Abbildung 28 dargestellt. Für Szenario 1 (Inkubation ohne Durchmischung) ergab sich ein rel. CL-Signal von 18 ± 2 %. Für die Szenarien 2 bis 4 wurde ein rel. CL-Signal von 6 ± 2 %, 3 ± 2 % und 7 ± 6 % ermittelt. Hierbei wurden das Pumpvolumen und die Pumpgeschwindigkeit konstant gehalten, während die Anzahl der Durchmischungen von 1 bis 3 variiert wurden. Das bewegte Volumen von 10 µL entsprach dabei ungefähr 20 % des Flusszellvolumens. Die Inkubationszeit wurde in Intervalle aufgeteilt, wobei die Gesamtzeit von 20 min beibehalten wurde. Im Vergleich zur statischen Inkubation verminderte sich das Messsignal um mehr als die Hälfte. In Szenario 5 und 6 wurde einerseits das bewegte Volumen auf ca. 10 % des Gesamtvolumens der Flusszelle und andererseits die Pumpgeschwindigkeit reduziert. Auf diese Weise sollte die Reduktion des CL-Signals mit einer möglichen Verdünnung des Reaktionsgemisches durch Laufpuffer in Verbindung gebracht werden. Jedoch ergaben sich für beide Szenarien erneut geringere Signalintensitäten als für die statische Inkubation. Für

Szenario 5 ergab sich ein rel. CL-Signal von 4 ± 1 %, während Szenario 6 ebenfalls ein rel. CL-Signal von 4 ± 1 % ergab. Es konnte kein Zusammenhang zwischen dem bewegten Volumen oder der Pumpgeschwindigkeit und dem Messsignal hergestellt werden. Schließlich wurde die Reaktionsmischung sequenziell ohne Richtungsänderung über den Mikroarray geschoben (Szenario 7). Das rel. Messsignal von 7 ± 3 % war leicht erhöht gegenüber den anderen Durchmischungsszenarien, jedoch deutlich niedriger als das Signal für die Inkubation ohne Durchmischung. Zusammengefasst wurde festgestellt, dass die Durchmischung des Reaktionsgemisches nicht zu einer Erhöhung des Messsignals führte. Aus diesem Grund wurde die statische Inkubation beibehalten.

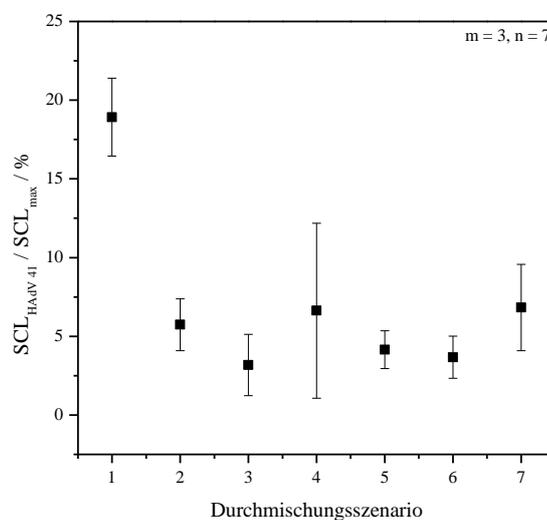


Abbildung 28: Verschiedene Durchmischungsszenarien für die Verbesserung der On-Chip RPA.

3.2.8. Optimierung der On-Chip-RPA: Inkubationstemperatur und Inkubationszeit

Enzymatische Reaktionen, wie die Amplifikation von Nukleinsäuren mittels PCR oder RPA, werden von der Reaktionstemperatur stark beeinflusst. Dabei werden biochemische (Nukleinsäuresynthese durch eine Polymerase), wie biophysikalische Vorgänge (Primeranlagerung, Sekundärstruktur der Nukleinsäuren) gleichermaßen beeinflusst [390]. Daher wurden verschiedene Inkubations- / Reaktionstemperaturen (20, 30, 37, 42, 50, 60 °C) für die Detektion von HAdV 41 (10^6 GU/ μ L, Plasmid-Standard) mittels On-Chip-RPA getestet. Die Inkubationszeit / Reaktionszeit blieb dabei konstant bei 20 min. Die Ergebnisse sind in Abbildung 29 dargestellt. Bei Inkubationstemperaturen von 20 und 30 °C blieb das rel. CL-

Signal im Bereich des Hintergrundsignals $< 1\%$. In einem Temperaturbereich von 37 °C bis 42 °C stieg das rel. CL-Signal von $32 \pm 8\%$ auf $71 \pm 15\%$ an und wurde damit mehr als verdoppelt. Die Reproduzierbarkeit sank allerdings in gleichem Maße. Die erhöhte Standardabweichung bei einer Temperatur von 42 °C ist dabei auf stärker schwankendes Hintergrundsignal zurückzuführen. Eine weitere Steigerung der Temperatur auf 50 °C führte zur Reduktion des rel. CL-Signals auf $49 \pm 27\%$. Schließlich fand bei einer Inkubationstemperatur von 60 °C keine Amplifikationsreaktion mehr statt und das rel. CL-Signal sank auf $< 1\%$.

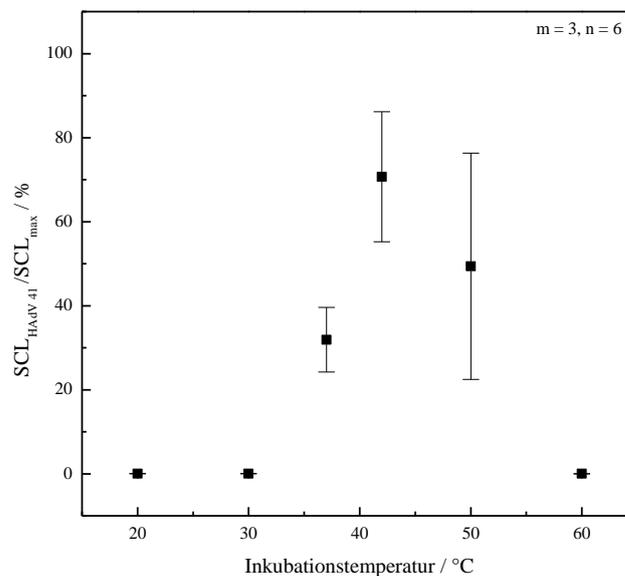


Abbildung 29: Veränderung der Inkubationstemperatur für die On-Chip-RPA-Messung von HAdV 41 ($10^6\text{ GU}/\mu\text{L}$) bei einer konstanten Inkubationszeit von 20 min.

Neben der Inkubationstemperatur, stellt die Inkubationszeit einen weiteren wichtigen Einflussfaktor enzymatischer Reaktionen dar. Bei einer gleichbleibenden Temperatur von 37 °C wurden daher verschiedene Inkubationszeiten von 5 bis 840 min für die Detektion von HAdV 41 getestet. Da die On-Chip-RPA vor allem in unteren Konzentrationsbereich optimiert werden sollte, wurde eine Konzentration von $10^4\text{ GU}/\mu\text{L}$ gewählt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 30 dargestellt. Bereits ab einer Inkubationszeit von 10 min erreichte das rel. CL-Signal eine Intensität von $4 \pm 2\%$. Durch eine Verlängerung der Inkubationszeit auf bis zu 60 min wurde das rel. CL-Signal um das 20-fache gesteigert ($\text{SCL}_{\text{HAdV}} = 81 \pm 8\%$). Eine weitere Erhöhung der Inkubationszeit erbrachte keine weitere Steigerung des Messsignals. Jedoch war das rel. CL-Signal selbst nach einer Inkubationszeit von 14 h noch bei $53 \pm 19\%$, was auf

eine sehr stabile Bindung zwischen den Biotin-markierten Amplifikaten und den immobilisierten Primern hindeutet.

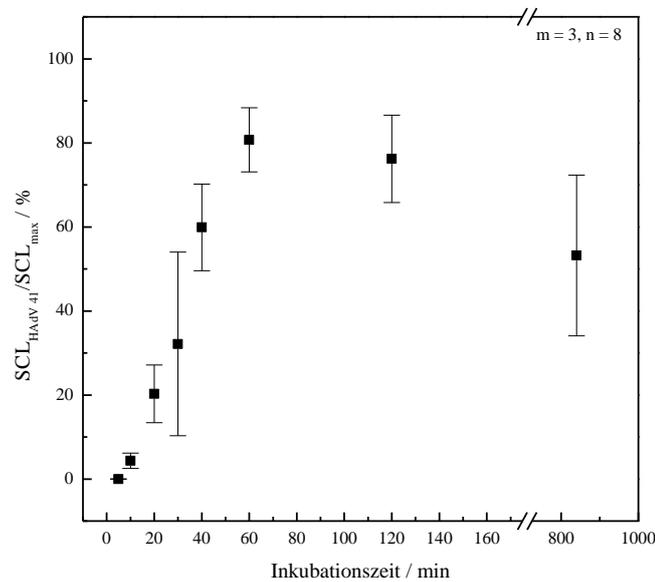


Abbildung 30: Veränderung der Inkubationszeit für die On-Chip-RPA-Messung von HAdV 41 (10^4 GU/ μ L) bei einer konstanten Inkubationstemperatur von 37 °C.

Durch Variation der Reaktionstemperatur und der Reaktionszeit konnte das rel. CL-Signal für HAdV 41 auf maximal 80 % des Maximalsignals SCL_{max} gesteigert werden. Eine Steigerung der Temperatur führte zur Erhöhung des rel. CL-Signals, jedoch wurde die Reproduzierbarkeit in gleichem Maße reduziert. Dies wurde mit größeren Schwankungen im Hintergrundsignal in Verbindung gebracht. Das Temperaturoptimum der Enzyme in der homogen RPA-Reaktion wird vom Hersteller mit 37 °C bis 39 °C angegeben, während beispielsweise WAHED ET AL.(2013) die RPA-Reaktion für RNA bei einer Temperatur von 42 °C einsetzten [329, 391]. Der Temperaturbereich von 37 bis 42 °C zeigte sich auch für die On-Chip-RPA als optimal. Die Inkubationszeit konnte ohne negativen Einfluss auf die Reproduzierbarkeit bis zu 60 min gesteigert werden und auch hier wurde ein maximales CL-Signal von ca. 80 % ermittelt. Die optimierten Bedingungen wurden mit Hilfe von konzentrationsabhängigen Messungen miteinander verglichen (siehe Kapitel 3.2.9).

3.2.9. Optimierung der On-Chip-RPA: Quantifizierung

Aus der Optimierung der Reaktionstemperatur und –zeit (siehe Kapitel 3.2.8) ergab sich für die On-Chip-RPA ein Temperaturbereich von 37 bis 42 °C und eine Inkubationszeit von

60 min. Mit Hilfe von konzentrationsabhängigen Messungen wurden verschiedene RPA-Reaktionsbedingungen miteinander verglichen. Die Temperatur wurde geringfügig erhöht, um eine mögliche Verkürzung der Reaktionszeit zu untersuchen. HAdV 41-Plasmid-Standards in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 10^7 GU/ μ L dienten als Ziel-DNA. Die Verdünnung der Plasmide erfolgte in t-RNA-Lösung, da vor allem für kleine Plasmid-Konzentrationen eine Abnahme der Konzentration innerhalb weniger Stunden beobachtet wurde. Es wurde vermutet, dass eine Adsorption der DNA an die Wandung der Reaktionsgefäße stattfand, obwohl dies laut Hersteller nicht geschehen sollte. Die Reaktionstemperatur für die On-Chip-RPA wurde auf 39 °C erhöht, während Reaktionszeiten von 40 min und 60 min miteinander verglichen wurden. Alle anderen Parameter wurden analog zu Kapitel 6.4.2 eingestellt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 31 dargestellt.

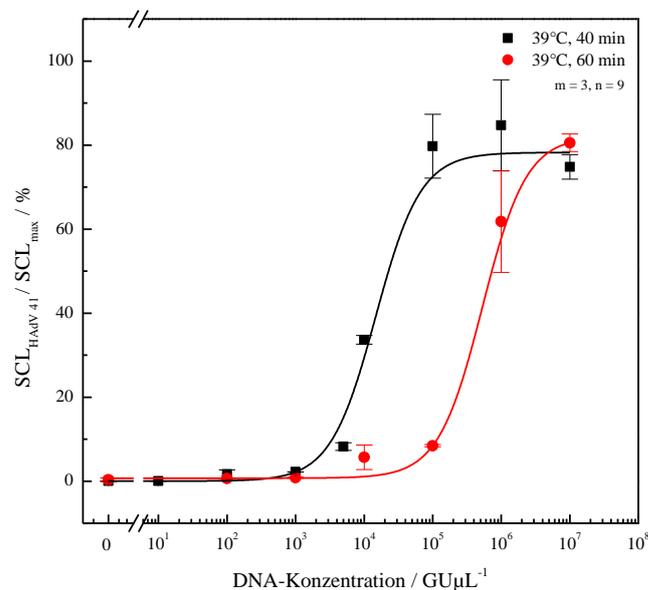


Abbildung 31: Vergleich verschiedener Reaktionsbedingungen für die Quantifizierung von HAdV 41 mittels On-Chip-RPA.

Für beide Reaktionszeiten ließ sich durch logistische Regression ein sigmoidaler Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der DNA-Konzentration und dem rel. CL-Signal beschreiben (R^2 (40 min, 60 min) = 0,99, $m = 3$, $n = 9$). Des Weiteren lagen die maximalen CL-Signale beider Reaktionszeiten bei ca. 80 %. Die Nachweisgrenze (Limit of detection, LOD) wurde wie in Kapitel 6.5 beschrieben, berechnet. Für eine Reaktionszeit von 40 min ergab sich somit ein LOD von 35 GU/ μ L, wogegen der LOD für eine Reaktionszeit von 60 min bei $1,2 \times 10^3$ GU/ μ L lag. Vergleicht man die Ergebnisse für eine Konzentration von 10^4 GU/ μ L für 37 °C, 60 min (siehe Kapitel 3.2.8) mit der gleichen Inkubationszeit bei 39 °C, so zeigt sich ein

deutlicher Abfall des rel. CL-Signals von $81 \pm 7 \%$ auf $6 \pm 3 \%$. Diese Daten zeigen, dass der Arbeitsbereich der Enzyme bezüglich Temperatur und Inkubationszeit stets unter Berücksichtigung beider Faktoren betrachtet werden muss und dass beide Parameter die größten Einflussfaktoren für die On-Chip RPA darstellen. Des Weiteren zeigte ein Vergleich der Nachweisgrenzen, dass die Reaktionszeit durch Erhöhung der Reaktionstemperatur um 20 min verkürzt werden konnte. Somit wurde die Gesamtmesszeit des Assays von 68 min auf 48 min verkürzt. Nach dem Virus HAdV 41, wurden die optimierten Reaktionsbedingungen für die Quantifizierung weiterer Vertreter für jede wasserrelevante Erregergruppe ausgewählt. Die Vertreter neben dem Virus HAdV 41 waren die Bakteriophage Φ X 174 und das Bakterium *E. faecalis*. Das optimierte On-Chip RPA-Messprogramm ist in Kapitel 3.2.10 dargestellt und zusammengefasst. Plasmid-Standards aller drei Mikroben wurden in einem Konzentrationsbereich von 0 bis 10^7 GU/ μ L eingesetzt. Die Ergebnisse für alle drei Mikroben sind in Abbildung 32 dargestellt.

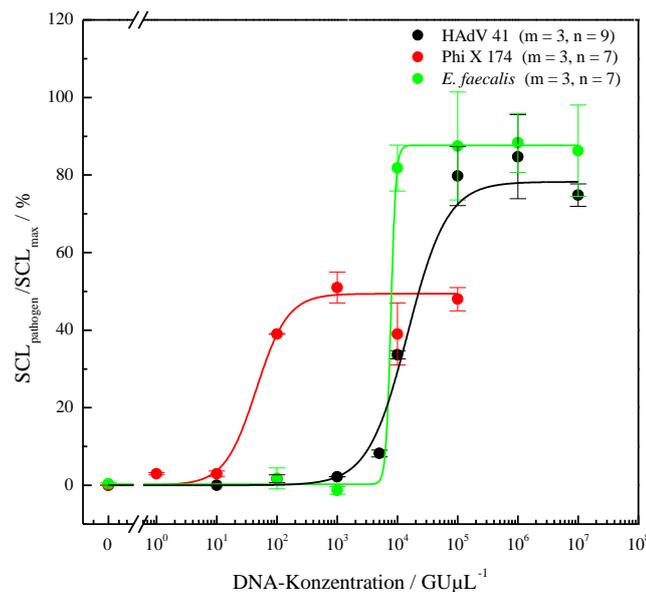


Abbildung 32: Quantifizierung von HAdV 41, Φ X 174 und *E. faecalis* mit Hilfe des entwickelten On-Chip RPA-Assays. Die Nachweisgrenzen für HAdV 41, Φ X 174 und *E. faecalis* betragen 35 GU/ μ L, 1 GU/ μ L und 5×10^3 GU/ μ L.

Für alle Mikroben ließ sich durch logistische Regression, ein sigmoidaler Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der DNA-Konzentration und dem rel. CL-Signal beschreiben. Die Bestimmungsmaße R^2 für HAdV 41, Φ X 174 und *E. faecalis* betragen 0,99 ($m = 3$, $n = 9$); 0,998 ($m = 3$, $n = 7$) und 0,99 ($m = 3$, $n = 7$). Allerdings unterscheiden sich die maximalen CL-Signale sehr stark. Während *E. faecalis* im Mittel ein maximales, rel. CL-Signal von ca. 90 %

erreichte, betrug dies für Φ X 174 lediglich ca. 50 %. Für HAdV 41 betrug das maximale, rel. CL-Signal im Mittel ca. 80 %. Des Weiteren unterschieden sich auch die Arbeitsbereiche (20 bis 80 % des Maximalsignals) deutlich, blieben jedoch stets kleiner als eine logarithmische Einheit. Die Nachweisgrenzen für HAdV 41, Φ X 174 und *E. faecalis* betragen 35 GU/ μ L, 1 GU/ μ L und 5×10^3 GU/ μ L. Die Reproduzierbarkeit war bei allen drei Mikroben im unteren Konzentrationsbereich deutlich besser gegenüber dem Bereich hoher Konzentrationen.

Im Vergleich mit konventionellen Quantifizierungsmethoden für DNA besitzt der entwickelte Assay für HAdV 41 und Φ X 174 eine vergleichsweise gute Nachweisgrenze. Beispielsweise erreichten HEIM ET AL. (2003) mittels TaqMan-qPCR für HAdV 41 einen LOD von 15 GU/ μ L [392]. Allerdings ist der Arbeitsbereich der On-Chip-RPA mit maximal einer logarithmischen Einheit deutlich kleiner als jener der qPCR (üblicherweise 6 bis 8 logarithmische Einheiten). Andere On-Chip RPA-Messmethoden nutzen elektrochemische oder Label-freie Detektionsmethoden anstatt der Chemilumineszenz-Detektion. DEL RIO ET AL. (2014) verwendeten die chronoamperometrische Messung der Oxidation von 3,3', 5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), welches während der Amplifikationsreaktion an einer Oberfläche ausgefällt wurde [327]. Die ermittelte Nachweisgrenze betrug 10^4 GU/ μ L. Der entwickelte Assay lag im Vergleich dazu um vier Größenordnungen darunter. Eine Label-freie Methode basierend auf der Frequenzänderung eines Silikon-Mikroring-Resonators, ermöglichte die zeitaufgelöste Verfolgung der RPA- Reaktion und erreichte einen LOD von 500 fg/ μ L [328]. Im Vergleich dazu war der LOD des entwickelten Assays für HAdV 41 kleiner als 0,5 fg/ μ L. Andere On-Chip RPA-Methoden erreichten vergleichbare Nachweisgrenzen wie der entwickelte Assay. So konnten MAYBORODA ET AL. (2015) *Yersinia Pestis*-dsDNA bis zu einer molaren Konzentration von 180 GU/ μ L nachweisen [393].

Zusammenfassend konnte für mehrere Mikroben ein reproduzierbarer Zusammenhang zwischen rel. CL-Signal und DNA-Konzentration bestimmt werden. Die berechneten Nachweisgrenzen waren vergleichbar mit der qPCR-Analyse und z. T. deutlich besser als andere On-Chip-RPA-Messmethoden. Eine Quantifizierung von DNA mittels On-Chip-RPA ist daher prinzipiell möglich. Jedoch kann eine absolute Quantifizierung nur in einem sehr eingeschränkten Konzentrationsbereich vorgenommen werden, da der Arbeitsbereich für alle untersuchten Mikroben maximal eine logarithmische Einheit umfasste.

3.2.10. Finale Fluidik und finales On-Chip-RPA-Messprogramm

Aus den Ergebnissen bezüglich der Probeninjektion, der Reaktionsbedingungen für die RPA, sowie der Waschschriffe ergab sich das in Tabelle 15 dargestellte Messprogramm für die On-Chip-RPA. Die finale Fluidik ist im Anhang dargestellt. Nach dem Starten des Messprogramms gemäß der Beschreibung im experimentellen Teil dieser Arbeit (Kapitel 6.4.2) beginnt das Messprogramm mit der Referenzierung der Pumpen und Ventile. Anschließend wird die Flusszelle gemäß den optimierten Reaktionsbedingungen für die RPA auf 39 °C temperiert und der Messchip eingelegt (enthält den RPA-Reaktionsmix) und für 40 min inkubiert. Nach der Amplifikation werden die Reagenzien mit 1 mL (20-faches Volumen der Flusszelle) Laufpuffer und einer Geschwindigkeit von 200 µL/s gewaschen. Das während der Amplifikation immobilisierte Biotin wird mit 600 µL (2 µL/s) mit Streptavidin-HRP markiert und nicht gebundenes Streptavidin-HRP anschließend mit 1 mL (200 µL/s) gewaschen. Die Chemilumineszenzreagenzien Luminol und H₂O₂ werden in einer Spritze im Volumenverhältnis 1 : 1 gemischt und anschließend in einem Gesamtvolumen von 400 µL und einer Geschwindigkeit von 20 µL/s über den Mikroarray geleitet. Der Zustrom der Reagenzien wird gestoppt und die CL-Reaktion von der CCD-Kamera für 60 s aufgezeichnet. Schließlich wird das gesamte fluidische System mit insgesamt 2,5 mL Laufpuffer gespült.

Tabelle 15: Finales On-Chip-RPA-Messprogramm.

Programmschritt	Details
Referenzierung	Referenz-Check für alle Pumpen und Ventile
Temperierung der Flusszelle	39°C
Probeninjektion und Einlegen des Mikroarrays	52 µL Probe
RPA-Reaktion	39 °C, 40 min
Waschschritt 1	37°C, 1000 µL, 200 µL/s
Detektion mit Streptavidin-HRP	37°C, 600 µL, 2 µL/s
Waschschritt 2	37°C, 1000 µL, 200 µL/s
Chemilumineszenzreaktion	35°C, 400µL (Luminol, H ₂ O ₂ , 1 : 1 v/v), 20 µL/s
Aufnahme des Messbildes	60s
Waschschritt 3	35°C, 1500 µL, 500 µL/s
Waschschritt 4	35°C, 1000 µL, 68 µL/s

3.2.11. Quantifizierung von Bakteriophage Φ X 174 in Flusswasser

Die Entwicklung des Assays wurde mit stabilen Plasmid-Standards in t-RNA-Lösung vorangetrieben. Auf diese Weise wurden stabile Bedingungen geschaffen, um Matrixeffekte zu vermeiden. Nach der Entwicklung des Assays wurde dieser nun auf seine Praxistauglichkeit für die Detektion vollständiger Bakteriophagen Φ X 174 in einer realen Matrix hin überprüft. Das verwendete Flusswasser wurde am 19.11.2015 aus der Würm bei Gräfelfing gesammelt. Da der Assay für die Detektion von Mikroben in Roh- und Trinkwasser dienen sollte, stellt Flusswasser eine deutlich komplexere Matrix dar. Diese wurde aber bewusst gewählt, um die Robustheit der Methode gegenüber großem biologischem Hintergrund, sowie vielen Störsubstanzen zu überprüfen. Es wurde eine dekadische Verdünnungsreihe intakter Bakteriophagen in Flusswasser hergestellt, wobei die Gesamtheit der darin enthaltenen DNA als biologischer Hintergrund dienen sollte. Der Konzentrationsbereich erstreckte sich von 0 bis 10^8 GU/ μ L. Die Extraktion der gesamten DNA der Flusswasserproben erfolgte mit Hilfe des QIAamp DNA Mini Kits (siehe Kapitel 6.2.3). Die Ergebnisse der On-Chip-RPA sind in Abbildung 33 (A) dargestellt. Als Referenzanalytik diente eine SYBR Green[®]-qPCR (siehe Abbildung 33 (B)). Sowohl für On-Chip-RPA, als auch für qPCR konnte eine Kalibrierkurve erhalten werden. Die On-Chip-RPA (Abbildung 33 (A)) zeigte erneut einen sigmoidalen Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der DNA-Konzentration und dem rel. CL-Signal (R^2 (Logistic Fit) = 0,97, $m = 3$, $n = 9$). Die berechnete Nachweisgrenze betrug 2×10^2 GU/ μ L und lag damit 2 logarithmische Einheiten über der für den Plasmid-Standard (siehe Kapitel 3.2.9). Für die qPCR ergab sich der bekannte lineare Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der DNA-Konzentration und dem cp-Wert ($R^2 = 0,98$; $m = 3$, $n = 8$). Die berechnete Nachweisgrenze betrug 8 GU/ μ L. Sie war damit um den Faktor 25 besser als die On-Chip-RPA. Der lineare Bereich der qPCR umfasste 8 logarithmische Einheiten von 10^1 bis 10^8 GU/ μ L. Die amplifizierte Gensequenz für Bakteriophage Φ X 174 (Protein D) ist dabei nur einmal pro Viren-Genom vorhanden. Zudem trägt der Bakteriophage sein Genom nur einmal. Unter diesen Voraussetzungen kann die genomische Einheit GU mit der Anzahl der DNA-Moleküle und damit der Anzahl der Viren gleichgesetzt werden. Somit ergibt sich für die On-Chip-RPA eine Nachweisgrenze von 2×10^2 Viren/ μ L und für die qPCR 8 Viren/ μ L. Um die Qualität der Quantifizierung abschließend bewerten zu können, ist die Bestimmung von positiven Realproben notwendig.

Diese sollten im Rahmen des Projektes EDIT über einen Ringversuch generiert werden, standen jedoch bis zur Beendigung dieser Arbeit noch nicht zur Verfügung.

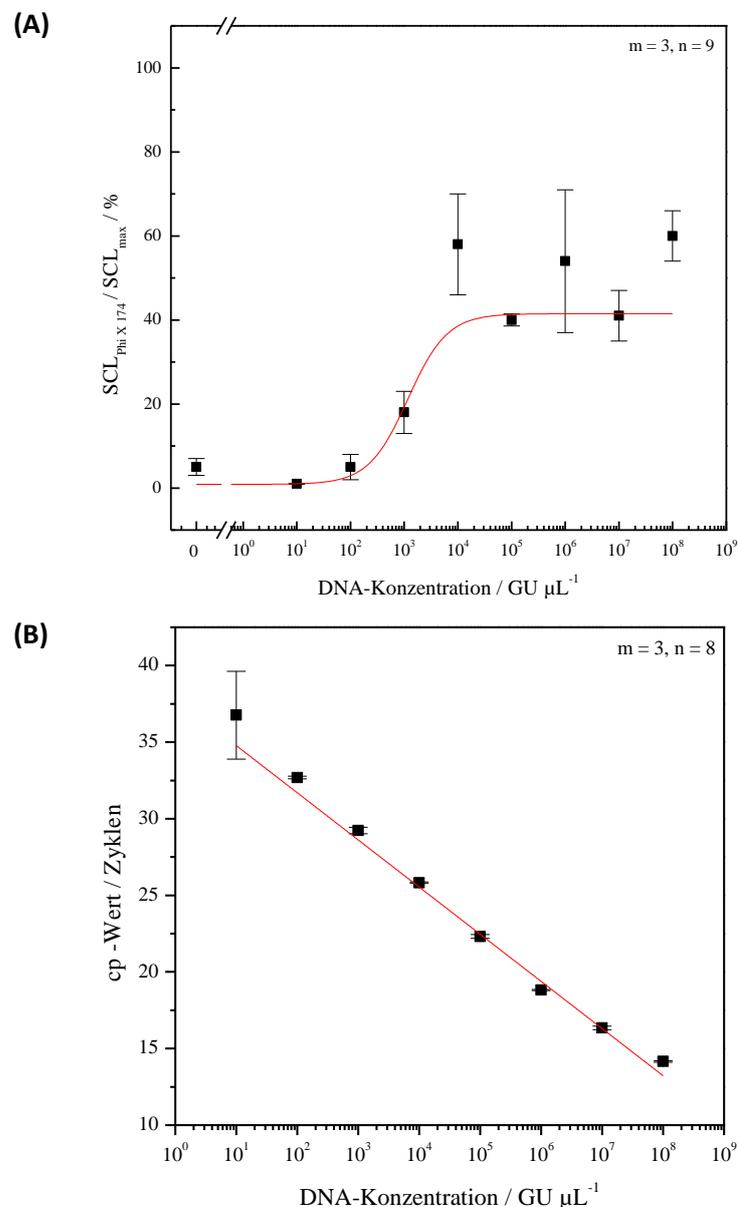


Abbildung 33: Quantifizierung von Bakteriophage Φ X 174 in Flusswasser mittels On-Chip-RPA (A) und SYBR Green®-qPCR (B).

Die Ergebnisse zeigen, dass der entwickelte On-Chip-RPA-Assay für die Quantifizierung einzelner Mikroben in einer Realprobenmatrix eingesetzt werden konnte. Er zeigte sich selbst gegenüber einem hohen biologischen Hintergrund als robust und erfordert für eine einzelne Probe weniger Probenvorbereitungs- und Messzeit als die qPCR (40 min im Vergleich zu 2,5 Stunden). Im Bezug auf die Nachweigrenze, die Reproduzierbarkeit und des quantifizierbaren Bereiches erwies sich die qPCR für die Quantifizierung einzelner Mikroben

jedoch als überlegen. Die Ergebnisse unterstreichen erneut die unterschiedliche Anwendbarkeit von isothermen Amplifikationsmethoden, wie der entwickelten On-Chip-RPA als Screening-Methode gegenüber der qPCR für die Quantifizierung einzelner, bestimmter Mikroben. Da für Screening-Methoden die Möglichkeit der Multiparameter-Bestimmung, sowie kurze Messzeiten und dezentrale Einsetzbarkeit zu bevorzugen sind, ist eine digitale Unterscheidung (Ja/Nein) oftmals ausreichend [25, 28]. Wurde ein bestimmter Zielanalyt positiv bestimmt, so ist für die Quantifizierung eine nachgeschaltete qPCR der On-Chip-RPA vorzuziehen.

3.2.12. Multiplex-Detektion von Viren und Bakterien mittels On-Chip-RPA

Die Vorteile der On-Chip-RPA als Screening-Methode für Krankheitserreger in Trinkwasser gegenüber der Kultur, sowie der qPCR bestehen in der Möglichkeit der gleichzeitigen Detektion und Identifizierung verschiedener Mikroben (Viren und Bakterien).

Aufbau einer Multiplex-RPA für HAdV 41, Φ X 174 und *E. faecalis*

Bei der Entwicklung einer Triplex-RPA stellen sich ähnliche Probleme wie bei anderen Multiplex-Amplifikationsmethoden (z.B. Multiplex-PCR). Durch das Vorhandensein von mehreren Primerpaaren, kommt es zu unvorhersehbaren Interaktionen der DNA-Oligomere untereinander (z.B. Bildung von Primer-Dimeren), was die Selektivität und Sensitivität der Amplifikation beeinflussen kann [394]. Daher mussten die Mengenverhältnisse der Primer für jede Kombination von Mikroben neu bestimmt werden. Dieses System wird für jeden hinzukommenden Analyten komplexer. Daher wurde für diese Experimente zunächst je ein Vertreter für jede wasserrelevante Erregergruppe ausgewählt. Die Vertreter waren das Virus HAdV 41, die Bakteriophage Φ X 174 und Bakterium *E. faecalis*. Da HAdV 41 und *E. faecalis* humanpathogen sind, wurde die Etablierung der Multiplex-Detektion zunächst mit Plasmid-Standards vorangetrieben. Des Weiteren wird für die Gewinnung von HAdV 41 eine humane Zellkultur benötigt, welche im Rahmen dieser Arbeit nicht zur Verfügung stand. Der Erwerb kultivierter Viren war ebenfalls nicht möglich. Auch eine Substitution mit einem anderen humanpathogenen Adenoviren-Stamm: HAdV 5 (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Lars Jurzik, Ruhr-Universität Bochum) war auf Grund der hohen Selektivität des entwickelten Primerpaars für HAdV 41 nicht möglich.

Für die Entwicklung der Multiplex-RPA wurden Mikroarrays mit den RW-Primern für alle drei Mikroben hergestellt. Des Weiteren enthielten diese eine Positivkontrolle, sowie zwei Negativkontrollen am Anfang und Ende des Erregerpanels. Die On-Chip-RPA wurde unter optimierten Bedingungen durchgeführt. Um eine Vergleichbarkeit mit den Singleplex-Experimenten herstellen zu können, wurden die Plasmid-Standards in einer Konzentration von 10^6 GU/ μ L in t-RNA-Lösung eingesetzt. Wie bereits beschrieben, stellt die Zusammensetzung des Primermixes die größte Herausforderung bei der Entwicklung einer Multiplex-Amplifikation dar. Zunächst wurde ein äquimolarer Primermix von 0,93 μ M FW-Biotin zu 0,093 μ M RW-Primer für alle drei Mikroben eingesetzt. Für eine gleichzeitige Messung aller drei Mikroben (10^6 GU/ μ L) ergaben sich rel. CL-Signale von 3 ± 1 %, 18 ± 1 % und 10 ± 1 % für HAdV 41, Φ X 174 und *E. faecalis* (siehe Abbildung 34). Diese lagen deutlich unter den CL-Werten für eine vergleichbare Konzentration im Singleplex-Experiment (siehe Kapitel 3.2.9), obwohl die gleichen Primermengen und Reaktionsbedingungen eingesetzt wurden. Es wird daher vermutet, dass die Gesamtmenge an DNA in der Reaktion zu hoch war und es zu einer Verminderung der Amplifikationseffizienz durch kompetitive Hemmung kam. In Kapitel 3.2.6 wurde dies ebenfalls beobachtet. Die im Singleplex-Experiment verwendeten Primermengen konnten folglich nicht übertragen werden. Die Anpassung der Primermengen erfolgte empirisch, wobei die Gesamtmenge der DNA reduziert wurde. Des Weiteren führte die Konkurrenz zwischen den Amplifikationsreaktionen der verschiedenen Mikroben zur Dominanz der Amplifikation von Φ X 174, da diese eine höhere Sensitivität besitzt. Daher wurde die Primermenge für Φ X 174 stärker reduziert als für HAdV 41 und *E. faecalis*. Schließlich erwies sich für HAdV 41 und *E. faecalis* ein Primermengenverhältnis von 0,42 μ M FW-Biotin zu 0,042 μ M RW-Primer als vorteilhaft. Für Φ X 174 ergab sich ein Primermengenverhältnis von 0,3 μ M FW-Biotin zu 0,03 μ M RW-Primer. Für eine gleichzeitige Messung aller drei Mikroben (10^6 GU/ μ L) ergaben sich mit dem optimierten Primermix rel. CL-Signale von 36 ± 6 %, 43 ± 4 % und 6 ± 1 % für HAdV 41, Φ X 174 und *E. faecalis* (siehe Abbildung 34). Obwohl die Menge an FW-Primer und damit verfügbarem Biotin reduziert wurde, konnten die CL-Signale für HAdV 41 und Φ X 174 deutlich gesteigert werden. Lediglich das CL-Signal für *E. faecalis* blieb in einem ähnlichen Intensitätsbereich und verminderte sich leicht. Auch eine Erhöhung der Primermengen führte nicht zur Verbesserung. Die deutlich geringere Sensitivität der Amplifikationsreaktion von *E. faecalis*,

welche auch im Singleplex-Experiment zu beobachten war, konnte auch im Multiplex-Experiment nicht erhöht werden.

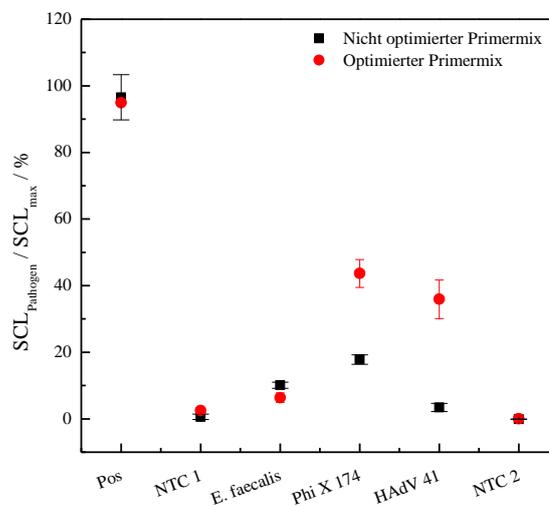


Abbildung 34: Multiplex-RPA mit nicht optimiertem und optimiertem Primermix für die parallele Detektion von HAdV 41, Φ X 174 und *E. faecalis* (10^6 GU/ μ L). Pos steht für die Positivkontrolle. NTC 1 und 2 sind die Negativkontrollen.

