

**TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN**

**Lehrstuhl für Analytische Chemie  
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie**

**Kombination  
von monolithischer Immunfiltration  
und Antikörper-Mikroarrays zur schnellen  
Quantifizierung von Mikroorganismen in Milch**

**Sonja Ott**

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.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. M. Schuster  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. R. Nießner  
2. Univ.-Prof. Dr. M. Groll

Die Dissertation wurde am 16.08.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 20.09.2012 angenommen.



Inmitten der Schwierigkeiten liegt die Möglichkeit.  
Albert Einstein, deutscher Physiker, 1879 - 1955



# Danksagung

*Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juni 2009 bis Mai 2012 am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München unter der Leitung von Herrn o. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner angefertigt. Sie wurde teilweise durch ein Projekt des FEI (Forschungskreis der Ernährungsindustrie e.V., Bonn, Germany), der AiF (Allianz Industrie Forschung) und dem Bundesministerium für Wirtschaft und Technologie gefördert (331 Z).*

Besonderer Dank gilt Herrn o. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner für das mir entgegengebrachte Vertrauen und für die Ermöglichung meiner Doktorarbeit an diesem interessanten Thema. Die gute Laborausstattung und Vielseitigkeit des Instituts trugen sehr zum Gelingen meiner Arbeit bei.

Ebenfalls besonders bedanken möchte ich mich bei Herrn Dr. Michael Seidel. Er ermöglichte es mir, meine Arbeit selbstbestimmt zu planen, war trotzdem fortwährend erreichbar, zur Diskussion bereit und mit wertvollen Ideen und Kritik zur Stelle.

Ich möchte auch Veronika Langer, Sandra Lengger und Agathe Szkola sehr danken, für deren Hilfsbereitschaft und Verlässlichkeit, für Anregungen zu meiner Arbeit sowie für ab und zu erforderliche Abwechslung durch gemeinsame Abendgestaltungen. Den weiteren Kollegen der Arbeitsgruppe von Herrn Dr. Seidel danke ich ebenfalls für die gute Zusammenarbeit: Lu Pei, Dr. Martin Rieger und Klaus Wutz.

Vielen Dank an Xaver Hecht (Lehrstuhl für Technische Chemie II, Technische Universität München) und Christine Sternkopf für die Messungen, sowie an Roland Hoppe und Sebastian Wiesemann für die Werkstattarbeiten.

Bei den weiteren Kollegen des Instituts möchte ich mich auch bedanken: Birgit Apel, PD Dr. Thomas Baumann, Christoph Berger, Henrike Blatt, Simon Donhauser, Benedikt Grob, Prof. Dr. Christoph Haisch, Dr. Clemens Helmbrecht, Moritz Herbrich, Dr. Gabi Hörnig, Dr. Natascha Ivleva, Dr. Xaver Karsunke, Dr. Maria Knauer, apl. Prof. Dr. Dietmar Knopp, Melanie Kühn, Mark Lafolger, Joachim Langer, Susanna Mahler, Christian Metz, Susanna Oswald, Dr. Gerhard Pappert, Michael Pschenitzka, Dr. Jimena Saucedo-Friebe, Johannes Schmid, Kathrin Schwarzmeier, Jan-Christoph Wolf sowie allen nicht namentlich erwähnten Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts.

Ein weiterer Dank geht an meine Projektpartner Prof. Dr. Erwin Märtlbauer und Dr. Richard Dietrich (Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, Tierärztliche Fakultät, LMU München). Besonders bedanken möchte ich mich bei Fabian Wiescher für die reibungslose und verlässliche gemeinsame Laborarbeit in diesem Projekt. Ebenfalls bedanken möchte ich

mich bei den weiteren Projektpartnern: Prof. Dr.-Ing. Antonio Delgado, Dr.-Ing. Rainer Benning und Anuhar Osorio Nesme (Lehrstuhl für Strömungstechnik, Friedrich-Alexander-Universität Erlangen-Nürnberg) und Prof. Dr. Markus Fischer, Prof. Dr. Ulrich Hahn und Jan-Hinnerk Jarck (Lehrstuhl für Lebensmittelchemie, Department Chemie, Universität Hamburg).

Zum Schluss möchte ich mich ganz herzlich bei meinen Eltern Irmgard und Werner Ott und meinem Lebenspartner Fabian Röhl für die Unterstützung während meines ganzen Studiums und der Promotion bedanken.

**Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht:**

Ott, S.; Seidel, M.; Niessner, R., *Preparation of epoxy-based macroporous monolithic columns for the fast and efficient immunofiltration of Staphylococcus aureus*, Journal of Separation Science **2011**, *34*, 2181–2192.



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1</b>	<b>Einleitung und Aufgabenstellung</b> .....	<b>2</b>
<b>2</b>	<b>Theoretische Grundlagen</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1</b>	<b>Mikroorganismen in Milch</b> .....	<b>6</b>
2.1.1	Allgemeines zu Milch.....	6
2.1.2	Milchverarbeitung und Qualitätskontrolle .....	7
2.1.3	Beschreibung der Mikroorganismen und der Lebensmittelvergiftungen.....	11
2.1.3.1	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	11
2.1.3.2	<i>Bacillus cereus</i> .....	14
<b>2.2</b>	<b>Detektion von Mikroorganismen</b> .....	<b>16</b>
2.2.1	Konventionelle mikrobiologische Anreicherung auf Nährmedien .....	16
2.2.2	Mikroarray-Detektion .....	17
2.2.2.1	Antikörper-Mikroarrays als Schnellnachweisverfahren.....	18
2.2.2.1.1	Testformate und Reagenzien .....	18
2.2.2.1.2	Sigmoidale Kurvenverläufe.....	21
2.2.2.2	DNA-Mikroarray.....	22
2.2.2.3	Automatische Auslesesysteme .....	23
2.2.3	Weitere Schnellnachweisverfahren .....	24
2.2.3.1	Konventionelle biochemische Schnellnachweisverfahren .....	24
2.2.3.2	Durchflusszytometrie (FCM) .....	25
2.2.3.3	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	28
2.2.3.4	Alternative markierungsfreie Methoden .....	31
<b>2.3</b>	<b>Abtrennung und Aufkonzentrierung von Mikroorganismen aus Probenmatrizes</b> .....	<b>32</b>
2.3.1	Affinitätschromatographie.....	33
2.3.1.1	Prinzip .....	33
2.3.1.2	Unterteilung der Affinitätschromatographie .....	34
2.3.1.3	Trägermaterialien der Affinitätschromatographie .....	36
2.3.1.3.1	Anorganische Monolithe .....	37
2.3.1.3.2	Organische Monolithe.....	37
2.3.1.4	Immobilisierung von Liganden .....	39

2.3.1.5	Fluiddynamische Parameter am Trägermaterial .....	44
2.3.2	Weitere Trenn- und Aufkonzentrierungstechniken .....	46
2.3.2.1	Ionenaustauscherharze .....	46
2.3.2.2	Dielektrophorese .....	47
2.3.2.3	Flüssig-Flüssig-Extraktion.....	47
2.3.2.4	Zentrifugation .....	48
2.3.2.5	Membranfiltration.....	50
2.3.2.6	Trennung und Aufkonzentrierung über Metallhydroxide.....	53
2.3.2.7	Immunomagnetische Separation .....	53
<b>2.4</b>	<b>Antikörper zur Abtrennung und Aufkonzentrierung sowie Detektion von Mikroorganismen aus Probenmatrizes.....</b>	<b>54</b>
2.4.1	Struktur eines Antikörpers und Antigenerkennung.....	54
2.4.2	Polyklonale Antikörper.....	56
2.4.3	Monoklonale Antikörper.....	57
<b>3</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion .....</b>	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b>Aufkonzentrierung mittels monolithischer Immunfiltration .....</b>	<b>62</b>
3.1.1	Übersicht der Komponenten für die monolithische Immunfiltration .....	62
3.1.2	Charakterisierung der monolithischen Säule .....	63
3.1.3	Charakterisierung der monolithischen Affinitätssäule .....	65
3.1.3.1	Nachweis von GOPTS auf der Monolithoberfläche.....	67
3.1.3.2	Nachweis von DAPEG auf der Monolithoberfläche.....	67
3.1.3.3	Nachweis von Antikörpern auf der Monolithoberfläche .....	68
3.1.3.4	Bestimmung der Antikörperkonzentration auf der Monolithoberfläche .....	70
3.1.4	Optimierung des Verbindungsstücks für den Glaskörper.....	73
3.1.5	Aufbau der monolithischen Immunfiltration.....	75
3.1.6	Aufkonzentrierung Hitze-inaktivierter <i>S. aureus</i> -Bakterien (Protein A-positiv).....	78
3.1.6.1	Optimierung der Länge der monolithischen Säule und der Flussrate.....	79
3.1.6.2	Optimierung der Elution.....	82
3.1.6.3	Effektivität der monolithischen Immunfiltration .....	83
3.1.7	Aufkonzentrierung lebender Mikroorganismen .....	85
3.1.7.1	<i>S. aureus</i> -Bakterien (Protein A-positiv und Protein A-negativ).....	85
3.1.7.2	<i>B. cereus</i> -Sporen.....	86
3.1.7.2.1	Variation der eingesetzten Antiserumkonzentration .....	86
3.1.7.2.2	Variation der Probenmatrix und der Probenkonzentration .....	88

3.1.7.3	Kreuzreaktivitätsversuch für <i>S. aureus</i> -Bakterien (Protein A-positiv) und <i>B. cereus</i> -Sporen.....	90
3.1.8	Zusammenfassung der monolithischen Immunfiltration .....	91
<b>3.2</b>	<b>Detektion mittels Antikörper-Mikroarrays .....</b>	<b>93</b>
3.2.1	Automatische Auslesesysteme.....	93
3.2.2	Nachweis Hitze-inaktivierter <i>S. aureus</i> -Zellen am Immunomat.....	94
3.2.2.1	Messung Protein A-positiver und Protein A-negativer <i>S. aureus</i> -Zellen ...	94
3.2.2.2	CL-Signale für unterschiedliche Matrices und Antikörper.....	95
3.2.3	Nachweis Hitze-inaktivierter <i>S. aureus</i> -Zellen am MCR3 SLT .....	97
3.2.3.1	Übertragung des Antikörper-Mikroarrays auf den MCR3 SLT .....	97
3.2.3.2	Abhängigkeit des CL-Signals von der Flussgeschwindigkeit der Probe ...	99
3.2.3.3	Abhängigkeit des CL-Signals von der Temperatur der Flusszelle .....	100
3.2.3.4	Abhängigkeit des CL-Signals vom Volumen der CL-Substrate .....	101
3.2.3.5	Kalibrierkurven bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten.....	102
3.2.4	Nachweis autoklavierter <i>B. cereus</i> -Sporen am MCR3 SLT.....	105
3.2.4.1	Inaktivierung der <i>B. cereus</i> -Sporen .....	105
3.2.4.2	Kalibrierkurve für inaktivierte <i>B. cereus</i> -Sporen .....	106
3.2.5	Zusammenfassung der Antikörper-Mikroarrays .....	107
<b>3.3</b>	<b>Kombination von Aufkonzentrierung und Detektion.....</b>	<b>109</b>
3.3.1	Hitze-inaktivierte <i>S. aureus</i> -Zellen in PBS-Puffer .....	109
3.3.2	Lebende <i>B. cereus</i> -Sporen in PBS-Puffer .....	110
3.3.3	Mischproben in PBS-Puffer .....	112
3.3.4	Lebende <i>B. cereus</i> -Sporen in Milch.....	116
3.3.5	Zusammenfassung der Kombination .....	118
<b>4</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick – Summary and outlook.....</b>	<b>122</b>
<b>5</b>	<b>Experimenteller Teil.....</b>	<b>134</b>
<b>5.1</b>	<b>Verwendete Geräte.....</b>	<b>134</b>
5.1.1	Aufkonzentrierungsapparatur .....	134
5.1.2	Mikroarray-Auslesegeräte und Zubehör .....	135
5.1.3	Sonstige Geräte und Zubehör .....	135
5.1.4	Software.....	136

<b>5.2</b>	<b>Verbrauchsmaterialien .....</b>	<b>137</b>
<b>5.3</b>	<b>Chemikalien und Reagenzien.....</b>	<b>138</b>
5.3.1	Chemikalien .....	138
5.3.2	Bakterienstämme .....	140
5.3.3	Bakterielle Antigene .....	140
5.3.4	Antikörper und Antiseren.....	141
5.3.5	Biochemische Reagenzien.....	141
5.3.6	Puffer und Lösungen .....	141
<b>5.4</b>	<b>Aufkonzentrierung mittels monolithischer Immunfiltration .....</b>	<b>143</b>
5.4.1	Herstellung monolithischer Säulen .....	143
5.4.1.1	Modifizierung der Glaskörperoberfläche .....	144
5.4.1.2	Polymerisation des Monoliths in den Glaskörper .....	145
5.4.2	Herstellung monolithischer Affinitätssäulen .....	146
5.4.2.1	Hydrolyse der monolithischen Säulen.....	146
5.4.2.2	Immobilisierung von GOPTS und DAPEG .....	146
5.4.2.3	Aktivierung mit DSC .....	147
5.4.2.4	Immobilisierung von Antikörpern.....	147
5.4.2.5	Blocken der monolithischen Affinitätssäulen .....	147
5.4.3	Charakterisierung des Monoliths und der Oberflächenbelegung.....	148
5.4.3.1	Aussehen und Porengröße des Monoliths .....	148
5.4.3.2	Nachweis von GOPTS auf der Monolithoberfläche .....	148
5.4.3.3	Nachweis von DAPEG auf der Monolithoberfläche .....	149
5.4.3.4	Nachweis von Antikörpern auf der Monolithoberfläche .....	149
5.4.3.5	Bestimmung der Antikörperkonzentration auf der Monolithoberfläche ...	149
5.4.3.6	Bestimmung des Rückdrucks der monolithischen Säule.....	150
5.4.4	Monolithische Immunfiltration für Mikroorganismen .....	150
5.4.5	Wiederverwendung gebrauchter Glaskörper .....	150
5.4.6	Auswertung der Messdaten.....	151
<b>5.5</b>	<b>Antikörper-Mikroarrays .....</b>	<b>152</b>
5.5.1	Modifizierung der Glaschipoberfläche mit GOPTS und DAPEG .....	152
5.5.2	Vorbereitung für Antikörper-Mikroarrays.....	153
5.5.2.1	Aktivierung der Glasobjektträger-Oberfläche mit DSC .....	153
5.5.2.2	Spotten der Glasobjektträger-Oberfläche mit Antikörpern.....	153
5.5.2.3	Blocken der Mikroarray-Chips.....	154

5.5.3	Antikörper-Mikroarrays am Immunomat.....	154
5.5.4	Antikörper-Mikroarrays am MCR3 SLT.....	156
5.5.5	Auswertung der Messdaten.....	160
<b>5.6</b>	<b>Mikrobiologische und molekularbiologische Techniken .....</b>	<b>161</b>
5.6.1.1	Allgemeines.....	161
5.6.1.2	Kultivierung lebender pathogener Mikroorganismen.....	161
5.6.1.3	Durchflusszytometrie .....	162
5.6.1.3.1	Konjugation von anti- <i>S. aureus</i> mit PE-Cy5.....	162
5.6.1.3.2	Messung mit Doppelanfärbung.....	162
<b>6</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>166</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>172</b>



---

## **TEIL 1**

# **EINLEITUNG UND AUFGABENSTELLUNG**

# 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Immer wieder werden Fälle bekannt, in denen Menschen durch kontaminierte Lebensmittel erkranken oder sogar sterben. Die wohl bekanntesten Lebensmittelskandale der letzten Jahre waren in Deutschland die Dioxin-[1] oder Ehec-Kontaminationen [2] von Lebensmitteln oder die Hygienemängel im Brot einer Großbäckerei in München im Februar dieses Jahres [3]. Über die Medien werden Informationen über solche Missstände schnell verbreitet und sorgen bei den Verbrauchern für Aufregung und Verunsicherung. Einerseits schädigen solche Fälle das Ansehen der betroffenen und auch nicht betroffenen Lebensmittelproduzenten, andererseits entstehen finanzielle Schäden in nicht zu überblickendem Ausmaß. Für die Lebensmittelindustrie sind daher die Qualitätssicherung und der Verbraucherschutz die grundlegenden Voraussetzungen, um leistungs- und wettbewerbsfähig zu bleiben.

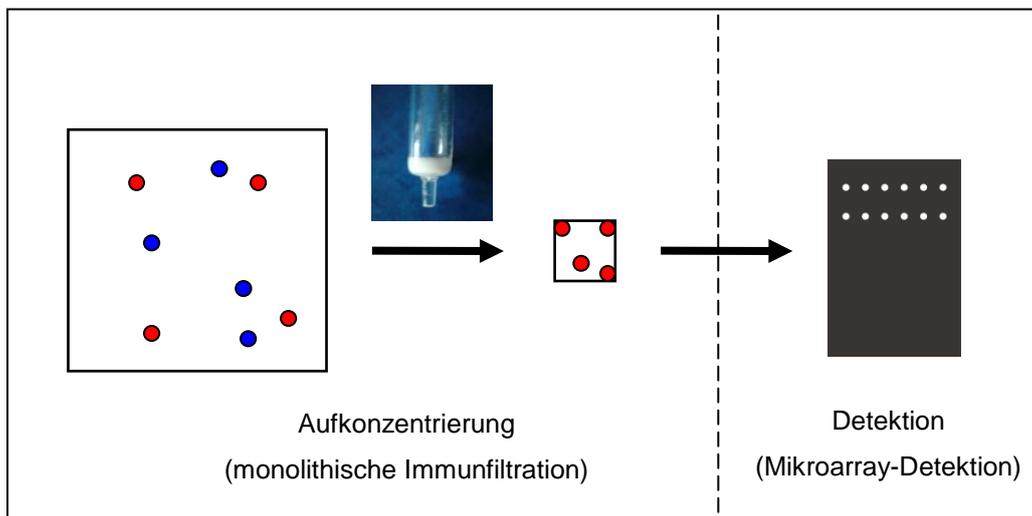
Die stärksten Branchen der Lebensmittelindustrie in Deutschland sind die Milchindustrie und die Molkereiwirtschaft. Sie hatten im Jahr 2010 einen Jahresumsatz von rund 22 Mrd. €, über 29.000 Beschäftigte und wurden mit 29,6 Mio. t Kuhmilch von über 91.000 milcherzeugenden Betrieben beliefert [4]. Um die Produktqualität zu sichern, wird in der Milchindustrie u.a. die häufig auftretende Kontamination durch pathogene Mikroorganismen untersucht. Die Konzentrationen sollten möglichst gering sein und werden durch Grenzwerte gesetzlich geregelt. Dabei spielen die Lebensmittelintoxikationserreger *Staphylococcus aureus* und *Bacillus cereus* eine besondere Rolle. Mit Hilfe des Indikatorkeims *Staphylococcus aureus* wird nachgewiesen, ob hygienisch sauber gearbeitet wurde. Der Erreger *Bacillus cereus* zeigt verdorbene Ware an. Standardmäßig werden sie in der Praxis über klassische mikrobiologische Verfahren unter hohem zeitlichen und arbeitstechnischen Aufwand nachgewiesen. Da die Hygiene- und Qualitätsmängel mit eventuellen Gesundheitsrisiken bereits während des Verarbeitungsprozesses erkannt und beseitigt werden sollen, ist die Zeitspanne von Probenahme bis zum eindeutigen Nachweis zu groß.

Aus diesem Grund ist die Erforschung und Entwicklung schneller und verlässlicher Nachweismethoden zur Qualitätskontrolle von Lebensmitteln wichtig, um die Kontaminationen darin frühzeitig festzustellen, bevor sie zum Verbraucher gelangen. Die Entwicklung eines kombinierten analytischen Systems hat eine große wirtschaftliche Bedeutung für die Milchindustrie, da durch ein automatisiertes Analysesystem die Kosten verringert werden können und auch die Detektionszeit deutlich reduziert wird. Dies hat den Vorteil, dass die Mikroorganismen viel schneller nachzuweisen sind und somit die Entscheidungswege verkürzt werden können, ob das Produkt in den Handel darf oder nicht. Da Milch relativ

schnell verderblich ist, hat ein Schnellnachweis den weiteren Vorteil, dass Produkte schneller in den Handel gelangen können, wodurch deren Haltbarkeit beim Verbraucher verlängert wird. Ebenso können durch die schnelle Detektion finanzielle Schäden vermieden werden, wie z.B. Rückrufaktionen, durch die auch das Firmenimage erheblich leidet.

In dieser Arbeit wurde an der Entwicklung zweier neuartiger Methoden gearbeitet: die Aufkonzentrierung mit monolithischer Immunfiltration und die Detektion mit Antikörper-Mikroarrays. Beide Systeme wurden im Anschluss miteinander kombiniert.

Der erste Schritt beinhaltete die Entwicklung einer monolithischen Immunfiltration zur Aufkonzentrierung von *Staphylococcus aureus*-Bakterien bzw. *Bacillus cereus*-Sporen aus Milch, nach der die Proben in geeigneten Konzentrationen vorliegen sollen, um eine anschließende Detektion zu ermöglichen (Abbildung 1.1).



**Abbildung 1.1:** Schema der Kombination aus Aufkonzentrierung und Detektion.

Die monolithische Immunfiltration ist eine Unterklasse der Affinitätschromatographie. Sie wird auf einem monolithischen Trägermaterial, d.h. einem Polymer mit Durchflusssporen, durchgeführt. Die Oberfläche wird schrittweise modifiziert, so dass die Immobilisierung von Fängerliganden, in diesem Fall Antikörpern, möglich wird. Die Antikörper fangen spezifisch die Mikroorganismen aus der Milch heraus und sorgen dafür, dass die für den Nachweis störende Milchmatrix das Trägermaterial ohne Rückhalt passieren kann. Die Mikroorganismen können so aufkonzentriert und in einer geeigneten Matrix erhalten werden.

Für die Detektion bedient man sich der Mikroarray-Technologie, bei der Fängerantikörper auf definierten Positionen auf oberflächenbehandelten Glasobjektträgern immobilisiert werden. Die so hergestellten Mikroarray-Chips werden in der Mikroarray-Analysenplattform MCR3 mittels Chemilumineszenz ausgelesen, um die Analyte in kürzester Zeit zu quantifizieren.

Für *S. aureus* sind gesetzliche Grenzwerte von 100 *S. aureus*/mL vorgegeben. Für *B. cereus* bzw. *B. cereus*-Sporen sind keine gesetzlichen Grenzwerte definiert, jedoch geht man hier von der gleichen Größenordnung wie für *S. aureus*-Bakterien aus. Da mittels Mikroarray-Detektion erst Konzentrationen ab  $10^4$  -  $10^5$  Zellen/mL quantifiziert werden können, wird ein volumetrischer Konzentrationsfaktor von 1.000 angestrebt. Dies sollte in möglichst kurzer Zeit erreicht werden, damit die Kombination aus Aufkonzentrierung und Detektion in weniger als 1 h abgeschlossen ist.

Die Forschungsarbeiten dienen als Prinzipstudie. Bei einer erfolgreichen ersten Entwicklung des kombinierten Systems kann dieses auf weitere Anwendungen angepasst und bis zur Marktreife weiterentwickelt werden. Die Anwendung könnte dabei nach entsprechender Anpassung über die Analyse von flüssigen Lebensmitteln hinausgehen, da die Qualitätskontrolle von Ausgangsstoffen, Zwischen- und Endprodukten für unterschiedliche Betriebe von Interesse ist.

---

## **TEIL 2**

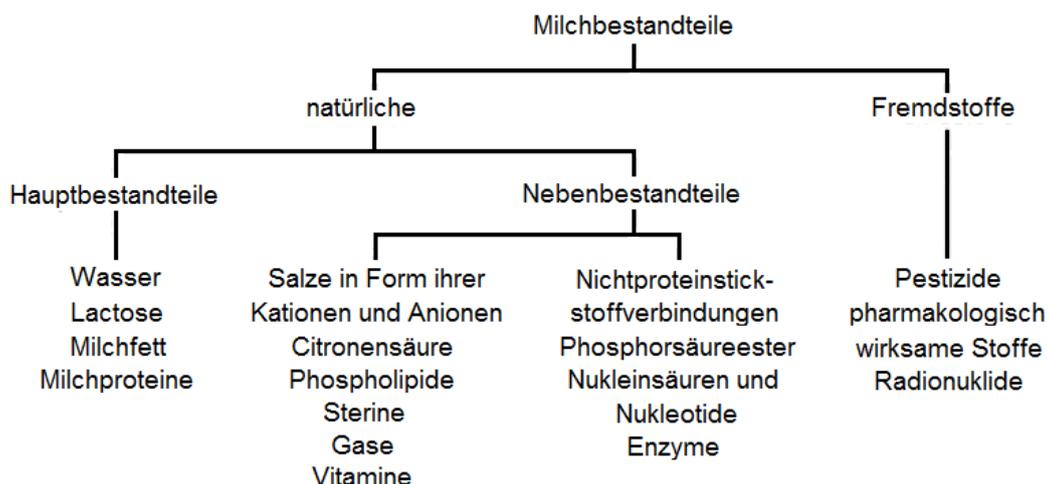
# **THEORETISCHE GRUNDLAGEN**

## 2 Theoretische Grundlagen

### 2.1 Mikroorganismen in Milch

#### 2.1.1 Allgemeines zu Milch

Gemäß Milchverordnung wird Milch wie folgt definiert: „Das durch ein- oder mehrmaliges tägliches Melken gewonnene unveränderte Eutersekret von zur Milchgewinnung gehaltenen Kühen“ [5]. Eine Kuh kann bis zu ca. zehn Monate nach der Geburt ihres Kalbes gemolken werden. Die Zusammensetzung und die Eigenschaften der Milch verändern sich während dieser Zeit [6]. Sie ist eine sehr komplizierte Matrix, da in ihr über 100.000 verschiedene Molekülsorten nachgewiesen wurden. Die komplexe Zusammensetzung kann zusätzlich noch durch verschiedene Variationen einzelner Kuhrassen oder Herden, durch unterschiedliche Fütterungsbedingungen sowie jahreszeitliche und geographische Unterschiede beeinflusst werden [7]. Die Bestandteile der Milch können in natürliche Milchbestandteile und in Fremdstoffe untergliedert werden (Abbildung 2.1). Die natürlichen Milchbestandteile sind weiter unterteilt in Hauptbestandteile und Nebenbestandteile. Zu den Hauptbestandteilen gehören Stoffgruppen, die mehr als 1% der Gesamtzusammensetzung der Milch ausmachen [8].



**Abbildung 2.1:** Bestandteile der Milch [8] (modifiziert).

Der Hauptanteil der Milch mit fast 90% ist Wasser, welches als Lösungs- und Dispergiermittel für die weiteren Bestandteile dient [8]. Die Lactose, das charakteristische Kohlenhydrat der Milch, ist mit einem relativ konstanten Anteil von 5% vertreten und sorgt für den leicht süßlichen Geschmack der Milch [8]. Der Milchfettanteil unterliegt größeren Schwankungen

und beträgt zwischen 3% und 6% [8]. Die Milchproteine, auch als Gesamteiweiß bezeichnet, machen über 3% der Gesamtzusammensetzung aus [8]. Der Hauptbestandteil der Milchproteine ist Casein mit fast 80% und zählt zum unlöslichen Milchproteinanteil [8]. Molkenproteine, wie z.B. Antikörper gehören zum löslichen Milchproteinanteil [8]. Die Nebenbestandteile haben zusammen eine Konzentration von 1 - 1,5%. Zu ihnen gehören Salze, Citronensäure, Phospholipide, Sterine, Gase, Vitamine, Nichtproteinstickstoffverbindungen, Phosphorsäureester, Nukleinsäuren und Nukleotide sowie Enzyme [8]. Zu den Fremdstoffen zählen Pestizide, pharmakologisch wirksame Stoffe und Radionuklide [8]. Des Weiteren werden körpereigene Zellen der Kuh, sog. somatische Zellen vorgefunden. Sie bestehen aus 2% Epithelzellen und 98% Leukozyten [8].

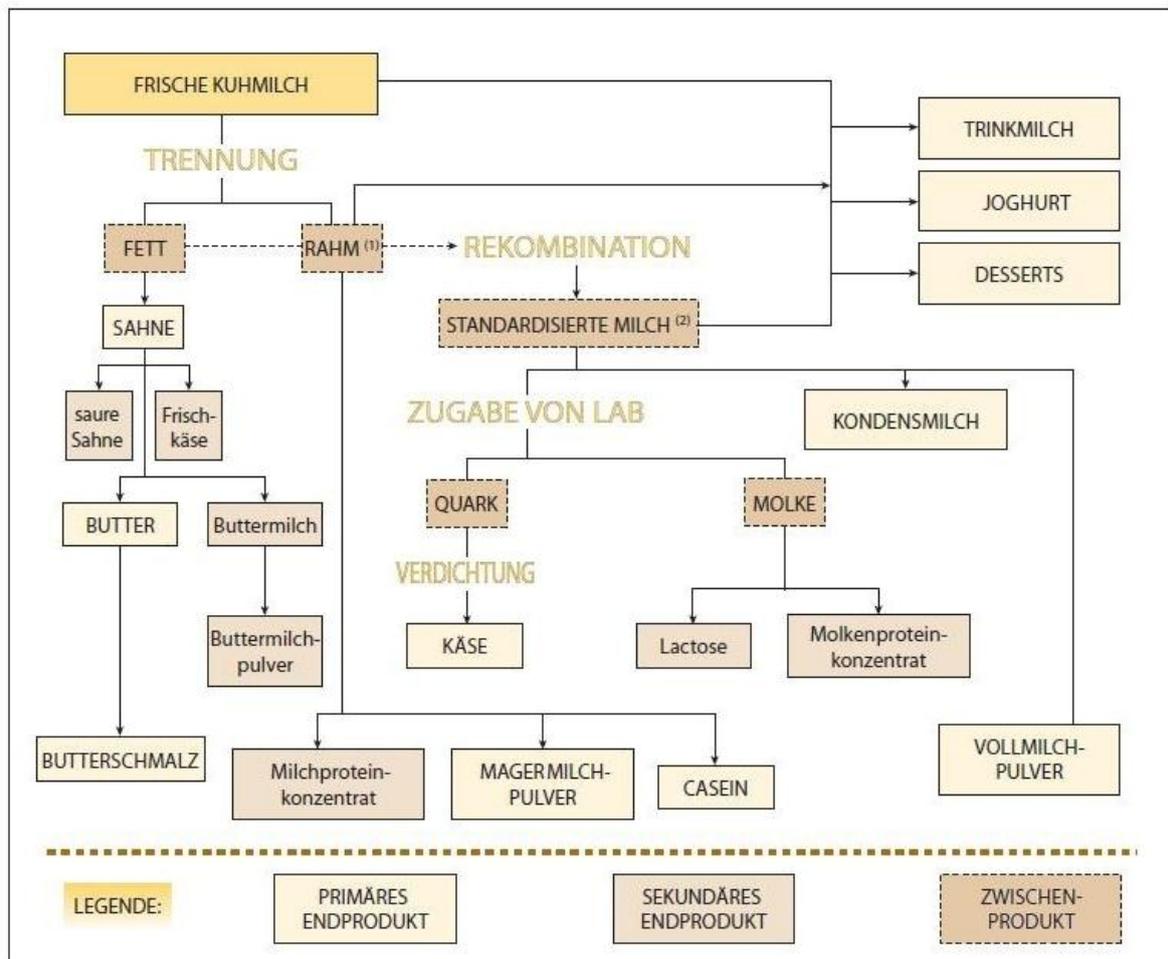
Die Milch stellt eine analytische Herausforderung dar, da diese Vielzahl von Matrixbestandteilen viele Methoden stören können [9]. Die Viskosität von Rohmilch, die mit 2,10 - 2,18 mPa·s ungefähr doppelt so hoch ist wie die von Wasser [8], stellt ebenso eine Schwierigkeit dar. Sie lässt sich jedoch über Temperatur, pH-Wert, Fettgehalt etc. verändern [8].

## **2.1.2 Milchverarbeitung und Qualitätskontrolle**

Milch wird meist mechanisch gemolken und über Schläuche in einen gekühlten Lagertank vor Ort gepumpt. Um eine Bakterienvermehrung zu vermeiden, wird die Milch so schnell wie möglich gekühlt und bei Temperaturen unter 6 °C gelagert. Die Zeitspanne zwischen dem Melken und dem Abtransport zur milchverarbeitenden Industrie dauert normalerweise zwischen 24 h und 48 h. Die Rohmilch wird in speziell gekühlten Milchtanklastern befördert oder in alpinen Regionen über Milchpipelines transportiert und gelangt so in die milchverarbeitende Industrie [6].

Nach der Anlieferung der Rohmilch wird in der milchverarbeitenden Industrie standardmäßig eine Eingangskontrolle durchgeführt. Diese beinhaltet die Bestimmung der relativen Dichte und des Gefrierpunkts, um Beimischung von z.B. Wasser auszuschließen. Die Milch wird auf Antibiotikarückstände getestet. Außerdem wird zur schnellen Bestimmung der bakteriologischen Qualität ein Methylenblau-Reduktasetest durchgeführt, der indirekt Aussagen über die Keimbelastung der Milch trifft. Dazu wird die Senkung des Redox-Potentials in der Milch gemessen, was sich durch Entfärbung des Methylenblaus äußert. Die somatischen Zellen werden qualitativ über den Schalmtest nachgewiesen. Zusätzlich wird der Lactose-, Gesamtprotein- und Fettgehalt durch einen automatischen Infrarottest bestimmt [6]. Dann wird die Rohmilch gereinigt, aufbereitet (z.B. nach unterschiedlichem Fettgehalt aufgetrennt) und thermisch behandelt (z.B. pasteurisiert, ultrahocherhitzt) [6]. Abschließend wird sie zu

Trinkmilch und vielerlei anderen Milcherzeugnissen weiterverarbeitet. Das nachfolgende Schema (Abbildung 2.2) zeigt eine Reihe von Milcherzeugnissen, die durch Weiterverarbeitung wie z.B. Trennung, Rekombination, Zugabe von Lab oder Verdichtung aus frischer Kuhmilch erzeugt werden können [10].



**Abbildung 2.2:** Erzeugnisse aus Kuhmilch [10] (modifiziert).

Als Zwischenprodukte sind Fett, Rahm, standardisierte Milch, Quark und Molke gezeigt, aus denen durch Weiterverarbeitung weitere primäre Endprodukte (Trinkmilch, Joghurt, Desserts, Sahne, Butter, Butterschmalz, Käse, Magermilchpulver, Casein, Kondensmilch und Vollmilchpulver) und sekundäre Endprodukte (saure Sahne, Frischkäse, Buttermilch, Buttermilchpulver, Milchproteinkonzentrat, Lactose und Molkenproteinkonzentrat) hergestellt werden können [10].

Milch ist ein gutes Wachstumsmedium für erwünschte und unerwünschte Mikroorganismen. Zu den erwünschten Bakterien zählen z.B. Milchsäurebakterien, die zur Herstellung von Sauermilch verwendet werden, zu den Unerwünschten gehören Verderbserreger, pathogene

Bakterien und aerobe sporenbildende Spezies [6, 11, 12]. Beim Verlassen des Euters enthält die Milch weniger als 1.000 Bakterien pro mL, jedoch begünstigt die Körpertemperatur von 37 °C das Bakterienwachstum während des Melkprozesses [6]. Pathogene Bakterien können direkt über die infizierte Kuh, aber auch indirekt von außen in die Milch gelangen, z.B. durch Kontamination des Melkzubehörs, der Ausstattung für die Verarbeitung oder durch die Milchlagerung, und so den Lebendanteil der Bakterien in der Rohmilch erhöhen [6, 13, 14]. Bei der Anlieferung zur milchverarbeitenden Industrie beträgt die Gesamtkeimzahl lebender Zellen bereits mehrere 10.000 - 10<sup>6</sup> CFU/mL [6]. Darin enthalten sind v.a. folgende Bakterien (Tabelle 2.1).

**Tabelle 2.1:** Bakterien in Milch und Milchprodukten [6].

Bakterien	Beispiele	Auswirkungen
Psychrotrophe Bakterien	<i>Pseudomonas</i> , <i>Flavobacterium</i> und <i>Alcaligenes sp.</i>	Vermehrung in der Milch während Kühlung, Produktion extrazellulärer Enzyme, Geschmacksveränderung und Stabilitätsprobleme
<i>Enterobacteriaceae</i>	<i>Escherichia</i> , <i>Enterobacter</i> , <i>Citrobacter</i> , <i>Klebsiella</i> , <i>Proteus</i> und <i>Serratia sp.</i>	Geruchs- und Geschmacksverschlechterung, Schleimbildung, Verfärbung
<i>Coliforme Keime</i>		Bei >100 CFU/mL starke Kontamination der Rohmilch aufgrund Bearbeitung oder verunreinigter Geräten
Sporenbildende Bakterien	<i>Bacillus</i> und <i>Clostridium sp.</i>	Hitzeresistente Sporen überleben Pasteurisieren, Problem in Frischmilchprodukten oder pasteurisierten Milchprodukten
<i>Clostridia</i>	<i>Clostridium tyrobutyricum</i> und andere	Problem in Hartkäse, Produktion von Gasen
Milchsäurebakterien	<i>Streptococcus sp.</i> , <i>Lactobacillus sp.</i> , <i>Leuconostoc sp.</i>	Schnelles Aussäuern bei unzureichend gekühlter Milch

Hefen und Schimmel haben eine geringere Bedeutung beim Verderb von Milch. Der Gehalt an somatischen Zellen (Körperzellen der Kuh) in der Milch beträgt bei gesunden Kühen 10<sup>5</sup> - 3·10<sup>5</sup> Z/mL. Die Grenzwerte liegen je nach Land bei einer Zahl von über 4·10<sup>5</sup> Z/mL bis über 8·10<sup>5</sup> Z/mL [6].

Generell muss die milchverarbeitende Industrie die Sicherheit der Lebensmittel garantieren. Dies wird durch einen präventiven Ansatz bewirkt, bei dem auf die Anwendung einer guten Hygienepraxis und die Grundsätze des HACCP-Konzepts (Risikoanalyse und kritische Kontrollpunkte, engl. *hazard analysis and critical control point*) geachtet wird [15].

**Tabelle 2.2:** Zusammenfassung der Lebensmittelkategorien, Mikroorganismen, Grenzwerte, analytischen Referenzmethoden und der Stufen, für welche die jeweiligen Kriterien gelten. Allgemein gilt für die Probenahme  $n = 5$ ,  $c = 2$  mit  $n =$  Anzahl der Probeneinheiten der Stichprobe,  $c =$  Anzahl der Probeneinheiten, deren Werte über  $m$  oder zwischen  $m$  und  $M$  liegen (Ausnahmen: (\*)  $n = 5$ ,  $c = 0$ , (\*\*)  $n = 10$ ,  $c = 0$ ) [15] (modifiziert).

Lebensmittelkategorie	Mikroorganismen	Grenzwerte		Analytische Referenzmethode	Stufe, für die das Kriterium gilt
		m	M		
Pasteurisierte Milch und sonstige pasteurisierte flüssige Milcherzeugnisse	<i>Enterobacteriaceae</i>	<1 CFU/mL	5 CFU/mL	ISO 21528-1	Ende des Herstellungsprozesses
Käse aus Milch oder Molke, die einer Wärmebehandlung unterzogen wurden	<i>E. coli</i>	100 CFU/g	1.000 CFU/g	ISO 16649-1 oder 2	Zu einem Zeitpunkt während der Herstellung, zu dem der höchste <i>E. coli</i> -Gehalt erwartet wird
Käse aus Rohmilch	Koagulase-positive Staphylokokken	10 <sup>4</sup> CFU/g	10 <sup>5</sup> CFU/g	EN/ISO 6888-2	Zu einem Zeitpunkt während der Herstellung zu dem der höchste Staphylokokkengehalt erwartet wird
Käse aus Milch, die einer Wärmebehandlung unterhalb der Pasteurisierungstemperatur unterzogen wurde, und gereifter Käse aus Milch oder Molke, die pasteurisiert oder einer Wärmebehandlung über der Pasteurisierungstemperatur unterzogen wurde	Koagulase-positive Staphylokokken	100 CFU/g	1.000 CFU/g	EN/ISO 6888-1 oder 2	
Nicht gereifter Weichkäse (Frischkäse) aus Milch oder Molke, die pasteurisiert oder einer Wärmebehandlung über der Pasteurisierungstemperatur unterzogen wurden	Koagulase-positive Staphylokokken	10 CFU/g	100 CFU/g	EN/ISO 6888-1 oder 2	Ende des Herstellungsprozesses
Butter und Sahne aus Rohmilch oder Milch, die einer Wärmebehandlung unterhalb der Pasteurisierungstemperatur unterzogen wurde	<i>E. coli</i>	10 CFU/g	100 CFU/g	ISO 16649-1 oder 2	Ende des Herstellungsprozesses
Milch- und Molkepulver	<i>Enterobacteriaceae</i> (*)		10 CFU/g	ISO 21528-1	Ende des Herstellungsprozesses
	Koagulase-positive Staphylokokken	10 CFU/g	100 CFU/g	EN/ISO 6888-1 oder 2	
Speiseeis und vergleichbare gefrorene Erzeugnisse auf Milchbasis	<i>Enterobacteriaceae</i>	10 CFU/g	100 CFU/g	ISO 21528-2	Ende des Herstellungsprozesses
Getrocknete Säuglingsanfangsnahrung und getrocknete diätetische Lebensmittel für besondere medizinische Zwecke, die für Säuglinge unter 6 Monaten bestimmt sind	<i>Enterobacteriaceae</i> (**)	In 10 g nicht nachweisbar		ISO 21528-1	Ende des Herstellungsprozesses

Die Grenzwerte in CFU oder KBE (koloniebildenden Einheiten, engl. *colony forming units*) pro mL oder g der Mikroorganismen für Milch und Milcherzeugnisse sind im Amtsblatt der Europäischen Kommission (VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005 DER KOMMISSION vom

15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel) festgelegt [15]. Tabelle 2.2 zeigt zusätzlich die analytischen Referenzmethoden und bei welchem Prozessschritt der Nachweis erbracht werden muss. Dieser erfolgt meist am Ende des Herstellungsprozesses oder zu einem Zeitpunkt während der Herstellung, an dem der höchste Bakteriengehalt erwartet wird. Für den Fall, dass unbefriedigende Ergebnisse erhalten werden, müssen Herstellungshygiene und Rohstoffauswahl verbessert sowie die Wärmebehandlung kontrolliert werden.

### **2.1.3 Beschreibung der Mikroorganismen und der Lebensmittelvergiftungen**

Die pathogene Flora von *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) wird durch die Pasteurisierung zerstört – nicht jedoch ihre hitzeresistenten Enterotoxine [16]. Auch hitzeresistente Sporen wie die von *Bacillus cereus* (*B. cereus*) überleben diesen Vorgang. *B. cereus* ist auch imstande, bei Kühlschranktemperaturen zu wachsen und stellt daher ein großes Problem in Produkten dar, die aus Frischmilch oder pasteurisierter Milch hergestellt werden [6]. Aufgrund ihrer Eigenschaften sind die beiden Mikroorganismen *S. aureus* und *B. cereus* wichtige pathogene Lebensmittelkeime, die nachfolgend näher beschrieben werden.

#### **2.1.3.1 *Staphylococcus aureus***

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) ist ein grampositives Kugelbakterium, das zur Familie der Micrococcaceae zählt. Bereits die berühmten Bakteriologen Robert Koch (1878) und Louis Pasteur (1880) beschäftigten sich mit Staphylokokken [17]. 1884 wurde von Rosenbach erstmals der gelb pigmentierte Kolonietyp *S. aureus* beschrieben und benannt [18]. Seinen Namen, der übersetzt „goldenes traubenförmiges Kugelbakterium“ bedeutet [19], erhielt es aufgrund seiner Gestalt, da seine Zellen wie die Beeren einer Traube angeordnet sind (Abbildung 2.3) [20]. Diese Anordnung entsteht durch unregelmäßige Zellteilung, die in verschiedenen Ebenen erfolgt [20]. Es ist fakultativ aerob, unbeweglich, katalasepositiv und besitzt einen Durchmesser von ca. 1 µm. Es bildet Cytochrome nur unter aeroben Bedingungen und ist relativ resistent gegen Austrocknung und hohe Salzkonzentrationen [17, 19, 20].

Die pathogene Wirkung von *S. aureus* wird u.a. durch das Protein A, den Fibrinogenrezeptor und die Koagulase bestimmt, die zu den Pathogenitätsfaktoren zählen. Fast alle Stämme besitzen das zellwandständige Protein A und werden als Protein A-positive *S. aureus*-Zellen bezeichnet. Es existieren jedoch auch Protein A-negative Stämme, die dieses

Oberflächenprotein nicht besitzen. *S. aureus* weist einen zellwandständigen Fibrinogenrezeptor auf, der zum Schnelldachweis (Ausfällen von Fibrin) genutzt wird. Das Fibrin wird ebenso durch das extrazelluläre Enzym Koagulase ausgefällt. So gibt es z.B. pathogene Koagulase-positive und weniger pathogene Koagulase-negative Staphylokokken [17].

*S. aureus* ist ein pathogenes Bakterium, das beim Menschen Hautinfektionen (z.B. Furunkel, Pickel, Impetigo), Lungenentzündung, Osteomyelitis (Knochenmarksentzündung), Meningitis (Hirnhautentzündung), Karditis (entzündliche Erkrankung des Herzens) und Arthritis (Gelenkentzündung) hervorruft [21]. Sein Toxin löst Lebensmittelvergiftungen aus und kann auch die Ursache für das toxische Schocksyndrom (TSS) sein. *S. aureus* zählt zu den „Krankenhauskeimen“ [19], die v.a. auf Intensivstationen schwere Infektionen verursachen [17]. Bekannter sind sie in diesem Zusammenhang unter den beiden Namen MRSA (methicillinresistente *S. aureus*) oder ORSA (oxacillinresistente *S. aureus*) [17]. Die Behandlung dieser Infektionen ist immer schwieriger geworden, da es bereits multiresistente Stämme gibt [22].

*S. aureus* wird auch als „Eitererreger“ bezeichnet, da es den Nasenraum besiedelt [19, 20]. Ca. 20% der Bevölkerung sind permanente und ca. 60% sind wiederkehrende Träger eines *S. aureus*-Stammes im Nasenraum [23].



**Abbildung 2.3:** *Staphylococcus aureus* [19].

Die Pathogenität von *S. aureus* zeigt sich auch bei Tieren, da dieses Bakterium verantwortlich für ungefähr 30 - 40% aller Mastitisfälle ist [24]. Es kann entweder bei einer klinischen oder subklinischen Mastitis direkt über das Euter oder durch Kontaminationen bei der Weiterverarbeitung der Rohmilch über die Umgebung in die Milch gelangen [25, 26]. Das hat schwere Konsequenzen für die Milchindustrie zur Folge [27].

*S. aureus* ist der häufigste Erreger bei Lebensmittelvergiftungen (siehe Tabelle 2.3). In Japan kam es im Jahr 2000 zu einem großflächigen Ausbruch durch kontaminierte Milchprodukte wie z.B. Magermilch und Trinkjoghurt, bei dem 13.420 Menschen betroffen waren. Der Hauptbestandteil dieser Produkte war kontaminiertes Magermilchpulver, das aus einer Fabrik in Hokkaido bezogen wurde [28]. In den USA kommt es jährlich zu geschätzten 185.000 Fällen von Nahrungsmittelvergiftungen durch Staphylokokken [29]. Einen Krankheitsausbruch durch kontaminierte Milkschokolade gab es z.B. 1985 in Kentucky [14]. In Deutschland waren in den Jahren 1993 - 1998 3,3% aller Lebensmittelvergiftungen auf *S. aureus* zurückzuführen. Im gleichen Zeitraum waren die Prozentzahlen in anderen Ländern höher: in der Schweiz waren es 5,1%, in Frankreich 13,5%, in Slowenien 18,4% und in Norwegen 29,9% [30]. Das Wachstum von *S. aureus* ist deutlich reduziert, wenn die Lebensmittel nach der Herstellung bzw. nach dem Öffnen kühl gelagert werden. Am häufigsten sind die Nahrungsmittel betroffen, wenn sie bei Raumtemperatur gelagert oder im Sommer zu Picknicks mitgenommen werden, da solche Bedingungen ein schnelles Wachstum von *S. aureus* sowie die Produktion von Enterotoxinen begünstigen [29].

**Tabelle 2.3:** Erregerhäufigkeit bei Lebensmittelvergiftungen [17].

Erreger bei einer Lebensmittelvergiftung	Häufigkeit [%]
<i>Staphylococcus aureus</i> Enterotoxin (A-E)	40
<i>Clostridium perfringens</i>	30
<i>Bacillus cereus</i>	10
<i>Clostridium botulinum</i>	<5
Mykotoxine ( <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Aspergillus ochraceus</i> , <i>Penicillium roqueforti</i> , <i>Fusarium</i> sp.)	<5

Die Bildung von Enterotoxinen begründet die Pathogenität von *S. aureus*. Die Toxine sind hitzestabil und können selbst nach dem Erhitzen aktiv bleiben [16]. Da die Toxine alleine die Krankheit auslösen, müssen lebende *S. aureus*-Keime nicht anwesend sein. *S. aureus*-Bakterien produzieren mindestens sieben miteinander verwandte Enterotoxine, die auch Superantigene genannt werden [29, 31]. Weitere Enterotoxine bzw. Enterotoxin-ähnliche Toxine wurden in den letzten Jahren veröffentlicht und ihre Gene beschrieben [31-38]. Meistens werden pro *S. aureus*-Keim ein bis zwei verschiedene Toxine hergestellt, manche Stämme produzieren keine Toxine. Eine Staphylokokken-Nahrungsmittelvergiftung wird jedoch durch jedes einzelne Toxin hervorgerufen. Das Staphylococcus Enterotoxin A (SEA) ist dabei am weitesten verbreitet [29]. Je nach Staphylokokken-Stamm können Enterotoxine

schon nach einer Inkubationszeit von 24 h bei 30 °C [39] oder nach 3 h bei günstigen Wachstumsbedingungen nachgewiesen werden [40]. Bei ca.  $10^6$  bis  $10^8$  CFU pro g Lebensmittel wird eine ausreichende Menge an Toxin produziert, sodass von einer Lebensmittelvergiftung ausgegangen werden kann [41]. In einem Fall in den USA reichten bei Schulkindern bereits weniger als 200 ng SEA aus, um an einer Gastroenteritis zu erkranken [42]. Lebensmittelvergiftungen durch Staphylokokken haben eine kurze Inkubationszeit von nur 1 - 2 Stunden. Die Symptome sind Fieber, Übelkeit, Erbrechen und Diarrhö [17]. 48 h nach Einsetzen der ersten Symptome verschwindet die manchmal sehr schwer verlaufende Krankheit von selbst [29].

Um diese Krankheitsausbrüche zu reduzieren und bestenfalls zu vermeiden, wurden gesetzliche Grenzwerte im Amtsblatt der Europäischen Kommission (VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005 DER KOMMISSION vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel) festgelegt [15]. Diese liegen z.B. für koagulasepositive Staphylokokken für Milch- und Molkepulver zwischen 10 und 100 CFU/g (siehe Tabelle 2.2). Für den Fall, dass am Ende des Herstellungsprozesses unbefriedigende Ergebnisse vorliegen, sind Verbesserungen der Herstellungshygiene nötig. Wenn Werte über  $10^5$  CFU/g auftreten, muss die Partie auf Staphylokokken-Enterotoxine untersucht werden [15].

### 2.1.3.2 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* (*B. cereus*) gehört zu den grampositiven, aeroben und fakultativ anaeroben Stäbchenbakterien, die im Boden vorkommen. Sie können neben der vegetativen Zellform eine zweite Zellform mit verminderter Stoffwechselaktivität ausbilden [43], die thermo-resistenten Bakteriensporen. Diese sind oval oder zylindrisch, nicht breiter als die Mutterzelle [20] und werden gebildet, um bei variablen Bedingungen (betreffend Nährstoffe, Temperaturen und Wasseraktivität) für längere Zeit im Erdboden zu überleben [29]. Bei diesem Prozess schrumpft die vegetative Zelle durch Wasserverlust auf ein Zehntel des ursprünglichen Volumens, so dass die Zellinhaltsstoffe konzentriert vorliegen und es wird um den Zellinhalt eine dicke mehrschichtige Hülle gebildet. Bei günstigeren Umweltbedingungen können sie sich wieder in die vegetative Form zurückverwandeln [43].

*B. cereus* wurde nach einer Lebensmittelvergiftung in einem Krankenhaus in Oslo 1949 erstmals als Pathogen erkannt, das durch Lebensmittel übertragen wird [44]. Da keine Meldepflicht besteht, ist es schwierig, die Häufigkeit der Krankheitsausbrüche durch *B. cereus* zu bestimmen [45]. Aus diesem Grund sind nur wenige Zahlen veröffentlicht. Allgemein wird jedoch angenommen, dass *B. cereus* der verantwortliche Erreger bei 10% aller Lebensmittelvergiftungen ist [17] (siehe Tabelle 2.3). In den Jahren 1993 - 1998

konnten in Deutschland 1,3% aller Lebensmittelvergiftungen auf *B. cereus* zurückgeführt werden. In Schweden waren es 11,6%, in den Niederlanden 11,9% und in Finnland 13,8% [30]. In Norwegen wurden in den Jahren 1993 - 1998 22,4% [30], 1999 und 2000 35% bzw. 32% aller Lebensmittelvergiftungen auf *B. cereus* zurückgeführt [46].

*B. cereus* gelangt bereits im Viehbetrieb in die Milch und es ist daher sehr schwierig, eine Kontamination der Milch komplett zu vermeiden. Der Boden, auf dem auch die Kühe liegen, enthält *B. cereus*-Sporen und stellt mit Dung vermischt ein gutes Wachstumsmedium dar, was als die Hauptkontaminationsquelle der Euter angesehen werden kann. Aus diesem Grund ist es sehr wichtig, die Euter vor dem Melken zu reinigen, um der Kontamination von Rohmilch entgegenzuwirken. Auch durch Transport und Lagerung können bereits in Tanks und Rohrleitungen vorhandene *B. cereus*-Sporen die Rohmilch verunreinigen [47]. Die Anwesenheit von Sporen in Rohmilch, deren hohe Resistenz gegenüber Pasteurisierungstemperaturen [48, 49] und die Eigenschaft seiner Sporen und vegetativen Zellen sich an Metalloberflächen anzuhaften [50, 51], macht *B. cereus* zu einem unwillkommenen, aber sehr häufigen Kontaminanten in Milchprodukten.

Es gibt zwei mögliche klinische Formen der Lebensmittelvergiftung durch *B. cereus*: Durchfall und Erbrechen. Durchfallerkrankungen werden durch drei verschiedene diarrhöische Enterotoxine hervorgerufen, Erbrechen durch ein emetisches Toxin [11]. Diarrhöische *B. cereus*-Stämme werden hauptsächlich in Fleisch-, Milch- und Fischprodukten vorgefunden. Sie sind noch bei Temperaturen unter 4 °C fähig, die Toxine zu bilden [45]. Die drei diarrhöischen Enterotoxine heißen Hämolyysin BL (Hbl), nicht-hämolytisches Enterotoxin (Nhe) und Cytotoxin K (CytK) [52]. Sie sind hitzelabil und werden nach der Nahrungsaufnahme im Dünndarm durch die vegetativen *B. cereus*-Bakterien produziert [53]. Die Lebensmittelvergiftung macht sich 6 - 15 h nach Verzehr der kontaminierten Speise durch Bauchkrämpfe und Durchfall bemerkbar, die dann etwa 24 h anhalten [45].

Das emetische Toxin (Cereulid) ist ein hitzestabiles niedermolekulares Protein, das in den Nahrungsmitteln produziert wird [45, 54]. Für die Lebensmittelvergiftung sind kontaminierte proteinreiche Lebensmittel verantwortlich wie Reis, Nudeln oder Kartoffeln. Emetische *B. cereus*-Stämme benötigen zur Toxinproduktion Temperaturen zwischen 12 - 15 °C [45]. Eine durch das emetische Toxin ausgelöste Lebensmittelvergiftung ähnelt jener, die durch Staphylokokken ausgelöst wird. Bereits 0,5 - 6 h nach Verzehr sind Übelkeit und Erbrechen zu beobachten, klingen aber bereits nach weniger als 24 h ab [45]. Es wird davon ausgegangen, dass ca.  $10^5$  bis  $10^8$  CFU pro g Lebensmittel notwendig sind, um eine ausreichende Menge an Toxin zu produzieren. Manchmal reichen jedoch auch geringere Keimzahlen aus [41]. Meistens verlaufen diese durch *B. cereus* hervorgerufenen Lebens-

mittelvergiftungen harmlos, jedoch wurde in den letzten Jahren immer häufiger von Krankheiten durch den emetischen Keim berichtet, bei denen Menschen auch zu Tode kamen [55, 56]. Dennoch wurde im Amtsblatt der Europäischen Kommission (VERORDNUNG (EG) Nr. 2073/2005 DER KOMMISSION vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel) für *B. cereus* kein Grenzwert definiert.

## 2.2 Detektion von Mikroorganismen

In diesem Kapitel wird zunächst die sehr zeit- und arbeitsintensive konventionelle mikrobiologische Anreicherung auf Nährmedien behandelt. Um die Qualität von Lebensmitteln hinsichtlich Bakterienkontaminationen zu gewährleisten, ist allerdings die Erforschung von schnellen und zuverlässigen Detektionsmethoden grundlegend. Deshalb liegt der Fokus auf den Schnellnachweismethoden, d.h. Verfahren in der Mikrobiologie, die weniger als einen Arbeitstag dauern. Es wird v.a. auf die Mikroarray-Detektion eingegangen, aber auch alternative schnelle Detektionsmethoden wie z.B. konventionelle biochemische Schnellnachweisverfahren, Durchflusszytometrie (FCM), Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und markierungsfreie Methoden werden vorgestellt.

### 2.2.1 Konventionelle mikrobiologische Anreicherung auf Nährmedien

Standardreferenzmethoden zur Detektion von Lebensmittelkeimen basieren in der Regel auf der Vermehrung, der sog. Anreicherung auf selektiven Kultivierungsmedien. Je nach Bakterienart dauert das Wachstum zwischen 48 h und mehreren Wochen [57]. Konventionelle mikrobiologische Methoden erfordern auch viele Arbeitsschritte im Labor, wie z.B. die Voranreicherung, selektive Anreicherung und Isolation der Kolonien, bevor eine spezifische Detektion oder Identifikation möglich ist [58].

Idealerweise liegen die Mikroorganismen in der Lebensmittelprobe homogen verteilt und räumlich voneinander getrennt vor. Man geht davon aus, dass jeder intakte Mikroorganismus eine Kolonie auf der Agarplatte ausbildet und sich sowohl Medium, Temperatur, Sauerstoffbedingungen als auch Inkubationszeit für ein Bakterienwachstum eignen. Die koloniebildenden Einheiten pro g oder mL werden durch Auszählen, dem Verdünnungsfaktor und dem Volumen bestimmt [59].

Die Anzahl der Mikroorganismen in der Originalprobe  $N$  lässt sich durch Gleichung 2.1 berechnen [60].

$$N = \frac{\sum C}{V_{\text{Platte}} \cdot 1,1 \cdot d} \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

N	Anzahl der koloniebildenden Einheiten (CFU/mL oder CFU/g)
$V_{\text{Platte}}$	ausplattiertes Probenvolumen in mL
d	Verdünnungsfaktor; d = 1 bei unverdünnter Probe
$\sum C$	Summe der Kolonien von zwei Platten zweier aufeinander folgender Verdünnungen, eine davon enthält mindestens 10 Kolonien

Die Anzahl zulässiger Kolonien pro Platte wurde bereits vor fast 100 Jahren durch Breed und Dotterrer festgelegt. Sie beschränkten die Anzahl der Kolonien pro Platte auf 30 - 400 für die Milchanalytik [61]. Später wurde der Bereich von Tomaszewicz *et al.* auf 25 - 250 eingeschränkt [62]. Für nichtselektive Platten wurde durch ISO 4833:2003 ein Bereich von 15 - 300 Zellen definiert [63] und 2007 in der ISO-Norm ISO 7218:2007(E) auf 10 Zellen herabgesetzt [60]. Ebenso wurde die Anzahl der Replikate der Platten von drei [61], auf zwei [63] und schließlich auf ein Replikat [60] reduziert. Da die Anzahl der Replikatplatten das Volumen und die Gesamtzellzahl beeinflusst, wird dadurch auch die Genauigkeit der Methode beeinflusst. Sehr hohe Variationen können z.B. auftreten, wenn das Wachstum von Kolonien das Wachstum anderer Kolonien hemmt und diese am Ende abgetötet werden [64]. Weitere Schwankungen treten beim Pipettieren auf, da Bakterienzellen an der Pipettenwand anhaften und bei kleineren Volumina die Effekte einen größeren Einfluss haben. Es hat sich ebenfalls herausgestellt, dass es beim Auszählen von Sporen Unterschiede gab, wenn sie vor der Inkubation im Brutschrank bei RT unterschiedliche lange inkubiert wurden [64].

Da die Kultivierung auf dem Wachstum und der Vermehrung von Bakterienzellen beruht, gibt es verschiedene Einschränkungen. Neben kultivierbaren Bakterien gibt es auch eine Anzahl unkultivierbarer Bakterien oder kultivbarer Bakterien, die sich in einem unkultivierbaren Zustand befinden. Sie werden als VBNC (engl. *viable but nonculturable*) bezeichnet und bilden keine Kolonien auf Platten oder wachsen nicht unter Standardbedingungen. In diesen Fällen müssen sie nach einem spezifischen Protokoll aktiviert werden [65, 66]. Weitere Einschränkungen hat die Methode, wenn nach Anreicherung durch Kultivierung eine PCR-Detektion durchgeführt werden soll, da verschiedene Kultivierungsmedien mit der Analysemethoden interferieren oder sogar inhibierende Effekte aufweisen [57].

## 2.2.2 Mikroarray-Detektion

Mikroarrays wurden Mitte der 1980er Jahre entwickelt [67, 68] und haben – wie auch die PCR-Detektion – ein sehr breites Anwendungsgebiet, das immer weiter ausgedehnt wird [69]. Sie werden u.a. auf beschichteten Glas- oder Kunststoffträgern durchgeführt und

erlauben Multiplex-Messungen sowie eine Automatisierung. Durch die Miniaturisierung kann der Reagenzverbrauch deutlich reduziert werden [70]. Generell wird zur Detektion von Bakterien zwischen Antikörper-, DNA (Desoxyribonukleinsäure)- und Zell-Mikroarrays unterschieden. [69]. Der Name richtet sich jeweils nach dem Fängerliganden, der auf dem Träger immobilisiert ist.

Zur Herstellung von Mikroarray-Chips bedient man sich der Mikroarray-Technologie. Um einen Mikroarray für eine Messung am automatischen Auslesegerät MCR3 (Munich Chip Reader der 3. Generation) zu erhalten, werden die selektiven Fängerliganden durch sog. Spots an definierten Positionen auf einem beschichteten Trägermaterial immobilisiert. Für die Fertigung eines einsatzfähigen Mikroarray-Chips werden weitere Schritte benötigt: Zunächst wird die Oberfläche des Mikroarrays blockiert. Anschließend wird der Mikroarray über eine doppelseitige Klebefolie auf den Plastikträger geklebt, so dass man zwei Mikrofluidikkanäle erhält. So vorbereitet kann der Mikroarray-Chip im Auslesegerät fixiert werden.

### **2.2.2.1 Antikörper-Mikroarrays als Schnellnachweisverfahren**

Die in dieser Arbeit verwendete Mikroarray-Detektion basiert auf dem ELISA-Testformat, dem „*enzyme-linked immunosorbent assay*“, einer Form des Immunoassays, bei der ein Reaktionspartner an einer festen Phase gebunden ist und das Signal durch ein Enzym generiert wird. Da sowohl an fester und flüssiger Phase gearbeitet wird, bezeichnet man sie auch als heterogene Enzym-Immunoassays (EIAs) oder „*solid-phase immunoassays*“ (SPI). Diese Techniken haben die Antigen- und Antikörper-Detektion vereinfacht und sind die Basis vieler moderner Tests in der Diagnostik, Lebensmittelanalytik, Umweltanalytik und anderen analytischen Disziplinen [71].

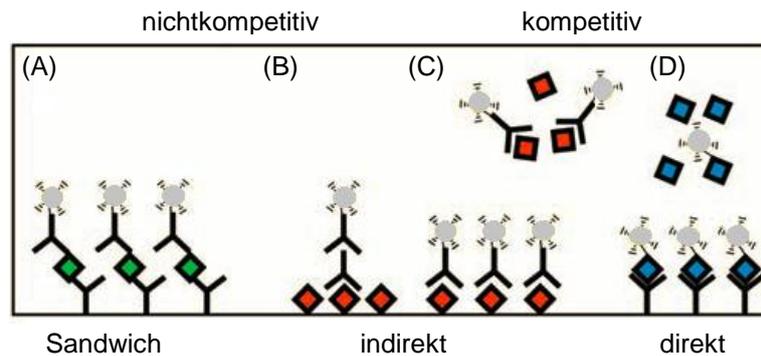
#### **2.2.2.1.1 Testformate und Reagenzien**

Mikroarrays können in einer Vielzahl von Testformaten durchgeführt werden, wie z.B. der direkte oder indirekte Assay oder der Sandwich-Assay (Abbildung 2.4). Zusätzlich dazu wird noch zwischen kompetitiven und nichtkompetitiven Testformaten unterschieden. Bei kompetitiven Testformaten wird ein Analytderivat zugesetzt, das mit dem Analyt um die Antikörperbindungsstellen konkurriert. Beim nichtkompetitiven Testformat wird der Immunkomplex direkt an der Oberfläche detektiert [72].

Beim direkt kompetitiven Assay (Abbildung 2.4, (D)) sind die Antikörper auf dem Träger immobilisiert. Die Analyten werden mit einer bekannten Anzahl an markierten Analytderivaten gemischt und konkurrieren mit den markierten Analytderivaten um den Platz

an limitierten Antikörper-Bindungsplätze. Bei diesem Testformat wird die Analytkonzentration dann indirekt über die Anzahl an gebundenen markierten Analytderivaten bestimmt [72].

Beim indirekt kompetitiven Assay (Abbildung 2.4, (C)) sind die Analytderivate auf dem Träger immobilisiert und die Analyten konkurrieren mit den immobilisierten Analytderivaten um den Platz an limitierten markierten Antikörpern [72].



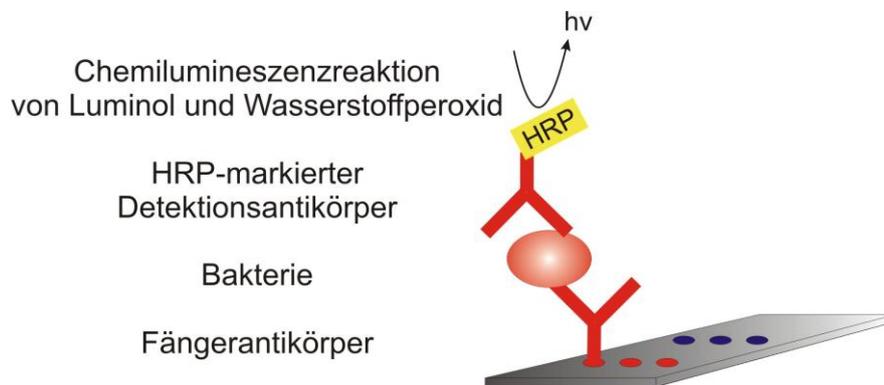
**Abbildung 2.4:** Testformate: (A) Sandwich-Immunoassay, (B) indirekt nichtkompetitiver Immunoassay, (C) indirekt kompetitiver Immunoassay, (D) direkt kompetitiver Immunoassay [72] (modifiziert).

Für den Nachweis von Antibiotika in Milch bzw. Honig am MCR3 wurde das indirekt kompetitive Testformat gewählt. Dazu wurden Antibiotikaderivate auf dem Träger immobilisiert. Die Antibiotikarückstände in der Probe konkurrierten dabei mit den immobilisierten Antibiotikaderivaten um die Anzahl an freien Primärantikörpern. Man verwendete bei diesem Assay unmarkierte Primärantikörper und HRP-markierte Sekundärantikörper, die an den Primärantikörpern gebunden haben [73-75].

Im Sandwich-Assay sind die Antikörper (Fängerantikörper) auf dem Träger immobilisiert und im Überschuss vorhanden (Abbildung 2.4 (A)). Der Analyt bindet an die Antikörper und die Anzahl an gebundenem Analyt wird mit Hilfe eines zweiten, markierten Antikörpers (Detektionsantikörper) bestimmt. Daraus resultiert ein Sandwich-Komplex, in dem der Analyt zwischen den beiden Antikörpern gebunden ist. Dieses Format ist besser geeignet für größere Analytmoleküle wie z.B. Bakterien, da diese mehrere Epitope besitzen und zur Ausbildung dieses Komplexes mindestens zwei Bindungsstellen benötigt werden [76]. Der Einsatz des Sandwich-Formats zur Quantifizierung von Mikroorganismen ist bereits etabliert und veröffentlicht [77-79].

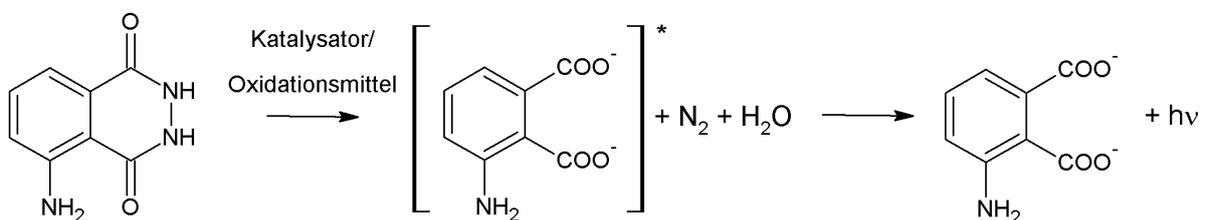
Unabhängig vom Testformat werden zur Markierung der Antikörper meist Enzyme verwendet. Sie können jedoch auch mit Radioisotopen, Fluorophoren, Luminophoren, Mikro- oder Nanopartikeln markiert sein [76]. Mindestens 15 verschiedene Enzyme sind für

Immunoassays im Einsatz, wobei drei davon am häufigsten im Gebrauch sind: Meerrettichperoxidase (HRP), alkalische Phosphatase (AP) und  $\beta$ -Galaktosidase ( $\beta$ gal) [71]. HRP ist das gängigste Enzym, da es sehr klein ist und es so zu keiner sterischen Hinderung mit anderen Molekülen kommt. Außerdem kann es leicht konjugiert werden, ist kostengünstig und weist eine schnelle Kinetik auf [71]. In dieser Arbeit wird das Antikörper-HRP-Konjugat zur Katalyse der Chemilumineszenzreaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid ( $H_2O_2$ ) eingesetzt. Die Kombination aller Bestandteile des in dieser Arbeit verwendeten Sandwich-Immunoassays ist in der nächsten Abbildung gezeigt (Abbildung 2.5).



**Abbildung 2.5:** Schematische Abbildung des Antikörper-Mikroarrays nach dem Testformat eines Sandwich-Immunoassays.

Der an der modifizierten Glasobjektträgeroberfläche immobilisierte Fängerantikörper bindet die Antigenstruktur der Bakterie. Diese wiederum bindet den HRP-markierten Detektionsantikörper an einer weiteren Antigenstruktur. Die Meerrettichperoxidase katalysiert schließlich die Chemilumineszenzreaktion, bei der Luminol mit  $H_2O_2$  oxidiert wird (Abbildung 2.6).

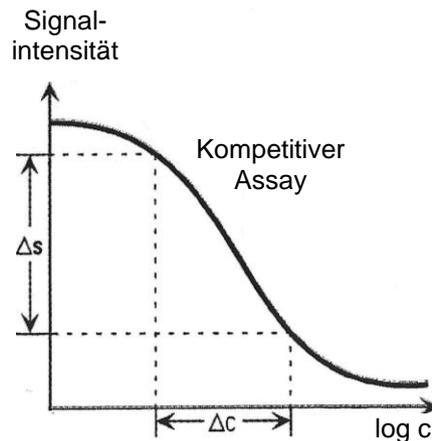


**Abbildung 2.6:** Chemilumineszenzreaktion von Luminol [80].

Das entstandene Aminophthalation befindet sich im angeregten Zustand, das bei der Rückkehr in den Grundzustand Licht bei einer Wellenlänge von 425 nm emittiert. Dieses wird mit Hilfe einer CCD-Kamera (engl. *charged coupled device*) aufgenommen.

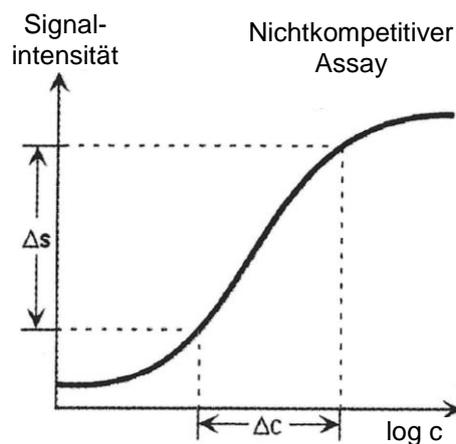
### 2.2.2.1.2 Sigmoidale Kurvenverläufe

Für den kompetitiven Immunoassay ist der sigmoidale Kurvenverlauf in halblogarithmischer Auftragung gezeigt (Abbildung 2.7). Die Signalintensität ist invers proportional zur Probenkonzentration. Für sehr hohe und sehr niedrige Probenkonzentrationen flacht die Kurve ab und eine quantitative Analyse ist nicht mehr möglich [76].



**Abbildung 2.7:** Sigmoidaler Kurvenverlauf eines kompetitiven Immunoassays [76].

Der sigmoidale Kurvenverlauf des Sandwich-Immunoassays ist in Abbildung 2.8 gezeigt. Der Kurvenverlauf ergibt sich durch halblogarithmisches Auftragen der relativen Signalintensitäten gegen die Probenkonzentrationen. Das Signal ist proportional zur Probenkonzentration. Auch hier flacht der Kurvenverlauf für hohe und niedrige Konzentrationen ab.



**Abbildung 2.8:** Sigmoidaler Kurvenverlauf eines Sandwich-Immunoassays bzw. nichtkompetitiven Immunoassays [76].

Die Funktion für den sigmoidalen Kurvenverlauf eines kompetitiven als auch eines nicht-kompetitiven Immunoassays lässt sich durch das *4-parameter logistic* (4-PL) Modell (Gleichung 2.2) beschreiben [81]:

$$Y = \frac{(A-D)}{1 + \left(\frac{X}{C}\right)^B} + D \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

X	Probenkonzentration
Y	relative Signalintensität
A	Signalintensität bei $X \rightarrow 0$
B	Steigung am Testmittelpunkt
C	Testmittelpunkt
D	Signalintensität bei $X \rightarrow \infty$

Die Probenkonzentration lässt sich durch Auflösen der Gleichung nach X ermitteln. Für  $A > D$  fällt die Kurve bei zunehmender Konzentration ab, für  $A < D$  steigt sie an. Letzterer Fall beschreibt demnach den sigmoidalen Kurvenverlauf für den Sandwich-Immunoassay mit A als untere Asymptote und D als obere Asymptote [81]. Die untere Asymptote befindet sich am Hintergrundsignal, die obere Asymptote an der maximalen Signalintensität [81], die durch die maximale Belegung am Spot limitiert ist.

Die Daten können auch doppellogarithmisch durch den linearen Bereich aufgetragen werden [78, 81]. Die Gleichung wird dann wie folgt beschrieben (Gleichung 2.3) [81]:

$$\log(Y) = A + B \cdot \log(X) \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

X	Probenkonzentration
Y	relative Signalintensität
A	Achsenabschnitt
B	Steigung

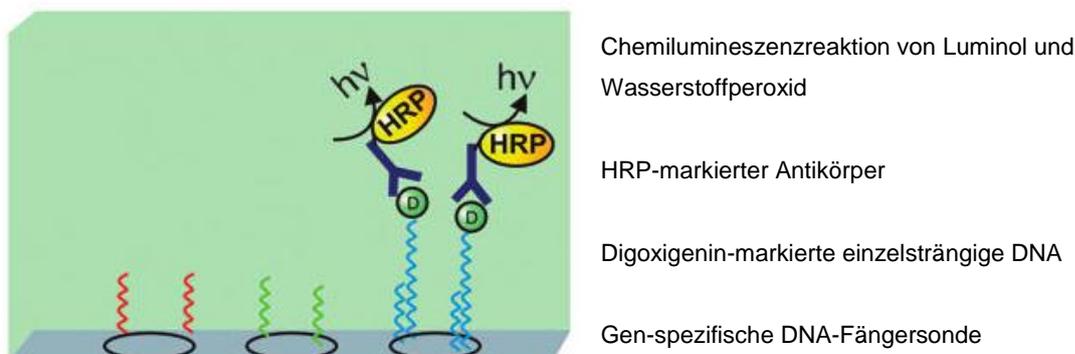
Die größten Abweichungen von der linearen Regression befinden sich dann an den Enden des Assaybereichs [81]. Wie gut die Regressionsgerade zu den gemessenen Werte passt, wird durch das Bestimmtheitsmaß  $R^2$  angezeigt. Der Wert liegt zwischen 0 und 1 und fällt umso höher aus, je enger die Werte um die ermittelte Regressionsgerade liegen [82].

### 2.2.2.2 DNA-Mikroarray

DNA-Mikroarrays verwenden einzelsträngige DNA, sog. DNA-Sonden, die auf dem Mikroarray-Chip immobilisiert sind. Da komplementäre DNA-Stränge Doppelhelices ausbilden, wird diese Eigenschaft ausgenutzt, um die komplementären Nukleinsäuren der Probe zu binden (Hybridisierung). Über eine Markierung des Probenmoleküls, z.B. mit einem

Fluoreszenzmolekül [83] oder HRP [84], kann nachverfolgt werden, wo die Hybridisierung abgelaufen ist. Da man bei der PCR keine Enzym-markierten Primer verwenden kann, setzt man stattdessen kleine Moleküle wie z.B. Digoxigenin zur Markierung der Primer ein. Die generierte Digoxigenin-markierte einzelsträngige DNA wird schließlich im DNA-Mikroarray über HRP-markierte Antikörper gegen Digoxigenin detektiert [84].

Die DNA-Mikroarray-Technik wird zur Analyse von verschiedenen pathogenen Mikroorganismen verwendet [84-87]. Donhauser *et al.* beschrieben einen DNA-Mikroarray Assay zur schnellen und sensitiven Quantifizierung der pathogenen Bakterien *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enterica*, und *Campylobacter jejuni* in Wasser [86]. Dazu wurde die stopped-PCR Strategie verwendet, d.h. die Amplifikation wurde während der logarithmischen Phase abgebrochen [84]. Die Anzahl an amplifizierter Ziel-DNA war dabei direkt von der verwendeten Zellkonzentration abhängig. Die anschließende Erzeugung einzelsträngiger DNA-Sequenzen erfolgte über Streptavidin-konjugierte magnetische Nanopartikel. In der PCR wurden beide Einzelstränge jeweils unterschiedlich markiert. Man verwendete einen Biotin-markierten *reverse*-Primer für den abzutrennenden Einzelstrang und einen *forward*-Primer mit Digoxigenin-Markierung für den Einzelstrang zur CL-Mikroarray Messung [86]. Der DNA-Mikroarray sah wie folgt aus (Abbildung 2.9).



**Abbildung 2.9:** DNA-Mikroarray [86].

Die Digoxigenin-markierte einzelsträngige DNA wurde durch immobilisierte Gen-spezifische DNA-Fängersonden abgefangen. Diese wurde mit Hilfe eines HRP-markierten Antikörpers gegen Digoxigenin erkannt. Die HRP katalysierte die Chemilumineszenzreaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid und das CL-Signal wurde aufgenommen [86].

### 2.2.2.3 Automatische Auslesesysteme

Am Institut für Wasserchemie sind zwei verschiedene automatische Auslesesysteme im Einsatz: der Immunomat und der MCR3 (Munich Chip Reader der 3. Generation).

Der Immunomat wurde vor über zehn Jahren am Institut für Wasserchemie entwickelt und ist ein computergesteuertes Mikroarray-Durchlaufsystem mit Chemilumineszenz-Auslesung. Mit dem Auslesegerät wurden eine Reihe von Publikationen zur Detektion von Mikroorganismen (*Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* und *Legionella pneumophila*) in Wasser und Bioaerosolen veröffentlicht [77-79].

Der MCR3, ebenso ein computergesteuertes Mikroarray-Durchlaufsystem mit Chemilumineszenz-Auslesung, wurde zunächst für die Detektion 13 verschiedener Antibiotika in Milch entwickelt [73, 74] und fand auch bereits Einsatz bei der Detektion von vier Antibiotikarückständen in Honig [75]. Für das Projekt *PATH2OGENSCAN* wurde der MCR3 für die DNA-Mikroarray-Analyse weiterentwickelt. Dazu wurde von GWK Präzisionstechnik GmbH in die neueste Generation des MCR3, des MCR3 SLT (SL: engl. *sample loop*, T: engl. *temperature*), eine Temperatursteuerung der Flusszelle eingebaut, mit der das Reaktionsverhalten zwischen 5 - 65 °C beeinflusst werden kann.

Zurzeit wird am Institut für Wasserchemie am MCR3 gleichzeitig an fünf verschiedenen Themen geforscht, da das System ein sehr breites Anwendungsgebiet verspricht. Eines der fünf Themen ist die Detektion von drei Toxinen (Okadasäure, Domoinsäure und Saxitoxin) aus Meereslebewesen sowie der Nachweis der Toxine Rizin und Staphylococcus Enterotoxin B (SEB). Weitere Anwendungen des MCR3 sind die Detektion von Zoonoseantikörpern in Schweineseren (z.B. IgG Antikörper gegen Hepatitis E Virus) oder die Quantifizierung von Viren (MS2, PhiX174, Adenovirus und Norovirus) mittels MCR3 SLT in Wasser. Des Weiteren wird an der Detektion von Mykotoxinen in Lebensmitteln geforscht. Das fünfte Anwendungsgebiet ist die in dieser Arbeit vorgestellte Detektion von Mikroorganismen (*S. aureus*-Zellen und *B. cereus*-Sporen) in Milch.

## 2.2.3 Weitere Schnelldachweisverfahren

### 2.2.3.1 Konventionelle biochemische Schnelldachweisverfahren

Zum Schnelldachweis von *S. aureus* im Labor wird häufig der Verklumpungsfaktor (engl. *clumping factor*) ausgenutzt. Dabei bildet *S. aureus* in Anwesenheit von Blutserum Verklumpungen [17]. Das im Serum enthaltene Fibrinogen ist hauptsächlich daran beteiligt, ein 340 kDa großes Dimerprotein mit drei Polypeptidketten ( $\alpha$ ,  $\beta$  und  $\gamma$ ) [88]. Es hat eine sehr starke Affinität zum Fibrinogenrezeptor auf der Zelloberfläche von *S. aureus* ( $K_d = 9,9 \cdot 10^{-9}$  M) [89]. Das Verklumpen wird auf eine Vernetzung des Fibrinogendimers mit den *S. aureus*-Zellen zurückgeführt und erfolgt selbst bei kleinen Fibrinogenkonzentrationen [88, 90].

Biochemische Schnelldachweise zur Identifikation von Bakterien und eine Weiterentwicklung der bunten Reihe sind *Analytical Profile Index* (API) Systeme (z.B. von bioMérieux) [91]. Sie

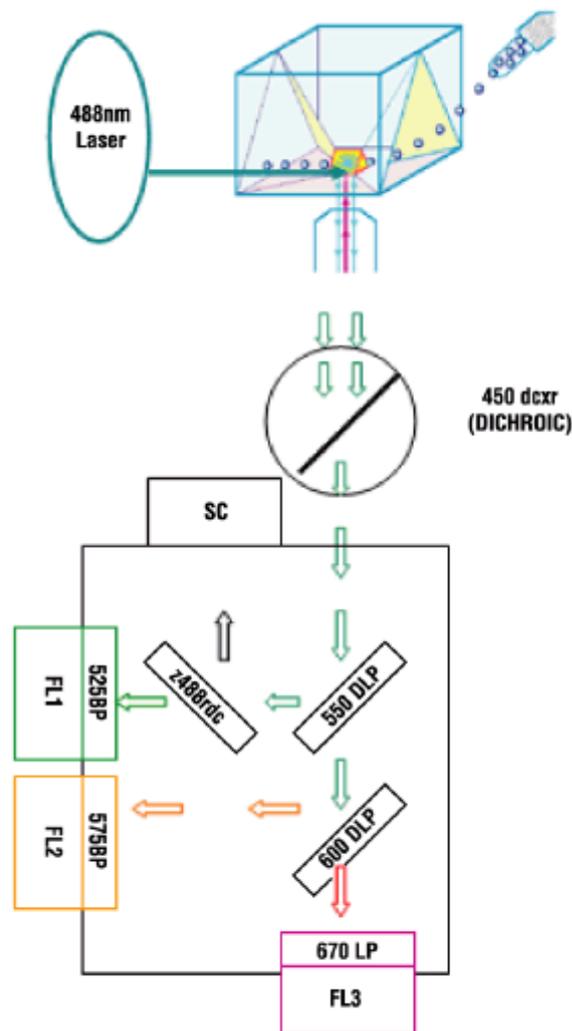
sind als standardisierte und miniaturisierte Version einfach durchzuführen und abzulesen. Durch die Testsysteme API 50 CH bzw. API Staph lassen sich verschiedene *Bacillus*-Arten bzw. Staphylokokken aufgrund ihres Kohlenhydrat-Abbaus innerhalb von 48 h bzw. 18 - 24 h identifizieren.

### **2.2.3.2 Durchflusszytometrie (FCM)**

Die Durchflusszytometrie (engl. *flow cytometry*, FCM) ist eine Detektionsmethode, bei der physikalische oder chemische Charakteristika von einzelnen Zellen oder biologischen und nichtbiologischen Partikeln der selben Größenordnung gemessen werden können [92]. Sie wurde vor über 30 Jahren in der medizinischen Forschung und Routineanalyse z.B. von Blutkrebs etabliert und erlangte in den letzten 20 Jahren immer größer werdende Beliebtheit im Bereich der Wassermikrobiologie [93]. Nicht nur Bakterien, sondern auch Hefezellen [94], Algen [95], Parasiten wie *Cryptosporidium* und *Giardia* [96] und Viren [97] können nachgewiesen werden.

Wichtige Vorteile der Durchflusszytometrie sind, dass sie mit ca. 3 min pro Probe sehr schnell durchzuführen und mit einem Fehler von weniger als 5% sehr genau ist [93]. Außerdem ist sie sehr sensitiv mit einer Nachweisgrenze von ca. 100 Z/mL und vergleichbar mit anderen Färbe- und Markierungsmethoden [93]. Da sie eine Einzelzell-Methode ist, können allerdings keine komplexeren Makropartikelanalysen durchgeführt werden [93]. Die Messergebnisse sind auch abhängig vom Zytometer-Hersteller, der Wassermatrix, der Probe oder der Anfärbemethode. Die Messung muss frei von Partikeln sein [93] und auch eine hohe Salzkonzentration kann die Zellphysiologie von Bakterien und die Lichtstreuung beeinflussen [98].

Die Zellen oder Partikel werden bei der durchflusszytometrischen Messung mit Hilfe eines Hüllstroms in einem laminaren Fluss durch das System befördert. So gelangen sie zur Messzelle, die durch ihre triangulare Geometrie große hydrodynamische Kräfte erzeugt, so dass die Probe mittig und der Reihe nach getrennt die Messzelle durchfließt [99] (Abbildung 2.10).



**Abbildung 2.10:** Schematischer Aufbau des Durchflusszytometers *Cell Lab Quanta™ SC* von Beckman Coulter mit Laseranregung [99] (modifiziert): dichroitischer Spiegel (450 dcr (DICHROIC)), Streulicht (SC), Fluoreszenzdetektoren (FL1-FL3), Dichroitischer *Longpass*-Filter (DLP), Laser-Strahlteiler (z488rdc) *Longpass*-Filter (LP), *Bandpass*-Filter (BP).

Mit Hilfe der FCM mit dem Gerät *Cell Lab Quanta™ SC* von Beckman Coulter können Messungen des „elektronischen Volumens“ oder optische Messungen wie Streuung oder Fluoreszenz durchgeführt werden [99].

Über das „elektronische Volumen“ kann die Größe der Probe gemessen werden. Bei dieser Messung durchfließt die Probe in einer leitenden Hüllflüssigkeit zwei voneinander getrennte Elektroden an der Messzelle [99]. Ein schwacher Strom fließt dazwischen solange, bis eine Zelle oder ein Partikel durch die Messzelle kommt und so den Widerstand erhöht. Diese Änderung erzeugt einen Spannungsimpuls, der direkt proportional zum Volumen der Zelle oder des Partikels ist [99]. Dieses sog. Coulter-Prinzip [100], ist eine anerkannte Referenzmethode zum Zählen und zur Größenbestimmung von Zellen und Partikeln, da die Messung weder durch die Farbe der Probe, noch durch den Brechungsindex gestört wird [99].

Bei einer optischen Messung wie der Seitwärtsstreuung wird ein Laser verwendet, der an der Probe im rechten Winkel zum Einstrahlwinkel abgelenkt und mit einem Detektor gemessen wird. Dieser generiert einen Spannungsimpuls proportional zum gestreuten Licht, der die Granularität verschiedener Proben unterscheiden lässt [99]. Bei der Vorwärtsstreuung wird das Laserlicht an der Oberfläche abgelenkt und gibt somit Aufschluss auf die Größe einer Zelle. Allerdings beeinflusst hier der Brechungsindex das Ergebnis [92].

Bei der Fluoreszenzmessung regt eine Lampe oder ein Laser den Fluoreszenzfarbstoff der markierten Probe an. Das langwellige emittierte Licht wird an einem dichroitischen Spiegel reflektiert und über verschiedene Filter zu den drei Photomultipliern (FL1, FL2 und FL3) weitergeleitet, die Spannungsimpulse proportional zur Fluoreszenz generieren. Ein *Longpass*-Filter (LP) ist durchgängig für Licht oberhalb einer bestimmten Wellenlänge, ein *Shortpass*-Filter (SP) lässt nur Licht unterhalb einer bestimmten Wellenlänge durch. Bei einem *Bandpass*-Filter (BP) wird ein kleiner Bereich der Wellenlänge durchgelassen [99].

Die Fluoreszenzmessung eröffnet eine Vielzahl von Detektionsmöglichkeiten. So kann der DNA- und RNA-Gehalt in Bakterienzellen gemessen werden. DNA kann z.B. mit Hoechst 33342 [92], PicoGreen [101] und 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) [102] angefärbt werden, wohingegen RNA mit Pyronin Y angefärbt wird [92]. Zur Bestimmung der Gesamtzellzahl werden ebenfalls Fluoreszenzfarbstoffe wie z.B. SYBR Green II, SYTO 9 oder DAPI [103, 104] zur Anfärbung von Bakterien-DNA oder anderen typischen Zellkomponenten ausgenutzt. Im Messbild werden nichtfluoreszierende Hintergrundpartikel visuell abgetrennt. Es gibt zwei Auftragsarten: das Histogramm und das Dot-Plot-Diagramm. Das Histogramm ist eine eindimensionale Darstellung, bei der ein Messwert gegen die Häufigkeit der Zellen aufgetragen wird. Das Dot-Plot-Diagramm ist eine zweidimensionale Darstellung, bei der die Signalintensitäten zueinander in Punktwolken aufgetragen werden [105].

Mit dem Durchflusszytometer ist es auch möglich, unabhängig von der Bakterienkultivierung auf Nährmedium, unkultivierbare Bakterien oder kultivierbare Bakterien, die sich in einem unkultivierbaren Zustand befinden, zu messen [106]. Mit einem BacLight Life/Dead Kit lassen sich lebend/tot-Unterscheidungen von Bakterien durchführen [107]. Es besteht aus zwei verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen: SYTO 9 und Propidiumiodid (PI). SYTO 9 ist membrandurchgängig, d.h. es interkaliert sowohl in die DNA lebender als auch toter Bakterien. PI dagegen färbt nur die DNA von Bakterien an, deren Membran nicht mehr intakt ist. Da beide Farbstoffe bei gleicher Wellenlänge angeregt werden (488 nm), jedoch bei unterschiedlicher Wellenlänge emittieren (520 nm für SYTO 9, 630 nm für PI), kann so differenziert werden [107].

Um Bakteriengruppen oder -spezies spezifisch zu unterscheiden, werden Moleküle benötigt, die sowohl mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert sind, als auch an die Bakterien binden.

Ein Beispiel ist der in dieser Dissertation verwendete Antikörper anti-*S. aureus* mit Tandem-Markierung Phycoerythrin-Cy5 (PE-Cy5) zur Quantifizierung von *S. aureus* [108]. Das Tandem-Konjugat wird bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt und hat ein Emissionsmaximum bei 660 nm, da PE Energie an Cy5 abgibt [92]. Es wurde in einer Doppelmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTO 9 verwendet und so in einem Dot-Plot-Diagramm aufgetragen.

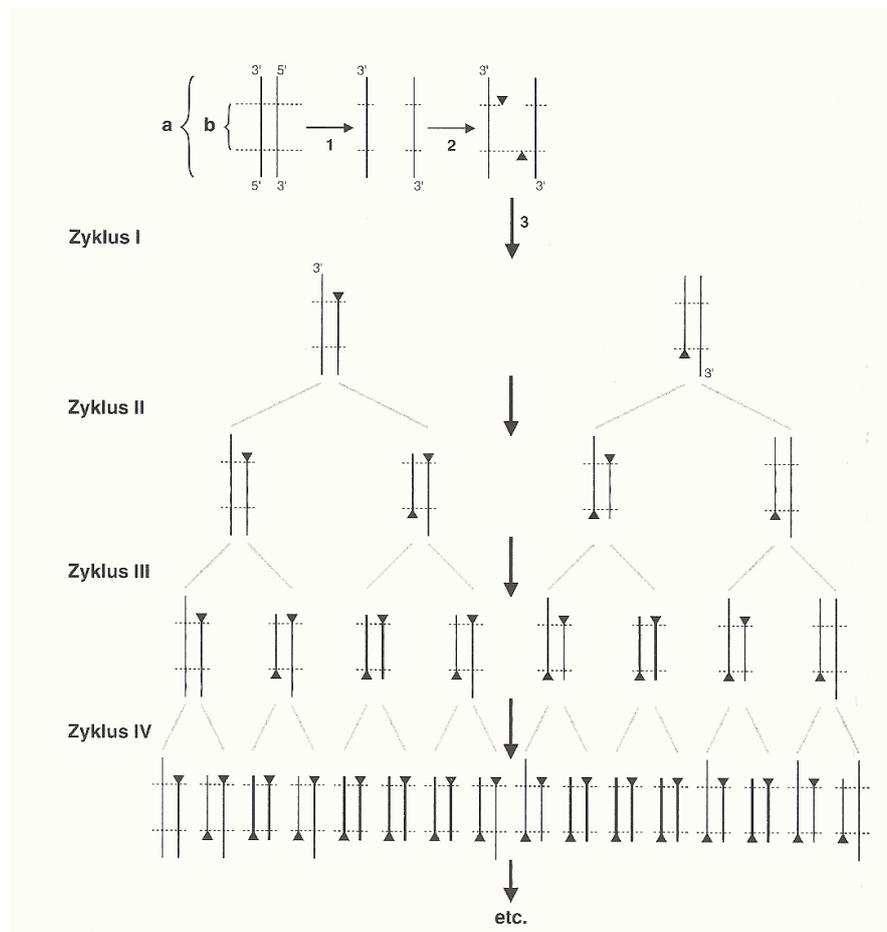
### 2.2.3.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine Methode, durch welche die DNA aus kleinsten Mengen vermehrt werden kann. Sie wurde bereits 1986 durch Kary Mullis veröffentlicht, für deren Entwicklung er 1993 den Chemie-Nobelpreis erhielt [43, 109]. Für die Durchführung einer PCR müssen die Endsequenzen der DNA bekannt sein, so dass sich dort nach der Trennung der Einzelstränge Primer anlagern können. Diese sind komplementäre, einzelsträngige und synthetisch hergestellte DNA-Endstücke, die bei der PCR-Reaktion im Überschuss vorhanden sind [43]. Sie sind mit der DNA-Polymerase und zusätzlichen Desoxynukleotidtriphosphaten in der Lage, zu den DNA-Einzelsträngen komplementäre DNA-Einzelstränge zu erzeugen. Die DNA-Polymerase, ein temperaturbeständiges Enzym aus dem Bakterium *Thermus aquaticus*, nimmt die Rolle des Katalysators ein [43].

Die Abfolge einer PCR verläuft wie folgt (Abbildung 2.11): Zunächst wird das DNA-Doppelstrangfragment (a) durch Denaturierung bei 95 °C (1) aufgeschmolzen, so dass zwei Einzelstränge entstehen. Nach Abkühlen lagern sich die beiden Primer (dargestellt als schwarze Dreiecke) an den komplementären Stellen an (2) und es wird zu jedem DNA-Einzelstrang ein komplementärer DNA-Strang (b) amplifiziert (3). Dies wird bis zu 50 Zyklen lang wiederholt, so dass nach jedem Zyklus die DNA-Einzelstränge in doppelter Anzahl vorhanden sind. Ab Zyklus III tauchen DNA-Doppelstränge mit der gewünschten Länge auf, die ab Zyklus IV bereits die Hälfte aller DNA-Doppelstränge ausmachen. Die Anzahl der DNA-Doppelstränge N in der gewünschten Länge nach dem n-ten Zyklus lässt sich mit folgender Formel [43] (Gleichung 2.4) beschreiben:

$$N = 2^n - 2n \quad (\text{Gleichung 2.4})$$

Nach zehn Zyklen liegen bereits 1.004 DNA-Doppelstränge in der gewünschten Länge vor, nach 20 Zyklen sind es bereits mehr als  $10^6$ . Bei modernen automatisierten PCR-Geräten lassen sich bis zu 50 Zyklen einstellen [43].



**Abbildung 2.11:** Ablauf der Polymerase Kettenreaktion; (1) Denaturierung, (2) Anlagerung der Primer, (3) Amplifizierung, (a) Doppelstrangfragment, (b) amplifizierter DNA-Strang [43].

In der Real-time-quantitative-PCR (RT-qPCR) lässt sich die DNA-Amplifikation durch verschiedene Fluoreszenzmethoden direkt verfolgen, wie durch die Fluoreszenzfarbstoffe Ethidiumbromid oder *SYBR® Green I*, die in den Doppelstrang interkalieren [110, 111]. Das neuere *SYBR® Green I* hat den Vorteil, dass es sehr einfach in der Anwendung ist und jedes PCR-Produkt detektieren kann. Seine Sensitivität ist allerdings limitiert, da es sich auch unspezifisch in Nebenprodukte wie z.B. Primerdimere einlagert [111].

Eine weitere Methode verwendet FRET-Sonden (engl. *fluorescence resonance energy transfer*) [112], die zwei Fluoreszenzfarbstoffe beinhalten. Der erste Fluoreszenzfarbstoff ist im angeregten Zustand und dient als Donor. Die Anregung wird auf den zweiten Fluoreszenzfarbstoff, den Akzeptor übertragen. Dabei wird die Fluoreszenz des Donors gequencht. Der Akzeptor wird angeregt und gibt die Energie über Wärme oder Fluoreszenzemission ab. Das hierfür am häufigsten verwendete Paar ist Fluorescein (Donor) und Rhodamin (Akzeptor) [112].

Ein anderes Beispiel für FRET-Sonden sind „*molecular beacons*“. Dies sind einzelsträngige Nukleinsäuren, die wie Haarnadeln geformt sind und die an den jeweiligen Enden einen

Fluoreszenzfarbstoff bzw. einen Quencher enthalten. Ein Quencher ist ein Molekül, das selbst nicht fluoresziert und die Fluoreszenz des Fluoreszenzfarbstoffs unterdrückt. Erst nach der Hybridisierung mit der DNA, bei welcher der Fluoreszenzfarbstoff räumlich vom Quencher getrennt wird, kann eine Fluoreszenz beobachtet werden [112, 113].

Die PCR hat ein sehr weites Anwendungsgebiet. Dieses reicht vom Einsatz in der Medizin zum Nachweis von Erb- und Infektionskrankheiten über die Gerichtsmedizin, in der kleinste Mengen an Gewebeproben vom Tatort amplifiziert werden, bis hin zur Archäologie, in der es gelungen ist, eine über 40.000 Jahre alte Mammut-DNA zu vervielfältigen [43].

Am Institut für Wasserchemie wurde ein PCR-System zur Quantifizierung von *E. coli* entwickelt. Dieses besteht aus einer stopped-PCR, bei der die amplifizierte Ziel-DNA aus *E. coli* anschließend an einem DNA-Mikroarray quantifiziert werden kann [84]. Die Amplifizierung wurde nach 30 Zyklen abgestoppt [86], dem Zeitpunkt, bei dem die Amplifizierung in der Mitte der logarithmischen Phase war und die Streuung der unterschiedlichen DNA-Startkonzentrationen das Maximum hatte. Mit diesem System ist eine sensitive Detektion und Quantifizierung von *E. coli* in einem Konzentrationsbereich von  $10^5$  bis  $10^7$  Kopien/mL möglich [86].

In der Literatur sind mehrere PCR-Detektionsarten für *B. cereus* und *S. aureus* in Lebensmitteln beschrieben. Dazu werden die Gene der Toxine detektiert. Für den PCR-Einzelnachweis der Toxine musste z.B. für jedes Toxin-Gen eine separate PCR durchgeführt werden und hatte deshalb einen sehr hohen labortechnischen Aufwand zur Folge [114-116]. Aus diesem Grund wird die neuere Multiplex-PCR (mPCR) eingesetzt, mit der es möglich ist, mit mehreren Primern die Spezies- bzw. Stamm-spezifische DNA-Sequenzen gleichzeitig amplifizieren [117, 118]. Die mPCR ermöglicht es zwar, mehrere Gene der Toxine gleichzeitig zu quantifizieren, sie ist jedoch aufwendiger zu etablieren und auch störanfälliger bezüglich Kreuz-Amplifizierung und falsch positiven Ergebnissen [118].

Die verschiedenen Gene der Enterotoxine bzw. Enterotoxin-ähnlichen Toxine von *S. aureus* sind in Becker *et al.* zusammengefasst [115]. Die Gene sea bis sej konnten mittels mPCR gleichzeitig nachgewiesen werden [119]. Eine andere Veröffentlichung beschreibt den Nachweis der Toxin-Gene von *S. aureus* in Milch- und Fleischproben [120].

Für die Detektion von *B. cereus* wurden v.a. die Gene, die das Hämolysin BL, das hämolytische Enterotoxin und das emetische Toxin kodieren, untersucht. Das Hämolysin BL, das aus drei verschiedenen Proteinen besteht, wird durch die Gene hblC, hblD [121] sowie hblA [122] codiert. Die Gene nheA, nheB, nheC codieren das nichthämolytische Enterotoxin [123]. Das emetische Toxin Cereulid wird durch ein Peptidsynthase-Gen, dem ces-Gen kodiert [124]. Mittels mPCR konnten drei Toxin-Genfragmente (hblC, hblA und nheA) gleichzeitig amplifiziert werden [125]. Mit Hilfe einer Duplex-PCR wurden in acht von zehn

---

Proben einer koreanischen Sojabohnenpaste die Gene der emetischen und nicht-emetischen Toxine nachgewiesen [126]. Eine Reihe von Veröffentlichungen zeigen den Nachweis der Toxin-Gene von *B. cereus* in Lebensmitteln [118, 127, 128].

#### 2.2.3.4 Alternative markierungsfreie Methoden

Zu den alternativen markierungsfreien Methoden zählen die Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR), die Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) und die Ramanspektroskopie. Sie werden nachfolgend im Einzelnen beschrieben.

Die Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie (FT-IR) ist in der Biophysik und Biochemie eine weitverbreitete Methode, da sie strukturelle Informationen über biologische Moleküle liefert, wie z.B. Proteine, Nukleinsäuren, Carbohydrate und Lipide [129]. Naumann *et al.* veröffentlichten erstmals 1991 die Anwendung an Mikroorganismen [130], die auf ein großes Interesse stieß [131-133]. Bei Mikroorganismen wird der Schwingungscharakter aller Zellbestandteile wie DNA/RNA, Proteine, Membran und Komponenten der Zellwand erhalten. In einem einzigen Experiment werden somit alle Bestandteile beprobt und für jeden Mikroorganismus ein spezifischer *Fingerprint*-Bereich erzeugt. Die Selektivität ist aus diesem Grund sehr hoch und es können Subspezies unterschieden werden, wie z.B. *Pseudomonas spp.* [130]. Mit dieser Methode können Mikroorganismen differenziert, klassifiziert und identifiziert werden sowie ein *large-scale* Screening durchgeführt werden [130] – eine Quantifizierung ist jedoch nicht möglich.

Bei der Matrix-unterstützten Laser-Desorption/Ionisation (MALDI) wird ein Spektrum erhalten, das Informationen über das Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) angibt [134]. Zur Identifizierung von Bakterien werden ihre Bakterienproteine genutzt. Sie machen 50% der Trockenmasse der Bakterien aus und sind auf 200 - 6.000 molekulare Spezies verteilt [135]. Sie sind für diese Anwendung die charakteristischsten Biomarker in Bakterien, da sie nicht extrahiert, separiert oder amplifiziert werden müssen. Zur Probenvorbereitung werden die Mikroorganismen lysiert und innerhalb von 5 min wird das Ergebnis erhalten [135]. Sie werden über die Kondensatphase in intakte, isolierte und ionisierte Moleküle in die Gasphase überführt. Die Ionen werden dann nach ihrem Molekulargewicht in einem TOF (Flugzeitanalysator, engl. *time of flight*) aufgetrennt. Jedes Molekül wird schließlich nach seinem Molekulargewicht ( $m$ ), seiner Ladung ( $z$ ), seinem Masse-zu-Ladungs-Verhältnis ( $m/z$ ) und der relativen Signalintensität charakterisiert [134].

Die Ramanspektroskopie ist eine spektroskopische Methode, die auf Schwingung basiert und hoch spezifische Informationen über Materialeigenschaften liefert [136].

Die Mikro-Ramanspektroskopie erlaubt die schnelle Identifizierung von Mikroorganismen bis auf die Subspezies-Ebene in *Fingerprint*-Spektren, ohne dass Reinkulturen oder Kultivierungsschritte benötigt werden [137]. Um die Mikroorganismen in Lebensmittelmatrizes messen zu können, sind Separations- und Aufkonzentrierungsmethoden, wie z.B. die Filtration oder Zentrifugation notwendig [138].

Die oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie (engl. *surface-enhanced Raman spectroscopy*, SERS) zum Nachweis von Mikroorganismen wurde von Knauer *et al.* veröffentlicht. In dieser Methode wurde ein Immunoassay mit einer Ramanspektroskopie zur qualitativen und quantitativen Analyse von Mikroorganismen (*Legionella pneumophila* und *Salmonella typhimurium*) kombiniert [136]. Die SERS erlaubt die Verstärkung einer geringen Ramanstreuung und ermöglicht es, *Fingerprint*-Spektren von verschiedenen biologischen Systemen sogar im Molekülniveau zu erhalten [139]. Eine Vielzahl von Metallstrukturen (Silber, Gold, Kupfer) induzieren den SERS-Effekt [136]. Diese Metalle werden in den verschiedensten Formaten eingesetzt (Metallscheiben, Kolloide, Stäbe, Beschichtungen) [140-144]. Wird der Analyt zusammen mit dem SERS-Substrat einem Laserstrahl ausgesetzt, erfährt dieser eine Verstärkung durch entweder elektromagnetische und/oder chemische Effekte zwischen dem Zielmolekül und den Metallnanostrukturen. Knauer *et al.* verwenden Silberkolloide, mit denen Verstärkungen bis um den Faktor  $10^8$  erreicht wurden [136]. Der Nachweis von Mikroorganismen aus komplexeren Lebensmittelmatrizes ist jedoch noch nicht bekannt.

## **2.3 Abtrennung und Aufkonzentrierung von Mikroorganismen aus Probenmatrizes**

Die Methoden zum Schnelldurchweis von Mikroorganismen wurden bereits vorgestellt. Um messbare Konzentrationen zu erhalten, müssen die Matrixbestandteile der Probe abgetrennt und die Mikroorganismen gleichzeitig aufkonzentriert werden. Aus diesem Grund setzen sich neuere Analysemethoden aus einer Kombination von Separation und Detektion zusammen. Einige Beispiele für Aufkonzentrierungs- und Trenntechniken sind nachfolgend aufgeführt.

---

## 2.3.1 Affinitätschromatographie

### 2.3.1.1 Prinzip

Die wohl bekannteste bioanalytische Trenntechnik und älteste Form der Flüssigchromatographie ist die Affinitätschromatographie (AC). Sie wurde das erste Mal von Emil Starckenstein 1910 eingesetzt, um die Wechselwirkung zwischen Stärke und  $\alpha$ -Amylase zu untersuchen [145]. Im Laufe der Zeit wurde sie weiterentwickelt und ist derzeit eine verbreitete Technik in unterschiedlichen Gebieten der Life Science, wie z.B. der Chemie, Biologie und Biotechnologie und bedient sich hoch spezifischer und reversibler Molekularwechselwirkungen verschiedener Biomoleküle (z.B. Antikörper-Antigen, Protein-Antikörper, Lektin-Glykoprotein) [145]. Die zu untersuchende Probe, die den zu bestimmenden Analyten enthält (z.B. Proteine, Glykolipide, Biomarker, Toxine, Viren, Bakterien, Zellen), wird über die monolithische Affinitätssäule geleitet [145] (Abbildung 2.12). Der Analyt wird aufgrund der selektiven Wechselwirkung an den Liganden gebunden. Die Matrixbestandteile hingegen werden nicht spezifisch gebunden, sondern passieren die Säule mit wenig oder keiner Retention. Die anschließende Elution kann je nach Stärke des gebildeten Ligand-Analyt-Komplexes auf drei Arten erfolgen. Zum einen kann bei kleiner oder moderater Affinität isokratisch eluiert werden, wobei der Waschpuffer selbst als Elutionsmittel eingesetzt wird, zum anderen wird bei hoher Affinität die unspezifische oder biospezifische Elution angewandt. Hierbei wird der Analyt aufgrund der Änderung des pH-Wertes, Ionenstärke, Temperatur oder Polarität vom Liganden gelöst oder durch eine kompetitive Substanz gebunden [146].

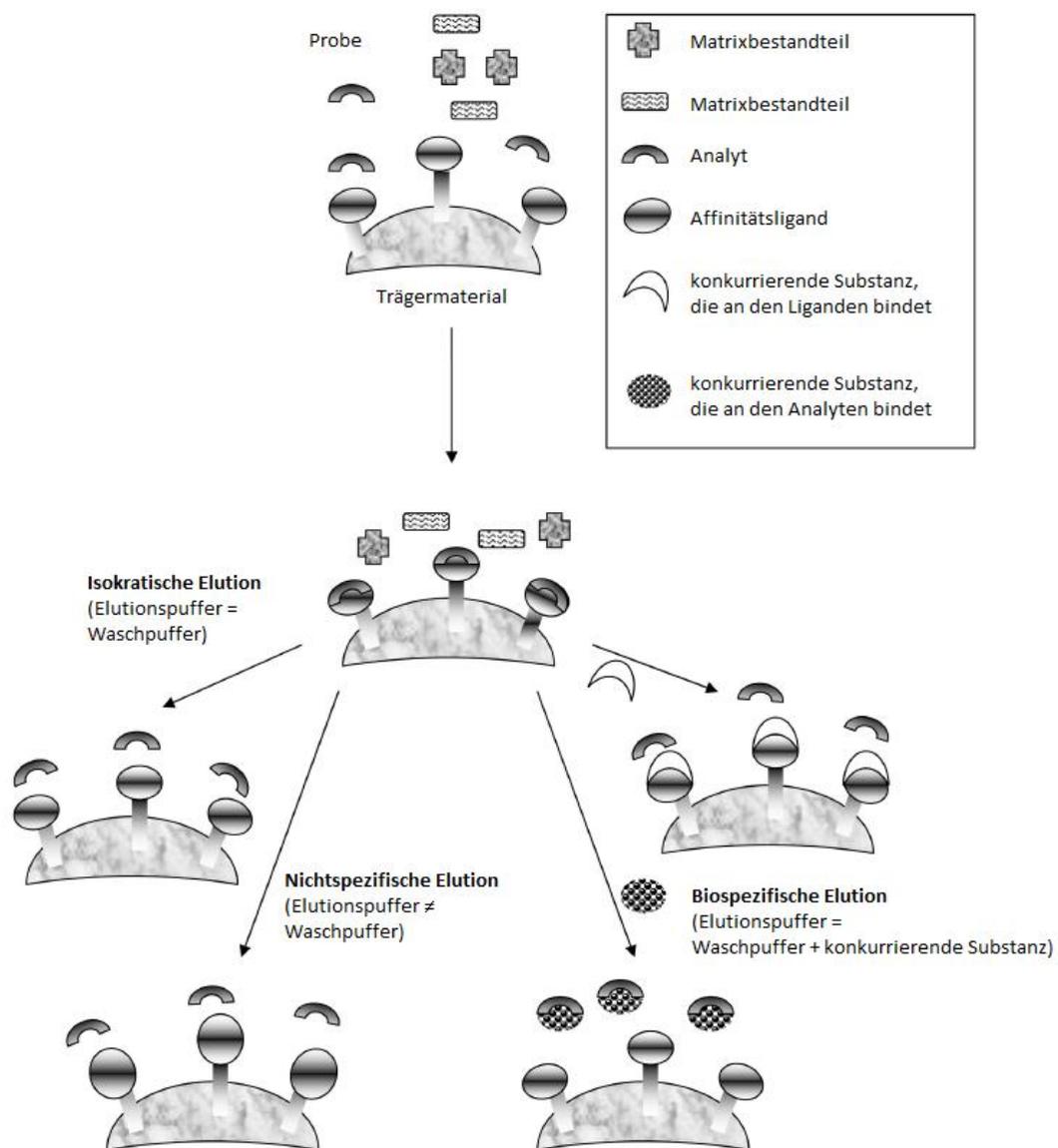


Abbildung 2.12: Prinzip der Affinitätschromatographie [146] (modifiziert).

### 2.3.1.2 Unterteilung der Affinitätschromatographie

Die Beliebtheit der Affinitätschromatographie beruht auf der Vielzahl der Liganden und stationären Phasen, welche für die Immobilisierung verwendet werden können. Als Liganden können biologische (Antikörper, Antigene, Lektine) und nichtbiologische Substanzen (Metalchelate) fungieren; als stationäre Phasen können z.B. Agarose, Sepharose oder Monolithe verwendet werden [145].

Die Bioaffinitätschromatographie (Bio-AC) ist eine Unterart der Affinitätschromatographie, bei der immunglobulinbindende Proteine, Enzyme, Lektine, Avidin/Biotin, Aptamere (synthetische DNA- oder RNA-Oligonukleotide) oder Antikörper an die stationäre Phase gebunden

werden (Tabelle 2.4) [146]. Diese Methode wird zur Aufreinigung, Abtrennung und Isolierung ihrer komplementären Substrate verwendet [145]. Werden Antikörper als Liganden an der stationären Phase verwendet, so spricht man von einer Immunaффinitätschromatographie, zu der auch die monolithische Immunfiltration zählt, bei der die Abtrennung von Matrixbestandteilen und die gleichzeitige Aufkonzentrierung der Mikroorganismen im Vordergrund stehen. Diese Methode lässt es zu, Bakterien schnell aus großen Probenvolumina aufzukonzentrieren und von der Matrix abzutrennen. Am Ende wird eine kleine Fraktion eines aufgereinigten Eluats erhalten, die durch die nachfolgende Analysemethode gemessen werden kann. Die monolithische Immunfiltration hat das Ziel, die Sensitivität der Detektionsmethode wie z.B. von Mikroarrays zu erhöhen. Dies ist wichtig für eine schnelle und nachweisstarke Analyse von Mikroorganismen in Lebensmitteln. Ein kommerzielles Beispiel für einen Säulen-basierten Immunfiltration-Assay sind die so genannten ABICAPs (engl. *antibody immunocolumn for analytical processes*). Mit ihnen kann eine direkte Analyse von Bakterien über einen Sandwich-ELISA auf dem polymeren Trägermaterial aus Polyethylen durchgeführt werden [147].

**Tabelle 2.4:** Verschiedene Arten der Bio-AC [145, 148] (modifiziert).

Liganden	Analyte
Protein A und G	Antikörper [149, 150]
Lektine	Glykoproteine [151], Bakterien [152]
Carbohydate	Lektine [153]
Antikörper	Antigene (z.B. Biomarker [154], Proteine [155], Pharmaka, Peptide, Viren, Zellbestandteile [145])
Proteine wie HSA, BSA und AGP	Pharmaka und biologische Bestandteile [156]
Aptamere	Proteine [157], Adenosin [158]

Neben der monolithischen Immunfiltration können Bakterien auch über eine weitere Methode behandelt werden, der Zellchromatographie. Je nach Art des Liganden kann sie z.B. der Bio-AC oder der IMAC (engl. *immobilized metal affinity chromatography*) zugeordnet werden. Die Zellchromatographie ist im Gegensatz zur monolithischen Immunfiltration eine fraktionierende Methode, die verschiedene Mikroorganismen voneinander trennt. Nachfolgend wird je ein Beispiel für eine Zellchromatographie der Bio-AC und der IMAC vorgestellt.

Dainiak *et al.* trennten eine Mischung aus *Saccharomyces cerevisiae*-Zellen und *E. coli*-Zellen mit Hilfe des immobilisierten Lektins Concanavalin A. Eine Trennung von 95 - 100% Reinheit jeder Fraktion gelang [152]. Die gleiche Gruppe trennte zwei Bakterienmischungen mit metallorganischen Liganden  $\text{Cu}^{2+}$ -Iminodiacetat. Die eine Bakterienmischung bestand aus *E. coli*-Zellen (Wildtyp) und rekombinanten *E. coli*-Zellen, die andere aus *E. coli*-Zellen (Wildtyp) und *Bacillus halodurans*-Zellen. Die Trennung erfolgte jeweils aufgrund unterschiedlich starker Affinität zur Säule und mit Hilfe unterschiedlicher Elutionsmittel [159].

### 2.3.1.3 Trägermaterialien der Affinitätschromatographie

Die Wahl des Trägermaterials nimmt einen entscheidenden Einfluss auf die Gestaltung der Affinitätschromatographie ein. Es sollte kostengünstig und druckstabil sein sowie die Probe schnell und ungehindert zum Affinitätsliganden durchlassen. Zudem sollte es chemisch inert sein, d.h. keine Bindungen oder Wechselwirkungen mit dem Lösungsmittel bzw. den gelösten Stoffen eingehen. Andererseits sollte es chemisch modifiziert werden können oder die Affinitätsliganden adsorbieren. Da fast alle Affinitätsseparationen in wässrigen Lösungen durchgeführt werden, sollte der Träger auch so hydrophil wie möglich sein. Um das geeignete Trägermaterial zu finden, müssen Kompromisse eingegangen werden, da viele dieser Anforderungen in direktem Widerspruch zueinander stehen. Aus diesem Grund muss der Träger so gut es geht auf die jeweilige Anwendung angepasst werden [148].

Ursprünglich wurden für die AC Partikel aus Agarose (z.B. Sepharose: engl. *Separation-Pharmacia-Agarose*) [160] oder Kieselgel [161] verwendet. Aufgrund seiner vielen Vorteile, wie z.B. einem schnellen Massentransfer [162], einer hohen Porosität [163] und kleinem Rückdruck bei hohen Flussraten [164], wurde jedoch das monolithische Material immer beliebter. Auch kann seine Form und Größe je nach Anwendung variiert werden. Durch hochvernetzte Makroporen, die als Durchflusskanäle dienen, können die Separationsprozesse mit Monolithen schneller durchgeführt werden als mit konventionellen gepackten Säulen mit sphärischen porösen Partikeln. Der Massentransport des Analyten erfolgt bei diesem Prozess durch Konvektion und nicht durch Diffusion in die Poren [165].

Aufgrund dieser Eigenschaften werden monolithische Säulen für eine Vielzahl analytischer Anwendungen eingesetzt. Dazu zählen die Umkehrphasen- (engl. *reversed phase*, RP) [166-168], Ionenaustausch- [169], Größenausschluss- [170] und Affinitätschromatographie [146, 164]. Es gibt vielzählige Möglichkeiten, monolithisches Trägermaterial für die Affinitätschromatographie herzustellen, worüber es bereits einige Veröffentlichungen gibt [145, 146, 171-175]. Sie können grob in anorganische und organische Monolithe unterteilt werden [145]. Nachfolgend sind die beiden Arten näher beschrieben.

### 2.3.1.3.1 Anorganische Monolithe

Tanaka *et al.* beschrieben als erste Gruppe Mitte der 1990er Jahre Silica-Monolithe, die Hauptvertreter der anorganischen Monolithe [176-180]. Sie werden gewöhnlich aus Silanverbindungen wie z.B. Tetramethoxysilan, Tetraethoxysilan oder Methyl(trimethoxy)silan hergestellt. Die resultierenden Silica-Monolithe sind kommerziell erhältlich (z.B. *Chromolith-Si®*, Merck, Tabelle 2.5) und können für die Immobilisierung von Liganden verwendet werden [181]. Dazu werden die Silanolgruppen auf der Oberfläche durch Silylierungsreagenzien, wie z.B. 3-Aminopropyltrimethoxysilan oder 3-Glycidylxypropyltrimethoxysilan modifiziert [181]. Alternativ sind auch andere Methoden zur Funktionalisierung der monolithischen Oberfläche möglich [182]. Silica-Monolithe besitzen eine sehr hohe mechanische Stabilität und eine große Oberfläche, doch ihre Herstellung ist anspruchsvoll, da das Material während des Härtingsprozesses schrumpft [181]. Die Einkapselung von Liganden in Sol-Gel-Material ist ebenso möglich [183, 184], jedoch kommt es während des Härtingsprozesses zu Schwierigkeiten durch entstehende Alkohole, die nicht immer kompatibel mit den labilen Proteinen sind [181].

**Tabelle 2.5:** Beispiele für kommerziell erhältliche anorganische Monolithe [165] (modifiziert).

Monolith	Firma	Material	Porengröße
Chromolith	Merck	Silica	Makroporen: 2000 nm Mesoporen: 13 nm
Conchrom	Conchrom	Silica	Mesoporen: 30 nm Mikroporen: 5 nm

Es wurden verschiedenste Arten der Anwendung von Silica-Monolithe beschrieben. Generell können mit Silica-Monolithen Trennoperationen fünf bis zehnmal schneller durchgeführt werden als mit gepackten Säulen [185]. Koal *et al.* zeigten z.B. eine schnelle Analyse von 30 Pestiziden in Trink- und Oberflächenwasser mit Hilfe von einer Online SPE-LC-MS-MS-Methode (SPE: *engl. solid phase extraction*, LC: Flüssigchromatographie, MS: Massenspektrometrie) [186]. Eine 2D-HPLC zur Trennung von Peptiden wurde durch Tanaka *et al.* beschrieben [187]. Aufgrund ihrer enthaltenen Meso- und Mikroporen sind allerdings keine Trennanwendungen für Mikroorganismen bekannt.

### 2.3.1.3.2 Organische Monolithe

Organische Monolithe wurden durch die Gruppe von Svec vor fast 30 Jahren vorgestellt [181] und sind das bekannteste monolithische Trägermaterial [146, 165, 188-194]. Ihr

größter Vorteil besteht darin, dass sie direkt aus einer Vielzahl von Monomeren in den gewünschten Formaten hergestellt werden können [195]. Glycidylmethacrylat (GMA) und Ethylenglycoldimethacrylat (EDMA) sind die am häufigsten verwendeten Monomere für die Herstellung von organischem Monolithmaterial, da dieses im Anschluss funktionalisiert werden kann [181]. Ebenso erlaubt die Epoxygruppe von GMA eine Vielzahl von Immobilisierungsstrategien von verschiedenen Liganden [146, 181]. Eine weitere Subklasse der organischen Monolithe stellen Cryogelee [152, 196] und Hydrogele [197] dar, die makroporöse Strukturen aufweisen. Beispiele für kommerziell erhältliche organische Monolithe verstecken sich hinter den Namen UNO und Seprisorb (Tabelle 2.6) der Firmen Bio-Rad bzw. Sepragen [165]. Zusätzlich zu monolithischen Säulen gibt es auch monolithische Disks (*CIM®*, engl. *convective interaction media*, BIA Separations) aus Poly(GMA-co-EDMA) [198].

**Tabelle 2.6:** Beispiele für kommerziell erhältliche organische Monolithe [165] (modifiziert).

Monolith	Firma	Material	Porengröße
<i>CIM®</i>	BIA Separations	Methacrylat	1500 nm
UNO	Bio-Rad	Acrylat	ca. 1000 nm
Seprisorb	Sepragen	Cellulose	50 - 300 µm

Andere Monomere, wie z.B. 2-Vinyl-4,4-Dimethylazlacton (VDA) [199, 200] werden auch zur Herstellung von monolithischem Trägermaterial verwendet. Eine Herstellung von Monolithen ist ebenfalls durch direkte Copolymerisierung von funktionalen Monomeren möglich, bei der monolithische Affinitätsäulen in einem Schritt erhalten werden [201, 202]. Ansonsten werden die Affinitätsliganden üblicherweise über die meist verfügbaren Hydroxylgruppen an das Trägermaterial angebunden [146, 203].

Zur Aufkonzentrierung und Separation von biologischen Molekülen oder Zellen wurden bereits verschiedene monolithische Trägermaterialien veröffentlicht. Methacrylat-basierte monolithische Säulen werden z.B. oft zur schnellen und effektiven Analyse von Biomolekülen verwendet [204]. Kommerziell erhältliche *CIM®*-Monolithe werden für die verschiedensten Anwendungen eingesetzt. Die „*high-performance monolithic disk chromatography*“ wird z.B. als sehr effiziente Methode zur quantitativen Fraktionierung von polyklonalen Antikörper-Pools aus Blutserum von Kaninchen verwendet [205]. Eine andere Anwendung finden monolithische Disks zur schnellen präparativen Abtrennung von Proteinen in Lösung [206].

Für die Aufkonzentrierung von Bakterien wird ein poröses Material mit größeren Poren benötigt. Trägermaterialien wie Cryogelee besitzen ein Netzwerk aus verzweigten Poren mit

einer Größe von 10 - 100  $\mu\text{m}$  und werden z.B. zur IMAC [159] oder zur Anionenaustauschchromatographie von *E. coli*-Zellen verwendet [207]. In einem Review von Plieva *et al.* [208] sind eine Reihe weiterer makroporöser Gele und deren Anwendungen gezeigt. Obwohl Cryogele sehr geringe Rückdrücke bei hohen Flussraten aufweisen [196], ist die Oberflächenchemie nicht sehr vielversprechend und deshalb sind nur wenige Methoden zur Antikörperimmobilisierung veröffentlicht [209].

Der in dieser Arbeit verwendete makroporöse Epoxy-Monolith wurde von Peskoller *et al.* [210] entwickelt und für die Aufkonzentrierung von *Escherichia coli* (*E. coli*)-Bakterien aus Wasser mit Polymyxin B beschichtet. Der Monolith beinhaltet sowohl Hydroxyl- als auch Epoxygruppen und wird aus dem Monomer Poly(glycerol-3-glycidylether) hergestellt, das durch Selbst-Polymerisation mit der initiierenden Lewis-Säure  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  (Bortrifluorid-Ethyletherat) entsteht. Die Zugabe der Porogene Toluol und Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) sorgt für die Ausbildung eines durchgehenden Porennetzwerkes. Der Polymerträger ist aus Makroporen aufgebaut, die optimal für die Aufkonzentrierung von Bakterien und anderen Zellen sind. Die Porengröße wird über das Porogengemisch eingestellt. Je nach Zusammensetzung des Porogengemischs können auch Monolithe mit Mesoporen hergestellt werden [210]. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Cryogelen ermöglicht die Oberflächenchemie dieses Monolithen eine Immobilisierung von Antikörpern für die Durchführung einer monolithischen Immunfiltration zur selektiven Aufkonzentrierung von Analyten. Verschiedene Methoden zur Immobilisierung von Liganden sind nachfolgend zusammengestellt.

#### 2.3.1.4 Immobilisierung von Liganden

Nachfolgend werden einige Immobilisierungsmethoden vorgestellt, die bereits für die kovalente Ankopplung von Liganden an monolithische Säulen adaptiert wurden. Sie reagieren jeweils an der Aminogruppe des Liganden. Eine Ausnahme ist die Hydrazid-Methode, bei der die Reaktion an den Carbohydratgruppen der Liganden abläuft. Tabelle 2.7 fasst Methoden, verwendete Trägermaterialien und Liganden zusammen.

**Tabelle 2.7:** Zusammenfassung der Immobilisierungsmethoden, die verwendeten Trägermaterialien und Liganden.

Method	Trägermaterial	Liganden
Epoxy-Methode	C/M®-Disks	Protein G [212, 213], Protein A, Protein L [212], BSA [205], Bradykinin [205]
	GMA/EDMA	L-Histidin [214], HSA [156, 211], Antikörper [211]
Schiff'sche Base-Methode	GMA/EDMA	Protein A [214, 215], HSA [156], Antikörper [211]
Glutaraldehyd-Methode	GMA/EDMA	Protein A [214], Trypsin [216]
Carbonyldiimidazol (CDI)-Methode	GMA/EDMA	L-Histidin [214], HSA [156], Antikörper [211]
Disuccinimidylcarbonat (DSC)-Methode	GMA/EDMA	HSA [156]
	Silica-Monolithe mit Aminogruppen	β-Glucuronidase [217]
Hydrazid-Methode	GMA/EDMA	Glykoproteine und Liganden mit Carbohydratketten [146]
Cyanogenbromid (CNBr)-Methode	Agarose oder Polysaccharid-basiert	Liganden mit Aminogruppen wie NAD <sup>+</sup> [218]

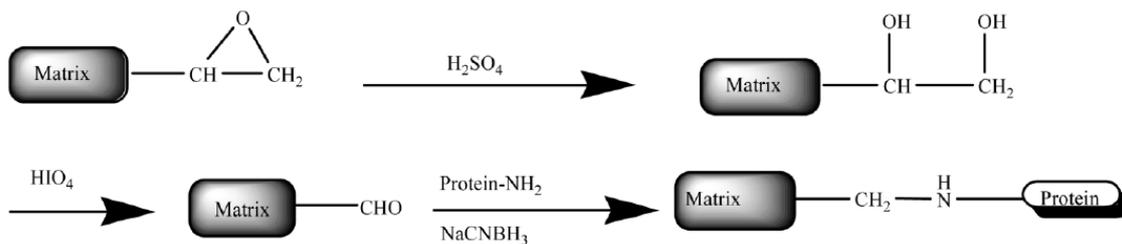
Eine der vielen Immobilisierungsmethoden ist die Epoxy-Methode (Abbildung 2.13), die an den Epoxygruppen der monolithischen Säule abläuft und bei der über einen nukleophilen Angriff mit dem Liganden ein stabiles sekundäres Amin entsteht [156]. Diese Methode kann in einem Schritt durchgeführt werden [156, 211], jedoch ist die Reaktionsgeschwindigkeit langsamer als bei vergleichbaren Methoden, was zu geringen Konzentrationen an immobilisiertem Ligand oder langen Immobilisierungszeiten führen kann [156].



**Abbildung 2.13:** Epoxy-Methode [146].

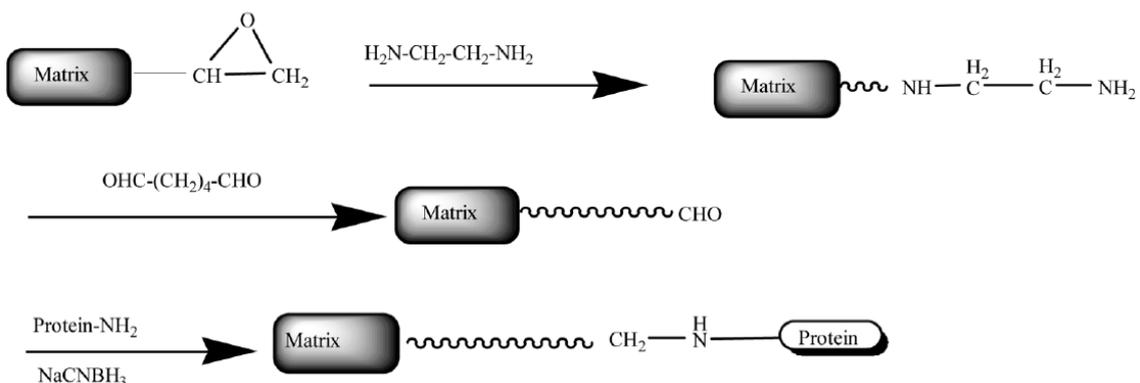
Eine zweite Methode ist die Schiff'sche Base-Methode [156, 211, 214] (Abbildung 2.14). Als erster Schritt werden die Epoxygruppen der monolithischen Säule zu Diolgruppen hydrolysiert. Diese werden dann mit Periodsäure zu Aldehydgruppen oxidiert, die mit primären Aminen an den Liganden zu einer Schiff'schen Base reagieren. Da dies eine reversible Reaktion ist, wird die Schiff'sche Base bei seiner Bildung mit

Natriumcyanoborhydrid reduziert, wodurch ein sekundäres Amin entsteht. Die verbleibenden Aldehydgruppen auf dem Monolith werden später mit kleineren Liganden mit Aminogruppen gebunden oder durch Natriumborhydrid zu Alkoholen reduziert [219]. Diese Methode hat eine schnellere Reaktionsgeschwindigkeit als die Epoxy-Methode und höhere Aktivitäten als viele andere Amin-basierte Kupplungsmethoden [156]. Der Hauptnachteil der Methode ist der Gebrauch von Reduktionsmitteln wie z.B. Natriumborhydrid, die die immobilisierten Liganden beeinflussen können [146].