Triplex-RPA für HAdV 41, Φ X 174 und *E. faecalis* Plasmid-Standards

Die ermittelten Primerkonzentrationen für die Multiplex-Detektion von HAdV 41, Φ X 174 und *E. faecalis* wurden für vergleichende Messungen von einem, zwei und allen drei Mikroben gleichzeitig angewendet. Um eine Vergleichbarkeit der CL-Signale zu ermöglichen, wurde jede Mikrobe in je drei unabhängige Messungen mit einer Konzentration von 10^6 GU/ μ L eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 35 dargestellt. Die gleichzeitige Amplifikation von HAdV 41 und Φ X 174 ergab rel. CL-Signale von $20 \pm 0,9$ % und $35 \pm 0,02$ %, während das rel. CL-Signal für *E. faecalis* mit $0,1 \pm 0,4$ % wie erwartet im Bereich des Hintergrundsignals lag. Die Kombination von HAdV 41 und *E. faecalis* ergab rel. CL-Signale von 19 ± 2 % und $2 \pm 0,3$ %, während das rel. CL-Signal für Φ X 174 mit $0,1 \pm 0,2$ % im Bereich des Hintergrundsignals lag. Schließlich führte die parallele Detektion von *E. faecalis* und Φ X 174 zu rel. CL-Signalen von 4 ± 1 % und 39 ± 4 %, während das rel. CL-Signal für HAdV 41 mit $0,8 \pm 0,4$ % im Bereich des Hintergrundes lag. Die gemeinsame Detektion aller drei Mikroben ergab für HAdV 41, *E. faecalis* und Φ X 174 rel. CL-Signale von 36 ± 6 %, 6 ± 1 % und 44 ± 4 %. Die Intensität der rel. CL-Signale war dabei vergleichbar mit den Duplex-Experimenten. Im Vergleich zur gleichen DNA-Menge im Singleplex-Experiment war die Intensität der rel. CL-Signale im Multiplex-Experiment allerdings deutlich geringer. Dies galt

für alle Mikroben. Dies könnte zum einen mit der geringeren Menge des Biotin-markierten *forward*-Primers zu erklären sein. Zum anderen findet eine Konkurrenz der Amplifikationsreaktionen statt, was die Amplifikationseffizienz des Enzyms für die einzelnen Mikroben vermindern könnte. Des Weiteren erscheint eine kompetitive Inhibition der Enzyme durch die verschiedenen Primer ebenfalls plausibel [390].

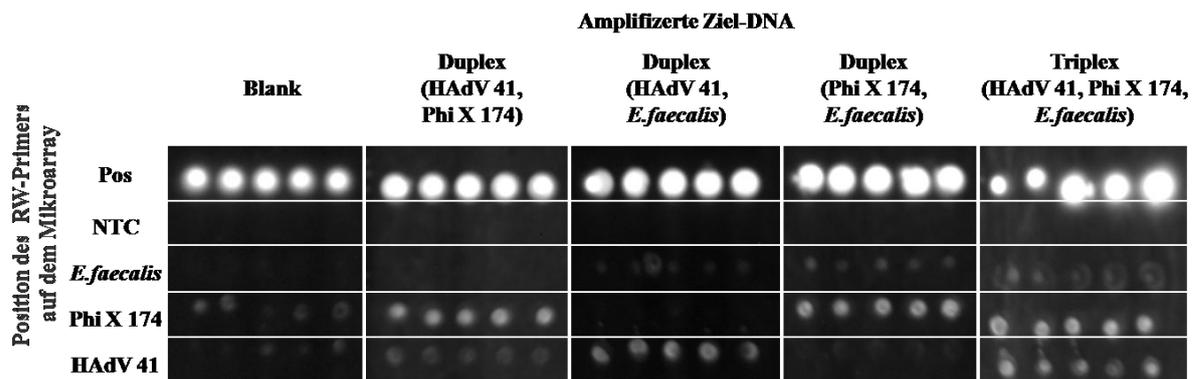


Abbildung 35: Repräsentative Darstellung für die Multiplex-Detektion von HAdV 41, Φ X 174 und *E. faecalis* Plasmid-Standards mittels On-Chip-RPA. Neben den RW-Primern für die Ziel-Analyten enthielten die Mikroarrays eine Positivkontrolle (Pos) und eine Negativkontrolle (NTC).

Multiplex-RPA für Bakteriophage Φ X 174 und *E. faecalis* (OG1RF, Symbioflor)

Die Multiplex-Detektion wurde im Umfang einer Machbarkeitsstudie auch auf extrahierte, genomische DNA angewendet. Die hierfür verwendeten Proben stammten aus Experimenten über die Aufkonzentrierung mittels monolithischer Adsorptionsfiltration (MAF) von D. Elsässer und wurden gemäß den dort notwendigen Bedingungen behandelt. Beispielsweise erfolgte die Quantifizierung der untersuchten Mikrobekulturen nicht mittels qPCR, sondern mittels Kultur und Photometrie. Des Weiteren erfolgte lediglich eine grobe Reinigung der extrahierten Nukleinsäuren. Mit Hinblick auf die mögliche Kombination von MAF als Probenvorbereitungs- und On-Chip RPA als Detektionsmethode erschien die Durchführung der Machbarkeitsstudie mit diesen Proben dennoch als sinnvoll. Als Ersatz für humanpathogene *E. faecalis* wurden zwei nicht pathogene Stämme (OG1RF und Symbioflor®) gewählt. Des Weiteren wurden Φ X 174-Bakteriophagen eingesetzt. HAdV 41 konnte aus den oben genannten Gründen im Rahmen dieser Arbeit nicht eingesetzt werden. Die eingesetzte Φ X 174-Bakteriophagensuspension hatte eine Konzentration von 6×10^9 PFU/ μ L. Die Konzentration der Bakteriensuspension betrug 1×10^8 Zellen/mL. Nach der Kultur der Mikroben, wurde deren DNA mit Hilfe des ViralXpress®-Extraktionskits

extrahiert und ohne weitere Aufreinigung je dreimal mit dem entwickelten Assay gemessen. Für beide Mikroben wurde ein Primer-Mengenverhältnis von 0,42 μ M FW-Biotin zu 0,042 μ M RW-Primer eingesetzt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 36 dargestellt. Für die Messung *E. faecalis* OF1RF und Symbioflor[®] ergab sich ein ähnliches rel. CL-Signal von $3,5 \pm 0,6$ % und $3,5 \pm 0,2$ %. Das rel. CL-Signal des immobilisierten RW-Primers für Φ X 174 betrug $0,1 \pm 0,1$ % und $0,5 \pm 0,2$ %, was im Bereich des Hintergrundsignals lag. Die Vermessung von Φ X 174 ergab ein rel. CL-Signal von $8,5 \pm 0,7$ %, während das rel. CL-Signal für *E. faecalis* $0,4 \pm 0,1$ % betrug und damit im Bereich des Hintergrundsignals lag. Beide Mikroben konnten folglich erfolgreich voneinander differenziert werden. Die gemeinsame Messung beider Mikroben ergab für Φ X 174 und *E. faecalis* ein rel. CL-Signal von $8,4 \pm 1$ % und $4,1 \pm 0,2$ %. Die gemeinsame Detektion beider Mikroben war folglich ebenfalls erfolgreich und die Intensität der CL-Signale war vergleichbar mit der Einzeldetektion. Des Weiteren konnten beide *E. faecalis*-Stämme mit dem entwickelten Assays detektiert werden.

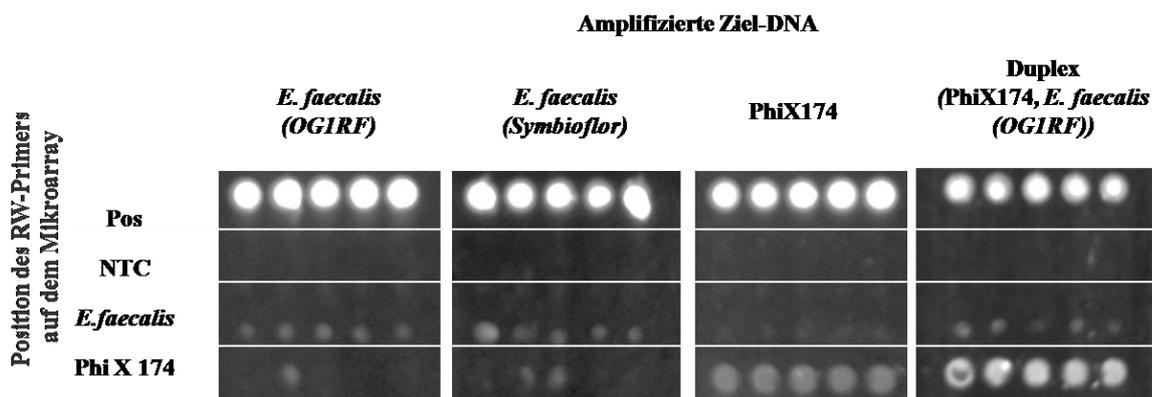


Abbildung 36: Repräsentative Darstellung für die Multiplex-Detektion von genomischer DNA aus Φ X 174 und *E. faecalis* mittels On-Chip RPA. Neben den RW-Primern für die Ziel-Analyten enthielten die Mikroarrays eine Positivkontrolle (Pos) und eine Negativkontrolle (NTC).

Es konnte gezeigt werden, dass der entwickelte On-Chip RPA Assay auf die Multiplex-Detektion übertragen werden konnte. Hierfür mussten vor allem die Konzentrationsverhältnisse der Primer angepasst werden. Die Unterscheidung einzelner Mikroben, sowie die gleichzeitige Detektion verschiedener Mikroben (Bakteriophagen, Viren, Bakterien) gelang sowohl mit Plasmid-Standards, als auch mit extrahierter, genomischer DNA. Eine weitergehende Bewertung, beispielsweise bezüglich der Quantifizierbarkeit bedarf jedoch weiterer Untersuchungen mit Proben unterschiedlicher Konzentration und konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht vorgenommen werden.

Kombination der On-Chip-RPA mit Monolithischer Adsorptionsfiltration

Die On-Chip-RPA wurde schließlich im Umfang einer Machbarkeitsstudie mit Monolithischer Adsorptionsfiltration (MAF) als Probenvorbereitungsmethode kombiniert. Mit Hilfe der MAF sollten Φ X 174 und *E. faecalis* (Symbioflor®) in einer 10-L-Leitungswasserprobe aufkonzentriert und mittels On-Chip-RPA gleichzeitig nachgewiesen werden. Der experimentelle Ablauf ist in Abbildung 37 dargestellt. Die Quantifizierung von Feed- und Eluat mittels qPCR als Referenzmethode erfolgte durch D. Elsäßer.

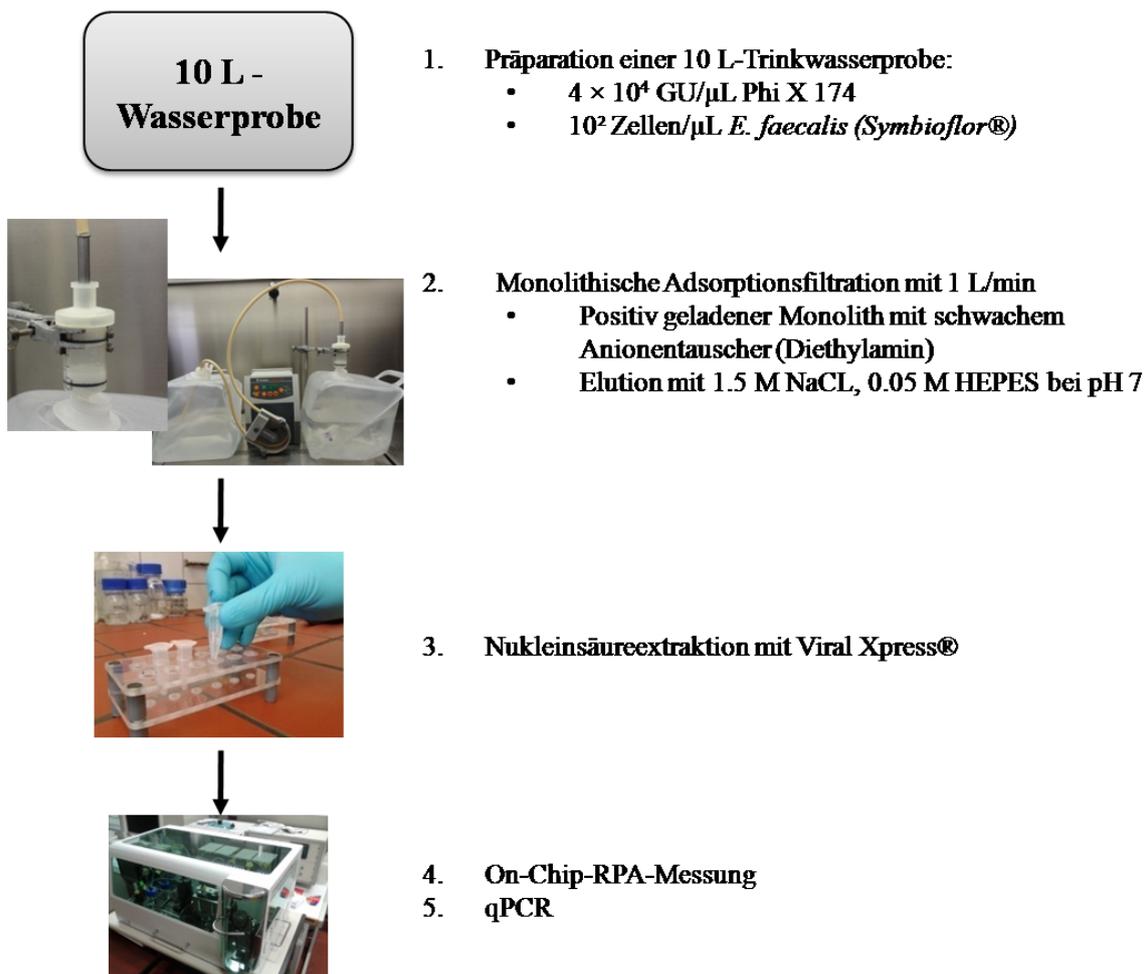


Abbildung 37: Experimenteller Ablauf der Machbarkeitsstudie für die Kombination der On-Chip-RPA mit Monolithischer Adsorptionsfiltration als Probenvorbereitungsmethode für die gleichzeitige Aufkonzentrierung verschiedener Mikroben.

Eine 10-L-Trinkwasserprobe wurde mit Φ X 174 und *E. faecalis* in einer Endkonzentration von $5 \times 10^{10} \pm 4 \times 10^9$ Zellen/mL bzw. $1 \times 10^8 \pm 3 \times 10^7$ Zellen/mL versetzt. Die Filtration erfolgte mit Hilfe eines positiv geladenen Monolithen, welcher mit einem schwachen Anionentauscher (Diethylaminoethyl, DEAE-Gruppe) funktionalisiert wurde. Über ionische

Wechselwirkungen mit der geladenen Mikrobenoberfläche sollten Bakteriophagen und Bakterien gleichermaßen zurückhalten werden. Die Filtration erfolgte ohne vorherige Zugabe eines Additivs bei pH 7. Die Elution erfolgte in Hochsalz-Puffer (1,5 M NaCl) mit 0,05 M HEPES bei pH 7. Die Nukleinsäuren wurden anschließend mit dem Viral Xpress®-Extraktionskit extrahiert und mittels On-Chip-RPA und qPCR vermessen. Die Ergebnisse der sind in Abbildung 38 dargestellt.

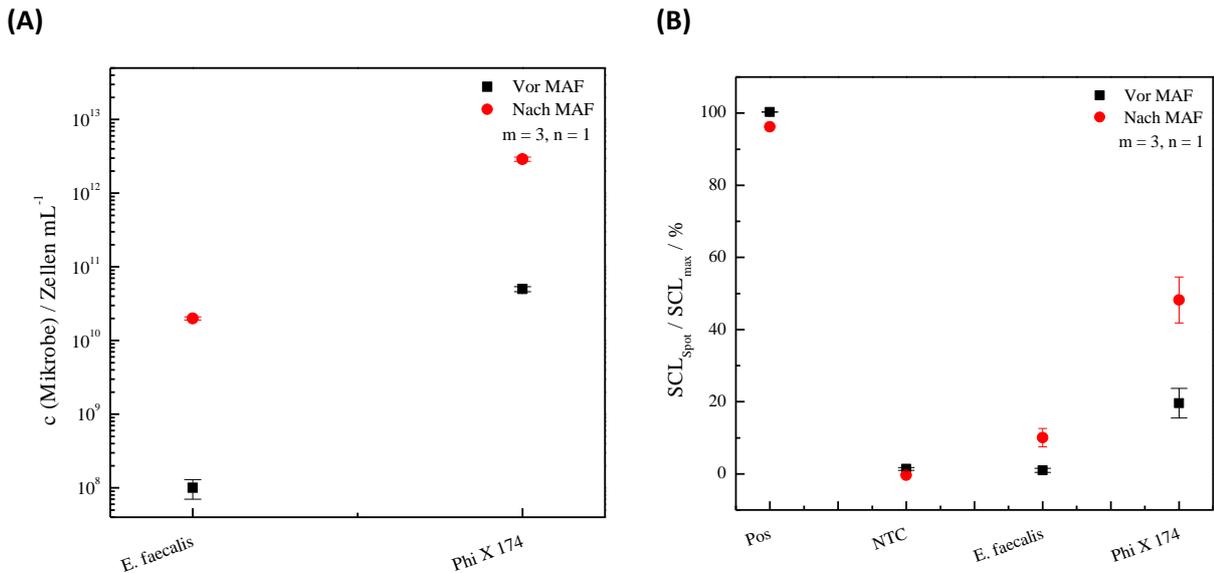


Abbildung 38: Ergebnisse der qPCR (A) On-Chip RPA (B) und vor und nach der Aufkonzentrierung von Φ X 174 und *E. faecalis* (Symbioflor®) mittels Monolithischer Adsorptionsfiltration. Pos und NTC sind Positiv- und Negativkontrolle.

Die erfolgreiche Aufkonzentrierung von Φ X 174 und *E. faecalis* konnte mittels qPCR bestätigt werden (siehe Abbildung 38 A). Die Φ X 174-Konzentration vor der MAF betrug $5 \times 10^{10} \pm 4 \times 10^9$ Zellen/mL und wurde durch die Aufkonzentrierung um das 60-fache auf $3 \times 10^{12} \pm 2 \times 10^{11}$ Zellen/mL erhöht. Die *E. faecalis*-Konzentration vor der MAF betrug $1 \times 10^8 \pm 3 \times 10^7$ Zellen/mL und wurde durch die Aufkonzentrierung um das 200-fache auf $2 \times 10^{10} \pm 1 \times 10^9$ Zellen/mL erhöht. In der RPA steigerte sich das rel. CL-Signale Φ X 174 von 20 ± 4 % (vor MAF) um das mehr als Doppelte auf 48 ± 4 % (nach MAF), während das rel. CL-Signal für *E. faecalis* von $1 \pm 0,6$ % (vor MAF) um das 10-fache auf 10 ± 3 % anstieg (siehe Abbildung 38 B). Eine Konzentration konnte für die RPA nicht berechnet werden, da im Rahmen dieser Arbeit eine Kalibrierung der Multiplex-RPA für Φ X 174 und *E. faecalis*, sowie der Aufkonzentrierung mit anschließender RPA-Detektion nicht mehr möglich war. Die

grundlegende Machbarkeit einer Kombination der On-Chip-RPA mit der Monolithischen Adsorptionsfiltration als Aufkonzentrierungsmethode konnte jedoch demonstriert werden.

3.2.13. Lebend / Tot-Unterscheidung mit PMA

Die Detektion bestimmter pathogener Bakterien und Viren als Indikatororganismen (beispielsweise *E. coli* und *Enterokokken*) erfolgt laut Trinkwasserverordnung aktuell mittels Kulturverfahren [35]. Jedoch umfassen die kulturbasierten und publizierten Kulturverfahren nur 5 von 53 Bakterien-Stämmen, was die Limitierung dieser Messmethode aufzeigt [224]. Des Weiteren geht man davon aus, dass vor allem in Umweltproben maximal 1 % der mikroskopisch sichtbaren Organismen im Kulturverfahren als lebend bewertet wird [228]. Darüber hinaus ist nur ein geringer Anteil der als lebend / intakt eingestuften Mikroben als krankheitserregend zu betrachten [72]. Ein ähnliches Problem ergibt sich bei der Detektion und Identifizierung pathogener Mikroben anhand ihres Genoms. Die Detektion des Genoms allein lässt keinen Rückschluss auf die „Lebendigkeit“ oder die Infektiösität des Krankheitserregers schließen, da lebende und „tote“ Mikroben gleichermaßen über ein Genom verfügen können. Dieses kann, abhängig von der Desinfektionsmethode, auch nach einer Desinfektion noch intakt und detektierbar sein [73]. Da die Korrelation zwischen der Lebendigkeit und Infektiösität von Pathogenen nicht global beantwortet und noch Gegenstand aktueller Forschung ist, kann sie im Rahmen dieser Arbeit nicht beantwortet werden. Stattdessen sollte aufgezeigt werden, dass der entwickelte On-Chip-RPA-Assay dazu genutzt werden kann, nicht nur die Anwesenheit des Mikroben-Genoms, sondern die Vitalität der Mikrobe zu detektieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Lebend / Tot-Unterscheidung mittels On-Chip-RPA anhand des Bacteriophage Φ X 174 untersucht. Da es sich bei Phagen definitionsgemäß nicht um Lebewesen handelt, wird daher in Folgendem von einer Aktivität / Inaktivität-Unterscheidung gesprochen. Die Aktivität / Inaktivität-Unterscheidung mittels On-Chip-RPA erfolgte mit Hilfe von Propidiummonoazid (PMA), da dieser Assay in der Literatur bereits gut etabliert und einfach durchzuführen ist (siehe hierzu auch Kapitel 2.3.2.6). Zunächst wurde eine dekadische Verdünnungsreihe intakter Φ X 174-Bakteriophagen in Karlsruher Trinkwasser hergestellt (siehe Abbildung 39). Der Konzentrationsbereich erstreckte sich von 10^9 GU/ μ L bis 0 GU/ μ L. Jede Verdünnungsstufe wurde mit der gleichen Menge inaktiver Phagen versetzt (10^9 GU/ μ L), welche zuvor durch Inkubation bei 90 °C für 10 min

hitzeinaktiviert wurden. Die Proben enthielten somit einen sinkenden Anteil intakter Phagen und einen im Vergleich dazu steigenden Anteil hitzeinaktivierter Phagen. Die Lebend / Tod-Unterscheidung erfolgte durch Inkubation der Mischproben mit PMA (51,6 μM) bei RT für 5 min. Während der Inkubationszeit kann PMA in beschädigte Phagen eindringen, während es von einer intakten Phagenhülle zurückgehalten wird. Durch Belichtung der Proben bei 510 nm für 10 min erfolgt eine photochemische Reaktion mit der DNA, wodurch es zum *cross-linking* der DNA-Doppelstränge kommt.

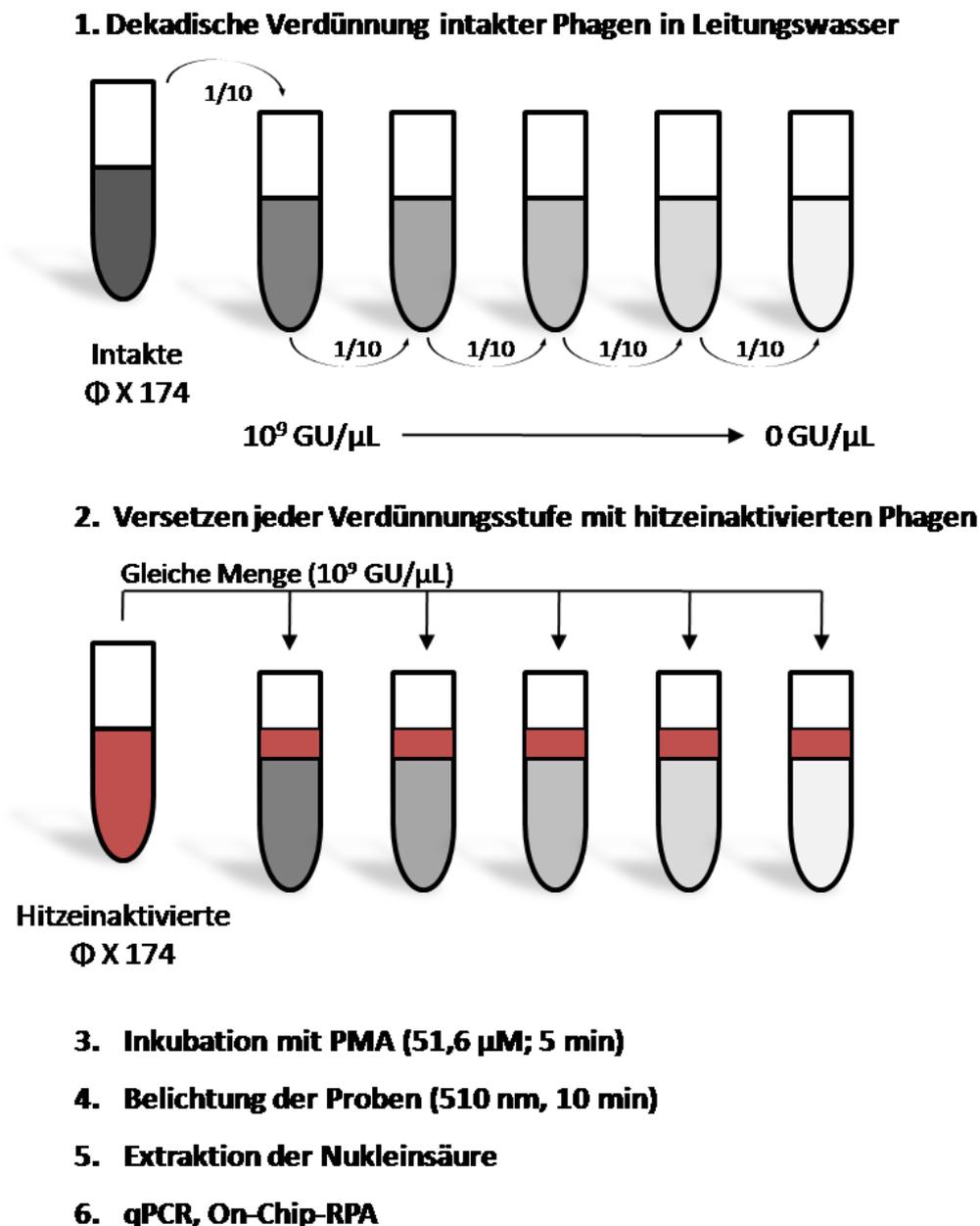


Abbildung 39: Probenpräparation für die Aktivität / Inaktivität-Unterscheidung von Bakteriophage Φ X 174 mittels qPCR und On-Chip-RPA.

Die DNA-Doppelstränge können während der Amplifikation nun nicht mehr getrennt werden, was zum Abbruch der Amplifikationsreaktion führt. Eine erfolgreiche Unterscheidung zwischen intakten und hitzeinaktivierten Phagen äußert sich folglich in der Veränderung des Messsignals der qPCR oder RPA mit steigender Verdünnung. Anderenfalls bleibt das Signal über den gesamten Konzentrationsbereich hinweg konstant. Die behandelten Proben wurden schließlich mit dem ViralXpress® Kit extrahiert und mittels qPCR als Referenzmethode vermessen. Die Probenpräparation, sowie die Analyse der Proben mittels qPCR erfolgten durch Johannes Otto (TZW Karlsruhe).

Da die chemische Reaktion zwischen PMA und der DNA nicht gerichtet stattfindet, spielt die Länge des amplifizierten DNA-Abschnittes bei diesem Assay eine wichtige Rolle. Ist er zu kurz, findet die Reaktion eventuell außerhalb des amplifizierten Bereiches statt, wodurch hitzeinaktivierte Phagen fälschlicherweise ein Messsignal liefern und als lebend interpretiert werden (siehe Abbildung 40).

Hitzeinaktivierte Phage

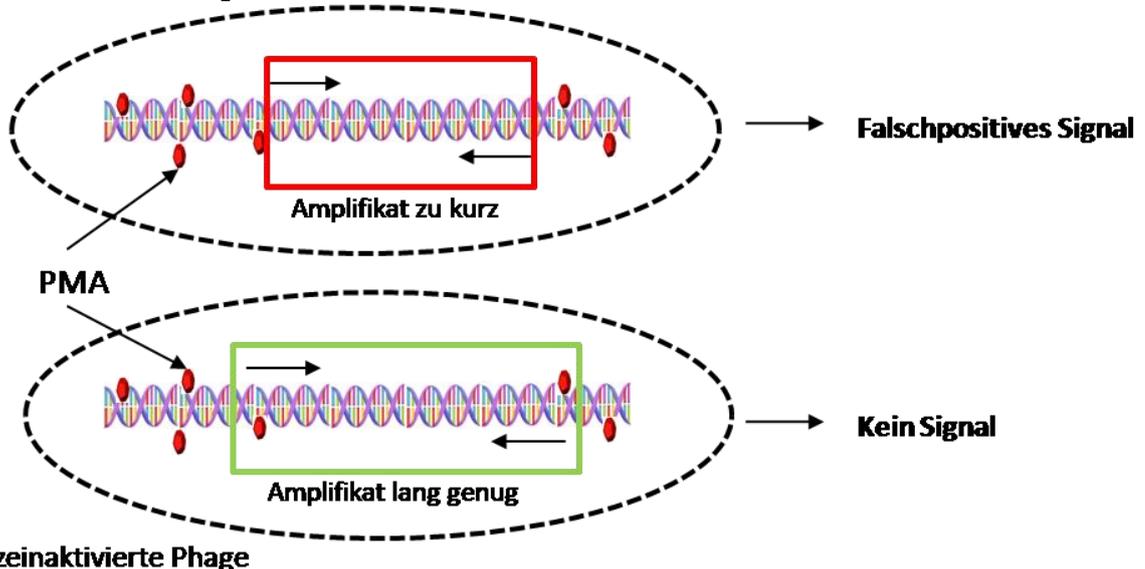


Abbildung 40: Einfluss der Amplifikatlänge auf die Aktivität / Inaktivität-Unterscheidung mit PMA.

Da das Amplifikat der On-Chip-RPA für Φ X 174 nur eine Länge von 200 bp besitzt und keine alternativen Primer zur Verfügung standen, wurde der Einfluss der Amplifikatlänge zunächst in der qPCR überprüft. Die Amplifikate der qPCR besaßen eine Länge von 350 bp und

1044 bp. Die Ergebnisse der qPCR sind in Abbildung 41 dargestellt. Sowohl für eine Amplifikatlänge von 350 bp (Abbildung 41, A), als auch 1044 bp (Abbildung 41, B) sank der ct-Wert mit steigender Konzentration intakter Phagen, wie dies bei einer Verdünnungsreihe zu erwarten ist. Eine Störung der Reaktion war trotz der hohen Konzentration inaktivierter Phagen (10^9 GU/ μ L) nicht zu beobachten. Die Unterscheidung zwischen intakten und hitzeinaktivierten Φ X 174 war folglich für beide Amplifikatlängen erfolgreich.

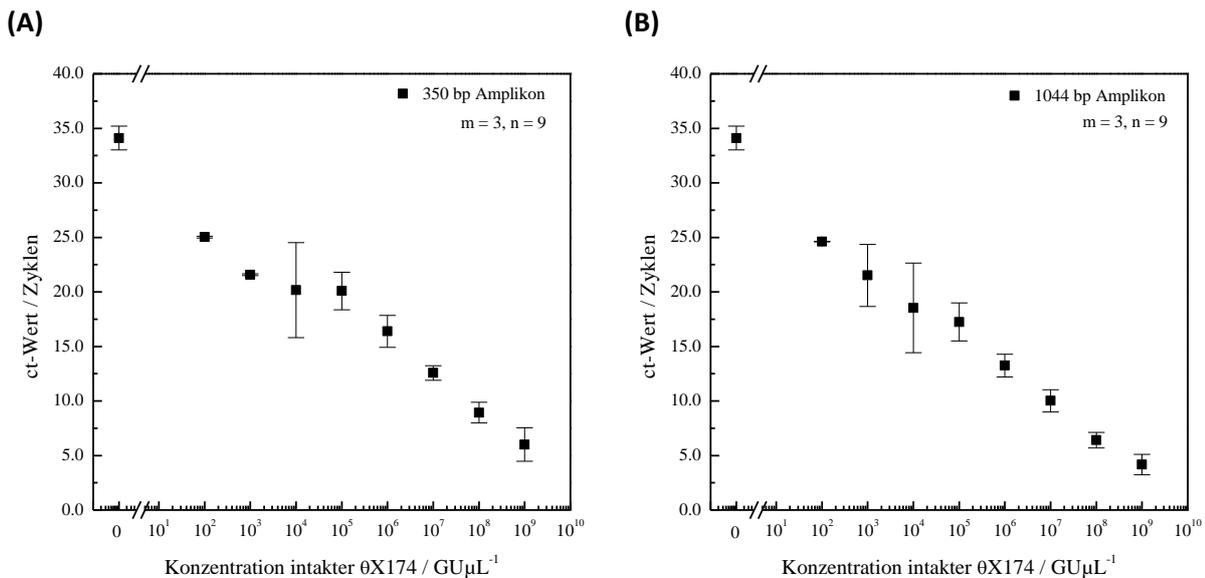


Abbildung 41: Lebend / Tod-Unterscheidung mittels PMA-qPCR für Bakteriophage Φ X 174. Die Länge des amplifizierten DNA-Abschnittes betrug 350 bp (A) und 1044 bp (B). Daten freundlicherweise zur Verfügung gestellt von J. Otto (TZW Karlsruhe).

Da die Erhebung der Datenpunkte im unteren Konzentrationsbereich $< 10^2$ GU/ μ L nicht vollständig war, konnte die tatsächliche Nachweisgrenze der qPCR nicht ermittelt werden. Für beide Amplifikatlängen wird daher eine Nachweisgrenze von 10^2 GU/ μ L angenommen. Ein Einfluss der Länge des Amplifikates auf die Nachweisgrenze wurde nicht beobachtet. Die Ergebnisse der On-Chip-RPA sind in Abbildung 42 dargestellt. Ähnlich wie bei anderen konzentrationsabhängigen Messungen, wurde ein sigmoidaler Zusammenhang zwischen dem Logarithmus der Konzentration intakter Bakteriophagen und dem rel. CL-Signal festgestellt ($R^2 = 0,99$). Auf Grund der hohen Sensitivität der On-Chip-RPA, mussten die Proben vor der Messung 1:1000 verdünnt werden. Die Nachweisgrenze betrug 7×10^2 GU/ μ L und war damit vergleichbar mit der Kalibrierung von Φ X 174 in Flusswasser (siehe Kapitel 3.2.11). Die Unterscheidung zwischen intakten und hitzeinaktivierten Bakteriophagen war erfolgreich. Das Hintergrundsignal war jedoch mit 9 ± 1 % des

Maximalsignals für die Aktivität / Inaktivität-Unterscheidung deutlich höher als bei der Kalibration in Flusswasser. Hier betrug das Hintergrundsignal $0,9 \pm 0,9$ % des Maximalsignals. Die Lebend / Tot-Unterscheidung in Kombination mit isothermen Amplifikationsmethoden wurde ebenfalls in der Literatur gezeigt. Beispielsweise kombinierten CHEN ET AL. (2011) eine PMA-basierte Lebend / Tot-Unterscheidung mit LAMP für die Untersuchung der Vitalität von *Salmonella* in Zellkultur und Gemüseproben (Spinat, Honigmelone, Tomaten) [395]. Die ermittelten Nachweisgrenzen in der Zellkultur betragen 3,4 bis 34 lebende Zellen pro μL , während sie in den Gemüseproben 6×10^3 bis 6×10^4 Zellen/g betragen. Im Vergleich zur PMA-qPCR waren die ermittelten Nachweisgrenzen ähnlich und zum Teil sogar besser. Eine weitere Studie von LU ET AL. (2009) nutzte EMA (Ethidiummonoazid) statt PMA in Kombination mit LAMP für die Detektion von bis zu 10 *Salmonella*-Zellen (lebend) in 2 μL Zellkultur [370]. Die mittels On-Chip RPA erreichte Nachweisgrenze für ΦX174 ist im Vergleich zu den Literaturwerten um den Faktor 100 schlechter, wobei die Vergleichbarkeit aufgrund der unterschiedlichen Analyten allerdings nur bedingt gegeben ist.

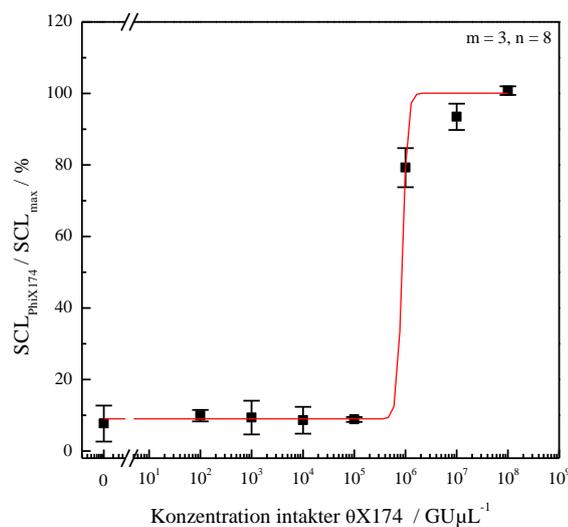


Abbildung 42: Aktivität / Inaktivität-Unterscheidung mittels On-Chip-RPA für Bakteriophage ΦX174 . Die Länge des Amplifikates betrug 200 bp.