**Abbildung 2.14:** Schiff'sche Base-Methode [146].

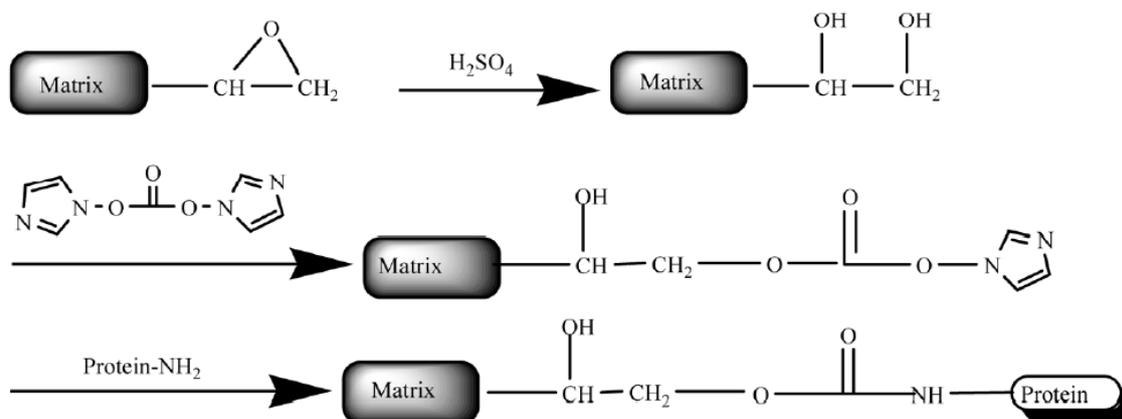
Die Glutaraldehyd-Methode ist verwandt mit der Schiff'schen Base-Methode (Abbildung 2.15). In einem ersten Schritt werden die Epoxygruppen der monolithischen Säule mit Ethylendiamin [216] oder Hexandiamin A [214] zu Aminen umgewandelt. Anschließend wird das Dialdehyd (z.B. Glutaraldehyd) gekoppelt. Die weitere Reaktion verläuft wie bei der Schiff'schen Base-Methode. Dieser Ansatz hat die gleichen Vorteile wie die Schiff'sche Base-Methode, benötigt aber mehrere Schritte, wodurch allerdings längere Linker zwischen dem Monolith und dem Ligand eingeführt werden, die eine sterische Hinderung vermeiden.



**Abbildung 2.15:** Glutaraldehyd-Methode [146].

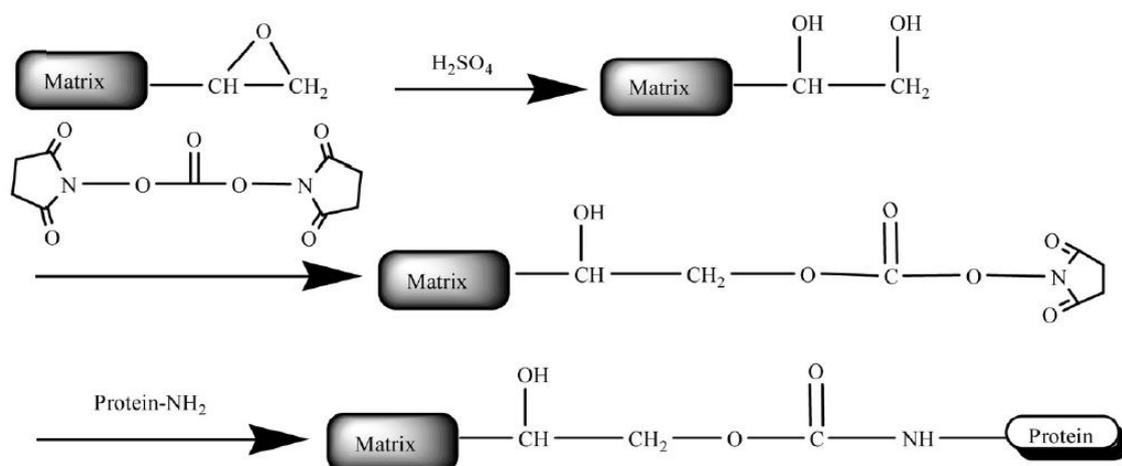
Bei der Carbonyldiimidazol (CDI)-Methode (Abbildung 2.16) werden die Epoxygruppen der monolithischen Säule zu Diolgruppen hydrolysiert. Diese reagieren mit Carbonyldiimidazol zu Imidazolylcarbamat-Gruppen. Der Ligand kann schließlich durch eine nukleophile

Substitution binden, was zu einer stabilen Amidbindung führt. Diese Methode ist schneller als die Epoxy-Methode und beinhaltet weniger Schritte als die Schiff'sche Base-Methode oder die Glutaraldehyd-Methode. Allerdings erhält man dadurch auch niedrigere Ligandaktivitäten als mit der Schiff'sche Base-Methode [156, 211].



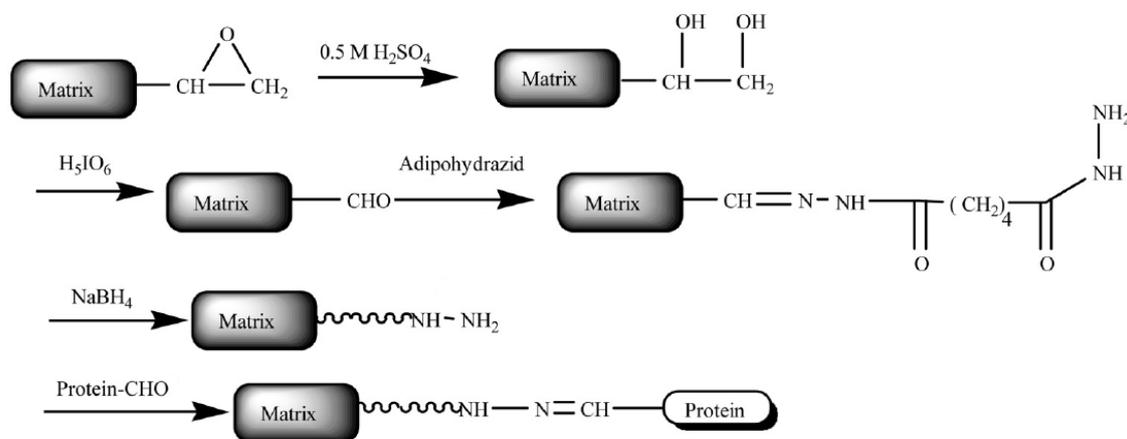
**Abbildung 2.16:** Carbonyldiimidazol (CDI)-Methode [146].

Bei der Disuccinimidylcarbonat (DSC)-Methode (Abbildung 2.17) werden Epoxygruppen der monolithischen Säule zu Diolgruppen hydrolysiert, die im nächsten Schritt mit DSC reagieren [156, 211]. Die Reaktion läuft auch ab, wenn die monolithische Säule Aminogruppen besitzt [217]. Die aktivierte Form reagiert dann mit dem Ligand und formt eine stabile Carbamatbindung [219]. Die Methode ist zwar schnell [156], die Stabilität von DSC und dem aktivierten Monolith ist jedoch gering, sodass nach Möglichkeit Nebenreaktionen wie z.B. Hydrolyse verhindert werden müssen [219].



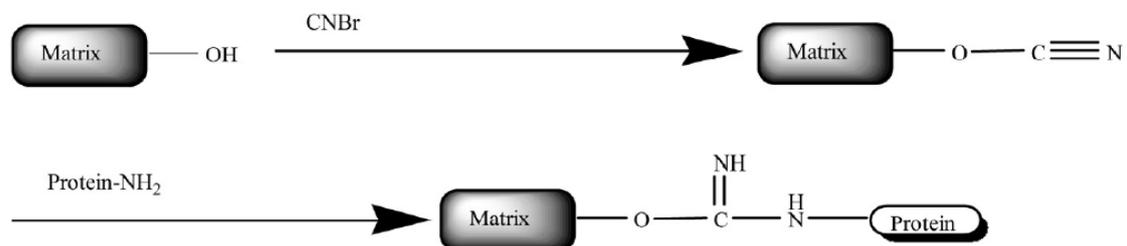
**Abbildung 2.17:** Disuccinimidylcarbonat (DSC)-Methode [146].

Bei der Hydrazid-Methode wird ein Aldehyd-aktivierter Monolith wie bei der Schiff'sche Base-Methode hergestellt (Abbildung 2.18). Der Monolith wird mit Adipohydrazid aktiviert, wobei übrig gebliebene Aldehydgruppen mit Natriumborhydrid zu Alkoholen reduziert werden. Diese Methode bindet Liganden mit Carbohydratgruppen. Zur Bindung müssen die Carbohydratgruppen zunächst unter milden Bedingungen zu Aldehydgruppen oxidiert werden [220] und bilden mit dem aktivierten Monolith eine stabile Hydrazonbindung. Obwohl bei dieser Methode sehr viele Schritte benötigt werden, ist dies eine attraktive Möglichkeit, Antikörper und andere Glykoproteine über die Carbohydratkette zu binden. Im Vergleich zu Amin-basierten Kopplungstechniken ist die Aktivität der Liganden höher [221].



**Abbildung 2.18:** Hydrazid-Methode [146] (modifiziert).

Die häufigste Methode bei der herkömmlichen Affinitätschromatographie ist die Cyanogenbromid (CNBr)-Methode (Abbildung 2.19).



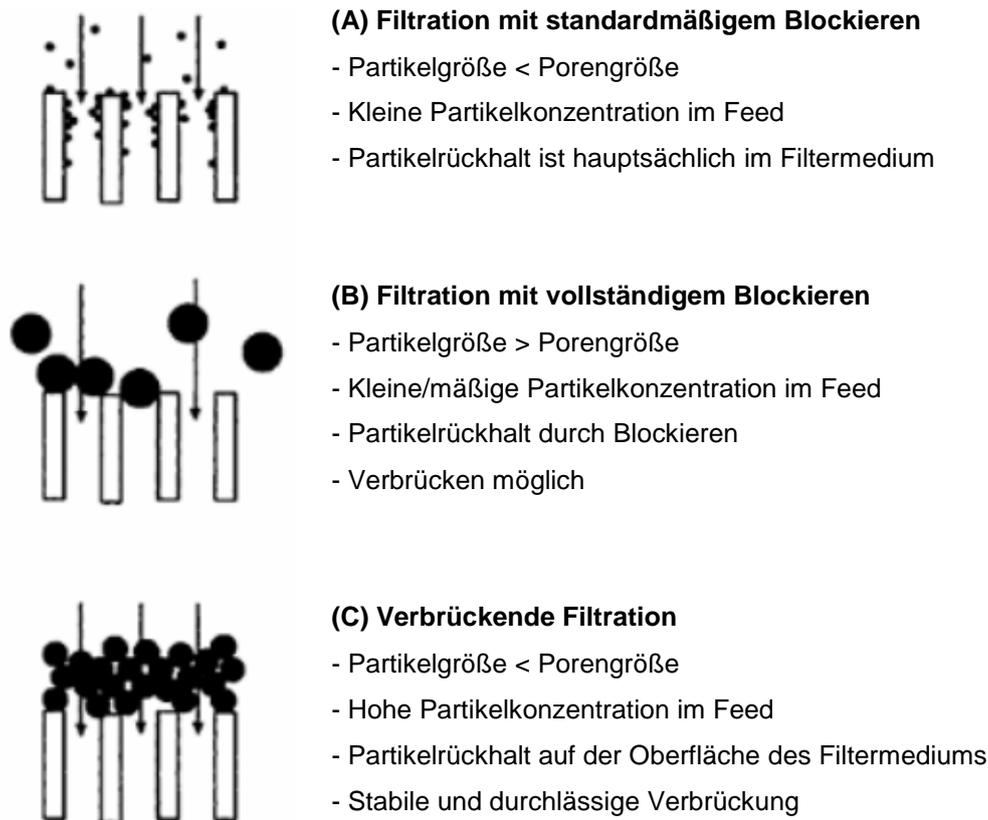
**Abbildung 2.19:** Cyanogenbromid (CNBr)-Methode [146].

Dazu wird eine eiskalte basische CNBr-Lösung auf einen Agarose- oder Polysaccharidträger gebracht. Obwohl die Methode sehr einfach durchzuführen ist, wird das toxische CNBr benötigt [218]. Außerdem sind die immobilisierten Liganden nicht so stabil wie jene, die durch andere Amin-basierte Kopplungsmethoden entstehen. Zusätzlich gibt es Nebenreaktionen und unspezifische Bindungen auf der Oberfläche [222].

### **2.3.1.5 Fluidynamische Parameter am Trägermaterial**

Die monolithische Immunfiltration setzt sich aus einer Immunreaktion und einer Filtration zusammen bzw. einer Immunreaktion in den Filterporen. Die Immunreaktion wird später in Kapitel 2.4 beschrieben. Nachfolgender Absatz beschreibt allgemein den Filtrationsprozess an Filtermedien.

Filtermedien können Partikel (hier Bakterien) auf zwei verschiedene Arten zurückhalten. Sind die Partikel größer als die Porengröße des Filters, wird ein Filterkuchen ausgebildet. Man spricht dann auch von einer Kuchenfiltration [223] oder Oberflächenfiltration [224]. Dieser Prozess lässt sich bei der Membranfiltration beobachten [224] (Kapitel 2.3.2.5). Sind die Partikel kleiner als die Porengröße des Filters, dann erfolgen Ablagerungen in der internen Struktur des Filters. Dieser Prozess der Separation geschieht aufgrund mechanischer oder oberflächenchemischer Effekte – bei der monolithischen Immunfiltration durch die Immunerkennung der immobilisierten Antikörper – und wird als Tiefenfiltration bezeichnet (Abbildung 2.20 (A)). Auf mikroskopischer Ebene gibt es zwei Mechanismen: das komplette Verblocken und das Verbrücken. Die Poren verblocken, wenn die Partikel größer als die Pore sind (Abbildung 2.20 (B)). Der verbrückende Prozess entsteht, wenn die Partikel kleiner als die Poren des Filters sind und einen Filterkuchen bilden. Dieser entsteht hauptsächlich, wenn die Partikel in hochkonzentrierter Form auftreten (Abbildung 2.20 (C)). Mehrere Partikel behindern sich bei dem Versuch, gleichzeitig eine Pore zu durchlaufen und formen eine Brücke über dem Poreneingang. Diese kann durch Verändern der Flussgeschwindigkeit oder Flussrichtung aufgebrochen werden [223]. Bei der monolithischen Immunfiltration erfolgen hauptsächlich die Filtrationsmechanismen, die in Abbildung 2.20 (A) und (C) dargestellt sind, da die Bakterien kleiner als die Poren sind und in die Poren fließen.



**Abbildung 2.20:** Unterschiedliche Filtrationsmechanismen [223].

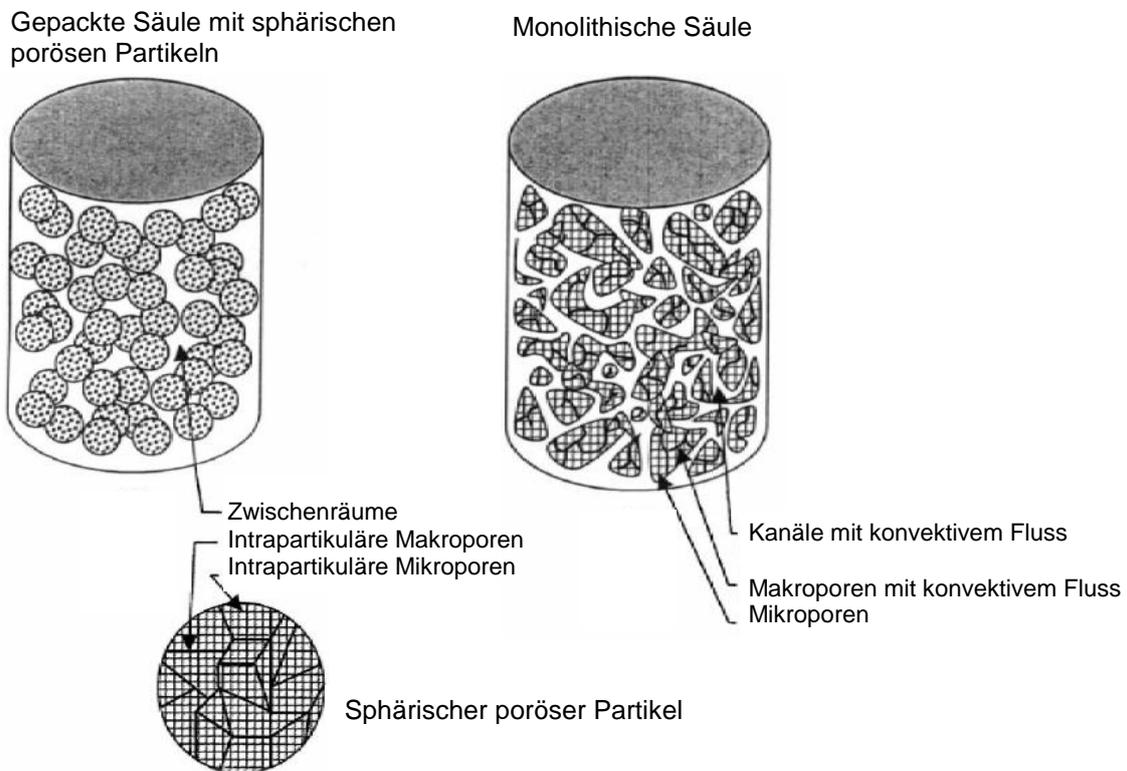
Will man die Flussgeschwindigkeit berechnen, so liefert das Gesetz von Darcy (Gleichung 2.5) [223] mit der Geschwindigkeit durch eine gepackte poröse Säule eine sehr grobe Näherung.

$$u = \frac{-k}{\mu} \frac{dp}{dz} \quad (\text{Gleichung 2.5})$$

$u$	Flussgeschwindigkeit
$k$	Permeabilität
$\mu$	Viskosität der Flüssigkeit
$dp$	dynamische (hydraulische) Druckdifferenz
$dz$	Dicke des porösen Mediums

Die Porenstruktur von Monolithen ist so stark vernetzt, dass der diffusive Weg sehr kurz ist [165]. Im Gegensatz zur Diffusion, deren Antriebskraft auf einem Konzentrationsgradienten liegt, wird die Konvektion durch die Flussrate getrieben, welche die Rate des Massentransfers beschleunigt [167]. Aus diesem Grund erreicht der Analyt die Pore durch Konvektion und nicht durch Diffusion, wodurch der Separationsprozess sehr viel schneller abläuft [165].

Im Vergleich zu gepackten Säulen mit sphärischen porösen Partikeln gibt es deutliche strukturelle Unterschiede.



**Abbildung 2.21:** Querschnitt durch eine gepackte Säule mit sphärischen porösen Partikeln und durch eine monolithische Säule [225] (modifiziert).

Herrschen bei den gepackten Säulen Zwischenräume sowie intrapartikuläre Makro- und Mikroporen vor, so gibt es bei den monolithischen Säulen Kanäle und Makroporen mit konvektivem Fluss sowie Mikroporen (Abbildung 2.21) [225].

## 2.3.2 Weitere Trenn- und Aufkonzentrierungstechniken

### 2.3.2.1 Ionenaustauscherharze

Ionenaustauscherharze werden für gewöhnlich in der Wasser- und Proteinaufreinigung verwendet und bestehen aus kleinen porösen Polymerbeads, an die geladene saure oder basische Gruppen gebunden sind [226]. Sie haben eine Bindungskapazität von bis zu  $10^{10}$  CFU pro g Harz [227]. Die Bakterien können durch Verändern des pH-Wertes vom Harz gelöst werden. Viele Bakterienspezies tolerieren große pH-Schwankungen für eine kurze Zeit. Für den Fall, dass man nicht davon abhängig ist, lebende Bakterien zu erhalten, können auch höhere pH-Werte zur Verbesserung der Trennleistung führen [226, 228].

---

Kationische Austauscherharze wurden verwendet, um Bakterienzellen und -DNA aus Bodenproben (pH 6,5) zu extrahieren. Die Effizienz von Kationenaustauscherharzen für *Pseudomonas cepacia* aus Bodenproben lag bei 35% [229]. Durch diese Methode konnten die polyvalenten Kationen der Bodenpartikel durch monovalente Kationen des Harzes ausgetauscht werden, wodurch Bakterienzellen, die an den Bodenpartikeln anhafteten, gelöst und die Bodenpartikel durch das kationische Austauscherharz zurückgehalten wurden. Da keine Veröffentlichungen zur Trennung von Bakterien aus Lebensmitteln gefunden wurden, scheint es, dass sich diese Technik nicht durchgesetzt hat.

### 2.3.2.2 Dielektrophorese

Die Dielektrophorese basiert auf dem Effekt, dass sich Partikel (z.B. Bakterien) in Anwesenheit eines elektrischen Feldgradienten bewegen [58, 230]. Der Prozess läuft in einem hochfrequenten elektrischen Feld (0,1 - 10 mHz) ab, in dem die suspendierten Zellen zu den Elektroden wandern [231]. Zellen mit unterschiedlichen physikalischen und chemischen Eigenschaften verhalten sich unterschiedlich im elektrischen Feld, was eine Trennung der einzelnen Zelltypen ermöglicht [231]. Eine Trennung von Säugetierzellen aufgrund z.B. des Zelltyps oder der Morphologie konnte von Gascoyne *et al.* gezeigt werden [230]. Für die Anwendung der Dielektrophorese mit Bakterienzellen hat sich gezeigt, dass die Zellen an der Elektrode zusammenklumpen und dass sie nach und nach über einen Leitfähigkeitsgradienten abgelöst werden können. Marx *et al.* zeigten die Dielektrophorese zur Auftrennung von *Bacillus subtilis*, *E. coli*, und *Micrococcus luteus* in Reinkulturen bei Konzentrationen von ca.  $5 \cdot 10^7$  Z/mL und in Mischungen. Über Mikroskopie konnte die Ablösung von ungefähr 50% der Zellen von der Elektrode bestimmt werden [232]. Da für diese Methode flüssige Proben, kleine Probengrößen und niedrige Leitfähigkeiten benötigt werden, sind die Einsatzmöglichkeiten der Dielektrophorese für die Trennung und Aufkonzentrierung von Bakterienzellen aus Lebensmitteln limitiert [226].

### 2.3.2.3 Flüssig-Flüssig-Extraktion

Eine Extraktion mit organischen Lösungsmitteln wird nur in den wenigsten Fällen verwendet, da die meisten Biomoleküle durch diesen Prozess geschädigt werden. Große Abweichungen in der Oberflächenspannung und Dielektrizitätskonstanten zwischen Wasser und dem organischen Lösungsmittel sorgen dafür, dass sich Biomoleküle entfalten, wenn sie beiden Lösungsmitteln zur gleichen Zeit ausgesetzt sind [227].

Wässrige Flüssig-Flüssig-Extraktionen sind viel schonender. Beträgt der Wassergehalt jeder Phase ca. 85 - 95% [233], sind die Unterschiede in der Oberflächenspannung klein. Die

Zellen konzentrieren sich an der Zwischenschicht und in einer der beiden Phasen [233]. Kleine, lösliche, ungeladene Moleküle verteilen sich gleichmäßig zwischen den beiden Phasen, wohingegen die Konzentration von größeren Partikeln (z.B. Zellorganellen oder Zellen) in der Zwischenschicht und in einer der beiden Phasen stattfindet [233].

Die beiden Phasen bestehen meist aus Polyethylenglycol (PEG) und Dextranen, die unterschiedliche Molekulargewichte und kleine Unterschiede in der Oberflächenspannung aufweisen, aber nicht toxisch für Bakterienzellen sind [226, 227]. Ein Anwendungsbeispiel ist die Extraktion von *Listeria monocytogenes* und *Salmonella berta* aus einer Wurstprobe mit Wiederfindungsraten von 45% für *Listeria monocytogenes* und 56% für *Salmonella berta* [234]. Ein anderes Beispiel zeigt eine Sensitivitätssteigerung der anschließenden PCR auf  $10^4$  CFU/mL durch Flüssig-Flüssig-Extraktion von *Listeria monocytogenes* in Weichkäse, da PCR-Inhibitoren in der PEG-Phase abgeschieden wurden [235].

Es gibt generell nur wenige Daten zu diesem System, da die Trennung nicht komplett abläuft und Bakterien verloren gehen [234]. Die Flüssig-Flüssig-Extraktionen sind auch schwer zu standardisieren, da sie empfindlich gegenüber Temperatur, Mischen und chemischer Zusammensetzung sind. Die Effizienz kann auch negativ durch Fette oder andere Lebensmittelbestandteile beeinflusst werden [226, 227].

### 2.3.2.4 Zentrifugation

Bei der Zentrifugation wird zur Trennung die Zentrifugalkraft genutzt, die durch Rotation um eine feste Achse entsteht. In diesem Vorgang sedimentieren suspendierte Partikel aus der Flüssigkeit an den Boden des Behälters. Die Sedimentation hängt dabei vom Partikeldurchmesser, der Partikeldichte, der Dichte der Flüssigkeit, dem Volumen, dem Winkel und der Rotationsgeschwindigkeit ab [226]. Je nach Geschwindigkeit lassen sich verschiedene Teile abtrennen. Bei Rotationsgeschwindigkeiten unter  $1.000 \times g$  wird die Sedimentation von Lebensmittelpartikeln gefördert, die Bakterien bleiben im Überstand. Werden etwas höhere Zentrifugationsgeschwindigkeiten verwendet ( $1.000 - 8.000 \times g$ ), so sedimentieren die Bakterien mit. Bei Geschwindigkeiten von  $8.000 - 60.000 \times g$  wird von Hochgeschwindigkeitszentrifugation gesprochen, bei noch höheren bis zu  $700.000 \times g$  von Ultrazentrifugation [226]. Die Hochgeschwindigkeitszentrifugation wird zur Trennung und Aufkonzentrierung von Mikroorganismen aus mikrobiellen Medien verwendet und ist sehr einfach in der Durchführung. Die Nukleinsäuren können im Anschluss extrahiert werden und die Detektion der Mikroorganismen kann über DNA-Hybridisierung oder PCR erfolgen [226]. Mit dieser Methode wurden z.B. *Clostridium welchii* aus 20 L Medium abgetrennt [236].

---

Weitere, etwas komplexere Methoden, wie die Differentialzentrifugation und die Dichtegradientenzentrifugation, werden nachfolgend beschrieben.

Die Differentialzentrifugation basiert auf unterschiedlicher Sedimentationsgeschwindigkeit aufgrund unterschiedlicher Größe und Dichte der Partikel. Zunächst werden schwerere und größere Partikel mit kleineren Zentrifugationsgeschwindigkeiten abgetrennt. Die Zentrifugationsgeschwindigkeit wird schrittweise erhöht, bis die Mikroorganismen sich im Pellet befinden. Schließlich kann der Überstand entfernt und das Pellet für die weitere Detektion resuspendiert werden [226].

Ein Beispiel zur Aufkonzentrierung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmittelproben wurde von Niederhauser *et al.* beschrieben. Hier wurde eine Zentrifugationsgeschwindigkeit von 100 x g verwendet, um zunächst größere Lebensmittelbestandteile abzutrennen. Der zweite Schritt erfolgte bei 3.000 x g zur Gewinnung der Bakterien. Mit Hilfe der Aufkonzentrierung war eine 500-fache Verringerung der Nachweisgrenze der PCR auf  $2 \cdot 10^3$  CFU/mL möglich [237]. Eine weitere Veröffentlichung beschreibt die Abtrennung von *Campylobacter jejuni* und *Campylobacter coli* aus Milchprodukten [238]. Zunächst wurde die Probe mit Verdauopuffer versetzt und anschließend bei 3.000 x g zentrifugiert. Dadurch wurde die Probe in eine Fettschicht, eine Wasserschicht und ein Pellet getrennt. Das Pellet wurde anschließend lysiert, extrahiert und eine PCR durchgeführt.

Die Differentialzentrifugation hat den Vorteil, dass sie schnell und einfach durchgeführt werden kann, ohne dass hohe Gravitationskräfte benötigt werden. Allerdings werden mit den Bakterienzellen auch Lebensmittelbestandteile als Pellet mit abzentrifugiert, die anschließende Detektionsmethoden inhibieren oder stören können [226].

Zur Dichtegradientenzentrifugation werden Proben verwendet, bei denen Bakterien nicht an Partikel gebunden sind. Diese Methode basiert auf suspendierenden Lösungen, die im unteren Bereich eine höhere Dichte als im oberen Bereich aufweisen. Die Bakterien gehen in einen Bereich über, der mit der eigenen Dichte im Gleichgewicht ist und können dann abgetrennt werden. Gewöhnlich werden Substanzen zugesetzt, die einen Dichtegradienten erzeugen, wie z.B. Saccharose, Ficoll, Percoll oder Nycodenz [226].

Mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation konnte durch Zusatz von Percoll die Nachweisgrenze von *E. coli* O157:H7 in Hackfleisch von  $10^4$  CFU/g auf 5 CFU/g gesenkt werden [239]. Eine andere Veröffentlichung beschreibt eine Kombination aus Differential- und Dichtegradientenzentrifugation zur Aufkonzentrierung von *E. coli* und *B. subtilis* aus Bodenproben [228]. Zunächst wurde die Probe bei 1.000 x g zentrifugiert, um die

Bodenpartikel zu entfernen. Eine Hochgeschwindigkeitszentrifugation wurde dann mit Nycodenz-Zusatz durchgeführt.

Weicht der osmotische Druck des Gradienten zu stark von dem der Zelle ab, hat die Methode einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität. Ebenso kann die Wiederfindung durch hoch viskose Gradienten oder durch eine Vielzahl von Waschschritten negativ beeinflusst werden. Viele Lebensmittel besitzen selber einen Dichtegradienten oder einen hohen Fettanteil, welcher die Trennung stört [226, 227].

### 2.3.2.5 Membranfiltration

Die Membranfiltration ist wie die Zentrifugation eine physikalische Trennmethode. Sie lässt sich je nach Größe der Poren in Mikro-, Ultra- und Nanofiltration einordnen. Bei der Mikrofiltration werden Partikel und suspendierte Feststoffe bis zu einer Größe von 0,1 µm und Drücken von 1 - 4 bar abgetrennt [240]. Die Ultrafiltration stellt den Übergang von der Partikelfiltration zur Molekularfiltration dar und liegt in einem Größenbereich von 0,004 - 0,1 µm und bei Drücken von 5 - 10 bar. Durch sie können z.B. Viren abgetrennt werden [240]. Die Nanofiltration gehört zur Molekularfiltration mit Porengrößen von 0,0012 µm - 0,012 µm und Drücken von 20 - 40 bar [240]. Die Mikro- und Ultrafiltration lassen sich im statischen Betrieb (*Dead-End-Filtration*) oder im dynamischen Betrieb (*Crossflow-Filtration*) ausführen [241]. Bei der *Dead-End-Filtration* fließt der Probenstrom senkrecht zum Filter, bei der *Crossflow-Filtration* parallel.

Als Filtermedien werden Membranen aus synthetischen Polymeren, wie z.B. Polypropylen, Perfluorpolymere, Elastomere, Polyamide und Polysulfone verwendet. Weitere Membranfilter basieren auf Cellulose oder beinhalten Materialien wie z.B. Keramik, Metall oder anorganische Materialien [224]. Die Filter sind sehr dünn, haben eine 2-dimensionale Struktur und deshalb findet der Filtrationsprozess an der Oberfläche statt [224].

Die Mikrofiltration ermöglicht die Abtrennung von Mikroorganismen aus Lebensmittelproben und wird nun näher beschrieben. Nachdem die Probe auf den Filter aufgebracht wurde, werden die Mikroorganismen vom Filtermaterial zurückgehalten, während die kleineren Lebensmittelbestandteile den Filter durchfließen und verworfen werden. Die anschließende Elution vom Filter hängt ab vom Filtertyp, der Porenform und -größe. Alternativ gibt es Filter mit extrem großen Poren, bei denen nur Partikel abgefangen werden, die größer als die Mikroorganismen sind. Die Mikroorganismen dagegen werden im Durchlauf vorgefunden. In diesem Fall ist allerdings nicht auszuschließen, dass Bakterien an den Partikeln hängen bleiben. Deshalb wurde die Filtration stets für Lebensmittelproben verwendet, die nur kleine Partikel beinhalten. Eine Probenvorbereitung mit Enzymen und Detergenzien kann die

---

Filtrierbarkeit verbessern, aber auch einen negativen Einfluss auf die Zellviabilität haben [226]. Mit den nächsten drei Methoden, die der *Dead-End-Filtration* zugeordnet werden können, wird die Probe sowohl aufkonzentriert, als auch quantifiziert. Deshalb könnte man sie ebenso gut zu den Detektionsmethoden zählen.

Eine der Filtrationsmethoden, ist die direkte Epifluoreszenz-Filtertechnik (DEFT) [242]. Hierbei werden die Mikroorganismen durch Filtration gesammelt, mit einem Fluoreszenzfarbstoff wie z.B. Acridinorange [243] angefärbt und mit Hilfe eines Epifluoreszenzmikroskops gezählt. Die Proben müssen vorher vorfiltriert und mit einem Enzym und Detergenz vorbehandelt werden. Die Methode ist mit einer Dauer von 30 min sehr schnell und kann für vegetative Bakterienzellen, Sporen, Pilzzellen und Hefen durchgeführt werden [242]. Das manuelle Auszählen ist allerdings mühsam und die Sensitivität der Methode ist teilweise durch das Probenvolumen eingeschränkt [227].

Ähnlich verläuft die FISH-Analyse (Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, engl. *fluorescence in situ hybridisation*), bei der neben Glasträgern auch Membranfilter zum Einsatz kommen können. Ein typisches FISH-Protokoll beinhaltet vier Schritte: zunächst wird die Bakterienprobe fixiert und permeabilisiert, so dass die Hybridisierung stattfinden kann. Sie wird mit synthetischen Oligonukleotiden (15 - 30 Basenpaare lang) durchgeführt, die kovalent mit einem Fluoreszenzfarbstoff verbunden sind und gegen die 16S-rRNA (ribosomale Ribonukleinsäure) der Probe gerichtet sind. Typische Fluoreszenzfarbstoffe sind z.B. DAPI oder Fluorescein. Im Anschluss folgen Waschschriffe, um die ungebundene Probe zu entfernen, sowie die Detektion der markierten Zellen durch Mikroskopie oder Durchflusszytometrie [244].

Bei einer weiteren Filtrationsmethode, der HGMF (engl. *hydrophobic grid membrane filtration*), wie z.B. der Iso-Grid Methode (Neogen Corporation, Lansing, MI) wird die Probe in zwei Schritten filtriert [226]. Zunächst wird die Probe über einen Vorfilter mit einer Porengröße von 5 µm filtriert, um größere Partikel abzutrennen. Der Durchlauf wird dann durch einen Filter mit 0,45 µm Porengröße filtriert. Dieser ist mit einem nichttoxischen hydrophoben Material in Rastern bedruckt, um die Bakterien zu trennen und um die Oberfläche in gleichmäßige Bereiche zu teilen. Diese Aufteilung erleichtert anschließend das Auszählen der Kolonien nach einer Inkubationszeit auf einer Agarplatte [226, 227]. Die Iso-Grid Methoden für *E. coli* O157:H7, *Salmonella*, Hefe und Schimmelpilz, Coliforme und *E. coli* in Kombination mit der aeroben Gesamtkeimzahlbestimmung wurden von der *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC) zugelassen [226].

Bei der *Dead-End*-Filtration an elektropositiv geladenen Filtern wird die negative Ladung der Mikroorganismen (Zeta-Potential) ausgenutzt [227]. Sie dient allein der Aufkonzentrierung, während die Quantifizierung durch ein anderes System erfolgt. Die Filter haben mit einer Porengröße von 2 - 9  $\mu\text{m}$  den Vorteil gegenüber konventionellen Filtern (0,2 - 0,6  $\mu\text{m}$ ) [245], dass größere Volumina und verschiedene Proben behandelt werden können. Es wurden Trennungen von Bakterien aus Reinkultur, Gemüse und Milch veröffentlicht. Die Adsorption an den Filtern lag bei Bakterien in Reinkultur und Gemüse bei pH 5,0 bei über 90%, in Milch bei ca. 80%. Die Wiederfindung in den Eluaten war allerdings gering mit bis zu 16% für Bakterien in Reinkultur, 24% für Gemüse und 20% für Milch [245].

Generell lässt sich über die *Dead-End* Filtration sagen, dass sie keine besonders selektive Methode ist. Sie unterliegt der Limitierung, dass die Poren klein genug sein müssen, um die Bakterien abzufangen. Gleichzeitig werden aber größere Partikel oder oft unerwünschte Matrixbestandteile mit abgefangen, welche die Poren verblocken und/oder die darauffolgende PCR-Detektion inhibieren [226]. Es wurde herausgefunden, dass z.B. nach der Filtration mit Celluloseacetat-Filtern keine DNA-Amplifikation möglich ist. Dies wurde darauf zurückgeführt, dass die DNA an die Filter bindet und anschließend nicht zur DNA-Amplifikation verfügbar ist [246]. Eine weitere Schwierigkeit bereitet die Elution, da die Mikroorganismen meist auf der Filteroberfläche oder in den Filterporen anhaften und nicht komplett eluiert werden können. Das Problem eines anwachsenden Filterkuchens und der Porenverblockung, des sog. *Filterfoulings*, kann mit der *Crossflow*-Filtration weitgehend verringert werden [227].

Bei der *Crossflow*-Filtration, Querstromfiltration oder Parallelfiltration wird das Problem des anwachsenden Filterkuchens auf dem Filter verhindert, der bei der *Dead-End*-Filtration entsteht. Anders als bei der *Dead-End*-Filtration fließt die Probe nicht senkrecht durch den Filter, sondern wird parallel zur Filterfläche geführt. Durch diese Fließrichtung wird dafür gesorgt, dass Partikel nicht an der Filteroberfläche anhaften, sondern mit dem Fluss mitgespült werden. So ist eine Filtration großer Probenvolumina möglich [227]. Peskoller *et al.* berichteten z.B. von einer *Crossflow*-Filtration, die zur Abtrennung und Aufkonzentrierung von *E. coli* aus einer 10-L-Trinkwasserprobe durchgeführt wurde. Die Probe konnte innerhalb von 15 min und mit Wiederfindungen von  $91,3 \pm 5,4\%$  um den Faktor 200 aufkonzentriert werden [247].

Nach einem ähnlichen Prinzip läuft die Filtration in „stirred cells“ (Amicon Ltd, UK) ab. Der Filterkuchen wird durch einen Rührfisch aufgewirbelt, der sich direkt auf der Membranoberfläche befindet [226].

### 2.3.2.6 Trennung und Aufkonzentrierung über Metallhydroxide

Diese Methode ähnelt der Flokkulation, da auch hier hochmolekulare und geladene Substanzen, in diesem Fall Metallhydroxide, verwendet werden. Sie sorgen für die Verbrückung mit den Mikroorganismen zu einem losen Aggregat, das durch langsame Zentrifugation oder Filtration abgetrennt werden kann [226].

Ibrahim *et al.* beschrieben die Immobilisierung von gramnegativen Bakterien, wie z.B. *E. coli* und grampositiven Bakterien, wie z.B. *Bacillus cereus* und *Staphylococcus* spp. an Titanhydroxid mit anschließender Zentrifugation bei 1.400 x g und Wiederfindungen von 80 - 100% [248]. Weitere Veröffentlichungen beschreiben die Aufkonzentrierung von Keimen aus fettfreier Milch, wie z.B. *Listeria monocytogenes* und *Salmonella enterica* serovar *enteritidis*. Diese wurden an Zirkoniumhydroxid immobilisiert und mit Wiederfindungen von 65 - 96% auf das 0,02-fache des Volumens reduziert [249]. Cullison *et al.* gelang die Aufkonzentrierung u.a. von *B. cereus*-Sporen in fettfreier Milch mit Hilfe einer Mischung von Zirkoniumhydroxid und magnetisiertem Carbonyleisen mit Wiederfindungen von 75% bis über 90% [250].

Generell lässt sich zu der Trennung und Aufkonzentrierung über Metallhydroxide sagen, dass diese Methode relativ einfach durchzuführen, schnell und kostengünstig ist [226].

### 2.3.2.7 Immunomagnetische Separation

Die Immunomagnetische Separation (IMS) wurde durch die Entwicklung superparamagnetischer Partikel vorangetrieben. Diese Partikel besitzen magnetische Eigenschaften nur in Anwesenheit eines magnetischen Feldes [226]. Nachdem es gelang, Antikörper an der Oberfläche zu immobilisieren, wurden erste Versuche zur Isolierung und spezifischen Anreicherung von Blutzellen durchgeführt [251, 252].

Zur Aufkonzentrierung von Bakterienzellen werden diese über die Antikörper an die magnetischen Partikel gebunden. Wird ein externes magnetisches Feld angelegt, so werden die Bakterienzellen über die Bindung an die Partikel zurückgehalten. Eluiert wird anschließend, indem das Feld entfernt wird. Dadurch ist eine direkte Detektion der konzentrierten Bakterien möglich, ohne dass weitere Aufkonzentrierungs- und Abtrennungsschritte nötig sind [226].

Johne *et al.* beschrieben die IMS für *S. aureus* aus Milch [253]. Weitere Veröffentlichungen gibt es zur Isolierung von pathogenen Keimen aus Lebensmitteln [254, 255]. In den 1990ern wurde die Methode kommerzialisiert und ist seitdem z.B. von Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach) oder Dynal Inc. (Oslo, Norwegen) erhältlich [256]. Die Separation kann auch in komplexen Proben durchgeführt werden (Wasser, Lebensmittel, Blut), ohne dass das

System verblockt [256]. Die IMS kann auch mit verschiedenen analytischen Detektionsmethoden kombiniert werden, wie z.B. Durchflusszytometrie [257, 258], Real-time PCR [259] oder Mikroarrays [256].

Durch die IMS ist eine effektive und hochspezifische Trennung von Bakterien aus kompetitiver Mikroflora möglich [226]. Ebenso können Lebensmittelkomponenten und Inhibitoren abgetrennt sowie das Probenvolumen reduziert werden. Einschränkungen dieser Methode gibt es allerdings in der benötigten Bakterienkonzentration, da für eine effektive Durchführung hohe Zellkonzentrationen benötigt werden, die nur über eine vorherige Anreicherung durch Kultivierung gewährleistet werden. Verluste erleidet man während der Durchführung durch die vielen Waschschrte und durch Interferenzen mit Matrixpartikeln und anderen Komponenten. Des Weiteren ist die IMS relativ kostenintensiv und limitiert in den einsetzbaren Volumina [226].

## **2.4 Antikörper zur Abtrennung und Aufkonzentrierung sowie Detektion von Mikroorganismen aus Probenmatrizes**

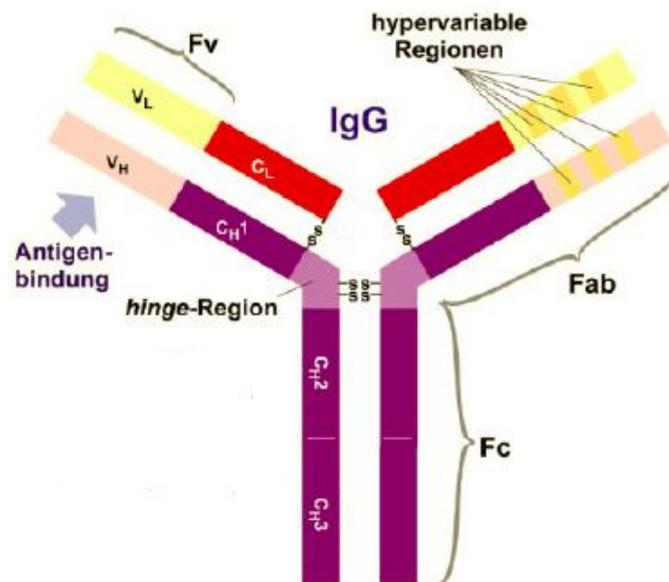
Das Herzstück der in dieser Dissertation beschriebenen monolithischen Immunfiltration und Antikörper-Mikroarrays sind Antikörper, die entweder auf der Oberfläche der monolithischen Affinitätssäule oder des Mikroarray-Chips immobilisiert sind. Ihre Struktur und Wirkweise sowie der Unterschied von polyklonalen und monoklonalen Antikörpern werden im folgenden Kapitel näher beschrieben.

### **2.4.1 Struktur eines Antikörpers und Antigenerkennung**

Antikörper, auch Immunglobuline (Ig) genannt, gehören zum Immunsystem von Wirbeltieren und werden als Reaktion auf fremde Substanzen, sog. Antigene produziert. Ihre Hauptaufgabe ist es, diese spezifisch zu binden und für das restliche Immunsystem zu markieren [260]. Sie sind im Blutserum und anderen Körperflüssigkeiten wie z.B. Magensäften oder Milch vorzufinden. Ein Serum, das Antikörper gegen spezifische Antigene enthält, wird oftmals als Antiserum bezeichnet [21]. Das Immunsystem eines Tiers kann einer Schätzung nach mindestens  $10^5$  verschiedene Antikörper herstellen, die Obergrenze ist nicht bekannt [261].

Durch B-Lymphozyten werden fünf verschiedene Antikörper-Isotypen produziert: IgM, IgG, IgA, IgE und IgD. Die Immunglobuline G (IgG) treten am häufigsten auf [260], da sie etwa

80% der Immunglobuline im menschlichen Serum ausmachen [21]. Sie lassen sich weiter in Unterklassen unterteilen ( $\text{IgG}_1$ ,  $\text{IgG}_2$ ,  $\text{IgG}_3$  und  $\text{IgG}_4$ ). Ihre Unterschiede sind genetischer, struktureller und funktioneller Art [21], da z.B. die Anzahl ihrer Disulfidbrücken variiert [262]. Die Grundstruktur eines  $\text{IgG}$  (ca. 150 kDa) besteht aus zwei leichten (je 25 kDa mit etwa 220 Aminosäuren (AS)) und zwei schweren (je 50 kDa mit etwa 440 AS) Polypeptidketten [260] (siehe Abbildung 2.22).

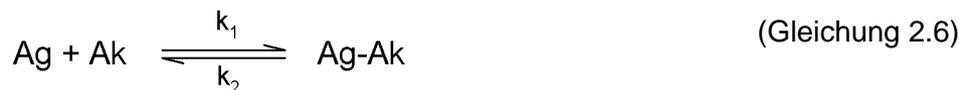


**Abbildung 2.22:** Schematische Darstellung eines Antikörpers [260] (modifiziert).

Die Polypeptidketten sind kovalent über Disulfidbrücken miteinander verbunden und bilden eine symmetrische Y-förmige Struktur [21]. Die leichten Ketten bestehen je aus zwei Domänen, der aminoterminalen, variablen Domäne ( $V_L$ ) und der carboxyterminalen, konstanten Domäne ( $C_L$ ). Die schweren Ketten setzen sich dagegen aus je vier Regionen zusammen, aus einer aminoterminalen, variablen ( $V_H$ ) und drei konstanten Domänen ( $C_{H1}$ ,  $C_{H2}$  und  $C_{H3}$ ) [260].

Die Fab-Regionen (engl. *fragment of antigen binding* [21]) sind jeweils mit den Fc-Regionen (engl. *fragment crystallizable* [21]) über die hinge-Region verbunden. Dieses „Scharnier“ erlaubt es, den Abstand der beiden Fv-Fragmente so anzupassen, dass das Antigen binden kann [260]. Die beiden Fv-Regionen sind jeweils aus den variablen Domäne der leichten ( $V_L$ ) und schweren Kette ( $V_H$ ) aufgebaut und sorgen für die Antigenbindung [260]. Sie bilden das so genannte Paratop, das eine komplementäre Oberfläche zum Antigen besitzt. Das Antigen wird an seinem Epitop über nichtkovalente Wechselwirkungen, d.h. Wasserstoffbrückenbindungen, elektrostatischen Wechselwirkungen und Van-der-Waals-Bindungen erkannt [260]. Die Bindungskonstanten liegen zwischen  $K_D = 10^{-4}$  M und  $K_D = 10^{-10}$  M [263]. Die

Stabilität des Antigen-Antikörper-Komplexes hängt dabei von der Affinität des Paratops zum entsprechenden Epitop ab. Es handelt sich bei der Antigen-Antikörper-Reaktion um eine Gleichgewichtsreaktion, die dem Massenwirkungsgesetz unterliegt [260, 262] (Gleichung 2.6). Wird die Konzentration des Antigen-Antikörper-Komplexes durch das Produkt der Antigen- und Antikörperkonzentration dividiert, erhält man die Gleichgewichtskonstante  $k_c$ .



Ag	Antigen
Ak	Antikörper
Ag-Ak	Antigen-Antikörper-Komplex
$k_1$	Geschwindigkeitskonstante der Hinreaktion
$k_2$	Geschwindigkeitskonstante der Rückreaktion

Beim Immunsystem wird zwischen dem angeborenen und dem adaptierten Immunsystem unterschieden. Bakterien können durch das angeborene Immunsystem erkannt werden. Dieses enthält spezielle Erkennungsrezeptoren (engl. *pattern recognition receptors*, PRRs), die pathogenassoziierte molekulare Muster (engl. *pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) auf der Oberfläche von Bakterien erkennen. Ein berühmtes Beispiel solcher PAMPs sind Lipopolysaccharide (LPS), die sich in der äußeren Membran von gramnegativen Bakterien befinden und beim Zerfall der Membran eine toxische Wirkung haben. Weitere Beispiele für PAMPs sind bakterielle Kohlenhydrate und bakterielle DNA [264].

Bei der Immunerkennung von *S. aureus* gibt es zusätzlich noch einen Sonderfall durch das sich auf der Zelloberfläche befindliche Protein A. Das Protein hat eine Größe von 42 kDa, das an den Fc-Term von Immunglobulin (IgG) binden kann [148]. Der Fab-Teil des IgG bleibt frei, so dass der Immunabwehr eine körpereigene Substanz vorgetäuscht wird [265]. In Mäusen treten z.B. starke Wechselwirkungen von Protein A mit den Immunglobulinen IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> und IgG<sub>3</sub> sowie schwache Wechselwirkungen mit IgG<sub>1</sub> auf [148].

## 2.4.2 Polyklonale Antikörper

Wird ein Tier mit einem Antigen immunisiert, so wird eine Mischung verschiedener Antikörper produziert, da das Antigen mehrere verschiedene Epitope auf der Oberfläche besitzt. Alle Antikörper erkennen das Antigen, jedoch binden ihre spezifischen Paratope an unterschiedlichen Stellen des Antigens. Die aufgereinigte Form dieser Mischung wird als polyklonaler Antikörper bezeichnet. Die unaufgereinigte Variante heißt polyklonales Antiserum. Es beinhaltet auch Antikörper, die bereits im Tier vorhanden waren, z.B. als

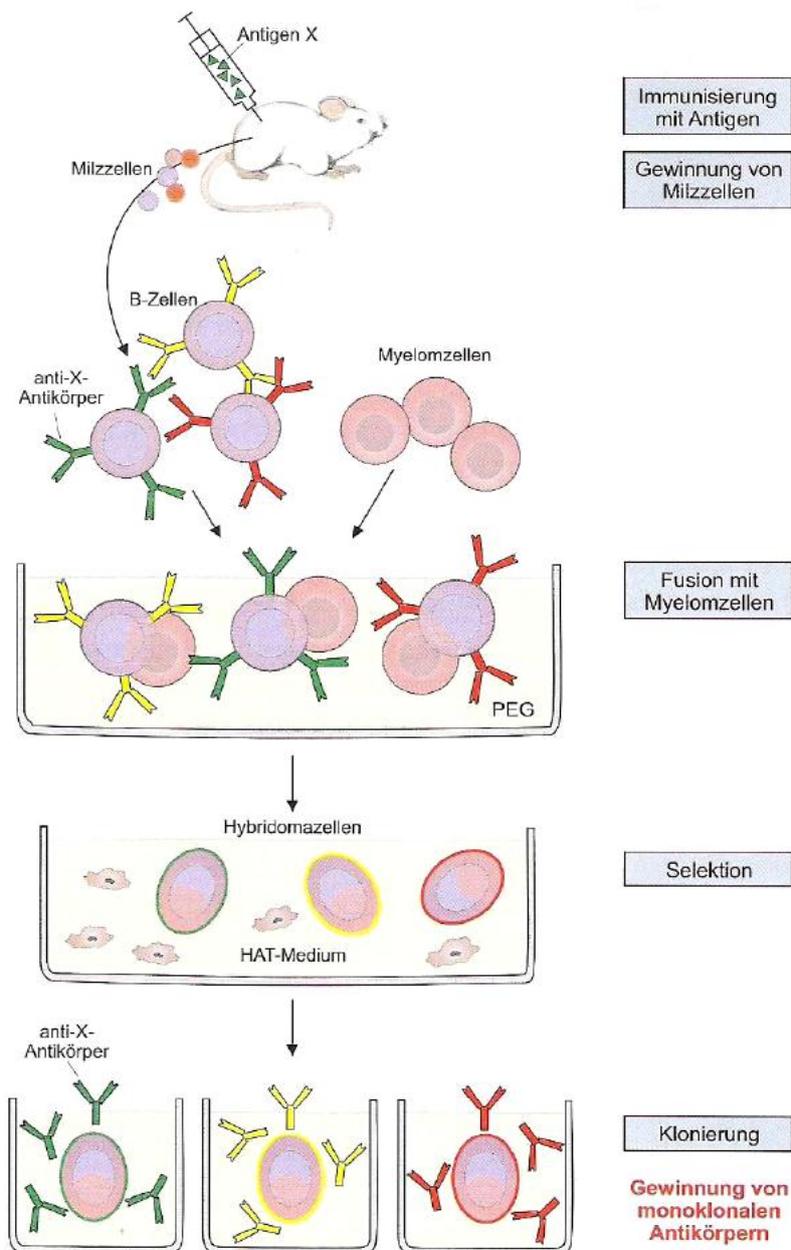
Folge von Infektionen. So kann der Anteil an gewünschten Antikörpern zwischen 1 und 10% des Gesamt-Antikörperpools betragen [262].

Polyklonale Antikörper haben viele Vorteile in der Herstellung und im Gebrauch. Sie sind preisgünstig, schnell und meist unkompliziert zu gewinnen und es werden relativ große Serummengen erhalten. Aufgrund ihrer Fähigkeit, viele Epitope eines Antigens zu erkennen, können besonders sehr kleine Moleküle mit wenigen Epitopen erkannt werden. Allerdings sind Kreuzreaktivitäten keine Seltenheit, besonders, wenn das Epitop auch viele andere Antigene besitzen. Polyklonale Antikörper stehen nur in begrenztem Maße zur Verfügung. Von Tier zu Tier können daher große Schwankungen auftreten und deshalb ist eine ständige Qualitätskontrolle vonnöten [262].

### **2.4.3 Monoklonale Antikörper**

Monoklonale Antikörper werden mit Hilfe einer biochemischen Methode synthetisiert, die erstmals in den 1970ern [266] von Milstein und Köhler beschrieben wurde und für die sie 1984 den Nobelpreis für Medizin erhielten [262]. Abbildung 2.23 zeigt den Ablauf für die Produktion monoklonaler Antikörper. Nach der Immunisierung einer Maus mit einem Antigen X können B-Zellen in ihren Milzzellen vorgefunden werden, die anti-X-Antikörper produzieren. Diese B-Zellen werden mit Myelomzellen fusioniert, um sie zu immortalisieren. Myelomzellen sind unsterblich, da sie sich unbegrenzt teilen können [262, 267]. Daraus resultieren sog. Hybridomazellen. Nichtfusionierte Myelomzellen sterben in HAT-Medium (Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin) ab, da ihnen das Enzym HGPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) fehlt und können so von den fusionierten Hybridomazellen selektiert werden, die aufgrund der fusionierten Milzzellen das Enzym besitzen. Die fusionierten Hybridomazellen wachsen im HAT-Medium und werden je nach Antikörperproduktion entsprechend kloniert [267].

Monoklonale Antikörper werden aus ein und demselben B-Zell-Klon erhalten – anders als polyklonale Antikörper, die aus unterschiedlichen B-Zell-Klonen produziert werden. Monoklonale Antikörper sind deshalb spezifisch gegen genau ein Epitop des Antigens gerichtet [262].



**Abbildung 2.23:** Die Generierung von hybriden Zelllinien für die Produktion monoklonaler Antikörper [267].

Stehen Hybridomazellen zur Verfügung, lassen sich monoklonale Antikörper in großen Mengen herstellen. Es sind keine weiteren Tiere zur Herstellung mehr notwendig, da die Hybridomazellen unsterblich sind und die Antikörper weiter kloniert werden können. Die Qualität bleibt daher gleich und gewährleistet reproduzierbare Ergebnisse. Sie sind aufgrund dessen, dass sie nur ein Epitop des Antigens erkennen, wesentlich selektiver als polyklonale Antikörper [262]. Als großer Nachteil muss allerdings die aufwändige und nicht immer Erfolg versprechende Herstellung genannt werden. Da auch Hybridomazellen ihre Fähigkeit verlieren, Antikörper zu produzieren, müssen laufend die produktivsten Klone vervielfältigt

werden. Je nach Methodik kann der Vorteil, dass nur ein einziges Epitop des Antigens erkannt wird, sich auch als Nachteil herausstellen. So ist im Vergleich zum polyklonalen Antikörper die Anzahl an potentiellen Bindungsstellen reduziert, was bedeutet, dass die gewünschte Nachweisgrenze nicht erreicht werden kann [262]. Aus diesem Grund kann keine allgemein gültige Aussage getroffen werden, ob die Verwendung von monoklonalen oder polyklonalen Antikörpern besser ist, da dies je nach Art der Anwendung entschieden werden muss.



---

**TEIL 3**

**ERGEBNISSE UND DISKUSSION**

## **3 Ergebnisse und Diskussion**

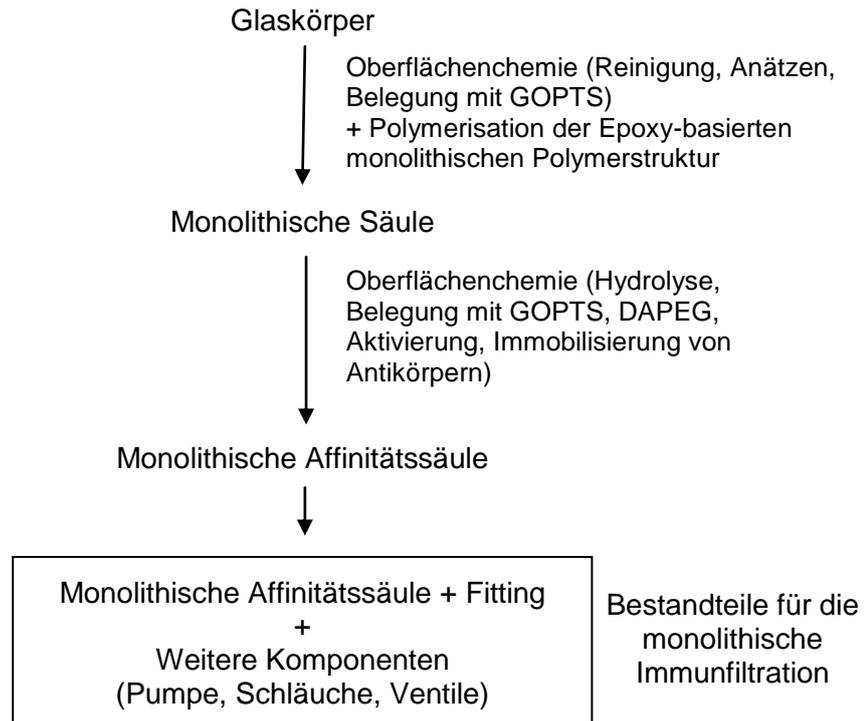
### **3.1 Aufkonzentrierung mittels monolithischer Immunfiltration**

Die monolithische Immunfiltration zur schnellen Aufkonzentrierung von Mikroorganismen (Analyt) und zur gleichzeitigen Abtrennung von Matrixbestandteilen (Matrix) wurde an einer monolithischen Affinitätssäule mit immobilisierten Analyt-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Waren in der Probe anfangs Matrix und Analyt noch gleichzeitig vorhanden, so wurden diese mittels monolithischer Säule voneinander getrennt. Der Analyt wurde durch die immobilisierten Antikörper der monolithischen Affinitätssäule abgefangen und von der Matrix abgetrennt. Im nächsten Schritt wurde die Aufkonzentrierung des Analyts vollzogen. Dies gelang durch Trennung der Analyt-Antikörper-Bindung und durch Eluieren des Analyts aus der monolithischen Affinitätssäule mit Hilfe eines Elutionspuffers. Dieser wurde in geringem Volumen und mit hoher Geschwindigkeit über die monolithische Affinitätssäule gebracht. Schließlich erhielt man im Eluat den Analyten in aufkonzentrierter Form.

#### **3.1.1 Übersicht der Komponenten für die monolithische Immunfiltration**

Zur monolithischen Immunfiltration wurden verschiedene Komponenten benötigt, die im Einzelnen charakterisiert und optimiert wurden. Abbildung 3.1 zeigt die schrittweise Herstellung der monolithischen Affinitätssäule und die Bezeichnung der einzelnen Komponenten in einem Fließschema.

Zunächst wurde die Oberfläche eines Glaskörpers modifiziert, so dass eine kovalente Bindung mit der Epoxy-basierten monolithischen Polymerstruktur möglich war. Nach der Polymerisation und Aushärtung entstand die monolithische Säule. Ihre Oberfläche wurde weiter modifiziert, so dass Antikörper immobilisiert werden konnten.

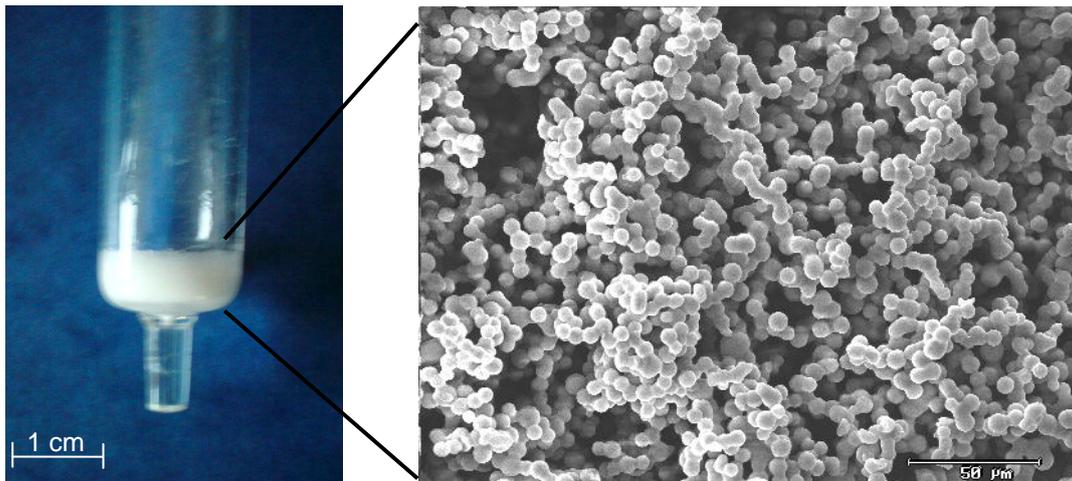


**Abbildung 3.1:** Herstellung und Bezeichnung der einzelnen Komponenten einer monolithischen Immunfiltration.

Die so entstandene monolithische Affinitätssäule wurde zur monolithischen Immunfiltration eingesetzt. Dazu musste sie mit dem System (Pumpe, Schläuche, Ventile) über ein speziell entwickeltes Fitting verbunden werden.

### 3.1.2 Charakterisierung der monolithischen Säule

Monolithische Säulen wurden durch eine kovalente Bindung der Epoxy-basierten Polymerstruktur an die modifizierte Glasinnenwand des Glaskörpers hergestellt (siehe Abbildung 3.2, links). Dazu wurde der Glaskörper an der Innenseite gereinigt, mit Säuren angeätzt und anschließend mit 3-Glycidylxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) funktionalisiert. Die kovalente Bindung mit dem monolithischen Polymer fand schließlich dort statt, wo die Epoxygruppen des GOPTS anwesend waren. Sie sorgte dafür, dass auch nach Aushärten der Polymerstruktur keine Lücke zwischen den beiden Materialien entstand. Die Struktur der hergestellten monolithischen Säule wurde durch Rasterelektronenmikroskopie (REM) charakterisiert und zeigte ein schwammartiges Netzwerk mit kontinuierlichen Durchflusskanälen (siehe Abbildung 3.2, rechts).

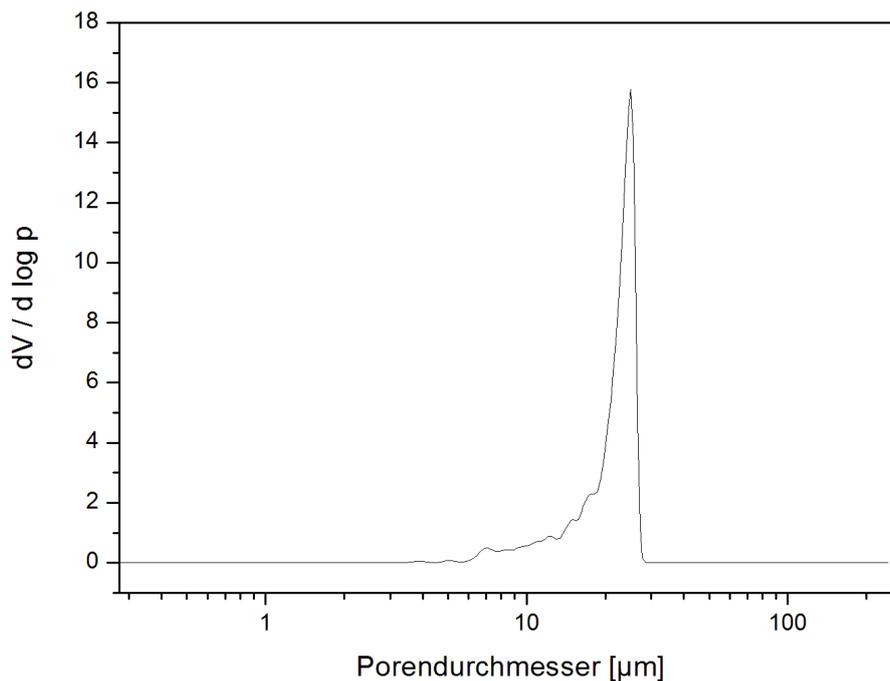


**Abbildung 3.2:** Monolithische Säule (links), REM-Aufnahme einer monolithischen Säule mit 500-facher Vergrößerung (rechts; Messung: Christine Sternkopf, IWC).