4. Zusammenfassung und Ausblick

Der Zugang zu sicherem Trinkwasser gilt zu Recht als wesentlicher Bestandteil für die Sicherung der Lebensgrundlage für eine gesunde Gesellschaft. Insbesondere von Krankheitserregern in Trinkwasser geht eine besondere Gefährdung aus. Eine Ausweitung der Hygieneüberwachung auf Pathogene im Trinkwasser wird daher vielerseits als sinnvoll und notwendig erachtet. Die aktuell verwendeten, meist Kultur-basierten Nachweismethoden sind allerdings auf Grund der langen Messzeit (z.T. mehrere Tage) und ihrer eingeschränkten Anwendbarkeit und Aussagekraft (v. a. für Viren) nur unzureichend für Hygiene-Monitoringsysteme geeignet und müssen durch moderne, molekularbiologische Methoden ergänzt werden. Das Ziel dieser Arbeit war daher der Aufbau eines solchen Hygiene-Monitoringsystems für Pathogene in Trinkwasser, wobei zunächst die Komponenten des Systems für Probenvorbereitung und Detektion entwickelt wurden. Anschließend wurden erste Untersuchungen für das Zusammenfügen der einzelnen Komponenten zu einem modularen System durchgeführt.

Auf Grund der großen Diversität und des hohen Infektions- und Ausbreitungspotentials stellen wasserbürtige Pathogene (Bakterien, Viren, Bakteriophagen, Protozoen) eine besondere analytische Herausforderung dar. Sehr kleinen Konzentrationen stehen dabei sehr große Probenvolumina (von teilweise $\gg 1\ 000\ \text{L}$) gegenüber. Da kein gegenwärtig verfügbares Detektionssystem in der Lage ist, die notwendigen Nachweisgrenzen zu erreichen, müssen sie mit (meist modularen) Aufkonzentrierungsmethoden kombiniert werden. Im ersten Teil dieser Forschungsarbeit wurde daher die Möglichkeiten zur Aufkonzentrierung von Krankheitserregern in Wasserproben mit einem Volumen bis zu $98\ \text{m}^3$ Trinkwasser untersucht. Dabei wurde ein 3-stufiger Prozess, bestehend aus Ultrafiltration, Monolith-basierter Adsorptionsfiltration und zentrifugaler Ultrafiltration verwendet. Der Bakteriophage MS 2 diente dabei auf Grund seiner geringen Größe von ca. 25 nm, seiner Nichtpathogenität gegenüber Menschen und seiner Verbindung zu fäkalen Verunreinigungen als ideale Modellmikrobe für Viren. Zunächst wurde die erste Aufkonzentrierungsstufe, die Ultrafiltration untersucht, da diese den größten Zeitaufwand im Gesamtprozess benötigt. Trinkwasserproben (aufgestockt mit MS 2:

$1,4 \times 10^{12} \pm 3 \times 10^{10}$ GU bzw. $2,4 \times 10^9 \pm 3 \times 10^8$ PFU) mit einem Volumen von 32 m^3 wurden im *Dead-end*-Modus innerhalb von 24 h auf ein Volumen von ca. 20 L aufkonzentriert. Dabei konnten $32 \pm 4 \%$ (mit qPCR bestimmt) bzw. $11 \pm 5 \%$ (mit Plaque-Assay bestimmt) der gespikten MS 2 wiedergefunden werden. Für ein Probenvolumen von 98 m^3 (aufgestockt mit MS 2: $5,2 \times 10^{12} \pm 7 \times 10^{10}$ GU bzw. $1,8 \times 10^{10} \pm 2 \times 10^9$ PFU) wurden 72 h benötigt und es ergab sich eine Wiederfindung von $21 \pm 3 \%$ (mit qPCR bestimmt) bzw. $0,8 \pm 0,3 \%$ (mit Plaque-Assay bestimmt). Trotz des höheren volumetrischen Aufkonzentrierungsfaktors, blieb der netto Aufkonzentrierungsfaktor auf Grund der sinkenden Wiederfindung bei 1×10^3 . Vor allem die Ergebnisse des Plaque-Assay zeigten, dass sich die lange Dauer der Filtration von 98 m^3 Trinkwasser negativ auf die Infektiösität der Bakteriophagen auswirkte, weswegen in diesem Fall eine Verminderung Filtrationszeit zugunsten der Wiederfindung sinnvoll erscheint.

Der 3-stufige Prozess ermöglichte die Aufkonzentrierung von Trinkwasserproben mit einem Volumen von bis zu 98 m^3 (aufgestockt mit MS 2: $1,1 \times 10^{12} \pm 4 \times 10^{10}$ GU bzw. $1,8 \times 10^{10} \pm 2 \times 10^9$ PFU) auf ein Endvolumen von ca. 1 mL, wobei maximal $1,2 \pm 0,7 \%$ (mit qPCR bestimmt) bzw. $1,1 \pm 0,9 \%$ (mit Plaque-Assay bestimmt) der eingesetzten MS 2 wiedergefunden wurden. Dennoch konnten Aufkonzentrierungsfaktoren von 2×10^5 bis 4×10^6 (32 m^3) bzw. 2×10^5 bis 1×10^6 (98 m^3) erzielt werden, was im Vergleich zu anderen Verfahren als sehr gut zu werten ist. Erneut brachte eine Vergrößerung des Probenvolumens auf 98 m^3 keine Verbesserung des Aufkonzentrierungsfaktors, da die Wiederfindung in gleichem Maße abnahm.

Der zweite Teil dieser Forschungsarbeit beschäftigte sich mit dem Aufbau einer Mikroarray-basierten Detektionsmethode für den simultanen Nachweis der Krankheitserreger auf der Mikroarray-Analysenplattform MCR 3, wodurch ein hoher Grad an Automatisierung erreicht werden konnte. Die Identifizierung der Krankheitserreger erfolgt dabei anhand ihres Spezies-spezifischen Genoms, wobei die dafür notwendige Amplifikation der DNA mit Hilfe einer isothermen Amplifikationsmethode (Rekombinase-Polymerase-Amplifikation, RPA) in den Assay integriert wurde.

Die Basis des Assays bildeten DNA-Mikroarrays, auf welchen Spezies-spezifische Primer (*reverse-Primer*) an definierten Stellen immobilisiert sind. Im Verlauf der Amplifikationsreaktion entstehen Biotin-markierte Amplifikationsprodukte, die an den passenden Primern auf der Mikroarrayoberfläche binden. Die Signaltransduktion erfolgt

durch anschließende Markierung des Biotins mit Hilfe von Streptavidin, welches an das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert ist. Durch die Umsetzung von Luminol und Wasserstoffperoxid mit HRP wird schließlich ein Chemilumineszenz-Signal erzeugt, welches über eine CCD-Kamera aufgezeichnet wird. Die Position des CL-Signals dient dabei der Identifizierung des Pathogens, während die Intensität des Signals mit der eingesetzten Menge an Ziel-DNA korreliert.

Der erste Schritt der Entwicklung des Assays war die Anpassung der Herstellungsprotokolle für die DNA-Mikroarrays, da die schwankende Qualität der als Basis dienenden modifizierten Glasobjektträger zu starken unspezifischen Hintergrundsignalen führten. Vor allem die Kontrolle der Luftfeuchtigkeit während der einzelnen Reaktionsschritte spielte dabei eine entscheidende Rolle. Des Weiteren wurden verschiedene Oberflächenmodifizierungen mit einander verglichen. Neben der Oberflächenchemie hatte auch die Menge an immobilisierten Primer einen direkten Einfluss auf die Sensitivität des Assays. Daher wurde das bisher verwendete Spotting-Verfahren nach der *Solid Pin*-Methode durch eine *Inkjet*-Methode ersetzt. Somit konnte die Menge an gespottetem Primer besser kontrolliert werden. Aus dem Vergleich des Messsignals für verschiedene Mengen an immobilisiertem Primer wurde berechnet, dass eine Mindestanzahl von 4×10^{10} Primermoleküle auf der gespotteten Mikroarrayoberfläche (ca. 5 mm^2) notwendig ist, um ein Signal / Rausch-Verhältnis von mindestens 3 ($\text{SNR} > 3$) zu erzeugen. Durch Erhöhung der Menge an immobilisiertem Primer auf der Oberfläche konnte auch das CL-Signal erhöht werden, wobei die maximal mögliche Primer-Menge pro Analyt bei $28 \pm 2 \text{ pmol}$ lag. Nach der Anpassung der Herstellungsprotokolle für DNA-Mikroarrays, wurden die Reaktionsbedingungen für die On-Chip-RPA optimiert und verschiedene Reportersysteme verglichen. Neben dem Reportersystem Biotin / Streptavidin wurde ein alternatives Reportersystem mit Digoxigenin (DIG) / Anti-Digoxigenin-Antikörper getestet. Dabei wurden Sensitivität und Reproduzierbarkeit beider Systeme im mittleren ($10^6 \text{ GU}/\mu\text{L}$) und unteren ($10^4 \text{ GU}/\mu\text{L}$) Messbereich des Assays verglichen. Obwohl das System DIG / Anti-DIG-Antikörper im mittleren Messbereich ein höheres CL-Signal lieferte, zeigte sich das System Biotin / Streptavidin sowohl in punkto Reproduzierbarkeit und Sensitivität vor allem im unteren Messbereich als deutlich überlegen. Das Reportersystem Biotin / Streptavidin wurde daher bevorzugt.

Durch Variation der Primerverhältnisse (symmetrisch, asymmetrisch) im Reaktionsmix, sollte

im nächsten Schritt die Benachteiligung der Amplifikationsreaktionen an der Oberfläche überwunden werden. Durch Erhöhung des Anteils an RW-Primer im Reaktionsmix (zusätzlich zum immobilisierten RW-Primer auf der Mikroarrayoberfläche) wurde neben der Amplifikationsreaktion auf der Oberfläche ein zweiter Amplifikationszyklus angeregt. Dieser findet in der Flüssigphase über dem Mikroarray statt und führt zur Generation von Biotin-markierten Amplifikationsprodukten. Da sie die Startsequenz für den immobilisierten RW-Primer beinhalten, werden sie durch Hybridisierung an der Oberfläche gebunden und verstärken somit die Sensitivität des Assays. Auf diese Weise konnte die Sensitivität des Assays um ein Vielfaches gesteigert werden.

Neben der Variation des Primerverhältnisses wurde für die Überwindung der Hindernisse der Festphasen-Reaktion auch eine zusätzliche Durchmischung der Probe während der Amplifikation getestet. Dabei wurden verschiedene Durchmischungsszenarien getestet, welche sich in der Anzahl, Stärke, bewegtem Volumen und Richtung unterschieden. Im Vergleich zu einer statischen Inkubation waren alle Durchmischungsszenarien jedoch unterlegen, weswegen die statische Inkubation bevorzugt wurde.

Da enzymatische Reaktionen in großem Maße von der Temperatur, sowie der Reaktionsdauer beeinflusst werden, wurden diese Parameter ebenfalls untersucht. Der untersuchte Temperaturbereich erstreckte sich von 20 °C bis 60 °C (bei 20 min Reaktionszeit), wobei ein optimaler Bereich von 37 °C bis 42 °C ermittelt wurde. Dies entspricht ebenfalls dem optimalen Bereich von RPA-Reaktionen in Lösung. Daneben wurden Reaktionszeiten von 5 bis 840 min (bei 37 °C Reaktionstemperatur) getestet, wobei das Hintergrundsignal bereits ab einer Reaktionszeit von 10 min überschritten wurde. Das maximale Messsignal ergab sich bei einer Reaktionszeit von 60 min. Der gegenseitige Einfluss der Reaktionsparameter Temperatur und Inkubationszeit wurde durch Quantifizierung von HAdV 41-Plasmidstandards verschiedener Konzentration ermittelt. Durch eine Erhöhung der Temperatur auf 39 °C, statt der bisher verwendeten 37 °C, konnte die optimale Reaktionszeit von 60 min auf 40 min reduziert werden. Die Nachweisgrenze für das Humane Adenovirus 41 betrug 35 GU/μL (39 °C, 40 min). Die finale Messzeit des entwickelten Assays beträgt damit 48 min.

Nach der Optimierung des Assays wurde dieser für weitere Mikroben eingesetzt. Die Nachweisgrenze für die Bakteriophage Φ X 174 und das Bakterium *E. faecalis* betragen 1 GU/μL und 5×10^3 GU/μL. Abgesehen von *E. faecalis* lagen die Nachweisgrenzen des

Assays damit im Bereich der qPCR bzw. anderer isothermer Amplifikationsmethoden.

Auch die Quantifizierung von Bakteriophage Φ X 174 in einer Realprobenmatrix (Flusswasser) konnte mit dem entwickelten Assay durchgeführt werden. Die erreichte Nachweisgrenze betrug hier 2×10^2 GU/ μ L, wogegen die als Referenzmethode eingesetzte qPCR eine Nachweisgrenze von 8 GU/ μ L aufwies. Für die Detektion einzelner Mikroben scheint die qPCR der On-Chip-RPA daher überlegen, da sie neben der geringen Nachweisgrenze einen breiteren Messbereich (meist über 8-Log-Stufen hinweg) aufweist.

Der Vorteil der On-Chip-RPA gegenüber der qPCR zeigt sich vor allem bei der gleichzeitigen Messung mehrerer Zielmikroben, da die Anzahl der parallel messbaren Pathogene theoretisch nicht begrenzt ist. Limitierungen ergeben sich hier vor allem aus der steigenden Komplexität der Primersysteme. Die Anwendbarkeit der On-Chip-RPA für die Multipathogen-Detektion wurde anhand des Virus HAdV 41, des Bakteriophagen Φ X 174 und der Bakterie *E. faecalis* demonstriert. Die Zielmikroben konnten dabei sowohl einzeln, als auch in Mischproben aus zwei oder drei Mikroben nachgewiesen werden.

Mit Hinblick auf ein Monitoringsystem für Krankheitserreger wurde der On-Chip-RPA-Assay mit monolithischer Adsorptionsfiltration (MAF, Diethylaminoethyl-funktionalisiert) kombiniert, um Φ X 174 und *E. faecalis* in aufgestockten 10-L-Leitungswasserproben gleichzeitig aufzukonzentrieren und nachzuweisen. Durch die Aufkonzentrierung der Probe mittels MAF konnten beide Analyte ungefähr um den Faktor 100 aufkonzentriert werden, was die Sensitivität des Assays erhöhte. Das Experiment zeigte die Kompatibilität der Methoden und das Potential einer modularen Kombination der Verfahren.

Schließlich wurde eine Aktiv /Inaktiv-Unterscheidung bzw. Lebend / Tot-Unterscheidung für Viren bzw. Bakterien in den Assay integriert. Hierfür wurde die Probe vor der Nukleinsäureextraktion mit Propidium-Monoazid inkubiert, welches freie Nukleinsäuren durch eine photochemische Reaktion für die Nukleinsäureamplifikation inhibiert. Damit konnte der Informationsgehalt der Detektionsmethode erhöht werden. Zukünftig könnte diese Erweiterung dazu dienen, die Lücke zwischen Kultur-basierten und molekularbiologischen Detektionsmethoden für Pathogene in Trinkwasser weiter zu schließen. In einer dekadischen Verdünnungsreihe intakter Φ X 174-Bakteriophagen, welche einen hohen Anteil an hitzeinaktivierten Phagen enthielten, konnte die On-Chip-RPA erfolgreich zwischen aktiven und inaktiven Bakteriophagen unterscheiden. Die erzielte

Nachweisgrenze war 7×10^2 GU/ μ L und damit vergleichbar mit der Quantifizierung von Φ X 174 in Flusswasser.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass ein Hygiene-Monitoringsystem für Trinkwasser durch Kombinationen von (selektiven und unselektiven) Aufkonzentrierungssystemen mit Multianalyt-Detektionssystemen, wie der entwickelten On-Chip-RPA auch in großen Probenvolumina dargestellt werden kann. Durch Erweiterung des Informationsspektrums molekularbiologischer Detektionsmethoden beispielsweise mit Hilfe einer PMA-basierten Aktiv / Inaktiv-Unterscheidung lassen sich nicht nur die An- / Abwesenheit von Pathogenen, sondern auch deren Vitalität ermitteln.

Wie ein solches Monitoringsystem aus den in dieser Arbeit verwendeten Methoden aufgebaut sein könnte, ist in Abbildung 43 dargestellt. Aus einem Wasserreservoir wird in regelmäßigen Abständen eine Wasserprobe von 1 m^3 genommen und mit Hilfe des 3-stufigen Prozesses aus Ultrafiltration, monolithischer Adsorptionsfiltration und zentrifugaler Ultrafiltration auf ein Volumen von wenigen Millilitern aufkonzentriert. Dieses Konzentrat wird nun in zwei Proben geteilt. Teilprobe 1 wird direkt der Nukleinsäureextraktion unterzogen, woraufhin mit Hilfe des entwickelten On-Chip-RPA-Assays auf der Mikroarray-Analysenplattform MCR 3 die An- / Abwesenheit der Zielpathogene ermittelt wird (Multipathogen-Screening). Teilprobe 2 wird stattdessen vor der Nukleinsäureextraktion mit PMA behandelt, wodurch eine Aktiv- / Inaktiv- bzw. Lebend- / Tot-Unterscheidung ermöglicht wird. Nach der erfolgten Behandlung mit PMA erscheinen im On-Chip-RPA-Assay nur noch die intakten Pathogene. Im Vergleich der Ergebnisse aus Teilprobe 1 und 2 ist nun eine Abschätzung der Kontamination von Pathogenen möglich. Bei einem positiven Ergebnis können die ermittelten Pathogene mit den gängigen Methoden eingehender untersucht und quantifiziert werden. Durch die Verwendung eines solchen Monitoringsystems ergäbe sich die Möglichkeit einer flächendeckenden Datenerfassung (beispielsweise in weitverzweigten Wasserversorgungssystemen), da viele Prozessschritte auch dezentral durchgeführt werden könnten. Darüber hinaus würde ein solches Monitoringsystem auch zeitabhängige und zeitnahe Daten (innerhalb von Stunden) liefern, was der Reaktionszeit der Wasserversorger und Behörden zu Gute kommen würde.

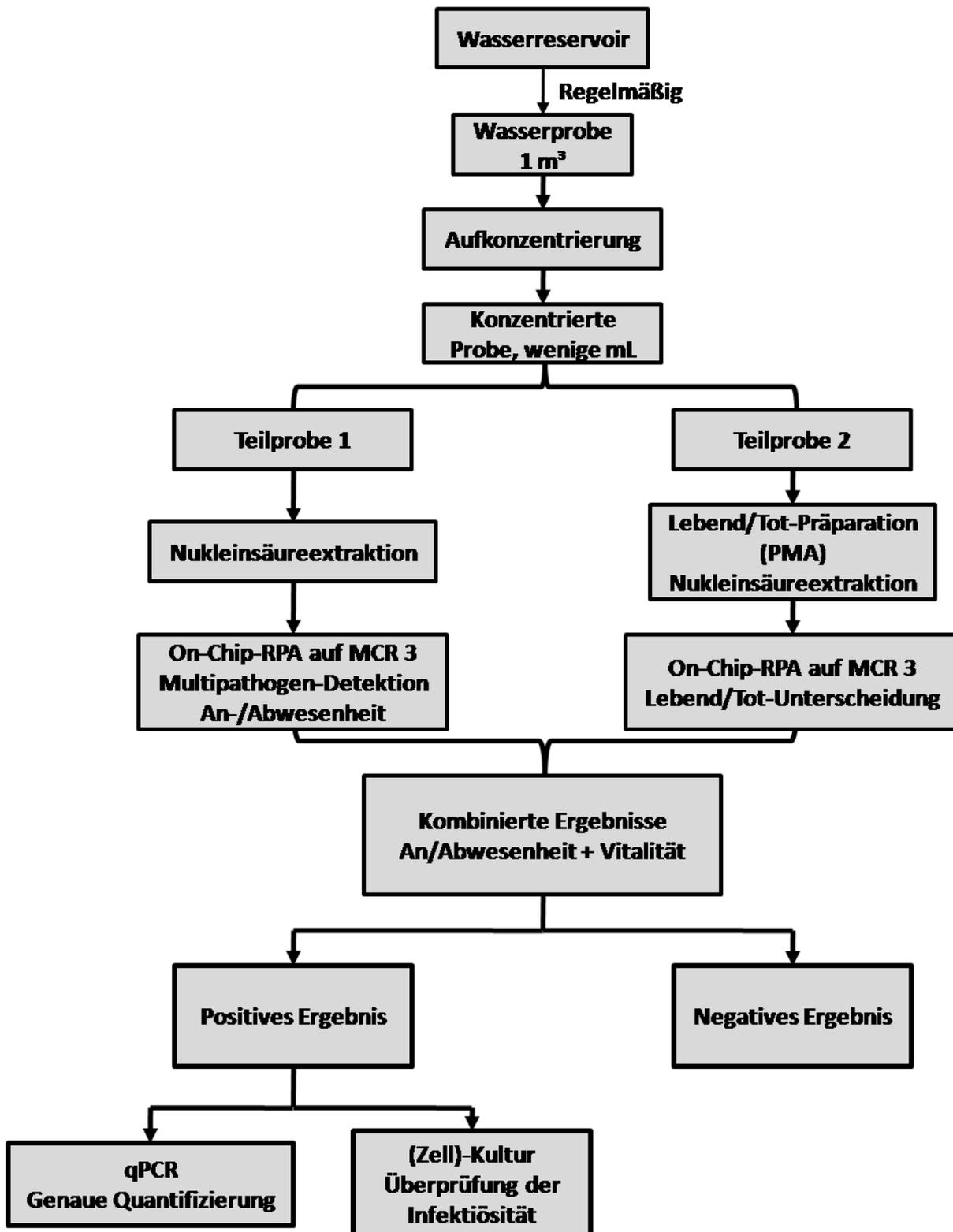


Abbildung 43: Beispielhafter Aufbau eines Hygiene-Monitoringsystems für Trinkwasser.

5. Summary and Outlook

The access to safe drinking water is of fundamental importance for the protection of the public health. Therefore the consumption of drinking water contaminated with pathogens represents a special hazard. Moreover due to climate change this danger may increase in future. An expansion of the hygiene monitoring of drinking water seems meaningful and necessary, in the scope of consumers, producers and authorities. Currently, only culture-based detection methods are accepted for the control of microbial water quality. However, they are poorly suitable to fulfill the requirements of a hygiene monitoring system. In terms of measurement time and lacking validity upon virus detection these methods have to be supplemented by modern, molecular biological methods. The aim of this thesis, therefore, was the design of such a monitoring system for pathogens in drinking water. The technologies for sample preparation and detection were developed and subsequently tested as a modular system.

Due to the high diversity, as well as the high infectious end epidemic potential, waterborne pathogens (bacteria, viruses, bacteriophages, protozoa) represent a special analytical task. The detection of such small concentrations in large sample volumes of typically above $>> 1\,000\text{ L}$ are not manageable with detection methods available today. Therefore, these methods have to be combined with modular concentration methods for rapid sample preparation of large water volumes. In the first part of this thesis, the focus lay on the concentration of pathogens in tap water volumes of up to 98 m^3 . A 3-step process consisting of ultrafiltration, monolithic adsorption filtration and centrifugal ultrafiltration was used. Bacteriophage MS 2 served as model virus, due to its small size of 25 nm , the non-pathogenicity to humans and the link to fecal contaminations. Ultrafiltration as the first and most time consuming step of the concentration process was investigated first. Tap water samples of 32 m^3 (spiked with MS 2: $1,4 \times 10^{12} \pm 3 \times 10^{10}\text{ GU}$ and $2,4 \times 10^9 \pm 3 \times 10^8\text{ PFU}$, respectively) were concentrated to a final volume of 20 L by Dead-end filtration within 24 h and $32 \pm 4\%$ (determined by qPCR), $11 \pm 5\%$ (determined by plaque assay) of spiked MS 2 could be recovered by qPCR and plaque assay, respectively. A tap water volume of 98 m^3 (spiked with MS 2: $5,2 \times 10^{12} \pm 7 \times 10^{10}\text{ GU}$ and $1,8 \times 10^{10} \pm 2 \times 10^9\text{ PFU}$, respectively) was

processed within 72 h and $21 \pm 3 \%$ (determined by qPCR), $0,8 \pm 0,3 \%$ (determined by plaque assay) of spiked MS 2 were recovered, respectively. Though the volumetric concentration factor was higher, the net concentration factor was 1×10^3 due to the decreasing recovery. Especially the analysis by plaque assay showed that the long time needed for filtration of 98 m^3 of tap water had a negative influence on the infectivity of MS 2. The filtration time should be reduced in the final experimental setup in favor of the recovery.

The 3-step concentration process was able to concentrate tap water samples with a volume of 98 m^3 (spiked with MS 2: $1,1 \times 10^{12} \pm 4 \times 10^{10}$ GU and $1,8 \times 10^{10} \pm 2 \times 10^9$ PFU, respectively) to a final volume of $\sim 1 \text{ mL}$ with low recoveries of $3,6 \pm 0,9 \%$ (determined by qPCR) and $13 \pm 12 \%$ (determined by plaque assay), respectively. Nevertheless net concentration factors of 2×10^5 bis 4×10^6 for $\sim 32 \text{ m}^3$ and 2×10^5 bis 1×10^6 for 98 m^3 of tap water were achieved, which was comparable with other reported concentration methods. Again the increase of the sample volume to 98 m^3 had no effect on the concentration factor since the recovery decreased in the same extend.

In the second part of this thesis, a microarray-based detection method for the simultaneous detection of waterborne pathogens was developed. By establishing the assay on the microarray analysis platform MCR 3, a high level of automation was achieved. The identification, thereby, is based on their species specific genome. The amplification of the target DNA was integrated into the assay by using an isothermal amplification method (recombinase polymerase amplification).

The assay is based on DNA microarrays with species specific primers (reverse primers) immobilized on defined spots. In the course of the amplification reaction biotin conjugated amplification products are formed, which bind to the matching primers on the microarray surface. Signal transduction is done by using the reporter system biotin / streptavidin (conjugated to horseradish peroxidase, HRP). After the addition of luminol and hydrogen peroxide a chemiluminescence signal is generated, which is recorded by a CCD camera. The identification of the pathogen is done by the position of the CL signal on the microarray whereas the intensity of the signal correlates with amount of target DNA in the sample. The first step for the development of the assay was the adaption of the protocols for synthesis of DNA microarrays. The varying quality of the microarrays was mainly caused by a lacking control of humidity during reaction steps sensitive to hydrolysis. Moreover different

synthesis strategies were compared. Besides the surface chemistry also the amount of immobilized primer had a direct influence on assay sensitivity. Therefore the presently established spotting method (solid pin method) was replaced by an inkjet method in order to control the amount of immobilized primer. The signal intensities of different amounts of immobilized primer for the same concentration of human adenovirus plasmid were compared. From the results, the minimum number of primer molecules necessary to achieve a signal-to-noise-ratio of minimum 3 ($\text{SNR} > 3$) was calculated. The minimum number was 4×10^{10} primer molecules on the spotted microarray surface of approx. 5 mm^2 . By increasing the amount of primer immobilized on the microarray surface also the CL signal could be increased. The maximum amount of primer was $28 \pm 2 \text{ pmol}$ per analyte.

The reaction conditions of the on-chip RPA were optimized next. Moreover different reporter systems were compared. Besides the system biotin / streptavidin also the system digoxigenin (DIG) / anti-digoxigenin antibody was tested. Sensitivity as well as reproducibility in a mid ($10^6 \text{ GU}/\mu\text{L}$) and low ($10^4 \text{ GU}/\mu\text{L}$) concentration range of the assay were compared. Although the system DIG / anti-DIG antibody showed a higher CL signal in the mid concentration the system biotin / streptavidin was superior regarding reproducibility and sensitivity in the low concentration range. Therefore, the reporter system biotin / streptavidin was chosen.

The hindrance of the RPA reaction on the microarray surface was the next topic to be investigated. By applying additional reverse primer to the reaction mix, asymmetric primer conditions were achieved. Thus, a second amplification cycle in the bulk phase was stimulated which forms additional biotin-conjugated amplification products. Since these products contain the starting sequences for the immobilized reverse primers, they would hybridize to the surface thereby enhancing the CL signal. Thus the sensitivity of the assay was increased many times over.

Besides the variation of the primer conditions, additional mixing steps of the sample during amplification were applied to overcome the hindrance of the RPA reaction on the surface. Different scenarios were tested varying the repetitions, strength, volume and direction of the mixing steps. The incubation in a static fashion without mixing step was always superior and therefore was preferred.

Reaction temperature and time were the next parameters to be investigated since both have a strong effect on the efficiency of enzymatic reactions. At a constant time of 20 min,

reaction temperatures of 20 °C to 60 °C were applied. The optimum temperature lay between 37 °C and 42 °C which was comparable to the optimum of the RPA in solution. On the other hand reaction times of 5 min to 840 min were applied at constant a temperature of 37 °C. A reaction time of 10 min was the minimum to generate a CL signal which exceeded the background signal. The maximum signal was generated for a reaction time of 60 min. The influence of both parameters together were investigated using concentration depended experiments. For plasmid standards of HAdV 41 an increase of the reaction temperature by 2 °C to 39 °C was applied to reduce the optimum reaction time from 60 min to 40 min. The resulting limit of detection for human adenovirus 41 was 35 GU/ μ L (39 °C, 40 min). Due to these experiments, the final measurement time of the assay was optimized to 48 min.

After optimization of the assay, it was applied for the quantification of bacteriophage Φ X 174 and the bacteria *E. faecalis*. The resulting limit of detection was 1 GU/ μ L and 5×10^3 GU/ μ L, respectively. With the exception of *E. faecalis* the limit of detection was comparable to qPCR and in part better than other reported isothermal amplification methods.

The assay was also applied for the quantification of bacteriophage Φ X 174 in real samples (river water). The resulting limit of detection was 2×10^2 GU/ μ L, whereas the qPCR reference method achieved 8 GU/ μ L. For the detection of single microbes the qPCR is superior since both limit of detection and working range are superior (typically 8-log steps).

The advantage of the on-chip RPA towards the qPCR lays in the possibility to detect several microbes simultaneously, since the number of analytes theoretically is not limited. Limitations mainly result from the increasing complexity of the primer systems. The applicability of the on-chip RPA assay for multi pathogen detection was demonstrated by detecting the virus HAdV 41, the bacteriophage Φ X 174 and the bacteria *E. faecalis* in single, as well as mixing samples containing two out of three or all three microbes.

With regard to the monitoring system for waterborne pathogens, the on-chip RPA assay was combined with monolithic adsorption filtration (MAF, diethylaminoethyl-functionalized). Φ X 174 and *E. faecalis* were spiked in 10-L tap water samples and concentrated by MAF, followed by nucleic acid extraction and subsequent detection by on-chip RPA. The concentration of the microbes by MAF was able to increase the sensitivity of the on-chip RPA which showed the compatibility of both methods. The results were confirmed by qPCR.

Finally an active / inactive- or live / dead-discrimination for viruses and bacteria, could be

integrated in the assay. Prior to nucleic acid extraction, the samples were incubated with propidium monoazide. Thereby, free nucleic acids are inhibited for nucleic acid amplification by a photochemical reaction. By integration of the active / inactive-discrimination, the amount of information accessible by the on-chip RPA was increased. This expansion of information might help in future studies, to close the gap between molecular biological methods and culture-based methods for the detection of pathogens in water. Intact Φ X 174 in a 10-fold dilution series were supplemented by heat inactivated phages. The discrimination between active and inactive bacteriophages by the on-chip RPA was successful. The resulting limit of detection was 7×10^2 GU/ μ L and comparable to the quantification of Φ X 174 in river water.

It was shown in this thesis that hygiene monitoring systems for pathogens can be established for drinking water samples of large volumes by combining (nonselective and selective) concentration methods with multi-analyte detection systems like the developed on-chip RPA assay. By expanding the spectrum of information of molecular biological detection methods for example by an active / inactive- or live / dead –discrimination based on PMA, not only the presence / absence but also the vitality of pathogens can be determined.

A schematic diagram of such a monitoring system is displayed in Abbildung 44. A water sample with a volume of 1 m³ is taken regularly from a water reservoir. During concentration by the presented 3-step process consisting of ultrafiltration, monolithic adsorption filtration and centrifugal ultrafiltration a concentrate of a few milliliters is generated. The concentrate is split in two samples. Subsample 1 undergoes directly nucleic acid extraction followed by on-chip RPA analysis on the MCR 3. Thus the presence or absence of the target pathogens is determined (multi-pathogen screening). Subsample 2 undergoes incubation with propidium monoazide prior to nucleic acid extraction which allows the active / inactive- or live / dead-discrimination. After propidium monoazide treatment only intact pathogens will generate a CL signal in the on-chip RPA assay. By comparing the results of subsample 1 and 2, an assessment of pathogenic contamination can be done. If the results were positive, single pathogens can be quantified using established culture-based methods. By using such a monitoring system, the generation of comprehensive data (i. e. in widespread water pipeline systems) would be possible since many process steps can be performed decentralized.

Moreover, such a system would be able to generate time-resolved and prompt data (within hours) which would be favorable for the reaction times of water suppliers and authorities.

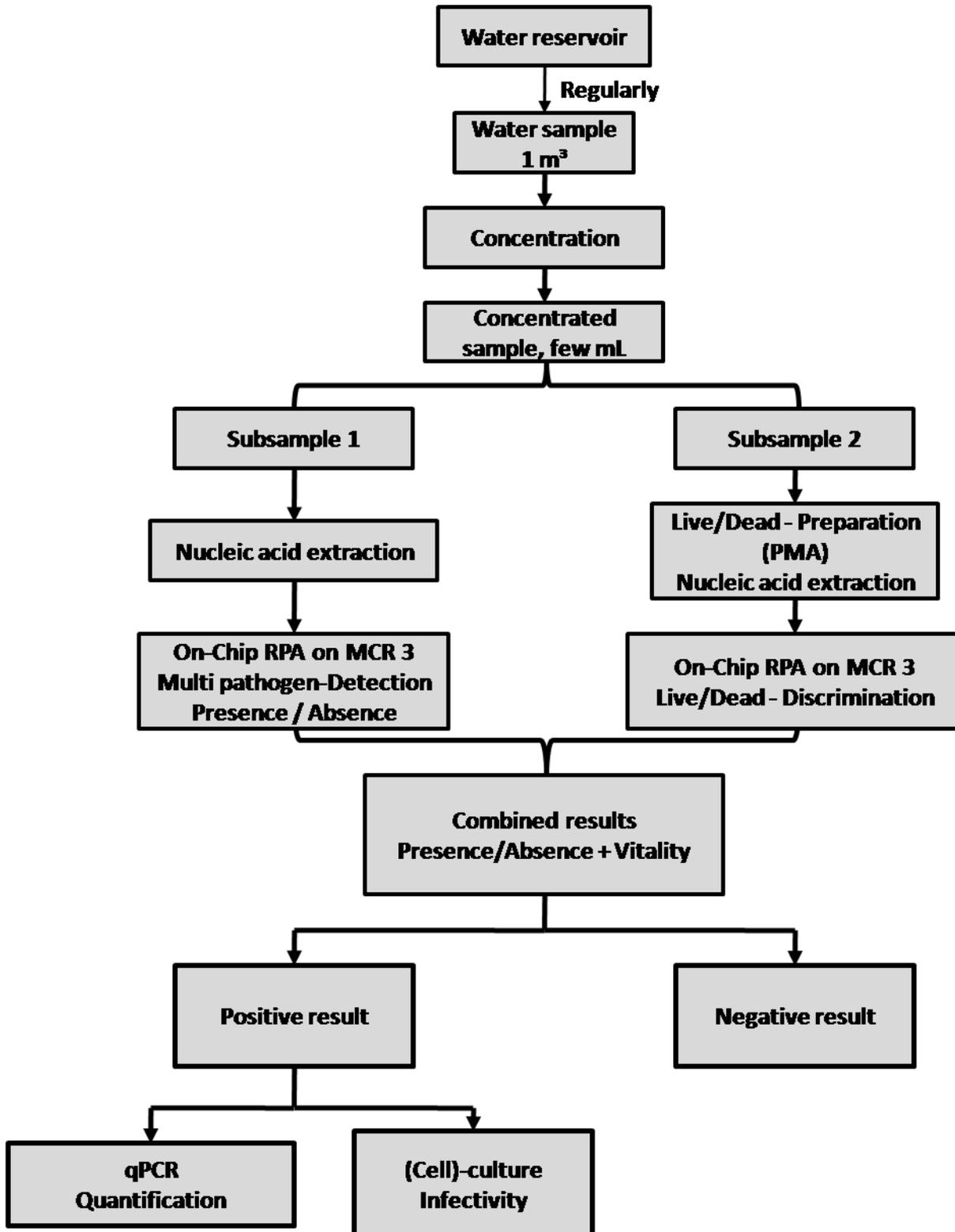


Abbildung 44: Exemplary structure of a hygiene monitoring system for drinking water.