Im Vergleich zu vielen anderen Filtern ist die Kanalstruktur länger und stabiler. Lange Kanäle sind für die monolithische Immunfiltration wichtig, da an deren Oberfläche Antikörper immobilisiert werden und so die Bakterien effektiv von der Probenmatrix abgetrennt werden können. Das monolithische Polymer enthält Makroporen, besitzt eine hohe Porosität von 79% [210] und ist aus diesen Gründen optimal für die Aufkonzentrierung von Bakterien. Die Porengröße wurde mit Hilfe der Quecksilber-Porosimetrie zu  $21 \pm 7 \mu\text{m}$  bestimmt (Tabelle 3.1). Sie ist homogen verteilt (Abbildung 3.3) und stimmt sehr gut mit der in der Literatur angegebenen Porengröße von  $22 \pm 9 \mu\text{m}$  überein [210]. Weitere Parameter der monolithischen Säule sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst. Die Oberfläche beträgt  $0,68 \text{ m}^2/\text{g}$  und ist aufgrund der Makroporen kleiner im Vergleich zu anderen in der Literatur beschriebenen Monolithen, die auch kleinere Poren besitzen [268].

**Tabelle 3.1:** Parameter der monolithischen Säule ( $m = 3$ ).

Porengröße [ $\mu\text{m}$ ]	Oberfläche [ $\text{m}^2/\text{g}$ ]	Porosität [%]	Schrumpfung [%]
$21 \pm 7$ ( $22 \pm 9$ [210])	0,68	79 [210]	$5,0 \pm 0,3$ [210]

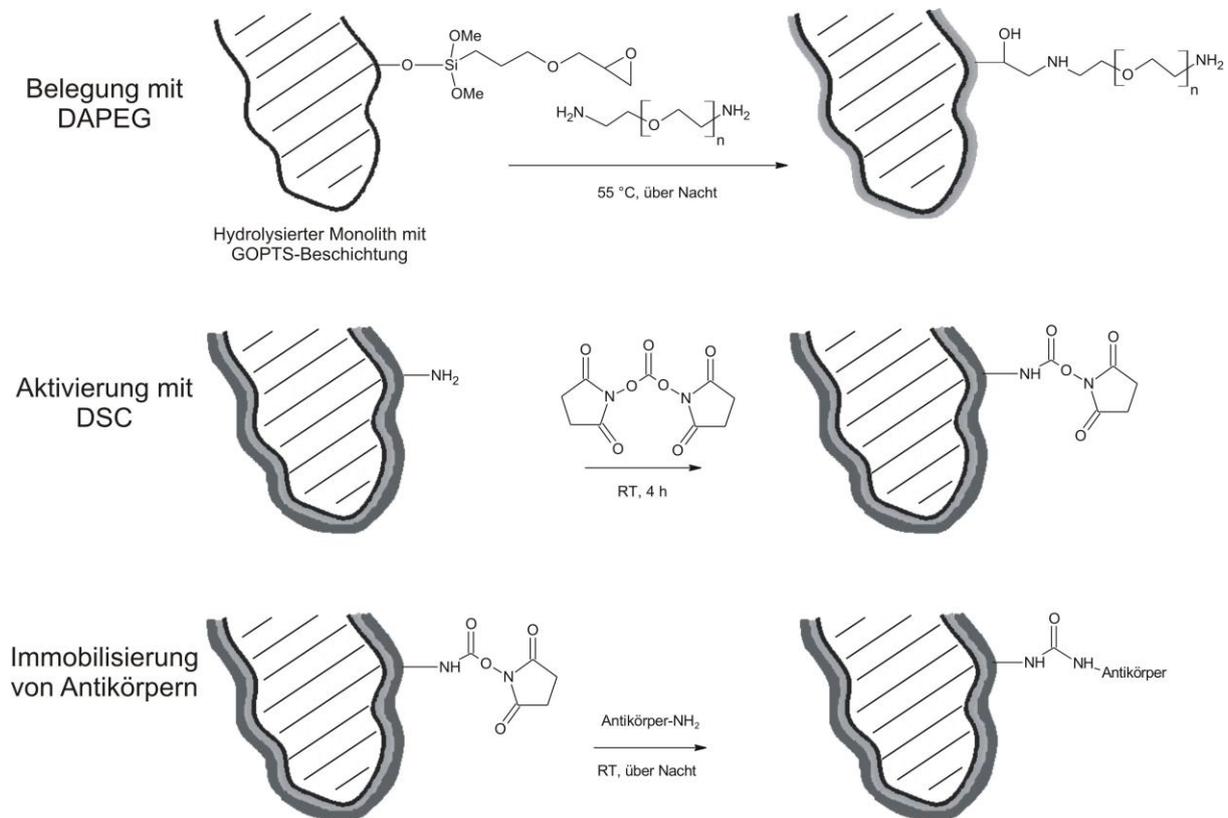


**Abbildung 3.3:** Bestimmung des mittleren Porendurchmessers der monolithischen Säule mittels Hg- Porosimetrie (Messung: Xaver Hecht, TUM).

Allerdings besitzt die monolithische Säule wegen der niedrigen Schrumpfung von  $5,0 \pm 0,3\%$  [210] eine stabilere Polymerstruktur, die auch mechanischer Beanspruchung standhält.

### 3.1.3 Charakterisierung der monolithischen Affinitätssäule

Für die Herstellung monolithischer Affinitätssäulen sind funktionelle Gruppen erforderlich, die es ermöglichen, Antikörper an der Oberfläche der monolithischen Säule zu immobilisieren. Der verwendete makroporöse Monolith zeigt die gewünschten Charakteristika, um die Oberfläche chemisch modifizieren zu können (Abbildung 3.4).



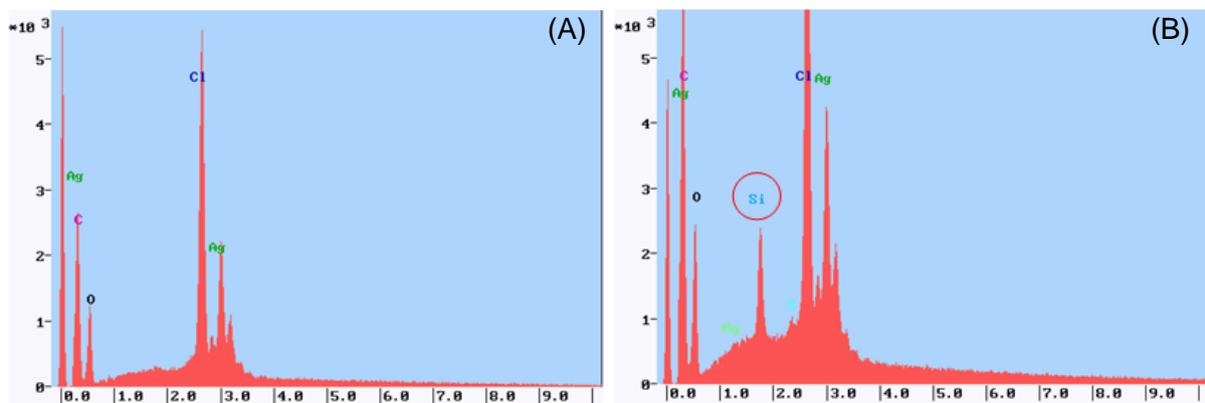
**Abbildung 3.4:** Schrittweise Modifizierung der Monolithoberfläche.

Die Epoxy-basierte Polymerstruktur wurde von Peskoller *et al.* [210] entwickelt. Die Oberflächenchemie, die von Wolter *et al.* [269] für Antikörper-Mikroarrays an Glaschips veröffentlicht wurde, konnte für die neue Anwendung abgeändert und angepasst werden. Mit Hilfe einer schrittweisen Modifizierung konnten funktionelle Schichten aufgebaut werden. Im ersten Schritt der Oberflächenmodifizierung wurden Hydroxylgruppen erzeugt, wie bereits von Jiang *et al.* 2005 [211] veröffentlicht, so dass im Anschluss GOPTS mit der monolithischen Säule reagieren konnte. Eine Silanisierungsmethode, die nicht auf Glas basiert, wurde bereits von Tang *et al.* 2010 [270] gezeigt. Nach intensiven Waschschrinen mit organischen Lösungsmitteln konnte die monolithische Säule mit geschmolzenem Diaminopolyethylenglykol (DAPEG) belegt werden [269, 271]. Die Belegung mit diesem Polymer war wichtig, um unspezifische Bindungen von Matrixbestandteilen zu unterbinden und die Antikörper auf der Oberfläche zu stabilisieren. Dies wurde bereits mit Antikörper-Mikroarrays bewiesen [73, 77]. Die Aminogruppen von DAPEG wurden mit Hilfe des homobifunktionalen Vernetzers Disuccinimidylcarbonat (DSC) aktiviert. Dadurch wurde eine N-Hydroxysuccinimid (NHS)-aktivierte Oberfläche generiert [219], die eine Immobilisierung von Antikörpern über die Aminogruppen möglich machte. Die Immobilisierungsreaktion wurde durch Zirkulieren der Antikörper über die monolithische Säule mit einer Peristaltik-

pumpe durchgeführt [156]. Zum Schluss wurde die Oberfläche mit Casein geblockt, um die übrigen NHS-Gruppen zu inaktivieren und die unspezifische Bindung der Matrix zu minimieren.

### 3.1.3.1 Nachweis von GOPTS auf der Monolithoberfläche

Die funktionalisierte Monolithoberfläche wurde nach jedem Reaktionsschritt charakterisiert. Die erfolgreiche Silanisierung mit GOPTS konnte mit der energiedispersiven Röntgenspektroskopie (EDX) nachgewiesen werden (Abbildung 3.5).

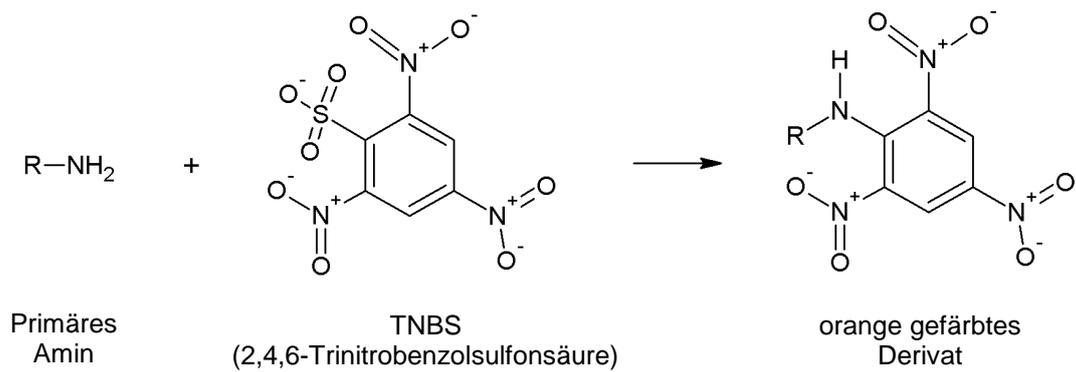


**Abbildung 3.5:** EDX-Aufnahmen einer Negativkontrolle (A) und einer Säule mit GOPTS (B) zum Nachweis des Siliziums von GOPTS (Messung: Christine Sternkopf, IWC).

Im Gegensatz zur Negativkontrolle konnte auf der mit GOPTS behandelten monolithischen Säule ein Siliziumpeak eindeutig festgestellt werden. Mit dieser Methode wurde keine kovalente Bindung mit dem Trägermaterial bewiesen, aber die Anwesenheit von GOPTS auf der Oberfläche der monolithischen Säule wurde gezeigt.

### 3.1.3.2 Nachweis von DAPEG auf der Monolithoberfläche

Der nächste Schritt, den es nachzuweisen galt, war die Belegung mit DAPEG, welche mit Hilfe des 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-Tests gezeigt werden konnte (Abbildung 3.6).



**Abbildung 3.6:** Reaktionsgleichung des TNBS-Tests [272].

TNBS reagierte mit den primären Aminen des DAPEG zur einem orange gefärbten Derivat. Die monolithische Säule ohne DAPEG-Belegung dagegen blieb farblos (Abbildung 3.7).

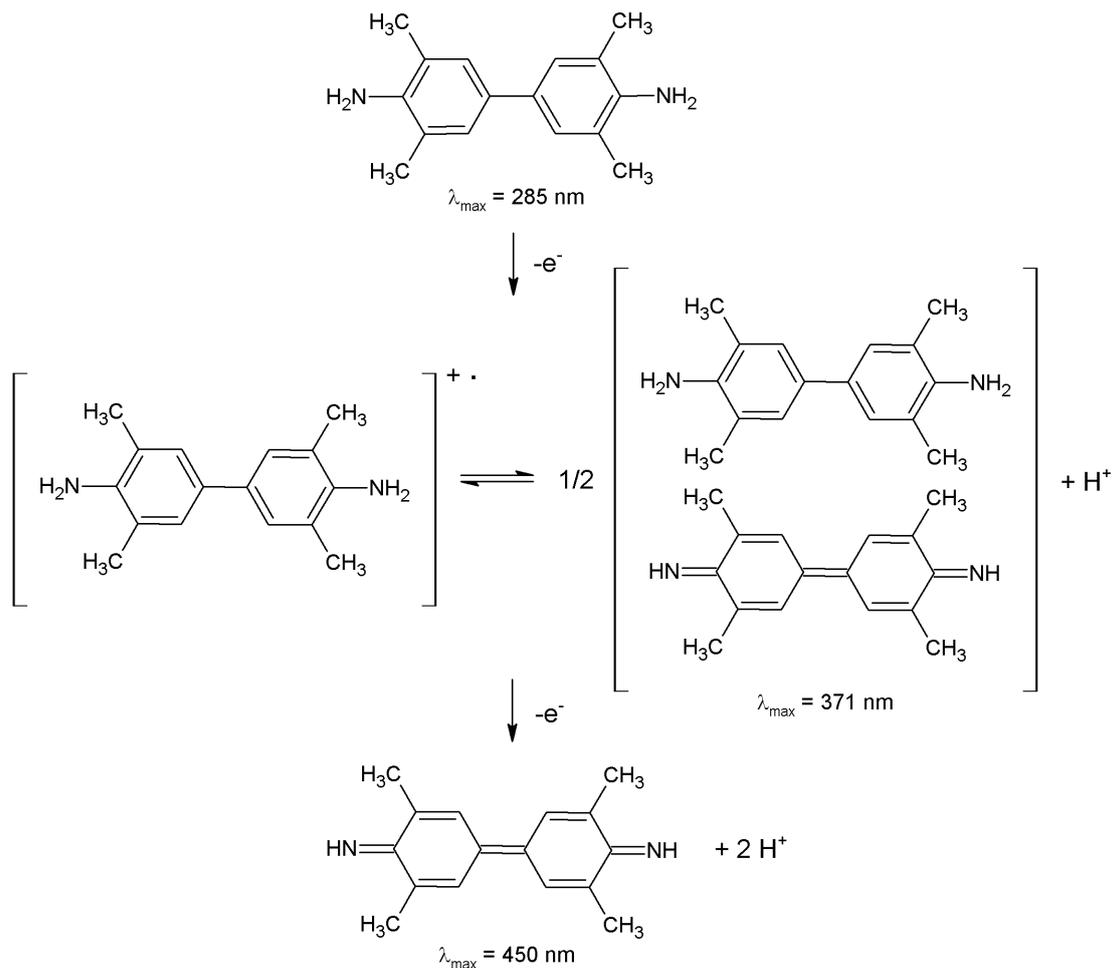


**Abbildung 3.7:** TNBS-Test: Negativkontrolle (links) und Säule mit DAPEG-Belegung (rechts) zum Nachweis der DAPEG-Belegung.

Wie im vorangegangenen Schritt konnte die Belegung auf der Oberfläche der monolithischen Säule gezeigt werden, nicht aber die kovalente Bindung.

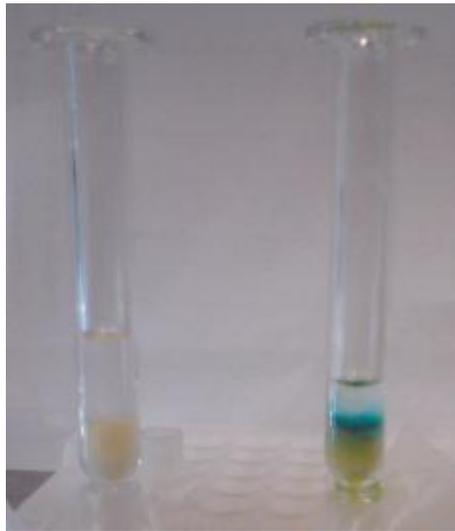
### 3.1.3.3 Nachweis von Antikörpern auf der Monolithoberfläche

Die Belegung mit den beiden aufeinander folgenden Schichten GOPTS und DAPEG wurde bereits gezeigt. Mit Hilfe von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), das zur Farbreaktion bei ELISAs (Enzymgekoppelter Immunadsorptionstests, engl. *enzyme-linked immunosorbent assays*) eingesetzt wird, wurde die Anwesenheit von Antikörpern auf der Monolithoberfläche nachgewiesen. Die Reaktion von TMB ist nachfolgend dargestellt (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8:** Reaktion von TMB [273].

Für diesen Nachweis wurden zwei verschiedene monolithische Säulen verwendet. Auf der einen wurden Antikörper gegen Meerrettichperoxidase (anti-HRP) auf der Oberfläche immobilisiert. Die andere monolithische Säule ohne Antikörperbelegung diente als Negativkontrolle. Das Enzym Meerrettichperoxidase (HRP) wurde auf beide Säulen aufgebracht. Abgefangen wurde HRP jedoch nur durch die Säule mit immobilisiertem anti-HRP. Bei der Leersäule als Negativkontrolle blieb das Enzym nicht in der Säule hängen, sondern passierte diese ungehindert. Das anschließende Durchspülen sorgte dafür, dass das ungebundene HRP aus der Säule entfernt wurde. Nach der Zugabe von TMB, dessen Reaktion durch HRP katalysiert wird, konnte die Farbänderung zu einem blauen Produkt beobachtet werden (Abbildung 3.9, rechts). Auf der Negativkontrolle blieb die Farbe unverändert (Abbildung 3.9, links)



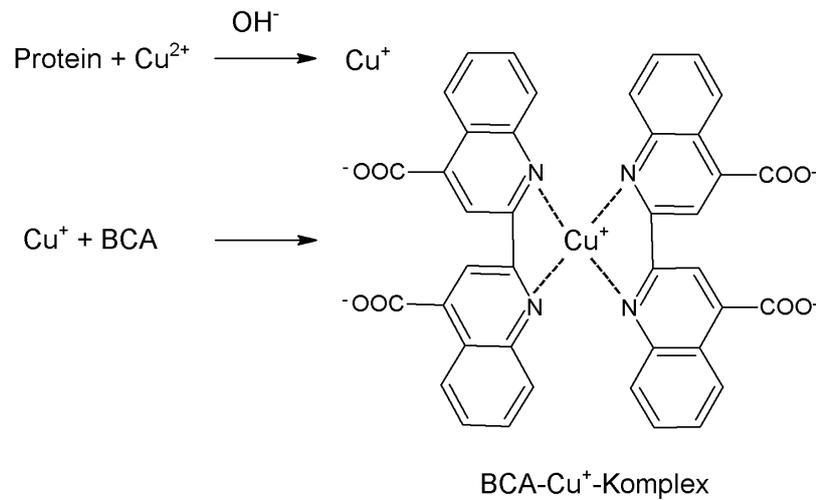
**Abbildung 3.9:** TMB-Test einer Negativkontrolle (links) und einer Säule mit anti-HRP (rechts) zum Nachweis der Antikörper-Belegung.

Es wurde beobachtet, dass sich hauptsächlich der obere Teil der Säule verfärbte. Dies könnte auf zwei verschiedene Möglichkeiten hinweisen. Entweder wurde der Großteil des Antikörpers im oberen Teil der monolithischen Säule immobilisiert und rief nur dort die Farbänderung hervor. Es könnte aber auch sein, dass der Antikörper homogen verteilt war, das Enzym aber bereits komplett im oberen Teil der monolithischen Säule abgefangen wurde, so dass ein vollständiges Durchdringen der Säule nicht möglich war.

Mit Hilfe dieses Nachweises erhielt man nur einen qualitativen Hinweis auf das Vorhandensein des Antikörpers auf der Oberfläche. Die Antikörperkonzentration auf der Oberfläche der monolithischen Säule konnte erst durch den Bicinchoninsäure (BCA)-Test im nachfolgenden Kapitel nachgewiesen werden.

### **3.1.3.4 Bestimmung der Antikörperkonzentration auf der Monolithoberfläche**

Die Antikörperbelegung auf der Monolithoberfläche und die Menge an Antikörper in mg pro g Monolith wurden bestimmt. Hierfür wurde der Monolith aus dem Glaskörper entnommen, gemörsert, in PBS-Puffer (Phosphat-Kochsalz-Puffer, engl. *phosphate buffered saline*) suspendiert und ein kommerziell erhältlicher BCA-Test durchgeführt [211]. Bei der Reaktion wurde zunächst  $\text{Cu}^{2+}$  in Anwesenheit von Proteinen zu  $\text{Cu}^+$  reduziert (Abbildung 3.10). Dieses wiederum formte mit Bicinchoninsäure einen violett gefärbten und hochstabilen Komplex, der bei einer Wellenlänge von 562 nm sein Absorptionsmaximum hat [274].



**Abbildung 3.10:** Reaktion von BCA [274].

Zunächst wurde mit dem Antikörper anti-HRP untersucht, welche Arten der Aktivierung und Antikörper-Immobilisierung am effektivsten sind. Dazu wurden die monolithischen Säulen stehend und zirkulierend bei Raumtemperatur (RT) mit dem Aktivierungsreagenz bzw. der Antikörperlösung inkubiert. Bei der stehenden Inkubation wurden diese auf die monolithische Säule pipettiert und es wurde auf eine vollständige Benetzung der Oberfläche geachtet. Anschließend wurde die monolithische Säule in eine Halterung gestellt, die den Auslass abdichtete. Bei der zirkulierenden Inkubation wurde die monolithische Säule über das PTFE-Fitting mit einem Schlauch verbunden. Das Aktivierungsreagenz bzw. die Antikörperlösung wurde dazu über eine Peristaltikpumpe im Kreislauf mit einer Geschwindigkeit von ca. 0,5 mL/min über die monolithische Säule geführt. Die durch den BCA-Test erhaltene immobilisierte Antikörperkonzentration in mg pro g Monolith ist in Tabelle 3.2 aufgetragen.

**Tabelle 3.2:** Immobilisierte Antikörperkonzentration in mg pro g Monolith in Abhängigkeit von der Aktivierungs- und Inkubationsmethode ( $m = 3$ ).

Aktivierung	Antikörper-Immobilisierung (über Nacht)	Immobilisierter Antikörper [mg/g]
24 h zirkulierend	zirkulierend	$4,7 \pm 2,2$
4 h stehend	zirkulierend	$3,7 \pm 1,7$
24 h zirkulierend	stehend	$2,1 \pm 1,9$

Vergleicht man die unterschiedlichen Antikörper-Immobilisierungsmethoden miteinander, so zeigt sich, dass die Variante mit Zirkulation mehr Erfolg versprach ( $4,7 \pm 2,2$  mg/g immobilisierter Antikörper) als die stehende Methode ( $2,1 \pm 1,9$  mg/g immobilisierter

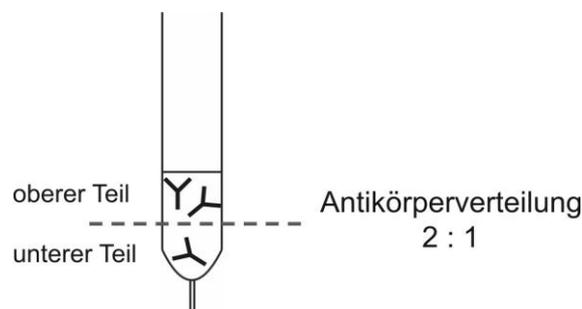
Antikörper). Dies hatte den Grund, dass die Antikörper in Bewegung waren, mehrmals über die aktivierte Oberfläche gepumpt wurden und somit die Wahrscheinlichkeit höher war, einen Bindungsplatz anzutreffen. Vergleicht man bei gleich bleibender zirkulierender Antikörper-Immobilisierung die Aktivierungsmethoden miteinander, so zeigt sich, dass bei der zirkulierenden Aktivierung für 24 h mit  $4,7 \pm 2,2$  mg/g mehr Antikörper gebunden wurde als bei der stehenden Methode (4 h) mit  $3,7 \pm 1,7$  mg/g. Mit 24 h nahm diese Methode allerdings sehr viel mehr Zeit in Anspruch, so dass die Variante der stehenden Aktivierung für 4 h effektiver war.

Um die Antikörperverteilung im oberen und unteren Teil der monolithischen Affinitätssäule zu messen, wurde diese horizontal geschnitten und der BCA-Test mit den einzelnen Hälften durchgeführt.

**Tabelle 3.3:** Immobilisierte Antikörperkonzentration in mg pro g Monolith in Abhängigkeit vom Bereich im Monolith ( $m = 3$ ).

Monolith	Immobilisierter Antikörper [mg/g]
Oberer Teil	$5,0 \pm 2,8$
Unterer Teil	$2,1 \pm 0,5$
Mittelwert	$3,7 \pm 1,7$

Es stellte sich heraus, dass die Antikörperverteilung in der monolithischen Affinitätssäule nicht ganz homogen war (Tabelle 3.3). Wurde im oberen Teil eine Antikörperkonzentration von  $5,0 \pm 2,8$  mg/g gemessen, so war es im unteren Teil mit  $2,1 \pm 0,5$  mg/g etwas weniger als die Hälfte (Abbildung 3.11). Als Mittelwert wurden  $3,7 \pm 1,7$  mg/g erhalten.



**Abbildung 3.11:** Schematische Darstellung der Antikörperverteilung.

Mit dieser Erkenntnis lässt sich auch das in Kapitel 3.1.3.3 erhaltene Ergebnis erklären, da auch dort im oberen Bereich der monolithischen Affinitätssäule eine höhere Antikörperkonzentration vorzufinden war.

Als preisgünstigere Alternative wurde anti-HRP für die Vorversuche verwendet. Nimmt man anstatt dessen Antikörper gegen *S. aureus* (anti-*S. aureus*), so erhält man auf der monolithischen Säule eine Menge von  $2,4 \pm 0,5$  mg anti-*S. aureus* pro g Monolith. Dieser Wert ist kleiner als für andere in der Literatur beschriebenen Monolithe. Größere Antikörperkonzentrationen konnten bei Monolithen mit Mikro- und Mesoporen immobilisiert werden, da diese eine größere Oberfläche besitzen [211, 275]. Für die monolithische Immunfiltration von Bakterien konnten allerdings nur Trägermaterialien ohne Mikro- und Mesoporen verwendet werden, weshalb die Oberfläche limitiert war.

### 3.1.4 Optimierung des Verbindungsstücks für den Glaskörper

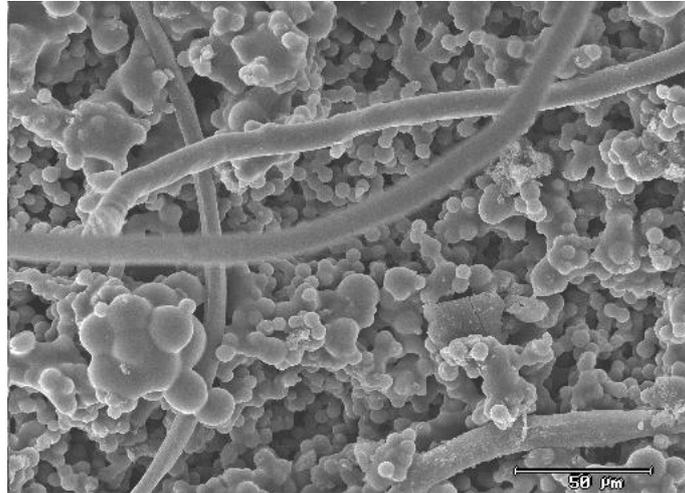
Das speziell angefertigte Fitting verbindet den 1-mL-Glaskörper der monolithischen Affinitätssäule mit dem Aufbau zur Bakterienaufkonzentrierung. Die Länge und das Material wurden hinsichtlich einer einfachen Anwendung und dauerhaften Stabilität optimiert. Bei der älteren Version musste der Glaskörper gekürzt werden, da man das Totvolumen möglichst klein halten wollte (Abbildung 3.12, linkes Fitting).



**Abbildung 3.12:** POM-Fitting (links), PTFE-Fitting (rechts).

Es stellte sich jedoch als schwierig heraus, das Glas an der gewünschten Stelle zu brechen. Ebenso entstanden dadurch scharfe Bruchkanten, sodass beim Aufsetzen des Fittings Material abgeschabt wurde und es dadurch nicht komplett abdichtete. Das Material Polyoxymethylen (POM) versprödete zudem sehr schnell bei Säurekontakt, wie z.B. bei der Hydrolyse mit 0,5 M Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ). Dies machte sich auch durch Verfärben der

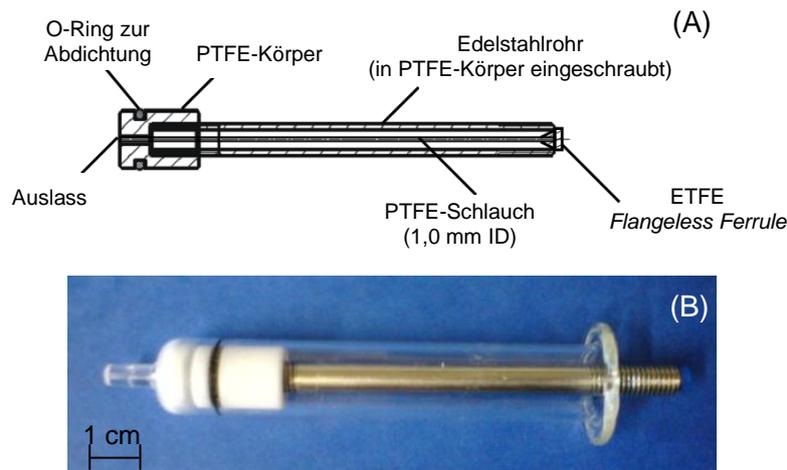
monolithischen Säule an der Oberseite bemerkbar. Eine REM-Aufnahme machte die Ablösungen sichtbar (Abbildung 3.13).



**Abbildung 3.13:** REM-Aufnahme der Oberseite einer monolithischen Säule mit POM-Ablösungen, 500-fache Vergrößerung (Messung: Christine Sternkopf, IWC).

Das neu konstruierte Fitting (Abbildung 3.12, rechts) dagegen bestand aus dem chemisch inerten Material PTFE (Polytetrafluorethylen, Teflon), das auch stabil gegen die Behandlung mit Säuren war. Der Glaskörper musste nicht mehr geschnitten werden, wodurch sich das Totvolumen von 19 µL auf 54 µL vergrößerte, sich die Anwendung aber vereinfachte. Der O-Ring sorgte für Halt und Abdichtung des Fittings im Glaskörper. Durch das komplette PTFE-Fitting wurde ein PTFE-Schlauch durchgezogen, der bei starker Kontamination ausgetauscht werden konnte. Ein eingefrästes Gewinde an der Oberseite des PTFE-Fittings ermöglichte es, das Fitting in ein Ventil zu schrauben.

Für die später verwendeten 8-mL-Glaskörper wurde die Größe des PTFE-Fittings hochskaliert. Es bestand größtenteils aus einem kostengünstigeren Edelstahlrohr, in das an beiden Enden ein Gewinde eingefräst war. So konnte das Edelstahlrohr am einen Ende in den PTFE-Körper (mit O-Ring zur Abdichtung am Glaskörper) eingeschraubt werden und am anderen Ende in ein Ventil zur Verbindung mit der Aufkonzentrierungsapparatur (siehe Abbildung 3.14).



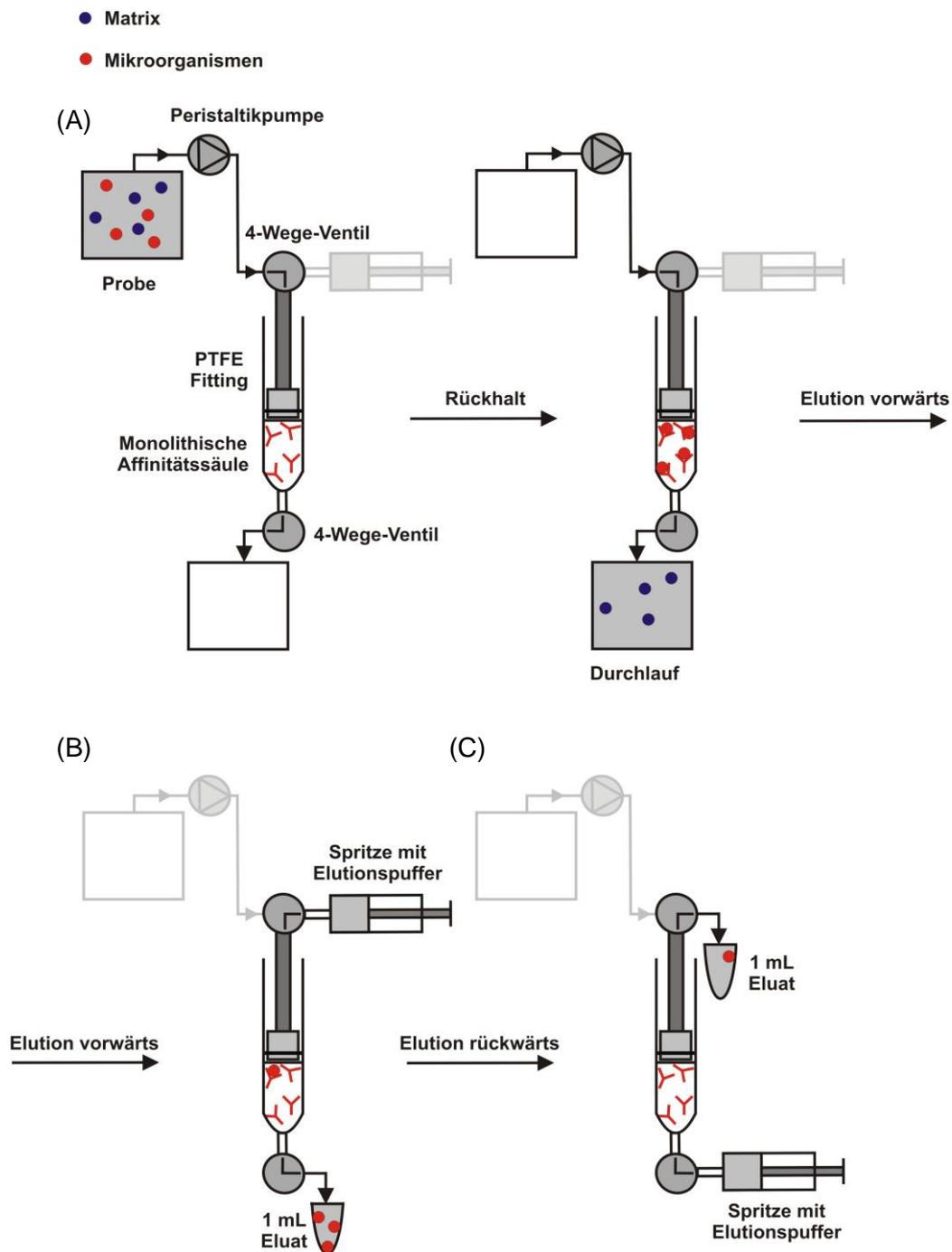
**Abbildung 3.14:** (A) Konstruktionszeichnung des PTFE-Fittings, (B) PTFE-Fitting verbunden mit einer monolithischen Säule.

Durch das gesamte Edelstahlrohr und den PTFE-Körper war ein PTFE-Schlauch (1,0 mm ID, Innendurchmesser) befestigt, der am Ende des Edelstahlrohrs mit einer Schlauchabschlussdichtung (ETFE *Flangeless Ferrule*) abschloss. Das Fitting war 8,9 cm lang und das Totvolumen betrug somit 70  $\mu\text{L}$ .

### 3.1.5 Aufbau der monolithischen Immunfiltration

Das Schema der monolithischen Immunfiltration ist in Abbildung 3.15 gezeigt. Zur Aufkonzentrierung von Mikroorganismen waren ein Durchflusssystem mit einer Peristaltikpumpe und einem Tygon-Schlauch (1,30 mm ID), zwei manuell drehbare 4-Wege-Ventile und die monolithische Affinitätssäule nötig. Die Ventile wurden für einen automatisierten und sicheren Ablauf der Arbeiten mit pathogenen Bakterien eingesetzt. Der Einlass der monolithischen Affinitätssäule war mit dem speziell angefertigten PTFE-Fitting verbunden (siehe Kapitel 3.1.4), das mit einem Abstand von weniger als 5 mm zum monolithischen Polymer befestigt wurde. Der Auslass der monolithischen Affinitätssäule wurde mit einem *male* Luer-Verbinder fixiert und mit dem zweiten Ventil verbunden. Durch die beiden drehbaren Ventile wurde eine einfache Durchführung der Elution in zwei Richtungen ermöglicht.

Die monolithische Immunfiltration konnte in drei Prozessschritte aufgeteilt werden, die in Abbildung 3.15 zu sehen sind. Zunächst wurde die Probe mit Hilfe der Peristaltikpumpe durch die monolithische Affinitätssäule befördert (Abbildung 3.15 (A)). Die Mikroorganismen wurden über Immunwechselwirkungen von den Antikörpern an den Makroporen zurückgehalten. Die Matrix wurde abgetrennt und im Durchlauf aufgefangen.

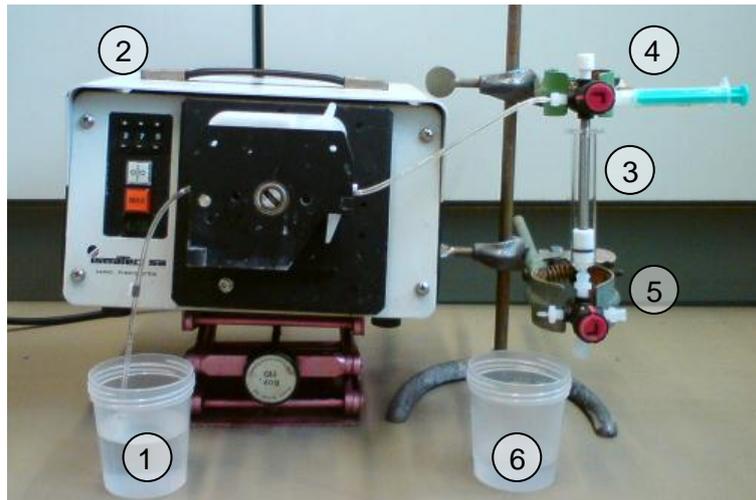


**Abbildung 3.15:** Schema der monolithischen Immunfiltration [108] (modifiziert).

Anschließend wurde die Antigen-Antikörper-Wechselwirkung der zurückgehaltenen Mikroorganismen mit einem sauren Puffer aufgebrochen und die Mikroorganismen aus der monolithischen Affinitätssäule eluiert. Um ein hoch konzentriertes Eluat zu erhalten, wurde der Analyt mit einem kleinen Volumen und hohen Geschwindigkeiten eluiert. Dazu wurde das obere Ventil 90° im Gegenuhrzeigersinn, das untere 90° im Uhrzeigersinn gedreht. Die Elution von 1 mL wurde manuell mit einer Spritze zunächst in Vorwärtsrichtung (von oben nach unten) durchgeführt (Abbildung 3.15 (B)). Dann wurde manuell mit einer Spritze 1 mL in

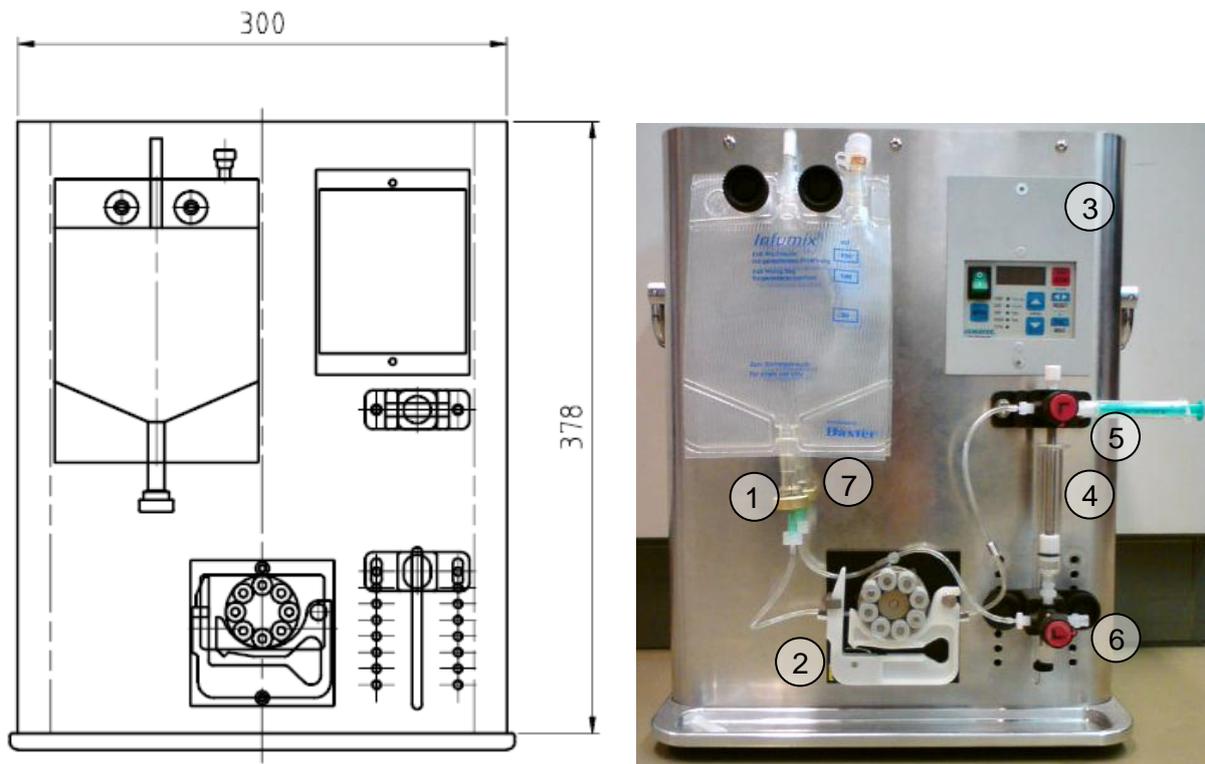
Rückwärtsrichtung (von unten nach oben) eluiert (Abbildung 3.15 (C)). Die eingesetzte Probe, der Durchlauf und die Eluate wurden für die Optimierungsschritte gemessen und die Wiederfindungen bestimmt.

Die Versuche wurden zunächst an einem ersten Aufkonzentrierungsaufbau durchgeführt (Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.16:** Erster Aufkonzentrierungsaufbau: (1) Sterilbecher mit Probe, (2) Peristaltikpumpe, (3) monolithische Affinitätssäule mit PTFE-Fitting, (4) Spritze zur Vorwärtselution, (5) Auslass zum Auffangen des Eluats (vorwärts), (6) Sterilbecher mit Durchlauf.

Nach diesem Vorbild wurde eine Aufkonzentrierungsapparatur geplant und von der institutseigenen Werkstatt aufgebaut (Abbildung 3.17). Die neue Apparatur hatte den Vorteil, dass alle Bestandteile an einem tragbaren Edelstahlgehäuse mit seitlichen Griffen zusammengefasst waren. Die Maße des Gehäuses betragen 30,0 cm x 37,8 cm x 17,5 cm (Breite x Höhe x Tiefe) und für die Probe und den Durchlauf konnten zwei Sterilbeutel eingehängt werden. Diese wurden mit Kanülen und Schlauchverbindern (*Rotilabo*®-Luer-Schlauchverbinder Luer Lock männlich für 1,6 mm ID) an den unteren Membranen mit den Schläuchen verbunden. Die Probe konnte mit einer Peristaltikpumpe (2) über die monolithische Affinitätssäule gepumpt werden. Die Schläuche wurde über einen ETFE-Schlauchadapter (*Adapter barb to male 1/4-28*) mit den Ventilen verbunden. Die monolithische Affinitätssäule mit PTFE-Fitting (4) wurde in das obere Ventil eingeschraubt, das an einem schwenkbaren Arm befestigt war. Das untere Ventil war höhenverstellbar und konnte mit Schrauben fixiert werden. Die Spritzen zur Elution wurden mit ETFE-Spritzenadaptern (*Female Luer to 1/4-28 Male*) mit den Ventilen befestigt.



**Abbildung 3.17:** Aufkonzentrationsapparat: Konstruktionszeichnung (links), Aufbau (rechts): (1) Sterilbeutel mit Probe, (2) Peristaltikpumpe, (3) Steuerungselement, (4) monolithische Affinitätssäule mit PTFE-Fitting, (5) Spritze zur Vorwärtselution, (6) Auslass zum Auffangen des Eluats (vorwärts), (7) Sterilbeutel mit Durchlauf.

Die beiden Sterilbeutel (1, 7) ermöglichten den Aufbau eines geschlossenen Systems, das dafür sorgte, dass der Anwender mit den Mikroorganismen nicht in Berührung kam. Mit Hilfe des digitalen Steuerungselements (3) konnte das zu pumpende Volumen genau eingestellt werden, nach dessen Durchlauf die Pumpe automatisch abstoppte. Ein weiterer Vorteil des Aufbaus war, dass die monolithische Affinitätssäule fest zwischen den beiden Ventilen fixiert war. So konnte weder das PTFE-Fitting bei höheren Rückdrücken herausgeschoben werden, noch die Verbindung zum *male* Luer-Verbinder am unteren Ventil gelockert werden.

### 3.1.6 Aufkonzentrierung Hitze-inaktivierter *S. aureus*-Bakterien (Protein A-positiv)

Für die Optimierung der monolithischen Immunfiltration mit Hitze-inaktivierten *S. aureus*-Zellen (Protein A-positiv) wurden die eingesetzten Proben, die Durchläufe und die Eluate mittels FCM (Durchflusszytometrie, engl. *flow cytometry*) quantifiziert. Es wurde ein kommerziell erhältlicher polyklonaler Antikörper gegen *S. aureus* von ViroStat (0,1 mg/mL) verwendet. Die Hitze-inaktivierten *S. aureus*-Zellen (Protein A-positiv,  $3,0 \cdot 10^{10}$  *S. aureus*/mL) wurden vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch (LMU) bereitgestellt. Zur

Quantifizierung am FCM wurden die Bakterien mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTO 9 und dem polyklonalen Antikörperkonjugat anti-*S. aureus*-PE-Cy5 angefärbt. Der Fluoreszenzfarbstoff und das Antikörperkonjugat wurden im FCM bei 488 nm angeregt. SYTO 9 emittierte Licht bei einer Wellenlänge von 525 nm und wurde mittels Fluoreszenzdetektor 1 (FL1) detektiert. FL3 nahm die Emission des Antikörperkonjugats anti-*S. aureus*-PE-Cy5 bei 674 nm auf. Das positive Signal beider Detektoren wurde über eine polygonale Region im Dot-Plot-Diagramm manuell ausgewählt und die Ereignisse anschließend elektronisch gezählt.

### 3.1.6.1 Optimierung der Länge der monolithischen Säule und der Flussrate

Bei einer Flussrate von 34,0 mL/min wurden die Rückdrücke für drei verschieden lange monolithische Säulen (1,9 mm, 3,7 mm und 7,4 mm) gemessen. Diese sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst.

**Tabelle 3.4:** Rückdrücke bei unterschiedlich langen monolithischen Säulen ( $m = 3$ ).

Länge der monolithischen Säule [mm]	Rückdruck [mbar]
1,9	341 ± 118
3,7	149 ± 35
7,4	308 ± 106

Der geringste Rückdruck wurde für eine Länge von 3,7 mm gemessen. Er betrug  $149 \pm 35$  mbar. Bei der doppelten Monolithlänge (7,4 mm) wurde ein Rückdruck von  $308 \pm 106$  mbar bestimmt. Dies entspricht ungefähr dem doppelten Wert zu dem vorher genannten. Bei der halben Monolithlänge (1,9 mm) wurde der halbe Rückdruck erwartet. Dieser war jedoch mit  $341 \pm 118$  mbar sehr viel höher und weist darauf hin, dass sich die Struktur und Größe der Makroporen bei dieser Länge zu den beiden anderen Längen unterscheiden.

Die ersten Aufkonzentrierungsversuche wurden mit drei verschiedenen Flussraten (0,7 mL/min, 7,0 mL/min und 34,0 mL/min) und drei verschiedenen Längen der monolithischen Affinitätssäule (1,9 mm, 3,7 mm und 7,4 mm) durchgeführt. Daraus resultierten neun verschiedene Kombinationen. Jede Kombination wurde sowohl für monolithische Affinitätssäulen (mit Antikörperbelegung) als auch für Leersäulen (ohne Antikörperbelegung)

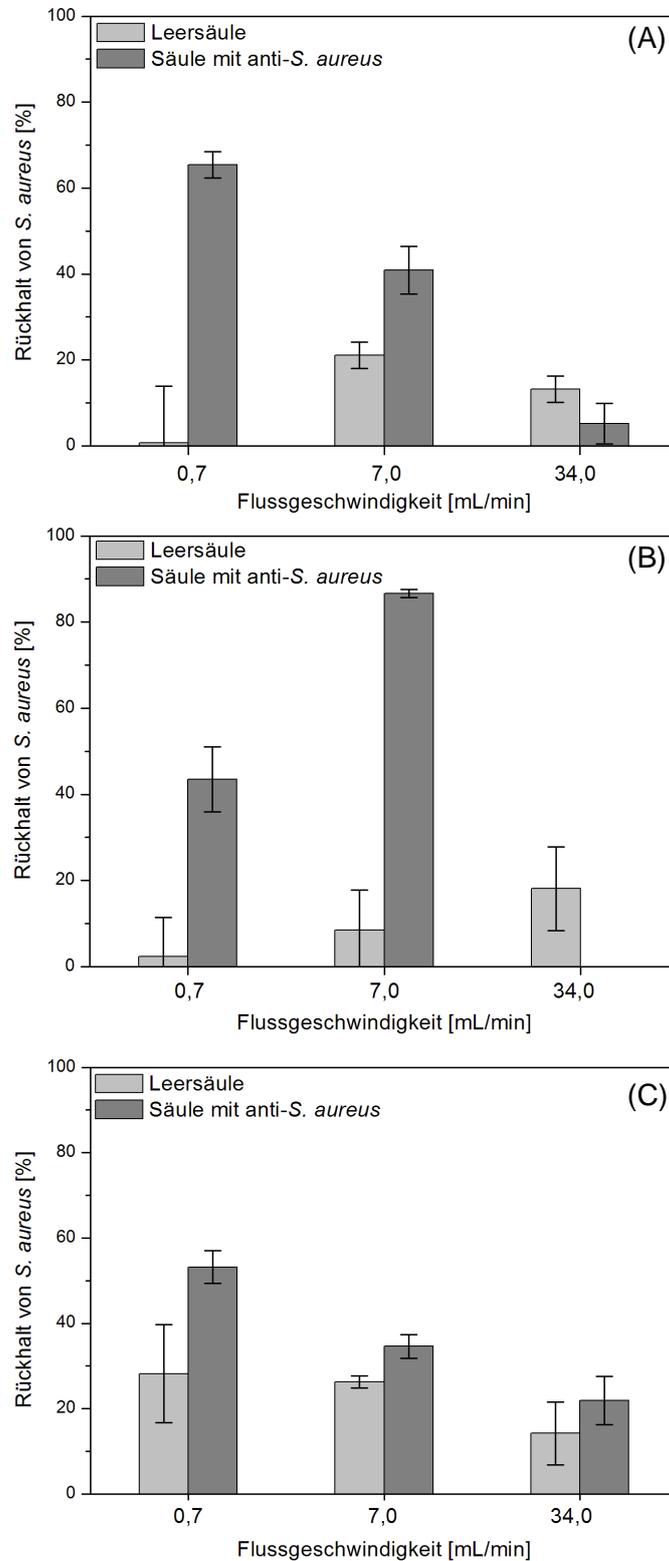
durchgeführt. Für die resultierenden 18 Möglichkeiten wurde die Wiederfindung für den Rückhalt der *S. aureus*-Bakterien bestimmt. Sie beschreibt die Anzahl an Bakterien, die in der Säule zurückgehalten werden und lässt sich nach Gleichung 5.3 (Kapitel 5.4.6) durch die Subtraktion der Wiederfindung des Durchlaufs von 100% berechnen. Abbildung 3.18 zeigt einen unterschiedlich großen spezifischen Rückhalt der *S. aureus*-Bakterien durch die immobilisierten Antikörper bei Flussraten von 0,7 mL/min, 7,0 mL/min und 34,0 mL/min. Der fehlende Balken bei Abbildung 3.18 (B) lässt sich dadurch erklären, dass die Wiederfindung des Durchlaufs überbestimmt wurde, wodurch ein negativer Wiederfindungswert für den Rückhalt erhalten wurden und deshalb nicht aufgetragen ist.

Die Säulen mit den Längen 1,9 mm und 7,4 mm zeigen für den Rückhalt ähnliche Trends, da sie wie vorher beschrieben auch ähnliche Rückdrücke bei einer Flussrate von 34,0 mL/min aufwiesen. Für höhere Flussraten wurden weniger *S. aureus*-Bakterien durch die Antikörper zurückgehalten. Da bei monolithischen Säulen der Massentransport durch Konvektion und nicht durch Diffusion in die Poren und aus diesen wieder heraus erfolgt, haben die *S. aureus*-Bakterien bei hohen Geschwindigkeiten wie z.B. 34 mL/min nur wenig Zeit, um an die Oberfläche und zum Antikörper zu gelangen. Ebenso benötigen Antigen-Antikörper-Wechselwirkungen (in diesem Fall spezifische Antigen-Antikörper-Wechselwirkung und Wechselwirkung zwischen Antikörper und Protein A) eine bestimmte Zeit, um in ein Gleichgewicht zu gelangen. Dieses Gleichgewicht ist bei einer Flussrate von 34,0 mL/min nicht mehr gegeben.

Auch für die Leersäulen sank der Rückhalt bei höheren Flussraten. Eine Ausnahme stellte die Leersäule bei 0,7 mL/min (Abbildung 3.18 (A)) dar, die einen zu vernachlässigenden Rückhalt von  $0,7 \pm 13,2\%$  aufwies und auch Ursache einer Überbestimmung des Durchlaufs sein könnte. Bei der längsten monolithischen Säule mit 7,4 mm war der unspezifische Rückhalt bei allen drei Flussraten erhöht. Der Grund dafür lag in der längeren Kanalstruktur, in der sich die *S. aureus*-Bakterien gegenseitig hindern und es zu Verbrückungen und Verblockungen kam.

Die Säulenlänge von 3,7 mm zeigt einen anderen Trend, der auf den geringeren Rückdruck zurückzuführen ist (Abbildung 3.18 (B)). Es wurde ein Maximum des spezifischen Rückhalts bei einer Flussrate von 7,0 mL/min erreicht. Bis zu  $86,6 \pm 1,0\%$  der *S. aureus*-Bakterien wurden über die Antikörper zurückgehalten. Der unspezifische Rückhalt erhöhte sich von  $2,4 \pm 9,0\%$  für 0,7 mL/min,  $8,5 \pm 9,2\%$  für 7,0 mL/min bis auf  $18,1 \pm 9,7\%$  für 34,0 mL/min. Im Vergleich zum unspezifischen Rückhalt der Säulenlänge von 1,9 mm war dieser im Durchschnitt etwas höher und im Vergleich zur Säulenlänge von 7,4 mm deutlich geringer. Der spezifische Rückhalt lag bei 7,0 mL/min und einer Säulenlänge von 3,7 mm bei ca. 78%

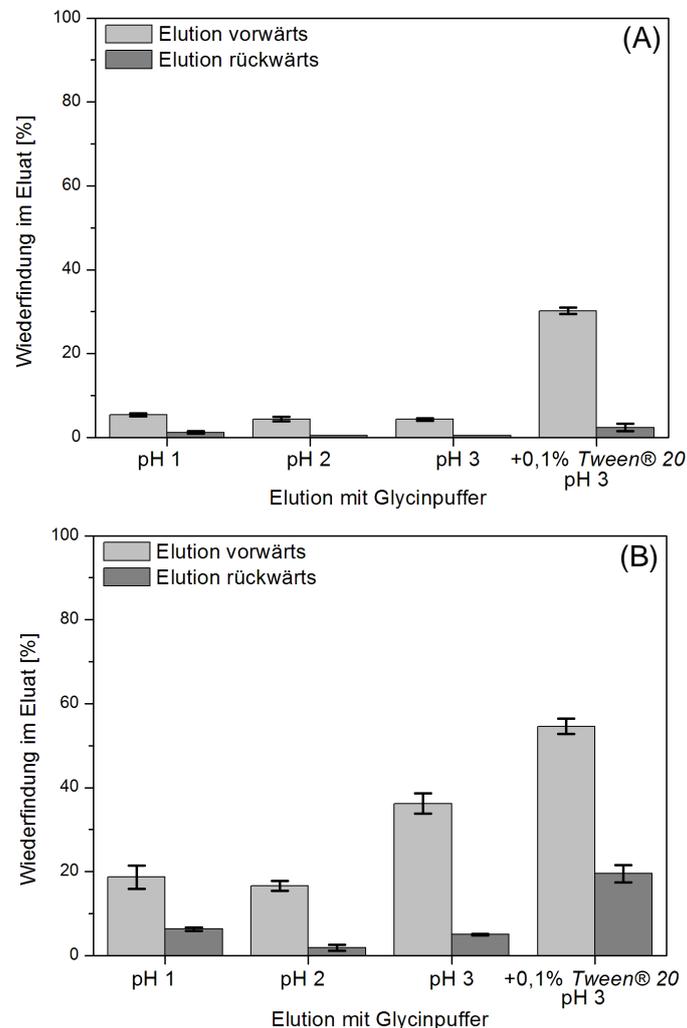
und lieferte die besten Ergebnisse. Aus diesem Grund wurde mit diesen Bedingungen weitergearbeitet.



**Abbildung 3.18:** Rückhalt für drei verschiedene Längen der monolithischen Affinitätsäulen ( $m = 3$ ): (A) 1,9 mm, (B) 3,7 mm und (C) 7,4 mm; eingesetzte Probe:  $2,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL in 10 mL PBS-Puffer.

### 3.1.6.2 Optimierung der Elution

Um hohe Wiederfindungen von Hitze-inaktivierten *S. aureus*-Bakterien im Eluat zu erhalten, wurden verschiedene Elutionsgeschwindigkeiten und Elutionspuffer getestet. Dazu wurden zunächst  $2,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL in 10 mL PBS-Puffer über die monolithische Affinitätssäule gebracht. 1 mL Elutionspuffer wurde manuell (vorwärts bzw. rückwärts) mit einer Spritze in das System gegeben, indem Geschwindigkeiten von 1 - 2 Tropfen/s (langsame Elution) oder mehr als 1 mL/s (schnelle Elution) verwendet wurden. Abbildung 3.19 zeigt die Wiederfindungen im Eluat für die langsame und schnelle Elution, bezogen auf den Rückhalt auf der monolithischen Affinitätssäule. Sie wurden mit Hilfe von Gleichung 5.6 (Kapitel 5.4.6) berechnet.



**Abbildung 3.19:** Eluat für die verschiedenen Elutionsmethoden ( $m = 3$ ): (A) langsame Elution und (B) schnelle Elution; eingesetzte Probe:  $2,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL in 10 mL PBS-Puffer.

Die schnelle Elution war effektiver als die langsame, da eine hohe Geschwindigkeit den Durchgang der Bakterien durch die Porenstruktur begünstigte. Die Wiederfindung des Eluats

in Vorwärtsrichtung war größer als die in Rückwärtsrichtung, da die Elution in Vorwärtsrichtung als erstes durchgeführt wurde. Die Elution in Rückwärtsrichtung sorgte jedoch dafür, dass auch die restlichen Bakterien entfernt wurden, die sich mehr im oberen Bereich der monolithischen Affinitätsäule befanden. Es konnte gezeigt werden, dass pH 3 der beste pH-Wert war, um hohe Wiederfindungen zu erhalten. Tabelle 3.5 zeigt eine Zusammenfassung der Gesamtwiederfindungen, d.h. die Summe der Wiederfindungen aus Vorwärts- und Rückwärtselution.

**Tabelle 3.5:** Zusammenfassung der Gesamtwiederfindungen für die langsame bzw. schnelle Elution.

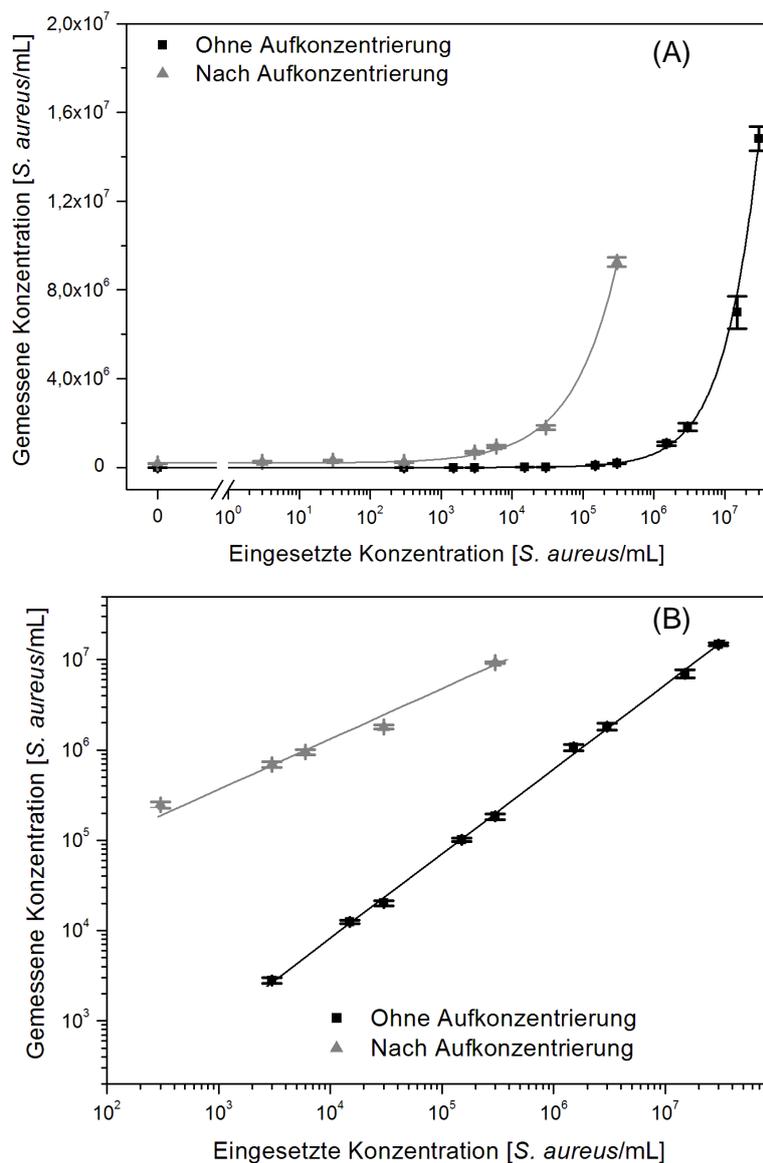
Elutionspuffer	Gesamtwiederfindung [%] langsame Elution	Gesamtwiederfindung [%] schnelle Elution
pH 1	6,7 ± 0,6	25,0 ± 3,2
pH 2	4,9 ± 0,5	17,8 ± 2,4
pH 3	4,7 ± 0,3	41,2 ± 2,6
+0,1% Tween® 20, pH 3	32,0 ± 0,5	74,1 ± 3,9

Gab man zusätzlich 0,1% nichtionisches Detergenz *Tween® 20* zum Elutionspuffer zu, welches die Grenzflächenspannung herabsetzte, wurde die Gesamtwiederfindung im Eluat um den Faktor 1,8 erhöht und eine Gesamtwiederfindung von 74,1 ± 3,9% im Eluat erhalten. Diese optimierte Elutionsmethode wurde für die weiteren Versuche verwendet.

### 3.1.6.3 Effektivität der monolithischen Immunfiltration

Um die Effektivität der monolithischen Immunfiltrationsmethode zu bestimmen, wurden die Systeme „ohne Aufkonzentrierung“ mit FCM und „nach Aufkonzentrierung“ (Kombination von monolithischer Immunfiltration und FCM) gemessen und die Kalibrierkurven aufgetragen.

Für die Kalibrierkurve „ohne Aufkonzentrierung“ wurde eine Verdünnungsreihe von zwölf verschiedenen *S. aureus*-Konzentrationen in PBS-Puffer erstellt (0; 3,0·10<sup>2</sup>; 1,5·10<sup>3</sup>; 3,0·10<sup>3</sup>; 1,5·10<sup>4</sup>; 3,0·10<sup>4</sup>; 1,5·10<sup>5</sup>; 3,0·10<sup>5</sup>; 1,5·10<sup>6</sup>; 3,0·10<sup>6</sup>; 1,5·10<sup>7</sup>; 3,0·10<sup>7</sup> *S. aureus*/mL) und am FCM gemessen. Die zweite Kalibrierkurve wurde nach Aufkonzentrierung acht verschiedener 1-L-PBS-Proben mit zugesetzten *S. aureus*-Zellen (0; 3,0·10<sup>0</sup>; 3,0·10<sup>1</sup>; 3,0·10<sup>2</sup>; 3,0·10<sup>3</sup>; 6,0·10<sup>3</sup>; 3,0·10<sup>4</sup>; 3,0·10<sup>5</sup> *S. aureus*/mL) bei einer Geschwindigkeit von 7,0 mL/min erhalten (Abbildung 3.20).



**Abbildung 3.20:** (A) Kalibrierkurven für *S. aureus*: ohne Aufkonzentrierung:  $m = 3$ ,  $n = 12$ ,  $R^2 = 0,9751$ ; nach Aufkonzentrierung:  $m = 3$ ,  $n = 8$ ,  $R^2 = 0,9854$ ; (B) linearer Bereich: ohne Aufkonzentrierung:  $m = 3$ ,  $n = 9$ ,  $R^2 = 0,9928$ ; nach Aufkonzentrierung:  $m = 3$ ,  $n = 5$ ,  $R^2 = 0,9998$ .