6. Experimenteller Teil

6.1. Geräte und Materialien

6.1.1. Chemikalien und Reagenzien

1,4-Dioxan (42510, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

(Methyl)-*tert*-Buthylether (mTBE) (20249, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

2-Propanol (34959, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (50040, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Agar-Agar, bakteriologisch (2266.3, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Anti-Digoxygenin Antikörper, Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert (ab6212, Abcam, Cambridge, Großbritannien)

Casein aus Kuhmilch (C5890, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Di (N-succinimidyl) carbonat, $\geq 95,0$ % (A43720, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Diethylamin (KK00.2, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Diethylether-Bortrifluorid ($\text{BF}_3\text{Et}_2\text{O}$) (216607, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Di-Kaliumhydrogenphosphat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Dimethylaminopyridin (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Ethanol absolut, ≥ 99 % (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

EZ-Link™ Amino-PEG2-Biotin (21346, ThermoFischer Scientific, Waltham, MA, USA)

Glycin, p.a. (33226, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Hellmanex II (Hellma, Müllheim, Deutschland)

Kaliumdihydrogenphosphat (60230, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

LB (Luria lowsalt) (L3397, Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

LB-Medium (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

LightCycler CYBR Green Master 1 Mix (04707516001, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

Methanol, $\geq 99,8$ % (65548, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

N, N'-Dimethylformamid wasserfrei (40248, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)

Natriumbisulfid (13438, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Natriumchlorid (71381, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Natriumdihydrogencarbonat (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydrogencarbonat (71628, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhydroxid (Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Natriumhypochlorit (9062.3, Roth, Karlsruhe, Deutschland)
NZCYM-Medium (X974.1, Roth, Deutschland)
Polyglycerin-3-Glycidylether (Polypox R9, UPPC, Mietingen, Deutschland)
Poly (Propylenglykol) Diamin 2000 Da (JEFFAMINE® ED-2003 (XTJ-502), Huntsman, Rotterdam, Holland)
Rinderextrakt (B4888, Fluka-Sigma Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Ribonukleinsäure aus Bäckerhefe (*S. cerevisiae*, R5636, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Salzsäure HCl 37%-ig (84422, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Schwefelsäure H₂SO₄ 95 – 97 % (84720, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Streptavidin, Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiert (SA-5004, Vector Laboratories, Burlingam, USA)
Streptomycinsulfat (HP66.1, Roth, Karlsruhe Deutschland)
Toluol (89677, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Triethylamin (471283, Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland)
Wasser, PCR-Qualität (03315932001, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
WESTAR SUPERNOVA ELISA Luminol solution (XLSE2L, 0250, Cyanagen, Bologna, Italien)
WESTAR SUPERNOVA ELISA Peroxide solution (XLSE2P, 0250, Cyanagen, Bologna, Italien)

6.1.2. Pufferlösungen und Medien

Für alle Pufferlösungen wurde UV-behandeltes Reinstwasser verwendet.

Blocklösung (TRIS-HCl, 1 M, pH 8,5)

TRIS (1 M)	121,1 g
NaCl (150 mM)	8,8 g
HCl (37%, v/v)	ad pH 8,5

Reinstwasser ad 1000 mL

Glycin-haltiger Rinder-Extrakt-Puffer (pH 9,5)

Glycin 11,37 g

Beef Extract 9 g

NaOH (32 %) ad pH 9,5

Reinstwasser ad 300 mL

Laufpuffer (0,5 %Casein in PBS)

Casein 5 g

PBS-Konzentrat (10x) 100 mL

Reinstwasser ad 1000 mL

LB-Medium (für *E.coli* DSM-13127)

Trypton 10 g

Hefeextrakt 5 g

NaCl 10 g

Reinstwasser Ad 1000 mL

LB (Luria)-Medium (für *E. faecalis*)

Trypton 10 g

Hefeextrakt 5 g

NaCl 0,5 g

Reinstwasser Ad 1000 mL

NZCYM-Medium (für *E.coli* DSM-5695)

NZCYM-Medium 22 g

Reinstwasser Ad 1000 mL

Phosphat- Kochsalzpuffer (PBS, 10x)

K_2HPO_4 (70 mM) 244 g

KH_2PO_4 (10 mM) 27,1 g

NaCl (145 mM) 170 g

Reinstwasser ad 1000 mL

SM-Puffer (pH 7,4)

NaCl (100 mM) 5,8 g

$MgSO_4 \times 7 H_2O$ (0,2 M) 2 g

TRIS-HCL (1 M, pH 7,5) 50 mL

Gelatinelösung (2 %, w/v)	5 mL
Reinstwasser	ad 1000 mL
TAE-Puffer (50x)	
Tris (2 M)	242 g
Eisessig (1 M)	57,1 mL
EDTA 0,5 M, pH 8	100 mL
Reinstwasser	ad 1000 mL
TRIS-HCl, 1 M, pH 7,5	
TRIS (1 M)	121,1 g
NaCl (150 mM)	8,8 g
HCl (37%, v/v)	ad pH 7,5
Reinstwasser	ad 1000 mL

6.1.3. Kits

cDNA Synthese:

DyNAmo cDNA Synthesis Kit (F-470L, Thermo Fisher Scientific, Schwerte, Deutschland)

DNA-Aufreinigung nach RPA:

GeneJET® PCR Purification Kit (K0701, ThermoScientific, Waltham, MA, USA)

Extraktion und Aufreinigung genomischer DNA:

GeneJET® Genomic DNA Purification Kit (K0721, ThermoScientific, Waltham, MA, USA)

Extraktion und Aufreinigung viraler DNA aus Flusswasser:

QIAmp® DNA Mini Kit (15304, Quiagen, Hilden, Deutschland)

Extraktion von viraler RNA aus Trinkwasser:

ViralXpress® Nucleic Acid Extraction Kit (3095, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)

NucliSENS® Magnetic Extraction (200-292/-293, BioMérieux, Paris, Frankreich)

Rekombinase-Polymerase-Amplifikation:

TwistAmp® Basic (TABAS03KIT, TwistDx, Cambridge, United Kingdom)

Quantitative Real-time-PCR mit SYBR Green®:

LightCycler® 480 SYBR Green I Master (4707516001, Roche, Unterhaching, Deutschland)

6.1.4. Referenzstämme

Tabelle 16: In der vorliegenden Arbeit verwendete Referenzstämme. Die Identifizierungsnummern beziehen sich entweder auf die DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSM-Nummer) oder die ATCC (ATCC-Nummer).

Organismus	Kulturstamm	Identifizierungsnummer
Bakteriophagen	Phi X 174	DSM-4497
	MS 2	DSM-13767
Gramnegative Bakterien	<i>Escherichia Coli</i>	DSM-5695
		DSM-13127
Grampositive Bakterien	<i>Enterococcus faecalis</i> (Symbioflor® 1)	DSM-16431/16440
	<i>Enterococcus faecalis</i> (OG1RF)	ATCC-47077
Viren	Humanes Adenovirus HAdV 40	
	Humanes Adenovirus HAdV 41	Extrahiert aus Zellkulturüberstand
	Respiratorisches Adenovirus 1c, 4e, 7b	
	Sigmavirus	

6.1.5. Geräte und Verbrauchsmaterial

Autoklavierbeutel (0384.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland,)

BioOdyssey Calligrapher Mini Arrayer (Bio - Rad Laboratories, München, Deutschland)

Brutschrank C24KC (Edison, New York, USA)

Dampfautoklav Laboklav 55MV-FA (SHP Steriltechnik, Magdeburg, Deutschland)

Einmalspritze Injekt-F, PP/PE, 1 mL (T987.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Einmalspritze Injekt-F, PP/PE, 25 mL (T987.3, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Färbeschale und Einsätze für 20 Objektträger (2290.1 und 2291.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Graviergerät mit Diamantstift (Proxxon, Niersbach, Deutschland)

Kanister, 10 L und 20 L aus PE (N 369.1 und N 370.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Klebefolie ARcare 90106, Acryl-Hybrid, doppels.(Adhesive Research Ireland, Limerick, Irland)

Kunststoffträger, PMMA, schwarz (Institut für Wasserchemie und chemische Balneologie, München, Deutschland)

Laborwaage AT 261 Delta Range (Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland)

Laborwaage Mettler PM 4600 Delta Range (Mettler - Toledo GmbH, Gießen, Deutschland)

Magnetrührer mit Heizung, RCT Basic (IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland)

MCR 3 (GWK Präzisionstechnik GmbH, München, Deutschland)

Nanodrop 1000 (Thermo, Wilmington, USA)

Nylonfilter F40-600 (Apic GmbH, Bad Liebenzell, Deutschland)

PCR LightCycler 480 (Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland)

PDC 80 Piezo Dispense Capillary (Scinion, Berlin, Deutschland)

Petrischale, mit Nocken, 90 x 16 x 2mm (391-0440, VWR, Darmstadt, Deutschland)

Reinstwasseranlage MilliQ plus 185 (Millipore, Bedford, USA)

Roti®-Store Cryoröhrchen (P730.1, Roth, Karlsruhe Deutschland)

Schüttler C24KC (New Brunswick Scientific Corp., Edison, NJ, USA)

SciFLEXARRAYER S1 (Scienion, Berlin, Deutschland)

SciSOURCEPLATE-384-PP (CPG-5502, ABgene, Surrey, Großbritannien)

Silikonschlauch Tygon R3607 (Ismatec GmbH, Wertheim, Deutschland)

Spotternadel Stealth Solid Pin SNS9 (Arraylt, Sunnyvale, USA)

Spritzenfilter, 0,22µm (P668.1, Roth, Deutschland)

Standard - Objektträger, 76x26x1 mm (0656.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Sterilindikatorband (8221.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland,)

Trockenschrank, max. 120 °C (Memmert, Büchenbach, Deutschland)

Ultrafiltrationsmodul dizzyer S 0,9 MB 6,0 (VK-0060, INGE AG, Greifenberg, Deutschland)

Utraschallbad Sonorex RK510S (Bandelin, Berlin, Deutschland)

UV-Vis-Spektrometer DU 650 (Beckmann Instruments, Fullerton, USA)

Vortexer Top Mix FB15024 (Fisher Scientific, Pittsburgh, USA)

Zentifugenröhrchen, PP, 15 mL (AN77.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Zentifugenröhrchen, PP, 50 mL (AN79.1, Roth, Karlsruhe, Deutschland)

Zentrifuge 5804 R (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

Zentrifuge Universal 320R (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)

Zentrifugenröhrchen, Amicon Ultra-15. NMWL 50 kDa (UFC905024, Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland)

6.1.6. Software

Adobe Photoshop CS3 10.0	(Adobe Systems, USA)
AVIS FITS-Viewer	(MSB di F. Cavicchio, Italien)
BioOdyssey Calligrapher 2.0	(Bio-Rad Laboratories, Deutschland)
ChemBio Office 2012	(Cambridge Soft, USA)
ChemSketch	(Advanced Chemistry Development, Kanada)
Core Draw 12	(Corel Corporation, Kanada)
EndNote X6.0.1	(Thomson Reuters, USA)
MCR Visualization 1.0.6	(GWK Präzisionstechnik, Deutschland)
Microsoft Office Professional Plus 2010	(Microsoft Corporation, USA)
Origin Pro 9.0.0	(OriginLab Corporation, USA)
SolidWorks Lehr-Edition 2013	(Dassault Systèmes, USA)

6.2. Molekularbiologische Techniken

Für mikrobiologische Arbeiten wurde prinzipiell Wasser in MilliQ-Qualität (Reinstwasser) verwendet. Außerdem wurden die Arbeitsschritte unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Lösungen, Materialien (wie Pipettenspitzen etc.) und biologische Abfälle wurden mit Hilfe eines Dampf - Autoklaven sterilisiert.

6.2.1. Bakterienkultur und Konzentrationsbestimmung

Präparation einer Bakterienkultur von der DSMZ

Die von der DSMZ gelieferte Doppel-Ampulle, welche das gefriergetrocknete Bakterienpellet enthielt, wurde gemäß der Anleitung geöffnet. Die Ampullenspitze wurde in der Flamme erhitzt und durch Zugabe von zwei bis drei Tropfen Wasser zum Zerspringen gebracht. Die Baumwollstopfen wurden entfernt und die Oberkante der Ampulle abgeflammt. Es wurden 500 µL geeignetes Medium hinzugegeben (siehe Kapitel 6.1.2) und die Ampulle nach dem Wiederverschließen für 30 min bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurden 250 µL der

Lösung bei + 4 °C zurückgestellt, während weitere 250 µL in einen autoklavierten 300-mL-Erlenmeyerkolben mit 150 mL vorbereiteten Medium geimpft wurden. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 100 U/min inkubiert.

Präparation einer Bakterien-Übernachtskultur

Die Anzucht von Bakterien erfolgte in 150 mL geeignetem, autoklaviertem Kulturmedium (siehe Kapitel 6.1.2). Dieses wurde zunächst in einen autoklavierten 300-mL-Erlenmeyerkolben überführt, wobei Flaschenränder und Deckel durch Abflammen sterilisiert wurden. Das Animpfen mit Bakterien erfolgte mit Hilfe von Roti®-Store Glaskügelchen, woraufhin die Lösung über Nacht bei 37 °C und 100 U/min inkubiert wurde. Am nächsten Tag wurde die gewünschte Menge Bakteriensuspension bei 4 °C und 4500 U/min für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Bakterienpellet in SM-Puffer resuspendiert.

Konzentrationsbestimmung einer Bakterien-Übernachtskultur

Die Konzentrationsbestimmung einer Bakterien-Übernachtskultur erfolgte photometrisch. Nach der wie oben beschriebenen Herstellung der Übernachtskultur, wurde die Absorbanz von 1 mL der in SM-Puffer vorliegenden Suspension am Photometer bei einer Wellenlänge von 670 nm vermessen (OD_{670}). Als Referenz diente SM-Puffer ohne Bakterien. Die Messung wurde dreimal wiederholt. Die Berechnung der Zellzahl erfolgte anhand der folgenden Gleichung [372]:

$$\text{Gleichung (2)} \quad \text{Zellzahl} \left[\frac{\text{Zellen}}{\text{mL}} \right] = \frac{\overline{OD}_{670} \times 0,03}{23 \times 10^6 \left[\frac{\text{mL}}{\text{Zellen}} \right]}$$

Präparation einer Bakteriengefrierkultur (Bakterienkryokultur)

Die Präparation einer Gefrierkultur von Bakterien erfolgte mit Hilfe von Roti®-Store Kryoröhrchen. Zunächst wurde, wie oben beschrieben, eine Übernachtskultur mit einer OD_{670} von mindestens 2 hergestellt. Von dieser Suspension wurden je 500 µL in ein Kryoröhrchen überführt und das Röhrchen mehrmals sacht geschüttelt. Der Überstand wurde entfernt und verworfen. Die beimpften Kryoröhrchen wurden für die Langzeitlagerung bei – 80 °C eingefroren. Eine Kurzzeitlagerung (einige Wochen) erfolgte bei – 20 °C.

6.2.2. Bakteriophagenkultur mittels Plaque-Assay

Die Quantifizierung / Kultur von Bakteriophagen erfolgte mittels Doppelschicht-Agar-Technik nach DAWSON ET AL. (2005) (Bakteriophage MS 2), sowie SILLANKORVA ET AL. (2011) (Bakteriophage Phi X 174) und angelehnt an die DIN EN ISO 10705-1:2001 (Bakteriophage MS 2) und DIN EN ISO 10705-2:2001 (Bakteriophage Phi X 174) [103, 396].

Bakteriophage MS 2 (DSM-13767)

Für die untere Nährmediumschicht wurden je 30 mL frisch autoklaviertes, heißes NZCYM-Medium mit Agar (1,5 % Agar, w/v) in eine Petrischale (Durchmesser 96 mm) gegossen. Luftblasen in der Mediumschicht wurden mit einer Pipettenspitze entfernt. Das Aushärten erfolgte bei Raumtemperatur für mindestens zwei Stunden und möglichst erschütterungsfrei. Als Wirtsbakterium diente *E. coli* (DSM-5696, Kapitel 6.1.4). Eine Bakterienübernachtkultur in NZCYM-Medium wurde, wie in Kapitel 6.2.1 beschrieben, hergestellt und mit SM-Puffer auf eine Konzentration von 1×10^8 Zellen/mL eingestellt. Die Bakteriensuspension wurde bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert.

Die Quantifizierung von MS2-haltigen Lösungen erfolgte in dekadischen Verdünnungsreihen, um eine auszählbare Plaque-Anzahl zwischen 0 und 300 zu erreichen. Jede Verdünnungsstufe wurde dreifach kultiviert, woraus ein Endvolumen von mindestens 4 mL pro Verdünnungsstufe resultiert. Die Verdünnung der Probe erfolgte in SM-Puffer, wobei bei der Herstellung der Verdünnungen stets auf eine gute Durchmischung der Probe geachtet wurde, um Sedimentation zu vermeiden. Die Lagerung der Verdünnungen bis zur Verwendung erfolgte bei 4 °C (max. 5 Stunden). Nach der Herstellung der Verdünnungsreihe erfolgte die Herstellung der oberen Nährmediumschicht. Hierfür wurde frisch autoklaviertes, warmes NZCYM-Medium mit Agar (0,7 % Agar, w/v) zu je 3 mL pro Petrischale aliquotiert und bei 62 °C im Wasserbad bis zur Verwendung gelagert. Es war darauf zu achten, dass die Temperatur bei Zugabe der Bakterienlösung nicht zu hoch ist, um eine Beschädigung der Bakterien zu verhindern. Nach dem Abschluss der Vorbereitungen, wurde jede auszuplattierende Verdünnung mit 1 mL Bakteriensuspension versetzt, durch Vortexen gemischt und für 20 min bei 37 °C inkubiert. Als Nullprobe diente 1 mL Bakteriensuspension ohne Bakteriophagen. Die inkubierten Proben wurden mit je 3 mL des oberen Nährmediums gemischt, in eine Petrischale gegeben und durch sanftes Schwenken verteilt. Eventuelle Luftblasen wurden mit einer sterilen Pipettenspitze entfernt. Die Petrischalen wurden über

Nacht (ca. 16 h) bei 37 °C inkubiert. Durch die Infektion der Bakterien mit Bakteriophagen bilden sich Löcher (Plaques) in dem sonst dichten Bakterienrasen auf der Petrischale. Am nächsten Tag wurden diese Plaques gezählt. Unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors der Probe erfolgte die Quantifizierung der Bakteriophagen in *plaque forming units* pro mL (PFU/mL).

Die Gewinnung einer neuen Bakteriophagen-Stammlösung erfolgte je nach benötigter Menge nach verschiedenen Protokollen. Für die Herstellung von Bakteriophagen im Umfang von wenigen Millilitern wurde der Plaque-Assay verwendet. Jedoch wurden zum Infizieren der Wirtsbakteriensuspension 100 µL einer möglichst hoch konzentrierten Virensuspension (mind. 10^{11} PFU/mL) verwendet. Nach der Inkubation der ausplattierten Bakteriophagenkultur über Nacht, wurden die Petrischalen mit je 5 mL steril gefiltertem SM-Puffer überschichtet und für 3 h bei RT sanft geschwenkt. Der Überstand wurde abgenommen und für 10 min bei 4500 U/min und 4 °C zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand abgenommen (enthielt die Bakteriophagen) und mittels 0,22-µm-Spritzenvorsatzfilter steril filtriert. Für die Herstellung größerer Mengen an Bakteriophagen-Stammlösungen (> 50 mL) wurde eine Wirtsbakterium-Übernachtkultur ohne weitere Aufarbeitung mit 100 µL einer möglichst hoch konzentrierten Virensuspension (mind. 10^{11} PFU/mL) versetzt und erneut über Nacht bei 37 °C und 100 U/min inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Suspension in 30 mL-Alliquots für 10 min, bei 4500 U/min und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand (enthielt die Bakteriophagen) wurde abgenommen und mittels 0,22-µm-Spritzenvorsatzfilter steril filtriert.

Bakteriophage Phi X 174 (DSM-4497)

Die Quantifizierung / Kultur von Phi X174 erfolgte mittels Doppelschicht-Agar-Technik nach dem gleichen Protokoll wie für den Bakteriophagen MS 2. Als Wirtsbakterium diente *E. coli* (DSM-13127, Kapitel 6.1.4), welches in LB-Medium (Kapitel 6.1.2) kultiviert wurde. Die Gewinnung einer neuen Bakteriophagen-Stammlösung erfolgte ebenfalls gemäß dem obigen Protokoll für Bakteriophage MS 2.

6.2.3. Nukleinsäureextraktion

Nukleinsäureextraktion mit NucliSENS® MagneticExtractionKit

Die Extraktion erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers und wird daher nachfolgend nur kurz dargestellt. Zunächst wurden die Nukleinsäuren durch Lyse der Bakterien und Viren mit einem chaotropischem Salz (Guanidiniumthiocyanat, GuSCN) freigesetzt. Hierfür wurde 1 mL der zu extrahierenden Lösung in ein Zentrifugenröhrchen mit 2 mL NucliSENS® - Lysepuffer gegeben und gemischt. Die Lyse erfolgte während der anschließenden Inkubation für 10 min bei RT. Nach Zugabe von 50 µL der jeweils frisch gevortexten magnetischen Silikananopartikeln, wurde die Lösung für 10 min bei RT inkubiert und anschließend bei 1500 g für 2 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Nach Zugabe von 400 µL „Waschpuffer 1“ (Benennung laut Hersteller) wurde die Suspension gevortext und in ein frisches 1,5 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Nanopartikel (mit extrahierten Nukleinsäuren) wurden ein weiteres Mal mit 400 µL „Waschpuffer 1“ für 30 s und anschließend zweimal mit 500 µL „Waschpuffer 2“ (Benennung laut Hersteller) für 30 s und schließlich einmal mit 500 µL „Waschpuffer 3“ (Benennung laut Hersteller) für 15 s gewaschen. Die magnetischen Silikananopartikel wurden dabei mit Hilfe eines Magneten am Rand des Reaktionsgefäßes zurückgehalten und der Überstand nach dem Vortexen abgenommen. Nach dem letzten Waschschrift wurde der Überstand vollständig entfernt und die Nukleinsäuren durch Zugabe von 100 µL „Elutionspuffer“ (Benennung laut Hersteller) und Inkubation für 5 min bei 60 °C und 1.400 U/min von den Silikananopartikeln eluiert. Die magnetischen Silikananopartikel wurden erneut mit einem Magneten zurückgehalten und der Überstand (mit extrahierten Nukleinsäuren) gesammelt. Die Langzeitlagerung der Extrakte (mind. 1 Monat) erfolgte bei -80 °C, während die Kurzzeitlagerung bei -20 °C erfolgte.

Nukleinsäureextraktion mit Viral Xpress® Extraction Kit

Die Extraktion erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers und wird daher nachfolgend nur kurz dargestellt. Zunächst wurden 200 µL des Lysepuffers in ein 1,5-mL-Reaktionsgefäß vorgelegt. Nach der Zugabe von 150 µL der zu extrahierenden Probe, erfolgte die Freisetzung der Nukleinsäuren während der Inkubation für 5 min bei RT. Die Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 350 µL Isopropanol und Vortexen gefällt. Die Probe wurde zentrifugiert (14 000 U/min, 10 min, 20 °C) und der Überstand abgenommen und verworfen. Das Pellet wurde mit 400 µL Ethanol (70 %, v/v) gewaschen und der Überstand nach der Zentrifugation

(14 000 U/min, 10 min, 20 °C) rückstandslos entfernt. Das Pellet wurde bei RT für ca. 10 min getrocknet und anschließend in 20 µL PCR-Wasser (Nukleinsäure- und Nuklease-frei, zweifach destilliert, deionisiert und autoklaviert, Roche, Grenzach-Wyhlen, Deutschland) resuspendiert (auf Eis für 30 min). Die Langzeitlagerung der Extrakte erfolgte bei -80 °C, während die Kurzzeitlagerung bei -20 °C erfolgte.

Nukleinsäureextraktion mit QIAamp DNA Mini Kit

Die Extraktion erfolgte gemäß dem Protokoll für DNA Aufreinigung aus Blut und Körperflüssigkeiten nach den Empfehlungen des Herstellers und wird daher nachfolgend nur kurz dargestellt. Zunächst wurden 20 µL „QIAGEN Protease“ (Benennung laut Hersteller) in ein 1,5 mL-Reaktionsgefäß vorgelegt. Nach der Zugabe von 200 µL Probe und 200 µL „Puffer AL“ (Benennung laut Hersteller) wurde die Probe zunächst für 15 s gevortext anschließend bei 56 °C für 10 min inkubiert. Nach kurzem Zentrifugieren wurden 200 µL Ethanol (absolut, 96-100 %) hinzugegeben und erneut für 15 s gevortext. Die Lösung wurde in die mitgelieferten Zentrifugensäulchen übertragen und bei 8.000 U/min für 1 min zentrifugiert. Das Filtrat wurde verworfen. Nach Hinzufügen von 500 µL „Waschpuffer AW1“ (Benennung laut Hersteller) wurde das Röhrchen erneut bei 8.000 U/min für 1 min zentrifugiert und das Filtrat verworfen. Der Vorgang wurde mit 500 µL „Waschpuffer AW2“ (Benennung laut Hersteller) wiederholt, wobei die Zentrifugation bei 14.000 U/min für 3 min erfolgte. Nach dem Verwerfen des Filtrates, wurde das Röhrchen nochmals leer bei 14 000 rpm für 1 min zentrifugiert. Die Elution der Nukleinsäuren erfolgte von dem Säulchen mit 60 µL „Puffer AE“ (Benennung laut Hersteller) nach einer Inkubation für 5 min bei RT durch Zentrifugation bei 8.000 U/min für 1 min. Die Langzeitlagerung der Extrakte erfolgte bei -80 °C, während die Kurzzeitlagerung bei -20 °C erfolgte.

6.2.4. cDNA-Synthese mit DyNAmo cDNA Synthesis Kit von Thermo Fischer Scientific

Die cDNA-Synthese für extrahierte RNA erfolgte gemäß dem Protokoll des Herstellers. In Tabelle 17 ist die Zusammensetzung des Reaktionsmixes für einen Ansatz zusammengefasst.

Tabelle 17: Zusammensetzung des Reaktionsmixes für die cDNA-Synthese mit dem DyNAmo cDNA Synthesis Kit von Thermo Fischer Scientific.

Reagenz	Volumen pro Ansatz / μL
Puffer	10
Random-Hexamer-Primer	1
Reverse-Transkriptase	2
PCR-Wasser	3
RNA-Templat (Probe)	4
Gesamt	20

Gemäß der Tabelle wurden die Reagenzien in einem 200 μL -Reaktionsgefäß (PCR geeignet, Nukleinsäure- und Nuklease-frei) vorgelegt und zuletzt das RNA-Templat (Probe) zugegeben. Der Reaktionsmix wurde für 10 s gevortext und für 10 min, bei 25 °C und 200 U/min im Thermomixer inkubiert. Anschließend folgte eine Inkubation für 30 min, bei 37 °C und 200 U/min. Schließlich wurde die Temperatur für 5 min auf 85 °C erhöht und anschließend die Reaktion im Eisbad gestoppt. Die Lagerung cDNA erfolgte bei -20 °C.

6.2.5. Quantitative real-time PCR (qPCR) mit LightCycler® 480 SYBR Green® I von Roche

Alle qPCR-Experimente wurden auf dem LightCycler 480 von Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland) und gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. In Tabelle 18 ist die Zusammensetzung des Reaktionsmixes für einen Ansatz dargestellt. Sowohl *reverse*-, als auch *forward*-Primer wurden mit einer Endkonzentration von 0,4 μM eingesetzt. Die Primersequenzen waren für jeden Organismus individuell und sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Entsprechend der Tabelle wurde der Mastermix für alle zu analysieren Proben in dreifachem Ansatz hergestellt. Die für qPCR-Experimente verwendete LightCycler® 480-Mikrotiterplatte wurde mit Hilfe einer Aluplatte vorgekühlt. Ein Volumen von 18,4 μL des Mastermixes pro Kavität wurde vorgelegt, woraufhin 1,6 μL der DNA-Probe hinzugefügt wurden (Dreifachbestimmung). Die Negativkontrolle enthielt 1,6 μL PCR-Wasser. Die Mikrotiterplatte wurde mit einer Folie verschlossen, kurz zentrifugiert (1.500 U/min, 1 min)

und in den LightCycler® 480 eingelegt. Die für die Amplifikation verwendeten Temperaturprogramme sind in Tabelle 19 zusammengefasst. Die Gesamtzahl der Zyklen betrug 45.

Tabelle 18: Zusammensetzung des Reaktionsmixes für die qPCR mit LightCycler® 480 SYBR Green I von Roche.

Reagenz	Volumen pro Ansatz / μL
LightCycler 480 SYBR Green I Master (10x)	10
Reverse-Primer	0,4
Forward-Primer	0,4
PCR-Wasser	7,6
Gesamt	18,4

Die Auswertung der Ergebnisse erfolgte durch die LightCycler 480 Software mit Hilfe der Funktion „Abs Quant/2nd Derivative Max“. Diese Funktion ermittelt das Maximum der zweiten Ableitung der sigmoidalen Kurve und damit die Zyklenzahl (C_p -Wert), bei welcher das Fluoreszenzsignal in den exponentiellen Bereich der Kurve übergeht (sog. *crossing point*) [262, 263].

Tabelle 19: Primersequenzen und Temperaturprogramm für die Quantifizierung von DNA mittels qPCR.

Zielorganismus	Temperaturprogramm	Oligonukleotidsequenz [5'-3']	Referenz
MS 2	94 °C / 15 s	FW: CTGGGCAATAGTCAAA	[397]
	60 °C / 30 s	RW: CGTGGATCTGACATAC	
	72 °C / 30 s		
Phi X 174	94 °C / 20 s	FW: GGT TCG TCA AGG ACT GGT TT	[398]
	60 °C / 20 s	RW: TTG AAC AGC ATC GGA CTC AG	
	72 °C / 20 s		

6.2.6. On-Chip-Rekombinase-Polymerase-Amplifikation (RPA)

Alle RPA-Experimente wurden mit dem TwistAmp® Basic-Kit von TwistDx (Cambridge, UK) durchgeführt. Die Zusammensetzung des eingesetzten Reaktionsmixes ist in Tabelle 20

dargestellt und unterscheidet sich vom Protokoll des Herstellers. Das Kit wurde für die homogene Amplifikation der DNA eines einzelnen Analyten entwickelt. Als Konsequenz aus der Übertragung der RPA auf die DNA-Mikroarrayoberfläche, sowie als Anpassung für Multiplex-Messungen, wurde die Menge an $MgAc_2$ gegenüber den Herstellerangaben auf $4 \mu L$ erhöht. Auch die Menge der eingesetzten *forward*- und *reverse*-Primer wurde angepasst. Für die Durchführung einer On-Chip-RPA-Messung wurde zusätzlich ein Teil des eingesetzten *reverse*-Primers auf dem Mikroarray immobilisiert (siehe Kapitel 6.4.1). Soweit nicht anders beschrieben, wurden biotinylierter *forward*- und unmodifizierter *reverse*-Primer in einer Endkonzentration von 930 nM und 93 nM eingesetzt. Die Primersequenzen wurden im Rahmen des Projektes EDIT von der virologischen Abteilung der Universitätsmedizin Göttingen (UMG) entwickelt und zur Verfügung gestellt. Die Synthese der modifizierten und unmodifizierten Oligonukleotide (Primer) erfolgte durch Eurofins Genomics (Ebersberg, Deutschland). Die Sequenzen und Modifizierungen der eingesetzten Primer sind in Tabelle 21 zusammengefasst.

Tabelle 20: Zusammensetzung des Reaktionsmixes für die RPA mit TwistAmp® Basic-Kit von TwistDx.

Reagenz	Volumen pro Ansatz / μL
Rehydratationspuffer (1 x)	29,5
PCR-Wasser	10,5
Primer-Mix	5
$MgAc_2$ (280 mM)	4
DNA-Templat (Probe)	5
Gesamt	54

Für ein RPA-Experiment wurde in einem Reaktionsgefäß zunächst ein Mastermix bestehend aus Rehydratationspuffer, PCR-Wasser und Primer-Mix hergestellt. Pro Ansatz wurden $45 \mu L$ dieser Lösung in ein Reaktionsgefäß mit den gefriergetrockneten Enzymen übertragen. In den Deckel des Reaktionsgefäßes wurden $4 \mu L$ $MgAc_2$ gegeben. Nach dem Hinzufügen von $5 \mu L$ DNA-Templat (Probe) in das Reaktionsgefäß, wurde dieses verschlossen und die Reaktion durch Zentrifugation gestartet (Zugabe von $MgAc_2$).

Tabelle 21: Primersequenzen und Modifizierungen für die On-Chip-RPA. (Sequenzen im Rahmen des Projektes E.D.I.T zur Verfügung gestellt von der Universitätsmedizin Göttingen).

Zielorganismus	Oligonukleotidsequenz [5'-3']	Modifikation
Adenoviren		
HAdV 40-FW1	CCGCAATGGTCATACATGCACATCGCCGGGCAGG	5'-Biotin
HAdV 40-RW2	CAGTCGCTGCGACCTGTCTGTGGTTACATCGTGGG	5'-NH ₂ -C12
HAdV 41-FW1	GCCCCAGTGGTCATACATGCACATCGCCGGGCAGG	5'-Biotin
HAdV 41-RW5	CGTGGGTCCGAGCCACAGTGGGGTTTCTGAACTT	5'-NH ₂ -C12
HAdV 1c-FW	GGACGAGCCCACCCTTCTTTATGTTTTGTTTGAAG	5'-Biotin
HAdV 1c-RW	CCGGCCGAGAAGGGCGTGCGCAGGTACACGGTCTC	5'-NH ₂ -C12
HAdV 7b-FW	GGATGAGCCCACCCTGCTTTATCTTCTTTTGAAG	5'-Biotin
HAdV 7b-RW	CCGGCCGAGAACGGTGTGCGCAGGTAGACGGCCTC	5'-NH ₂ -C12
Bakteriophagen		
MS2-FW1	CGTGGATCTGACATACCTCCGACAACCTCCCAAC	5'-Biotin
MS2-RW2	GTAAAACGTTTCGTGTCCGGGCTCTTTCGCGAG	5'-NH ₂ -C12
PhiX174-FW2	CAAAGTTTGGATTGCTACTGACCGCTCTCGTGCTC	5'-Biotin
PhiX174-RW2	CGCCTTCCATGATGAGACAGGCCGTTTGAATG	5'-NH ₂ -C12
<i>Enterococcus faecalis</i>		
Efaecalis-FW3	CAAACCATACATTCTTCTGGGAAATTATGGCACC	5'-Biotin
Efaecalis-RW2	CCAAAGCGGCCAGTTGCAGCTGTTTTGAAAG	5'-NH ₂ -C12
Enteroviren		
Entero-FW2	GAGCAGATACCCCATGCCAGTGGGCAGTCTGTCT	5'-Biotin
Entero-RW5	CAGTATAAAAATAAAAAGGAAACACGGACAC	5'-NH ₂ -C12
Sigmavirus		
SigmaV-FW	TGACCATCCTAACTCTGTGACATTCCAAGT	5'-Biotin
SigmaV-RW	GTTGACAGTGAGCTCTTGAATCTCTGGGTT	5'-NH ₂ -C12

Für die Durchführung einer homogenen Reaktion erfolgte die Inkubation auf einem Heizblock (20 min, 37 °C). Für die Durchführung einer On-Chip-RPA-Messung wurde wie in Kapitel 6.4.2 detailliert beschrieben die Reaktionsmischung in einen DNA-Mikroarray übertragen.

6.3. Aufkonzentrierung von Viren und Mikroorganismen in großen Wasservolumina

6.3.1. Aufkonzentrierung mittels Ultrafiltration

Aufbau

Die Anlage für die Aufkonzentrierung von Mikroben in Wasserproben großer Volumina wurde von MARTIN RIEGER (2011) im Rahmen der Doktorarbeit konstruiert, gebaut und eingehend beschrieben [31]. Die Anlage ist in Abbildung 45 dargestellt. Durch den Aufbau des Systems in einem Stahlrahmen wurde die Transportfähigkeit gewährleistet. Die Ultrafiltration (UF) erfolgt an einem Hohlfasermodule der Firma INGE AG mit einer bruchsicheren Multibore®-Membran, welche eine Fläche von 6,0 m², eine Porengröße von 20 nm und eine Permeabilität von 1000 L·h⁻¹·m⁻²·bar⁻¹ besaß. Mit Hilfe einer Kreiselpumpe wurde die Wasserprobe durch das Ultrafiltrationsmodul transportiert. Die Pumpvolumenrate wurde mit Hilfe eines Frequenzumformers gesteuert. Mit Hilfe von 4 Kugelventilen (Abbildung 45, CV, SV, DV, EV) wurden die Betriebsmodi: (I) Konditionierung, (II) *Crossflow-* / *Dead-end*-Ultrafiltration, (III) Elution und (IV) Desinfektion kontrolliert. Zur Überprüfung des Transmembrandruckes verfügte das Gerät über drei Drucksensoren (Abbildung 45, P 1 bis 3). Das Filtrat konnte über ein Dreiwegeventil entweder in den Druckbehälter für das Rückspülen nach der Filtration oder ein anderes Reservoir geleitet werden. Die filtrierte Wassermenge konnte auf der Filtratseite mit Hilfe einer Wasseruhr abgelesen werden.

Um das UF-Setup für die Filtration von Volumina bis zu 100 m³ Leitungswasser verwenden zu können, mussten Änderungen im Versuchsaufbau vorgenommen werden. Der ursprünglich als Pufferspeicher verwendete 1 m³-Kunststofftank wurde entfernt und die Anlage mit einem Gartenschlauch (ID 3/4", 19 mm) über das Ventil SV direkt an die Wasserleitung im Außenbereich des Institutes angeschlossen. Um grobe organische Bestandteile

zurückzuhalten, wurde ein Nylonfilter mit einer Maschenweite von 25 µm (F40- 600, Apic GmbH, Deutschland) zwischen Wasseranschluss und Filtrationsanlage eingesetzt.

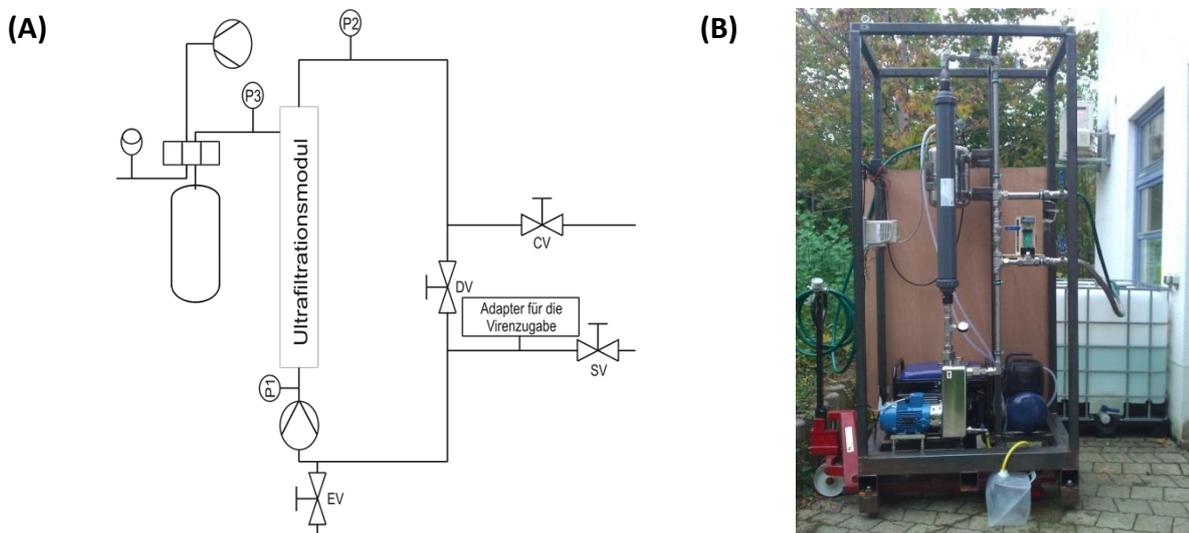


Abbildung 45: Anlage für die Ultrafiltration von großen Volumina. Das Flusschema (A) wurde von KUNZE ET AL. (2015) übernommen [119]. SV bedeutet *sample valve*, CV bedeutet *conditioning valve*, DV bedeutet *Crossflow / Dead-end valve* und EV bedeutet *elution valve*. P 1 bis 3 stehen für Drucksensoren. (B) Die Konstruktion, sowie das Foto der Anlage wurden aus der Doktorarbeit von MARTIN RIEGER (2011) übernommen [31].

Die Zugabe der Bakteriophagensuspension erfolgte kontinuierlich während der Filtration über eine Peristaltikpumpe (Ismatec, Deutschland) und einen Silikonschlauch (Ismatec, Deutschland) an einem T-Stück zwischen SV und DV.

Ablauf

Entlüftung/ Konditionierung:

Das Filtrationssystem wurde im Vorfeld jeder Filtration mit Hilfe des 1-m³-Kunststofftanks entlüften bzw. konditioniert. Proben- und Konditionierungsschlauch wurden in den mit frischem Leitungswasser gefüllten Kunststofftank getaucht. SV und CV wurden geöffnet, DV und EV blieben zunächst geschlossen. Die Pumpe wurde gestartet (1 m³/h) und DV wurde mehrmals geöffnet und geschlossen. Es wurden mindestens 100 L Leitungswasser durch die Anlage gepumpt. Ein gleichbleibender Druck zeigte an, dass keine Luft mehr im System vorhanden war. Nach der Entlüftung des Systems wurde der Rückspültank mit 24 L frisch filtriertem Wasser befüllt und mit einem Druck von 2,5 bar beaufschlagt.

Crossflow- / Dead-end-Ultrafiltration:

Das Filtrationssystem wurde wie oben beschrieben direkt mit dem Wasseranschluss

verbunden. Das Ventil SV wurde geöffnet, während CV geschlossen blieb. Für eine Filtration im *Crossflow*-Modus, wurde das Ventil DV geöffnet, für eine Filtration im *Dead-end*-Modus geschlossen. Die Kreiselpumpe wurde mit einer Geschwindigkeit von 0,7 bis 1,2 m³/h für *Crossflow*- und 1,2 bis 1,7 m³/h für *Dead-end*-UF betrieben. Das auf diese Weise filtrierte Wasservolumen wurde mit Hilfe einer Wasseruhr auf der Filtratseite verfolgt. Die Zugabe der MS 2-Bakteriophagen erfolgte kontinuierlich während der Filtration. Eine MS 2-Suspension mit ca. 10⁷ PFU/mL in Wasser (MilliQ) wurde kontinuierlich gerührt und mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (1 mL/min) über ein T-Stück zugegeben. Die Zugabe erfolgte auf diese Weise, um bei Experimenten mit langer Laufzeit (mehrere Tage) durch regelmäßigen Austausch der Bakteriophagensuspension eine Deaktivierung der Bakteriophagen durch die lange Standzeit zu verhindern. Die Aktivität / Infektiosität der Phagen wurde durch regelmäßige Probenahme überprüft. Auf diese Weise konnten eventuelle Effekte des Filtrationsprozesses von einer Deaktivierung durch eine lange Standzeit (Witterungsverhältnisse) unterschieden werden. Durch Rückwaage der Suspension vor und nach der Zugabe wurde die eingesetzte Menge an MS 2 dokumentiert und berücksichtigt.

Elution:

Nach der Filtration des gewünschten Wasservolumens, wurde die Kreiselpumpe gestoppt und SV geschlossen. DV wurde geöffnet. Die Elution des Retentats erfolgte von der Filtratseite aus durch die Rückspülung mit filtriertem Wasser (24 L, 2,5 bar). Über das Ventil EV wurden ca. 20 L Retentat in einen Plastikkanister (Roth, Deutschland) eluiert. Die Masse des Eluates wurde gravimetrisch bestimmt.

Desinfektion:

Im Anschluss an jede Filtration wurde das System vollständig desinfiziert. Hierfür wurden Proben- und Konditionierungsschlauch in einen 10-L-Plastikkanister mit 200 mg/L Natriumhypochlorit getaucht. SV und CV wurden geöffnet, während DV geschlossen wurde. Die Kreiselpumpe wurde mit 300 L/h betrieben und die Desinfektionslösung im System verteilt. Nach der Desinfektion erfolgte die Deaktivierung des Chlors durch Natriumbisulfit (0,75 %, w/v) auf die gleiche Weise. Anschließend wurde das Ventil CV geschlossen und die Pumpe gestoppt. Die Schläuche wurden in den mit frischem Leitungswasser gefülltem Kunststofftank getaucht und das System mit mindestens 200 L gespült.

6.3.2. Aufkonzentrierung mittels monolithischer Adsorptionsfiltration (MAF)

Synthese von Monolithen mit Hydroxy-Funktionalisierung

Die in dieser Arbeit verwendeten, funktionalisierten Monolithe für die Adsorptionsfiltration wurden von D. Elsäßer (IWC-TUM) und E. R. Aspiri (IWC-TUM) synthetisiert und zur Verfügung gestellt. Das verwendete Protokoll wurde von PESKOLLER ET AL. (2009) entwickelt und im Rahmen der Doktorarbeit von LU PEI (2015) angepasst [32, 182]. Es wird daher im Folgenden nur kurz beschrieben.

Für die Herstellung einer monolithischen Säule mit 38,6 mm Breite und 9,0 mm Höhe wurde eine Mischung aus 5,65 mL Toluol und 3,77 mL 2-Methoxy-2-methylpropan (MTBE) im Verhältnis 60 : 40 (v/v) als Porogen gemischt und auf 28 °C temperiert. Unmittelbar vor dem Start der Polymerisationsreaktion, wurde diese Lösung mit 150 mL einer Mischung aus Diethylether-Bortrifluorid ($\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$) und eisgekühltem 1,4-Dioxan (1 : 10, v/v) für 20 s gemischt. Ein Volumen von 2,4 mL des Monomers Polyglycerin-3-Glycidylether (PolypoxR9, UPPC, Deutschland) wurde hinzugegeben. Die gesamte Lösung wurde für 1 min gemischt und in eine PTFE-Form gegossen. Nach einer Polymerisationszeit von 1 h (28 °C), wurde der Monolith in ein 50-mL-Plastikspritzen-Gehäuse (Brand, Deutschland) überführt und mit 50 mL Methanol gewaschen.

Die Hydrolyse der Monolithe erfolgte wiederum in einem Plastikspritzen-Gehäuse mit 0,5 M Schwefelsäure bei 60 °C für 3 h. Anschließend wurde der Monolith mit Wasser (MilliQ) gewaschen und konnte in Wasser (MilliQ) bei 4 °C gelagert werden.

MAF-Filtration

Die funktionalisierten Monolithe wurden zunächst in eine Filtrationssäule eingebaut. Ein Foto und eine Beschreibung der Bauteile sind in Abbildung 46 dargestellt. Der Auslass des Plastikspritzen-Gehäuses wurde auf eine Länge von 0,9 cm abgeschnitten um den Gegendruck zu verkleinern. Auf einer PTFE-Bodenplatte wurden zwei Monolithe gestapelt in das Gehäuse eingesetzt. Die Zwischenräume wurden mit Hilfe von O-Ringen aus Gummi abgedichtet. Über einen Adapter erfolgte der Anschluss an eine Schlauchpumpe. Die Säule wurde mit einem Deckel druckstabil verschlossen.

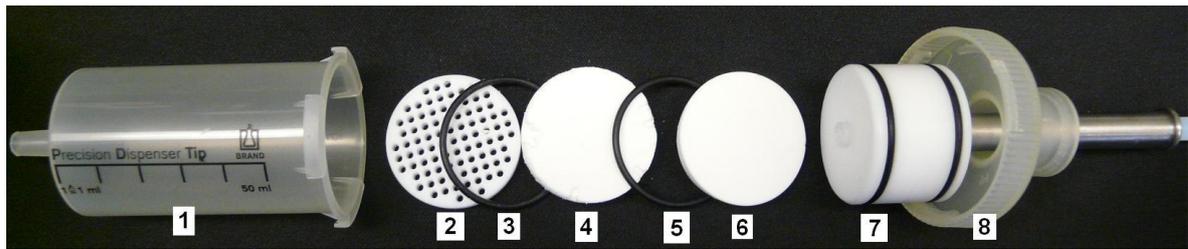


Abbildung 46: Foto einer Filtrationssäule für die monolithische Adsorptionsfiltration. Sie besteht aus einem Plastikspritzen-Gehäuse (1), einer PTFE-Bodenplatte (2), O-Ring-Dichtungen aus Gummi (3, 5), zwei MAF-Disks (4, 6), einem Adapter für den Schlauchanschluss (7) und einem Deckel (8).

Nach der Zusammensetzung der Filtrationssäule, wurden die Monolithe mit Wasser (MilliQ, pH 3) äquiliert. Dabei wurde auf eine luftfreie Befüllung der Säule geachtet. Für die Filtration wurde die Säule oberhalb eines Auffanggefäßes für das Filtrat fixiert. Der genaue Versuchsaufbau ist in Abbildung 47 dargestellt. Die 20-L-Wasserprobe (z. B. Eluat der Ultrafiltration) wurde mit HCl auf pH 3 eingestellt und mit einer Flussrate von 1 L/min durch die MAF-Säule gepumpt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Säule niemals leer lief. Nach der Filtration wurde die Schlauchpumpe gestoppt, der Auslass der Säule verschlossen und die Säule von der Schlauchpumpe getrennt. Das Probengefäß wurde ebenfalls entfernt.

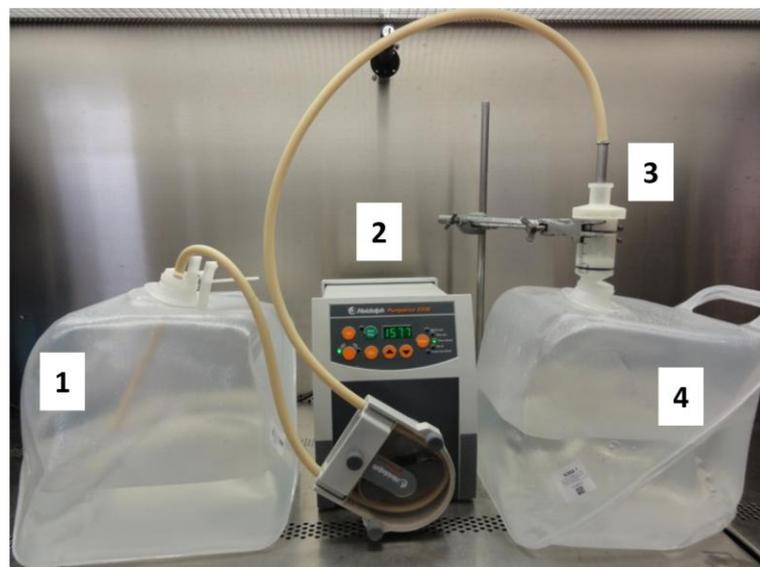


Abbildung 47: Foto des Versuchsaufbaus für die monolithische Adsorptionsfiltration. Die Probe (1) wird mit Hilfe einer Schlauchpumpe (2) durch die Filtrationssäule (3) gepumpt. Das Filtrat wird in einem Behälter gesammelt (4).

Die Elution der Monolithe erfolgte einzeln in zwei separaten Säulen. Ein Volumen von 20 mL des Elutionspuffers (0,5 M Glycin, 3 % (w/v) Rinderextrakt, pH 9,5) wurden mit Hilfe einer

Spritze in die Säule gegeben. Der Anschluss zur Schlauchpumpe wurde wiederhergestellt und der Auslass der Säule geöffnet. Bei einer Flussgeschwindigkeit von 150 mL/min wurde der Elutionspuffer in drei Intervallen durch die Säule gepumpt. Die Wartezeit zwischen den Pumpschritten betrug 2 min. Das Eluat wurde in einem tarierten Zentrifugenröhrchen gesammelt und gewogen, woraufhin es zur weiteren Analyse auf pH 7 eingestellt wurde.

6.3.3. Zentrifugale Ultrafiltration (CeUF)

Die Eluate der MAF konnten durch zentrifugale Ultrafiltration weiter aufkonzentriert werden. Die auf pH 7 eingestellten Eluate wurden hierfür in ein Amicon-Ultra-15-Zentrifugenröhrchen (Millipore, Deutschland) mit einem Größenausschluss von 50 kDa übertragen. Die Zentrifugation erfolgte bei 1500 g bis zu einem Endvolumen von ca. 1 mL.

6.4. Munich Chip-Reader 3 (MCR 3)

6.4.1. Mikroarray-Herstellung

Die Basis der DNA-Mikroarrays stellten mit Poly (Propylenglykol)-Diamin (DAPPG) kovalent belegte Glasobjektträger dar. Diese werden in folgendem als JEFFAMINE-Oberflächen bezeichnet. Die verwendeten Protokolle für die Oberflächenchemie wurden von WOLTER ET AL. (2007) und DONHAUSER ET AL. (2009) eingehend beschrieben [385, 399]. Um die Qualität der Mikroarrays zu verbessern, wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Inkubator entwickelt, mit dem die Luftfeuchtigkeit bei hydrolyseempfindlichen Syntheseschritten konstant und niedrig gehalten werden konnte. Ein Foto des Inkubators, sowie ein Einsatzschema sind in Abbildung 48 dargestellt. Die Überwachung der Temperatur und Luftfeuchtigkeit erfolgte mit einem handelsüblichen Haushaltsthermometer /-hygrometer.

(A)



(B)

DNA-Mikroarray-Herstellung

1. Reinigung

2. Ätzung / Aktivierung

3. Silanisierung ←

4. Belegung mit DAPPG

5. Aktivierung mit DSC ←

Abbildung 48: (A) Foto des Inkubators („Hydrobox“) für die Oberflächenchemie bei geringer Luftfeuchtigkeit mit Thermometer / Hygrometer. (B) Einsatz des Inkubators im Rahmen der DNA-Mikroarray-Herstellung (Pfeile).

6.4.1.1. Herstellung von JEFFAMINE®-Oberflächen

Das Reaktionsschema für die Herstellung der JEFFAMINE®-Oberflächen ist in Abbildung 49 dargestellt. Die folgenden Mengenangaben beziehen sich jeweils auf eine Chargengröße von 20 Objektträgern.

Reinigung

Im Vorfeld der Aktivierung wurden gravierte Glasobjektträger (Roth, Deutschland) in einer Färbeschale gereinigt. Für je 20 Objektträger pro Färbeschale wurden 200 mL einer 2 %igen (v/v) Hellmanex II-Lösung (Hellma, Deutschland) in Wasser (MilliQ) verwendet. Die Reinigung erfolgte zunächst für 1 Stunde im Ultraschallbad und anschließend über Nacht auf dem Schüttler bei RT. Nach der erneuten Behandlung mit Ultraschall für 1 Stunde am nächsten Tag, wurden die Objektträger mit insgesamt 1 L (5 × 200 mL) Wasser (MilliQ) gewaschen.

Ätzung der Glasoberfläche (Aktivierung)

Die gereinigten Objektträger wurden mit 200 mL einer Lösung (1:1, v/v) aus Methanol (absolut) und Salzsäure (rauchend, 37 %) für 1 Stunde bei RT geschüttelt. Anschließend erfolgte eine Reinigung mit insgesamt 1 L (5 × 200 mL) ultrareinem Wasser. Schließlich wurden die Objektträger mit 200 mL konz. Schwefelsäure für 1 Stunde bei RT auf dem

Schüttler geätzt. Nach dem Ätzen erfolgte erneut eine Reinigung mit insgesamt 1 L (5 × 200 mL) ultrareinem Wasser, woraufhin die Objektträger im Stickstoffstrom und anschließend im Trockenschrank bei 70 °C für 15 min vollständig getrocknet wurden.

Silanisierung mit (3-Glycidyoxypropyl)-trimethoxysilan (GOPTS)

Da dieser Schritt der Herstellung hauptverantwortlich für die Qualität der JEFFAMINE-Oberflächen war, musste besondere Sorgfalt auf eine wasserfreie Arbeitsweise gelegt werden. Hierfür wurde im Rahmen der Doktorarbeit ein Inkubator entwickelt (siehe Abbildung 48, Anhang i), dessen Atmosphäre in Vorbereitung auf die Silanisierung mit Trockenmittel (Kieselgel Orange) auf eine Luftfeuchtigkeit unter $\leq 20\%$ getrocknet wurde. Die geätzten und getrockneten Objektträger wurden im Sandwich mit je 600 μL GOPTS bei RT für 3 Stunden im Inkubator silanisiert. Im Anschluss wurden die Sandwiches in einer mit Ethanol (absolut) gefüllten Glaswanne getrennt, gründlich gewaschen und nacheinander mit je 200 mL Ethanol (absolut), Methanol (absolut) und nochmals Ethanol (absolut) für 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend wurden die silanisierten Objektträger im Stickstoffstrom und im Trockenschrank bei 70 °C für 15 min getrocknet.

Belegung mit JEFFAMINE® ED-2003

Die silanisierten Objektträger wurden mit 500 μL geschmolzenem JEFFAMINE ED-2003 (Huntsman, Holland) im Sandwich über Nacht bei 100 °C im Trockenschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Sandwiches in einer mit ultrareinem Wasser gefüllten Glaswanne getrennt, gründlich gewaschen und mit je 200 mL ultrareinem Wasser für 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Nach der Trocknung im Stickstoffstrom und Trockenschrank, konnten die JEFFAMINE-Oberflächen mehrere Wochen im Exsikkator gelagert werden.

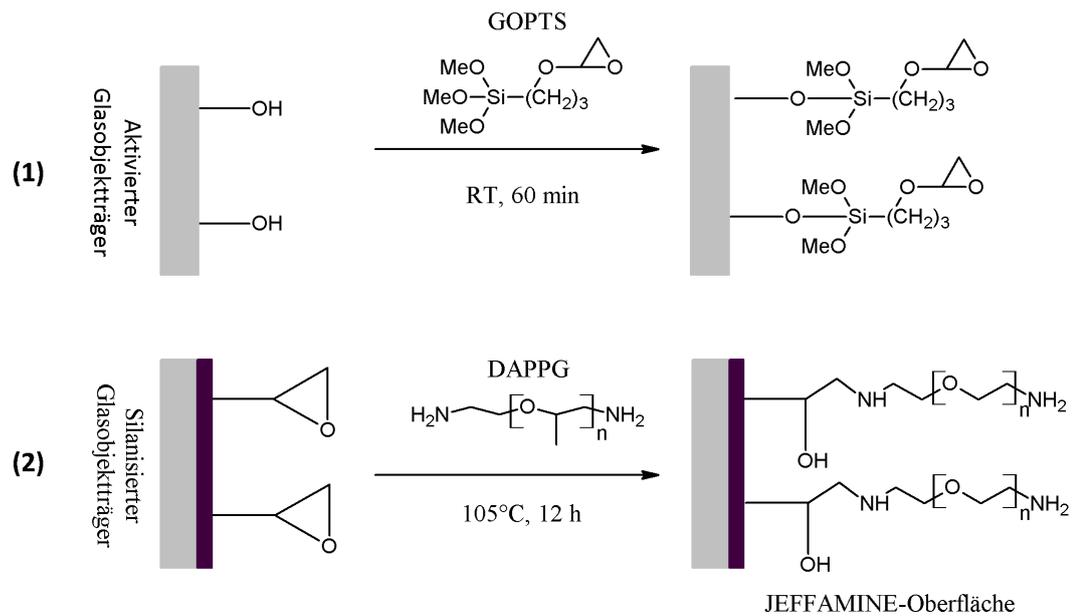


Abbildung 49: Reaktionsschema für die Herstellung von JEFFAMINE®-Oberflächen. GOPTS steht für (3-Glycidyloxypropyl)-trimethoxysilan und DAPPG steht für Poly (Propylenglykol)-Diamin.

Aktivierung der JEFFAMINE-Oberflächen mit N,N'-Disuccinimidylcarbonat (DSC)

Auch bei der Aktivierung mit DSC wurde ein Inkubator verwendet, um eine Beeinträchtigung der Qualität der Mikroarrays durch Luftfeuchtigkeit zu vermeiden. Die Atmosphäre des Inkubators wurde daher mit Trockenmittel (Kieselgel Orange) auf eine Luftfeuchtigkeit unter $\leq 20\%$ getrocknet. Die Aktivierung von 10 JEFFAMINE-Oberflächen mittels DSC erfolgte mit einer Lösung aus 160 mg DSC (0,62 mmol) und 8 mg 4-(Dimethylamino)-pyridin (DMAP, 0,065 mmol) in 3,2 mL Dimethylformamid (absolut) und 250 μL Triethylamin (absolut). Je zwei JEFFAMINE-Oberflächen wurden mit je 600 μL dieser Lösung im Sandwich für 4 Stunden bei RT im Inkubator aktiviert. Die Trennung und Reinigung der aktivierten JEFFAMINE-Oberflächen erfolgte mit Methanol (absolut) für 15 min im Ultraschallbad. Anschließend wurden sie im Stickstoffstrom und im Trockenschrank getrocknet und noch am gleichen Tag gespottet. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 50 dargestellt.

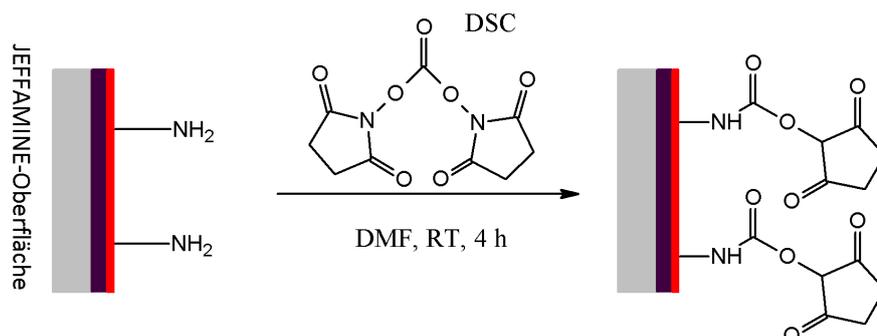


Abbildung 50: Reaktionsschema für die Aktivierung der JEFFAMINE-Oberflächen mit N,N'-Disuccinimidylcarbonate (DSC).

Aktivierung der JEFFAMINE-Oberflächen mit Poly(ethylenglykol)-Diglycidylether (Diepoxy-PEG)

Die Aktivierung erfolgte im Sandwich aus zwei JEFFAMINE-Oberflächen mit 600 μ L Diepoxy-PEG für 15 Stunden im Trockenschrank bei 98 °C. Am nächsten Tag wurden die Sandwiches getrennt und zweimal mit je 200 mL Methanol (absolut) für 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend wurden sie im Stickstoffstrom und im Trockenschrank getrocknet und noch am gleichen Tag gespottet. Das Reaktionsschema ist in Abbildung 51 dargestellt.

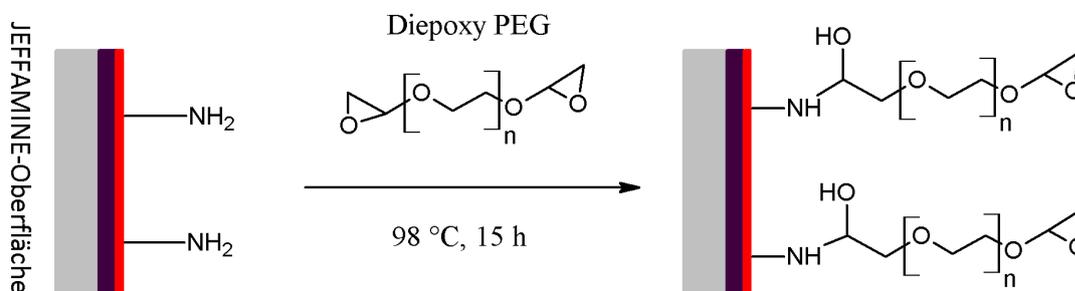


Abbildung 51: Reaktionsschema für die Aktivierung der JEFFAMINE-Oberflächen mit Poly(ethylenglykol)-Diglycidylether (Diepoxy-PEG).

6.4.1.2. Spotten von DNA-Oligomeren auf JEFFAMINE-Oberflächen

Die Immobilisierung von DNA-Oligomeren erfolgte sowohl auf mit DSC, als auch mit Diepoxy-PEG aktivierten JEFFAMINE-Oberflächen mit Hilfe eines Amino-C₁₂-Linkers am 5'-Ende der Nukleotidsequenz (siehe Abbildung 52).

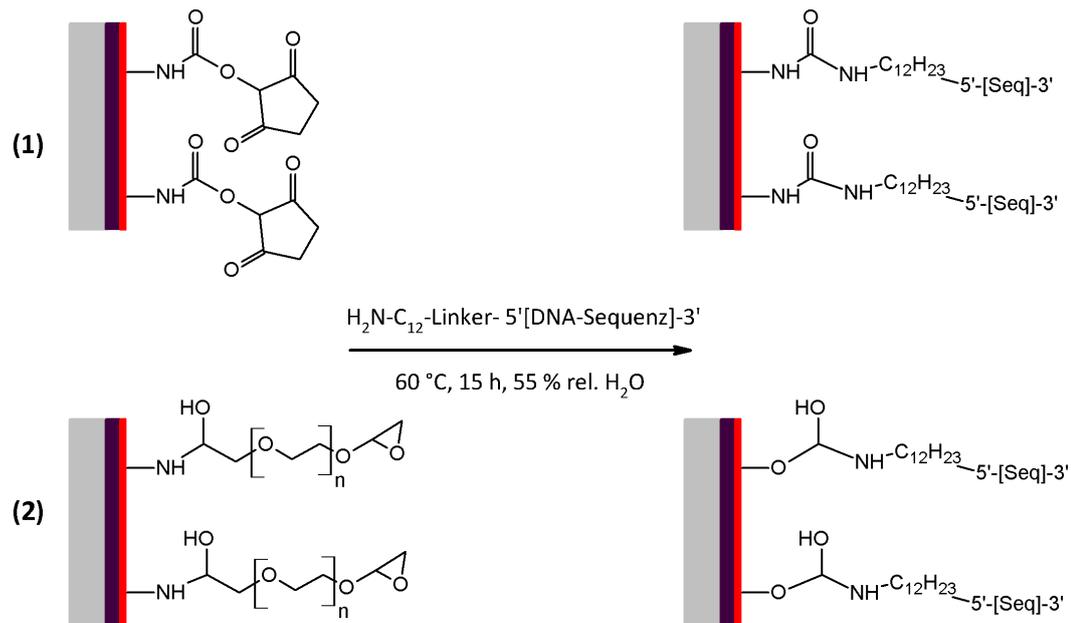


Abbildung 52: Reaktionsschema für die Immobilisierung von DNA-Oligomeren auf JEFFAMINE-Oberflächen mit (1) DSC-Aktivierung und (2) Diepoxy-PEG-Aktivierung.

Da die immobilisierten DNA-Oligomere als Primer in der On-Chip-RPA-Reaktion dienen, mussten sie in bekannter Menge gespottet werden. Daher wurde das bekannte Kontaktpottingverfahren mit Hilfe des Mikrodosierroboters BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer durch ein *Inkjet*-Spottingverfahren mit dem SciFLEXARRAYER S1 ersetzt. Hierbei werden mit Hilfe eines piezoelektrischen, schwingenden Quarzes Ultraschallwellen in einer Glaskapillare erzeugt, so dass durch eine starke Beschleunigung (ca. 100.000 g) einzelne Pikoliter-Tröpfchen aus der inkompressiblen Flüssigkeit herausgeschossen werden. Die Größe der Tröpfchen liegt im Bereich von 150 bis 500 pL. Einzelne oder mehrere Tröpfchen können in einem Spot abgelegt werden, so dass die DNA-Menge je Spot, sowie der Spotdurchmesser angepasst werden kann.

Zunächst wurde der Spotter gemäß der Betriebsanleitung des Herstellers in Betrieb genommen. Die verwendete Düse („Nozzle“) trug eine unbeschichtete Borosilikat-Kapillare (PDC 80 Piezo Dispense Capillary, Scinion, Deutschland) mit einer 50 μm bis 100 μm großen Öffnung. Das für verwendete Kapillare (ID-Nummer 15842) bestimmte Volumen pro erzeugtem Tropfen betrug 439 ± 26 pL ($m = 31$). Nach dem Einlegen der Nozzle wurde das System mit ultrareinem, sterilfiltriertem und im Ultraschallbad entgasten Wasser befüllt und gespült. Die Qualität der Tropfen wurde geprüft und anhand der folgenden Parameter eingestellt: *Voltage* [V], *Pulse* [μs], *Frequency* [Hz] und *LED Delay* [μs]. Die Parameter sind für

jede Nozzle individuell und vom Hersteller vorgegeben. Die Spottingbedingungen wurden auf 55 % relative Luftfeuchtigkeit und 20 °C eingestellt. Das Spottingprogramm wurde nach den Empfehlungen des Herstellers aufgebaut und ist in Anhang ii dargestellt. Pro Mikroarray wurden zwei Felder gespottet, deren Maße und Position in Abbildung 53 (A) dargestellt sind. Die Belegung der Felder ist in Abbildung 53 (B) dargestellt und orientiere sich an der späteren Flussrichtung im Mikroarray.

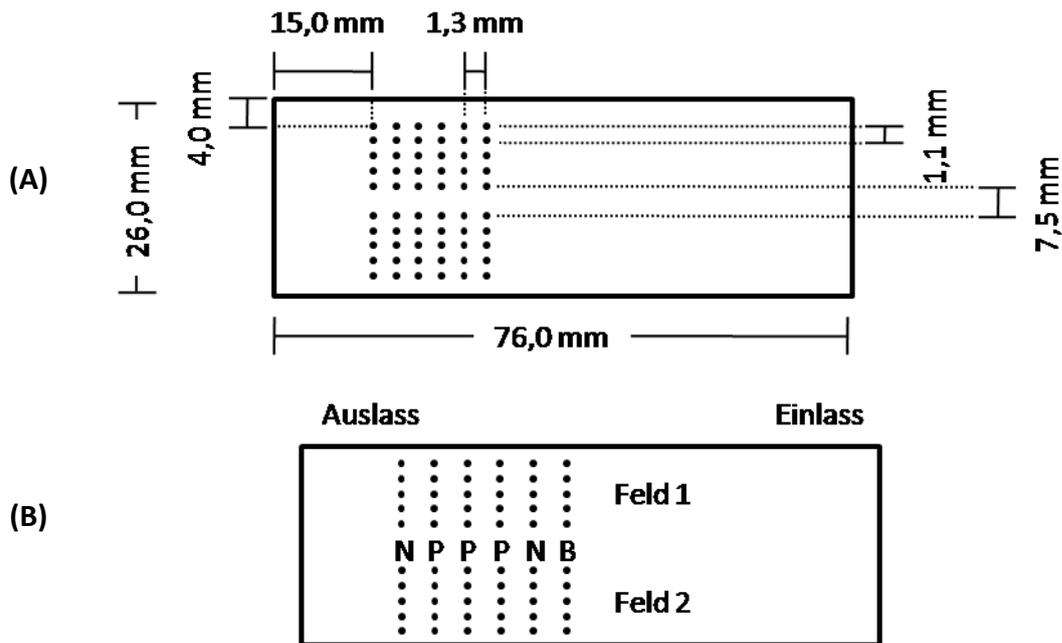


Abbildung 53: (A) Schematische Zeichnung mit den Maßen und der Position der gespotteten Felder auf dem Mikroarray.(B) Belegung der Felder auf dem Mikroarray. Die Belegung beider Felder war identisch. Jede Lösung wurde in eine Reihe mit 5 Replikaten gespottet. Die Anzahl der Probe-Reihen (P) unterschied sich je nach Experiment. N steht für Negativkontrolle (PCR-Wasser), P steht für Probe (*reverse-Primer*) und B steht für die Biotin-Positivkontrolle.

Die zu spottenden Lösungen (je 30 μ L) wurden in einer 384-Well-Mikrotiterplatte (sciSOURCEPLATE-384-PP) aus Polypropylen vorgelegt. Die Berechnung der Konzentration / Menge an DNA-Oligonukleotid (*reverse-Primer*) orientierte sich an der für die RPA-Reaktion empfohlenen Primerkonzentration (420 nM). Unter Berücksichtigung der praktischen Durchführbarkeit wurde die Konzentration der Spottinglösung auf 150 μ M *reverse-Primer* in PCR-Wasser eingestellt, woraus sich eine Menge von 84 Tropfen à 439 ± 26 pL pro Spot ergaben. Als Negativkontrolle wurde PCR-Wasser gespottet, während 0,005 mg/mL EZ-Link[®] Amino-PEG₂-Biotin in ultrareinem Wasser als Positivkontrolle diente. Beide Kontrollen wurden ebenfalls in einer Menge von 84 Tropfen pro Spot gespottet.

Nach dem Spotten der Lösungen auf die aktivierten JEFFAMINE-Oberflächen, wurden diese über Nacht bei 55 % rel. H₂O und 60 °C inkubiert. Die Nozzle wurde zweimal mit sterilfiltriertem „sciclean 8“ (0,5 %, v/v) gereinigt. Am nächsten Tag wurden die Oberflächen mit Tris/HCl (1 M, pH 8,5) für 15 min bei RT auf dem Schüttler geblockt und anschließend mit ultrareinem Wasser und Methanol (absolut) für 2 min bei RT auf dem Schüttler gewaschen. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom konnten die gespotteten Objektträger mehrere Wochen bei -20 °C gelagert werden.

6.4.1.3. Fertigung eines DNA-Mikroarray

Die Fertigung eines DNA-Mikroarray wurde von KLOTH ET AL. (2009) übernommen und ist in Abbildung 54 dargestellt [400]. Am Tag der On-Chip-RPA-Messung wurde der gespottete Objektträger mit Hilfe einer doppelseitigen Klebefolie auf einen PMMA-Kunststoff-Träger (IWC-TUM) befestigt und formte den DNA-Mikroarray. Die Klebefolie generierte dabei zwei Flusszellen mit einem Volumen von je 48 µL und der PMMA-Träger enthielt die fluidischen Anschlüsse für den MCR 3. Ein DNA-Mikroarray konnte daher für zwei On-Chip-RPA-Messungen verwendet werden. Die fertigen Mikroarrays wurden bis zur Messung im Kühlschrank bei 4 °C gelagert, um eine Degradierung der DNA zu verhindern.

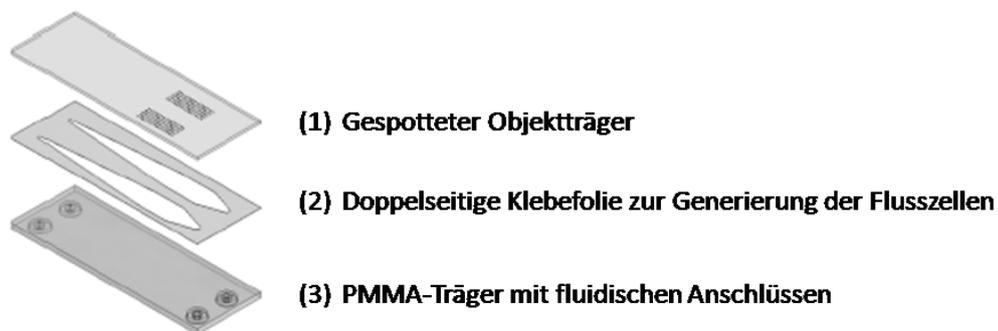


Abbildung 54: Schematische Zeichnung eines DNA-Mikroarray. Abbildung modifiziert nach KLOTH ET AL. (2009) [400].

6.4.2. On-Chip-RPA-Messung am MCR 3

Aus der Übertragung der RPA auf einen DNA-Mikroarray und der Automatisierung des Assays auf der Mikroarray-Analysenplattform MCR 3, ergab sich der nachfolgend dargestellte Ablauf einer On-Chip-RPA-Messung. Ein Fluidikplan des MCR 3 ist im Anhang dargestellt.