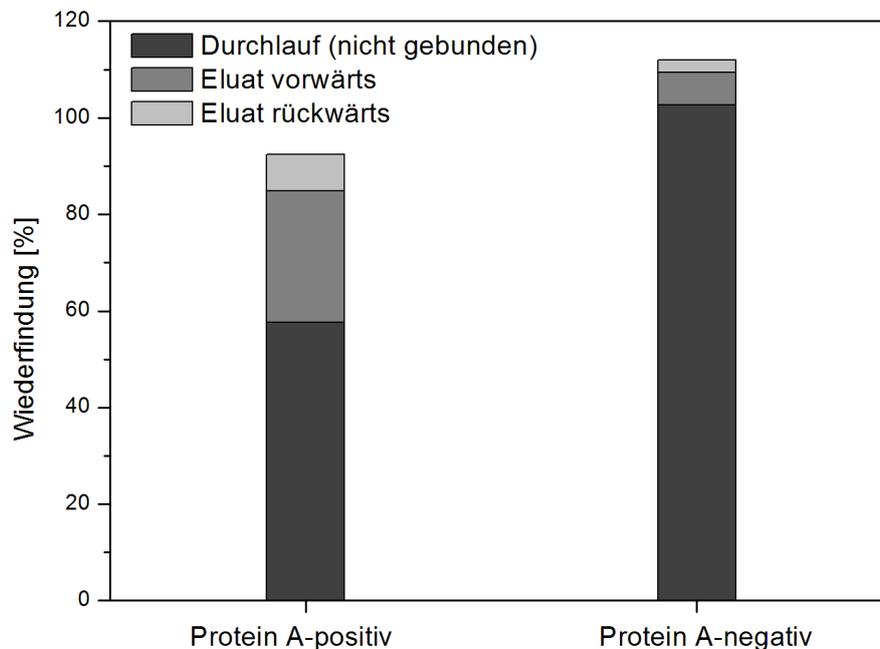
Vergleicht man beide Kalibrierkurven miteinander, so wird deutlich, dass der lineare Bereich der Kurve „nach Aufkonzentrierung“ nach links verschoben ist. Dies zeigt sich auch beim Vergleich zweier Punkte, da die eingesetzten Konzentrationen für  $3,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL „ohne Aufkonzentrierung“ und für  $3,0 \cdot 10^4$  *S. aureus*/mL „nach Aufkonzentrierung“ der gleichen gemessenen Konzentration von  $1,8 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL entsprechen. Der lineare Bereich ohne Aufkonzentrierung liegt im Bereich von  $3 \cdot 10^3$  -  $3 \cdot 10^7$  *S. aureus*/mL, wohingegen der lineare Bereich nach der Aufkonzentrierung mit  $3 \cdot 10^2$  -  $3 \cdot 10^5$  *S. aureus*/mL um den Faktor 10 zu niedrigeren Konzentrationen verschoben ist. Das bedeutet, dass mit

Hilfe der monolithischen Immunfiltration bei geringeren Konzentrationen gemessen werden kann.

### 3.1.7 Aufkonzentrierung lebender Mikroorganismen

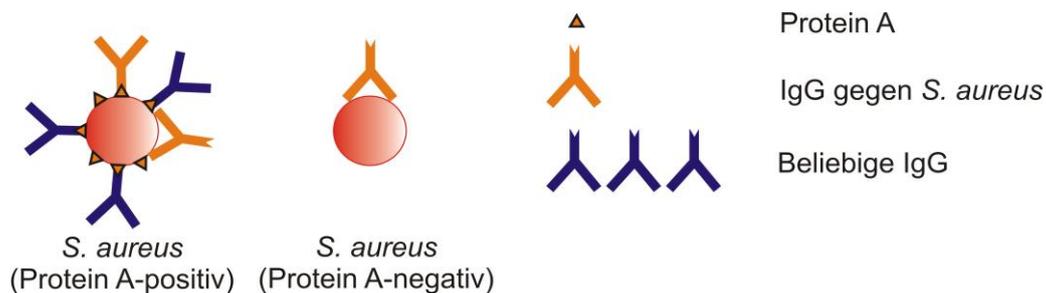
#### 3.1.7.1 *S. aureus*-Bakterien (Protein A-positiv und Protein A-negativ)

Für den Versuch wurde gefälltes polyklonales Antiserum gegen *S. aureus* aus Kaninchen (anti-*S. aureus*, 5,0 mg/mL) auf DSC-aktivierten monolithischen Säulen immobilisiert. Das Antiserum wurde vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch (LMU) erhalten. Zur Aufkonzentrierung wurden 100 mL PBS-Puffer mit  $10^5$  lebenden *S. aureus*-Bakterien versetzt und mit einer Geschwindigkeit von 7,0 mL/min über die monolithischen Affinitätsäulen gepumpt. Dazu wurden zwei verschiedene *S. aureus*-Stämme verwendet: Zum einen der Protein A-positive *S. aureus*-Stamm (MHI 348, DSM 20372), der an der Oberfläche Protein A exprimiert und somit zusätzlich zur spezifischen Bindung an den konstanten Teil von IgG-Antikörper binden kann. Zum anderen wurde der Protein A-negative *S. aureus*-Stamm (DSM 20491) eingesetzt, der nur die spezifische Bindung zum anti-*S. aureus* zulässt. In Abbildung 3.21 sind die Wiederfindungen für den Durchlauf und die Eluate für beide Stämme aufgetragen.



**Abbildung 3.21:** Quantifizierung mittels Kultivierung (Messungen: Fabian Wiescher (LMU)): Wiederfindung im Durchlauf und Eluat für Protein A-positive und Protein A-negative *S. aureus*-Zellen; eingesetzte Probe:  $10^3$  *S. aureus*/mL in 100 mL PBS-Puffer.

Ganz deutlich zeigt sich, dass die Wiederfindung vitaler *S. aureus*-Bakterien im Eluat für den Protein A-positiven Stamm mit 35% fast viermal höher war als für den Protein A-negativen mit 9%. Im Durchlauf wurden 103% Protein A-negativen *S. aureus*-Bakterien wiedergefunden und 58% Protein A-positiven *S. aureus*-Bakterien. Verantwortlich für diese Ergebnisse ist das Protein A, das bei den Protein A-positiven *S. aureus*-Zellen auf der gesamten Oberfläche verteilt ist und Bindungen mit den IgG des polyklonalen Antiserums eingeht (Abbildung 3.22).



**Abbildung 3.22:** Schematische Abbildung Protein A-positiver und Protein A-negativer *S. aureus*-Bakterien.

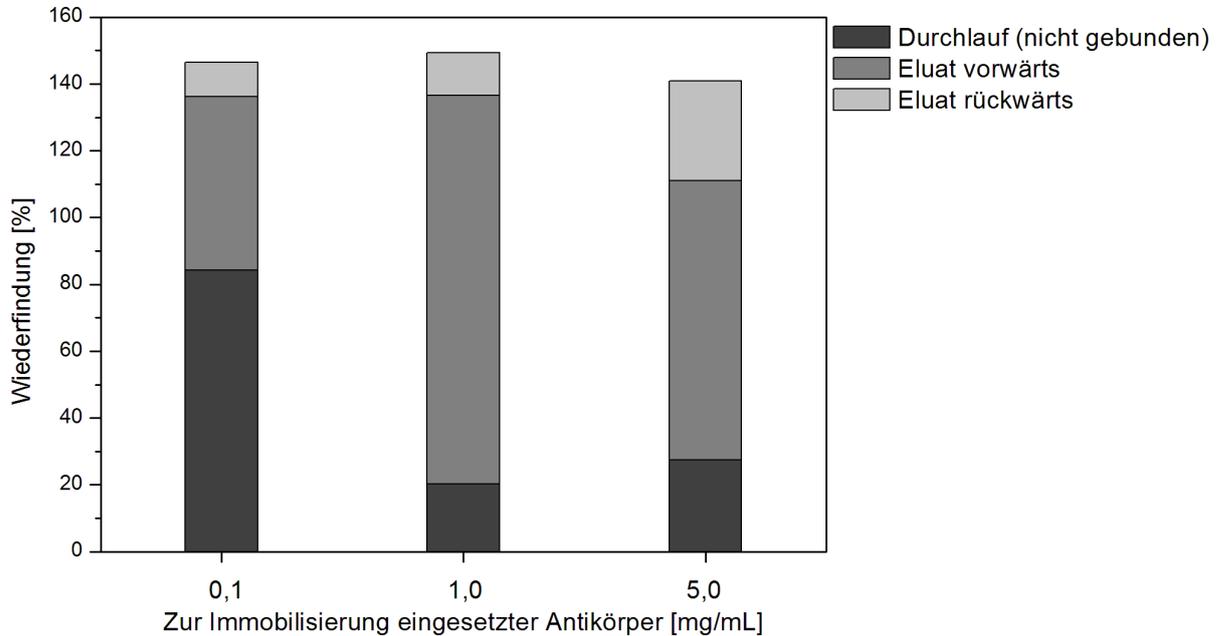
Im Gegensatz zu Protein A-negativen *S. aureus*-Bakterien musste der Antikörper nicht das zum Paratop passende Epitop finden. In besonders ungünstigen Fällen bewegt sich das Protein A-negative *S. aureus* am entsprechenden Antikörper vorbei, ohne erkannt zu werden. Obwohl zur Immunisierung beide *S. aureus*-Stämme verwendet wurden, zeigten sie in den monolithischen Affinitätssäulen unterschiedliches Bindungsverhalten mit den Antikörpern. Die spezifische Bindung der Antikörper an beide Bakterienstämme wurde allerdings vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch (LMU) mittels Enzym-Immunoassay (EIA)-Sandwich überprüft und bestätigt. Im Gegensatz zur monolithischen Affinitätssäule waren dort die Antigene anstelle von Antikörpern an eine feste Phase gebunden. Möglicherweise hatte die Immobilisierung der Antikörper an der monolithischen Affinitätssäule einen negativen Einfluss auf das Bindungsverhalten.

### 3.1.7.2 *B. cereus*-Sporen

#### 3.1.7.2.1 Variation der eingesetzten Antiserumkonzentration

Für diesen Versuch wurden 0,1 mg/mL, 1,0 mg/mL und 5,0 mg/mL des gefällten polyklonalen Antiserums gegen *B. cereus*-Sporen (anti-*B. cereus*-Sporen) aus Kaninchen verwendet. Drei DSC-aktivierte monolithische Säulen wurden mit je einer der drei Konzentrationen behandelt. Zur Aufkonzentrierung wurden  $10^3$  *B. cereus*-Sporen/mL in

100 mL PBS-Puffer mit 7,0 mL/min über die monolithische Affinitätssäule gepumpt und dann je 1 mL in Vorwärts- und Rückwärtsrichtung eluiert.



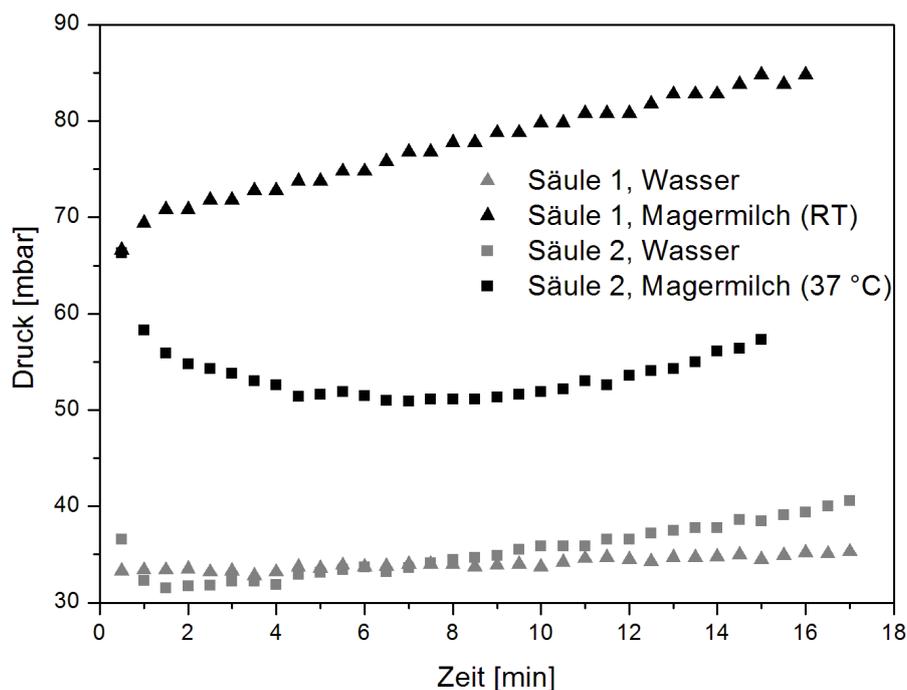
**Abbildung 3.23** Quantifizierung mittels Kultivierung (Messungen: Fabian Wiescher (LMU)): Wiederfindungen im Durchlauf und Eluat für *B. cereus*-Sporen bei unterschiedlichen zur Immobilisierung eingesetzten Antikörperkonzentrationen; eingesetzte Probe:  $10^3$  *B. cereus*-Sporen/mL in 100 mL PBS-Puffer.

Bei einer Antiserumkonzentration von 0,1 mg/mL war die Anzahl der zur Verfügung stehenden Bindungsstellen zu gering, um die Sporen zurückzuhalten, da nur 62% der vitalen Sporen im Eluat wiedergefunden wurden (Abbildung 3.23). Für die monolithischen Affinitätssäulen mit Konzentrationen von 1,0 mg/mL und 5,0 mg/mL Antiserum konnten die besten Wiederfindungen vitaler *B. cereus*-Sporen im Eluat erreicht werden. Bei einer Konzentration von 5,0 mg/mL konnte kein großer Unterschied zu 1,0 mg/mL festgestellt werden, da die Bindungsplätze an der monolithischen Affinitätssäule gesättigt vorlagen. Um möglichst wenig Antiserum für die Immobilisierung verbrauchen zu müssen, wurde deshalb 1,0 mg/mL für die weiteren Versuche verwendet. Wie an den Balken zu erkennen ist, wurde hier bei der Kultivierung eine leichte Überbestimmung erhalten, da die Gesamtwiederfindung vitaler *B. cereus*-Sporen, d.h. die Wiederfindung der Summe aus Eluat und Durchlauf, über 140% lag und nicht bei 100%. Die Schwankungen können mehrere Ursachen haben. Einerseits kann das Medium einen Einfluss haben, in dem sich die *B. cereus*-Sporen befanden, da sich die eingesetzten Proben und die Durchläufe in PBS-Puffer, die Eluate in neutralisiertem Glycinpuffer befanden. Einen weiteren Einfluss könnte andererseits die Tatsache haben, dass die bereits ausgestrichenen Platten für unterschiedliche Zeitspannen

bei RT inkubiert waren, bis alle Platten im Anschluss gemeinsam zur Inkubation in den Brutschrank gestellt wurden.

### 3.1.7.2.2 Variation der Probenmatrix und der Probenkonzentration

Als Vorversuch wurde die zeitliche Druckveränderung in zwei monolithischen Säulen (Säule 1 bzw. 2) mit 100 mL Flüssigkeit (Wasser bzw. Magermilch) untersucht. Dazu wurde zunächst Wasser mit einer Geschwindigkeit von 7,0 mL/min über die monolithischen Säulen (Länge 3,7 mm, ID 11,8 mm) gepumpt. Am Verlauf der Kurven (Abbildung 3.24) sieht man für beide Säulen einen ähnlichen und leicht linearen Anstieg des Rückdrucks. Im Anschluss wurde bei der gleichen Geschwindigkeit über Säule 1 Magermilch bei RT gepumpt, über Säule 2 Magermilch, die auf 37 °C erwärmt wurde. In der Literatur wurde die Erwärmung der Milch beschrieben, um darin enthaltene Fettsäuren zu schmelzen [276, 277].

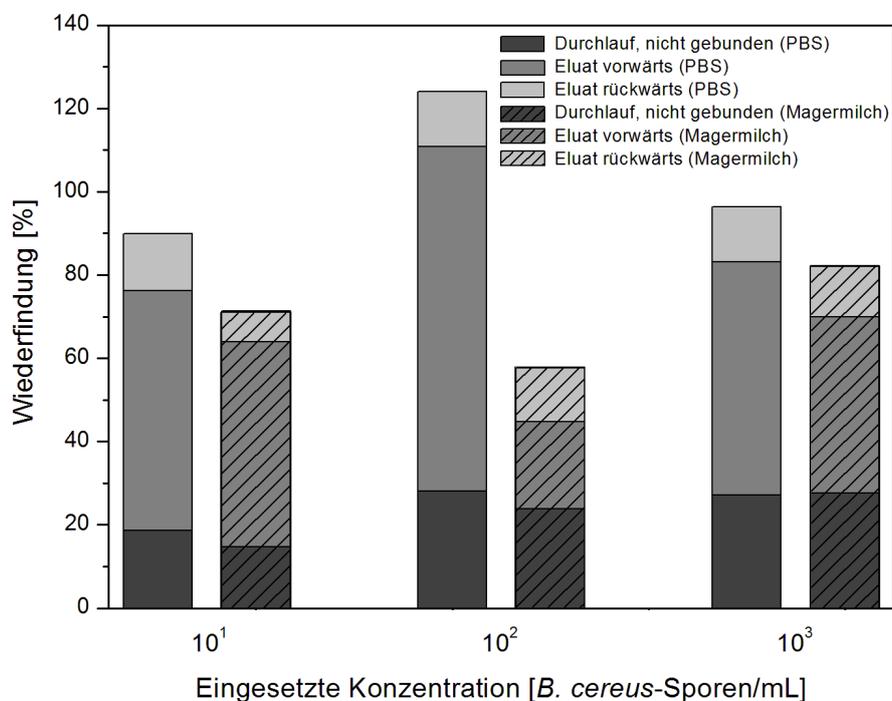


**Abbildung 3.24:** Druckverlauf durch die monolithische Säule mit Wasser bzw. Magermilch.

Betrachtet man die beiden Kurven für Magermilch, so zeigt sich, dass eine Erwärmung der Magermilch ebenfalls einen positiven Einfluss hatte. Bei Säule 1 (RT) zeigte sich ein stärkerer Anstieg des Rückdrucks von etwa 65 mbar auf ca. 85 mbar, wobei der Druck bei Säule 2 (37 °C) erst einmal von ca. 65 mbar auf 50 mbar abfällt und dann eine leichte Steigung auf 55 mbar aufweist. Die Temperaturerhöhung sorgte dafür, dass die in der Milch enthaltenen Fettsäuren schmolzen und die Viskosität herabgesenkt wurde. Dementsprechend wurde auch der Rückdruck der monolithischen Säule gesenkt. Aufgrund dieses

Druckverlaufs wurden der nächste Versuch und alle nachfolgenden Aufkonzentrierungsversuche, bei denen mit Milch gearbeitet wurde, mit 37 °C warmer Magermilch durchgeführt. Die Temperatur hatte auch den Vorteil, dass sie eine natürliche Bedingung darstellt (Körpertemperatur von Säugetieren), bei der die Antikörper eine optimale Aktivität besitzen.

Für die Untersuchungen mit unterschiedlicher Probenmatrix bzw. -konzentration wurden sechs identische monolithische Affinitätsäulen eingesetzt. Mit je drei davon wurde der Versuch in 100 mL PBS-Puffer bzw. in 100 mL Magermilch durchgeführt. Dazu wurden  $10^1$ ,  $10^2$  bzw.  $10^3$  *B. cereus*-Sporen/mL eingesetzt. Die Aufkonzentrierung mit Milch erfolgte bei 37 °C [276], indem die Probe im Wasserbad während des Pumpschritts temperiert wurde.



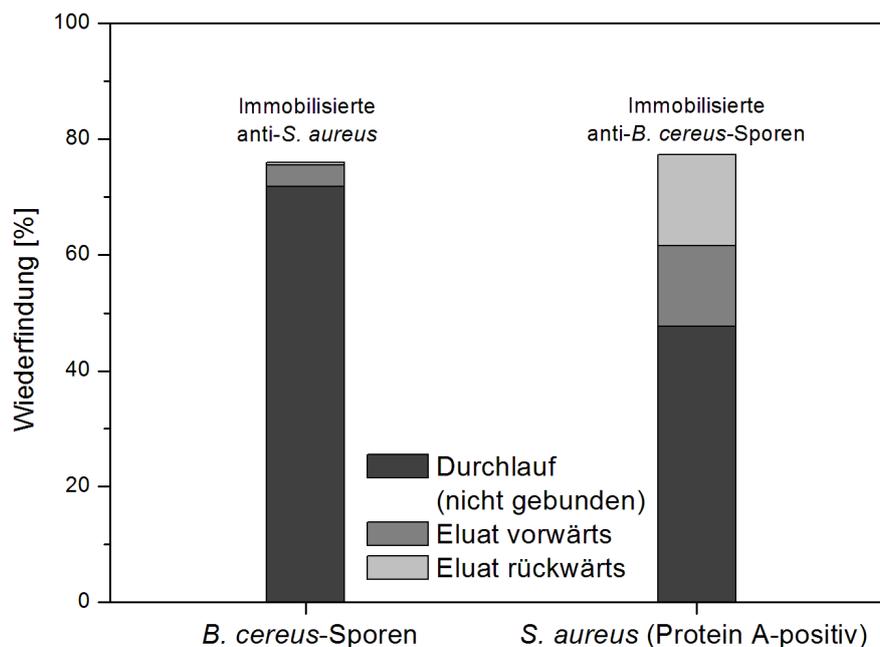
**Abbildung 3.25:** Quantifizierung mittels Kultivierung (Messungen: Fabian Wiescher (LMU)): Wiederfindungen im Durchlauf und Eluat für  $10^1$ ,  $10^2$  bzw.  $10^3$  *B. cereus*-Sporen/mL in 100 mL PBS-Puffer bzw. Magermilch.

Die Balken in Abbildung 3.25 zeigen, dass für alle drei Konzentrationen eine Aufkonzentrierung erfolgreich war. Dieses Ergebnis bewies erstmalig, dass die Aufkonzentrierung von *B. cereus*-Sporen aus Milch mit Antikörpern möglich ist. Die Wiederfindungen der vitalen *B. cereus*-Sporen im Durchlauf waren für PBS-Puffer bzw. Magermilch vergleichbar, d.h. die Magermilch hatte keinen Einfluss auf das Bindeverhalten zwischen den *B. cereus*-Sporen und den Antikörpern. Sie schwankten zwischen 15% und 28%. Die Wiederfindungen vitaler *B. cereus*-Sporen im Eluat waren für die Verwendung von Magermilch etwas niedriger (57%, 34% und 55% für  $10^1$ ,  $10^2$  und  $10^3$  *B. cereus*-Sporen/mL)

als für PBS-Puffer (71%, 96% und 69% für  $10^1$ ,  $10^2$  und  $10^3$  *B. cereus*-Sporen/mL). Dies konnte auf die komplexe Matrix zurückgeführt werden, die die Elution erschwerte oder auf die Schwankungen, die sich bei der Kultivierung ergaben.

### 3.1.7.3 Kreuzreaktivitätsversuch für *S. aureus*-Bakterien (Protein A-positiv) und *B. cereus*-Sporen

Um zu sehen, inwieweit Kreuzreaktivitäten zwischen *B. cereus*-Sporen mit immobilisierten Antikörpern gegen *S. aureus* (anti-*S. aureus*) und Protein A-positive *S. aureus*-Bakterien mit immobilisierten Antikörpern gegen *B. cereus*-Sporen (anti-*B. cereus*-Sporen) auftraten, wurden diese kreuzweise getestet. Dazu wurden je  $10^2$  *B. cereus*-Sporen/mL bzw. *S. aureus*/mL eingesetzt.



**Abbildung 3.26:** Quantifizierung mittels Kultivierung (Messungen: Fabian Wiescher (LMU)): Kreuzreaktivitäten für *B. cereus*-Sporen bzw. Protein A-positive *S. aureus*-Bakterien; eingesetzte Konzentration:  $10^2$  *B. cereus*-Sporen/mL bzw. *S. aureus*/mL in 100 mL PBS-Puffer.

Anhand der Graphik (Abbildung 3.26) lässt sich erkennen, dass die *B. cereus*-Sporen keine Reaktivität mit anti-*S. aureus* zeigten. 72% der insgesamt 76% wiedergefundenen vitalen Sporen waren im Durchlauf. Im Gegensatz dazu gingen die Protein A-positiven *S. aureus*-Bakterien mit den anti-*B. cereus*-Sporen eine deutlich stärkere Bindung ein und es konnten 30% der insgesamt 77% vitalen *S. aureus*-Zellen im Eluat wiedergefunden werden. Die höheren Prozentzahlen sind auf das Protein A von *S. aureus* zurückzuführen, welches Bindungen mit dem Fc-Teil der IgG einging.

### 3.1.8 Zusammenfassung der monolithischen Immunfiltration

Zunächst wurden die monolithische Säule und die stufenweise Modifizierung bis hin zur monolithischen Affinitätssäule charakterisiert.

Das monolithische Material hat mit seinen Kanälen, seiner hohen Porosität und einer Porengröße von  $21 \pm 7 \mu\text{m}$  eine optimale Struktur als Trägermaterial zur Aufkonzentrierung von Mikroorganismen aus flüssigen Medien. Es kann in seiner Größe je nach Anwendung angepasst werden, weist nur eine niedrige Schrumpfung auf und ist dementsprechend stabil gegenüber Drücken. Eine Modifizierung der Glaskörperinnenfläche sorgt für eine feste Verankerung zwischen Glas und Polymer nach der Polymerisierung

Die Oberfläche der monolithischen Säule wurde schrittweise modifiziert, um eine Anbindung von Antikörpern zu gewährleisten. Zunächst wurde das Material hydrolysiert, um Hydroxylgruppen einzuführen, mit denen das GOPTS reagierte. An die Epoxygruppen des GOPTS konnte das DAPEG binden, das terminale Aminogruppen aufwies. Dort wurde die Aktivierung mit DSC durchgeführt, wo dann schließlich die Antikörper immobilisiert wurden. Die ersten beiden Schichten wurden mittels EDX und TNBS-Test charakterisiert. Die Anwesenheit bzw. die Konzentration von Antikörpern auf der Oberfläche wurde mittels TMB- bzw. BCA-Test bestimmt. Die effektivste Aktivierung wurde durch vierstündiges stationäres Inkubieren erhalten, die Antikörper wurden durch Zirkulieren über Nacht erfolgreich immobilisiert.

Es wurde auch die Länge und das Material des Verbindungsstücks optimiert, um die monolithische Affinitätssäule mit den weiteren Komponenten der monolithischen Immunfiltration verbinden zu können und eine Aufkonzentrierung der Mikroorganismen zu gewährleisten. Das beste Material für das Fitting war PTFE, da dieses auch dem Gebrauch von Säuren standhielt, die zur Modifizierung der Oberfläche nötig waren.

Im Anschluss wurden die Parameter der Aufkonzentrierung (Säulenlänge, Flussrate, Elutionsbedingungen) mit Hitze-inaktivierten *S. aureus*-Zellen in PBS-Puffer optimiert. Die besten Ergebnisse wurden bei einer Flussgeschwindigkeit von 7,0 mL/min, einer monolithischen Säule mit einer Höhe von 3,7 mm und einem Innendurchmesser von 11,8 mm erreicht. Die Elution von 1 mL wurde manuell mit einer Spritze zunächst in Vorwärts- und dann in Rückwärtsrichtung und einer Geschwindigkeit von ca. 1 mL/s durchgeführt. Der optimierte Elutionspuffer war Glycinpuffer bei pH 3 mit zusätzlichen 0,1% Tween® 20. Ein Vergleich der Messung einer Verdünnungsreihe „ohne Aufkonzentrierung“ und „nach Aufkonzentrierung“ brachte eine Erhöhung der Nachweisstärke um den Faktor 10.

Nach diesem Schritt wurden die optimierten Parameter zur Aufkonzentrierung von lebenden *S. aureus*-Zellen sowie *B. cereus*-Sporen verwendet und auf die Anwendung in Milch übertragen.

Bei der Aufkonzentrierung lebender *S. aureus*-Bakterien zeigten sich unterschiedliche Ergebnisse für den Protein A-positiven und Protein A-negativen Stamm. Die Wiederfindung vitaler *S. aureus*-Bakterien im Eluat war für den Protein A-positiven Stamm mit 35% fast viermal höher als für den Protein A-negativen mit 9%. Dies konnte auf das Protein A zurückgeführt werden.

Für die Aufkonzentrierung von *B. cereus*-Sporen konnte gezeigt werden, dass 1 mg/mL zur Immobilisierung eingesetztes Antiserum für die besten Wiederfindungswerte sorgte. Es wurden 100 mL PBS-Puffer bzw. Magermilch mit *B. cereus*-Sporen aufgestockt und aufkonzentriert. Die Milch wurde auf 37 °C erwärmt, da das Milchfett ab einer Temperatur von 35 °C flüssig vorliegt und somit geringere Rückdrücke erhalten werden. Außerdem gewährleistet diese Temperatur eine optimale Aktivität der immobilisierten Antikörper. Die besten Wiederfindungen vitaler *B. cereus*-Sporen im Eluat waren 96% für PBS-Puffer und 57% in Magermilch.

Bei einem Kreuzreaktivitätsversuch, bei dem je *S. aureus*-Bakterien und *B. cereus*-Sporen über die jeweils andere monolithische Affinitätssäule mit immobilisierten Antikörpern geleitet wurden, konnte gezeigt werden, dass *B. cereus*-Sporen von anti-*S. aureus* nicht zurückgehalten wurden. Die Protein A-positiven *S. aureus*-Bakterien wurden jedoch von den anti-*B. cereus*-Sporen gebunden. Dieses Ergebnis war wegen der Bindung des Protein A an die Antigenstrukturen von IgG und anderen Antikörpern erklärbar und deckte sich mit den Ergebnissen beim Vergleich des Protein A-positiven und Protein A-negativen Stamms.

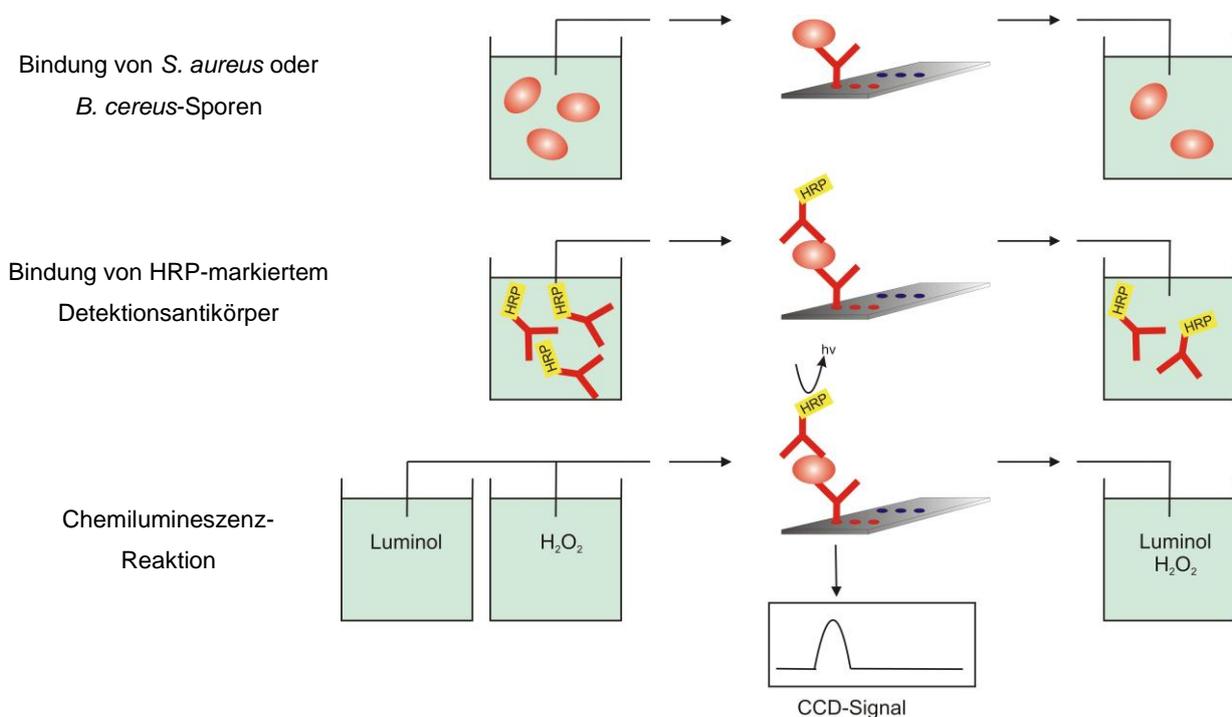
Die Versuche wurden an einem ersten Aufkonzentrierungsaufbau durchgeführt, nach dessen Vorbild eine neue Aufkonzentrierungsapparatur mit Hilfe der institutseigenen Werkstatt aufgebaut wurde. Bei dieser wurden alle einzelnen Bestandteile in einem tragbaren System zusammengefasst.

Generell hat die monolithische Immunfiltration viele Vorteile zu anderen Methoden. Durch sie werden Mikroorganismen schnell und selektiv von der Probenmatrix abgetrennt und gleichzeitig im aufkonzentrierten Eluat für anschließende Schnellnachweismethoden wie z.B. der Mikroarray-Detektion erhalten. Dies schaffen die meisten Abtrennungs- und Aufkonzentrierungsmethoden nicht, da diese zu unselektiv sind, unzureichend von der Probenmatrix abtrennen sowie nur geringe Probenvolumina behandelt werden können oder große Verluste bei der Elution erlitten werden.

## 3.2 Detektion mittels Antikörper-Mikroarrays

### 3.2.1 Automatische Auslesesysteme

Die Antikörper-Mikroarrays wurden über die automatischen Auslesesysteme Immunomat und MCR3 SLT, dem Munich Chip Reader der 3. Generation mit Probenschleife und Temperierung (SL: engl. *sample loop*, T: engl. *temperature*) durchgeführt. Diese erlaubten dem Anwender eine einfache Handhabung und einen schnellen Nachweis der Proben. Dazu wurden nacheinander die Bakterienprobe (Hitze-inaktivierte *S. aureus*-Zellen oder autoklavierte *B. cereus*-Sporen), der HRP-markierte Detektionsantikörper und die Chemilumineszenzsubstrate über den Chip gepumpt (siehe Abbildung 3.27).



**Abbildung 3.27:** Schematische Darstellung des Mikroarray-Durchlaufsystems.

Die Reagenzien wurden in den einzelnen Schritten im Überschuss eingesetzt, damit alle Reaktionsstellen belegt werden konnten. Die überschüssigen, nicht gebundenen Reagenzien wurden nach jedem Schritt durch Spülen mit Laufpuffer entfernt. An den Stellen, an denen der Sandwichkomplex entstand, wurde ein Chemilumineszenzsignal (CL-Signal) generiert, das mit Hilfe einer CCD-Kamera (engl. *charged coupled device*) aufgenommen und im Anschluss mit der System-spezifischen Software ausgewertet wurde.

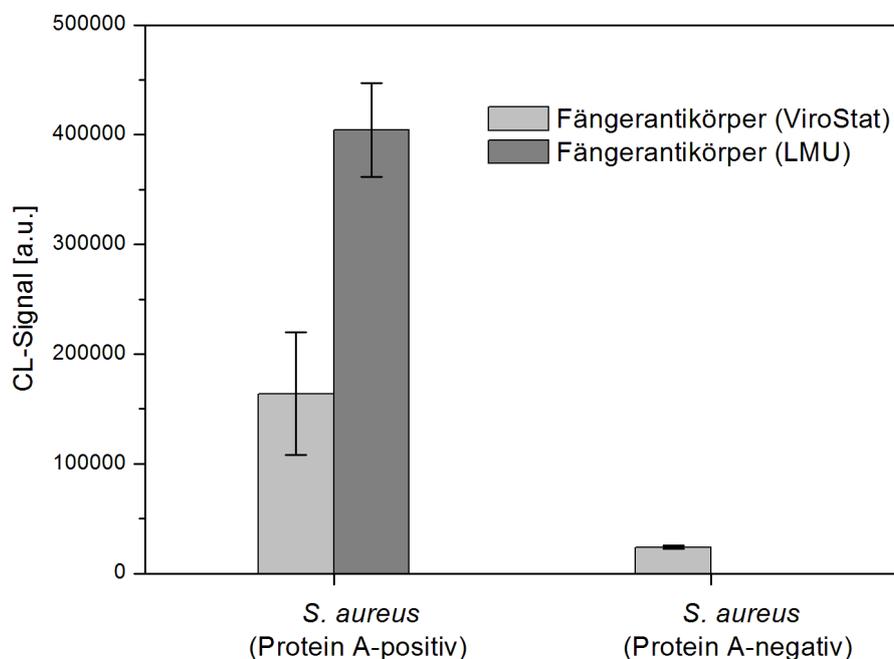
Da am Immunomat die Messbedingungen für die Detektion von Mikroorganismen schon bekannt waren, wurden die ersten Messungen zunächst dort durchgeführt. Die Übertragbar-

keit auf das neue Chemilumineszenz-Auslesesystem MCR3 SLT wurde im Anschluss überprüft.

### 3.2.2 Nachweis Hitze-inaktivierter *S. aureus*-Zellen am Immunomat

#### 3.2.2.1 Messung Protein A-positiver und Protein A-negativer *S. aureus*-Zellen

Um zu sehen, wie gut die Antikörpererkennung Protein A-positiver und Protein A-negativer *S. aureus*-Bakterien abläuft, wurden diese mit einer Konzentration von  $2,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL am Immunomat gemessen (Abbildung 3.28).



**Abbildung 3.28:** Detektion von  $2,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL (Hitze-inaktiviert) mittels Antikörper-Mikroarrays: CL-Signale von Protein A-positiven und Protein A-negativen *S. aureus*-Zellen mit Detektionsantikörper (LMU) ( $m = 6$ ).

Dazu wurden Fängerantikörper der Firma ViroStat bzw. des Lehrstuhls für Hygiene und Technologie der Milch (LMU) eingesetzt. Der HRP-markierte Detektionsantikörper wurde von der LMU bezogen und 1:500 in PBS-Puffer verdünnt.

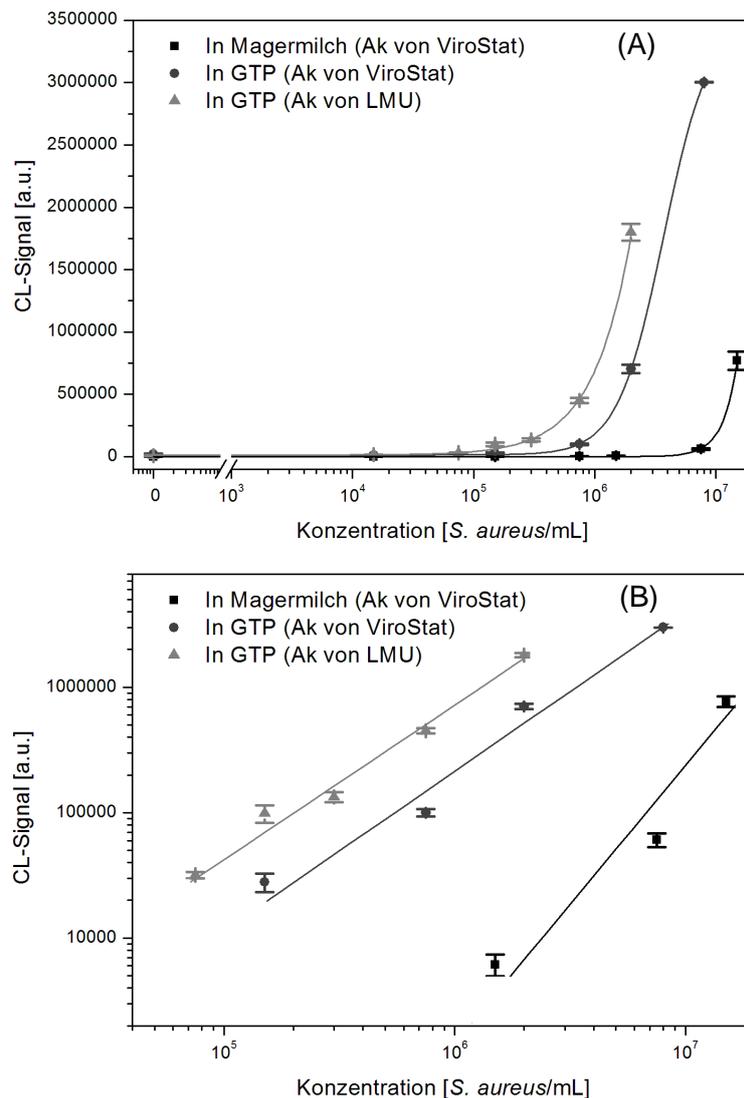
Ein Vergleich der CL-Signale zeigt, dass Protein A-negative *S. aureus*-Zellen nicht erkannt wurden, Protein A-positive *S. aureus*-Zellen dagegen schon. Der Grund dafür wurde bereits in Kapitel 3.1.7.1 erläutert. Protein A-positive *S. aureus*-Zellen binden sowohl an spezifische Antikörper als auch an den Antigenstrukturen am Fc-Teil beliebiger IgG, wobei Protein A-negative *S. aureus*-Zellen nur die spezifische Bindung zulassen. Die spezifische Bindung bei

---

Protein A-negativen *S. aureus*-Zellen konnte unter den verwendeten Assay-Bedingungen nicht detektiert werden. Aus diesem Grund wurden die nachfolgenden Versuche mit Protein A-positiven *S. aureus*-Bakterien durchgeführt. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass der Fängerantikörper der LMU besser wirkte, da die Signale höher waren als mit dem entsprechenden Antikörper von ViroStat.

### 3.2.2.2 CL-Signale für unterschiedliche Matrices und Antikörper

Dieser Versuch diente dazu, den Einfluss verschiedener Probenmatrices auf die CL-Signale des Sandwich-Immunoassays zu testen. Die erhaltenen Ergebnisse waren v.a. wichtig für die spätere Kombination der monolithischen Immunfiltration mit Antikörper-Mikroarrays. Liegen die Mikroorganismen vor der monolithischen Immunfiltration in Magermilch vor, so sind sie nach der Aufkonzentrierung in Glycinpuffer, da die Bakterien mit diesem Puffer von der Säule eluiert werden. Da ein zu saurer pH-Wert (pH 3 für Glycinpuffer) die Antikörper schädigen würde, wurde der Glycinpuffer mit PBS-Puffer im Verhältnis 1:1 (v/v) neutralisiert. Aus diesem Grund wurden die Kalibrierkurven in Magermilch bzw. in neutralisiertem Glycinpuffer (Glycinpuffer + *Tween*®20 + PBS-Puffer, GTP-Puffer) erstellt. Neben den Probenmatrices wurde auch der Einfluss zweier Antikörper (ViroStat bzw. LMU) untersucht. Fänger- und Detektionsantikörper von ViroStat wurden für die Versuche in Magermilch und in GTP-Puffer verwendet. Fänger- und Detektionsantikörper der LMU wurden für die Versuche in GTP-Puffer benutzt. Zur Erstellung der drei Kalibrierkurven wurden drei verschiedene Verdünnungsreihen vorbereitet und mittels Sandwich-Immunoassay gemessen. In Magermilch wurde eine Kalibrierkurve mit den Konzentrationen 0,  $1,5 \cdot 10^4$ ,  $1,5 \cdot 10^5$ ,  $7,5 \cdot 10^5$ ,  $1,5 \cdot 10^6$ ,  $7,5 \cdot 10^6$  und  $1,5 \cdot 10^7$  *S. aureus*/mL mit Fänger- und Detektionsantikörpern von ViroStat erstellt. Für GTP-Puffer wurde eine Kalibrierkurve mit Antikörpern (Ak) von ViroStat und eine mit Ak der LMU gemessen. Die verwendeten Konzentrationen waren 0,  $1,5 \cdot 10^4$ ,  $1,5 \cdot 10^5$ ,  $7,5 \cdot 10^5$ ,  $2,0 \cdot 10^6$  und  $8,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL (Ak von ViroStat) bzw. 0,  $1,5 \cdot 10^4$ ,  $7,5 \cdot 10^4$ ,  $1,5 \cdot 10^5$ ,  $3,0 \cdot 10^5$ ,  $7,5 \cdot 10^5$  und  $2,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL (Ak von LMU).



**Abbildung 3.29:** Detektion von *S. aureus* (Hitze-inaktiviert, Protein A-positiver Stamm) mittels Antikörper-Mikroarrays für verschiedene Probenmatrizes bzw. Antikörper:  
 (A) Kalibrierkurven: in Milch (Ak von ViroStat):  $m = 6$ ,  $n = 7$ ,  $R^2 = 0,8422$ ; in GTP (Ak von ViroStat):  $m = 6$ ,  $n = 6$ ,  $R^2 = 0,9999$ ; in GTP (Ak von LMU):  $m = 6$ ,  $n = 7$ ,  $R^2 = 0,9922$ ;  
 (B) linearer Bereich: in Milch (Ak von ViroStat):  $m = 6$ ,  $n = 3$ ,  $R^2 = 0,9581$ ; in GTP (Ak von ViroStat):  $m = 6$ ,  $n = 4$ ,  $R^2 = 0,9906$ ; in GTP (Ak von LMU)  $m = 6$ ,  $n = 5$ ,  $R^2 = 0,9974$ .

Die drei Kalibrierkurven wurden miteinander verglichen (siehe Abbildung 3.29), um zu sehen, wie die Matrix bzw. die eingesetzten Antikörper die Nachweisstärke des Immunossays beeinflussen.

Generell fehlen bei den Kalibrierkurven die oberen Asymptoten, da die Kurven auf ein hohes Signal optimiert wurden. Bei noch höheren Signalen (nicht abgebildet) flachte das Signal nicht aufgrund einer vollständigen Belegung der Fängerantikörper zu einer Asymptote ab, sondern aufgrund der Kamerasättigung.

Die Kalibrierkurve für Magermilch (schwarze Kurve) war am wenigsten nachweisstark, da ihr linearer Bereich mit  $1,5 \cdot 10^6$  -  $1,5 \cdot 10^7$  *S. aureus*/mL bei hohen Konzentrationen lag. Eine

---

moderate Nachweisstärke erhielt man für die Kalibrierkurve mit GTP-Puffer und Ak von ViroStat (dunkelgraue Kurve) und einem linearen Bereich von  $1,5 \cdot 10^5$  -  $8,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL. Der Immunoassay mit den Antikörpern der LMU hatte die höchste Nachweisstärke, da der lineare Bereich zu niedrigeren Konzentrationen ( $7,5 \cdot 10^4$  -  $2,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL) verschoben war. Allein durch diese Änderung und ohne einen Einfluss über die Aufkonzentrierung war im Vergleich zur Magermilch bereits eine Erhöhung der Nachweisstärke um den Faktor 20 erzielt worden. Mit diesem Versuch konnte man außerdem die Erkenntnis gewinnen, dass es unbedingt notwendig ist, bei der Aufkonzentrierung die störenden Milchkomponenten zu entfernen, da diese die Nachweisstärke der Messung negativ beeinflussen. Die nachfolgenden Versuche wurden deshalb in GTP-Puffer sowie den Antikörpern der LMU durchgeführt.

### **3.2.3 Nachweis Hitze-inaktivierter *S. aureus*-Zellen am MCR3 SLT**

Nachfolgend wird gezeigt, wie Sandwich-Immunoassays erstmals für den Bakteriennachweis am MCR3 SLT etabliert wurden. Dazu wurde der bestehende Sandwich-Immunoassay vom Immunomat auf den MCR3 übertragen.

#### **3.2.3.1 Übertragung des Antikörper-Mikroarrays auf den MCR3 SLT**

Aufgrund des unterschiedlichen Aufbaus der beiden Systeme mussten die meisten Parameter abgeändert werden. Dies betraf die Volumina und Flussgeschwindigkeiten, sowie die Geometrie der Flusszelle. Ein maßgeblicher Unterschied bestand auch darin, dass der MCR3 SLT über Ventile gesteuert wurde, der Immunomat anstatt von Ventilen Schlauchverbinder beinhaltet. Wurde beim Immunomat noch ein Mikroarray-Chip mit einer Flusszelle und sechs Spots pro Reihe eingesetzt, so waren es am MCR3 SLT zwei Flusszellen mit je fünf Spots pro Reihe. Die beiden Flusszellen konnten separat voneinander angesteuert werden und ermöglichten zwei Messungen pro Chip. In Tabelle 3.6 sind die Parameter des Messprogramms für den Immunomat und die erstmaligen Einstellungen für den MCR3 SLT gegenübergestellt.

**Tabelle 3.6:** Gegenüberstellung der Parameter des Messprogramms von Immunomat und MCR3 SLT.

	Immunomat		MCR3 SLT	
<b>Flusszelle(n)</b>	1		2	
<b>Anzahl der Spots pro Reihe</b>	6		5	
<b>Assaydauer</b>	ca. 60 min		ca. 60 min	
<b>Aufnahme des CL-Signals</b>	60 s		90 s	
	Volumen	Geschwindigkeit	Volumen	Geschwindigkeit
<b>Waschschritt</b>	2 x 1,0 mL	100 $\mu$ L/s	5 x 1,0 mL	68 $\mu$ L/s
<b>Probe</b>	0,6 mL + 0,6 mL in 20- $\mu$ L-Portionen	100 $\mu$ L/s, Stopped-flow mit 20 $\mu$ L/s und Pause von 108 s	0,7 mL	0,2 $\mu$ L/s
<b>Waschschritt</b>	4 x 1,0 mL	100 $\mu$ L/s	5 x 1,0 mL	68 $\mu$ L/s
<b>Detektions-antikörper</b>	0,6 mL + 0,6 mL in 20- $\mu$ L-Portionen	100 $\mu$ L/s, Stopped-flow mit 20 $\mu$ L/s und Pause von 1,2 s	1,0 mL in 20- $\mu$ L- Portionen	Stopped-flow mit 20 $\mu$ L/s und Pause von 5 s
<b>Waschschritt</b>	6 x 1,0 mL	100 $\mu$ L/s	5 x 1,0 mL	68 $\mu$ L/s
<b>Chemilumineszenz-substrate</b>	1,2 mL	100 $\mu$ L/s	1,0 mL	20 $\mu$ L/s

Neben dem Aufbau gab es für beide Systeme auch Unterschiede bei der Auswertung der erhaltenen Messsignale. Wurde am Immunomat mit Hilfe der Bildanalysesoftware 1.0.2 pro Spot je über 7 x 7 Pixel integriert, so wurde an der neueren und schnelleren Software des MCR3 SLT (*MCRImageAnalyzer*) der Mittelwert über die 10 hellsten Pixel berechnet. Zur besseren Vergleichbarkeit der erhaltenen Signalintensitäten wurden deshalb für beide Systeme die Chemilumineszenzsignale pro Pixel im Programm Avis abgelesen.

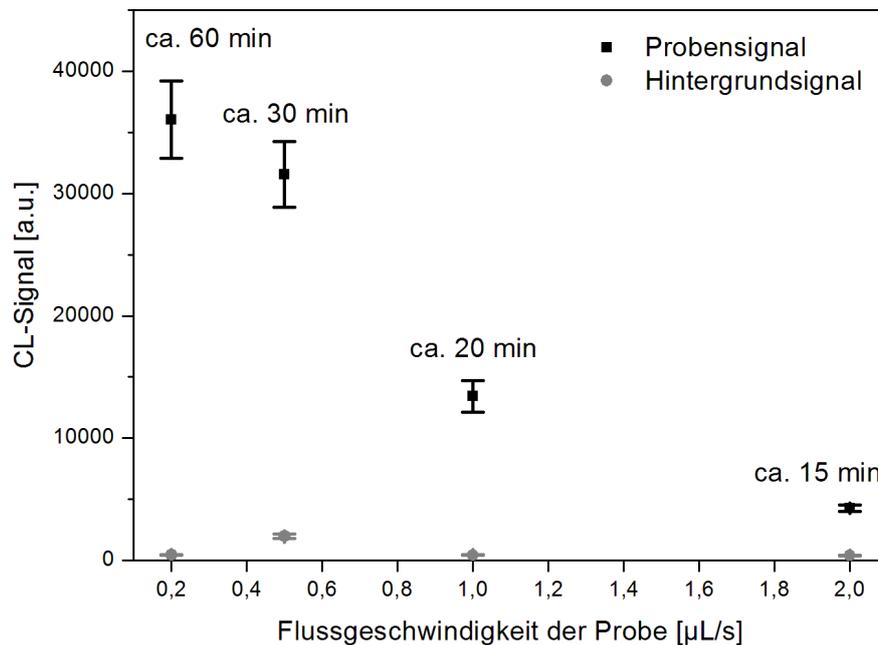
Eine Gegenüberstellung der abgelesenen Pixel in Avis, die nach der Messung von  $2,0 \cdot 10^6$  S. aureus/mL am Immunomat und MCR3 SLT erhalten wurden, macht deutlich, dass die CL-Signale in etwa vergleichbar waren und die Übertragung der Messung auf den MCR3 SLT möglich war. Mit dem Fängerantikörper der LMU wurde am Immunomat eine Signalintensität von  $54.205 \pm 3.448$  a.u., am MCR3 SLT eine Signalintensität von  $37.550 \pm 3.797$  a.u. erzielt. Die Abweichungen der Signalintensitäten zwischen den beiden Systemen konnten dadurch erklärt werden, dass die Programme aufgrund des

unterschiedlichen Aufbaus der Geräte (Totvolumina, Pumpgeschwindigkeiten und -volumina) ähnlich, jedoch nicht identisch abliefen.

Nach der Erkenntnis, dass der Sandwich-Immunoassay auf den MCR3 SLT übertragbar ist, konnte auf die weitere Optimierung des Ablaufs am MCR3 SLT eingegangen werden. Dies betraf die Reduzierung der Assaydauer, die Temperierung der Flusszelle und die Reduzierung der Volumina der Chemilumineszenzsubstrate.

### 3.2.3.2 Abhängigkeit des CL-Signals von der Flussgeschwindigkeit der Probe

Um einen Einblick auf die CL-Signalintensitäten bei unterschiedlicher Interaktionsdauer der Bakterien mit den Antikörpern zu gewinnen, wurden vier verschiedene Flussgeschwindigkeiten der Probe getestet. Dazu wurde der Antikörper-Mikroarray mit  $2,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL (Hitze-inaktiviert) bei den Flussgeschwindigkeiten 0,2  $\mu\text{L/s}$ , 0,5  $\mu\text{L/s}$ , 1,0  $\mu\text{L/s}$  und 2,0  $\mu\text{L/s}$  durchgeführt (Abbildung 3.30). Die zugehörige Assaydauer war jeweils ca. 60, 30, 20 und 15 min.



**Abbildung 3.30:** Detektion von  $2,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL (Hitze-inaktiviert, Protein A-positiver Stamm) mittels Antikörper-Mikroarrays: Abhängigkeit des CL-Signals von der Flussgeschwindigkeit der Probe ( $m = 5$ ).

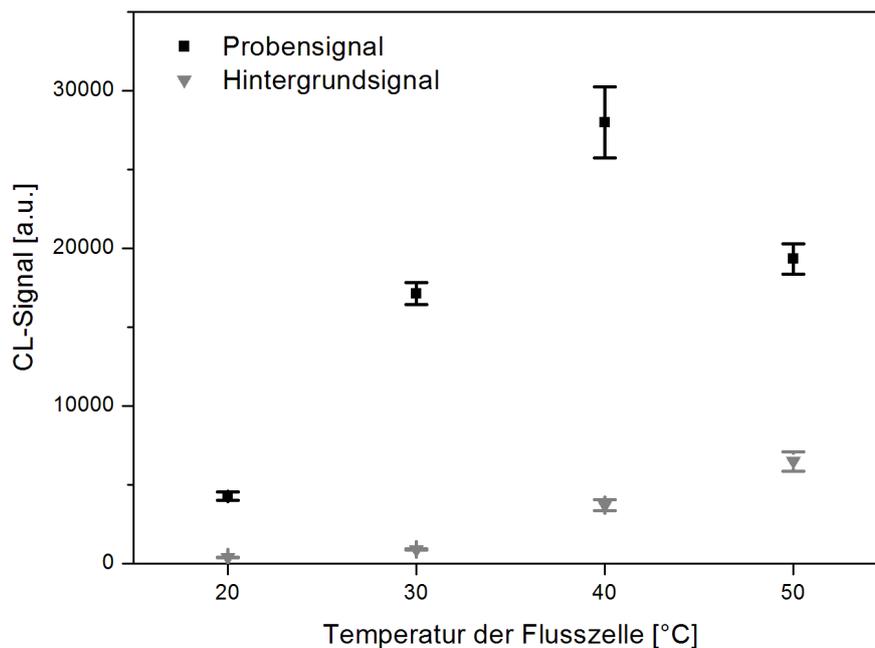
Die Graphik zeigt, dass durch eine Verzehnfachung der Flussgeschwindigkeit von 0,2  $\mu\text{L/s}$  auf 2,0  $\mu\text{L/s}$  das CL-Signal um den Faktor 8 reduziert wurde. Das Hintergrundsignal bleibt nahezu konstant.

Das CL-Signal bei den unterschiedlichen Flussgeschwindigkeiten der Probe erlaubt eine Aussage über den konvektiven Massentransport der Mikroorganismen zu den Spots. Bei einer sehr niedrigen Flussgeschwindigkeit der Probe, wie z.B. 0,2  $\mu\text{L/s}$ , findet ein langsamer Massentransport der Mikroorganismen zum Spot und zu den Fängerantikörpern statt. Auch die Wegbewegung der Mikroorganismen ist verlangsamt, da die Probe kaum in Bewegung ist. Bei höheren Flussgeschwindigkeiten wird zum einen zwar der Massentransport der Mikroorganismen an den Spot beschleunigt, zum anderen jedoch auch der Massentransport vom Spot weg. Daher sind kleinere CL-Signale die Folge.

Eine Verringerung der Assaydauer könnte allerdings den Versuchstag verkürzen bzw. es könnten mehr Proben in derselben Zeit gemessen werden. Aus diesem Grund wurde weiter untersucht, ob das CL-Signal durch Temperaturerhöhung wieder angehoben werden kann und so ein Kompromiss zwischen CL-Signal und Assaydauer gefunden wird.

### 3.2.3.3 Abhängigkeit des CL-Signals von der Temperatur der Flusszelle

Für diese Messungen wurde die Flussgeschwindigkeit der Probe konstant gehalten (2,0  $\mu\text{L/s}$ ) und die Temperatur der Flusszelle in Zehnerschritten erhöht. Laut der RGT-Regel (Reaktionsgeschwindigkeit-Temperatur-Regel) [278] sollte mit Erhöhung der Temperatur um 10  $^{\circ}\text{C}$  eine Verdoppelung der Reaktionsgeschwindigkeit eintreten. Es wurde untersucht, ob diese Abschätzung auch hier gilt.



**Abbildung 3.31:** Detektion von  $2,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL (Hitze-inaktiviert, Protein A-positiver Stamm) mittels Antikörper-Mikroarrays: Abhängigkeit des CL-Signals von der Temperatur der Flusszelle ( $m = 5$ ).

Von 20 °C bis 40 °C konnte ein linearer Anstieg des CL-Signals festgestellt werden (Abbildung 3.31), der zeigte, dass die Antikörper und Enzyme bei einer Temperatur in der Nähe der Körpertemperatur von 37 °C am aktivsten sind. Gleichzeitig wurde durch die Temperaturerhöhung auch der diffusive Massentransport der Mikroorganismen zu den Antikörpern beschleunigt. Bei über 40 °C wurden die Antikörper und die an den Detektionsantikörpern gebundene Meerrettichperoxidase bereits denaturiert, was den Signalabfall erklärt. Bei 60 °C (nicht mehr in der Graphik abgebildet) konnten keine Signale mehr gemessen werden, da in der Flusszelle bereits eine starke Blasenentwicklung auftrat. Je höher die Temperatur gewählt wurde, desto höher stieg auch das Hintergrundsignal. Dieses erhöhte sich, da die unspezifische Bindung an der Mikroarray-Chipoberfläche ebenso erleichtert wurde. Es kann auch die Enzymaktivität an den unspezifischen Bindungen erhöht worden sein, was ebenfalls die höheren Signale erklärt. Um die Nachweisstärke der Ergebnisse herauszufinden, wurde das Verhältnis des Signal-zu-Hintergrund (S/N) untersucht, da dieses das CL-Signal der Probe im Vergleich zum CL-Signal des Hintergrunds bewertet (Tabelle 3.7).

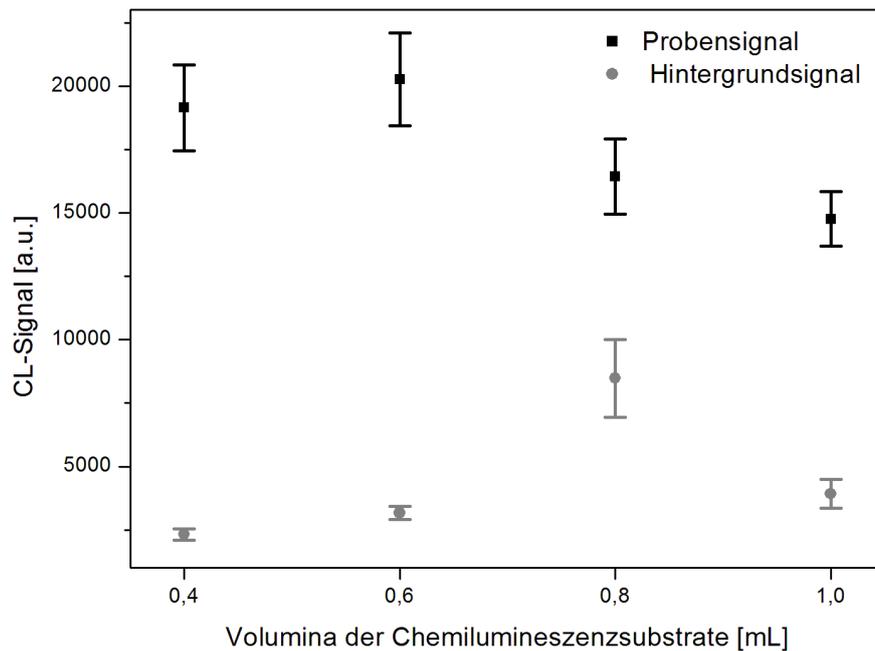
**Tabelle 3.7:** Verhältnis Signal-zu-Hintergrundsignal bei unterschiedlichen Temperaturen.

T [°C]	20	30	40	50
S/N	11	19	8	3

Da bei einer Temperatur von 30 °C aufgrund des hohen S/N-Verhältnisses die nachweisstärksten Ergebnisse geliefert wurden, erfolgten die weiteren Versuche bei dieser Temperatur und einer Flussgeschwindigkeit der Probe von 2,0 µL/s.

#### 3.2.3.4 Abhängigkeit des CL-Signals vom Volumen der CL-Substrate

Weiter wurde untersucht, ob die Volumina der Chemilumineszenzsubstrate reduziert werden können, da diese sehr teuer sind und so der Preis jeder einzelnen Messung verringert werden könnte. Dazu wurde von einem Gesamtvolumen von 1,0 mL (0,5 mL Luminol und 0,5 mL Wasserstoffperoxid) ausgegangen. Die Substrate wurden dann schrittweise um je 100 µL bis zu einem Gesamtvolumen von 0,4 mL reduziert (Abbildung 3.32). Die Konzentration der *S. aureus*-Bakterien betrug je  $2,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL.

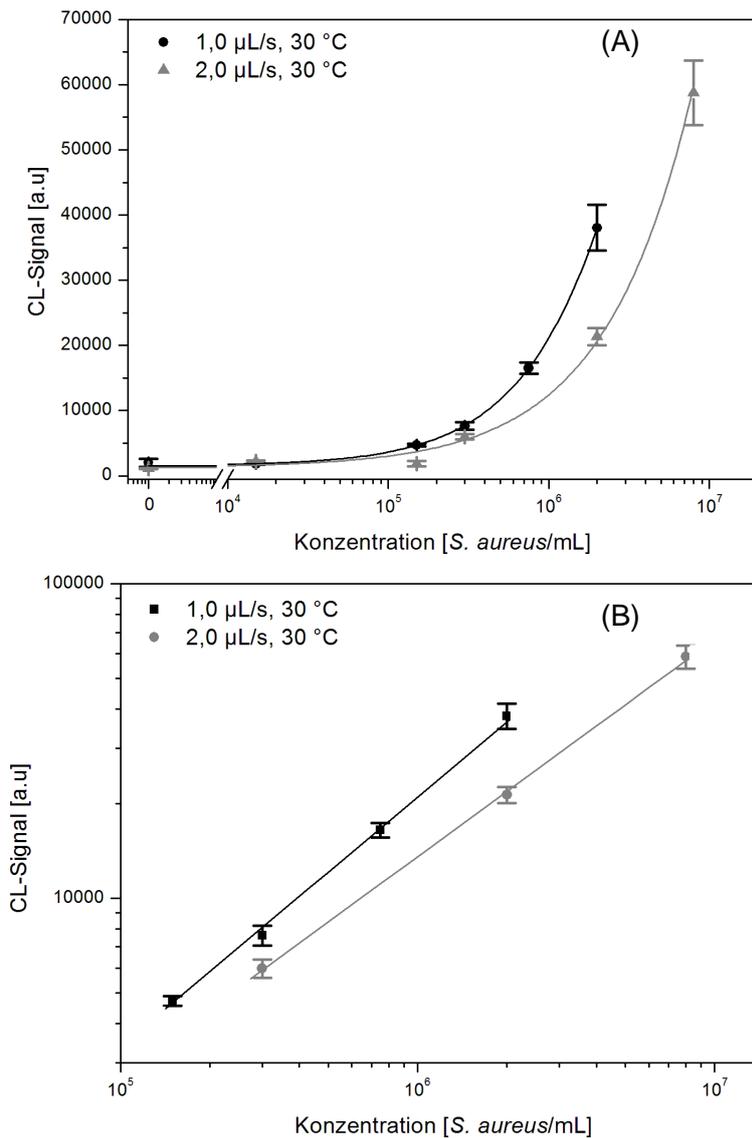


**Abbildung 3.32:** Detektion von  $2,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL (Hitze-inaktiviert, Protein A-positiver Stamm) mittels Antikörper-Mikroarrays: Abhängigkeit des CL-Signals vom Volumen der Chemilumineszenzsubstrate ( $m = 5$ ).

Vergleicht man die Signale miteinander und berücksichtigt man die Interassay-Varianzen (hier im Bereich zwischen 20.000 und 15.000 a.u.), so machte eine Verringerung der Volumina um 60% keinen Unterschied zu vorher. Aus diesem Grund wurden für die weiteren Versuche nur noch 0,4 mL der Chemilumineszenzsubstrate verwendet. Die Kosten der Chemilumineszenzsubstrate pro Messung konnten so von 1,87 € auf 0,75 € reduziert werden. Aus diesem Grund wurden die weiteren Versuche mit den reduzierten Volumina durchgeführt.