Mit Hilfe des Waschprogramms **Waschprogramm Anfang / -Ende** wurde zunächst das fluidische System des MCR 3 mit dem Laufpuffer / Spülpuffer (0,5 % Casein in PBS) befüllt. Anschließend erfolgte die Befüllung mit den Chemilumineszenzreagenzien Luminol und H_2O_2 . Die Spritze der Spritzeneinheit P0 wurde, sofern nicht anders beschrieben, mit einer Lösung aus Meerrettichperoxidase konjugiertem Streptavidin in Laufpuffer (4×10^{-4} mg/mL) befüllt. Hierfür wurde das **Ladeprogramm für Reagenzien** verwendet. Am Anfang jedes Messtages folgte nach der Vorbereitung des MCR 3s stets eine zweimalige On-Chip-RPA-Messung ohne Probe. Das verwendete Messprogramm unterschied sich dabei von einer normalen Messung lediglich in der auf 10 s verkürzten Inkubationszeit / Amplifikationszeit. Auf diese Weise wurden ein korrekter Programmablauf und eine vollständige Befüllung der Fluidik mit den Reagenzien gewährleistet.

Der Ablauf der On-Chip-RPA-Messung ist in Abbildung 55 dargestellt. Am Anfang einer jeden On-Chip-RPA-Messung wurde zunächst das Hintergrundsignal der Kamera aufgezeichnet. Hierfür wurde der unbenutzte, leere DNA-Mikroarray in die Flusszelleinheit eingelegt und ein Hintergrundbild aufgezeichnet (Programm: **Aufnahme des Hintergrundbildes** (*dark frame image*)). Nach der Aufnahme des Hintergrundbildes, wurde das **On-Chip-RPA-Messprogramm** gestartet. Während der Temperierung der Flusszelle auf die im Programm eingestellte Inkubationstemperatur / Amplifikationstemperatur wurde der RPA-Reaktionsmix, wie in Kapitel 6.2.6 beschrieben, hergestellt. Aus dem Gesamtvolumen von 54 μL pro Ansatz, wurden 52 μL des RPA-Reaktionsmixes mit Hilfe eines speziellen Adapters in die Flusszelle des DNA-Mikroarrays injiziert und der Mikroarray nach Aufforderung des Messprogrammes in die Flusszelle des MCR 3s eingelegt. Nach der Bestätigung der Eingabe, führte das Messprogramm den Assay automatisch durch.

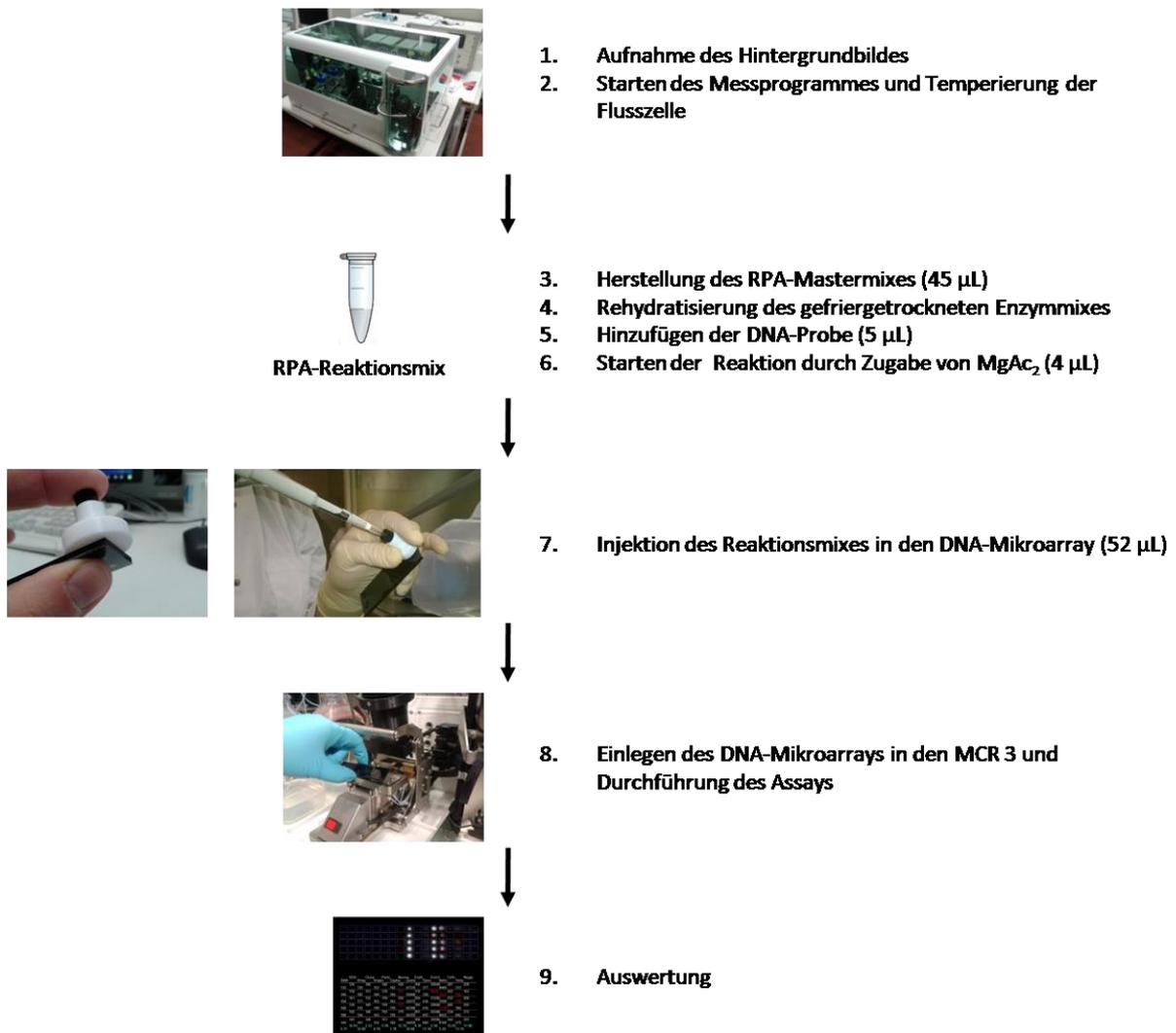


Abbildung 55: Ablauf einer On-Chip RPA-Messung.

6.4.3. Auswertung einer On-Chip-RPA-Messung

Die Auswertung der MCR 3-Experimente erfolgte analog zu WUTZ ET.AL. (2011) [401]. Jede On-Chip-RPA-Messung resultierte in einem 2 D-Chemilumineszenzbild (2×2 binning mode, 696×520 px), welche mit der MCR 3-Steuerungssoftware MCRVisualisation 1.0.6 (GWK Präzisionstechnik, München, Deutschland) ausgewertet wurde. Die Intensität des Chemilumineszenzsignals wurde als Graustufenintensität pro Pixel dargestellt und reichte von 0 bis 65536 a.u. (16-Bit CCD-Kamera). Das aufgenommene Messbild wurde bei der Aufnahme bereits automatisch um das Hintergrundbild (*dark frame image*) bereinigt. Mit Hilfe eines Rasters wurde die Intensität der Spots anhand der 10 hellsten Pixel pro Spot bestimmt. Das Ergebnis der fünf Replikate pro Zielanalyt wurde gemittelt. Wenn die

Abweichung eines Spots vom Mittelwert größer als 15 % war, wurde er als Ausreißer markiert.

Um eine bessere Vergleichbarkeit der On-Chip-RPA-Experimente zu ermöglichen, wurden die erhaltenen Chemilumineszenzsignale der immobilisierten *reverse*-Primer SCL_{Pathogen} auf das Maximalsignal (100 % Sättigung) der CCD-Kamera SCL_{max} normalisiert. SCL_{max} wurde für jeden Chip individuell berechnet durch Subtraktion der gemittelten Intensität des Hintergrundbildes $SCL_{\text{Darkframe}}$ von der maximal möglichen Graustufenintensität der CCD-Kamera (65536 a.u.):

$$\text{Gleichung (3)} \quad SCL_{\text{Pathogen}} [\%] = \frac{SCL_{\text{Pathogen}} [a. u.]}{\{SCL_{\text{max}} [a. u.] - SCL_{\text{Dark frame}} [a. u.]\}} \times 100 \%$$

6.5. Statistische Angaben und Auswertung

Die Parameter m und n sind wie folgt definiert:

Definition von m: Anzahl der durchgeführten, unabhängigen Messreihen.

Definition von n: Anzahl der Messpunkte eines Experimentes.

Die Berechnung der Nachweisgrenze (*limit of detection*, LOD) erfolgte gemäß der Vorgabe der IUPAC (*International Union of Pure and Applied Chemistry*) [402]. Zunächst wurde der Mittelwert aus mindestens 3 Negativkontrollen \bar{x}_B berechnet und mit der dreifachen Standardabweichung s_B addiert. Durch Einsetzen des so erhaltenen Wertes in die Regressionsgleichung, erfolgte die Berechnung des LODs.

7. Abkürzungsverzeichnis

AF - Aufkonzentrierungsfaktor

AFNOR - *Association française de normalisation* (Französische Standardisierungsbehörde)

ATP - Adenosin-Triphosphat

BGM-Zelllinie - *Buffalo green monkey*-Zelllinie

bp - Base pairs

cDNA - *complementary DNA*

CeUF - Zentrifugale Ultrafiltration

CL - Chemilumineszenz

CPE - Cythopathischer Effekt

CUF - *Crossflow-Ultrafiltration*

DEUF - *Dead-end-Ultrafiltration*

DIG - Digoxigenin

DNA - Desoxyribonukleinsäure

DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen

ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*

EMA - Ethidiummonoazid

FISH - *Fluorescence in situ hybridization*

FW-Primer - *Forward-Primer*

GU - Genomische Einheit

HDA - *Helicase-dependent amplification*

ICAN - *Isothermal and chimeric primer-initiated amplification of nucleic acids*

ICC-PCR - *Integrated cell culture PCR*

IEP - Isoelektrischer Punkt

IUPAC - *International Union of Pure and Applied Chemistry*

KBE - Koloniebildende Einheit

LAMP - *Loop-mediated isothermal amplification*

LOD - *Limit of detection* (Nachweisgrenze)

MAF - Monolithische Adsorptionsfiltration
MCF - Magnetisch gekoppelte Filtration
MCR 3 - Munich Chip Reader 3
MDA - *Multiple displacement amplification*
MF - Membranfiltration
MME-PCR - *multiplex microarray-enhanced PCR*
MPN - *Most probable number*
MTF - *Multiple-tube fermentation*
MUG - 4-Methylumbelliferyl- β -D-Glucuronid
NAAT - Nukleinsäure-Amplifikations-Test
NASBA - Nukleinsäure-Sequenz-basierte Amplifikation
NF - Nanofiltration
NMWL - Nominales molekulares Massen-Limit
NPG - o-Nitrophenol- β -D-galaktopyranosid
NTC - *No target control* (Nullprobe)
OD - Optische Dichte
PBS - *Phosphat buffered-solution*
PCR - *Polymerase chain reaction*
PFU - *plaque forming unit*
PMA - Propidiummonoazid
qPCR - *quantitative polymerase chain reaction*
RCA - *Rolling circle amplification*
RNA - Ribonukleinsäure
RO - Umkehrosmose
RPA - *Recombinase polymerase amplification*
(RT)-PCR - *Reverse transcriptase polymerase chain reaction*
RW-Primer - Reverse-Primer
Pos - Positivkontrolle
SCL - Chemilumineszenz-Signal
SDA - *Strand displacement amplification*
SMART - *Signal-mediated amplification of RNA technology*
SSB - *single strand binding proteins*

TCID - *tissue culture infectivity dose*

TMP - Transmembrandruck

TOC - *Total organic carbon*

TrinkwV - Trinkwasserverordnung

U.S EPA – *United States Environmental Protection Agency*

UF - Ultrafiltration

VIRADEL - *virus adsorption and elution*

VNBC-Status - *viable but not culturable*

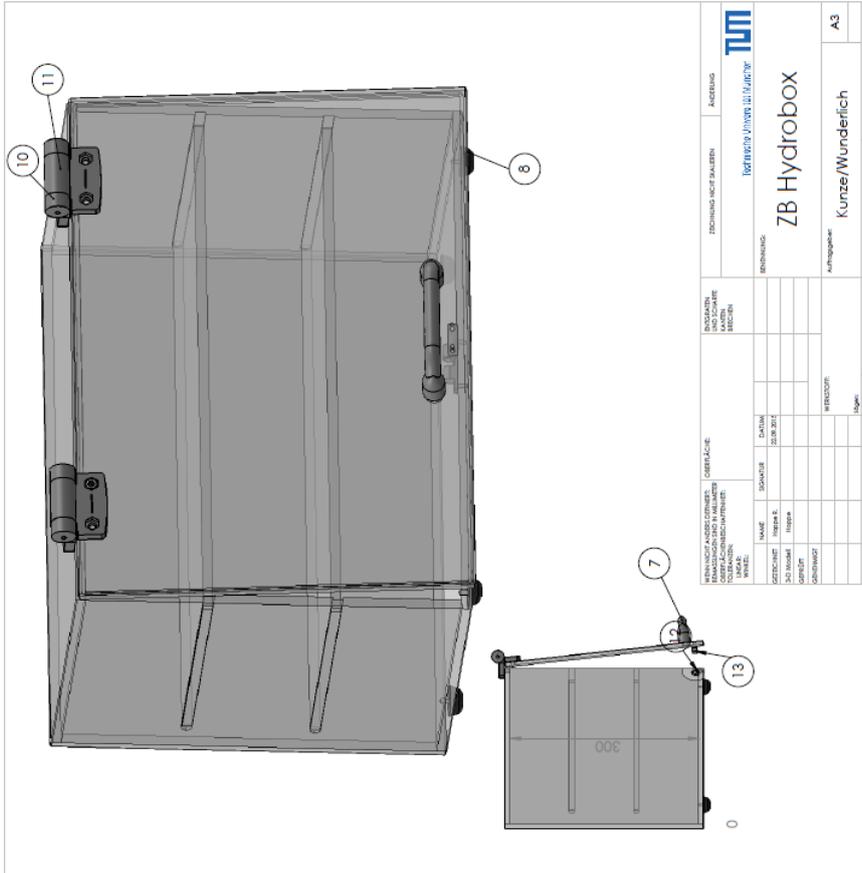
WHO - *World Health Organisation*

8. Anhang

i. Technische Zeichnungen

Hydrobox (Technische Zeichnung von R. Hoppe)

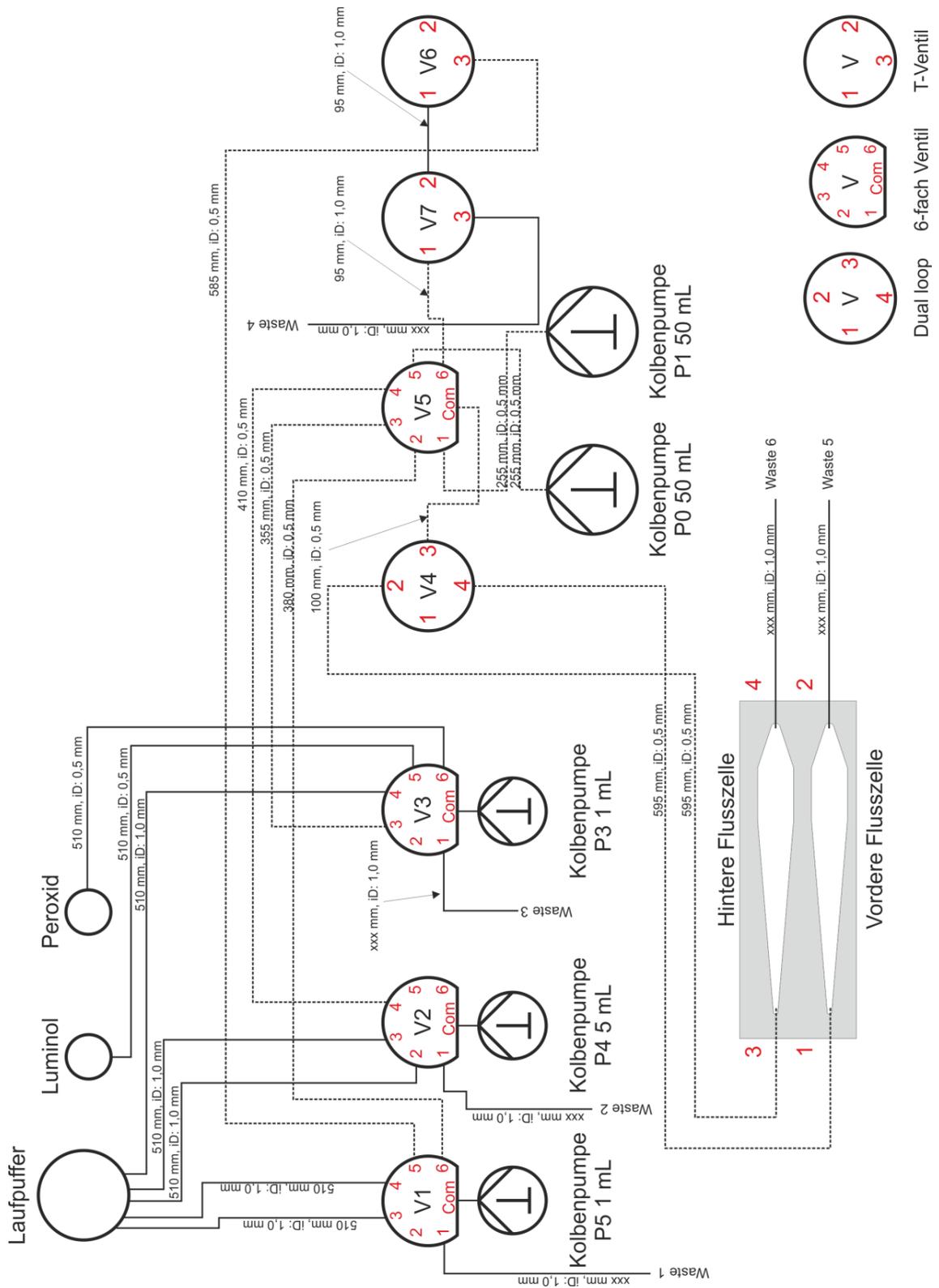
POS-NR.	BENENNUNG	MENGE
1	Boden Hydrobox	1
2	Seitenteil Hydrobox	2
3	Deckel Hydrobox	1
4	Rückseite Hydrobox	1
5	Erschubboden Hydrobox	2
6	Vordereite Hydrobox	1
7	06895-100061	1
8	Gummifuß D25	4
9	ISO 7380 - M6 x 12 --- 12N	1
10	27858-56232300-900 Teil 2	2
11	27858-56232300-900 Teil 1	2
12	03075 „gehäuse_39_8	1
13	039 803075 s. Kolben	1
14	DIN 6912 - M6 x 12 --- 6.5N	1



WENN NICHT ANDERSONTENS ODER EINGETRAGEN IN DIESE SPALTEN:		DATEI-NR.		PROJEKT-NR.		ZEICHNUNG-NR.	
NAME	STATUS	PROJEKT-NR.	PROJEKT-NR.	PROJEKT-NR.	PROJEKT-NR.	PROJEKT-NR.	PROJEKT-NR.
242 Model	Hydrobox						
03075	gehäuse_39_8						
039	803075 s. Kolben						

BESCHREIBUNG		PROJEKT-NR.		PROJEKT-NR.		PROJEKT-NR.	
NAME	STATUS	PROJEKT-NR.	PROJEKT-NR.	PROJEKT-NR.	PROJEKT-NR.	PROJEKT-NR.	PROJEKT-NR.
ZB Hydrobox							
Kunze/Wunderlich							

MCR 3 - Fluidikplan



ii. Programm für das Spotten von DNA-Oligonukleotiden mit dem sciFLEXARRAYER S1

Programmeinheit	Programmposition	Programmbefehl
Waschschritt 1 vor dem Spotten	1	dip into wash station 1
	2	move to waste station 1
	3	wash flush medium
Waschschritt 2 vor dem Spotten	4	dip into wash station 1
	5	move to waste station 1
	6	wash flush medium
Waschschritt 3 vor dem Spotten	7	dip into wash station 1
	8	move to waste station 1
	9	wash flush medium
Trocknen der Nozzleoberfläche	10	wait 10 s
Anfang der Spottingschleife	11	Begin loop
Aufnahme der Probe	12	Take Probe 5µl
Anpassung nach DNA-Menge und Probenzahl	13	Dip into wash station 1
	14	Dip into wash station 2
	15	Dip into wash station 3
Trocknen der Nozzleoberfläche	16	wait 10 s
	17	Prespot 250 spots
-optionale- Überprüfung der Qualität der Spots	18	Auto drop detection drop volume
Spotten	19	Spot Probe Run
Waschschritt 1 nach dem Spotten	20	move to waste station 1
	21	wash flush medium
	22	dip into wash station 1-2s
Waschschritt 2 nach dem Spotten	23	move to waste station 1
	24	wash flush medium
	25	dip into wash station 1-2s
Trocknen der Nozzleoberfläche	26	wait 10 s
Ende der Spottingschleife	27	End loop
Fährt auf Ausgangsposition	28	Move home

9. Literaturverzeichnis

1. Lee, S.H., Levy, D.A., Craun, G.F., Beach, M.J., and Calderon, R.L., *Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1999-2000*. Morbidity and Mortality Weekly Report. Surveillance summaries (Washington, D.C. : 2002), 2002. 51(8): p. 1-47.
2. Hamza, I.A., Jurzik, L., Uberla, K., and Wilhelm, M., *Methods to detect infectious human enteric viruses in environmental water samples*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2011. 214(6): p. 424-436.
3. Craun, G.F., Brunkard, J.M., Yoder, J.S., Roberts, V.A., Carpenter, J., Wade, T., Calderon, R.L., Roberts, J.M., Beach, M.J., and Roy, S.L., *Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006*. Clinical Microbiology Reviews, 2010. 23(3): p. 507-528.
4. Beer, K.D., Gargano, J.W., Roberts, V.A., Hill, V.R., Garrison, L.E., Kutty, P.K., Hilborn, E.D., Wade, T.J., Fullerton, K.E., and Yoder, J.S., *Surveillance for waterborne disease outbreaks associated with drinking water—United States, 2011–2012*. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), 2015. 64: p. 842-848.
5. UNICEF and WHO, W.H.O., *Progress in Drinking Water and Sanitation - Update 2012*, 2012,
6. UN, *The Millennium Development Goals Report*. United Nations, 2010,
7. Bosch, A., *Human enteric viruses in the water environment: a minireview*. International Microbiology : The Official Journal of the Spanish Society for Microbiology, 1998. 1(3): p. 191-196.
8. Rao, V.C., Metcalf, T.G., and Melnick, J.L., *Development of a method for concentration of rotavirus and its application to recovery of rotaviruses from estuarine waters*. Applied and Environmental Microbiology, 1986. 52(3): p. 484-488.
9. Schmidt, P.J., Pintar, K.D., Fazil, A.M., Flemming, C.A., Lanthier, M., Laprade, N., Sunohara, M.D., Simhon, A., Thomas, J.L., Topp, E., Wilkes, G., and Lapen, D.R., *Using Campylobacter spp. and Escherichia coli data and Bayesian microbial risk assessment to examine public health risks in agricultural watersheds under tile drainage management*. Water Research, 2013. 47(10): p. 3255-3272.
10. Amvrosieva, T., Titov, L., Mulders, M., Hovi, T., Dyakonova, O., Votyakov, V., Kvacheva, Z., Eremin, V., Sharko, R., and Orlova, S., *Viral water contamination as the cause of aseptic meningitis outbreak in Belarus*. Central European Journal of Public Health, 2001. 9(3): p. 154-157.
11. Gallay, A., De Valk, H., Cournot, M., Ladeuil, B., Hemery, C., Castor, C., Bon, F., Megraud, F., Le Cann, P., and Desenclos, J., *A large multi-pathogen waterborne community outbreak linked to faecal contamination of a groundwater system, France, 2000*. Clinical Microbiology and Infection, 2006. 12(6): p. 561-570.
12. Sinclair, R., Jones, E., and Gerba, C., *Viruses in recreational water-borne disease outbreaks: A review*. Journal of Applied Microbiology, 2009. 107(6): p. 1769-1780.
13. Samendra, P., Masaaki, K., Charles, P., and Ian, L., *Rapid detection technologies for monitoring microorganisms in water*. Biosensors Journal, 2014. 2014.
14. Bates, B., Kundzewicz, Z.W., Wu, S., and Palutikof, J., *Climate change and water: Technical paper vi*. 2008, Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC).

15. Delpla, I., Jung, A.-V., Baures, E., Clement, M., and Thomas, O., *Impacts of climate change on surface water quality in relation to drinking water production*. Environment International, 2009. 35(8): p. 1225-1233.
16. Hillenbrand, T., Niederste-Hollenberg, J., Menger-Krug, E., Klug, S., Holländer, R., Lautenschläger, S., and Geyley, S., *Demografischer Wandel als Herausforderung für die Sicherung und Entwicklung einer kosten- und ressourceneffizienten Abwasserinfrastruktur*. 2010, Umweltbundesamt.
17. Bernt, M. and Naumann, M., *Wenn der Hahn zu bleibt: Wasserversorgung in schrumpfenden Städten*, in *Hydropolis. Wasser und die Stadt der Moderne*. 2006, Frank, S. & Gandy, M.: Frankfurt/Main. p. 210-228.
18. Gertler, M., Dürr, M., Renner, P., Poppert, S., Askar, M., Breidenbach, J., Frank, C., Preußel, K., Schielke, A., and Werber, D., *Outbreak of cryptosporidium hominis following river flooding in the city of Halle (Saale), Germany, August 2013*. BMC Infectious Diseases, 2015. 15(1).
19. Cann, K., Thomas, D., Salmon, R., Wyn-Jones, A., and Kay, D., *Extreme water-related weather events and waterborne disease*. Epidemiological Infections, 2012. 9: p. 1-16.
20. Nichols, G., Lane, C., Asgari, N., Verlander, N.Q., and Charlett, A., *Rainfall and outbreaks of drinking water related disease and in England and Wales*. Journal of Water and Health, 2009. 7(1): p. 1-8.
21. Lindgren, E., Ebi, K.L., and Johannesson, M., *Climate Change and Communicable Diseases in the EU Member States: Handbook for National Vulnerability, Impact, and Adaptation Assessments*. 2010, European Centre for Disease Prevention and Control.
22. Kistemann, T., Rechenburg, A., Höser, C., Schreiber, C., Frechen, T., and Herbst, S., *Assessing the potential impacts of climate change on food-and waterborne diseases in Europe*. European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), 2012,
23. Petry, D., *Klimawandel und Trinkwasserversorgung: Auswirkungen*. Handlungsbedarf, Anpassungsmöglichkeiten. energie | wasser-praxis, 2009. 10: p. 48-54.
24. Rodó, X., Pascual, M., Doblas-Reyes, F.J., Gershunov, A., Stone, D.A., Giorgi, F., Hudson, P.J., Kinter, J., Rodríguez-Arias, M.-À., and Stenseth, N.C., *Climate change and infectious diseases: Can we meet the needs for better prediction?* Climatic Change, 2013. 118(3-4): p. 625-640.
25. WHO, W.H.O., *Guidelines for Drinking-water Quality*. 2011.
26. Umweltbundesamt, *Trinkwasseraufbereitung und Trinkwasserqualität Forschungsprojekte von 2003 bis 2013*. Umweltbundesamt, 2014,
27. WHO, W.H.O., *Guidelines for Drinking-water Quality*. 2008.
28. Organization, W.H., *Assessing Microbial Safety of Drinking Water: Improving Approaches and Methods*. 2003, OECD Publishing.
29. Figueras, M. and Borrego, J.J., *New perspectives in monitoring drinking water microbial quality*. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2010. 7(12): p. 4179-4202.
30. Peskoller, C., *Entwicklung eines schnellen und selektiven Anreicherungs-systems für Bakterien in Trinkwasser mittels Querstromfiltration und Affinitätschromatographie*, in *Fakultät für Chemie, Lehrstuhl für Analytische Chemie*. 2010, TU München: München.
31. Rieger, M., *Entwicklung von Anreicherungs- und Detektionsmethoden umweltrelevanter Analyten (Viren in Trinkwasser; adsorbiertes Benzo[a]pyren)*, in *Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, Lehrstuhl für Analytische Chemie*. 2011, Technische Universität München.

32. Pei, L., *Monolithic adsorption filtration (MAF)-Based Methods for Concentrating Viruses from Water*, in *Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, Fakultät für Chemie*. 2015, Technische Universität München: München.
33. Donhauser, S.C., *Entwicklung und Validierung eines automatisierten DNA-Mikroarrays zur Detektion von humanpathogenen Bakterien in Trinkwasser*, in *Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie, Fakultät für Chemie*. 2015, Technische Universität München: München.
34. Lengger, S., Otto, J., Elsässer, D., Schneider, O., Tiehm, A., Fleischer, J., Niessner, R., and Seidel, M., *Oligonucleotide microarray chip for the quantification of MS2, ΦX174, and adenoviruses on the multiplex analysis platform MCR 3*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2014. 406(14): p. 3323-3334.
35. Gesundheit, B.f., *TrinkwV 2001 - Verordnung über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch*. 2012.
36. Köster, W.E., T.; Ashbolt N.; Botzenhart K.; Burlion N.; Endo, T.; Gromont P.; Guillot, E.; Mabilat, C.; Newport, L.; Niemi, M.; Payment, P.; Prescott, A.; Renaud, P.; Rust, A., *Microbial safety of drinking water: Improving approaches and methods*. 2003, WHO OECD.
37. Rompré, A., Servais, P., Baudart, J., de-Roubin, M.-R., and Laurent, P., *Detection and enumeration of coliforms in drinking water: current methods and emerging approaches*. *Journal of Microbiological Methods*, 2002. 49(1): p. 31-54.
38. APHA, A.P.H.A., *Standard methods for the examination of water and wastewater*. 1985: Washington, DC. p. 1,268.
39. Turco, R.F., *Coliform bacteria*. *Methods of Soil Analysis: Part 2—Microbiological and Biochemical Properties*, 1994(2): p. 145-158.
40. AFNOR, *Eaux-méthodes d'essais*, in *Recueil des Normes Françaises*. 1990, AFNOR (Association Francaise de Normalisation): Paris.
41. McKinney, R.E., *Environmental pollution control microbiology: a fifty-year perspective*. 2004, CRC Press, New York, Basel.
42. Purves, W.K., Sadava, D., Orians, G.H., and Heller, H.C., *Biologie*. 7th ed. 2006, Spektrum Akademischer Verlag, München.
43. Kaper, J.B., Nataro, J.P., and Mobley, H.L., *Pathogenic escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2004. 2(2): p. 123-140.
44. EPA, U., *Drinking Water Contaminant Candidate List 3—Draft*. US Environmental Protection Agency (EPA), 2008,
45. Singleton, P. and Sainsbury, D., *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology*. 3rd ed. 2007, John Wiley & Sons Ltd., Chichester.
46. Schmidt, H. and Hensel, M., *Pathogenicity Islands in Bacterial Pathogenesis*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2004. 17(1): p. 14-56.
47. de la Cruz, F. and Davies, J., *Horizontal gene transfer and the origin of species: lessons from bacteria*. *Trends in Microbiology*, 2000. 8(3): p. 128-133.
48. Jacobi, C.A. and Malfertheiner, P., *Escherichia coli Nissle 1917 (Mutaflor): new insights into an old probiotic bacterium*. *Digestive Diseases*, 2011. 29(6): p. 600-607.
49. Nataro, J.P. and Kaper, J.B., *Diarrheagenic escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, 1998. 11(1): p. 142-201.
50. Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, G., and Karch, H., *Characterisation of the Escherichia coli strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study*. *The Lancet Infectious Diseases*, 2011. 11(9): p. 671-676.

51. Buchholz, U., Bernard, H., Werber, D., Böhmer, M.M., Remschmidt, C., Wilking, H., Deleré, Y., an der Heiden, M., Adlhoch, C., and Dreesman, J., *German outbreak of Escherichia coli O104: H4 associated with sprouts*. New England Journal of Medicine, 2011. 365(19): p. 1763-1770.
52. Hardie, J. and Whiley, R., *Classification and overview of the genera Streptococcus and Enterococcus*. Journal of Applied Microbiology, 1997. 83(S1).
53. Botzenhart, K., Brandis, H., Brecht, W., Eggers, H.J., Gärtner, H., Gillissen, G., Habs, H., Knapp, W., Krech, U., Leidel, J., Linzenmeier, G., Maier, W., Müller-Ruchholtz, W., Otte, H.J., Piekarski, G., Pulverer, G., Ritzerfeld, W., Roemer, G.B., Schaal, K.P., Schallehn, G., Seeliger, H.P.R., Thofern, E., Winterhoff, D., and Wundt, W., *Lehrbuch der Medizinischen Mikrobiologie*. 1978, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York.
54. Domann, E., Hain, T., Ghai, R., Billion, A., Kuenne, C., Zimmermann, K., and Chakraborty, T., *Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic Enterococcus faecalis strain Symbioflor 1*. International Journal of Medical Microbiology, 2007. 297(7): p. 533-539.
55. Hahn, H. and Kaufmann, S.H., *Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2009, Springer-Verlag, Heidelberg.
56. Bonten, M.J., Willems, R., and Weinstein, R.A., *Vancomycin-resistant enterococci: why are they here, and where do they come from?* The Lancet Infectious Diseases, 2001. 1(5): p. 314-325.
57. Witte, W., *Medical consequences of antibiotic use in agriculture*. Science, 1998. 279(5353): p. 996-667.
58. Witte, W. and Klare, I., *Glycopeptide-resistant Enterococcus faecium outside hospitals: a commentary*. Microbial Drug Resistance, 1995. 1(3): p. 259-263.
59. Michel, A., Peter, R., and Patrice, C., *Glycopeptide resistance in enterococci*. Trends in Microbiology, 1996. 4(10): p. 401-407.
60. Mena, K.D. and Gerba, C.P., *Risk assessment of Pseudomonas aeruginosa in water*. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 2009. 201: p. 71-115.
61. Falagas, M. and Kopterides, P., *Risk factors for the isolation of multi-drug-resistant Acinetobacter baumannii and Pseudomonas aeruginosa: a systematic review of the literature*. Journal of Hospital Infection, 2006. 64(1): p. 7-15.
62. Favero, M., Carson, L., Bond, W., and Petersen, N., *Pseudomonas aeruginosa: growth in distilled water from hospitals*. Science, 1971. 173(3999): p. 836-838.
63. Ferroni, A., Nguyen, L., Pron, B., Quesne, G., Brusset, M., and Berche, P., *Outbreak of nosocomial urinary tract infections due to Pseudomonas aeruginosa in a paediatric surgical unit associated with tap-water contamination*. Journal of Hospital Infection, 1998. 39(4): p. 301-307.
64. Bert, F., Maubec, E., Bruneau, B., Berry, P., and Lambert-Zechovsky, N., *Multi-resistant Pseudomonas aeruginosa outbreak associated with contaminated tap water in a neurosurgery intensive care unit*. Journal of Hospital Infection, 1998. 39(1): p. 53-62.
65. Hardalo, C. and Edberg, S.C., *Pseudomonas aeruginosa: assessment of risk from drinking water*. Critical Reviews in Microbiology, 1997. 23(1): p. 47-75.
66. Stöcker, P., Brodhun, B., and Buchholz, U., *Legionärskrankheit in Deutschland unter besonderer Berücksichtigung der im Krankenhaus oder in einer Pflegeeinrichtung erworbenen Erkrankungen, 2004–2006*. Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz, 2009. 52(2): p. 219-227.

67. Krøjgaard, L.H., Kroghfelt, K.A., Albrechtsen, H.-J., and Uldum, S.A., *Detection of Legionella by quantitative-polymerase chain reaction (qPCR) for monitoring and risk assessment*. BMC Microbiology, 2011. 11(254): p. 1-7.
68. Bartram, J., *Legionella and the prevention of legionellosis*. 2007, World Health Organization.
69. Marston, B.J., Lipman, H.B., and Breiman, R.F., *Surveillance for Legionnaires' disease: risk factors for morbidity and mortality*. Archives of Internal Medicine, 1994. 154(21): p. 2417-2422.
70. Che, D., Decludt, B., Campese, C., and Desenclos, J., *Sporadic cases of community acquired legionnaires' disease: an ecological study to identify new sources of contamination*. Journal of Epidemiology and Community Health, 2003. 57(6): p. 466-469.
71. Vivier, J.C., Ehlers, M.M., and Grabow, W.O.K., *Detection of enteroviruses in treated drinking water*. Water Research, 2004. 38(11): p. 2699-2705.
72. Modrow, S., Falke, D., and Truyen, U., *Molekulare Virologie*. 2nd ed. 2003, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Berlin.
73. Melnick, J.L., Gerba, C.P., and Berg, G., *The ecology of enteroviruses in natural waters*. Critical Reviews in Environmental Science and Technology, 1980. 10(1): p. 65-93.
74. Biziagos, E., Passagot, J., Crance, J.-M., and Deloince, R., *Long-term survival of hepatitis A virus and poliovirus type 1 in mineral water*. Applied and Environmental Microbiology, 1988. 54(11): p. 2705-2710.
75. Raphael, R.A., Sattar, S.A., and Springthorpe, V.S., *Long-term survival of human rotavirus in raw and treated river water*. Canadian Journal of Microbiology, 1985. 31(2): p. 124-128.
76. Haas, C.N., Rose, J.B., Gerba, C., and Regli, S., *Risk assessment of virus in drinking water*. Risk Analysis, 1993. 13(5): p. 545-552.
77. Ward, R.L., Bernstein, D.I., Young, E.C., Sherwood, J.R., Knowlton, D.R., and Schiff, G.M., *Human rotavirus studies in volunteers: determination of infectious dose and serological response to infection*. Journal of Infectious Diseases, 1986. 154(5): p. 871-880.
78. Schiff, G.M., Stefanovic, G.M., Young, B., and Pennekamp, J.K., *Minimum human infectious dose of enteric virus (Echovirus-12) in drinking water*. Monographs in Virology, 1984. 15: p. 222-228.
79. Jiang, S.C., *Human Adenoviruses in Water: Occurrence and Health Implications: A Critical Review†*. Environmental Science & Technology, 2006. 40(23): p. 7132-7140.
80. Grabow, W.O.K., *Bacteriophages: update on application as models for viruses in water*. Water Sanitary, 2001. 27(2): p. 251-268.
81. Maunula, L., Miettinen, I.T., and Von Bonsdorff, C.-H., *Norovirus outbreaks from drinking water*. Emerging Infectious Diseases, 2005. 11(11): p. 1716-1721.
82. Kukkula, M., Arstila, P., Klossner, M.-L., Maunula, L., Bonsdorff, C.-H.V., and Jaatinen, P., *Waterborne outbreak of viral gastroenteritis*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 1997. 29(4): p. 415-418.
83. Nygard, K., Torvén, M., Ancker, C., Knauth, S.B., Hedlund, K.-O., Giesecke, J., Andersson, Y., and Svensson, L., *Emerging genotype (GGIIb) of norovirus in drinking water, Sweden*. Emerging Infectious Diseases, 2003. 9(12): p. 1548-1552.
84. Lopman, B.A., Adak, G.K., Reacher, M.H., and Brown, D., *Two epidemiologic patterns of norovirus outbreaks: surveillance in England and Wales, 1992-2000*. Emerging Infectious Diseases, 2003. 9(1): p. 71-77.

85. Lopman, B., Vennema, H., Kohli, E., Pothier, P., Sanchez, A., Negredo, A., Buesa, J., Schreier, E., Gray, J., and Gallimore, C., *Increase in viral gastroenteritis outbreaks in Europe and epidemic spread of new norovirus variant*. *The Lancet*, 2004. 363(9410): p. 682-688.
86. Bank-Wolf, B.R., König, M., and Thiel, H.-J., *Zoonotic aspects of infections with noroviruses and sapoviruses*. *Veterinary Microbiology*, 2010. 140(3): p. 204-212.
87. Wang, Q.-H., Han, M.G., Cheetham, S., Souza, M., Funk, J.A., and Saif, L.J., *Porcine noroviruses related to human noroviruses*. *Emerging Infectious Diseases*, 2005. 11(12): p. 1874-1881.
88. Mattison, K., Shukla, A., Cook, A., Pollari, F., Friendship, R., Kelton, D., Bidawid, S., and Farber, J.M., *Human noroviruses in swine and cattle*. *Emerging Infectious Diseases*, 2007. 13(8): p. 1184-1188.
89. Shaffer, P., Metcalf, T.G., and Sproul, O.J., *Chlorine resistance of poliovirus isolants recovered from drinking water*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1980. 40(6): p. 1115-1121.
90. Payment, P., Siemiatycki, J., Richardson, L., Renaud, G., Franco, E., and Prevost, M., *A prospective epidemiological study of gastrointestinal health effects due to the consumption of drinking water*. *International Journal of Environmental Health Research*, 1997. 7(1): p. 5-31.
91. de Jong, J.C., Wigand, R., Kidd, A.H., Wadell, G., Kapsenberg, J.G., Muzerie, C.J., Wermenbol, A.G., and Firtzlaff, R.G., *Candidate adenoviruses 40 and 41: fastidious adenoviruses from human infant stool*. *Journal of Medical Virology*, 1983. 11(3): p. 215-231.
92. Wigand, R., Baumeister, H., Maass, G., Kühn, J., and Hammer, H., *Isolation and identification of enteric adenoviruses*. *Journal of Medical Virology*, 1983. 11(3): p. 233-240.
93. Pina, S., Puig, M., Lucena, F., Jofre, J., and Girones, R., *Viral pollution in the environment and in shellfish: human adenovirus detection by PCR as an index of human viruses*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1998. 64(9): p. 3376-3382.
94. Jiang, S., Dezfulian, H., and Chu, W., *Real-time quantitative PCR for enteric adenovirus serotype 40 in environmental waters*. *Canadian Journal of Microbiology*, 2005. 51(5): p. 393-398.
95. Enriquez, C.E. and Gerba, C.P., *Concentration of enteric adenovirus 40 from tap, sea and waste water*. *Water Research*, 1995. 29(11): p. 2554-2560.
96. Verheyen, J., Timmen-Wego, M., Laudien, R., Boussaad, I., Sen, S., Koc, A., Uesbeck, A., Mazou, F., and Pfister, H., *Detection of adenoviruses and rotaviruses in drinking water sources used in rural areas of Benin, West Africa*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2009. 75(9): p. 2798-2801.
97. Gerba, C.P., Gramos, D.M., and Nwachuku, N., *Comparative inactivation of enteroviruses and adenovirus 2 by UV light*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2002. 68(10): p. 5167-5169.
98. Silva, H.D., García-Zapata, M.T., and Anunciação, C.E., *Why the use of adenoviruses as water quality virologic marker?* *Food and Environmental Virology*, 2011. 3(3-4): p. 138-140.
99. Leclerc, H., Edberg, S., Pierzo, V., and Delattre, J.M., *Bacteriophages as indicators of enteric viruses and public health risk in groundwaters*. *Journal of Applied Microbiology*, 2000. 88(1): p. 5-21.

100. Leclerc, H., Mossel, D., Edberg, S., and Struijk, C., *Advances in the bacteriology of the coliform group: their suitability as markers of microbial water safety*. Annual Reviews in Microbiology, 2001. 55(1): p. 201-234.
101. Grabow, W.O.K., *Indicator systems for assessment of the virological safety of treated drinking water*. Water Science and Technology, 1986. 18(10): p. 159-165.
102. Kott, Y., *Viruses and bacteriophages*. Science of the Total Environment, 1981. 18: p. 13-23.
103. Dawson, D.J., Paish, A., Staffell, L.M., Seymour, I.J., and Appleton, H., *Survival of viruses on fresh produce, using MS2 as a surrogate for norovirus*. Journal of Applied Microbiology, 2005. 98(1): p. 203-209.
104. Exner, M. and Schwartz, T., *RiSKWa-Statuspapier Bewertungskonzepte der Mikrobiologie mit den Schwerpunkten neue Krankheitserreger und Antibiotikaresistenzen*. 2005,
105. Wingender, J. and Flemming, H.C., *Biofilms in drinking water and their role as reservoir for pathogens*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2011. 214(6): p. 417-423.
106. Flemming, H.C., Neu, T.R., and Wozniak, D.J., *The EPS matrix: the "house of biofilm cells"*. Journal of Bacteriology, 2007. 189(22): p. 7945-7947.
107. Flemming, H.C. and Wingender, J., *The biofilm matrix*. Nature Reviews Microbiology, 2010. 8(9): p. 623-633.
108. Allison, D.G., *The Biofilm Matrix*. Biofouling, 2003. 19(2): p. 139-150.
109. Flemming, H.C., *Biofouling in water systems--cases, causes and countermeasures*. Applied Microbiology and Biotechnology, 2002. 59(6): p. 629-640.
110. van Loosdrecht, M.C., Lyklema, J., Norde, W., and Zehnder, A.J., *Influence of interfaces on microbial activity*. Microbiology Reviews, 1990. 54(1): p. 75-87.
111. Martienssen, M., *Leistungen immobilisierter Mikroorganismen bei der Eliminierung von Umweltschadstoffen*, in *Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technische Fakultät*. 2001, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg: Halle (Saale).
112. O'Toole, G., Kaplan, H.B., and Kolter, R., *Biofilm formation as microbial development*. Annual Review of Microbiology, 2000. 54: p. 49-79.
113. Skraber, S., Schijven, J., Gantzer, C., and de Roda Husman, A.M., *Pathogenic viruses in drinking-water biofilms: a public health risk?* Biofilms, 2005. 2(2): p. 105-117.
114. Kilb, B., Lange, B., Schaule, G., Flemming, H.C., and Wingender, J., *Contamination of drinking water by coliforms from biofilms grown on rubber-coated valves*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2003. 206(6): p. 563-573.
115. Wyn-Jones, A. and Sellwood, J., *Enteric viruses in the aquatic environment*. Journal of Applied Microbiology, 2001. 91(6): p. 945-962.
116. Cashdollar, J.L. and Wymer, L., *Methods for primary concentration of viruses from water samples: a review and meta-analysis of recent studies*. Journal of Applied Microbiology, 2013. 115(1): p. 1-11.
117. Block, J.C. and Schwartzbrod, L., *Viruses in water systems: Detection and identification*. 1989, VCH PUBLISHERS, New York.
118. Ikner, L.A., Gerba, C.P., and Bright, K.R., *Concentration and Recovery of Viruses from Water: A Comprehensive Review*. Food and Environmental Virology, 2012. 4(2): p. 41-67.
119. Kunze, A., Pei, L., Elsässer, D., Niessner, R., and Seidel, M., *High performance concentration method for viruses in drinking water*. Journal of Virological Methods, 2015. 222: p. 132-137.

120. Grabow, W.O.K., Taylor, M.B., and de Villiers, J.C., *New methods for the detection of viruses: call for review of drinking water quality guidelines*. Water Science and Technology, 2001. 43(12): p. 1-8.
121. Benner, R., *Ultra-Filtration for the Concentration of Bacteria, Viruses, and Dissolved Organic Matter*. Marine Particles: Analysis and Characterization, 1991: p. 181-185.
122. Allgeier, S., Alspach, B., and Vickers, J., *Membrane filtration guidance manual*. United States Environmental Protection Agency, 2005, EPA 815-R-06-009.
123. Morales-Morales, H.A., Vidal, G., Olszewski, J., Rock, C.M., Dasgupta, D., Oshima, K.H., and Smith, G.B., *Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. 69(7): p. 4098-4102.
124. Divizia, M., Santi, A.L., and Pana, A., *Ultrafiltration-an efficient 2nd step for Hepatitis A and Poliovirus concentration*. Journal of Virological Methods, 1989. 23(1): p. 55-62.
125. Howell, J., Sanchez, V., and Field, R.W., *Membranes in bioprocessing: theory and applications*. 2012, Springer Science & Business Media, Bath.
126. Hill, V.R., Kahler, A.M., Jothikumar, N., Johnson, T.B., Hahn, D., and Cromeans, T.L., *Multistate evaluation of an ultrafiltration-based procedure for simultaneous recovery of enteric microbes in 100-liter tap water samples*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. 73(13): p. 4218-4225.
127. Hill, V.R., Polaczyk, A.L., Kahler, A.M., Cromeans, T.L., Hahn, D., and Amburgey, J.E., *Comparison of Hollow-Fiber Ultrafiltration to the USEPA VIRADEL Technique and USEPA Method 1623*. Journal of Environmental Quality, 2009. 38(2): p. 822-825.
128. Helmi, K., Lamart, S., David, F., Vidal, A., Meheut, G., Jaffrezic, M.P., Oberti, S., and Charni-Ben-Tabassi, N., *Endospore recovery from large volumes using fieldable ultrafiltration for the diagnosis of drinking water treatment plants*. Water Science and Technology-Water Supply, 2014. 14(2): p. 265-273.
129. Embrey, M., Hunter, P., Sellwood, J., Wyn-Jones, P., Percival, S.L., and Chalmers, R., *Microbiology of waterborne diseases: Microbiological aspects and risks*. 2004, Academic Press, London, Waltham, San Diego.
130. Ripperger, S., *Calculation of Cross-Flow Filtration*. Chemie Ingenieur Technik, 1993. 65(5): p. 533-540.
131. Ripperger, S. and Grein, T., *Filtration method with membrane and their modelling*. Chemie Ingenieur Technik, 2007. 79(11): p. 1765-1776.
132. Rhodes, E.R., Hamilton, D.W., See, M.J., and Wymer, L., *Evaluation of hollow-fiber ultrafiltration primary concentration of pathogens and secondary concentration of viruses from water*. Journal of Virological Methods, 2011. 176(1-2): p. 38-45.
133. Smith, C.M. and Hill, V.R., *Dead-End Hollow-Fiber Ultrafiltration for Recovery of Diverse Microbes from Water*. Applied and Environmental Microbiology, 2009. 75(16): p. 5284-5289.
134. Paul, J.H., Jiang, S.C., and Rose, J.B., *Concentration of viruses and dissolved DNA from aquatic environments by vortex flow filtration*. Applied and Environmental Microbiology, 1991. 57(8): p. 2197-2204.
135. Jiang, S.C., Thurmond, J.M., Pichard, S.L., and Paul, J.H., *Concentration of microbial populations from aquatic environments by vortex flow filtration*. Marine Ecology-Progress Series, 1992. 80(1): p. 101-107.
136. Hill, V.R., Polaczyk, A.L., Hahn, D., Narayanan, J., Cromeans, T.L., Roberts, J.M., and Amburgey, J.E., *Development of a rapid method for simultaneous recovery of diverse*

- microbes in drinking water by ultrafiltration with sodium polyphosphate and surfactants*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. 71(11): p. 6878-6884.
137. Winona, L.J., Ommani, A.W., Olszewski, J., Nuzzo, J.B., and Oshima, K.H., *Efficient and predictable recovery of viruses from water by small scale ultrafiltration systems*. Canadian Journal of Microbiology, 2001. 47(11): p. 1033-1041.
138. Lambertini, E., Spencer, S.K., Bertz, P.D., Loge, F.J., Kieke, B.A., and Borchardt, M.A., *Concentration of enteroviruses, adenoviruses, and noroviruses from drinking water by use of glass wool filters*. Applied and Environmental Microbiology, 2008. 74(10): p. 2990-2996.
139. Laine, J.M., Vial, D., and Moulart, P., *Status after 10 years of operation - overview of UF technology today*. Desalination, 2000. 131(1-3): p. 17-25.
140. Nakatsuka, S., Nakate, I., and Miyano, T., *Drinking water treatment by using ultrafiltration hollow fiber membranes*. Desalination, 1996. 106(1-3): p. 55-61.
141. Pei, L., Rieger, M., Lengger, S., Ott, S., Zawadsky, C., Hartmann, N.M., Selinka, H.C., Tiehm, A., Niessner, R., and Seidel, M., *Combination of Crossflow Ultrafiltration, Monolithic Affinity Filtration, and Quantitative Reverse Transcriptase PCR for Rapid Concentration and Quantification of Model Viruses in Water*. Environmental Science & Technology, 2012. 46(18): p. 10073-10080.
142. Leskinen, S.D., Kearns, E.A., Jones, W.L., Miller, R.S., Bevitas, C.R., Kingsley, M.T., Brigmon, R.L., and Lim, D.V., *Automated dead-end ultrafiltration of large volume water samples to enable detection of low-level targets and reduce sample variability*. Journal of Applied Microbiology, 2012. 113(2): p. 351-360.
143. Pei, L., Rieger, M., Lengger, S., Ott, S., Zawadsky, C., Hartmann, N.M., Selinka, H.-C., Tiehm, A., Niessner, R., and Seidel, M., *Combination of Crossflow Ultrafiltration, Monolithic Affinity Filtration, and Quantitative Reverse Transcriptase PCR for Rapid Concentration and Quantification of Model Viruses in Water*. Environmental Science & Technology, 2012. 46(18): p. 10073-10080.
144. Rutjes, S.A., Italiaander, R., van den Berg, H., Lodder, W.J., and Husman, A.M.D., *Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification*. Applied and Environmental Microbiology, 2005. 71(7): p. 3734-3740.
145. Divizia, M., De Filippis, P., Di Napoli, A., Venuti, A., Perez-Bercoff, R., and Pana, A., *Isolation of wild-type hepatitis A virus from the environment*. Water Research, 1989. 23(9): p. 1155-1160.
146. Lottspeich, F. and Zorbas, H., *Bioanalytik*. Vol. 1. 1998, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin.
147. Jones, T., Brassard, J., Johns, M., and Gagné, M.-J., *The effect of pre-treatment and sonication of centrifugal ultrafiltration devices on virus recovery*. Journal of Virological Methods, 2009. 161(2): p. 199-204.
148. USEPA, U.S.E.P.A., *Concentration and processing of waterborne viruses by positive charge 1MDS cartridge filters and organic flocculation*, in *USEPA Manual of Methods for Virology*. 2001, Office of Research and Development: Washington, DC.
149. Cashdollar, J.L., Brinkman, N.E., Griffin, S.M., McMinn, B.R., Rhodes, E.R., Varughese, E.A., Grimm, A.C., Parshionkar, S.U., Wymer, L., and Fout, G.S., *Development and evaluation of EPA method 1615 for detection of enterovirus and norovirus in water*. Applied and Environmental Microbiology, 2013. 79(1): p. 215-223.
150. Wallis, C. and Melnick, J.L., *Concentration of viruses on aluminum and calcium salts*. American Journal of Epidemiology, 1967. 85(3): p. 459-468.

151. Wallis, C. and Melnick, J.L., *Concentration of viruses from sewage by adsorption on Millipore membranes*. Bulletin of the World Health Organization, 1967. 36(2): p. 219-225.
152. Wallis, C. and Melnick, J.L., *Concentration of enteroviruses on membrane filters*. Journal of Virology, 1967. 1(3): p. 472-477.
153. Michen, B. and Graule, T., *Isoelectric points of viruses*. Journal of Applied Microbiology, 2010. 109(2): p. 388-97.
154. Sobsey, M.D. and Jones, B.L., *Concentration of Poliovirus from tap water using positively charged microporous filters*. Applied and Environmental Microbiology, 1979. 37(3): p. 588-595.
155. Ikner, L.A., Soto-Beltran, M., and Bright, K.R., *New Method Using a Positively Charged Microporous Filter and Ultrafiltration for Concentration of Viruses from Tap Water*. Applied and Environmental Microbiology, 2011. 77(10): p. 3500-3506.
156. Melnick, J.L., Safferman, R., Rao, V.C., Goyal, S., Berg, G., Dahling, D.R., Wright, B.A., Akin, E., Stetler, R., Sorber, C., Moore, B., Sobsey, M.D., Moore, R., Lewis, A.L., and Wellings, F.M., *Round robin investigation of methods for the recovery of poliovirus from drinking-water*. Applied and Environmental Microbiology, 1984. 47(1): p. 144-150.
157. Fout, G.S., Schaefer III, F.W., Messer, J.W., Dahling, D.R., and Stetler, R., *ICR Microbial Laboratory Manual*. 1996, Office of Research and Development, Washington, D.C.
158. Polaczyk, A.L., Roberts, J.M., and Hill, V.R., *Evaluation of 1MDS electropositive microfilters for simultaneous recovery of multiple microbe classes from tap water*. Journal of Microbiological Methods, 2007. 68(2): p. 260-266.
159. Parshionikar, S.U., Willian-True, S., Fout, G.S., Robbins, D.E., Seys, S.A., Cassady, J.D., and Harris, R., *Waterborne outbreak of gastroenteritis associated with a norovirus*. Applied and Environmental Microbiology, 2003. 69(9): p. 5263-5268.
160. Borchardt, M.A., Haas, N.L., and Hunt, R.J., *Vulnerability of drinking-water wells in La Crosse, Wisconsin, to enteric-virus contamination from surface water contributions*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. 70(10): p. 5937-5946.
161. Tepper, F. and Kaledin, L., *Virus and protein separation using nano alumina fiber media*, in *Argonide. com*. 2007: Sanford.
162. Karim, M.R., Rhodes, E.R., Brinkman, N., Wymer, L., and Fout, G.S., *New Electropositive Filter for Concentrating Enteroviruses and Noroviruses from Large Volumes of Water*. Applied and Environmental Microbiology, 2009. 75(8): p. 2393-2399.
163. Gibbons, C., Rodriguez, R., Tallon, L., and Sobsey, M., *Evaluation of positively charged alumina nanofibre cartridge filters for the primary concentration of noroviruses, adenoviruses and male-specific coliphages from seawater*. Journal of Applied Microbiology, 2010. 109(2): p. 635-641.
164. Vilagines, P., Sarrette, B., Husson, G., and Vilagines, R., *Glass wool for virus concentration at ambient water pH level*. Water Science and Technology, 1993. 27(3-4): p. 299-306.
165. Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M.P., Calqua, B., Huguet, J.M., Matia, L., and Girones, R., *Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants*. Water Research, 2009. 43(7): p. 2011-2019.
166. Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Cagua, B., Maria Huguet, J., Courtois, S., and Girones, R., *Comparison of methods for concentrating human adenoviruses*,

- polyomavirus JC and noroviruses in source waters and drinking water using quantitative PCR*. Journal of Virological Methods, 2009. 158(1-2): p. 104-109.
167. Vilaginès, P., Sarrette, B., Champsaur, H., Hugues, B., Dubrou, S., Joret, J.-C., Laveran, H., Lesne, J., Paquin, J., and Delattre, J., *Round robin investigation of glass wool method for poliovirus recovery from drinking water and sea water*. Water Science and Technology, 1997. 35(11): p. 445-449.
168. Wallis, C., Henderso.M, and Melnick, J.L., *Enterovirus concentration on cellulose membranes*. Applied Microbiology, 1972. 23(3): p. 476-480.
169. Ver, B.A., Melnick, J.L., and Wallis, C., *Efficient filtration and sizing of viruses with membrane filters*. Journal of Virology, 1968. 2(1): p. 21-25.
170. Smith, E.M. and Gerba, C.P., *Development of a method for detection of human rotavirus in water and sewage*. Applied and Environmental Microbiology, 1982. 43(6): p. 1440-1450.
171. Katayama, H., Shimasaki, A., and Ohgaki, S., *Development of a virus concentration method and its application to detection of enterovirus and Norwalk virus from coastal seawater*. Applied and Environmental Microbiology, 2002. 68(3): p. 1033-1039.
172. Lukasik, J., Scott, T.M., Andryshak, D., and Farrah, S.R., *Influence of salts on virus adsorption to microporous filters*. Applied and Environmental Microbiology, 2000. 66(7): p. 2914-2920.
173. Payment, P., Berube, A., Perreault, D., Armon, R., and Trudel, M., *Concentration of Giardia lamblia cysts, Legionella pneumophila, Clostridium perfringens, Human enteric viruses and coliphages from large volumes of drinking water using a single filtration*. Canadian Journal of Microbiology, 1989. 35(10): p. 932-935.
174. Wallis, C., Henderson, M., and Melnick, J.L., *Enterovirus concentration on cellulose membranes*. Applied Microbiology, 1972. 23(3): p. 476-480.
175. Haramoto, E., Katayama, H., and Ohgaki, S., *Detection of noroviruses in tap water in Japan by means of a new method for concentrating enteric viruses in large volumes of freshwater*. Applied and Environmental Microbiology, 2004. 70(4): p. 2154-2160.
176. Jungbauer, A. and Hahn, R., *Monoliths for fast bioseparation and bioconversion and their applications in biotechnology*. Journal of Separation Science, 2004. 27(10-11): p. 767-778.
177. Krajnc, P., Leber, N., Štefanec, D., Kontrec, S., and Podgornik, A., *Preparation and characterisation of poly (high internal phase emulsion) methacrylate monoliths and their application as separation media*. Journal of Chromatography A, 2005. 1065(1): p. 69-73.
178. Bandari, R., Knolle, W., and Buchmeiser, M.R., *Comparative study on the separation behavior of monolithic columns prepared via ring-opening metathesis polymerization and via electron beam irradiation triggered free radical polymerization for proteins*. Journal of Chromatography A, 2008. 1191(1): p. 268-273.
179. Iberer, G., Hahn, R., and Jungbauer, A., *Monoliths as stationary phases for separating biopolymers: fourth-generation chromatography sorbents*. LC GC, 1999. 17(11): p. 998-1005.
180. Arrua, R.D., Talebi, M., Causon, T.J., and Hilder, E.F., *Review of recent advances in the preparation of organic polymer monoliths for liquid chromatography of large molecules*. Analytica Chimica Acta, 2012. 738: p. 1-12.
181. Endres, H.N., Johnson, J.A., Ross, C.A., Welp, J.K., and Etzel, M.R., *Evaluation of an ion-exchange membrane for the purification of plasmid DNA*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 2003. 37(3): p. 259-266.

182. Peskoller, C., Niessner, R., and Seidel, M., *Development of an epoxy-based monolith used for the affinity capturing of Escherichia coli bacteria*. Journal of Chromatography A, 2009. 1216(18): p. 3794-3801.
183. Wunderlich, A., Torggler, C., Elsässer, D., Lück, C., Niessner, R., and Seidel, M., *Rapid quantification method for Legionella pneumophila in surface water*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2016: p. 1-11.
184. Ott, S., Niessner, R., and Seidel, M., *Preparation of epoxy-based macroporous monolithic columns for the fast and efficient immunofiltration of Staphylococcus aureus*. Journal of Separation Science, 2011. 34(16-17): p. 2181-2192.
185. Hahn, H.H., *Wassertechnologie: Fällung· Flockung· Separation*. 2013, Springer-Verlag.
186. Pusch, D., Oh, D.-Y., Wolf, S., Dumke, R., Schröter-Bobsin, U., Höhne, M., Röske, I., and Schreier, E., *Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters*. Archives of Virology, 2005. 150(5): p. 929-947.
187. Busch, P.L. and Stumm, W., *Chemical interactions in the aggregation of bacteria bioflocculation in waste treatment*. Environmental Science & Technology, 1968. 2(1): p. 49-53.
188. Katzenelson, E., Fattal, B., and Hostovesky, T., *Organic flocculation: an efficient second-step concentration method for the detection of viruses in tap water*. Applied and Environmental Microbiology, 1976. 32(4): p. 638-639.
189. Manwaring, J.F., Chaudhuri, M., and Engelbrecht, R.S., *Removal of viruses by coagulation and flocculation*. Journal of the American Water Works Association, 1971: p. 298-300.
190. Zhu, B., Clifford, D.A., and Chellam, S., *Virus removal by iron coagulation-microfiltration*. Water Research, 2005. 39(20): p. 5153-5161.
191. Johnson, J., Fields, J., and Darlington, W., *Removing viruses from water by polyelectrolytes*. Nature, 1967. 213: p. 665-667.
192. Shields, P.A. and Farrah, S.R., *Concentration of viruses in beef extract by flocculation with ammonium sulfate*. Applied and Environmental Microbiology, 1986. 51(1): p. 211-213.
193. Lewis, G.D. and Metcalf, T.G., *Polyethylene glycol precipitation for recovery of pathogenic viruses, including hepatitis A virus and human rotavirus, from oyster, water, and sediment samples*. Applied and Environmental Microbiology, 1988. 54(8): p. 1983-1988.
194. Calgua, B., Mengewein, A., Grunert, A., Bofill-Mas, S., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Wyn-Jones, A.P., López-Pila, J., and Girones, R., *Development and application of a one-step low cost procedure to concentrate viruses from seawater samples*. Journal of Virological Methods, 2008. 153(2): p. 79-83.
195. Pappert, G., Rieger, M., Niessner, R., and Seidel, M., *Immunomagnetic nanoparticle-based sandwich chemiluminescence-ELISA for the enrichment and quantification of E. coli*. Microchimica Acta, 2010. 168(1-2): p. 1-8.
196. Schwab, K.J., De Leon, R., and Sobsey, M.D., *Immunoaffinity concentration and purification of waterborne enteric viruses for detection by reverse transcriptase PCR*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. 62(6): p. 2086-2094.
197. Yao, L., Wu, Q., Wang, D., Kou, X., and Zhang, J., *Development of monoclonal antibody-coated immunomagnetic beads for separation and detection of norovirus (genogroup II) in faecal extract samples*. Letters in Applied Microbiology, 2009. 49(2): p. 173-178.

198. Sack, M., Hofbauer, A., Fischer, R., and Stoger, E., *The increasing value of plant-made proteins*. Current Opinion in Biotechnology, 2015. 32: p. 163-170.
199. Jain, P., Pandey, P., Jain, D., and Dwivedi, P., *Plantibody: An overview*. Asian Journal of Pharmacy and Life Science, 2011. 1(1): p. 87-94.
200. Sack, M., Rademacher, T., Spiegel, H., Boes, A., Hellwig, S., Drossard, J., Stoger, E., and Fischer, R., *From gene to harvest: insights into upstream process development for the GMP production of a monoclonal antibody in transgenic tobacco plants*. Plant Biotechnology Journal, 2015. 13(8): p. 1094-1105.
201. Evans, T., Waarvick, C., Seidler, R.J., and LeChevallier, M., *Failure of the most-probable-number technique to detect coliforms in drinking water and raw water supplies*. Applied and Environmental Microbiology, 1981. 41(1): p. 130-138.
202. Seidler, R.J., Evans, T., Kaufman, J., Warvick, C., and LeChevallier, M.W., *Limitations of standard coliform enumeration techniques*. Journal of the American Water Works Association, 1981. 73(10): p. 538-342.
203. Grabow, W. and Du Preez, M., *Comparison of m-Endo LES, MacConkey, and Teepol media for membrane filtration counting of total coliform bacteria in water*. Applied and Environmental Microbiology, 1979. 38(3): p. 351-358.
204. Rice, E.W., Fox, K., Nash, H.D., Read, E.J., and Smith, A.P., *Comparison of media for recovery of total coliform bacteria from chemically treated water*. Applied and Environmental Microbiology, 1987. 53(7): p. 1571-1573.
205. Warren, L., Benoit, R., and Jessee, J., *Rapid enumeration of Fecal Coliforms in water by a colorimetric beta-galactosidase assay*. Applied and Environmental Microbiology, 1978. 35(1): p. 136-141.
206. Umweltbundesamt, *Hinweise zu mikrobiologischen Parametern/Nachweisverfahren nach TrinkwV 2001 Nachtrag zur Liste alternativer Verfahren gemäß § 15 Abs. 1 TrinkwV 2001*. 2004, Bundesgesundheitsblatt-Gesundheitsforschung-Gesundheitsschutz. p. 714-715.
207. Kilian, M. and Bülo, P., *Rapid diagnosis of Enterobacteriaceae*, in *Detection of bacterial glycosidases*. 1976, Acta Pathologica Microbiologica Scandinavica Section B Microbiology. p. 245-251.
208. Rice, E.W., Allen, M., and Edberg, S., *Efficacy of beta-glucuronidase assay for identification of Escherichia coli by the defined-substrate technology*. Applied and Environmental Microbiology, 1990. 56(5): p. 1203-1205.
209. Eckner, K.F., *Comparison of membrane filtration and multiple-tube fermentation by the Colilert and Enterolert methods for detection of waterborne coliform bacteria, Escherichia coli, and enterococci used in drinking and bathing water quality monitoring in southern Sweden*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. 64(8): p. 3079-3083.
210. Cowburn, J., Goodall, T., Fricker, E., Walter, K., and Fricker, C., *A preliminary study of the use of Colilert for water quality monitoring*. Letters in Applied Microbiology, 1994. 19(1): p. 50-52.
211. Budnick, G.E., Howard, R.T., and Mayo, D.R., *Evaluation of Enterolert for enumeration of enterococci in recreational waters*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. 62(10): p. 3881-3884.
212. Yakub, G.P., Castric, D.A., Stadterman-Knauer, K.L., Tobin, M.J., Blazina, M., Heineman, T.N., Yee, G.Y., and Frazier, L., *Evaluation of Colilert and Enterolert defined substrate methodology for wastewater applications*. Water Environment Research, 2002. 74(2): p. 131-135.

213. Leoni, E., De Luca, G., Legnani, P., Sacchetti, R., Stampi, S., and Zanetti, F., *Legionella waterline colonization: detection of Legionella species in domestic, hotel and hospital hot water systems*. Journal of Applied Microbiology, 2005. 98(2): p. 373-379.
214. Ta, A.C., Stout, J.E., Yu, V.L., and Wagener, M.M., *Comparison of culture methods for monitoring Legionella species in hospital potable water systems and recommendations for standardization of such methods*. Journal of Clinical Microbiology, 1995. 33(8): p. 2118-2123.
215. Hussong, D., Colwell, R., O'brien, M., Weiss, E., Pearson, A., Weiner, R., and Burge, W., *Viable Legionella pneumophila not detectable by culture on agar media*. Nature Biotechnology, 1987. 5: p. 947-950.
216. Fong, T.-T. and Lipp, E.K., *Enteric viruses of humans and animals in aquatic environments: health risks, detection, and potential water quality assessment tools*. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2005. 69(2): p. 357-371.
217. Cromeans, T.L., Lu, X., Erdman, D.D., Humphrey, C.D., and Hill, V.R., *Development of plaque assays for adenoviruses 40 and 41*. Journal of Virological Methods, 2008. 151(1): p. 140-145.
218. Grabow, W.O.K., Puttergill, D.L., and Bosch, A., *Plaque Assay for Adenovirus Type 41 Using the PLC/PRF/5 Liver Cell Line*. Water Science and Technology, 1993. 27(3-4): p. 321-327.
219. Dahling, D.R. and Wright, B.A., *Optimization of the BGM cell line culture and viral assay procedures for monitoring viruses in the environment*. Applied and Environmental Microbiology, 1986. 51(4): p. 790-812.
220. Abad, F.X., Pintó, R.M., and Bosch, A., *Flow cytometry detection of infectious rotaviruses in environmental and clinical samples*. Applied and Environmental Microbiology, 1998. 64(7): p. 2392-2396.
221. Morris, R., *Detection of enteroviruses: an assessment of ten cell lines*. Water Science and Technology, 1985. 17(10): p. 81-88.
222. Guttman-Bass, N., *Cell cultures and other host systems for detecting and quantifying viruses in the environment*, in *Methods for Recovering Viruses from the Environment*. 1987, CRC Press, Inc: Boca Raton, Florida p. 195-228.
223. Martín, M.C., Martínez, N., del Rio, B., Ladero, V., Fernández, M., and Alvarez, M., *A novel real-time polymerase chain reaction-based method for the detection and quantification of lactose-fermenting Enterobacteriaceae in the dairy and other food industries*. Journal of Dairy Science, 2010. 93(3): p. 860-867.
224. Davey, H.M., *Life, Death, and In-Between: Meanings and Methods in Microbiology*. Applied and Environmental Microbiology, 2011. 77(16): p. 5571-5576.
225. Bruma, M. and Tofan, C., *Detection, identification and quantification of indicator bacteria from drinking water*. Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, 2008. 14: p. 196-202.
226. Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P., Rajkovic, A., and Uyttendaele, M., *Alternative microbial methods: An overview and selection criteria*. Food Microbiology, 2010. 27(6): p. 710-730.
227. Calabrese, J.P. and Bissonnette, G.K., *Improved membrane filtration method incorporating catalase and sodium pyruvate for detection of chlorine-stressed coliform bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 1990. 56(11): p. 3558-3564.

228. Allen, M.J., Edberg, S.C., and Reasoner, D.J., *Heterotrophic plate count bacteria—what is their significance in drinking water?* International Journal of Food Microbiology, 2004. 92(3): p. 265-274.
229. Rodríguez, R.A., Pepper, I.L., and Gerba, C.P., *Application of PCR-based methods to assess the infectivity of enteric viruses in environmental samples.* Applied and Environmental Microbiology, 2009. 75(2): p. 297-307.
230. Brettar, I. and Höfle, M.G., *Molecular assessment of bacterial pathogens - a contribution to drinking water safety.* Current Opinion in Biotechnology, 2008. 19(3): p. 274-280.
231. Girones, R., Ferrús, M.A., Alonso, J.L., Rodriguez-Manzano, J., Calgua, B., de Abreu Corrêa, A., Hundesa, A., Carratala, A., and Bofill-Mas, S., *Molecular detection of pathogens in water – The pros and cons of molecular techniques.* Water Research, 2010. 44(15): p. 4325-4339.
232. Mothershed, E.A. and Whitney, A.M., *Nucleic acid-based methods for the detection of bacterial pathogens: Present and future considerations for the clinical laboratory.* Clinica Chimica Acta, 2006. 363(1–2): p. 206-220.
233. Niemz, A., Ferguson, T.M., and Boyle, D.S., *Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases.* Trends in Biotechnology, 2011. 29(5): p. 240-250.
234. Bosch, A., Guix, S., Sano, D., and Pinto, R.M., *New tools for the study and direct surveillance of viral pathogens in water.* Current Opinion in Biotechnology, 2008. 19(3): p. 295-301.
235. Ahmad, F. and Hashsham, S.A., *Miniaturized nucleic acid amplification systems for rapid and point-of-care diagnostics: a review.* Analytica Chimica Acta, 2012. 733: p. 1-15.
236. Yager, P., Edwards, T., Fu, E., Helton, K., Nelson, K., Tam, M.R., and Weigl, B.H., *Microfluidic diagnostic technologies for global public health.* Nature, 2006. 442(7101): p. 412-418.
237. Seidel, M. and Niessner, R., *Automated analytical microarrays: a critical review.* Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. 391(5): p. 1521-1544.
238. Mandal, P., Biswas, A., Choi, K., and Pal, U., *Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview.* American Journal of Food Technology, 2011. 6(2): p. 87-102.
239. Loens, K., Bergs, K., Ursi, D., Goossens, H., and Ieven, M., *Evaluation of NucliSens easyMAG for automated nucleic acid extraction from various clinical specimens.* Journal of Clinical Microbiology, 2007. 45(2): p. 421-425.
240. Tan, S.C. and Yiap, B.C., *DNA, RNA, and protein extraction: the past and the present.* Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2009. 2009: p. 1-10.
241. Jansohn, M. and Rothämel, S., *Gentechnische Methoden: Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* Vol. 5. 2012, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
242. Mao, Y., Daniel, L.N., Whittaker, N., and Saffiotti, U., *DNA binding to crystalline silica characterized by Fourier-transform infrared spectroscopy.* Environmental Health Perspectives, 1994. 102 Suppl 10: p. 165-171.
243. Cao, W., Easley, C.J., Ferrance, J.P., and Landers, J.P., *Chitosan as a polymer for pH-induced DNA capture in a totally aqueous system.* Analytical Chemistry, 2006. 78(20): p. 7222-7228.
244. Wen, J., Legendre, L.A., Bienvenue, J.M., and Landers, J.P., *Purification of nucleic acids in microfluidic devices.* Analytical Chemistry, 2008. 80(17): p. 6472-6479.
245. Reinard, T., *Molekularbiologische Methoden.* 2010, Ulmer, Stuttgart.