### 3.2.3.5 Kalibrierkurven bei unterschiedlichen Geschwindigkeiten

Zur Überprüfung, wie die Flussgeschwindigkeit der Probe auf die Mikroarray-interne Nachweisgrenze des Immunoassays wirkt, wurden zwei verschiedene Kalibrierkurven der Protein A-positiven *S. aureus*-Zellen gemessen. Dazu wurden die Immunoassays mit einer Assaydauer von ca. 20 min ( $1,0 \mu\text{L/s}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ) bzw. 15 min ( $2,0 \mu\text{L/s}$ ,  $30^\circ\text{C}$ ) miteinander verglichen (Abbildung 3.33). Auch hier konnten keine oberen Asymptoten aufgetragen werden, da die Kurven auf hohe Signale optimiert waren und bei höheren Signalen (nicht abgebildet) die Kamerasättigung erreicht war.



**Abbildung 3.33:** Detektion Hitze-inaktivierter *S. aureus*-Zellen (Protein A-positiver Stamm) mittels Antikörper-Mikroarrays für zwei unterschiedliche Messprogramme bei 30 °C:

(A) Kalibrierkurven ( $m = 5$ ,  $n = 6$ ): 1,0  $\mu\text{L/s}$ :  $R^2 = 0,9919$ ; 2,0  $\mu\text{L/s}$ :  $R^2 = 0,9898$ ;

(B) linearer Bereich: 1,0  $\mu\text{L/s}$ :  $m = 5$ ,  $n = 4$ ,  $R^2 = 0,9993$ ; 2,0  $\mu\text{L/s}$ :  $m = 5$ ,  $n = 3$ ,  $R^2 = 0,9996$ .

Es zeigte sich, dass sich die Mikroarray-internen Nachweisgrenzen der zwei Kalibrierkurven ca. um zwei Zehnerpotenzen unterschieden. Sie variierten zwischen  $4,8 \cdot 10^3$  *S. aureus*/mL für 2,0  $\mu\text{L/s}$  und  $1,1 \cdot 10^5$  *S. aureus*/mL für 1,0  $\mu\text{L/s}$ . Betrachtet man allerdings den linearen Bereich, so sieht man, dass dieser für 1,0  $\mu\text{L/s}$  zu niedrigeren Konzentrationen verschoben wurde. Für 1,0  $\mu\text{L/s}$  lag dieser bei  $1,5 \cdot 10^5$  -  $2,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL, für 2,0  $\mu\text{L/s}$  bei  $3,0 \cdot 10^5$  -  $8,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL. Die Kurve bei einer Flussgeschwindigkeit von 1,0  $\mu\text{L/s}$  hat dementsprechend eine höhere Nachweisstärke.

Fälschlicherweise hat man sich für die weiteren Versuche an der Mikroarray-internen Nachweisgrenze orientiert und somit mit dem weniger nachweisstarken Messprogramm mit einer Flussgeschwindigkeit von 2,0  $\mu\text{L/s}$  weitergearbeitet.

In Tabelle 3.8 sind noch einmal die Parameter des Immunomats und die optimierten Parametern für den MCR3 SLT gegenübergestellt.

**Tabelle 3.8:** Gegenüberstellung der Parameter von Immunomat und der optimierten Einstellungen am MCR3.

	Immunomat		MCR3 SLT	
<b>Flusszelle(n)</b>	1		2	
<b>Anzahl der Spots pro Reihe</b>	6		5	
<b>Assaydauer</b>	ca. 60 min		ca. 15 - 20 min	
<b>Aufnahme des CL-Signals</b>	60 s		90 s	
	<b>Volumen</b>	<b>Geschwindigkeit</b>	<b>Volumen</b>	<b>Geschwindigkeit</b>
<b>Waschschritt</b>	2 x 1,0 mL	100 $\mu\text{L/s}$	5 x 1,0 mL	68 $\mu\text{L/s}$
<b>Probe</b>	0,6 mL + 0,6 mL in 20- $\mu\text{L}$ -Portionen	100 $\mu\text{L/s}$ , Stopped-flow mit 20 $\mu\text{L/s}$ und Pause von 108 s	0,7 mL	2,0 $\mu\text{L/s}$ bei 30 °C Temperierung der Flusszelle
<b>Waschschritt</b>	4 x 1,0 mL	100 $\mu\text{L/s}$	5 x 1,0 mL	68 $\mu\text{L/s}$
<b>Detektions-antikörper</b>	0,6 mL + 0,6 mL in 20- $\mu\text{L}$ -Portionen	100 $\mu\text{L/s}$ , Stopped-flow mit 20 $\mu\text{L/s}$ und Pause von 1,2 s	1,0 mL in 20- $\mu\text{L}$ - Portionen	Stopped-flow mit 20 $\mu\text{L/s}$ und Pause von 5 s
<b>Waschschritt</b>	6 x 1,0 mL	100 $\mu\text{L/s}$	5 x 1,0 mL	68 $\mu\text{L/s}$
<b>Chemilumineszenz-substrate</b>	1,2 mL	100 $\mu\text{L/s}$	0,4 mL	20 $\mu\text{L/s}$

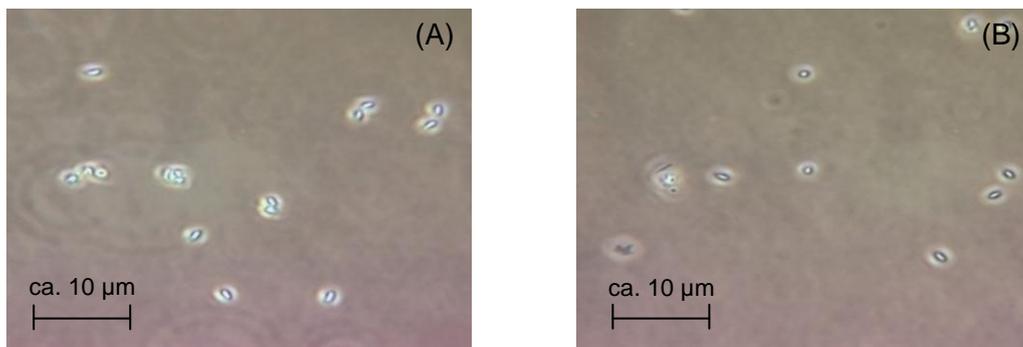
Der entscheidende Vorteil der Messung am MCR3 SLT war, dass durch die Temperierung der Flusszelle die Assaydauer ca. nur noch ein Viertel der Zeit am Immunomat betrug. Dadurch konnten an einem Messtag bis zu viermal mehr Proben detektiert werden. Des Weiteren konnte im Gegensatz zur Messung am Immunomat mit etwa einem Drittel der Chemilumineszenzsubstrate ausgekommen werden und so die Kosten vermindert werden.

### 3.2.4 Nachweis autoklavierter *B. cereus*-Sporen am MCR3 SLT

#### 3.2.4.1 Inaktivierung der *B. cereus*-Sporen

Um sicherzustellen, dass eine Messung mit lebenden *B. cereus*-Sporen am MCR3 SLT möglich ist, musste vorher ausgetestet werden, mit welchem Reagenz die Sporen nach einem Messtag effektiv und in kurzer Zeit komplett inaktiviert werden konnten. Dazu wurden bewährte Desinfektionsmittel getestet, die auch die Eigenschaft besitzen, materialschonend zu sein, um die Oberflächen von Verschlauchung, Ventilen und Flusszelle am MCR3 SLT nicht anzugreifen. Die *B. cereus*-Sporen wurden mit Isopropanol (70%, v/v), Chloramin T, Wasserstoffperoxidlösung (1% und 2%, v/v) für 1 min, 3 min, 5 min und 7 min behandelt und anschließend auf Nährmedium in Petrischalen kultiviert und ausgezählt (Messungen: Fabian Wiescher, LMU). Es zeigte jedoch keines der Reagenzien eine komplette sporozide Wirkung. Nur durch Autoklavieren für 15 min bei 121 °C konnten *B. cereus*-Sporen komplett inaktiviert werden. Das bedeutete, dass für die sichere Benutzung des MCR3 SLT anstatt lebender nur autoklavierte *B. cereus*-Sporen verwendet werden konnten.

Es war daher unklar, ob sich die Struktur der Sporen nach dem Autoklavieren bei hoher Temperatur und hohem Druck stark verändert und somit die Antikörper-Erkennung noch stattfindet. Ihr Aussehen wurde deshalb zusätzlich visuell am Lichtmikroskop vor und nach Autoklavieren überprüft (Abbildung 3.34).

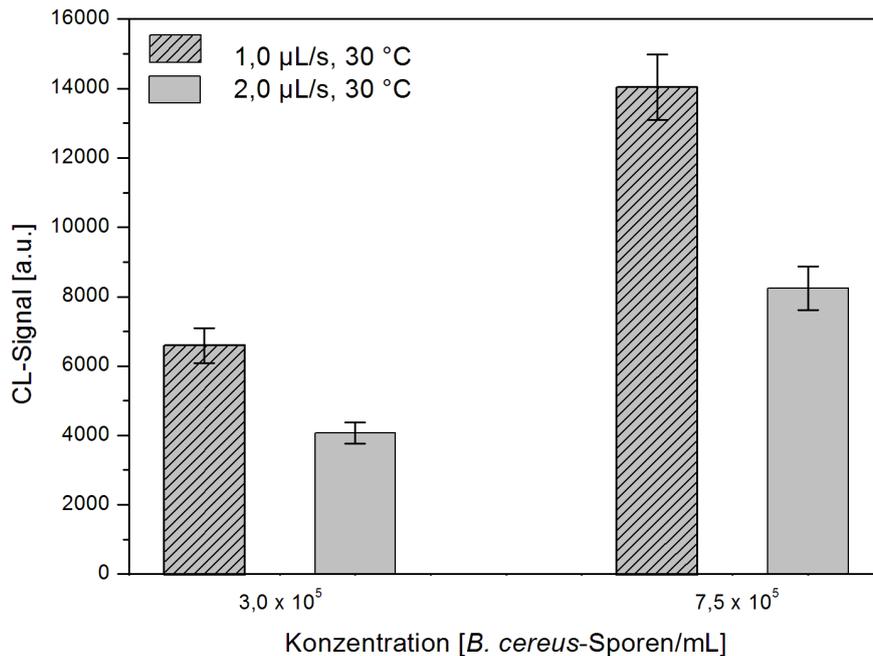


**Abbildung 3.34:** Lichtmikroskopie (A) lebender und (B) autoklavierter *B. cereus*-Sporen (Messung: Fabian Wiescher, LMU).

Beim Vergleich beider Bilder am Lichtmikroskop konnte kein Unterschied, wie z.B. eine Fragmentierung der *B. cereus*-Sporen, festgestellt werden. Eine Veränderung der Sporenoberfläche wurde jedoch nicht ausgeschlossen. Eine Messung der inaktivierten *B. cereus*-Sporen am MCR3 SLT sollte anschließend zeigen, ob diese trotz der starken Behandlung noch spezifisch von Antikörpern gebunden werden konnten.

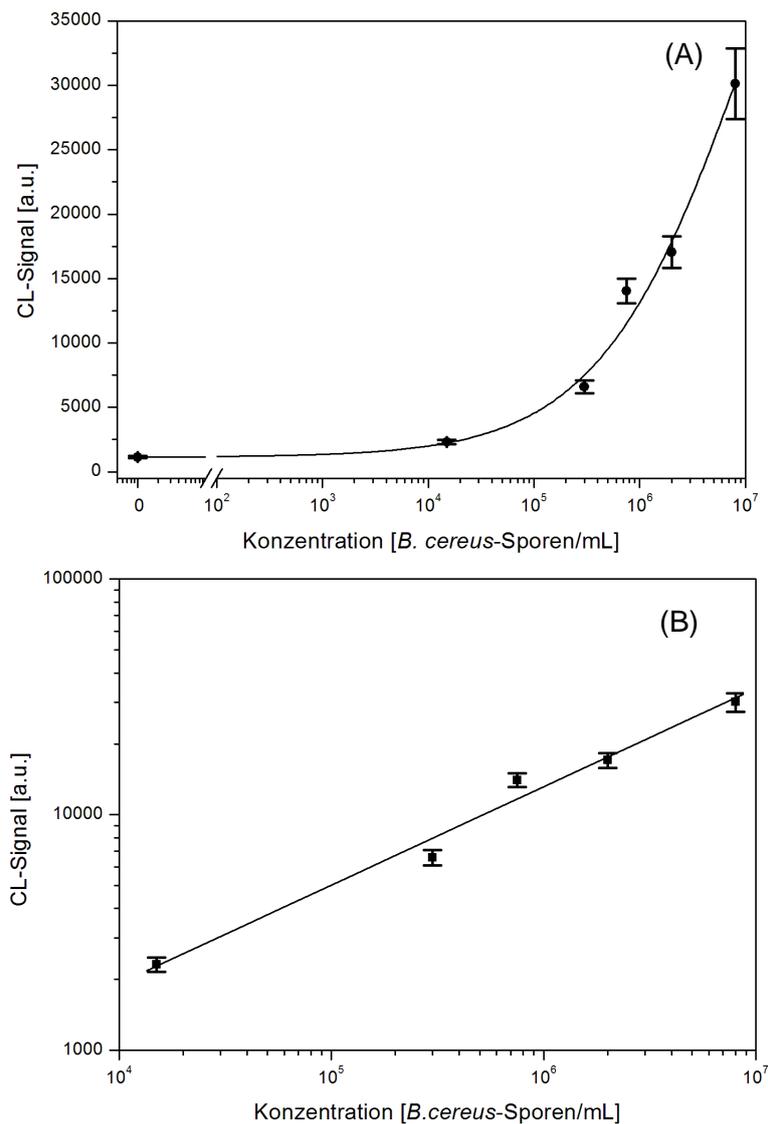
### 3.2.4.2 Kalibrierkurve für inaktivierte *B. cereus*-Sporen

Zunächst wurde an zwei verschiedenen Konzentrationen überprüft, welches Messprogramm die höheren CL-Signale für die Messung von *B. cereus*-Sporen liefert. Dazu wurden die Messprogramme mit einer Flussgeschwindigkeit der Probe von 1,0  $\mu\text{L/s}$  bzw. 2,0  $\mu\text{L/s}$  getestet (Abbildung 3.35).



**Abbildung 3.35:** Detektion mittels Antikörper-Mikroarrays: Vergleich zweier Messprogramme für  $3,0 \cdot 10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL bzw.  $7,5 \cdot 10^5$  *B. cereus*-Sporen.

Mit dem etwas längeren Assay (ca. 20 min) mit einer Flussgeschwindigkeit der Probe von 1,0  $\mu\text{L/s}$  konnten für beide Konzentrationen die höheren Messwerte erreicht werden. Sie waren  $6.587 \pm 500$  a.u. für  $3,0 \cdot 10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL bzw.  $14.039 \pm 944$  a.u. für  $7,5 \cdot 10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL. Für den kürzeren Assay (ca. 15 min) mit einer Flussgeschwindigkeit der Probe von 2,0  $\mu\text{L/s}$  waren die Signale im Durchschnitt um den Faktor 1,65 kleiner. Eine halb so große Flussgeschwindigkeit der Probe sorgte dafür, dass mehr Antigen-Antikörper-Komplexe entstanden, da der konvektive Massentransport der *B. cereus*-Sporen vom Spot weg verlangsamt war. Aus diesem Grund wurde im Anschluss das Messprogramm mit einer Flussgeschwindigkeit der Probe von 1,0  $\mu\text{L/s}$  für die Messung der Kalibrierkurve verwendet (Abbildung 3.36).



**Abbildung 3.36:** Detektion von *B. cereus*-Sporen mittels Antikörper-Mikroarrays mit dem Messprogramm 1,0  $\mu$ L/s, 30 °C: (A) Kalibrierkurve:  $m = 5$ ,  $n = 6$ ,  $R^2 = 0,9815$ , (B) linearer Bereich:  $m = 5$ ,  $n = 5$ ,  $R^2 = 0,9897$ .

Für die Kalibrierkurve mit *B. cereus*-Sporen wurde eine Mikroarray-interne Nachweisgrenze von  $9,6 \cdot 10^2$  *B. cereus*-Sporen/mL erhalten. Der lineare Bereich lag zwischen  $1,5 \cdot 10^4$  und  $2,0 \cdot 10^6$  *B. cereus*-Sporen/mL. Ebenso, wie bei den vorangegangenen Kalibrierkurven schon erwähnt, wurde hier auch keine obere Asymptote aufgrund einer vollständigen Belegung der Fängerantikörper erreicht, sondern nur eine Sättigung des Kamerasignals (nicht abgebildet).

### 3.2.5 Zusammenfassung der Antikörper-Mikroarrays

Die Antikörper-Mikroarrays im Sandwich-Testformat wurden zunächst am Immunomat durchgeführt, da dort bereits mit Mikroorganismen gearbeitet wurde. Im Anschluss wurde

das Sandwich-Format für Mikroorganismen auf der neuen Chemilumineszenz-Ausleseplattform mit Temperaturregelung, dem MCR3 SLT, etabliert.

Am Immunomat konnte gezeigt werden, dass man für Protein A-positive *S. aureus* ein CL-Signal erhält. Dies lag am Protein A, das mit beliebigen IgG und anderen Antikörpern Bindungen am Fc-Teil eingeht. Die spezifische Bindung der Protein A-negativen *S. aureus*-Zellen konnte unter den verwendeten Assay-Bedingungen nicht detektiert werden.

In Hinblick auf eine Kombination von monolithischer Immunfiltration und Mikroarray-Detektion wurden Hitze-inaktivierte Protein A-positive *S. aureus*-Zellen in Magermilch und neutralisiertem Glycinpuffer gemessen. Dort konnte gezeigt werden, dass bereits die Matrix einen Einfluss auf die Nachweisstärke hat. So konnte eine höhere Nachweisstärke für die Messung in neutralisiertem Glycinpuffer erreicht werden. Bei der Wahl geeigneter Antikörper konnte die Nachweisstärke nochmals gesteigert werden. Die Erhöhung der Nachweisstärke zeigte sich durch Verschiebung des linearen Bereichs zu niedrigeren Konzentrationen um den Faktor 20.

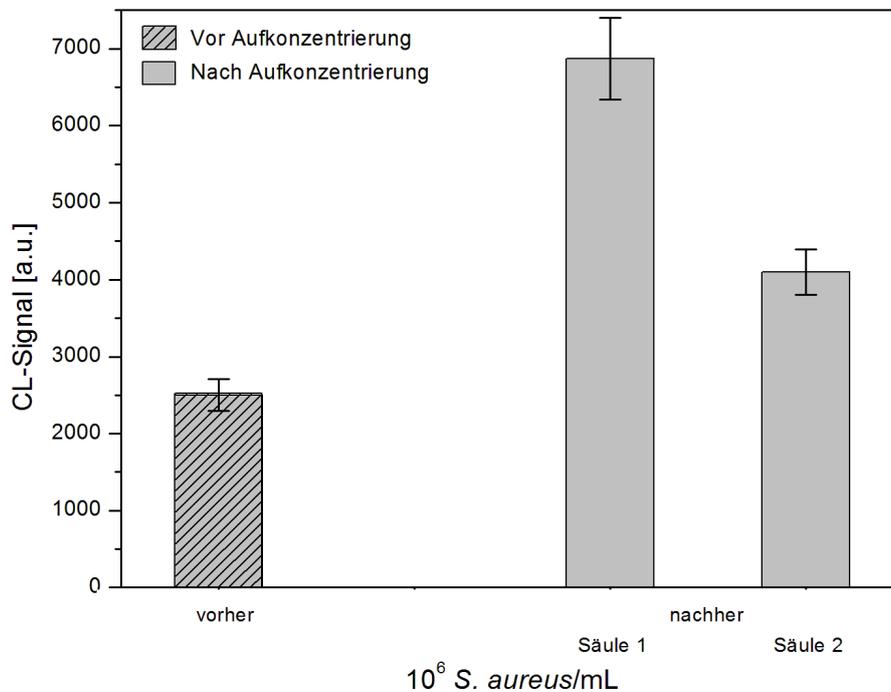
Das Sandwich-Testformat konnte erfolgreich auf den MCR3 SLT übertragen werden. Die Verkürzung der Assaydauer von 1 h auf wenige Minuten war das Ziel. Bei einer Verzehnfachung der Flussgeschwindigkeit der Probe von 0,2  $\mu\text{L/s}$  auf 2,0  $\mu\text{L/s}$  wurde allerdings eine Signalabnahme um den Faktor 8 erreicht. Erhöhte man jedoch die Assay-Temperatur von 20 °C auf 30 °C, so konnte auch das Signal mehr als verdoppelt werden und eine Assaydauer von ca. 15 - 20 min ermöglicht werden. Auch das Volumen der Chemilumineszenzsubstrate konnte um 60% reduziert werden und so die Kosten pro Messung erheblich gesenkt werden. Nach der Auswertung der jeweiligen Kalibrierkurven konnten Mikroarray-interne Nachweisgrenzen von  $4,8 \cdot 10^3$  *S. aureus*/mL und  $9,6 \cdot 10^2$  *B. cereus*-Sporen/mL erhalten werden. Dank der niedrigen Mikroarray-internen Nachweisgrenzen mussten anstatt 1 L der Aufgabenstellung nur 100 mL Probe aufkonzentriert werden.

Antikörper-Mikroarrays haben den Vorteil gegenüber anderen Nachweismethoden, dass sie sehr selektiv und sehr schnell, d.h. innerhalb eines Arbeitstages durchgeführt werden können. Ebenso müssen die Mikroorganismen nicht mühsam aufbereitet werden, wie es z.B. bei der PCR der Fall ist, sondern können nach Hitze-Inaktivierung oder Autoklavieren direkt eingesetzt werden.

### 3.3 Kombination von Aufkonzentrierung und Detektion

#### 3.3.1 Hitze-inaktivierte *S. aureus*-Zellen in PBS-Puffer

Nun wurde die Kombination von monolithischer Immunfiltration und Antikörper-Mikroarrays durchgeführt. Dazu wurden Hitze-inaktivierte *S. aureus*-Zellen in 100 mL PBS-Puffer als Ausgangsprobe verwendet. Zur Aufkonzentrierung von  $1,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL wurden zwei identische monolithische Affinitätssäulen (1,0 mg/mL anti-*S. aureus* (LMU)) verwendet. Die eingesetzten Proben sowie die Eluate (vorwärts) wurden am MCR3 SLT detektiert (Abbildung 3.37). Zur Detektion wurden Fänger- sowie Detektionsantikörper der LMU verwendet.



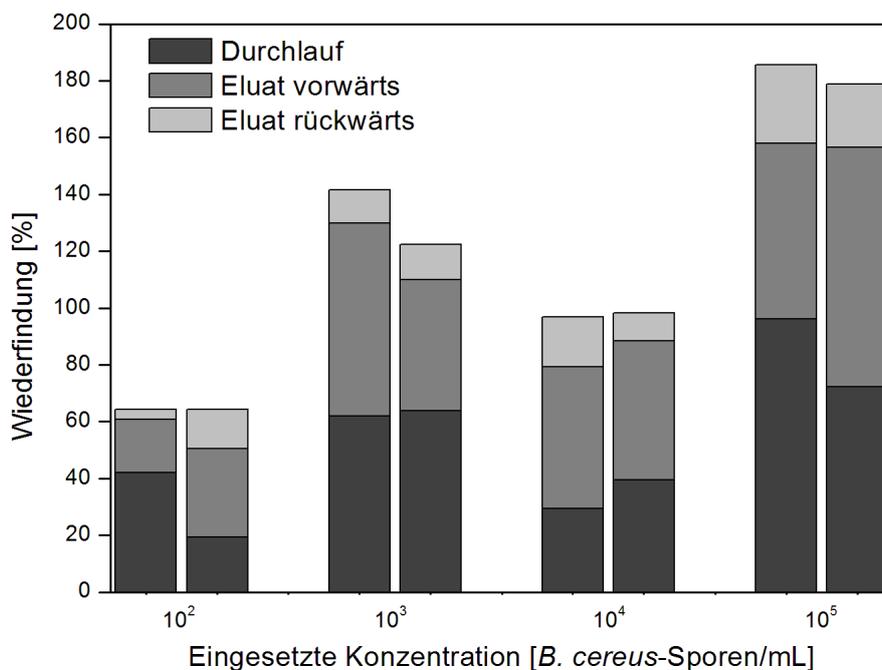
**Abbildung 3.37:** Detektion mittels Antikörper-Mikroarrays: CL-Signale vor und nach der Anreicherung für *S. aureus* in 100 mL PBS-Puffer ( $m = 5$ ).

Anhand der Graphik lässt sich erkennen, dass eine Signalerhöhung erreicht wurde. Lag das Signal vor der Aufkonzentrierung bei  $2.499 \pm 207$  a.u., so wurde es bei der einen Säule nach der Aufkonzentrierung um den Faktor 3 erhöht, bei der anderen ca. um den Faktor 2. Anhand dieser Ergebnisse konnte allerdings nicht untersucht werden, ob die fehlende Reproduzierbarkeit an der Aufkonzentrierung oder an der Mikroarray-Messung lag.

Es wurde allerdings erkannt, dass das Signal im Vergleich zu früheren Messungen stark abgenommen hat. Hatte man bei der Messung der Kalibrierkurve mit den gleichen Bedingungen (2,0  $\mu\text{L/s}$ , 30 °C) bei  $1,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL noch ein CL-Signal von ca. 10.000 a.u. (siehe Kapitel 3.2.3.5), so war es hier nur noch bei  $2.499 \pm 207$  a.u. Dies wurde auf die abnehmende Aktivität des Antikörpers bzw. des Enzyms HRP zurückgeführt. An welchem der beiden Komponenten der Abfall des CL-Signals lag, konnte nicht festgestellt werden, da diese nicht getrennt voneinander betrachtet werden konnte. Generell können HRP-Antikörperkonjugate nur schwierig titriert werden, da beide Bestandteile gleichzeitig verändert werden. Eine Aufteilung des HRP-Antikörperkonjugats in Antikörper-Biotin und Streptavidin-HRP wäre für diesen Zweck sinnvoll (siehe Ausblick).

### 3.3.2 Lebende *B. cereus*-Sporen in PBS-Puffer

Die Aufkonzentrierung der *B. cereus*-Sporen in 100 mL PBS-Puffer erfolgte im lebenden Zustand. Für jede Probe ( $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  und  $10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL) wurden je zwei identische Aufkonzentrierungsexperimente durchgeführt. Ein Teil der eingesetzten Proben, Eluate und Durchläufe wurde mittels Kultivierung quantifiziert. Der andere Teil der eingesetzten Proben und Eluate wurde autoklaviert und am MCR3 SLT gemessen.

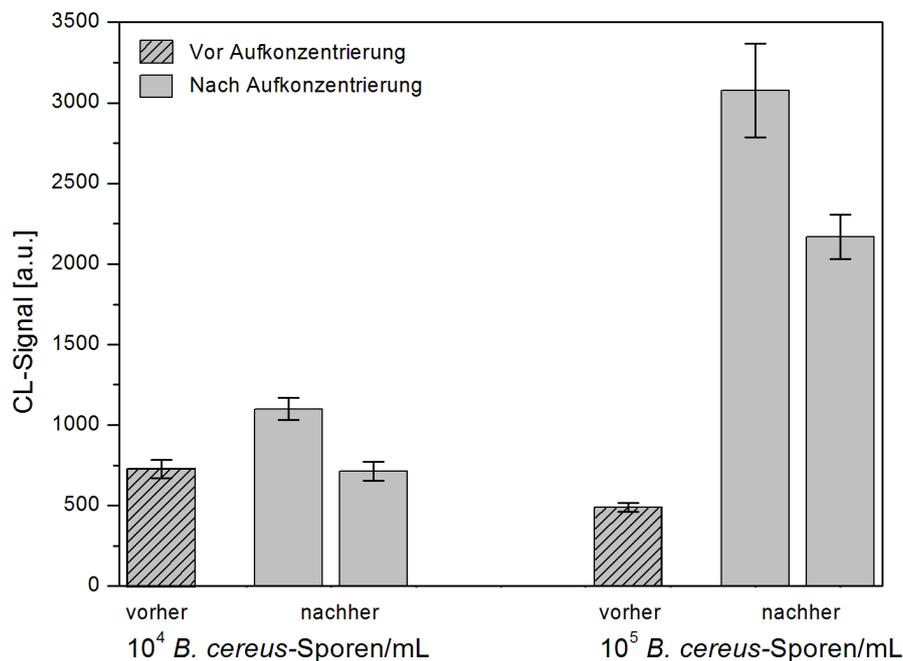


**Abbildung 3.38:** Quantifizierung mittels Kultivierung (Messungen: Fabian Wiescher (LMU)): Wiederfindungen im Durchlauf und in den beiden Eluaten für  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  und  $10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL in 100 mL PBS-Puffer.

Abbildung 3.38 zeigt die Wiederfindungen für den Durchlauf sowie das Vorwärts- und Rückwärtseluat. Für je zwei Versuche mit einer identischen Konzentration wurden ähnliche Werte erhalten. Zwischen den einzelnen Konzentrationen schwankten die Gesamtwiederfindungen vitaler *B. cereus*-Sporen jedoch zwischen 64 und 179%, die Wiederfindungen in den Eluaten schwankten zwischen 22% und 106%. Einige Fehlerquellen bei der Kultivierung wurden bereits beschrieben. Weitere Schwankungen können bei der Verdünnung hervorgerufen worden sein. Da hier vier verschiedene Konzentrationen verwendet wurden, hat die Adsorption der Sporen an die Wand der Pipettenspitze und somit der Fehler bei kleineren Konzentrationen eine höhere Gewichtung.

Die eingesetzten Proben und die Eluate (vorwärts) wurden nach der Inaktivierung durch Autoklavieren am MCR3 SLT gemessen. Die Messungen am MCR3 SLT zeigten Signalerhöhungen nach der Aufkonzentrierung für die Konzentrationen  $10^4$  und  $10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL (Abbildung 3.39).

Für die Konzentration von  $10^4$  *B. cereus*-Sporen/mL konnte das Signal maximal um den Faktor 1,5 erhöht werden. Für  $10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL wurde das Signal um den Faktor 6 bzw. 4 erhöht.

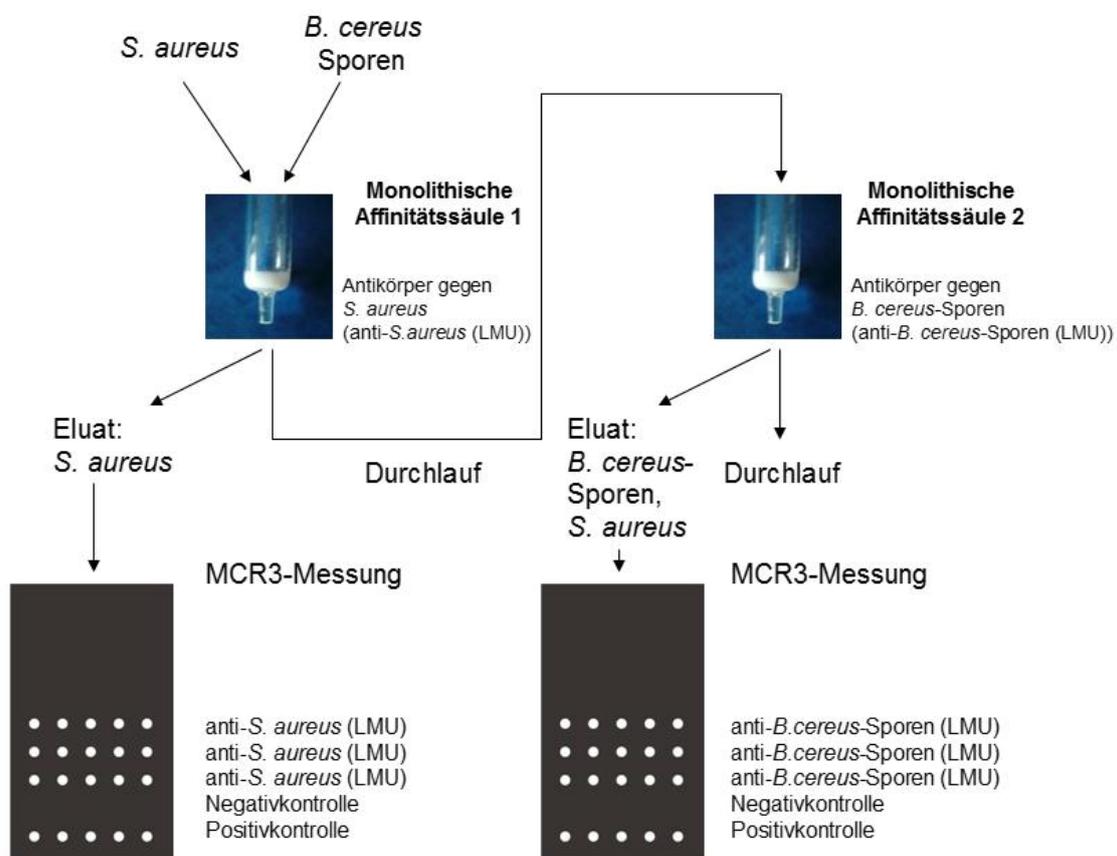


**Abbildung 3.39:** Detektion mittels Antikörper-Mikroarrays: CL-Signale vor und nach der Aufkonzentrierung von *B. cereus*-Sporen in 100 mL PBS-Puffer ( $m = 5$ ).

Diese Werte zeigen, dass die Aufkonzentrierung für die  $10^4$  und  $10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL funktioniert hat. Die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse ist jedoch noch nicht stabil.

### 3.3.3 Mischproben in PBS-Puffer

In diesem Versuchsteil wurden zwei Mischproben (*S. aureus*-Bakterien und *B. cereus*-Sporen gleichzeitig in einer Probe) aufkonzentriert und je zwei Einzelaufkonzentrierungen der beiden Mikroorganismen durchgeführt. Für die beiden Mischproben wurden Hitze-inaktivierte *S. aureus*-Zellen (Protein A-positiv) und lebende *B. cereus*-Sporen zu gleichen Anteilen ( $10^5$  bzw.  $10^6$  Zellen und Sporen pro mL) in 100 mL PBS-Puffer eingesetzt. Ein Ablaufschema der Aufkonzentrierungen der Mischproben ist nachfolgend zu sehen (Abbildung 3.40).



**Abbildung 3.40:** Aufkonzentrierung der Mischprobe und anschließende MCR3 SLT-Messung.

*S. aureus*-Bakterien und *B. cereus*-Sporen wurden gemeinsam als Mischprobe über die monolithische Affinitätssäule 1 geleitet. Die monolithische Affinitätssäule 1 enthält immobilisierte Antikörper gegen *S. aureus*. Bestenfalls konnten 100% der *S. aureus*-Zellen über die Antikörper abgefangen und von den *B. cereus*-Sporen getrennt werden, die im Durchlauf aufgefangen wurden. Die abgefangenen *S. aureus*-Bakterien wurden von der monolithischen Affinitätssäule eluiert und am MCR3 SLT gemessen. Für die Messung wurden gespottete anti-*S. aureus* (LMU) Fängerantikörper verwendet.

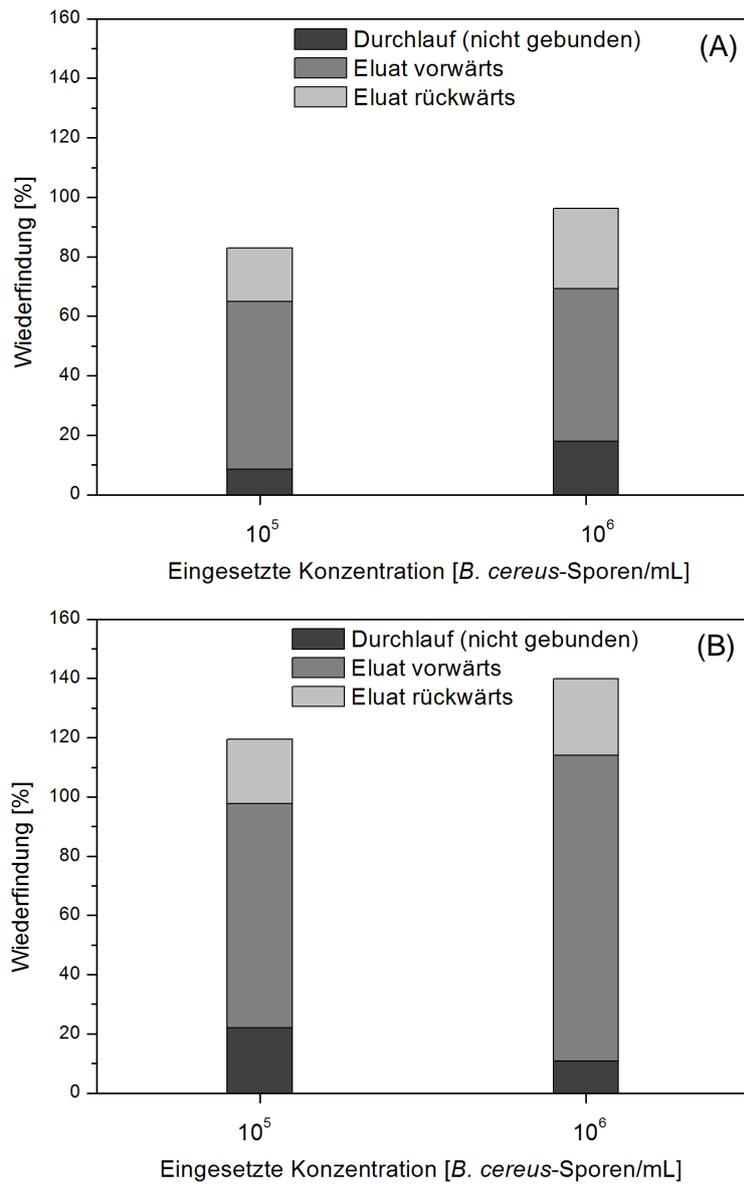
---

Der Durchlauf mit den darin enthaltenen *B. cereus*-Sporen sowie nicht zurückgehaltenen *S. aureus*-Zellen wurden über die monolithische Affinitätssäule 2 geleitet. Diese enthielt immobilisierte Antikörper gegen *B. cereus*-Sporen, welche die *B. cereus*-Sporen zurückhielten. Im Durchlauf befanden sich alle Mikroorganismen, die nicht gebunden wurden. Am MCR3 SLT wurden zum Schluss alle Mikroorganismen gemessen, die durch die anti-*B. cereus*-Sporen in der monolithischen Affinitätssäule zurückgehalten und anschließend eluiert wurden. Dies sind zum einen *B. cereus*-Sporen selber, aber auch *S. aureus*-Bakterien, da diese durch ihre Protein A-positive Oberfläche an die Antigenstruktur der Antikörper binden konnten. Für die MCR3 SLT-Messung wurden auf dem Träger gespottete anti-*B. cereus*-Sporen (LMU)-Fängerantikörper verwendet.

Zum Vergleich wurden Hitze-inaktivierte *S. aureus*-Zellen bzw. lebende *B. cereus*-Sporen in der gleichen Konzentration je einzeln aufkonzentriert.

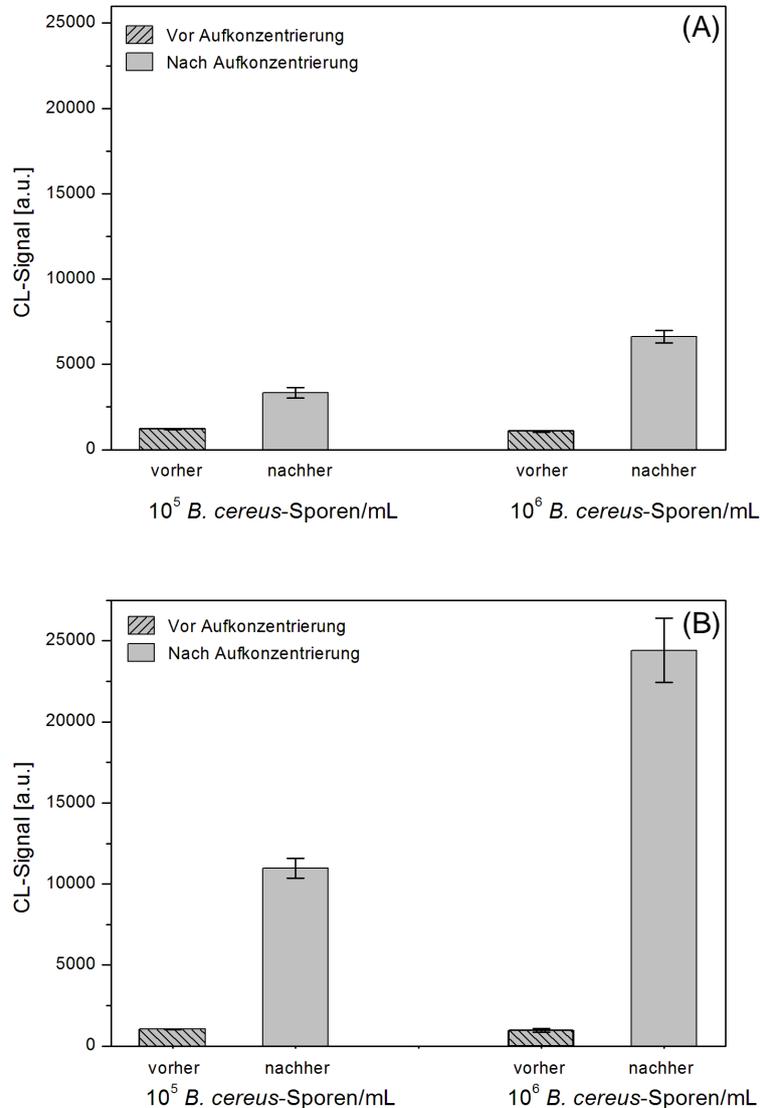
Aus der Aufkonzentrierung der Mischproben konnten für Hitze-inaktivierte *S. aureus*-Zellen keine Messwerte am MCR3 SLT erhalten werden. Die Detektion für lebende *B. cereus*-Sporen erfolgte über Kultivierung bzw. nach Inaktivierung durch Autoklavieren über die Mikroarray-Messung am MCR3 SLT.

Bei der Einzelaufkonzentrierung (Abbildung 3.41 (A)) konnten durch Kultivierung für eine eingesetzte Konzentration von  $10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL 9% vitale *B. cereus*-Sporen im Durchlauf und 74% in den Eluaten wiedergefunden werden. Bei einer eingesetzten Konzentration von  $10^6$  *B. cereus*-Sporen/mL waren es 18% vitale *B. cereus*-Sporen im Durchlauf und 76% in den Eluaten. Durch Aufkonzentrierung der Mischproben (Abbildung 3.41 (B)) wurden bei beiden Konzentrationen Überbestimmungen festgestellt. In den Eluaten waren dies z.B. 98% bzw. 129%. Diese Überbestimmungen sind allerdings nicht auf die *S. aureus*-Zellen zurückzuführen, da diese Hitze-inaktiviert waren und durch Kultivierung nicht mehr wachsen konnten, sondern auf allgemein bekannte Schwankungen der Kultivierung.



**Abbildung 3.41:** Quantifizierung mittels Kultivierung (Messungen: Fabian Wiescher (LMU)): Wiederfindungen im Durchlauf und den beiden Eluaten für *B. cereus*-Sporen in 100 mL PBS-Puffer, (A) Einzelaufkonzentrierung, (B) Mischauflaufkonzentrierung mit *S. aureus*-Zellen.

Ein Einfluss der Protein A-positiven *S. aureus*-Zellen wurde allerdings bei den Mikroarray-Messungen beobachtet (Abbildung 3.42).



**Abbildung 3.42:** Nachweis mit Antikörper-Mikroarrays: CL-Signale vor und nach der Aufkonzentrierung von *B. cereus*-Sporen in 100 mL PBS-Puffer ( $m = 5$ ); (A) Einzelaufkonzentrierung, (B) Mischkonzentrierung mit *S. aureus*-Zellen.

Bei den Einzelaufkonzentrierungen (Abbildung 3.42 (A)) wurden die CL-Signale für eine eingesetzte Konzentration von  $10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL um den Faktor 3 erhöht, für eine eingesetzte Konzentration von  $10^6$  *B. cereus*-Sporen/mL um den Faktor 6. Bei der Aufkonzentrierung der Mischproben (Abbildung 3.42 (B)) lagen die CL-Signale der Eluate (vorwärts) für beide Konzentrationen um den Faktor 3-4 höher als für die Einzelaufkonzentrierungen. Die erhöhten Signale sind auf den Einfluss der Protein A-positiven *S. aureus*-Zellen zurückzuführen, die zusammen mit den *B. cereus*-Sporen in der

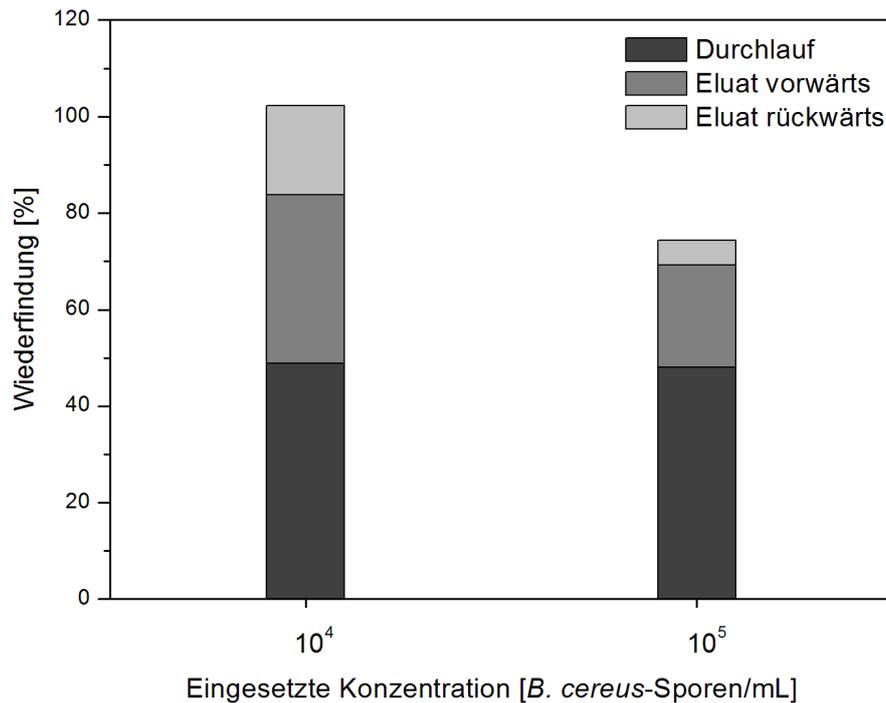
monolithischen Affinitätssäule 2 zurückgehalten und aus dieser eluiert wurden. Da die Protein A-positiven *S. aureus*-Zellen auch an die Fänger- und Detektionsantikörper der Mikroarray-Messung binden, wurden dadurch falsch positive Signale bei der MCR3 SLT-Messung ausgelöst.

Eine Trennung der beiden Mikroorganismen wird erst möglich sein, wenn für Protein A-negative *S. aureus* effektive Antikörper entwickelt wurden.

### **3.3.4 Lebende *B. cereus*-Sporen in Milch**

Als Abschlussversuch wurde eine Kombination aus allen entwickelten Systemen durchgeführt. Dazu wurde die neue Aufkonzentrierungsapparatur (siehe Kapitel 3.1.5) verwendet und die Aufkonzentrierung von lebenden *B. cereus*-Sporen in 100 mL Magermilch bei 37 °C durchgeführt. Die eingesetzten Proben, Durchläufe und Eluate wurden mittels Kultivierung über Nacht und Auszählen der Kolonien quantifiziert. Nach Abtöten der eingesetzten Proben und der Eluate (vorwärts) wurden diese am MCR3 SLT detektiert und die Chemilumineszenzsignale bestimmt.

Über Kultivierung konnte gezeigt werden, dass bei einer eingesetzten Konzentration von  $10^4$  *B. cereus*-Sporen/mL nach der Aufkonzentrierung ca. 50% der *B. cereus*-Sporen im Durchlauf, die übrigen 50% in den beiden Eluaten wiedergefunden werden konnten (Abbildung 3.43). Bei einer eingesetzten Konzentration von  $10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL wurden im Durchlauf ebenfalls ca. 50% wiedergefunden, allerdings waren es in den beiden Eluaten zusammen nur 26%. Die restlichen *B. cereus*-Sporen verblieben auf der monolithischen Affinitätssäule. Die hohen Wiederfindungen im Durchlauf konnten auf die Konzentration und die Matrix zurückgeführt werden.

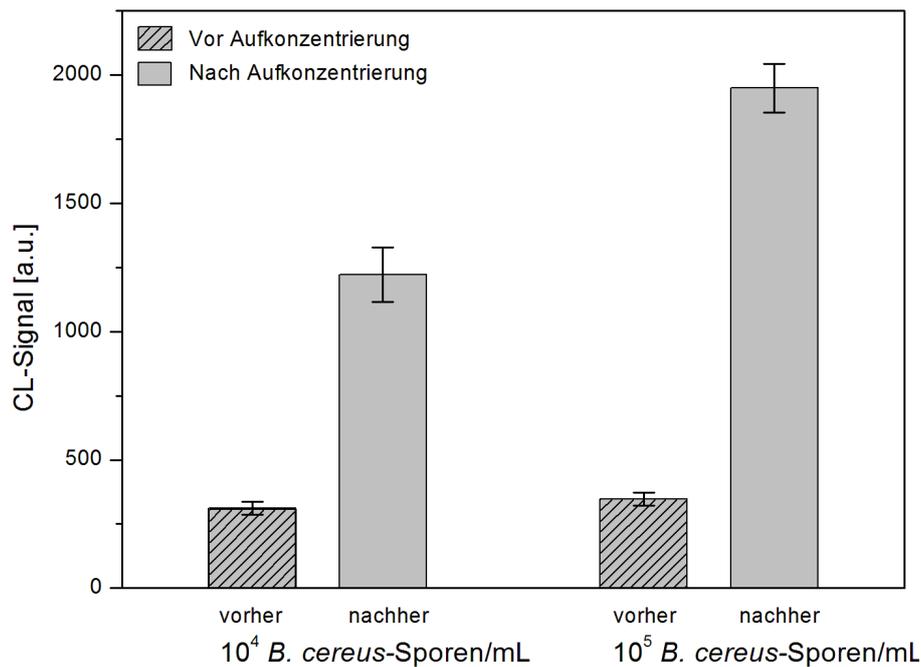


**Abbildung 3.43:** Quantifizierung mittels Kultivierung (Messungen: Fabian Wiescher (LMU)): Wiederfindungen im Durchlauf und den beiden Eluaten für *B. cereus*-Sporen in 100 mL Magermilch.

Eine Aufkonzentrierung von *B. cereus*-Sporen aus Milch wurde bereits in Kapitel 3.1.7.2.2 beschrieben. Dort war die maximal eingesetzte Konzentration  $10^3$  *B. cereus*-Sporen/mL und nach der Aufkonzentrierung wurden im Durchlauf bis zu 28% der Sporen wiedergefunden, in den Eluaten bis zu 57%. Die hohen Wiederfindungsraten im Durchlauf in dem aktuellen Versuch konnten auch dadurch erklärt werden, dass man sich bei höheren Konzentrationen wie  $10^4$  bzw.  $10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL immer mehr der Kapazitätsgrenze der monolithischen Affinitätssäule näherte.

Einen weiteren Beitrag leisteten die Proteine der Milch, die unspezifisch an der Oberfläche des Polymers anhaften konnten und die Sporen sterisch daran hinderten, an die Antikörper zu binden. Bei dem gleichen Versuch für  $10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL in PBS-Puffer (Einzelaufkonzentrierung, Kapitel 3.3.3) waren vergleichsweise nur 9% *B. cereus*-Sporen im Durchlauf und 74% konnten in den Eluaten wiedergefunden werden.

Die Messungen am MCR3 SLT wurden erstmalig nach der Aufkonzentrierung von *B. cereus*-Sporen aus Milch durchgeführt. Es konnten starke Signalerhöhungen nach der Aufkonzentrierung erreicht werden (Abbildung 3.44).



**Abbildung 3.44:** Nachweis mit Antikörper-Mikroarrays: CL-Signale vor und nach der Aufkonzentrierung von *B. cereus*-Sporen in 100 mL Magermilch (m = 5).

So konnte das Signal bei einer Konzentration von  $10^4$  *B. cereus*-Sporen/mL von  $311 \pm 25$  a.u. auf  $1.222 \pm 106$  a.u., bei  $10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL von  $347 \pm 26$  a.u. auf  $1.949 \pm 95$  a.u. erhöht werden. Das entspricht in beiden Fällen ca. einer Signalerhöhung um den Faktor 4 bzw. 6.

### 3.3.5 Zusammenfassung der Kombination

Die Aufkonzentrierung und Mikroarray-Detektion wurden miteinander kombiniert. Dazu wurden für beide Systeme die optimierten Bedingungen verwendet, die in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurden. Die Mikroorganismen wurden zunächst in PBS-Puffer aufkonzentriert. Mit Hilfe der Mikroarray-Detektion wurden die CL-Signale vor und nach der Aufkonzentrierung verglichen. Die Kombination der beiden Systeme ergab für Hitze-inaktivierte *S. aureus*-Zellen und einer eingesetzten Konzentration von  $10^6$  *S. aureus*/mL eine Signalerhöhung um den Faktor 2 - 3. Die *B. cereus*-Sporen wurden durch Autoklavieren zunächst abgetötet. Bereits ab einer eingesetzten Konzentration  $10^4$  *B. cereus*-Sporen/mL wurde eine Signalerhöhung um den Faktor 1,5 erzielt.

Bei der Aufkonzentrierung zweier Mischproben (Hitze-inaktivierte *S. aureus*-Bakterien und lebende *B. cereus*-Sporen in einer Probe) wurden beide Mikroorganismen zu gleichen Anteilen eingesetzt. Zum Vergleich wurden für jedes Pathogen Einzelaufkonzentrierungen der gleichen Konzentrationen durchgeführt. Die beiden Mikroorganismen konnten nicht

getrennt werden, da durch die monolithische Affinitätssäule 1 die *S. aureus*-Zellen nur in geringem Maß zurückgehalten wurden. Aufgrund der Eigenschaft der Protein A-positiven *S. aureus*-Zellen, an den Fänger- und Detektionsantikörper von anti-*B. cereus*-Sporen zu binden, wurden bei den Antikörper-Mikroarrays Überbestimmungen festgestellt.

Eine abschließende Kombination von Aufkonzentrierung und Detektion wurde anhand zweier 100-mL-Magermilchproben mit verschiedenen Sporen-Konzentrationen ( $10^4$  bzw.  $10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL) getestet. Erstmals wurde die neue Aufkonzentrierungsapparatur verwendet, nach deren Kombination mit dem MCR3 SLT für beide Konzentrationen Signalerhöhungen um den Faktor 4 bzw. 6 erzielt werden konnten.



---

## **TEIL 4**

### **ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK**

### **SUMMARY AND OUTLOOK**

## 4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Lebensmittelkontrolle des Grundnahrungsmittels Milch ist sehr wichtig, besonders um die Gesundheit der Verbraucher zu schützen und frühzeitig kontaminierte Produkte zu finden. Bisherige Detektionsverfahren basieren auf Kultivierung und sind sehr arbeits- und zeitintensiv. Aus diesem Grund wird an der Entwicklung und Kombination einer selektiven Aufkonzentrierung und einem Immunoassay gearbeitet. Ein Schnelldiagnostik wie dieser hätte verschiedene Vorteile, z.B. dass das Produkt schneller in den Handel gelangen und so die Haltbarkeit beim Verbraucher verlängert werden kann. Des Weiteren könnten auch Rückrufaktionen vermieden werden.

Diese Dissertation beschreibt *Staphylococcus aureus*-Zellen bzw. *Bacillus cereus*-Sporen, die mit Hilfe der monolithischen Immunfiltration von der Milchmatrix abgetrennt und aufkonzentriert wurden. Des Weiteren wurde die Detektion mittels Antikörper-Mikroarrays für beide Mikroorganismen entwickelt und optimiert. Im Anschluss wurden beide Systeme miteinander kombiniert.

Zu Beginn wurde die schrittweise modifizierte Oberfläche der monolithischen Affinitätssäule charakterisiert. Die Oberflächenchemie war nötig, um funktionelle Gruppen einzuführen, an die Antikörper gegen *S. aureus*-Zellen und *B. cereus*-Sporen binden konnten.

Das monolithische Material hat eine kontinuierliche schwammartige Struktur mit einem mittleren Porendurchmesser von  $21 \pm 7 \mu\text{m}$ . Dieser wurde mittels Hg- porosimetrie bestimmt. Im Anschluss konnte die Belegung von 3-Glycidioxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) nachgewiesen werden, welches zusätzliche Epoxygruppen einführte. Der Nachweis erfolgte über die energiedispersive Röntgenfluoreszenzspektroskopie (EDX). Mittels 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS)-Test wurde die weitere Belegung der Oberfläche mit Diaminopolyethylenglykol (DAPEG) durch das orange gefärbte Derivat gezeigt. Nach der Aktivierung mit Disuccinimidylcarbonat (DSC) wurde die Antikörperbelegung auf der Oberfläche detektiert. Dies gelang zum einen mit immobilisierten Antikörpern gegen Meerrettichperoxidase (anti-HRP), die HRP abfingen und welche wiederum die Reaktion von 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) katalysierten. Das blaue Produkt machte die Antikörperbelegung sichtbar. Zum anderen konnte die immobilisierte Antikörperkonzentration auf der monolithischen Affinitätssäule mittels kommerziell erhältlichem Bicinchoninsäure (BCA)-Test optimiert und nachgewiesen werden. Für anti-*S. aureus* war der Wert bei

---

2,4 ± 0,5 mg pro g Monolith. Es hat sich gezeigt, dass die Aktivierung am besten stationär (4 h) abläuft, die Immobilisierung der Antikörper durch Zirkulieren über Nacht.

Es wurde der Rückdruck für Milch und Wasser untersucht, wobei Milch einmal bei Raumtemperatur und einmal bei 37 °C getestet wurde. Es hat sich herausgestellt, dass der Rückdruck bei Milch höher war als bei Wasser, welcher allerdings durch Temperaturerhöhung reduziert werden konnte. Dies war darauf zurückzuführen, dass Matrixbestandteile wie z.B. das Milchfett durch Erwärmen der Milch verflüssigt wurden.

Es wurde eine Aufkonzentrierungsapparatur geplant und von der institutseigenen Werkstatt aufgebaut. Diese hatte v.a. den Vorteil, dass sie leicht zu transportieren war, da alle Bestandteile über ein Edelstahlgehäuse miteinander verbunden waren. Durch den geschlossenen Aufbau und den beiden Sterilbeuteln für Probe und Durchlauf, war die Aufkonzentrierung für den Anwender besonders benutzerfreundlich, da keine pathogenen Bakterien austreten konnten.

Die Parameter für die monolithische Immunfiltration wurden mit immobilisierten, kommerziell erhältlichen, polyklonalen Antikörpern gegen *S. aureus* der Firma ViroStat optimiert. Dazu wurden Hitze-inaktivierte *S. aureus*-Zellen (Protein A-positiv) in PBS-Puffer verwendet, die nach der Aufkonzentrierung über eine Doppelmarkierung mit dem Fluoreszenzfarbstoff SYTO 9 und dem polyklonalen Antikörperkonjugat anti-*S. aureus*-PE-Cy5 angefärbt und am Durchflusszytometer (FCM) gemessen wurden. Zunächst wurden die optimale Länge der monolithischen Affinitätssäule und die Flussgeschwindigkeit der Probe bestimmt. Es hat sich gezeigt, dass für eine Länge von 3,7 mm und einer Flussgeschwindigkeit von 7,0 mL/min eine schnelle Durchführung mit einem effektiven Rückhalt in der monolithischen Affinitätssäule erreicht wurde. Die Elution wurde dann im Anschluss optimiert. Es zeigte sich, dass eine Vorwärtselution mit anschließender Rückwärtselution die höchsten Wiederfindungen ergab. Es wurden unterschiedliche pH-Werte des Elutionspuffers und zwei Elutionsgeschwindigkeiten getestet: 1 - 2 Tropfen/s (langsame Elution) oder mehr als 1 mL/s (schnelle Elution). Eine schnelle Elution bei einem pH-Wert des Glycinpuffers von 3 und mit 0,1% zusätzlichem Detergenz *Tween*® 20 lieferte die besten Ergebnisse mit einer Gesamtwiederfindung von 74,1 ± 3,9% *S. aureus*-Bakterien im Eluat, bezogen auf den Rückhalt. Mit Hilfe dieser optimierten Bedingungen konnte gezeigt werden, wie effektiv die monolithische Immunfiltrationsmethode war. Dazu wurden die Konzentrationen einer Verdünnungsreihe ohne bzw. nach der Aufkonzentrierung über die monolithische Immunfiltration bestimmt. Es konnte gezeigt werden, dass nach der monolithischen Immunfiltration der lineare Bereich um den Faktor 10 zu niedrigeren Konzentrationen verschoben ist als ohne Aufkonzentrierung.

Weitere Aufkonzentrierungsversuche wurden mit lebenden Mikroorganismen in Zusammenarbeit mit dem Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch (LMU) durchgeführt. Dort wurden die Ausgangskonzentrationen, Eluate und Durchläufe mittels Kultivierung quantifiziert. Zur Aufkonzentrierung wurden monolithische Affinitätssäulen mit immobilisierten polyklonalen Antiseren gegen *S. aureus*-Zellen bzw. *B. cereus*-Sporen der LMU eingesetzt. Für *S. aureus* wurden sowohl der Protein A-positive als auch der Protein A-negative Stamm untersucht. Es konnten 35% Protein A-positive *S. aureus*-Bakterien im Eluat wiedergefunden werden, Protein A-negative nur 9%. Dies war auf das Protein A zurückzuführen, das bei den Protein A-positiven *S. aureus*-Bakterien auf der gesamten Oberfläche verteilt ist und Bindungen mit den IgG des polyklonalen Antiserums eingeht. Ein Kreuzversuch zeigte dieselben Trends. Während *B. cereus*-Sporen nicht von immobilisierten anti-*S. aureus* Antikörpern zurückgehalten wurden, konnten Protein A-positive *S. aureus*-Bakterien von immobilisierten anti-*B. cereus*-Sporen Antikörpern auf der monolithischen Affinitätssäule gebunden werden.

Positive Ergebnisse erhielt man für 100-mL-Proben, die mit  $10^3$ ,  $10^4$  bzw.  $10^5$  *B. cereus*-Sporen aufgestockt wurden. Für die Aufkonzentrierung aus 100 mL PBS-Puffer wurden bis zu 96% im Eluat wiedergefunden. Des Weiteren konnten aufgestockte 100-mL-Magermilchproben mit Wiederfindungen im Eluat von bis zu 57% bei 37 °C aufkonzentriert werden.

Die Detektion mittels Antikörper-Mikroarrays wurde mit zwei verschiedenen automatisierten Chemilumineszenz-Auslesesystemen durchgeführt. Zunächst wurden erste Versuch am Immunomat durchgeführt. Im Anschluss wurde der Sandwich-Immunoassay auf den MCR3 SLT übertragen.

Eine Messung Protein A-positiver und Protein A-negativer, Hitze-inaktivierter *S. aureus*-Zellen zeigte die gleichen Tendenzen, die auch schon bei der monolithischen Immunfiltration festgestellt wurden. Während für Protein A-positive *S. aureus*-Zellen hohe Chemilumineszenzsignale (CL-Signale) auftraten, erhielt man keine für Protein A-negative *S. aureus*-Zellen.

Im Sandwich-Immunoassay-Testformat wurden Hitze-inaktivierte *S. aureus*-Bakterien in unterschiedlichen Matrices (neutralisierter Glycinpuffer, Magermilch) und mit unterschiedlichen Antikörpern (ViroStat, LMU) getestet. Es wurde nachgewiesen, dass eine Messung in neutralisiertem Elutionspuffer mit optimierten Antikörpern (LMU) eine 20-fach höhere Nachweisstärke hatte. Eine Abtrennung der Milchmatrix mit Hilfe der monolithischen Immunfiltration ist deshalb grundlegend nötig, um Signale bei geringeren Konzentrationen zu erhalten.

---

Am MCR3 SLT wurde ein Sandwich-Immunoassay etabliert, der bei gleichbleibender *S. aureus*-Konzentration in etwa die gleichen CL-Signale lieferte wie am Immunomat. Es wurde untersucht, ob der Assay durch Erhöhung der Probengeschwindigkeit zeitlich verkürzt werden konnte. Dies erwies sich als schwierig, da dadurch das Signal abfiel. Eine Temperaturerhöhung in der Flusszelle hatte zur Folge, dass die Signale wieder anstiegen, jedoch auch das Hintergrundsignal. Aus diesem Grund wurde für die nachfolgenden Versuche eine Temperatur gewählt, bei der man einen Anstieg des CL-Signals hatte und das Hintergrundsignal nicht zu hoch war. Dies war bei einem hohen S/N-Verhältnis bei einer Temperatur der Flusszelle von 30 °C der Fall. Neben dieser Optimierung konnte auch das Volumen der Chemilumineszenzsubstrate und die Kosten der einzelnen Messung um 60% reduziert werden. Bei einer Temperatur von 30°C war ein Immunoassay innerhalb von 15 - 20 min möglich. Die Mikroarray-interne Nachweisgrenze lag für Hitze-inaktivierte Protein A-positive *S. aureus* bei  $4,8 \cdot 10^3$  *S. aureus*/mL. Für autoklavierte *B. cereus*-Sporen lag sie bei  $9,6 \cdot 10^2$  *B. cereus*-Sporen/mL.

Zum Schluss wurden Aufkonzentrierung und Mikroarray-Detektion miteinander kombiniert. Mit Hilfe der Mikroarray-Detektion wurden die CL-Signale vor und nach der Aufkonzentrierung verglichen. Bei  $1,0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL konnte mittels MCR3 SLT nach der Aufkonzentrierung eine maximale Signalerhöhung um den Faktor 2 - 3 erreicht werden. Eine Signalerhöhung um den Faktor 1,5 konnte bei *B. cereus*-Sporen bereits ab  $10^4$  *B. cereus*-Sporen/mL erzielt werden.

Es wurden zwei Mischproben aufkonzentriert (*S. aureus*-Bakterien und *B. cereus*-Sporen gleichzeitig in einer Probe) und je zwei Einzelaufkonzentrierungen der beiden Mikroorganismen durchgeführt. Für die beiden Mischungen wurden Hitze-inaktivierte Protein A-positive *S. aureus*-Zellen und lebende *B. cereus*-Sporen zu gleichen Anteilen ( $10^5$  bzw.  $10^6$  Zellen und Sporen pro mL) eingesetzt. Die Einzelaufkonzentrierungen und Aufkonzentrierungen der Mischproben wurden für *B. cereus*-Sporen über Kultivierung und MCR3 SLT-Messung detektiert, für *S. aureus* wurden nur MCR3 SLT-Messungen durchgeführt. Für *S. aureus* wurden keine Ergebnisse erhalten. Bei der Aufkonzentrierung der Mischproben lagen die CL-Signale der Eluate für beide Konzentrationen drei- bis viermal höher als für die Einzelaufkonzentrierungen. Dies war auf die Kreuzreaktivität von Protein A-positiven *S. aureus*-Bakterien zurückzuführen. Es wurden vermutlich nicht alle *S. aureus*-Bakterien über die erste monolithische Affinitätssäule mit immobilisierten anti-*S. aureus* zurückgehalten, sondern mit den *B. cereus*-Sporen zusammen über die monolithische Affinitätssäule mit immobilisierten anti-*B. cereus*-Sporen geleitet. Bei der MCR3 SLT-Messung wurden die *S. aureus*-Zellen als falsch positives Signal miterfasst.

Beim Abschlussversuch dieser Dissertation wurden alle Systeme miteinander kombiniert. Es wurden zwei 100-mL-Magermilchproben mit  $10^4$  bzw.  $10^5$  *B. cereus*-Sporen/mL versetzt, auf 37 °C erwärmt und über die neue Aufkonzentrationsapparatur geleitet. Eingesetzte Probe, Durchläufe und Eluate wurden über Kultivierung quantifiziert und die Wiederfindungen bestimmt. Es konnten bis zu 50% *B. cereus*-Sporen in den Eluaten gemessen werden. Dies war etwas weniger als bei dem ersten Versuch in Magermilch, jedoch konnte dies durch die höhere Konzentration begründet werden. Nach Autoklavieren der eingesetzten Proben und der Eluate (vorwärts) konnten die CL-Signale am MCR3 SLT gemessen werden. Das CL-Signal des Eluats konnte im Vergleich zur Probe vor der Aufkonzentrierung ca. um den Faktor 4 - 6 erhöht werden.

Für *S. aureus* sind gesetzliche Grenzwerte von 100 *S. aureus*/mL definiert. Da für *B. cereus* bzw. *B. cereus*-Sporen keine Grenzwerte definiert sind, orientierte man sich an den gesetzlichen Grenzwerten von *S. aureus*. Dementsprechend lag die geforderte Nachweisgrenze bei 100 Keimen bzw. Sporen/mL. Für *S. aureus* ließen sich die Versuche nur für den Protein A-positiven Stamm verwirklichen, da der Protein A-negative Stamm kein Bindungsverhalten zu den verwendeten Antikörpern zeigte. Mit Mikroarray-internen Nachweisgrenzen von  $4,8 \cdot 10^3$  *S. aureus*/mL (Hitze-inaktiviert, Protein A-positiver *S. aureus*-Stamm) und  $9,6 \cdot 10^2$  *B. cereus*-Sporen/mL der Antikörper-Mikroarrays reichte bereits eine Aufkonzentrierung von 100 mL Probe, um im Bereich der gesetzlichen Grenzwerte zu liegen. Aufgrund des Aktivitätsverlusts der Antikörper bzw. des HRP konnte man sich jedoch nicht auf die zuvor erstellten Kalibrierkurven beziehen und so keine Konzentrationen bestimmen.

In dieser Dissertation wurden erstmalig Mikroorganismen aus Milch mit Hilfe immobilisierter Antikörper an einem monolithischen Träger aufkonzentriert. Ebenso wurde erstmalig die schnelle Detektion von Mikroorganismen am MCR3 SLT mit Hilfe einer Temperaturregelung gewährleistet. Die Kombination der beiden Methoden wurde erfolgreich durchgeführt und somit konnte die Prinzipstudie abgeschlossen werden. Nach der ersten Entwicklung des kombinierten Systems kann dieses mit leistungsstärkeren Antikörpern weiter optimiert werden. Für zukünftige Messungen wird auch eine Modifizierung des Sandwich-Testformats sinnvoll sein. Diese sieht die Verwendung eines Biotin-markierten Antikörpers anstatt eines HRP-markierten Antikörpers vor. An das Biotin bindet in einem zusätzlichen Schritt das Streptavidin-HRP-Konjugat. Nachteilig an dieser Methode ist die Tatsache, dass ein zusätzlicher Schritt auch einen weiteren Spülschritt und somit eine Verlängerung der Assaydauer nach sich zieht. Der Vorteil dieser beiden Konjugate ist allerdings, dass sowohl der Antikörper als auch das Enzym getrennt voneinander titriert werden können und die

Parameter der jeweiligen Anwendung entsprechend durch Konzentrationserhöhung oder Verdünnung angepasst werden können. Nimmt beispielsweise die Aktivität des Antikörpers ab, so kann die Konzentration des Antikörper-Biotin-Konjugats erhöht werden, bei gleich bleibender Streptavidin-HRP-Konzentration.

Das weiterentwickelte System kann schließlich auf weitere Anwendungen des Lebensmittelbereichs angepasst werden. Eine direkte Anwendung für die Quantifizierung von Lebensmitteltoxinen wie z.B. *Staphylococcus*-Enterotoxinen ist auch denkbar. So ist der Anfang für einen Schnelldachweis mikrobieller Kontaminationen in Lebensmitteln gemacht, der es bis zur Marktreife schaffen kann.

## 4 Summary and outlook

The control of the staple food milk is very important, especially for saving the consumer's health and finding contaminated products at an early stage. Previous procedures for detection are based on cultivation and are very labor- and time-consuming. Therefore the development and combination of a selective enrichment and an immunoassay is being researched. A quick reference like that would have several advantages, for example products becoming faster available for commerce, and prolonged storability at the consumer. Additionally product recalls could also be prevented.

This thesis describes *Staphylococcus aureus* bacteria and *Bacillus cereus* spores, respectively, being separated and enriched from the milk matrix via monolithic immunofiltration. Furthermore the detection with antibody microarrays was developed and optimized for both microorganisms. Both systems were combined thereafter.

At the beginning a stepwise modified surface of the monolithic affinity column was characterized. The surface chemistry was needed to insert functional groups where antibodies could bind *S. aureus* bacteria and *B. cereus* spores.

The monolithic material has a continuous spongy structure with an average pore diameter of  $21 \pm 7 \mu\text{m}$ , which was determined by Hg-porosimetry. Then the coating of 3-glycidyloxypropyltrimethoxysilane (GOPTS) could be proved, which inserted additional epoxy groups. The detection was done with energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy (EDX). By using 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate the further coating of the surface with poly(ethylene glycol diamine) (DAPEG) was shown by the orange colored derivative. After activation with di(*N*-succinimidyl)carbonate (DSC) the antibody coating on the surface was detected. On the one hand this succeeded by the use of immobilized antibodies against horseradish peroxidase (anti-HRP) which captured the HRP, which in turn catalysed the reaction of 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB). The blue product visualized the antibody coating. On the other hand the concentration of immobilised antibodies on the monolithic affinity column was optimized and detected by a commercially available bicinchoninic acid (BCA) test. For anti-*S. aureus* the value has been  $2.4 \pm 0.5 \text{ mg per g}$  of monolith. It was shown that the activation was proceeded best at stationary conditions (4 h), the immobilization of the antibody by circulating over night.

The back pressure for milk and water was examined using milk at room temperature as well as at  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ . The back pressure turned out to be higher for milk than for water, which could be

---

reduced by increased temperatures, however. This was traced to the matrix components like e.g. milk fat being liquified by heating.

An enrichment apparatus was planned and afterwards constructed by the institute's own workshop. This apparatus had the advantage above all being easy to transport, because all components were connected by a body of stainless steel. With the closed setup and two sterile bags for sample and flow-through the enrichment was very user-friendly, because no pathogens could leak from it.

The parameters for the monolithic immunofiltration were optimized with immobilized, commercially available, polyclonal antibodies against *S. aureus* from the company ViroStat. For that purpose heat inactivated *S. aureus* bacteria (protein A-positive) were used in PBS buffer, which were dyed after enrichment with the fluorophore SYTO 9 and the polyclonal antibody conjugate anti-*S. aureus*-PE-Cy5 and measured at the flow cytometer (FCM). The optimal length of the monolithic affinity column and the flow rate of the sample were determined first. For a length of 3.7 mm and a flow rate of 7.0 mL/min a fast performance with effective capture in the monolithic column was reached. The elution was optimized thereafter. The highest recoveries were obtained for forward elutions followed by backward elutions. Different pH values of the elution buffer and two elution rates were tested: 1 - 2 droplets/s (slow elution) or more than 1 mL/s (fast elution). A fast elution at a pH value of the glycine buffer of 3 and 0.1% of additional detergent Tween® 20 yielded the best results with a total recovery of  $74.1 \pm 3.9\%$  *S. aureus* bacteria in the eluate referred to the capture. These optimized conditions have shown how effectively the monolithic immunofiltration worked. Thereto the concentrations of a dilution row without and after enrichment with monolithic immunofiltration were determined, respectively. The linear working range was proven to be shifted after enrichment to lower concentrations by factor 10 in comparison to the one without enrichment.

Further enrichment experiments were done with living microorganisms in cooperation with the Chair for Hygiene and Technology of Milk (LMU). There the applied samples, eluates and flow-throughs were quantified via cultivation. For enrichment, the monolithic affinity columns with immobilized polyclonal antisera against *S. aureus* bacteria and *B. cereus* spores of the LMU were used, respectively. For *S. aureus* the protein A-positive and protein A-negative strains were examined. 35% protein A-positive *S. aureus* bacteria could be recovered in the eluate, whereas only 9% of the protein A-negative bacteria were found. This was ascribed to the protein A, because it is distributed on the whole surface of protein A-positive *S. aureus* and binds with the IgG of the polyclonal antiserum. An experiment for determining cross reactivity showed the same trends. *B. cereus* spores were not captured by immobilized anti-

*S. aureus* antibodies on the monolithic affinity column, whereas protein A-positive *S. aureus* bacteria were captured by immobilized anti-*B. cereus* spores antibodies.

Positive results were obtained for 100-mL samples, which were spiked with  $10^3$ ,  $10^4$  and  $10^5$  *B. cereus* spores, respectively. For the enrichment out of 100 mL PBS buffer up to 96% were recovered in the eluate. Furthermore, spiked 100-mL skimmed milk samples with recovery rates in the eluate of up to 57% at 37 °C were enriched.

The detection with antibody microarrays was performed with two different automated chemiluminescence read-out systems. The first experiments were performed with the Immunomat. Then the sandwich immunoassay was transferred to the MCR3 SLT afterwards. A measurement of protein A-positive and protein A-negative heat-inactivated *S. aureus* bacteria showed the same trends which were already determined for monolithic immunofiltration. Protein A-positive *S. aureus* bacteria showed high chemiluminescence signals (CL signals), whereas for protein A-negative *S. aureus* bacteria none were obtained.

In the sandwich immunoassay format heat-inactivated *S. aureus* bacteria were tested in different matrices (neutralized glycine buffer, skimmed milk) and different antibodies (ViroStat, LMU). A measurement in neutralised elution buffer with optimized antibodies (LMU) showed a 20-fold higher detection strength. Therefore a separation of the milk matrix by using the monolithic immunofiltration is essential to get signals at lower concentrations.

With the MCR3 SLT a sandwich immunoassay was established, which provided approximately the same CL signals for the same concentration of *S. aureus* bacteria. It was analyzed, whether the assay could be shortened by increasing the flow rate of the sample. This proved to be difficult, because the signal declined. An increase of the temperature in the flow cell implicated an increase of the signals, but also of the background signal. Therefore for the following experiments a temperature was chosen, for which an increase of the CL signals was obtained at low background signals. This was obtained for a high signal-to-noise ratio for a temperature of the flow cell of 30 °C. Beside the optimization the volume of the chemiluminescence substrates, the costs of a single measurement could also be reduced by 60%. At a temperature of 30 °C an immunoassay was possible within 15 - 20 min. The microarray's internal detection limit was  $4.8 \cdot 10^3$  *S. aureus*/mL for heat-inactivated protein A-positive *S. aureus* and  $9.6 \cdot 10^2$  *B. cereus* spores/mL for *B. cereus* spores.

At the end enrichment and microarray detection were combined. By using microarray detection CL signals were compared before and after enrichment. With an applied concentration of  $1.0 \cdot 10^6$  *S. aureus*/mL a maximum signal increase by the factor 2 - 3 could

be reached after enrichment by the MCR3 SLT. For *B. cereus* spores a signal increase by the factor 1.5 could already be reached with  $10^4$  *B. cereus* spores/mL.

Two mixed samples were enriched (*S. aureus* and *B. cereus* spores simultaneously in one sample) and the enrichments of two single samples of each pathogen were proceeded. For both mixed samples heat-inactivated protein A-positive *S. aureus* bacteria and living *B. cereus* spores were used in the same quantity ( $10^5$  and  $10^6$  cells or spores per mL, respectively). For *B. cereus* spores the enrichment of the single samples, and mixed samples, were quantified by cultivation and MCR3 SLT measurement, while *S. aureus* were measured only by MCR3 SLT. For *S. aureus* no results were obtained. For the enrichment of the mixed samples the CL signals of the eluates were for both concentrations 3 - 4 fold higher than for the enrichment of the single samples. This was due to the cross reactivity of protein A-positive *S. aureus* bacteria. Probably not all of the *S. aureus* bacteria were captured in the first monolithic affinity column by the immobilized anti-*S. aureus*. They were pumped over the monolithic affinity column with immobilized anti-*B. cereus* spores together with the *B. cereus* spores. For the MCR3 SLT measurement the *S. aureus* bacteria were detected as false positive signal.

As a final experiment of this thesis all systems were combined. Two samples of 100 mL skimmed milk were spiked with  $10^4$  and  $10^5$  *B. cereus* spores/mL, heated to 37 °C and pumped over the new enrichment apparatus. The applied samples, flow-throughs and eluates were quantified by cultivation and the recovery was determined. Up to 50% *B. cereus* spores could be quantified in the eluates. This was a bit less than in the first experiment with skimmed milk, but this could be explained by the higher concentrations. After autoclaving the applied samples and the eluates (forward direction), the CL signals could be measured at the MCR3 SLT. The CL signal of the eluate could be enriched by the factor 4 - 6 in comparison to the sample before enrichment.

For *S. aureus* legal limits of 100 *S. aureus* cells/mL are defined. Since for *B. cereus* and *B. cereus* spores there are no limits, it was oriented towards the legal limits of *S. aureus*. Therefore the postulated detection limit was 100 cells or spores/mL. For *S. aureus* the experiments could only be realized for the protein A-positive strain, because the protein A-negative strain did not show any binding to the used antibodies. With microarray internal detection limits of  $4.8 \cdot 10^3$  *S. aureus*/mL (heat inactivated, protein A-positive *S. aureus*) and  $9.6 \cdot 10^2$  *B. cereus* spores/mL for antibody microarrays an enrichment of just 100 mL sample was sufficient to be within the legal limits. Because of the activity loss of the antibodies and the HRP, respectively, the concentrations could not be determined by the previously created calibration curves.

In this thesis microorganisms were enriched out of milk with immobilized antibodies on a monolithic support for the first time. Additionally, a fast detection of microorganisms at the MCR3 SLT with a temperature sensor was ensured. The combination of both methods was proceeded successfully, and thus the proof of principle could be finished. After a first development of the combined system it could be optimized further with more powerful antibodies. For future measurements a modification of the sandwich test format will make sense, too. For that, a HRP marked antibody is replaced by a biotin marked one. The biotin will bind the streptavidin-HRP conjugate in an additional step. A disadvantage within this concept is that the additional step also introduces a further washing step, and therefore the assay time will be increased. The advantage of both conjugates is, that both – antibody and enzyme – can be titrated separately and the parameters can be adapted to the respective application by increasing the concentration. If the activity of the antibody decreases, the concentration of the antibody-biotin conjugate can be increased by keeping the concentration of streptavidin-HRP constant.

The further developed system can then be adapted to other applications of food inspection. A direct application for the quantification of food toxins like *Staphylococcus* enterotoxins is also imaginable. Thus a first step towards a quick reference for microbial contaminations in food has been made.

---

## **TEIL 5**

### **EXPERIMENTELLER TEIL**

## 5 Experimenteller Teil

### 5.1 Verwendete Geräte

#### 5.1.1 Aufkonzentrierungsapparatur

- Einmal-Kanülen *Sterican®*, stumpfer Schliff, 22 mm Länge, 0,80 mm AD (X134.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- ETFE *Flangeless Ferrule* (P-200, Upchurch Scientific, Postnova Analytics GmbH, Landsberg)
- ETFE-Schlauchadapter, *Adapter barb to male 1/4-28* (P-646, Idex Health & Science GmbH, Wertheim-Mondfeld)
- ETFE-Spritzenadapter, *Female Luer to 1/4-28 Male* (P-624, Upchurch Scientific, Postnova Analytics GmbH, Landsberg)
- Infumix-Mischbeutel, steril (SB 21148, Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim)
- Kassette mit Anpresshebel aus POM-C (IS0649, Idex Health & Science GmbH, Wertheim-Mondfeld)
- PEEK 4-Wege-Schaltventil, Niederdruck, Fluss im rechten Winkel, 6,2 µL Totvolumen (V-100L, Upchurch Scientific, Postnova Analytics GmbH, Landsberg)
- Peristaltikpumpe, Reglo-E MS-CA1/8-160/12DC (IS3206, Idex Health & Science GmbH, Wertheim-Mondfeld)
- Peristaltikschlauch grau/grau Tygon, ID 1,30 mm (224-2214, VWR International GmbH, Darmstadt)
- PTFE-Fitting für 8-mL-Glaskörper, Länge: 8,9 cm, Totvolumen: 70 µL (in der institutseigenen Werkstatt hergestellt) mit Dichtungsring 10 x 2 (Sahlberg GmbH & Co. KG, Feldkirchen)
- PTFE-Schläuche, ID 1,0 mm, Wandstärke 0,30 mm (S 1810-12, Bohlender GmbH, Lauda)
- Pumpenansteuerung, Control unit Reglo-E Digital (IS3187, Idex Health & Science GmbH, Wertheim-Mondfeld)
- *Rotilabo®*-Luer-Schlauchverbinder Luer Lock männlich für 1,6 mm ID (CT58.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

### 5.1.2 Mikroarray-Auslesegeräte und Zubehör

- Beidseitige Klebefolie, Akryl-Hybrid (ARcare 90106, Adhesive Research Ireland Ltd., Limerick, Irland)
- Immunomat: PASA-Aufbau (Attotec GmbH, Siegen)
- Klebevorrichtung zum Fertigstellen der Mikroarray-Chips (in der institutseigenen Werkstatt hergestellt)
- Laserzuschnitt der beidseitigen Klebefolie (Karl Marbach GmbH & Co. KG, Heilbronn)
- Munich Chip Reader der 3. Generation (MCR3 SLT) mit Probenschleife und Temperierung der Flusszelle (GWK Präzisionstechnik GmbH, München)
- Plastikträger aus PMMA (in der institutseigenen Werkstatt gefertigt)
- PTFE-Schläuche, ID 0,5 mm, Wandstärke 0,30 mm (S 1810-09, Bohlender GmbH, Lauda)
- PTFE-Schläuche, ID 1,0 mm, Wandstärke 0,30 mm (S 1810-12, Bohlender GmbH, Lauda)

### 5.1.3 Sonstige Geräte und Zubehör

- Autoklav (Laboklav, SHP Steriltechnik AG, Magdeburg)
- Drucksensor, bis 50 bar (Typ KTE6005GO0, Sensortechnics GmbH, Puchheim)
- Durchflusszytometer *Cell Lab Quanta™ SC* (Beckman Coulter GmbH, Fullerton, USA)
- EDX-Detektor (Röntec GmbH, Berlin)
- Eppendorf Pipetten 0,5 - 10 µL, 10 - 100 µL, 100 - 1000 µL, 1 - 5 mL (Eppendorf AG, Hamburg)
- Graviergerät mit Diamantstift (NG 2/S, Proxxon GmbH, Niersbach)
- Inkubator (B 290, Heraeus Holding GmbH, Hanau)
- Magnetrührer mit Temperaturregler (MR 3002 S, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Kelheim)
- Mikrotiterplatten-Lesegerät (Synergy HAT, Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall)
- Millipore Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185 (Millipore GmbH, Schwalbach)
- Muffelofen MR 170 E (Heraeus Holding GmbH, Hanau)
- PEEK 1/4-28 *Flangeless Fitting* (XP-208, Upchurch Scientific, Postnova Analytics GmbH, Landsberg)
- Peristaltikpumpe (Vario-Pumpsystem, IDEX Health & Science SA, Glattbrugg, Schweiz)
- Peristaltikschlauch grün/grün Tygon, ID 1,85 mm (224-2219, VWR International GmbH, Darmstadt)
- pH-/mV-/Temperatur-Messgerät *SevenGo™ SG2* (Mettler-Toledo GmbH, Giessen)

- PTFE-Fitting für 1-mL-Glaskörper, Länge: 6,9 cm, Totvolumen: 54 µL (in der institutseigenen Werkstatt hergestellt) mit Dichtungsring 3 x 1 (Sahlberg GmbH & Co. KG, Feldkirchen)
- PTFE-Halterung für 25 Glaskörper (in der institutseigenen Werkstatt hergestellt)
- Rasterelektronenmikroskop Stereoscan 360 (Leica Cambridge Instruments, Cambridge, UK)
- Schüttelinkubator (C24KC, Edison, USA)
- Schüttler für Mikrotiterplatten, *Easysshaker* EAS 2/4 (SLT Labinstruments Deutschland GmbH, Crailsheim)
- Spotter, *BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- Spotternadel *Stealth Solid Pin* SNS 9 (ArrayIt, Sunnyvale, USA)
- *Sputter Coater Balzers* SCD 004 (Bal-Tec GmbH, Witten)
- Sterilbank, UVF 6.185 (BDK Luft- und Reinraumtechnik GmbH, Sonnenbühl-Genkingen)
- Trockenschrank, max. 120 °C (Memmert GmbH & Co. KG, Schwabach)
- Ultraschallbad (Sonorex RK 102, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Berlin)
- *Union White Delrin 1/4-28* (P-603, Upchurch Scientific, Postnova Analytics GmbH, Landsberg)
- Vortexer (REAX top, Heidolph Elektro GmbH & Co. KG, Schwabach)

#### 5.1.4 Software

- *Avis FITS Viewer* (MSB di F. Cavicchio, Ravenna, Italien)
- Bildanalysesoftware 1.0.2 (Wolfgang Wolter, TU München)
- *BioOdyssey Calligrapher 2.0* (Bio-Rad Laboratories GmbH, München)
- *Cell Lab Quanta SC 1.0* (Beckman Coulter GmbH, Fullerton, USA)
- *Corel Graphics Suite 12* (Corel Corporation, Ottawa, ON, Kanada)
- *Gen5* (Bio-Tek Instruments GmbH, Bad Friedrichshall)
- *MCRImageAnalyzer* (R-Biopharm AG, Darmstadt)
- *Microsoft Office* (Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA)
- *Origin 7G* (MicroCal Inc., Northampton, MA, USA)
- PASA-Immunomat-Software V7 (Attotec GmbH, Siegen)

---

## 5.2 Verbrauchsmaterialien

- Becher mit Schraubdeckel, 100 mL, steril (2-0101, neoLab GmbH, Heidelberg)
- Einmal-Kanülen *Sterican®*, langer Schliff, 120 mm Länge, 0,80 mm AD (C630.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Einmalspritze, 20 mL, (0059.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Faltenfilter, 595 ½, 150 mm (304205, Schleicher & Schüll BioScience GmbH, Dassel)
- Glaskörper, 1 mL (7328-01, J.T. Baker, Deventer, Niederlande)
- Glaskörper, 8 mL (7328-06, J.T. Baker, Deventer, Niederlande)
- Mikrotiterplatten aus Polypropylen, 384 Kavitäten, 90 µL (784201, Greiner GmbH, Frickenhausen)
- Mikrotiterplatten aus PS, 96 Kavitäten, Flachboden, hohe Bindungskapazität (655061, Greiner GmbH, Frickenhausen)
- *Multi Dolphin Tube*, 2,0 mL (E708.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Objektträger geschnitten, ca. 76 x 26 mm (0656, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Objektträger geschnitten, 76 x 26 mm x 1,0 mm, ± 0,1 mm (BA11.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- *Parafilm® M* (H666.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Pipettenspitzen:
  - *MultiGuard®-Tips* 0,1 - 10 µL, steril, *racked* (T613.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
  - *MultiLowBinding®-MultiGuard®* 1 - 200 µL, steril, *racked* (X598.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
  - *MultiLowBinding®-MultiGuard®* 100 - 1000 µL, steril, *racked* (X601.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Standard MAKRO 1 - 5 mL, unsteril, lose (5846.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Standard MIKRO 0,1 - 10 µL, unsteril, lose (K138.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Standard UNIVERSAL 1 - 200 µL, unsteril, lose (2395.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Standard UNIVERSAL 100 - 1000 µL, unsteril, lose (2679.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- *Rotilabo®*-Abdeckfolien für Mikrotiterplatten, unsteril (EN73.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- *Rotilabo®*-Probenfläschchen, 4 mL, klarglas (E152.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

- Rotilabo®-Rollrandgläser, 5 mL, klarglas (X654.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Rotilabo®-Rollrandgläser, 10 mL, klarglas (X655.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Rotilabo®-Rollrandgläser, 20 mL, klarglas (X657.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Rotilabo®-Spritzenfilter, steril, 0,22 µm (P668.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Rotilabo®-Zentrifugenröhrchen Eco, 15 mL, steril (AN77.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Rotilabo®-Zentrifugenröhrchen Eco, 50 mL, steril (AN79.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Schraubkappen ohne Loch (E155.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Universal-Indikatorpapier pH 1 - 11 (L861.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Universal-Indikatorpapier pH 4,5 - 10,0 (C731.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Universal-Indikatorstäbchen pH-Fix 7,5 - 9,5 (H919.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Universal-Indikatorstäbchen pH-Fix 0,0 - 6,0 (C730.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)

## 5.3 Chemikalien und Reagenzien

### 5.3.1 Chemikalien

- 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure-Lösung (TNBS-Lösung), Reinheit: purum, ~1% in *N,N*-Dimethylformamid (92824, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- 3-Glycidyoxypropyltrimethoxysilan (GOPTS), Reinheit: ≥ 99,5% (440167, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB), Reinheit: ≥ 98% (87748, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- 4-(Dimethylamino)pyridin (DMAP), Reinheit: puriss. (29224, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- Bortrifluorid-Ethyletherat (BF<sub>3</sub>·Et<sub>2</sub>O), Reinheit: purum (15719, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- Calciumchlorid (CaCl<sub>2</sub>), Reinheit: ≥ 93,0% (C1016, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- Casein (C5890, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- D-(+)-Trehalosedihydrat, Reinheit: ≥ 99% (90210, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- Diaminopolyethylenglykol (DAPEG), 2000 Da (XTJ 502, Huntsman, Rotterdam, Niederlande)
- Dikaliumhydrogenphosphat (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) (04248, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

- 
- Dimethylsulfoxid (DMSO), Reinheit:  $\geq 99,5\%$  (D4540, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - Dioxan, Reinheit: puriss. (42510, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - Disuccinimidylcarbonat (DSC), Reinheit: purum (43720, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - Ethanol, Reinheit: absolut puriss. p.a. (32205, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - Ethanol, Reinheit: absolut mit Methylethylketon vergällt (24194, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - Glycin Puffersubstanz, Reinheit: puriss p.a. (33226, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - *Hellmanex® II* (320002, Hellma, Müllheim)
  - Kaliumchlorid (KCl), Reinheit: puriss. p.a.  $\geq 99,5\%$  (60130, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - Kaliumcitrat monobasisch, Reinheit:  $\geq 99,0\%$  (60214, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) Reinheit: purum p.a. anhydrous  $\geq 99\%$  (T) (60230, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - Magermilchpulver (erhalten vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU)
  - Methanol für HPLC, Reinheit: gradient grade  $> 99,8\%$  (GC) (65548, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - Methyl-*tert*-Butylether (MTBE), Reinheit: puriss. (20249, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - *Micro BCA™ Protein Assay Reagent Kit* (23235, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA):
    - *Micro BCA™ Reagent A (MA)*: enthält Natriumcarbonat, Natriumbicarbonat und Natriumtartrat in 0,2 N NaOH (23231, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)
    - *Micro BCA™ Reagent B (MB)*: enthält Bicinchoninsäure (4,0%) in Wasser (23232, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)
    - *Micro BCA™ Reagent C (MC)*: enthält 4,0% Kupfersulfat-Pentahydrat in Wasser (23234, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA)
  - Natriumchlorid (NaCl), Reinheit: purum p.a.  $\geq 99,5\%$  (AT) (71381, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - *N,N*-Dimethylformamid (DMF), Reinheit: puriss., absolut, über Molekularsieb (40248, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - pH-Pufferlösung pH 4.01 (9602.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
  - pH-Pufferlösung pH 7.01 (9604.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
  - pH-Pufferlösung pH 10.01 (9606.1, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
  - Pluronic F-127 (P2443, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - Polyglycerol-3-glycidylether (Polypox R9, UPPC GmbH, Mietingen)
  - Salzsäure-Lösung,  $\sim 4$  M in Wasser, Reinheit: purum (84435, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
  - Salzsäure rauchend 37%, Reinheit: purum p.a. (84422, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)

- Schwefelsäure 95 - 97%, Reinheit: puriss. p.a. (84720, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- Silica Gel Orange, 1 - 3 mm, mit Indikator, Perlform (T199.2, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe)
- Sorbinsäure Kaliumsalz, Reinheit: purum p.a.  $\geq$  99,0% (85520, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- Stickstoff, Reinheit: 5.0
- Toluol, Reinheit: puriss. (89677, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- Triethylamin, Reinheit:  $\geq$  99,5% (471283, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- Tween® 20 (63158, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- Wasserstoffperoxid, 30 Gew.%, stabilisiert, Reinheit: puriss. p.a. (31642, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- Westar Supernova ELISA Luminol-Enhancer Solution (XLSE2L, Cyanagen, Bologna, Italien)
- Westar Supernova ELISA Peroxide Solution (XLSE2P, Cyanagen, Bologna, Italien)
- Zubehör zur Durchflusssyztometrie:
  - 4 mL Sample Cup (723908, Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
  - Cleaning Solution (629969, Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
  - Iso-Diluent (629966, Beckman Coulter GmbH, Krefeld)
  - Shutdown Solution (NPE 629968, Beckman Coulter GmbH, Krefeld)

### 5.3.2 Bakterienstämme

- *Bacillus cereus*-Sporen (MHI 165, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU)
- *Staphylococcus aureus* Protein A-negativ (DSM 20491, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU)
- *Staphylococcus aureus* Protein A-positiv (DSM 20372, Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU)

### 5.3.3 Bakterielle Antigene

- *Bacillus cereus*-Sporen, autoklaviert für 15 min bei 121 °C (MHI 165, erhalten vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU)
- *Staphylococcus aureus*, Protein A-negativ, Hitze-inaktiviert (DSM 20491, erhalten vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU)
- *Staphylococcus aureus*, Protein A-positiv, Hitze-inaktiviert (DSM 20372, erhalten vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU)

### 5.3.4 Antikörper und Antiseren

- Anti-Peroxidase (HRP) aus Kaninchen (pAk), unkonjugiert (P7899, Sigma-Aldrich GmbH, Taufkirchen)
- Anti-*S. aureus* aus Kaninchen (pAk), unkonjugiert, 4 - 5 mg/mL (6881, ViroStat, Westbrook, ME, USA)
- Anti-*S. aureus* aus Kaninchen (pAk), mit HRP konjugiert, 4 - 5 mg/mL (6884, ViroStat, Westbrook, ME, USA)
- gefälltes Antiserum gegen *B. cereus*-Sporen, 8,96 mg/mL (74 (Gießen), erhalten vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU)
- gefälltes Antiserum gegen *B. cereus*-Sporen, mit HRP konjugiert (74 (Gießen), erhalten vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU)
- gefälltes Antiserum gegen *S. aureus*, 11,0 mg/mL (75 (Gießen), erhalten vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU)
- gefälltes Antiserum gegen *S. aureus*, mit HRP konjugiert (71 (Gießen), erhalten vom Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch, LMU)

### 5.3.5 Biochemische Reagenzien

- *Filmtracer™ LIVE/DEAD® Biofilm Viability Kit* (L10316, Life Technologies GmbH, Darmstadt)
- *Lightning-Link™ PE-Cy5 Tandem Conjugation Kit* (760-0005, Innova Biosciences, Cambridge, United Kingdom)
- Meerrettichperoxidase (HRP) (10814393001, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim)

### 5.3.6 Puffer und Lösungen

Zur Herstellung der Lösungen und Puffer wurde Wasser der Reinstwasseranlage Milli-Q plus 185 verwendet.

#### **Glycinpuffer ohne Detergenz**

0,75 g (100 mmol) Glycin

0,88 g (150 mmol) NaCl

ad 100 mL Reinstwasser

mit 4 M HCl auf pH 1, 2 bzw. 3 eingestellt

### **Glycinpuffer mit Detergenz**

0,75 g (100 mmol) Glycin  
0,88 g (150 mmol) NaCl  
100 µL Tween 20  
ad 100 mL Reinstwasser  
mit 4 M HCl auf pH 1, 2 bzw. 3 eingestellt

### **PBS-Puffer**

1,36 g (10 mmol)  $\text{KH}_2\text{PO}_4$   
12,20 g (70 mmol)  $\text{K}_2\text{HPO}_4$   
8,5 g (145 mmol) NaCl  
ad 1.000 mL Reinstwasser

### **Ringer-Standard-Infusionslösung**

8,6 g (147 mmol) NaCl  
0,3 g (4 mmol) KCl  
0,33 g (3 mmol)  $\text{CaCl}_2$   
ad 1.000 mL Reinstwasser

### **Spottingpuffer für Positiv- bzw. Negativkontrolle**

0,005% Pluronic F-127 (w/v)  
10% D-(+)-Trehalosedihydrat (w/v)  
in 5 mL PBS-Puffer

### **Spottingpuffer für Probe**

0,01% Pluronic F-127 (w/v)  
20% D-(+)-Trehalosedihydrat (w/v)  
in 4 mL PBS-Puffer

### **Substratpuffer**

115,1 g (500 mmol) Kaliumcitrat monobasisch  
0,25 g (2 mmol) Sorbinsäure Kaliumsalz  
ad 2.500 mL Reinstwasser

### **Substratlösung**

Die Substratlösung wurde kurz vor der Verwendung aus 273 µL TMB-Stammlösung (375 mg

TMB in 5,00 mL DMSO) und 138  $\mu\text{L}$  1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  und 15,0 mL Substratpuffer hergestellt.

### Stopplösung

5% Schwefelsäure in Wasser: 19 mL konzentrierte Schwefelsäure auf 1.000 mL mit Wasser verdünnt.

## 5.4 Aufkonzentrierung mittels monolithischer Immunfiltration

### 5.4.1 Herstellung monolithischer Säulen

Die Herstellung von monolithischen Epoxy-Säulen wurde bereits von Peskoller *et al.* [210] für Glaskörper mit 4,5 mm ID und einer Länge von 6 mm beschrieben. Für die Charakterisierung der monolithischen Säule und der Oberflächenchemie wurden monolithische Säulen dieser Größe verwendet.

Der Durchmesser und die Länge der monolithischen Säule wurden anschließend in dieser Arbeit für die Aufkonzentrierung von Mikroorganismen in Milch angepasst. Es wird die Durchführung für 8-mL-Säulen mit 11,8 mm ID und einer Länge des Monoliths von 1,9 mm, 3,7 mm und 7,4 mm geschildert. Eine Übersicht aller verwendeten Säulengeometrien ist in Tabelle 5 aufgetragen.

**Tabelle 5:** Längen und Durchmesser der monolithischen Säulen in 1-mL- und 8-mL-Glaskörpern.

	1-mL-Glaskörper		8-mL-Glaskörper	
<b>ID [mm]</b>	4,5	11,8	11,8	11,8
<b>Länge [mm]</b>	6,0	1,9	3,7	7,4

Die Herstellung der mit Antikörpern belegten monolithischen Affinitätssäulen erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden die monolithischen Säulen hergestellt. Dazu musste die Oberfläche der Glaskörper gereinigt und modifiziert (Kapitel 5.4.1.1) sowie das monolithische Material in den Glaskörper polymerisiert werden (Kapitel 5.4.1.2). Anschließend wurden die monolithischen Affinitätssäulen hergestellt (Kapitel 5.4.2). Dazu wurde zunächst die Oberfläche der monolithischen Säulen schrittweise vorbereitet und daraufhin der Antikörper immobilisiert. Im Anschluss konnte die Aufkonzentrierung mittels monolithischer Immunfiltration durchgeführt werden. Alle Arbeiten zur Herstellung der monolithischen Affinitätssäulen wurden im Abzug durchgeführt.

#### 5.4.1.1 Modifizierung der Glaskörperoberfläche

Mit einem Gravierstift wurden in 10 Glaskörper am oberen Rand fortlaufende Ziffern eingraviert (von 1 bis 10). Die Glaskörper wurden in eine Färbeschale gegeben, mit 300 mL einer *Hellmanex® II*-Lösung (2%, v/v) versetzt und für 1 h in ein Ultraschallbad gestellt. Anschließend wurden die Glaskörper in der Färbeschale über Nacht auf dem Schüttler mit leichter Schüttelbewegung (200 rpm, Umdrehungen pro Minute, engl. *revolutions per minute*) bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Dann wurden sie erneut 1 h ins Ultraschallbad gestellt und später mit 1 L Reinstwasser durch Schütteln gründlich gewaschen.

Die Glaskörper wurden dann mit 300 mL einer vorbereiteten methanolischen Salzsäure-Lösung (1:1, v/v) versetzt und eine Stunde bei RT geschüttelt. Im Anschluss wurden die Glaskörper mit 1 L Reinstwasser gründlich gespült, mit konzentrierter Schwefelsäure versetzt und für 1 h bei RT auf dem Schüttler inkubiert. Nach erneutem Spülen mit 1 L Reinstwasser wurden die Glaskörper im Stickstoffstrom getrocknet. Die Glaskörper wurden senkrecht in eine speziell angefertigte PTFE-Halterung gesteckt, welche die Glaskörper am unteren Auslass verschließt (siehe Abbildung 5.1)



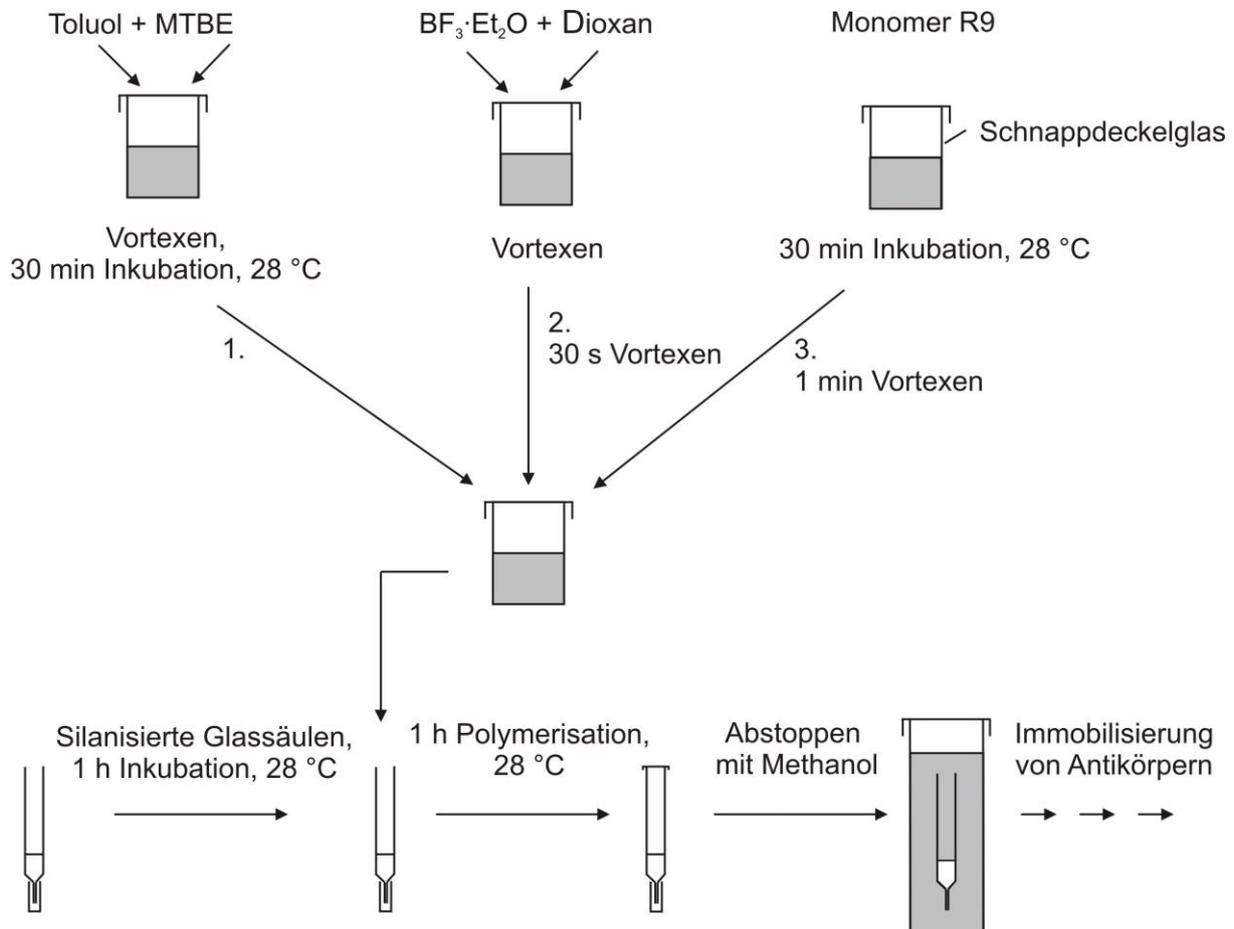
**Abbildung 5.1:** PTFE-Halterung für 25 Glaskörper (in der institutseigenen Werkstatt hergestellt).

Für eine Monolithlänge von 1,9 mm wurden 250  $\mu$ L GOPTS eingefüllt, für 3,7 mm waren 500  $\mu$ L GOPTS notwendig und für 7,4 mm wurde ein Volumen von 1000  $\mu$ L GOPTS pipettiert. Die Glaskörper wurden mit *Parafilm®* zugedeckt und für 1 h bei RT inkubiert. Die Glaskörper wurden geleert, in Färbeschalen gefüllt mit Ethanol gegeben und 15 min im Ultraschallbad inkubiert. Dieser Schritt wurde einmal mit Methanol und nochmals mit Ethanol

wiederholt. Die Glaskörper wurden im Stickstoffstrom getrocknet und senkrecht in die PTFE-Halterung gesteckt, in denen sie für 30 min im Inkubator bei 28 °C temperiert wurden.

#### 5.4.1.2 Polymerisation des Monoliths in den Glaskörper

Für die Polymerisation wurden Toluol, Methyl-*tert*-Butylether (MTBE) und Dioxan unter Schutzgas entnommen. 1,413 mL Toluol und 942 µL MTBE (3/2, v/v) wurden in ein Schnappdeckelglas pipettiert, mit dem Vortexer gut gemischt und für 30 min bei 28 °C in den Inkubator gestellt. Ebenso wurde das Monomer Polyglycerol-3-glycidylether (R9) für 30 min bei 28 °C inkubiert (Abbildung 5.2).



**Abbildung 5.2:** Herstellung der monolithischen Säule durch Polymerisation des Epoxy-Polymers in den Glaskörper.

Kurz vor der Polymerisation wurden 100 µL Bortrifluorid-Ethyletherat ( $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$ ) zügig zu gekühlten 900 µL Dioxan pipettiert (1/10, v/v) und mit dem Vortexer gut gemischt. 37,5 µL  $\text{BF}_3 \cdot \text{Et}_2\text{O}$  in Dioxan wurden zu Toluol und MTBE pipettiert und für 30 s am Vortexer geschüttelt. Dies entspricht einem Initiatoranteil von 1,25% am gesamten Reaktionsvolumen.

Anschließend wurden 600  $\mu\text{L}$  des Monomers R9 mit einer Viskospipette zügig zugegeben und das Reaktionsgemisch für 1 min mit dem Vortexer gemischt. Dann wurden zügig bis zu fünf Glaskörper mit je 200  $\mu\text{L}$  (1,9 mm), 400  $\mu\text{L}$  (3,7 mm) oder 800  $\mu\text{L}$  (7,4 mm) befüllt. Gleichzeitig wurde darauf geachtet, dass die Mischung mittig in den Glaskörper pipettiert wurde. Um Verdampfen der Lösungsmittel zu verhindern, wurden die Glaskörper mit *Parafilm*® verschlossen. Es wurde besonders darauf geachtet, dass die Säulen bei laufender Polymerisation nicht erschüttert wurden. Die Säulen trübten sich nach ca. 4 - 6 min ein. Nach ca. 1 h wurden die fertigen Polymersäulen aus der Halterung genommen, nach Entfernen des *Parafilms*® in Methanol gefüllte Färbeschalen gegeben und im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

## 5.4.2 Herstellung monolithischer Affinitätssäulen

Zur Immobilisierung von Antikörpern gegen *S. aureus*-Bakterien und *B. cereus*-Sporen an die monolithische Säule – der Herstellung monolithischer Affinitätssäulen – wurde die Oberflächenchemie für Mikroarrays abgewandelt. Die Oberflächenchemie für Mikroarrays auf Glasobjektträgern wurde bereits am Institut für Wasserchemie entwickelt [269] und verwendet.

### 5.4.2.1 Hydrolyse der monolithischen Säulen

Zum Entfernen des restlichen Porogens und zum anschließenden Äquilibrieren wurden je 50 mL Methanol und dann je 50 mL Reinstwasser mit der Peristaltikpumpe bei einer Geschwindigkeit von 7,0 mL/min durch die monolithische Säulen gepumpt. Dazu wurden die Säulen über die speziell angefertigten PTFE-Fittings mit den Schläuchen verbunden. Nachher wurden sie für 3 h bei 60 °C mit 0,5 M Schwefelsäure behandelt. Dazu wurde die Schwefelsäure mit 0,5 mL/min im Kreislauf gepumpt. Im Anschluss wurden die Säulen mit je 50 mL Reinstwasser gespült.

### 5.4.2.2 Immobilisierung von GOPTS und DAPEG

Die hydrolysierten monolithischen Säulen (siehe 5.4.2.1) wurden mit je 50 mL Methanol bei einer Geschwindigkeit von 7,0 mL/min gespült und anschließend im Stickstoffstrom getrocknet. Die Säulen wurden mit 250  $\mu\text{L}$ , 500  $\mu\text{L}$  oder 1000  $\mu\text{L}$  GOPTS versetzt (Säulenlänge 1,9 mm, 3,7 mm oder 7,4 mm). Nachdem überprüft wurde, dass das monolithische Material mit GOPTS benetzt ist, wurden die Säulen in der PTFE-Halterung befestigt. Sie wurden mit *Parafilm*® verschlossen und 1 h bei RT inkubiert. Die Säulen

---

wurden nach dem Entleeren mit je 50 mL Ethanol bei einer Geschwindigkeit von 7,0 mL/min gespült, dann mit 50 mL Methanol und schließlich noch einmal mit 50 mL Ethanol. Nach dem Trocknen im Stickstoffstrom wurden ca. 250  $\mu$ L, 500  $\mu$ L bzw. 1000  $\mu$ L geschmolzenes DAPEG im Überschuss je nach Säulenlänge (1,9 mm, 3,7 mm oder 7,4 mm) auf die Säulen pipettiert. Das DAPEG wurde zum Schmelzen ca. 2 h zuvor in den Trockenschrank bei 55 °C gestellt. Es wurde wieder auf vollständige Benetzung des Materials geachtet. Die Säulen wurden in die PTFE-Halterung gesteckt und über Nacht bei 55 °C in den Trockenschrank gestellt. Das überschüssige DAPEG über dem Monolithen wurde abpipettiert und die monolithischen Säulen zur Vorreinigung 10 min in 45 °C warmem Reinstwasser gerührt. Zur Grobreinigung wurden vorwärts mit dem PTFE-Fitting ca. 8 mL warmes Reinstwasser (45 °C) durch die monolithische Säule gedrückt. Anschließend wurden rückwärts ca. 20 mL warmes Reinstwasser (45 °C) mit einer Spritze durchgedrückt. Die Säulen wurden im Anschluss je mit ca. 200 mL Reinstwasser gespült. Nach einem weiteren Spülschritt mit 20 mL Methanol pro Säule wurden die Säulen im Stickstoffstrom getrocknet.

#### 5.4.2.3 Aktivierung mit DSC

Für die Aktivierung wurden monolithische Säulen mit DAPEG-Belegung (siehe 5.4.2.2) verwendet. Die Volumina beziehen sich auf eine monolithische Säule mit einer Länge von 3,7 mm. Es wurden 2 mg DMAP, 36 mg DSC, 0,57 mL DMF und 45  $\mu$ L Triethylamin gemischt. Je 500  $\mu$ L dieses Reaktionsgemisches wurden auf eine Säule pipettiert und die Benetzung des Materials geprüft. Die Säulen wurden in die PTFE-Halterung gesteckt, mit *Parafilm*® abgedeckt und für 4 h bei RT inkubiert. Daraufhin wurden sie je mit ca. 50 mL MeOH, dann mit ca. 50 mL Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet.

#### 5.4.2.4 Immobilisierung von Antikörpern

Zur Immobilisierung von Antikörpern wurde 1 mL der gewünschten Antikörperkonzentration in sterilem PBS-Puffer mit einer Geschwindigkeit von 0,5 mL/min über Nacht (16 - 18 h) zirkuliert. Die entsprechenden Leersäulen ohne Antikörper-Belegung zur Negativkontrolle wurden nur mit sterilem PBS-Puffer behandelt.

#### 5.4.2.5 Blocken der monolithischen Affinitätssäulen

Die Leersäulen und die Säulen mit immobilisierten Antikörpern (monolithische Affinitätssäulen) wurden mit PBS-Puffer gespült und anschließend jede Säule mit je 100 mL filtriertem Casein in PBS-Puffer (2%, w/v) geblockt. Dazu wurde das Blockungsreagenz mit

ca. 1 mL/min über die Säule gepumpt. Nach weiterem Spülen mit PBS-Puffer wurde am selben Tag die Aufkonzentrierung durchgeführt.

### 5.4.3 Charakterisierung des Monoliths und der Oberflächenbelegung

#### 5.4.3.1 Aussehen und Porengröße des Monoliths

Für die Rasterelektronenmikroskopaufnahmen (REM-Aufnahmen) wurde die Probe für 240 s im Vakuum mit einem *Sputter Coater* bei einem Strom von 18 mA mit Silber bedampft. Die dadurch leitfähige Probe wurde anschließend bei einem Kammervakuum von  $10^{-6}$  mbar, einem Arbeitsabstand von 25 mm, einer Anregungsspannung von 20 kV und einem Probenstrom von 200 pA gemessen. Die Messung wurde von Christine Sternkopf (IWC) durchgeführt.

Die Hg-Porosimetrie zur Bestimmung der Porengröße wurde von Xaver Hecht (Lehrstuhl für Technische Chemie II, Technische Universität München) durchgeführt. Mit Hilfe der Hg-Porosimetrie können Porenradien von 300  $\mu\text{m}$  bis 1,8 nm gemessen werden und die Porengrößenverteilung, spezifische Porenoberfläche, Dichte, Partikelverteilung und das Porenvolumen bestimmt werden. Dazu wird die nicht benetzende Flüssigkeit Quecksilber in das poröse System gedrückt [279]. Die Porengröße wird dann über den Druck mit Hilfe der Washburn-Gleichung berechnet (Gleichung 5.1) [280].

$$p = \frac{-4\gamma \cdot \cos\Theta}{d} \quad (\text{Gleichung 5.1})$$

p	Druck
$\gamma$	Oberflächenspannung von Quecksilber
$\Theta$	Benetzungswinkel von Quecksilber
d	Porengröße

#### 5.4.3.2 Nachweis von GOPTS auf der Monolithoberfläche

Als Proben wurden eine monolithische Säule mit GOPTS-Belegung und eine ohne GOPTS-Belegung als Negativkontrolle gemessen. Die energiedispersive Röntgenfluoreszenzspektroskopie (EDX) wurde an einem mit EDX-Detektor aufgerüsteten REM durchgeführt. Der gewünschte Probenausschnitt des REM wurde für die Messung ausgewählt und die EDX-Elementaranalytik durchgeführt. Die Messzeit betrug 300 s und der Probenstrom wurde soweit erhöht, bis ein Wert von etwa 2.000 cps (Counts pro Sekunde) des jeweils

---

detektierten Elements erreicht wurde. Alle weiteren Parameter waren dieselben wie die der REM-Messung. Die Messung wurde von Christine Sternkopf (IWC) durchgeführt.

#### **5.4.3.3 Nachweis von DAPEG auf der Monolithoberfläche**

Für den Nachweis wurde eine DAPEG-belegte monolithische Säule und eine Säule ohne Belegung als Negativkontrolle verwendet. Die monolithischen Säulen wurden mit Reinstwasser für mehrere Stunden gespült. Anschließend wurden 10 mL 2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure (TNBS) (0,1%, v/v) in einer  $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$ -Lösung (3%, w/v) über beide monolithischen Säulen mit einer Flussrate von 0,5 mL/min gepumpt. Dann wurden beide Säulen mit Reinstwasser gereinigt und der Farbwechsel visuell überprüft.

#### **5.4.3.4 Nachweis von Antikörpern auf der Monolithoberfläche**

Zur Antikörper-Immobilisierung wurden 1,0 mg/mL anti-HRP über Nacht über die monolithische Säule gepumpt und dann die Oberfläche mit 100 mL filtriertem Casein (2%, w/v) in PBS-Puffer geblockt. Nach dem Spülen mit PBS-Puffer wurden je 2 mL HRP mit einer Konzentration von 1,0 ng/mL über die monolithische Affinitätssäule und über eine Leersäule zur Negativkontrolle gepumpt. Nach Spülen für mehrere Stunden mit PBS-Puffer wurden 300  $\mu\text{L}$  Substratlösung durch die Säulen durchgetropft und die Farbreaktion abgewartet.

#### **5.4.3.5 Bestimmung der Antikörperkonzentration auf der Monolithoberfläche**

Zur Bestimmung des Antikörpergehalts auf der monolithischen Affinitätssäule wurde ein kommerzieller Bicinchoninsäure (BCA)-Test verwendet. Dazu wurden eine monolithische Säule als Negativkontrolle ohne Antikörper und eine monolithische Affinitätssäule mit immobilisiertem Antikörper miteinander verglichen. Die Säulen wurden zuvor mit mindestens 100 mL Reinstwasser gereinigt, im Stickstoffstrom getrocknet und aus dem Glaskörper genommen. Mit einem Mörser wurde das monolithische Material in ein feines Pulver zermahlen und über Nacht in einem Exsikkator weiter getrocknet. Vier verschiedene Portionen des Pulvers wurden gewogen (1,0 mg; 1,7 mg; 2,5 mg; 3,2 mg) und je in 500  $\mu\text{L}$  PBS-Puffer suspendiert. In einer Mikrotiterplatte aus Polystyrol mit 96 Kavitäten wurde eine Kalibrierung des Antikörpers in Triplikaten durchgeführt. Dazu wurden je 150  $\mu\text{L}$  Antikörperlösung (40; 20; 10; 5; 2,5; 1,0; 0,5; 0 mg/mL) eingesetzt. Ebenso wurden Triplikate von je 150  $\mu\text{L}$  des suspendierten Monoliths eingefüllt. Anschließend wurden 150  $\mu\text{L}$  des Arbeitsreagenzes des BCA-Kits (MA, MB und MC, 50:48:2, v/v/v) zugegeben und die Platte für 2 h bei 37 °C inkubiert. Zum Schluss wurde die Absorption in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät

bei 562 nm gemessen und die Konzentration des Antikörpers mit Hilfe einer Kalibriergeraden erhalten.

#### **5.4.3.6 Bestimmung des Rückdrucks der monolithischen Säule**

Zur Bestimmung des Rückdrucks wurde die monolithische Säule mit dem Drucksensor der institutseigenen *Crossflow*-Filtrationsapparatur verbunden. Die 100-mL-Probe (Wasser oder Magermilch) wurde mit der Peristaltikpumpe mit einer Geschwindigkeit von 34,0 mL/min über die Säule gepumpt und der Rückdruck alle 30 s abgelesen.

#### **5.4.4 Monolithische Immunfiltration für Mikroorganismen**

Zu Beginn der Aufkonzentrierung mit Hilfe der monolithischen Immunfiltration wurde der Schlauch über eine Kassette in die Pumpe eingelegt und mit PBS-Puffer befüllt. Anschließend wurde die monolithische Affinitätssäule samt PTFE-Fitting zwischen den beiden Ventilen befestigt und mit ein paar mL PBS-Puffer gespült. Dann wurde die Probe blasenfrei über die monolithische Affinitätssäule gepumpt und der Durchlauf in einem abgewogenen Sterilbecher oder -beutel gesammelt. Die Probe bestand aus PBS-Puffer oder Magermilch (10% Magermilchpulver in Reinstwasser, w/v), die mit *S. aureus*-Bakterien oder *B. cereus*-Sporen versetzt wurde. Die Magermilchprobe wurde in einem Wasserbad auf 37 °C erwärmt. Kurz bevor die gesamte Probe über die monolithische Affinitätssäule gelaufen war, wurde diese zweimal mit je 5 mL PBS-Puffer gespült. Es wurde darauf geachtet, dass keine Luft in die monolithische Affinitätssäule gezogen und die Pumpe frühzeitig ausgeschaltet wurde. Zur Elution in Vorwärtsrichtung wurde das obere Ventil 90° gegen den Uhrzeigersinn gedreht. Das untere Ventil wurde 90° im Uhrzeigersinn gedreht. 1 mL Elutionspuffer wurde mit Hilfe einer 2-mL-Spritze mit Luer-Lock-Auslass manuell mit hoher Geschwindigkeit eingespritzt. Das Eluat wurde in einem vorher abgewogenen Eppendorf-Gefäß aufgefangen. Die Rückwärtselution verlief gleich, nur in entgegengesetzte Richtung. Die eingesetzte Probe, der Durchlauf und die Eluate wurden anschließend quantifiziert und die Wiederfindungen bestimmt.

#### **5.4.5 Wiederverwendung gebrauchter Glaskörper**

Um Kosten und Material zu sparen, konnten die Glaskörper der monolithischen Affinitätssäulen, die zur Aufkonzentrierung von Hitze-inaktivierten Bakterien verwendet wurden, wiederverwendet werden. Dazu wurde das monolithische Material zunächst grob

aus dem Glaskörper geschabt, die Glaskörper anschließend für 4 h in den Muffelofen gegeben und auf 550 °C erhitzt [281]. Nach Ablauf der Zeit wurden die Glaskörper für 1 h bei geschlossener Tür und anschließend bei geöffneter Tür auf RT abgekühlt. Alternativ wurden die Glaskörper über Nacht im geschlossenen Muffelofen abgekühlt. Das monolithische Material wurde dabei vollständig verbrannt und die Glaskörper konnten wieder eingesetzt werden. Dazu wurden sie wie neue, unmodifizierte Glaskörper behandelt.

#### 5.4.6 Auswertung der Messdaten

Zur Berechnung der Wiederfindung wurden die Absolutzellzahlen  $Z$  eingesetzt. Die Wiederfindung im Durchlauf ( $R$  (Durchlauf) [%]) bezogen auf die eingesetzte Probe wurde wie folgt berechnet (Gleichung 5.2):

$$R \text{ (Durchlauf) [\%]} = \frac{Z \text{ (Durchlauf)}}{Z \text{ (eingesetzte Probe)}} \cdot 100\% \quad \text{(Gleichung 5.2)}$$

Die Wiederfindung des Bakterienrückhalts auf der monolithischen Affinitätssäule lässt sich mit Gleichung 5.3 berechnen. Sie beschreibt die Bakterien, die sich nicht im Durchlauf befinden, sondern durch die Säule zurückgehalten wurden.

$$R \text{ (Rückhalt) [\%]} = 100\% - R \text{ (Durchlauf) [\%]} \quad \text{(Gleichung 5.3)}$$

Die Wiederfindung im Eluat ( $R$  (Eluat) [%]) bezogen auf die eingesetzte Probe wurde analog berechnet (Gleichung 5.4):

$$R \text{ (Eluat) [\%]} = \frac{Z \text{ (Eluat)}}{Z \text{ (eingesetzte Probe)}} \cdot 100\% \quad \text{(Gleichung 5.4)}$$

Zur Berechnung der durch die monolithische Affinitätssäule zurückgehaltenen Bakterien wurden die Absolutzellzahlen im Durchlauf ( $Z$  (Durchlauf)) von den absolut eingesetzten Zellen in der Probe ( $Z$  (eingesetzte Probe)) subtrahiert (Gleichung 5.5).

$$Z \text{ (Rückhalt)} = Z \text{ (eingesetzte Probe)} - Z \text{ (Durchlauf)} \quad \text{(Gleichung 5.5)}$$

Die Wiederfindung des Eluats bezogen auf den Rückhalt wurde durch Gleichung 5.6 erhalten.

$$R \text{ (Eluat bezogen auf Rückhalt) [\%]} = \frac{Z \text{ (Eluat)}}{Z \text{ (Rückhalt)}} \cdot 100\% \quad \text{(Gleichung 5.6)}$$

Die jeweilige Standardabweichung bezog sich auf die Anzahl der Messungen pro monolithische Affinitätssäule.

## 5.5 Antikörper-Mikroarrays

### 5.5.1 Modifizierung der Glaschipoberfläche mit GOPTS und DAPEG

20 Glasobjektträger wurden mit einem Glasdiamantstift an der rechten unteren Ecke durchnummeriert. Die Glasobjektträger wurden in eine Plastikeinteilung einsortiert und in eine Färbeschale gestellt. Die Färbeschale wurde mit einer *Hellmanex® II*-Lösung (2%, v/v) befüllt und die Glasobjektträger für 1 h im Ultraschallbad behandelt. Im Anschluss wurden sie über Nacht bei RT auf dem Schüttler geschwenkt. Dann erfolgte ein weiterer einstündiger Behandlungsschritt im Ultraschallbad. Nach Entfernen der *Hellmanex® II*-Lösung wurden die Glasobjektträger insgesamt mit 1,5 L Reinstwasser durch rasche Auf- und Abbewegungen der Plastikeinteilung in der Färbeschale gewaschen und im Stickstoffstrom getrocknet. Die Glasobjektträger wurden dann mit einer methanolischen Salzsäurelösung (1:1, v/v) für 1 h bei RT geschüttelt. Zum Entfernen der sauren Lösung wurden sie wieder mit 1,5 L Reinstwasser gewaschen. Ein weiterer Anätzschritt erfolgte durch einstündiges Schütteln bei RT mit konzentrierter Schwefelsäure, die im Anschluss wieder mit Reinstwasser entfernt wurde. Nach Trocknung der Glasobjektträger im Stickstoffstrom wurde die Hälfte der Glasobjektträger mit der eingravierten Seite nach unten in Petrischalen gelegt. Auf jeden dieser Glasobjektträger wurden 600 µL GOPTS pipettiert und je mit einem der verbliebenen Glasobjektträger belegt. Es wurde darauf geachtet, dass bei dem Glasobjektträger, der den Deckel bildete, die eingravierte Seite nach oben zeigte. Diese so entstandenen „Sandwiches“ wurden für 1 h bei RT in geschlossenen Petrischalen inkubiert. Im Anschluss wurden die Sandwiches in Ethanol getrennt und geschwenkt, in Färbeschalen mit Plastikeinteilung und Ethanol sortiert und für 15 min im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend folgten je 15 min Ultraschallbad mit Methanol und Ethanol. Währenddessen wurde DAPEG bei 100 °C im Trockenschrank geschmolzen. Nach Trocknen der Glasobjektträger im Stickstoffstrom wurden sie für 10 min in den Trockenschrank bei 100 °C gestellt. Dann wurde wieder die Hälfte der Glasobjektträger mit der gravierten Seite nach unten in Petrischalen gelegt, 600 µL DAPEG darauf pipettiert und zügig mit einem zweiten

---

Glasobjektträger belegt. Die zugedeckten Petrischalen wurden über Nacht bei 100 °C gelagert. Zum Trennen der Sandwiches wurden diese manuell getrennt, separat in Reinstwasser geschwenkt und in eine mit Reinstwasser gefüllte Färbeschale mit Plastikeinteilung einsortiert. Nach 15 minütiger Behandlung im Ultraschallbad wurden die Glasobjektträger mit 1,5 L Reinstwasser durch Auf- und Abbewegungen der Plastikeinteilung gereinigt. Sie wurden dann im Stickstoffstrom getrocknet und im Exsikkator gelagert [269].

## 5.5.2 Vorbereitung für Antikörper-Mikroarrays

### 5.5.2.1 Aktivierung der Glasobjektträger-Oberfläche mit DSC

Für die Aktivierung wurden DAPEG-belegte Glasobjektträger (Kapitel 5.5.1) verwendet. Die Aktivierung wurde 4 h in geschlossenen Petrischalen durchgeführt. Dazu wurden Glasobjektträger mit der behandelten Seite nach oben in Petrischalen gelegt. Pro Sandwich wurden 36 mg DSC, 45 µL Triethylamin, 0,57 mL DMF und 2 mg DMAP gemischt. Nach dem Pipettieren von 600 µL der Lösung auf den Glasobjektträger wurde ein zweiter Glasobjektträger mit der behandelten Seite nach unten auf den ersten gelegt. Zum Entfernen des Aktivierungsreagenzes wurde je ein Sandwich in Methanol getrennt und durch Schwenken gewaschen. Nach zweimaligem Behandeln im Ultraschallbad für 5 min mit jeweils frischem Methanol wurden die Glasobjektträger im N<sub>2</sub>-Strom getrocknet.

### 5.5.2.2 Spotten der Glasobjektträger-Oberfläche mit Antikörpern

Das Spotten wurde bei einer Luftfeuchtigkeit von 50% und einer Wasserbadtemperatur von 14 °C mit einer Spotternadel (*Stealth Solid Pin*, SNS 9) durchgeführt. 3 x 3 Glasobjektträger wurden mit der eingravierten Zahl nach rechts unten in den Spotter gelegt und mit Magneten von der Seite fixiert.

Zum Spotten wurden je 20 µL der zu spottenden Lösungen hergestellt. Der Spottingpuffer hatte eine Endkonzentration von 0,005% Pluronic und 10% Trehalose in PBS-Puffer. Die Positivkontrolle bestand aus einer Lösung von 100 µg/mL anti-HRP in Spottingpuffer, die Negativkontrolle nur aus Spottingpuffer. Der Fängerantikörper wurde durch eine 1:1-Verdünnung (v/v) mit dem Spottingpuffer (0,01% Pluronic und 20% Trehalose in PBS-Puffer) auf die endgültige Konzentration von 2 - 2,5 mg/mL gebracht. In einer Mikrotiterplatte mit 384 Kavitäten wurden je 20 µL der Positiv- und Negativkontrolle sowie des Fängerantikörpers vorgelegt.