246. Vulto, P., Dame, G., Maier, U., Makohliso, S., Podszun, S., Zahn, P., and Urban, G.A., *A microfluidic approach for high efficiency extraction of low molecular weight RNA*. *Lab on a Chip*, 2010. 10(5): p. 610-616.
247. Kim, J., Johnson, M., Hill, P., and Gale, B.K., *Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification*. *Integrative Biology*, 2009. 1(10): p. 574-586.
248. Price, C.W., Leslie, D.C., and Landers, J.P., *Nucleic acid extraction techniques and application to the microchip*. *Lab on a Chip*, 2009. 9(17): p. 2484-2494.
249. Wilson, I.G., *Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1997. 63(10): p. 3741-3751.
250. Hata, A., Katayama, H., Kitajima, M., Visvanathan, C., Nol, C., and Furumai, H., *Validation of internal controls for extraction and amplification of nucleic acids from enteric viruses in water samples*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011. 77(13): p. 4336-4343.
251. Dundas, N., Leos, N.K., Mitui, M., Revell, P., and Rogers, B.B., *Comparison of automated nucleic acid extraction methods with manual extraction*. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2008. 10(4): p. 311-316.
252. Schweitzer, B. and Kingsmore, S., *Combining nucleic acid amplification and detection*. *Current Opinion in Biotechnology*, 2001. 12(1): p. 21-27.
253. Camilleri, P., *Capillary electrophoresis: theory and practice*. 1997, CRC Press.
254. Helm, M. and Wölfl, S., *Instrumentelle Bioanalytik*. 2007, John Wiley & Sons, Weinheim.
255. Nolan, T. and Bustin, S.A., *PCR Technology: Current Innovations, Third Edition*, ed. T. Nolan and S.A. Bustin. 2013, CRC Press, Boca Raton, USA.
256. Zipper, H., Brunner, H., Bernhagen, J., and Vitzthum, F., *Investigations on DNA intercalation and surface binding by SYBR Green I, its structure determination and methodological implications*. *Nucleic Acids Research*, 2004. 32(12): p. e103.
257. Rasmussen, R., *Quantification on the LightCycler*, in *Rapid cycle real-time PCR*. 2001, Springer: Berlin, Heidelberg. p. 21-34.
258. Espy, M.J., Uhl, J.R., Sloan, L.M., Buckwalter, S.P., Jones, M.F., Vetter, E.A., Yao, J.D., Wengenack, N.L., Rosenblatt, J.E., Cockerill, F.R., 3rd, and Smith, T.F., *Real-time PCR in clinical microbiology: applications for routine laboratory testing*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2006. 19(1): p. 165-256.
259. Didenko, V.V., *DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications*. *Biotechniques*, 2001. 31(5): p. 1106-1121.
260. Wong, M.L. and Medrano, J.F., *Real-time PCR for mRNA quantitation*. *Biotechniques*, 2005. 39(1): p. 75.
261. Reynisson, E., Josefsen, M.H., Krause, M., and Hoorfar, J., *Evaluation of probe chemistries and platforms to improve the detection limit of real-time PCR*. *Journal of Microbiological Methods*, 2006. 66(2): p. 206-216.
262. Pfaffl, M.W., *A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR*. *Nucleic Acids Research*, 2001. 29(9): p. e45.
263. Pfaffl, M.W., *Quantification strategies in real-time PCR*. *A-Z of quantitative PCR*, 2004. 1: p. 89-113.
264. Zhang, Y. and Ozdemir, P., *Microfluidic DNA amplification—A review*. *Analytica Chimica Acta*, 2009. 638(2): p. 115-125.
265. Bej, A.K., Steffan, R.J., DiCesare, J., Haff, L., and Atlas, R.M., *Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1990. 56(2): p. 307-314.

266. Bej, A.K., DiCesare, J.L., Haff, L., and Atlas, R.M., *Detection of Escherichia coli and Shigella spp. in water by using the polymerase chain reaction and gene probes for uid*. Applied and Environmental Microbiology, 1991. 57(4): p. 1013-1017.
267. Ratcliff, R.M., Lanser, J.A., Manning, P.A., and Heuzenroeder, M.W., *Sequence-Based Classification Scheme for the Genus Legionella Targeting the mip Gene*. Journal of Clinical Microbiology, 1998. 36(6): p. 1560-1567.
268. Morio, F., Corvec, S., Caroff, N., Le Gallou, F., Drugeon, H., and Reynaud, A., *Real-time PCR assay for the detection and quantification of Legionella pneumophila in environmental water samples: utility for daily practice*. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2008. 211(3): p. 403-411.
269. Yaradou, D.F., Hallier-Soulier, S., Moreau, S., Poty, F., Hillion, Y., Reyrolle, M., André, J., Festoc, G., Delabre, K., and Vandenesch, F., *Integrated real-time PCR for detection and monitoring of Legionella pneumophila in water systems*. Applied and Environmental Microbiology, 2007. 73(5): p. 1452-1456.
270. Bofill-Mas, S., Albinana-Gimenez, N., Clemente-Casares, P., Hundesa, A., Rodriguez-Manzano, J., Allard, A., Calvo, M., and Girones, R., *Quantification and stability of human adenoviruses and polyomavirus JCPyV in wastewater matrices*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. 72(12): p. 7894-7896.
271. Haramoto, E., Kitajima, M., Katayama, H., and Ohgaki, S., *Real-time PCR detection of adenoviruses, polyomaviruses, and torque teno viruses in river water in Japan*. Water Research, 2010. 44(6): p. 1747-1752.
272. Hamza, I.A., Jurzik, L., Stang, A., Sure, K., Überla, K., and Wilhelm, M., *Detection of human viruses in rivers of a densely-populated area in Germany using a virus adsorption elution method optimized for PCR analyses*. Water Research, 2009. 43(10): p. 2657-2668.
273. Laverick, M., Wyn-Jones, A., and Carter, M., *Quantitative RT-PCR for the enumeration of noroviruses (Norwalk-like viruses) in water and sewage*. Letters in Applied Microbiology, 2004. 39(2): p. 127-136.
274. Albinana-Gimenez, N., Miagostovich, M.P., Calgua, B., Huguet, J.M., Matia, L., and Girones, R., *Analysis of adenoviruses and polyomaviruses quantified by qPCR as indicators of water quality in source and drinking-water treatment plants*. Water Research, 2009. 43(7): p. 2011-2019.
275. Lim, D.V., Simpson, J.M., Kearns, E.A., and Kramer, M.F., *Current and developing technologies for monitoring agents of bioterrorism and biowarfare*. Clinical Microbiology Reviews, 2005. 18(4): p. 583-607.
276. Schumacher, S., Nestler, J., Otto, T., Wegener, M., Ehrentreich-Förster, E., Michel, D., Wunderlich, K., Palzer, S., Sohn, K., and Weber, A., *Highly-integrated lab-on-chip system for point-of-care multiparameter analysis*. Lab on a Chip, 2012. 12(3): p. 464-473.
277. Zhang, C. and Xing, D., *Miniaturized PCR chips for nucleic acid amplification and analysis: latest advances and future trends*. Nucleic Acids Research, 2007. 35(13): p. 4223-4237.
278. Iqbal, S.S., Mayo, M.W., Bruno, J.G., Bronk, B.V., Batt, C.A., and Chambers, J.P., *A review of molecular recognition technologies for detection of biological threat agents*. Biosensors Bioelectronics, 2000. 15(11-12): p. 549-578.
279. Posthuma-Trumpie, G.A., Korf, J., and van Amerongen, A., *Lateral flow (immuno) assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2009. 393(2): p. 569-582.

280. Dunbar, S.A., *Applications of Luminex® xMAP™ technology for rapid, high-throughput multiplexed nucleic acid detection*. Clinica Chimica Acta, 2006. 363(1): p. 71-82.
281. Epstein, J.R., Biran, I., and Walt, D.R., *Fluorescence-based nucleic acid detection and microarrays*. Analytica Chimica Acta, 2002. 469(1): p. 3-36.
282. Donhauser, S.C., Niessner, R., and Seidel, M., *Sensitive Quantification of Escherichia coli O157:H7, Salmonella enterica, and Campylobacter jejuni by Combining Stopped Polymerase Chain Reaction with Chemiluminescence Flow-Through DNA Microarray Analysis*. Analytical Chemistry, 2011. 83(8): p. 3153-3160.
283. Wang, J., *Electrochemical nucleic acid biosensors*. Analytica Chimica Acta, 2002. 469(1): p. 63-71.
284. Fan, X., White, I.M., Shopova, S.I., Zhu, H., Suter, J.D., and Sun, Y., *Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review*. Analytica Chimica Acta, 2008. 620(1-2): p. 8-26.
285. Postollec, F., Falentin, H., Pavan, S., Combrisson, J., and Sohier, D., *Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology*. Food Microbiology, 2011. 28(5): p. 848-861.
286. Smith, C.J. and Osborn, A.M., *Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology*. FEMS Microbiology Ecology, 2009. 67(1): p. 6-20.
287. Kawasaki, S., Fratamico, P.M., Horikoshi, N., Okada, Y., Takeshita, K., Sameshima, T., and Kawamoto, S., *Multiplex real-time polymerase chain reaction assay for simultaneous detection and quantification of Salmonella species, Listeria monocytogenes, and Escherichia coli O157: H7 in ground pork samples*. Foodborne Pathogens and Disease, 2010. 7(5): p. 549-554.
288. Suo, B., He, Y., Tu, S.-I., and Shi, X., *A multiplex real-time polymerase chain reaction for simultaneous detection of Salmonella spp., Escherichia coli O157, and Listeria monocytogenes in meat products*. Foodborne Pathogens and Disease, 2010. 7(6): p. 619-628.
289. Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G., and Magnani, M., *A new platform for Real-Time PCR detection of Salmonella spp., Listeria monocytogenes and Escherichia coli O157 in milk*. Food Microbiology, 2009. 26(6): p. 615-622.
290. Hamza, I.A., Jurzik, L., and Wilhelm, M., *Development of a Luminex assay for the simultaneous detection of human enteric viruses in sewage and river water*. Journal of Virological Methods, 2014. 204(0): p. 65-72.
291. Pemov, A., Modi, H., Chandler, D.P., and Bavykin, S., *DNA analysis with multiplex microarray-enhanced PCR*. Nucleic Acids Research, 2005. 33(2): p. e11.
292. Khodakov, D.A., Zakharova, N.V., Gryadunov, D.A., Filatov, F.P., Zasedatelev, A.S., and Mikhailovich, V.M., *An oligonucleotide microarray for multiplex real-time PCR identification of HIV-1, HBV, and HCV*. Biotechniques, 2008. 44(2): p. 241-248.
293. Gill, P. and Ghaemi, A., *Nucleic acid isothermal amplification technologies: a review*. Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids, 2008. 27(3): p. 224-243.
294. Khodakov, D. and Ellis, A., *Recent developments in nucleic acid identification using solid-phase enzymatic assays*. Microchimica Acta, 2014. 181(13-14): p. 1633-1646.
295. Asiello, P.J. and Baeumner, A.J., *Miniaturized isothermal nucleic acid amplification, a review*. Lab Chip, 2011. 11(8): p. 1420-1430.
296. Craw, P. and Balachandran, W., *Isothermal nucleic acid amplification technologies for point-of-care diagnostics: a critical review*. Lab Chip, 2012. 12(14): p. 2469-2486.

297. Lutz, S., Weber, P., Focke, M., Faltin, B., Hoffmann, J., Muller, C., Mark, D., Roth, G., Munday, P., Armes, N., Piepenburg, O., Zengerle, R., and von Stetten, F., *Microfluidic lab-on-a-foil for nucleic acid analysis based on isothermal recombinase polymerase amplification (RPA)*. Lab on a Chip, 2010. 10(7): p. 887-893.
298. Li, J. and Macdonald, J., *Advances in isothermal amplification: novel strategies inspired by biological processes*. Biosensors and Bioelectronics, 2014. 64: p. 196-211.
299. Compton, J., *Nucleic acid sequence-based amplification*. Nature, 1991. 350(6313): p. 91-92.
300. Connelly, J.T., Nugen, S.R., Borejsza-Wysocki, W., Durst, R.A., Montagna, R.A., and Baeumner, A.J., *Human pathogenic Cryptosporidium species bioanalytical detection method with single oocyst detection capability*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2008. 391(2): p. 487-495.
301. van Gemen, B., van Beuningen, R., Nabbe, A., van Strijp, D., Jurriaans, S., Lens, P., and Kievits, T., *A one-tube quantitative HIV-1 RNA NASBA nucleic acid amplification assay using electrochemiluminescent (ECL) labelled probes*. Journal of Virological Methods, 1994. 49(2): p. 157-167.
302. Baeumner, A.J., Humiston, M.C., Montagna, R.A., and Durst, R.A., *Detection of Viable Oocysts of Cryptosporidium p arvum Following Nucleic Acid Sequence Based Amplification*. Analytical Chemistry, 2001. 73(6): p. 1176-1180.
303. Nagamine, K., Hase, T., and Notomi, T., *Accelerated reaction by loop-mediated isothermal amplification using loop primers*. Molecular and Cellular Probes, 2002. 16(3): p. 223-229.
304. Nugen, S.R., Asiello, P.J., Connelly, J.T., and Baeumner, A.J., *PMMA biosensor for nucleic acids with integrated mixer and electrochemical detection*. Biosensors and Bioelectronics, 2009. 24(8): p. 2428-2433.
305. Leone, G., van Gemen, B., Schoen, C.D., van Schijndel, H., and Kramer, F.R., *Molecular beacon probes combined with amplification by NASBA enable homogeneous, real-time detection of RNA*. Nucleic Acids Research, 1998. 26(9): p. 2150-2155.
306. Dobnik, D., Morisset, D., Lenarcic, R., and Ravnikar, M., *Simultaneous Detection of RNA and DNA Targets Based on Multiplex Isothermal Amplification*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2014. 62(13): p. 2989-2996.
307. Gao, W., Li, X., Zeng, L., and Peng, T., *Rapid isothermal detection assay: a probe amplification method for the detection of nucleic acids*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 2008. 60(2): p. 133-141.
308. Vincent, M., Xu, Y., and Kong, H., *Helicase-dependent isothermal DNA amplification*. EMBO Reports, 2004. 5(8): p. 795-800.
309. Chow, W.H.A., McCloskey, C., Tong, Y., Hu, L., You, Q., Kelly, C.P., Kong, H., Tang, Y.-W., and Tang, W., *Application of isothermal helicase-dependent amplification with a disposable detection device in a simple sensitive stool test for toxigenic Clostridium difficile*. The Journal of Molecular Diagnostics, 2008. 10(5): p. 452-458.
310. Tang, W., Chow, W.H.A., Ying, L., Kong, H., Tang, Y.-W., and Lemieux, B., *Nucleic acid assay system for tier II laboratories and moderately complex clinics to detect HIV in low-resource settings*. Journal of Infectious Diseases, 2010. 201(Supplement 1): p. S46-S51.
311. Ramalingam, N., San, T.C., Kai, T.J., Mak, M.Y.M., and Gong, H.-Q., *Microfluidic devices harboring unsealed reactors for real-time isothermal helicase-dependent amplification*. Microfluidics and Nanofluidics, 2009. 7(3): p. 325-336.

312. Motré, A., Li, Y., and Kong, H., *Enhancing helicase-dependent amplification by fusing the helicase with the DNA polymerase*. *Gene*, 2008. 420(1): p. 17-22.
313. Goldmeyer, J., Kong, H., and Tang, W., *Development of a novel one-tube isothermal reverse transcription thermophilic helicase-dependent amplification platform for rapid RNA detection*. *The Journal of Molecular Diagnostics*, 2007. 9(5): p. 639-644.
314. Goldmeyer, J., Li, H., McCormac, M., Cook, S., Stratton, C., Lemieux, B., Kong, H., Tang, W., and Tang, Y.-W., *Identification of Staphylococcus aureus and determination of methicillin resistance directly from positive blood cultures by isothermal amplification and a disposable detection device*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2008. 46(4): p. 1534-1536.
315. Andresen, D., von Nickisch-Rosenegk, M., and Bier, F.F., *Helicase dependent OnChip-amplification and its use in multiplex pathogen detection*. *Clinica Chimica Acta*, 2009. 403(1): p. 244-248.
316. Mahalanabis, M., Do, J., ALMuayad, H., Zhang, J.Y., and Klapperich, C.M., *An integrated disposable device for DNA extraction and helicase dependent amplification*. *Biomedical Microdevices*, 2010. 12(2): p. 353-359.
317. Piepenburg, O., Williams, C.H., Stemple, D.L., and Armes, N.A., *DNA detection using recombination proteins*. *PLoS Biology*, 2006. 4(7): p. e204.
318. Ando, R.A. and Morrical, S.W., *Single-stranded DNA binding properties of the UvsX recombinase of bacteriophage T4: binding parameters and effects of nucleotides*. *J Mol Biol*, 1998. 283(4): p. 785-96.
319. Piepenburg, O. and A., A.N., Alere San Diego Inc., *Recombinase polymerase amplification reagents and kits*, Patent, United States, 2012, US 2012/0129173 A1.
320. Morrical, S.W. and Alberts, B.M., *The UvsY protein of bacteriophage T4 modulates recombination-dependent DNA synthesis in vitro*. *J Biol Chem*, 1990. 265(25): p. 15096-103.
321. Sasaki, Y., Miyoshi, D., and Sugimoto, N., *Effect of molecular crowding on DNA polymerase activity*. *Biotechnol J*, 2006. 1(4): p. 440-6.
322. Rohrman, B.A. and Richards-Kortum, R.R., *A paper and plastic device for performing recombinase polymerase amplification of HIV DNA*. *Lab on a chip*, 2012. 12(17): p. 3082-3088.
323. Rohrman, B.A., Leautaud, V., Molyneux, E., and Richards-Kortum, R.R., *A lateral flow assay for quantitative detection of amplified HIV-1 RNA*. *PLoS One*, 2012. 7(9): p. e45611.
324. Kersting, S., Rausch, V., Bier, F., and von Nickisch-Rosenegk, M., *Rapid detection of Plasmodium falciparum with isothermal recombinase polymerase amplification and lateral flow analysis*. *Malaria Journal*, 2014. 13(1): p. 99-108.
325. Euler, M., Wang, Y., Heidenreich, D., Patel, P., Strohmeier, O., Hakenberg, S., Niedrig, M., Hufert, F.T., and Weidmann, M., *Development of a panel of recombinase polymerase amplification assays for detection of biothreat agents*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2013. 51(4): p. 1110-1117.
326. Euler, M., Wang, Y., Nentwich, O., Piepenburg, O., Hufert, F.T., and Weidmann, M., *Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of Rift Valley fever virus*. *Journal of Clinical Virology*, 2012. 54(4): p. 308-312.
327. del Rio, J.S., Yehia Adly, N., Acero-Sanchez, J.L., Henry, O.Y., and O'Sullivan, C.K., *Electrochemical detection of Francisella tularensis genomic DNA using solid-phase recombinase polymerase amplification*. *Biosensors Bioelectronics*, 2014. 54: p. 674-678.

328. Shin, Y., Perera, A.P., Kim, K.W., and Park, M.K., *Real-time, label-free isothermal solid-phase amplification/detection (ISAD) device for rapid detection of genetic alteration in cancers*. Lab Chip, 2013. 13(11): p. 2106-2114.
329. Abd El Wahed, A., El-Deeb, A., El-Tholoth, M., Abd El Kader, H., Ahmed, A., Hassan, S., Hoffmann, B., Haas, B., Shalaby, M.A., Hufert, F.T., and Weidmann, M., *A Portable Reverse Transcription Recombinase Polymerase Amplification Assay for Rapid Detection of Foot-and-Mouth Disease Virus*. PLoS ONE, 2013. 8(8): p. e71642.
330. El Wahed, A.A., Weidmann, M., and Hufert, F.T., *Diagnostics-in-a-Suitcase: Development of a portable and rapid assay for the detection of the emerging avian influenza A (H7N9) virus*. Journal of Clinical Virology, 2015. 69: p. 16-21.
331. Hakenberg, S., Hugle, M., Weidmann, M., Hufert, F., Dame, G., and Urban, G.A., *A phase-guided passive batch microfluidic mixing chamber for isothermal amplification*. Lab Chip, 2012. 12(21): p. 4576-4580.
332. Kunze, A., Dilcher, M., Abd El Wahed, A., Hufert, F., Niessner, R., and Seidel, M., *On-Chip Isothermal Nucleic Acid Amplification on Flow-Based Chemiluminescence Microarray Analysis Platform for the Detection of Viruses and Bacteria*. Analytical Chemistry, 2016. 88(1): p. 898-905.
333. Fire, A. and Xu, S.-Q., *Rolling replication of short DNA circles*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1995. 92(10): p. 4641-4645.
334. Liu, D., Daubendiek, S.L., Zillman, M.A., Ryan, K., and Kool, E.T., *Rolling circle DNA synthesis: small circular oligonucleotides as efficient templates for DNA polymerases*. Journal of the American Chemical Society, 1996. 118(7): p. 1587-1594.
335. Notomi, T., Okayama, H., Masubuchi, H., Yonekawa, T., Watanabe, K., Amino, N., and Hase, T., *Loop-mediated isothermal amplification of DNA*. Nucleic Acids Research, 2000. 28(12): p. e63-e63.
336. Chowdry, V.K., Luo, Y.Z., Widen, F., Qiu, H.J., Shan, H., Belak, S., and Liu, L.H., *Development of a loop-mediated isothermal amplification assay combined with a lateral flow dipstick for rapid and simple detection of classical swine fever virus in the field*. Journal of Virological Methods, 2014. 197: p. 14-18.
337. Tomita, N., Mori, Y., Kanda, H., and Notomi, T., *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) of gene sequences and simple visual detection of products*. Nature Protocols, 2008. 3(5): p. 877-882.
338. Mori, Y., Nagamine, K., Tomita, N., and Notomi, T., *Detection of loop-mediated isothermal amplification reaction by turbidity derived from magnesium pyrophosphate formation*. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2001. 289(1): p. 150-154.
339. Mori, Y., Kitao, M., Tomita, N., and Notomi, T., *Real-time turbidimetry of LAMP reaction for quantifying template DNA*. Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 2004. 59(2): p. 145-157.
340. Gandelman, O., Jackson, R., Kiddle, G., and Tisi, L., *Loop-mediated amplification accelerated by stem primers*. International Journal of Molecular Sciences, 2011. 12(12): p. 9108-9124.
341. Fu, S., Qu, G., Guo, S., Ma, L., Zhang, N., Zhang, S., Gao, S., and Shen, Z., *Applications of loop-mediated isothermal DNA amplification*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011. 163(7): p. 845-850.
342. Mori, Y. and Notomi, T., *Loop-mediated isothermal amplification (LAMP): a rapid, accurate, and cost-effective diagnostic method for infectious diseases*. Journal of Infection and Chemotherapy, 2009. 15(2): p. 62-69.

343. Fang, X., Liu, Y., Kong, J., and Jiang, X., *Loop-mediated isothermal amplification integrated on microfluidic chips for point-of-care quantitative detection of pathogens*. Analytical Chemistry, 2010. 82(7): p. 3002-3006.
344. Gansen, A., Herrick, A.M., Dimov, I.K., Lee, L.P., and Chiu, D.T., *Digital LAMP in a sample self-digitization (SD) chip*. Lab on a Chip, 2012. 12(12): p. 2247-2254.
345. Walker, G.T., Little, M.C., Nadeau, J.G., and Shank, D.D., *Isothermal in vitro amplification of DNA by a restriction enzyme/DNA polymerase system*. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1992. 89(1): p. 392-396.
346. Walker, G.T., Fraiser, M.S., Schram, J.L., Little, M.C., Nadeau, J.G., and Malinowski, D.P., *Strand displacement amplification—an isothermal, in vitro DNA amplification technique*. Nucleic Acids Research, 1992. 20(7): p. 1691-1696.
347. Little, M.C., Andrews, J., Moore, R., Bustos, S., Jones, L., Embres, C., Durmowicz, G., Harris, J., Berger, D., and Yanson, K., *Strand displacement amplification and homogeneous real-time detection incorporated in a second-generation DNA probe system, BDProbeTecET*. Clinical Chemistry, 1999. 45(6): p. 777-784.
348. Walker, G.T., Nadeau, J.G., Spears, P.A., Schram, J.L., Nycz, C.M., and Shank, D.D., *Multiplex strand displacement amplification (SDA) and detection of DNA sequences from Mycobacterium tuberculosis and other mycobacteria*. Nucleic Acids Research, 1994. 22(13): p. 2670-2677.
349. Shimada, M., Hino, F., Sagawa, H., Mukai, H., Asada, K., and Kato, I., *Development of the detection system for Mycobacterium tuberculosis DNA by using the isothermal DNA amplification method ICAN*. Rinsho byori. The Japanese Journal of Clinical Pathology, 2002. 50(5): p. 528-532.
350. Mullis, K.B., *The unusual origin of the polymerase chain reaction*. Scientific American, 1990. 262(4): p. 56-61.
351. Vincent, M., Xu, Y., and Kong, H., *Helicase-dependent isothermal DNA amplification*. EMBO Reports, 2004. 5(8): p. 795-800.
352. Hübner, I., Steinmetz, I., Obst, U., Giebel, D., and Bitter-Suermann, D., *Rapid determination of members of the family Enterobacteriaceae in drinking water by an immunological assay using a monoclonal antibody against enterobacterial common antigen*. Applied and Environmental Microbiology, 1992. 58(9): p. 3187-3191.
353. Patange, S., Mukundan, M., and Kumar, K.A., *A simple and rapid method for colorimetric determination of histamine in fish flesh*. Food Control, 2005. 16(5): p. 465-472.
354. Genthe, B., Idema, G., Kfir, R., and Grabow, W., *Detection of rotavirus in South African waters: A comparison of a cytoimmunolabelling technique with commercially available immunoassays*. Water Science and Technology, 1991. 24(2): p. 241-244.
355. Keserue, H.A., Baumgartner, A., Felleisen, R., and Egli, T., *Rapid detection of total and viable Legionella pneumophila in tap water by immunomagnetic separation, double fluorescent staining and flow cytometry*. Microbial Biotechnology, 2012. 5(6): p. 753-763.
356. Fuchslin, H.P., Kötzsch, S., Keserue, H.A., and Egli, T., *Rapid and quantitative detection of Legionella pneumophila applying immunomagnetic separation and flow cytometry*. Cytometry Part A, 2010. 77(3): p. 264-274.
357. Noguera, P.S., Posthuma-Trumpie, G.A., van Tuil, M., van der Wal, F.J., Boer, A.d., Moers, A.P., and van Amerongen, A., *Carbon nanoparticles as detection labels in antibody microarrays. Detection of genes encoding virulence factors in Shiga toxin-producing Escherichia coli*. Analytical Chemistry, 2011. 83(22): p. 8531-8536.

358. Graff, J., Ticehurst, J., and Flehmig, B., *Detection of hepatitis A virus in sewage sludge by antigen capture polymerase chain reaction*. Applied and Environmental Microbiology, 1993. 59(10): p. 3165-3170.
359. Metzker, M.L., *Sequencing technologies—the next generation*. Nature Reviews Genetics, 2010. 11(1): p. 31-46.
360. Consortium, I.H.G.S., *Finishing the euchromatic sequence of the human genome*. Nature, 2004. 431(7011): p. 931-945.
361. Borchardt, M.A., Bradbury, K.R., Gotkowitz, M.B., Cherry, J.A., and Parker, B.L., *Human enteric viruses in groundwater from a confined bedrock aquifer*. Environmental Science & Technology, 2007. 41(18): p. 6606-6612.
362. Rosario, K., Nilsson, C., Lim, Y.W., Ruan, Y., and Breitbart, M., *Metagenomic analysis of viruses in reclaimed water*. Environmental Microbiology, 2009. 11(11): p. 2806-2820.
363. Hügler, M., Böckle, K., Eberhagen, I., Thelen, K., Beimfohr, C., and Hamsch, B., *Development and validation of a FISH-based method for the detection and quantification of E. coli and coliform bacteria in water samples*. Water Science & Technology, 2011. 64(7).
364. Singh, A., Pyle, B.H., and McFeters, G.A., *Rapid enumeration of viable bacteria by image analysis*. Journal of Microbiological Methods, 1989. 10(2): p. 91-101.
365. Cenciarini-Borde, C., Courtois, S., and La Scola, B., *Nucleic acids as viability markers for bacteria detection using molecular tools*. 2009.
366. Nocker, A., Cheung, C.-Y., and Camper, A.K., *Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs. dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells*. Journal of Microbiological Methods, 2006. 67(2): p. 310-320.
367. Nocker, A. and Camper, A.K., *Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide*. Applied and Environmental Microbiology, 2006. 72(3): p. 1997-2004.
368. Fittipaldi, M., Rodriguez, N.J.P., Codony, F., Adrados, B., Peñuela, G.A., and Morató, J., *Discrimination of infectious bacteriophage T4 virus by propidium monoazide real-time PCR*. Journal of Virological Methods, 2010. 168(1): p. 228-232.
369. Parshionikar, S., Laseke, I., and Fout, G.S., *Use of propidium monoazide in reverse transcriptase PCR to distinguish between infectious and noninfectious enteric viruses in water samples*. Applied and Environmental Microbiology, 2010. 76(13): p. 4318-4326.
370. Lu, Y., Yang, W., Shi, L., Li, L., Alam, M.J., Guo, S., and Miyoshi, S.-i., *Specific detection of viable Salmonella cells by an ethidium monoazide-loop mediated isothermal amplification (EMA-LAMP) method*. Journal of Health Science, 2009. 55(5): p. 820-824.
371. Reynolds, K.A., Gerba, C.P., and Pepper, I.L., *Detection of infectious enteroviruses by an integrated cell culture-PCR procedure*. Applied and Environmental Microbiology, 1996. 62(4): p. 1424-1427.
372. Bast, E., *Mikrobiologische Methoden: eine Einführung in grundlegende Arbeitstechniken*. 2001, Spektrum, Akad. Verlag.
373. Cochran, W.G., *Estimation of bacterial densities by means of the "most probable number"*. Biometrics, 1950. 6(2): p. 105-116.

374. Cooper, P.D., *The Plaque Assay of Animal Viruses*, in *Methods in Virology*, K. Maramorosch and H. Kaprowski, Editors. 1967, Academic Press: New York, London. p. 243-305.
375. Flint, S.J., Enquist, W., Racaniello, V.R., and Skalka, A.M., *Virological Methods*, in *Principles of Virology*, S.J. Flint, Editor. 2009, American Society for Microbiology Press.
376. Ingram, M., Cleary, T.J., Price, B.J., Price, R.L., and Castro, A., *Rapid detection of Legionella pneumophila by flow cytometry*. *Cytometry*, 1982. 3(2): p. 134-137.
377. Connelly, J.T. and Baeumner, A.J., *Biosensors for the detection of waterborne pathogens*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2011. 402(1): p. 117-127.
378. Griffin, D.W., Donaldson, K.A., Paul, J.H., and Rose, J.B., *Pathogenic human viruses in coastal waters*. *Clinical Microbiology Reviews*, 2003. 16(1): p. 129-143.
379. Grabow, W.O.K., *Bacteriophages: update on application as models for viruses in water*. *Water Sanitary*, 2004. 27(2): p. 251-268.
380. Lucht, A., Formenty, P., Feldmann, H., Gotz, M., Leroy, E., Bataboukila, P., Grolla, A., Feldmann, F., Wittmann, T., Campbell, P., Atsangandoko, C., Boumandoki, P., Finke, E.J., Miethé, P., Becker, S., and Grunow, R., *Development of an immunofiltration-based antigen-detection assay for rapid diagnosis of Ebola virus infection*. *Journal of Infectious Diseases*, 2007. 196 Suppl 2: p. 184-192.
381. Bidawid, S., Farber, J.M., and Sattar, S.A., *Rapid concentration and detection of hepatitis A virus from lettuce and strawberries*. *Journal of Virological Methods*, 2000. 88(2): p. 175-185.
382. Farrah, S., Goyal, S., Gerba, C.P., Wallis, C., and Melnick, J., *Concentration of poliovirus from tap water onto membrane filters with aluminum chloride at ambient pH levels*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978. 35(3): p. 624-626.
383. Rutjes, S.A., Italiaander, R., van den Berg, H.H., Lodder, W.J., and de Roda Husman, A.M., *Isolation and detection of enterovirus RNA from large-volume water samples by using the NucliSens miniMAG system and real-time nucleic acid sequence-based amplification*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2005. 71(7): p. 3734-3740.
384. Gerba, C.P., Farrah, S.R., Goyal, S.M., Wallis, C., and Melnick, J.L., *Concentration of enteroviruses from large volumes of tap water, treated sewage, and seawater*. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978. 35(3): p. 540-548.
385. Donhauser, S.C., Niessner, R., and Seidel, M., *Quantification of E. coli DNA on a flow-through chemiluminescence microarray readout system after PCR amplification*. *Analytical Sciences*, 2009. 25(5): p. 669-674.
386. Kersting, S., Rausch, V., Bier, F., and Nickisch-Rosenegk, M., *Multiplex isothermal solid-phase recombinase polymerase amplification for the specific and fast DNA-based detection of three bacterial pathogens*. *Microchimica Acta*, 2014: p. 1-9.
387. Florin, E.L., Moy, V.T., and Gaub, H.E., *Adhesion forces between individual ligand-receptor pairs*. *Science*, 1994. 264(5157): p. 415-417.
388. Marquette, C.A. and Blum, L.J., *Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006. 385(3): p. 546-54.
389. Dittmer, J., Dittmer, A., Della Bruna, R., and Kasche, V., *A native, affinity-based protein blot for the analysis of streptavidin heterogeneity: consequences for the specificity of streptavidin mediated binding assays*. *Electrophoresis*, 1989. 10(11): p. 762-765.
390. Berg, J.M., Stryer, L., and Tymoczko, J.L., *Stryer Biochemie*. Vol. 6. 2007, Elsevier, Spektrum Akademischer Verlag, München.

391. Dx, T., *Combined instruction manual, TwistAmp® DNA amplification kits*. Vol. F. 2013, TwistDx Ltd, Cambridge.
392. Heim, A., Ebnet, C., Harste, G., and Pring-Åkerblom, P., *Rapid and quantitative detection of human adenovirus DNA by real-time PCR*. *Journal of Medical Virology*, 2003. 70(2): p. 228-239.
393. Mayboroda, O., Benito, A.G., Rio, J.S., Svobodova, M., Julich, S., Tomaso, H., O'Sullivan, C.K., and Katakis, I., *Isothermal solid-phase amplification system for detection of Yersinia pestis*. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2015. 408(3): p. 671-676.
394. Markoulatos, P., Sifakas, N., and Moncany, M., *Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach*. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 2002. 16(1): p. 47-51.
395. Chen, S., Wang, F., Beaulieu, J.C., Stein, R.E., and Ge, B., *Rapid Detection of Viable Salmonellae in Produce by Coupling Propidium Monoazide with Loop-Mediated Isothermal Amplification*. *Applied and Environmental Microbiology*, 2011. 77(12): p. 4008-4016.
396. Sillankorva, S., Oliveira, D., Moura, A., Henriques, M., Faustino, A., Nicolau, A., and Azeredo, J., *Efficacy of a broad host range lytic bacteriophage against E. coli adhered to urothelium*. *Current Microbiology*, 2011. 62(4): p. 1128-1132.
397. Dreier, J., Stormer, M., and Kleesiek, K., *Use of bacteriophage MS2 as an internal control in viral reverse transcription-PCR assays*. *Journal of Clinical Microbiology*, 2005. 43(9): p. 4551-4557.
398. Crews, N., Wittwer, C., and Gale, B., *Continuous-flow thermal gradient PCR*. *Biomedical Microdevices*, 2008. 10(2): p. 187-195.
399. Wolter, A., Niessner, R., and Seidel, M., *Preparation and characterization of functional poly(ethylene glycol) surfaces for the use of antibody microarrays*. *Analytical Chemistry*, 2007. 79(12): p. 4529-4537.
400. Kloth, K., Niessner, R., and Seidel, M., *Development of an open stand-alone platform for regenerable automated microarrays*. *Biosensors Bioelectronics*, 2009. 24(7): p. 2106-2112.
401. Wutz, K., Niessner, R., and Seidel, M., *Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays*. *Microchimica Acta*, 2011. 173(1-2): p. 1-9.
402. Long, G.L. and Winefordner, J.D., *Limit of Detection A Closer Look at the IUPAC Definition*. *Analytical Chemistry*, 1983. 55(7): p. 712A-724A.