Glasobjektträger für den Immunomat:

Es wurden sechs Spots pro Probe und Reihe gespottet. Die Abstände zwischen den einzelnen Spots in einer Reihe betrug 1500  $\mu\text{m}$  und zwischen den einzelnen Reihen 1100  $\mu\text{m}$ .

Glasobjektträger für den MCR3 SLT:

Für die beiden Flusszellen wurden zwei identische Blöcke gespottet. Der Abstand der beiden Blöcke zueinander betrug 11,75 mm. Jeder Block enthielt pro Reihe fünf Spots mit je einem Abstand von 1300  $\mu\text{m}$ . Der Abstand zwischen den einzelnen Reihen betrug 1100  $\mu\text{m}$ .

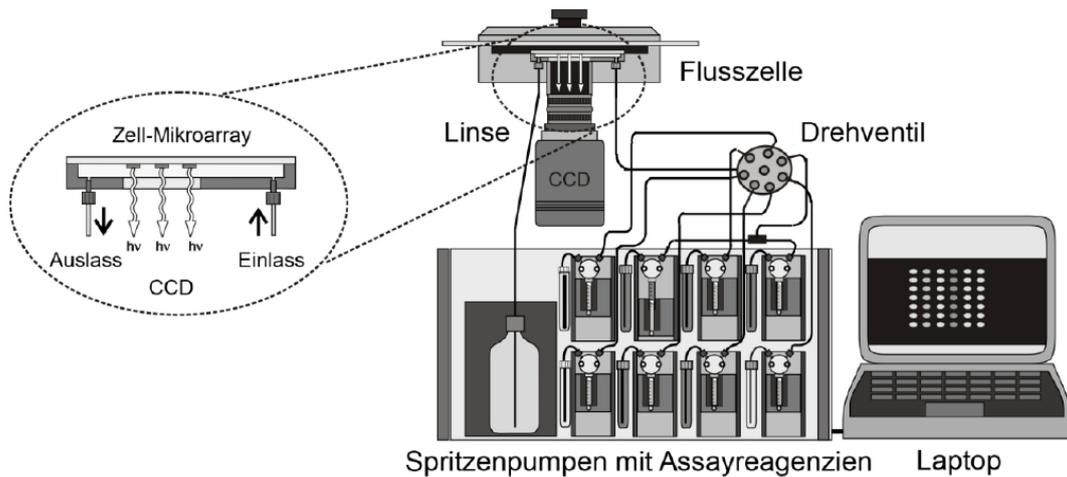
Nach erfolgtem Spotten wurden die Glasobjektträger mit der gespotteten Oberfläche nach oben in geschlossenen Petrischalen über Nacht gelagert. Um ein Austrocknen der Spots über Nacht zu vermeiden, wurde ca. 1 mL Reinstwasser gleichmäßig an den Rand der Petrischalen pipettiert.

### **5.5.2.3 Blocken der Mikroarray-Chips**

Zum Blocken wurde ein 50-mL-Zentrifugengefäß mit Deckel mit Caseinlösung (2%, v/v) und einem gespotteten Mikroarray-Chip befüllt und für 105 s auf dem Vortexer auf höchster Stufe geschüttelt. Nach zwei Mikroarray-Chips wurde die Caseinlösung ausgetauscht. Die so behandelten Mikroarray-Chips wurden in eine mit Casein befüllte Färbeschale mit Plastikeinteilung einsortiert und für 4 h bei RT geschüttelt. Anschließend wurde das Casein durch zweimaliges Waschen mit Reinstwasser entfernt. Im Anschluss wurden sie in PBS-Puffer im Kühlschrank gelagert.

### **5.5.3 Antikörper-Mikroarrays am Immunomat**

Der Immunomat ist ein computergesteuertes Mikroarray-Durchlaufsystem mit Chemilumineszenz-Auslesung, das vor über zehn Jahren am Institut entwickelt wurde. Mit der zum System zugehörigen Immunomat-Software wurde die Ansteuerung der einzelnen Spritzenpumpen und der CCD-Kamera ermöglicht (Abbildung 5.3).



**Abbildung 5.3:** Schema des Mikroarray-Auslesegeräts Immunomat [269].

Mit Hilfe von Pumpe 3 (P3) wurde die Bakterienprobe befördert (Abbildung 5.4). P4 transportierte den Laufpuffer der Messung. Mittels P5 konnte der Detektionsantikörper zur Flusszelle gebracht werden und über P6 und P8 wurden die beiden Chemilumineszenzsubstrate Luminol und Wasserstoffperoxid gepumpt.



**Abbildung 5.4:** Mikroarray-Auslesegerät Immunomat: (P3) Bakterienprobe, (P4) Laufpuffer, (P5) HRP-markierter Detektionsantikörper, (P6) Luminol, (P8) Wasserstoffperoxid.

Zum Spülen wurde ein unbehandelter Glasobjektträger eingelegt und die Pumpen initialisiert. Nachdem alle Pumpen zweimal mit je 8 mL Reinstwasser gespült wurden sind, wurde das

Spülprogramm einmal mit Caseinlösung (0,5%, w/v, Laufpuffer) wiederholt. Nach Aufnahme des Kamerarauschens (Dauer: 60 s) wurde die Messung gestartet. Dazu wurden die zur Messung benötigten Reagenzien in die entsprechenden Reservoirs gefüllt und die Pumpen mit Hilfe von „*Load Reagents*“ mit den Messreagenzien beladen. Nachdem der zu messende Mikroarray mit der modifizierten Seite nach unten eingelegt wurde, konnte der Assay gestartet werden.

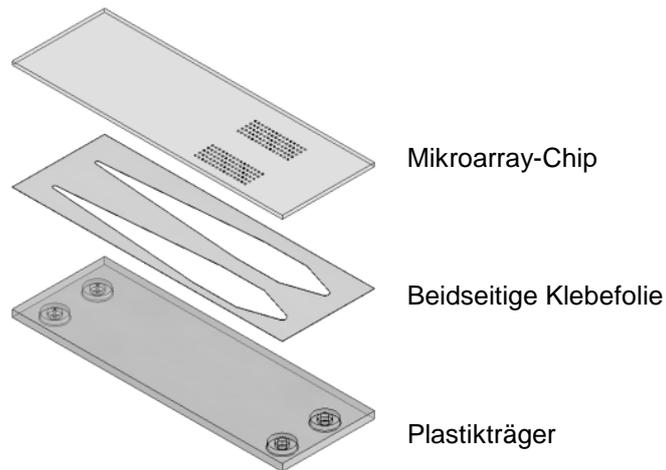
Das stopped-flow Messprotokoll ging wie folgt vor:

- Pumpe 4: Spülen von 2 x 1 mL Laufpuffer mit einer Geschwindigkeit von 100  $\mu\text{L/s}$
- Pumpe 3: Pumpen von 0,6 mL Probe mit einer Geschwindigkeit von 100  $\mu\text{L/s}$ ;  
anschließend stopped-flow von insgesamt 0,6 mL Probe mit einer Geschwindigkeit von 20  $\mu\text{L/s}$  (Volumen pro Intervall: 20  $\mu\text{L}$ , Interaktionszeit: 108 s)
- Pumpe 4: Spülen von 4 x 1 mL Laufpuffer mit einer Geschwindigkeit von 100  $\mu\text{L/s}$
- Pumpe 5: Pumpen von 0,6 mL HRP-markiertem Detektionsantikörper mit einer Geschwindigkeit von 100  $\mu\text{L/s}$ ; anschließend stopped-flow von insgesamt 0,6 mL mit einer Geschwindigkeit von 20  $\mu\text{L/s}$  (Volumen pro Intervall: 20  $\mu\text{L}$ , Interaktionszeit: 1,2 s)
- Pumpe 4: Spülen von 6 x 1 mL Laufpuffer mit einer Geschwindigkeit von 100  $\mu\text{L/s}$
- Pumpe 6 und 8 gleichzeitig: Pumpen von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und Luminol im Verhältnis 1:1 mit einem Volumen von je 0,6 mL und einer Geschwindigkeit von 100  $\mu\text{L/s}$
- Aufnahme des Messbildes mit Hilfe der CCD-Kamera innerhalb von 60 s

Nach Abschluss der Messung wurde das Messbild gespeichert und das System viermal mit je 1 mL 0,5% Casein durch Pumpe 4 gespült. Die zu variiierende Probe wurde getauscht und die entsprechende Pumpe durch „*Load Pump*“ geladen. Nach zweimaligem Spülen von je 1 mL Casein von Pumpe 4 wurde der unbehandelte Glasobjektträger entfernt, der Mikroarray-Chip eingesetzt und die Messung durch den Befehl „*Assay*“ neu gestartet.

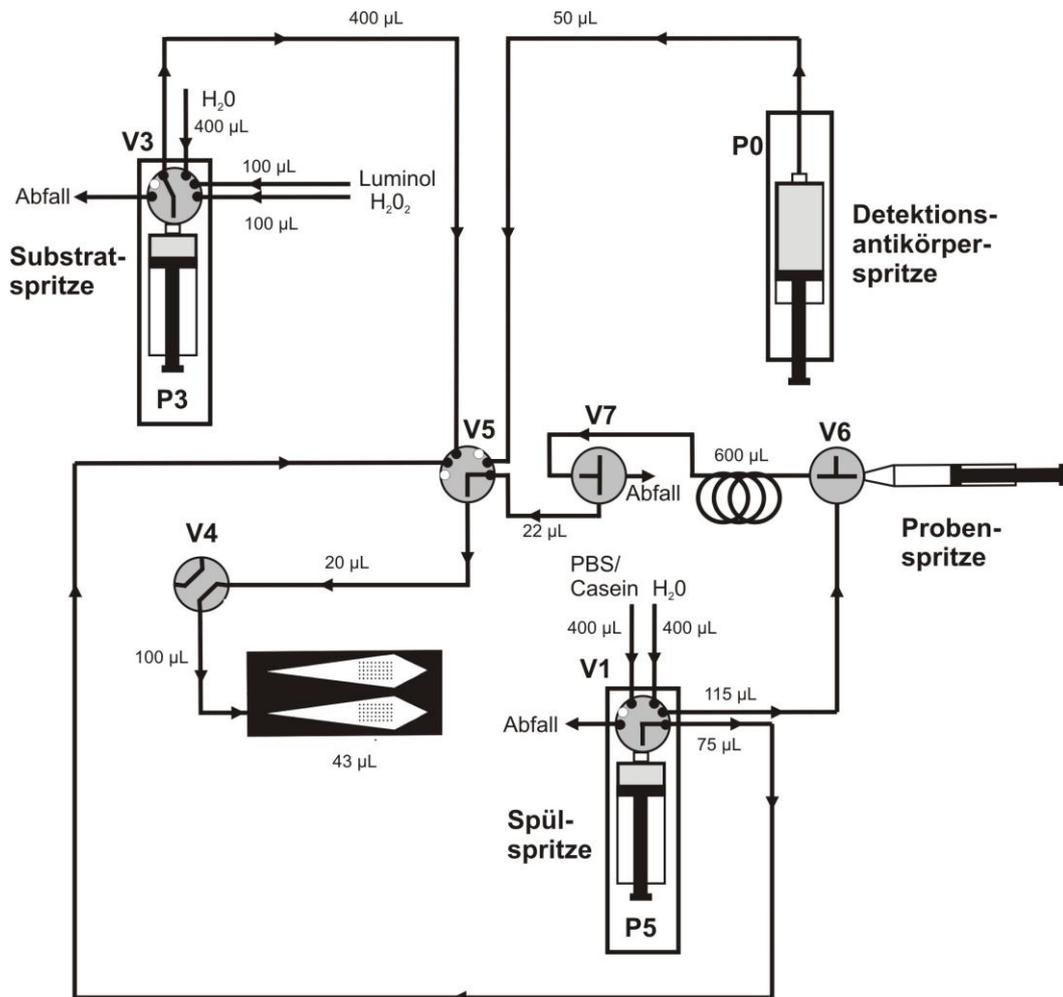
#### **5.5.4 Antikörper-Mikroarrays am MCR3 SLT**

Die geblockten Mikroarray-Chips (siehe Kapitel 5.5.2.3) wurden kurz vor der Messung vorsichtig mit Reinstwasser gespült und im Stickstoffstrom getrocknet. Anschließend wurden sie mit Hilfe einer speziellen Vorrichtung geklebt. Dazu wurde jeder Mikroarray-Chip mit der behandelten Seite nach innen mit einer beidseitigen Klebefolie (mit Aussparungen für die beiden Flusszellen) auf einem Plastikträger fixiert (Abbildung 5.5). Der Plastikträger enthielt pro Flusszelle jeweils ein Loch für den Ein- und Auslass. Die so fertiggestellten Mikroarray-Chips konnten schließlich am MCR3-SLT gemessen werden.



**Abbildung 5.5:** Schematische Abbildung des Mikroarray-Chips für die MCR3 SLT-Messung [73] (modifiziert).

Der Aufbau des MCR3 SLT ist komplexer als der des Immunomats. Ein Fluidikplan des MCR3 SLT mit den Totvolumina der Schläuche ist in Abbildung 5.6 dargestellt.



**Abbildung 5.6:** Fluidikplan des MCR3 SLT.

Er zeigt die Sechsfach- und T-Ventile sowie das Ventil zu den Flusszellen. Je nach Programmansteuerung konnten sie entsprechend gedreht werden. Für das Messprogramm von *S. aureus*-Bakterien und *B. cereus*-Sporen gab es vier Spritzen mit unterschiedlichen Funktionen. Mit Hilfe der manuell bedienbaren Probenspritze wurde die Probe über eine Probenschleife in das System gebracht. Über P0 wurde der Detektionsantikörper automatisch zugegeben. Die Substratspritze P3 beförderte automatisch die Chemilumineszenzsubstrate Luminol und Wasserstoffperoxid. Zwischen den einzelnen Schritten wurde filtriertes Casein (0,5%, w/v) mit der angesteuerten Spülspritze P5 in das System gebracht, um die überschüssigen Reagenzien zu entfernen. Das nachfolgende Foto zeigt die einzelnen Elemente im Gerät (Abbildung 5.7).

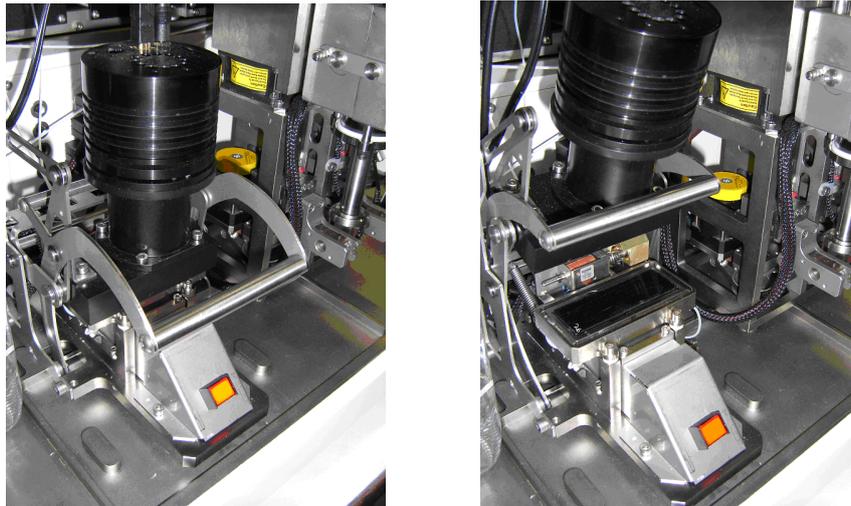


**Abbildung 5.7:** Aufbau des MCR3 SLT: Einlass für Probenspritze, (P0) Detektionsantikörper-Spritze, (P3) Substratspritze, (P5) Spülspritze, (V1, V3, V5) Sechsfach-Ventile, (V6, V7) T-Ventile, (V4) Ventil zu den Flusszellen, geschlossene Flusszelle.

Eine Besonderheit des MCR3 SLT (SL: engl. *sample loop*, T: engl. *temperature*) im Gegensatz zu seinen Vorgängern ist die temperaturgesteuerte Flusszelle mit einem Temperaturbereich von 5 - 65 °C. Sie wurde gemeinsam von Sandra Lengger und GWK

Präzisionstechnik GmbH im Projekt *PATH2OGENSCAN* zur DNA-Mikroarray-Analyse entwickelt.

Um den Chip austauschen zu können, wurde die CCD-Kamera durch einen Schalter entriegelt (Abbildung 5.8). Der auf den Plastikträger geklebte Mikroarray-Chip wurde mit der Glasfläche nach oben und mit dem Auslass der Messkammer nach rechts in die Flusszelle eingelegt.



**Abbildung 5.8:** Flusszelle des MCR3 SLT: links: geschlossene Flusszelle, rechts: geöffnete Flusszelle durch entriegelte CCD-Kamera.

Das System wurde getestet und ein neues Programm für die Anwendung von Sandwich-Immunoassays geschrieben. Vor der Messung wurde das Rauschen der Kamera bei eingelegtem Mikroarray-Chip mit einer Belichtungszeit von 90 s und 30 °C aufgezeichnet. Das optimierte Assayprotokoll wurde wie folgt durchgeführt: Die Flusszelle wurde auf 30 °C erwärmt. Dann wurden 700 µL Bakterienprobe manuell mit einer Einmalspritze in die Probenschleife eingebracht. Die ersten 150 µL der Bakterienprobe wurden mit einer Flussrate von 50 µL/s gepumpt, um das Totvolumen zur Flusszelle zu überbrücken. Die weiteren 700 µL wurden mit einer Flussrate von 1,0 µL/s (für *B. cereus*-Sporen) oder 2,0 µL/s (für *S. aureus*) über den Mikroarray gepumpt. Anschließend wurde die Flusszelle mit 5 mL einer filtrierten Caseinlösung (0,5%, w/v) und einer Flussrate von 68 µL/s gespült. Dann wurden 140 µL des HRP-markierten Antikörpers (1:500 in PBS, v/v) mit einer Geschwindigkeit von 50 µL/s zum Anfang der Flusszelle gepumpt. Die weiteren 860 µL wurden dann in 20-µL-Schritten (20 µL/s) und einer jeweiligen Interaktionszeit von 5 s dazwischen über den Mikroarray gepumpt. Die Flusszelle wurde wie zuvor gespült. Abschließend wurden 0,4 mL der Chemilumineszenzsubstrate Luminol und Wasserstoffperoxid (1:1, v/v) mit einer Geschwindigkeit von 20 µL/s über die Flusszelle gebracht und das

Chemilumineszenzsignal mit Hilfe einer CCD-Kamera mit einer Belichtungszeit von 90 s aufgenommen.

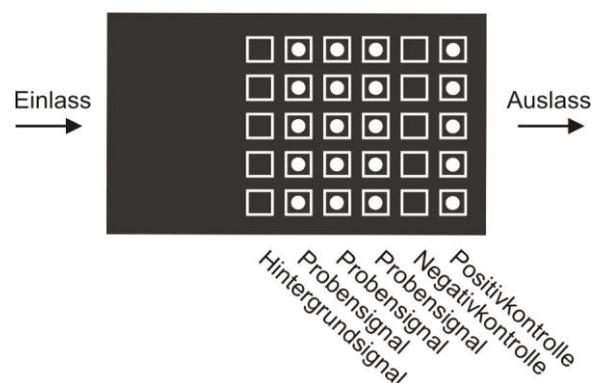
### 5.5.5 Auswertung der Messdaten

Bevor die CL-Signale der einzelnen Messungen ausgewertet werden konnten, wurde das Rauschen der Kamera von jedem Messbild subtrahiert.

Die Signale der Positivkontrolle waren immer vorhanden und dienten zur Kontrolle des ordnungsgemäßen Ablaufs des Immunoassays. Ebenso wurde durch die Negativkontrolle kein Signal erhalten.

Die gemessenen CL-Signale des Immunomats und des MCR3 SLT ließen sich nur durch die Chemilumineszenzsignale pro Pixel im Programm Avis miteinander vergleichen, da beide Messungen unterschiedlich mit der jeweiligen Geräte-spezifischen Software ausgewertet wurden. Am Immunomat wurde mit Hilfe der Bildanalysesoftware 1.0.2 pro Spot je über 7 x 7 Pixel integriert. Die Messsignale am MCR3 SLT wurden mit Hilfe eines Rasters unterteilt und über eine automatische Berechnung der Auswertesoftware *MCRImageAnalyzer* erhalten. Die Berechnung erfolgte durch den Mittelwert der 10 hellsten Pixel. Man erhielt so scheinbar niedrigere CL-Signale, da diese nicht wie am Immunomat aufsummiert sind, sondern den Mittelwert der Pixel darstellen.

Die Lage der Spots auf dem Mikroarray-Chip mit Ein- und Auslass der Messkammer, sowie das Raster zur Auswertung sind in Abbildung 5.9 gezeigt.



**Abbildung 5.9:** Schematische Abbildung des Mikroarray-Chips und des Rasters der Auswertesoftware *MCRImageAnalyzer*.

Wie die Probensignale selbst wurde mit Hilfe des Rasters auch eine Reihe des Hintergrundsignals ausgewertet. Die gemessenen Signale wurden im Anschluss gemittelt und die Standardabweichung berechnet.

---

Vor der Erstellung der Kalibrierkurven wurde von jedem CL-Signal das zugehörige Hintergrundsignal des jeweiligen Mikroarray-Chips abgezogen [78].

Die Entscheidungsgrenze und die Nachweisgrenze sind durch das Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften wie folgt definiert: „Die Entscheidungsgrenze ( $CC\alpha$ ) ist der Grenzwert, bei und über dem mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $\alpha$  bestimmt werden kann, dass eine Probe positiv ist.“ [282] Die Nachweisgrenze „( $CC\beta$ ) ist der kleinste Gehalt des Stoffs, der mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von  $\beta$  in einer Probe nachgewiesen, identifiziert und/oder quantifiziert werden kann.“ [282] Zur Bestimmung der Nachweisgrenze müssen pro Matrix mindestens 20 Blindwertproben analysiert werden, die mit dem Analyten in der Konzentration der Entscheidungsgrenze dotiert sind [282].

Da die Proben nicht in dieser Häufigkeit gemessen wurden, konnte nur eine Mikroarray-interne Nachweisgrenze jeder Kalibrierkurve definiert werden. Sie wurde nach IUPAC-Richtlinien (Internationale Union für reine und angewandte Chemie) durch die Addition der dreifachen Standardabweichung des CL-Signals des Blindwerts zum Mittelwert des CL-Signals des Blindwerts und Berechnung der entsprechenden Konzentration nach Gleichung 2.2 erhalten [78]. Durch sie konnte die unspezifische Bindung der Matrix und der Antikörper auf der Chipoberfläche im Vergleich zum Probensignal abgeschätzt werden.

## 5.6 Mikrobiologische und molekularbiologische Techniken

### 5.6.1.1 Allgemeines

Alle Verdünnungsarbeiten der Bakteriensuspensionen wurden in der Sterilbank durchgeführt. Vor den Pipettierschritten wurden die Suspensionen für mindestens 5 s auf höchster Stufe mit dem Vortexer homogenisiert. Der Bakterienabfall wurde zunächst autoklaviert und erst dann in den Restmüll gegeben.

### 5.6.1.2 Kultivierung lebender pathogener Mikroorganismen

Die Versuche mit lebenden pathogenen Mikroorganismen wurden im BIO 2 Labor in Oberschleißheim am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch der LMU München in Zusammenarbeit mit Fabian Wiescher durchgeführt. Die Quantifizierung der Proben erfolgte über Kultivierung auf Nährmedium in Petrischalen über Nacht und anschließendem Auszählen der Zellkolonien.

Die Anzuchten der *S. aureus*-Bakterien sowie der *B. cereus*-Sporen wurden in PBS-Puffer oder Magermilch verdünnt und über die monolithische Immunfiltration aufkonzentriert. Die Proben (eingesetzte Probe, Durchläufe und Eluate) wurden aufgefangen und quantifiziert. Die Eluate wurden zunächst mit Bicarbonatpuffer (1,59 g Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> und 2,93 g NaHCO<sub>3</sub> in 1 L Reinstwasser, pH 9,6) 1:1 (v/v) neutralisiert. Zum Verdünnen der Proben in Dezimalstufen wurde eine Ringer-Standard-Infusionslösung verwendet. 100 µL jeder Verdünnungsstufe wurden auf Petrischalen mit Nährmedium ausgestrichen. Das Nährmedium bestand aus 2,5 g Hefeextrakt, 5,0 g pankreasverdaulichem Casein, 1,0 g Glucose und 15,0 g Agar, das in 1 L Reinstwasser aufgekocht, in Petrischalen gegossen und bei 121 °C für 15 min autoklaviert wurde. Die Kultivierung erfolgte 16 - 24 h bei 37 °C und anschließender Auszählung der Zellkolonien nach dem Standard Plate Count-Verfahren.

### 5.6.1.3 Durchflusszytometrie

#### 5.6.1.3.1 Konjugation von anti-*S. aureus* mit PE-Cy5

Zur Konjugation von anti-*S. aureus* mit PE-Cy5 wurde der *Lightning Kit* (PE-Cy5 *Tandem Conjugation Kit*) von Innova Biosciences verwendet. Dazu wurden 50 - 60 µg Ak benötigt, wobei das Volumen 40 µL betrug.

Es wurden 10 µL anti-*S. aureus* (Konzentration 4 - 5 mg/mL) mit 30 µL sterilem PBS-Puffer verdünnt. Der verdünnte Ak wurde mit 4 µL (1 µL pro 10 µL Ak) *LL-Modifier Reagent* gut vermischt. Der so vorbereitete Ak wurde auf 100 µg *Lightning Link Mix* pipettiert und zum Mischen vorsichtig ein paar Mal auf- und abpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 3 h bei RT im Dunkeln wurden 4 µL (1 µL pro 10 µL Ak) *LL-Quencher FD Reagent* zu dem Gemisch gegeben. Nach einer 30-minütigen Wartezeit konnte das Konjugat anti-*S. aureus*-PE-Cy5 zur Messung verwendet werden.

#### 5.6.1.3.2 Messung mit Doppelanfärbung

Für die durchflusszytometrische Messung mit Doppelanfärbung mit SYTO 9 und anti-*S. aureus*-PE-Cy5 wurden 500 µL *S. aureus*-Bakteriensuspension mit 1 µL anti-*S. aureus*-PE-Cy5 (anti-*S. aureus*-PE-Cy5/Reinstwasser, 1:20, v/v) und 3 µL SYTO 9 (SYTO 9/Reinstwasser, 1:10, v/v) gemischt und für 30 min im Dunkeln inkubiert.

Für die Messung am Durchflusszytometer wurde die Flussrate der Probe so eingestellt, dass sie zwischen 300 und 400 Ereignissen/s lag. Bei höheren Bakterienkonzentrationen musste die Flussrate etwas herabgesetzt, bei niedrigeren etwas erhöht werden. Die Messsignale wurden im Dot-Plot-Diagramm erhalten, das die Signalintensitäten der beiden Fluoreszenzdetektoren FL1 und FL3 gegenüberstellte. Beide Farbstoffe wurden bei einer Wellenlänge

von 488 nm angeregt, emittierten allerdings bei unterschiedlichen Wellenlängen. SYTO 9 emittierte bei einer Wellenlänge von 525 nm und wurde mit FL1 detektiert. Die Emission von anti-*S. aureus*-PE-Cy5 wurde bei einer Wellenlänge von ca. 670 nm mit FL3 aufgenommen. Der Messbereich konnte manuell ausgewählt und so vom Hintergrundsignal abgetrennt werden. Die Umrechnung des Signals in die entsprechende Konzentration erfolgte automatisch durch das Gerät über die eingestellte Flussrate. Nach Erreichen von vorab eingestellten 15.000 gezählten Ereignissen wurde die Messung durch das Gerät abgestoppt und konnte gespeichert werden.



---

## **TEIL 6**

# **ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

## 6 Abkürzungsverzeichnis

4-PL	Engl. <i>4-parameter logistic</i>
AD	Außendurchmesser
Ag	Antigen
Ag-Ak	Antigen-Antikörper-Komplex
AGP	Arabinogalactan-Protein
Ak	Antikörper
anti- <i>B. cereus</i> -Sporen	Antikörper gegen <i>B. cereus</i> -Sporen
anti- <i>S. aureus</i>	Antikörper gegen <i>S. aureus</i>
AP	Alkalische Phosphatase
AS	Aminosäuren
a.u.	Willkürliche Einheiten (engl. <i>arbitrary units</i> )
BCA	Bicinchoninsäure
BF <sub>3</sub> ·Et <sub>2</sub> O	Bortrifluorid-Ethyletherat
βgal	β-Galaktosidase
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
BP	<i>Bandpass</i> -Filter
BSA	Rinderserumalbumin (engl. <i>bovine serum albumin</i> )
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
CCD	Ladungsgekoppeltes Bauteil (engl. <i>charged coupled device</i> )
CFU (KBE)	Koloniebildende Einheit (engl. <i>colony forming unit</i> )
C <sub>H</sub> 1, C <sub>H</sub> 2, C <sub>H</sub> 3	Konstante Domäne
CIM	Konvektives Interaktionsmedium (engl. <i>convective interaction media</i> )
CL	Chemilumineszenz
C <sub>L</sub>	Konstante Domäne
CytK	Cytotoxin K
DAPEG	Diaminopolyethylenglykol
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DLP	Dichroitischer Langpassfilter
DMAP	4-(Dimethylamino)pyridin
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

---

DSC	Disuccinimidylcarbonat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDMA	Ethylenglycoldimethacrylat
EDX	Energiedispersive Röntgenfluoreszenzspektroskopie (engl. <i>energy dispersive X-ray fluorescence spectroscopy</i> )
EIA	Enzym-Immunoassay
ELISA	Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest (engl. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i> )
ETFE	Ethylen-Tetrafluorethylen
FCM	Durchflusszytometrie (engl. <i>flow cytometry</i> )
Fab	Antigen-bindendes Fragment (engl. <i>fragment of antigen binding</i> )
Fc	Engl. <i>fragment cristallizable</i>
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (engl. <i>fluorescence in situ hybridisation</i> )
FL	Fluoreszenzdetektor
FRET	Fluoreszenz-Resonanzenergietransfer (engl. <i>fluorescence resonance energy transfer</i> )
FT-IR	Fourier-Transform-Infrarot-Spektroskopie
Fv	Variabler Bereich (engl. <i>fragment variable</i> )
GOPTS	3-Glycidylxypropyltrimethoxysilan
GMA	Glycidylmethacrylat
GTP-Puffer	Neutralisierter Glycinpuffer ( <u>G</u> lycinpuffer + <u>T</u> ween 20 + <u>P</u> BS-Puffer)
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Schwefelsäure
HACCP	Risikoanalyse und kritische Kontrollpunkte (engl. <i>hazard analysis and critical control point</i> )
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Thymidin
Hbl	Hämolyysin BL
Hg	Quecksilber
HGPRT	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. <i>high-performance liquid chromatography</i> )
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. <i>horseradish peroxidase</i> )
HSA	Humanes Serumalbumin
ID	Innendurchmesser

Ig	Immunglobulin
IMAC	Engl. <i>immobilized metal affinity chromatography</i>
ISO	Internationalen Organisation für Normung
IUPAC	Internationale Union für reine und angewandte Chemie (engl. <i>International Union of Pure and Applied Chemistry</i> )
IWC	Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie & Lehrstuhl für Analytische Chemie
$K_2HPO_4$	Dikaliumhydrogenphosphat
KCl	Kaliumchlorid
$K_D$	Bindungskonstante
kDa	Kilodalton
$KH_2PO_4$	Kaliumdihydrogenphosphat
LC	Flüssigchromatographie (engl. <i>liquid chromatography</i> )
LMU	Ludwig-Maximilians-Universität München
LP	<i>Longpass</i> -Filter
LPS	Lipopolysaccharide
m	Anzahl der Messwerte für einen einzelnen Punkt eines Graphen
MALDI	Matrix-unterstützte Laser-Desorption/Ionisation
MCR3	Munich Chip Reader der 3. Generation
MCR3 SLT	Munich Chip Reader der 3. Generation mit Probenschleife (engl. <i>sample loop</i> ) und Temperierung (engl. <i>temperature</i> )
mPCR	Multiplex Polymerase-Kettenreaktion
MRSA	Methicillinresistente <i>S. aureus</i> -Bakterien
MS	Massenspektroskopie
MTBE	Methyl- <i>tert</i> -Butylether
n	Anzahl der Messpunkte in einem Graphen
$Na_2CO_3$	Natriumcarbonat
NaCl	Natriumchlorid
$NaHCO_3$	Natriumhydrogencarbonat
Nhe	Nichthämolytisches Enterotoxin
NHS	N-Hydroxysuccinimid
ORSA	Oxacillinresistente <i>S. aureus</i>
p.a.	Pro analysi
PASA	Paralleler Affinitätssensor-Array (engl. <i>parallel affinity sensor array</i> )

---

PAMPs	Pathogenassoziierte molekulare Muster (engl. <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )
pAk	Polyklonaler Antikörper
PBS	Phosphat-Kochsalz-Puffer (engl. <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (engl. <i>polymerase chain reaction</i> )
PE-Cy5	Phycoerythrin-Cy5
PEEK	Polyetheretherketon
Polylox R9	Polyglycerol-3-glycidylether
POM	Polyoxymethylen
PRRs	Spezielle Erkennungsrezeptoren (engl. <i>pattern recognition receptors</i> )
PS	Polystyrol
PTFE	Polytetrafluorethylen, Teflon
R	Wiederfindung (engl. <i>recovery</i> )
R <sup>2</sup>	Bestimmtheitsmaß
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RIA	Radioimmunoassays
rRNA	Ribosomale Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	Real-time-quantitative-PCR
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SC	Streulicht
SEA	Staphylococcus Enterotoxin A
SERS	Oberflächenverstärkte Ramanspektroskopie (engl. <i>surface-enhanced Raman spectroscopy</i> )
S/N	Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (engl. <i>signal-to-noise ratio</i> )
SP	Shortpass-Filter
SPE	Festphasenextraktion (engl. <i>solid phase extraction</i> )
SPI	Festphasen-Immunoassay (engl. <i>solid-phase immunoassay</i> )
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNBS	2,4,6-Trinitrobenzolsulfonsäure
TOF	Flugzeitanalysator (engl. <i>time of flight</i> )
TSS	Toxisches Schocksyndrom
TUM	Technische Universität München
VDA	2-Vinyl-4,4-Dimethylazlacon
V <sub>H</sub>	Variable Domäne der schweren Kette

## Abkürzungsverzeichnis

---

V <sub>L</sub>	Variable Domäne der leichten Kette
(v/v)	Volumenprozent (engl. <i>percentage by volume</i> )
(w/v)	Massenprozent (engl. <i>weight per volume</i> )
Z	Bakterienzellen
Z/mL	Bakterienzellen pro Milliliter

---

## **TEIL 7**

# **LITERATURVERZEICHNIS**

## 7 Literaturverzeichnis

- [1] Der Spiegel, *Landwirtschaft: Schmierige Geschäfte*, <http://www.spiegel.de/spiegel/print/d-76229467.html>, **(10.01.2011)**.
- [2] Der Spiegel, *Epidemie: Bockshornklee-Samen als Ehec-Verursacher bestätigt*, <http://www.spiegel.de/wissenschaft/mensch/0,1518,800671,00.html>, **(29.11.2011)**.
- [3] Der Spiegel, *Mäusekot und Speisereste: Staatsanwaltschaft ermittelt gegen Großbäckerei*, <http://www.spiegel.de/wirtschaft/unternehmen/0,1518,813255,00.html>, **(03.02.2012)**.
- [4] Milch & Markt, *Zahlen und Daten der deutschen Milchindustrie*, [http://www.milchindustrie.de/de/presse/branchenzahlen\\_aktuell/milchaktuell\\_zahlen\\_daten.html](http://www.milchindustrie.de/de/presse/branchenzahlen_aktuell/milchaktuell_zahlen_daten.html), **(24.02.2012)**.
- [5] *Verordnung über Hygiene- und Qualitätsanforderungen an Milch und Erzeugnisse auf Milchbasis (Milchverordnung)*, **2004**.
- [6] Jost, R.: *Milk and Dairy Products*, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Wiley-VCH, Weinheim, **2007**.
- [7] Samanidou, V. F.; Karageorgou, E. G., *Review article: an overview of the use of monoliths in sample preparation and analysis of milk*, Journal of Separation Science, **34**, 2013–2025, **2011**.
- [8] Töpel, A.: *Chemie und Physik der Milch: Naturstoff - Rohstoff - Lebensmittel*, Behr's Verlag, Hamburg **2004**.
- [9] Pampel, L.; Boushaba, R.; Udell, M.; Turner, M.; Titchener-Hooker, N., *The influence of major components on the direct chromatographic recovery of a protein from transgenic milk*, Journal of Chromatography A, **1142**, 137-147, **2007**.
- [10] Europäische Kommission, *Milch und Milcherzeugnisse in der Europäischen Union*, [http://ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/milk/2007\\_de.pdf](http://ec.europa.eu/agriculture/publi/fact/milk/2007_de.pdf), **(30.01.2012)**.
- [11] Christiansson, A.; Naidu, S.; Nilsson, I.; Wadström, T.; Pettersson, H., *Toxin production by Bacillus cereus dairy isolates in milk at low temperatures*, Applied and Environmental Microbiology, **55**, 2595–2600, **1989**.

- 
- [12] Hassan, G. M.; Al-Ashmawy, M. A. M.; Meshref, A. M. S.; Afify, S. I., *Studies on enterotoxigenic Bacillus cereus in raw milk and some dairy products*, Journal of Food Safety, 30, 569-583, **2010**.
- [13] Chambers, J. V.: *The Microbiology of Raw Milk*, in: Dairy Microbiology Handbook: The Microbiology of Milk and Milk Products, John Wiley & Sons, Hoboken, NJ, USA, **2002**.
- [14] Vasavada, P. C., *Pathogenic bacteria in milk - a review*, Journal of Dairy Science, 71, 2809-2816, **1988**.
- [15] Amtsblatt der Europäischen Union, *Verordnung (EG) Nr. 2073/2005 der Kommission vom 15. November 2005 über mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel*, **2005**.
- [16] Balaban, N.; Rasooly, A., *Staphylococcal enterotoxins*, International Journal of Food Microbiology, 61, 1-10, **2000**.
- [17] Hof, H.; Dörries, R.: *Medizinische Mikrobiologie*, Thieme, Stuttgart **2009**.
- [18] Bhatia, A.; Zahoor, S., *Staphylococcus aureus enterotoxins: a review*, Journal of Clinical and Diagnostic Research, 1, 188-197, **2007**.
- [19] Fuchs, G.: *Allgemeine Mikrobiologie*, Thieme, Stuttgart **2007**.
- [20] Schlegel, H. G.: *Allgemeine Mikrobiologie*, Thieme, Stuttgart **1985**.
- [21] Madigan, M. T.; Martinko, J. M.; Parker, J.: *Brock Mikrobiologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2001**.
- [22] Lowy, F. D., *Staphylococcus aureus infections*, The New England Journal of Medicine, 339, 520-532, **1998**.
- [23] Kluytmans, J.; Van Belkum, A.; Verbrugh, H., *Nasal carriage of Staphylococcus aureus: epidemiology, underlying mechanisms, and associated risks*, Clinical Microbiology Reviews, 10, 505-520, **1997**.
- [24] Peles, F.; Wagner, M.; Varga, L.; Hein, I.; Rieck, P.; Gutser, K.; Kereszturi, P.; Kardos, G.; Turcsanyi, I.; Beri, B.; Szabo, A., *Characterization of Staphylococcus aureus strains isolated from bovine milk in Hungary*, International Journal of Food Microbiology, 118, 186-193, **2007**.

- [25] Scherrer, D.; Corti, S.; Muehlherr, J. E.; Zweifel, C.; Stephan, R., *Phenotypic and genotypic characteristics of Staphylococcus aureus isolates from raw bulk-tank milk samples of goats and sheep*, Veterinary Microbiology, 101, 101-107, **2004**.
- [26] Jorgensen, H. J.; Mork, T.; Rorvik, L. M., *The occurrence of Staphylococcus aureus on a farm with small-scale production of raw milk cheese*, Journal of Dairy Science, 88, 3810-3817, **2005**.
- [27] Seegers, H.; Fourichon, C.; Beaudeau, F., *Production effects related to mastitis and mastitis economics in dairy cattle herds*, Veterinary Research, 34, 475-491, **2003**.
- [28] Asao, T.; Kumeda, Y.; Kawai, T.; Shibata, T.; Oda, H.; Haruki, K.; Nakazawa, H.; Kozaki, S., *An extensive outbreak of staphylococcal food poisoning due to low-fat milk in Japan: estimation of enterotoxin A in the incriminated milk and powdered skim milk*, Epidemiology and Infection, 130, 33-40, **2003**.
- [29] Madigan, M. T.; Martinko, J. M.: *Brock Mikrobiologie*, Pearson Studium, München **2006**.
- [30] 7th Report of the WHO, *Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe, 1993-1998*.
- [31] Lina, G.; Bohach, G. A.; Nair, S. P.; Hiramatsu, K.; Jouvin-Marche, E.; Mariuzza, R., *Standard nomenclature for the superantigens expressed by Staphylococcus*, Journal of Infectious Diseases, 189, 2334-2336, **2004**.
- [32] Letertre, C.; Perelle, S.; Dilasser, F.; Fach, P., *Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of Staphylococcus aureus*, Journal of Applied Microbiology, 95, 38-43, **2003**.
- [33] Omoe, K.; Imanishi, K.; Hu, D.-L.; Kato, H.; Takahashi-Omoe, H.; Nakane, A.; Uchiyama, T.; Shinagawa, K., *Biological properties of staphylococcal enterotoxin-like toxin type R*, Infection and Immunity, 72, 3664-3667, **2004**.
- [34] Jorgensen, H. J.; Mork, T.; Caugant, D. A.; Kearns, A.; Rorvik, L. M., *Genetic variation among Staphylococcus aureus strains from Norwegian bulk milk*, Applied and Environmental Microbiology, 71, 8352-8361, **2005**.

- 
- [35] Bania, J.; Dabrowska, A.; Bystron, J.; Korzekwa, K.; Chrzanowska, J.; Molenda, J., *Distribution of newly described enterotoxin-like genes in Staphylococcus aureus from food*, International Journal of Food Microbiology, 108, 36-41, **2006**.
- [36] Boerema, J. A.; Clemens, R.; Brightwell, G., *Evaluation of molecular methods to determine enterotoxigenic status and molecular genotype of bovine, ovine, human and food isolates of Staphylococcus aureus*, International Journal of Food Microbiology, 107, 192-201, **2006**.
- [37] Hata, E.; Katsuda, K.; Kobayashi, H.; Ogawa, T.; Endo, T.; Eguchi, M., *Characteristics and epidemiologic genotyping of Staphylococcus aureus isolates from bovine mastitic milk in Hokkaido, Japan*, Journal of Veterinary Medical Science, 68, 165-170, **2006**.
- [38] Thomas, D. Y.; Jarraud, S.; Lemerrier, B.; Cozon, G.; Echasserieau, K.; Etienne, J.; Gougeon, M.-L.; Lina, G.; Vandenesch, F., *Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster*, Infection and Immunity, 74, 4724-4734, **2006**.
- [39] Pereira, J. L.; Salzberg, S. P.; Bergdoll, M. S., *Production of staphylococcal enterotoxin D in foods by low-enterotoxin-producing staphylococci*, International Journal of Food Microbiology, 14, 19-25, **1991**.
- [40] Rasooly, A.; Rasooly, R. S., *Detection and analysis of staphylococcal enterotoxin A in food by Western immunoblotting*, International Journal of Food Microbiology, 41, 205-212, **1998**.
- [41] Fricker, M.; Messelhaeusser, U.; Busch, U.; Scherer, S.; Ehling-Schulz, M., *Diagnostic real-time PCR assays for the detection of emetic Bacillus cereus strains in foods and recent food-borne outbreaks*, Applied and Environmental Microbiology, 73, 1892-1898, **2007**.
- [42] Evenson, M. L.; Hinds, M. W.; Bernstein, R. S.; Bergdoll, M. S., *Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk*, International Journal of Food Microbiology, 7, 311-316, **1988**.

- [43] Koecke, H. U.; Emschermann, P.; Härle, E.: *Biologie - Lehrbuch der allgemeinen Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler*, Schattauer Verlagsgesellschaft, Stuttgart **2000**.
- [44] Hauge, S., *Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli*, Journal of Applied Bacteriology, *18*, 591-595, **1955**.
- [45] Messelhäusser, U.; Fricker, M.; Ehling-Schulz, M.; Ziegler, H.; Elmer-Englhard, D.; Kleih, W.; Busch, U., *Real-time-PCR-System zum Nachweis von Bacillus cereus (emetischer Typ) in Lebensmitteln*, Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, *2*, 190-193, **2007**.
- [46] 8th Report of the WHO, *Surveillance programme for control of foodborne infections and intoxications in Europe, 1999-2000*.
- [47] Andersson, A.; Rönner, U.; Granum, P. E., *What problems does the food industry have with the spore-forming pathogens Bacillus cereus and Clostridium perfringens?*, International Journal of Food Microbiology, *28*, 145-155, **1995**.
- [48] Lin, S.; Schraft, H.; Odumeru, J. A.; Griffiths, M. W., *Identification of contamination sources of Bacillus cereus in pasteurized milk*, International Journal of Food Microbiology, *43*, 159-171, **1998**.
- [49] Janstova, B.; Lukasova, J., *Heat resistance of Bacillus spp. spores isolated from cow's milk and farm environment*, Acta Veterinaria Brno, *70*, 179-184, **2001**.
- [50] Faille, C.; Fontaine, F.; Benezech, T., *Potential occurrence of adhering living Bacillus spores in milk product processing lines*, Journal of Applied Microbiology, *90*, 892-900, **2001**.
- [51] Peng, J.-S.; Tsai, W.-C.; Chou, C.-C., *Surface characteristics of Bacillus cereus and its adhesion to stainless steel*, International Journal of Food Microbiology, *65*, 105-111, **2001**.
- [52] Arnesen, L. P. S.; Fagerlund, A.; Granum, P. E., *From soil to gut: Bacillus cereus and its food poisoning toxins*, FEMS Microbiology Reviews, *32*, 579-606, **2008**.
- [53] From, C.; Pukall, R.; Schumann, P.; Hormazabal, V.; Granum, P. E., *Toxin-producing ability among Bacillus spp. outside the Bacillus cereus group*, Applied and Environmental Microbiology, *71*, 1178-1183, **2005**.

- 
- [54] Agata, N.; Mori, M.; Ohta, M.; Suwan, S.; Ohtani, I.; Isobe, M., *A novel Dodecadepsipeptide, cereulide, isolated from Bacillus cereus causes Vacuole formation in Hep-2 cells*, FEMS Microbiology Letters, 121, 31-34, **1994**.
- [55] Mahler, H.; Pasi, A.; Kramer, J. M.; Schulte, P.; Scoging, A. C.; Bär, W.; Krähenbühl, S., *Fulminant liver failure in association with the emetic toxin of Bacillus cereus*, New England Journal of Medicine, 336, 1142-1148, **1997**.
- [56] Dierick, K.; Van Coillie, E.; Swiecicka, I.; Meyfroidt, G.; Devlieger, H.; Meulemans, A.; Hoedemaekers, G.; Fourie, L.; Heyndrickx, M.; Mahillon, J., *Fatal family outbreak of Bacillus cereus-associated food poisoning*, Journal of Clinical Microbiology, 43, 4277-4279, **2005**.
- [57] Rossen, L.; Norskov, P.; Holmstrom, K.; Rasmussen, O. F., *Inhibition of PCR by components of food samples, microbial diagnostic assays and DNA-extraction solutions*, International Journal of Food Microbiology, 17, 37-45, **1992**.
- [58] Betts, W. B., *The potential of dielectrophoresis for the real-time detection of microorganisms in food*, Trends in Food Science and Technology, 6, 51-58, **1995**.
- [59] Jongenburger, I.; Reij, M. W.; Boer, E. P. J.; Gorris, L. G. M.; Zwietering, M. H., *Factors influencing the accuracy of the plating method used to enumerate low numbers of viable micro-organisms in food*, International Journal of Food Microbiology, 143, 32-40, **2010**.
- [60] ISO 7218:2007(E), *Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations*, **2007**.
- [61] Breed, R. S.; Dotterer, W. D., *The number of colonies allowable on satisfactory agar plates*, Journal of Bacteriology, 1, 321-331, **1916**.
- [62] Tomasiewicz, D. M., *The most suitable number of colonies on plates for counting*, Journal of Food Protection, 43, 282-286, **1980**.
- [63] ISO 4833:2003, *Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln – Horizontales Verfahren für die Zählung von Mikroorganismen – Koloniezählverfahren bei 30 °C*, **2003**.
- [64] Cowell, N. D.; Morisetti, M. D., *Microbiological techniques - some statistical aspects*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 20, 573-579, **1969**.

- [65] Oliver, J. D., *The viable but nonculturable state in bacteria*, The Journal of Microbiology, 43, 93-100, **2005**.
- [66] Keep, N. H.; Ward, J. M.; Robertson, G.; Cohen-Gonsaud, M.; Henderson, B., *Bacterial resuscitation factors: revival of viable but non-culturable bacteria*, Cellular and Molecular Life Science, 63, 2555-2559, **2006**.
- [67] Ekins, R.; Chu, F., *Microarrays: Their origins and applications*, Trends in Biotechnology, 17, 217-218, **1999**.
- [68] Ekins, R.; Chu, F.; Biggart, E., *Development of microspot multi-analyte ratiometric immunoassay using dual fluorescent-labelled antibodies*, Analytica Chimica Acta, 227, 73-96, **1989**.
- [69] Seidel, M.; Niessner, R., *Automated analytical microarrays: a critical review*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 1521-1544, **2008**.
- [70] Schena, M.; Heller, R. A.; Theriault, T. P.; Konrad, K.; Lachenmeier, E.; Davis, R. W., *Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics*, Trends in Biotechnology, 16, 301-306, **1998**.
- [71] Butler, J. E., *Enzyme-linked immunosorbent assay*, Journal of Immunoassay, 21, 165-209, **2000**.
- [72] Seidel, M.; Niessner, R.: *Chemiluminescence to Immunoassays*, in: Chemiluminescence and Bioluminescence, A. Roda, 291-335, Royal Society of Chemistry, Cambridge, **2010**.
- [73] Kloth, K.; Niessner, R.; Seidel, M., *Development of an open stand-alone platform for regenerable automated microarrays*, Biosensors and Bioelectronics, 24, 2106-2112, **2009**.
- [74] Kloth, K.; Rye-Johnsen, M.; Didier, A.; Dietrich, R.; Märtlbauer, E.; Niessner, R.; Seidel, M., *A regenerable immuno chip for the rapid determination of 13 different antibiotics in raw milk*, Analyst, 134, 1433-1439, **2009**.
- [75] Wutz, K.; Niessner, R.; Seidel, M., *Simultaneous determination of four different antibiotic residues in honey by chemiluminescence multianalyte chip immunoassays*, Microchimica Acta, 173, 1-9, **2011**.

- 
- [76] Manz, A.; Pamme, N.; Jossifidis, D.: *Bioanalytical Chemistry*, London **2004**.
- [77] Wolter, A.; Niessner, R.; Seidel, M., *Detection of Escherichia coli O157:H7, Salmonella typhimurium, and Legionella pneumophila in water using a flow-through chemiluminescence microarray readout system*, *Analytical Chemistry*, *80*, 5854-5863, **2008**.
- [78] Langer, V.; Niessner, R.; Seidel, M., *Stopped-flow microarray immunoassay for detection of viable E. coli by use of chemiluminescence flow-through microarrays*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *399*, 1041-1050, **2011**.
- [79] Langer, V.; Hartmann, G.; Niessner, R.; Seidel, M., *Rapid quantification of bioaerosols containing L. pneumophila by Coriolis  $\mu$  air sampler and chemiluminescence antibody microarrays*, *Journal of Aerosol Science*, *48*, 46-55, **2012**.
- [80] Marquette, C. A.; Blum, L. J., *Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *385*, 546-554, **2006**.
- [81] Findlay, J. W. A.; Dillard, R. F., *Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays*, *The AAPS Journal*, *9*, E260-E267, **2007**.
- [82] Degen, H.; Lorscheid, P.: *Statistik - Lehrbuch*, Oldenbourg, München **2002**.
- [83] Ramsay, G., *DNA chips: State-of-the art*, *Nature Biotechnology*, *16*, 40-44, **1998**.
- [84] Donhauser, S. C.; Niessner, R.; Seidel, M., *Quantification of E. coli DNA on a flow-through chemiluminescence microarray readout system after PCR amplification*, *Analytical Sciences*, *25*, 669-674, **2009**.
- [85] Kostic, T.; Weilharter, A.; Rubino, S.; Delogou, G.; Uzzau, S.; Rudi, K.; Sessitsch, A.; Bodrossy, L., *A microbial diagnostic microarray technique for the sensitive detection and identification of pathogenic bacteria in a background of nonpathogens*, *Analytical Biochemistry*, *360*, 244-254, **2007**.
- [86] Donhauser, S. C.; Niessner, R.; 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*, *83*, 3153-3160, **2011**.

- [87] Lemarchand, K.; Masson, L.; Brousseau, R., *Molecular biology and DNA microarray technology for microbial quality monitoring of water*, Critical Reviews in Microbiology, 30, 145-172, **2004**.
- [88] Mc Devitt, D.; Francois, P.; Vaudaux, P.; Foster, T. J., *Molecular characterization of the clumping factor (fibrinogen receptor) of Staphylococcus aureus*, Molecular Microbiology, 11, 237-248, **1994**.
- [89] Hawiger, J.; Timmons, S.; Strong, D. D.; Cottrell, B. A.; Riley, M.; Doolittle, R. F., *Identification of a region of human fibrinogen interacting with staphylococcal clumping factor*, Biochemistry, 21, 1407-1413, **1982**.
- [90] Hawiger, J.; Hammond, D. K.; Timmons, S.; Budzynski, A. Z., *Interaction of human fibrinogen with staphylococci: presence of a binding region on normal and abnormal fibrinogen variants and fibrinogen derivatives*, Blood, 51, 799-812, **1978**.
- [91] *API® biochemische Identifizierung*,  
[http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM\\_CLN\\_PRD&doc=GRM\\_CLN\\_PRD\\_G\\_PRD\\_CLN\\_4&pubparams.sform=0&lang=de](http://www.biomerieux.de/servlet/srt/bio/germany/dynPage?open=GRM_CLN_PRD&doc=GRM_CLN_PRD_G_PRD_CLN_4&pubparams.sform=0&lang=de), (**18.05.2012**).
- [92] Shapiro, H. M.: *Practical Flow Cytometry*, John Wiley & Sons, New York **2003**.
- [93] Hammes, F.; Egli, T., *Cytometric methods for measuring bacteria in water: advantages, pitfalls and applications*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 397, 1083-1095, **2010**.
- [94] Diaz, M.; Herrero, M.; Garcia, L. A.; Quiros, C., *Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses*, Biochemical Engineering Journal, 48, 385-407, **2010**.
- [95] Dubelaar, G. B. J.; Gerritzen, P. L., *CytoBuoy: a step forward towards using flow cytometry in operational oceanography*, Scientia Marina, 64, 255-265, **2000**.
- [96] Vesey, G.; Hutton, P.; Champion, A.; Ashbolt, N.; Williams, K. L.; Warton, A.; Veal, D., *Application of flow cytometric methods for the routine detection of Cryptosporidium and Giardia in water*, Cytometry, 16, 1-6, **1994**.
- [97] Brussaard, C. P. D.; Marie, D.; Bratbak, G., *Flow cytometric detection of viruses*, Journal of Virological Methods, 85, 175-182, **2000**.

- 
- [98] Nebe-Von-Caron, G., *Standardization in microbial cytometry*, Cytometry Part A, 75A, 86-89, **2009**.
- [99] *Cell Lab Quanta SC, Instructions for use, Initial issue A 10/05*, Beckman Coulter, Fullerton **2005**.
- [100] Graham, M. D., *The Coulter principle: foundation of an industry*, Journal of Laboratory Automation, 8, 72-81, **2003**.
- [101] Müller, S., *Modes of cytometric bacterial DNA pattern: a tool for pursuing growth*, Cell Proliferation, 40, 621-639, **2007**.
- [102] Robertson, B. R.; Button, D. K., *Characterizing aquatic bacteria according to population, cell size, and apparent DNA content by flow cytometry*, Cytometry, 10, 70-76, **1989**.
- [103] Gasol, J. M.; Del Giorgio, P. A., *Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities*, Scientia Marina, 64, 197-224, **2000**.
- [104] Lebaron, P.; Parthuisot, N.; Catala, P., *Comparison of blue nucleic acid dyes for flow cytometric enumeration of bacteria in aquatic systems*, Applied and Environmental Microbiology, 64, 1725-1730, **1998**.
- [105] Rothe, G.: *Technische und methodische Grundlagen der Durchflusszytometrie*, in: Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie, 27–70, Karger, Basel, **2007**.
- [106] Falcioni, T.; Papa, S.; Campana, R.; Manti, A.; Battistelli, M.; Baffone, W., *State transitions of Vibrio parahaemolyticus VBNC cells evaluated by flow cytometry*, Cytometry Part B (Clinical Cytometry), 74, 272-281, **2008**.
- [107] Berney, M.; Hammes, F.; Bosshard, F.; Weilenmann, H.-U.; Egli, T., *Assessment and interpretation of bacterial viability by using the LIVE/DEAD BacLight kit in combination with flow cytometry*, Applied and Environmental Microbiology, 73, 3283-3290, **2007**.
- [108] Ott, S.; Seidel, M.; Niessner, R., *Preparation of epoxy-based macroporous monolithic columns for the fast and efficient immunofiltration of Staphylococcus aureus*, Journal of Separation Science, 34, 2181–2192, **2011**.

- [109] Mullis, K.; Faloona, F.; Scharf, S.; Saiki, R.; Horn, G.; Erlich, H., *Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: The polymerase chain reaction*, Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology, 51, 263-273, **1986**.
- [110] Wittwer, C. T.; Herrmann, M. G.; Moss, A. A.; Rasmussen, R. P., *Continuous fluorescence monitoring of rapid cycle DNA amplification*, Biotechniques, 22, 130-138, **1997**.
- [111] Rasmussen, R.; Morrison, T.; Herrmann, M.; Wittwer, C., *Quantitative PCR by continuous fluorescence monitoring of a double strand DNA specific binding dye*, Biochemica, 2, 8-11, **1998**.
- [112] Didenko, V. V., *DNA probes using fluorescence resonance energy transfer (FRET): designs and applications*, Biotechniques, 31, 1106-1121, **2001**.
- [113] Tyagi, S.; Kramer, F. R., *Molecular beacons: probes that fluoresce upon hybridization*, Nature Biotechnology, 14, 303-308, **1996**.
- [114] Johnson, W. M.; Tyler, S. D.; Ewan, E. P.; Ashton, F. E.; Pollard, D. R.; Rozee, K. R., *Detection of genes for enterotoxins, exfoliative toxins, and toxic shock syndrome toxin 1 in Staphylococcus aureus by the polymerase chain reaction*, Journal of Clinical Microbiology, 29, 426-430, **1991**.
- [115] Becker, H.; Bürk, C.; Märtlbauer, E., *Staphylokokken-Enterotoxine: Bildung, Eigenschaften und Nachweis*, Journal für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, 2, 171-189, **2007**.
- [116] Ikeda, T.; Tamate, N.; Yamaguchi, K.; Makino, S.-I., *Quantitative analysis of Staphylococcus aureus in skimmed milk powder by real-time PCR*, Journal of Veterinary Medical Science, 67, 1037-1041, **2005**.
- [117] Perry, L.; Heard, P.; Kane, M.; Kim, H.; Savikhin, S.; Dominguez, W.; Applegate, B., *Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food*, Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 15, 176-198, **2007**.
- [118] Settanni, L.; Corsetti, A., *The use of multiplex PCR to detect and differentiate food- and beverage-associated microorganisms: a review*, Journal of Microbiological Methods, 69, 1-22, **2007**.

- 
- [119] Letertre, C.; Perelle, S.; Dilasser, F.; Fach, P., *Detection and genotyping by real-time PCR of the staphylococcal enterotoxin genes sea to sej*, *Molecular and Cellular Probes*, *17*, 139-147, **2003**.
- [120] Chiang, Y.-C.; Tsen, H.-Y.; Chen, H.-Y.; Chang, Y.-H.; Lin, C.-K.; Chen, C.-Y.; Pai, W.-Y., *Multiplex PCR and a chromogenic DNA macroarray for the detection of Listeria monocytogens, Staphylococcus aureus, Streptococcus agalactiae, Enterobacter sakazakii, Escherichia coli O157:H7, Vibrio parahaemolyticus, Salmonella spp. and Pseudomonas fluorescens in milk and meat samples*, *Journal of Microbiological Methods*, *88*, 110-116, **2012**.
- [121] Ryan, P. A.; Macmillan, J. D.; Zilinskas, B. A., *Molecular cloning and characterization of the genes encoding the L<sub>1</sub> and L<sub>2</sub> components of hemolysin BL from Bacillus cereus*, *Journal of Bacteriology*, *179*, 2551-2556, **1997**.
- [122] Heinrichs, J. H.; Beecher, D. J.; Macmillan, J. D.; Zilinskas, B. A., *Molecular cloning and characterization of the hblA gene encoding the B component of hemolysin BL from Bacillus cereus*, *Journal of Bacteriology*, *175*, 6760-6766, **1993**.
- [123] Ehling-Schulz, M.; Svensson, B.; Guinebretiere, M. H.; Lindbäck, T.; Andersson, M.; Schulz, A.; Fricker, M.; Christiansson, A.; Granum, P. E.; Märtilbauer, E.; Nguyen-the, C.; Salkinoja-Salonen, M.; Scherer, S., *Emetic toxin formation of Bacillus cereus is restricted to a single evolutionary lineage of closely related strains*, *Microbiology*, *151*, 183-197, **2005**.
- [124] Ehling-Schulz, M.; Vukov, N.; Schulz, A.; Shaheen, R.; Andersson, M.; Märtilbauer, E.; Scherer, S., *Identification and partial characterization of the nonribosomal peptide synthetase gene responsible for cereulide production in emetic Bacillus cereus*, *Applied and Environmental Microbiology*, *71*, 105-113, **2005**.
- [125] Gracias, K. S.; Mc Killip, J. L., *Triplex PCR-based detection of enterotoxigenic Bacillus cereus ATCC 14579 in nonfat dry milk*, *Journal of Basic Microbiology*, *51*, 147-152, **2011**.
- [126] Lim, J. S.; Kim, M. R.; Kim, W.; Hong, K. W., *Detection and differentiation of non-emetic and emetic Bacillus cereus strains in food by real-time PCR*, *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, *54*, 105-111, **2011**.

- [127] Gitahi, N. J.; Ombui, J. N.; Nduati, D. W.; Gicheru, M. M., *Genetic characterisation of food borne Bacillus cereus strains from milk, cheese and rice by multiplex PCR assay*, International Journal of Integrative Biology, 5, 82-86, **2009**.
- [128] Martinez-Blanch, J. F.; Sanchez, G.; Garay, E.; Aznar, R., *Evaluation of phenotypic and PCR-based approaches for routine analysis of Bacillus cereus group foodborne isolates*, Antonie Van Leeuwenhoek, 99, 697-709, **2011**.
- [129] Yu, C.; Irudayaraj, J., *Spectroscopic characterization of microorganisms by Fourier transform infrared microspectroscopy*, Biopolymers, 77, 368-377, **2005**.
- [130] Naumann, D.; Helm, D.; Labischinski, H., *Microbiological characterizations by FT-IR spectroscopy*, Nature, 351, 81-82, **1991**.
- [131] Curk, M. C.; Peladan, F.; Hubert, J. C., *Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for identifying Lactobacillus species*, FEMS Microbiology Letters, 123, 241-248, **1994**.
- [132] Timmins, E. M.; Howell, S. A.; Alsberg, B. K.; Noble, W. C.; Goodacre, R., *Rapid differentiation of closely related Candida species and strains by pyrolysis-mass spectrometry and Fourier transform-infrared spectroscopy*, Journal of Clinical Microbiology, 36, 367-374, **1998**.
- [133] Maquelin, K.; Kirschner, C.; Choo-Smith, L.-P.; Van Den Braak, N.; Endtz, H. P., *Identification of medically relevant microorganisms by vibrational spectroscopy*, Journal of Microbiological Methods, 51, 255-271, **2002**.
- [134] Carbonelle, E.; Mesquita, C.; Bille, E.; Day, N.; Dauphin, B.; Beretti, J.-L.; Ferroni, A.; Gutmann, L.; Nassif, X., *MALDI-TOF mass spectrometry tools for bacterial identification in clinical microbiology laboratory*, Clinical Biochemistry, 44, 104-109, **2011**.
- [135] Fenselau, C.; Demirev, P. A., *Characterization of intact microorganisms by MALDI mass spectrometry*, Mass Spectrometry Reviews, 20, 157-171, **2001**.
- [136] Knauer, M.; Ivleva, N. P.; Liu, X.; Niessner, R.; Haisch, C., *Surface-enhanced Raman scattering-based label-free microarray readout for the detection of microorganisms*, Analytical Chemistry, 82, 2766-2772, **2010**.

- 
- [137] Stöckel, S.; Schumacher, W.; Meisel, S.; Elschner, M.; Rösch, P.; Popp, J., *Raman spectroscopy-compatible inactivation method for pathogenic endospores*, Applied and Environmental Microbiology, 76, 2895-2907, **2010**.
- [138] Meisel, S.; Stöckel, S.; Elschner, M.; Rösch, P.; Popp, J., *Assessment of two isolation techniques for bacteria in milk towards their compatibility with Raman spectroscopy*, Analyst, 136, 4997-5005, **2011**.
- [139] Kneipp, K.; Wang, Y.; Kneipp, H.; Perelman, L. T.; Itzkan, I.; Dasari, R. R.; Feld, M. S., *Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS)*, Physical Review Letters, 78, 1667-1670, **1997**.
- [140] Eustis, S.; El-Sayed, M. A., *Why gold nanoparticles are more precious than pretty gold: noble metal surface plasmon resonance and its enhancement of the radiative and nonradiative properties of nanocrystals of different shapes*, Chemical Society Reviews, 35, 209-217, **2006**.
- [141] Liz-Marzan, L. M., *Tailoring surface plasmons through the morphology and assembly of metal nanoparticles*, Langmuir, 22, 32-41, **2006**.
- [142] Schwartzberg, A. M.; Oshiro, T. Y.; Zhang, J. Z.; Huser, T.; Talley, C. E., *Improving nanoproboscopes using surface-enhanced Raman scattering from 30-nm hollow gold particles*, Analytical Chemistry, 78, 4732-4736, **2006**.
- [143] Stuart, D. A.; Yuen, J. M.; Shan, N.; Lyandres, O.; Yonzon, C. R.; Glucksberg, M. R.; Walsh, J. T.; Van Duyne, R. P., *In vivo glucose measurement by surface-enhanced Raman spectroscopy*, Analytical Chemistry, 78, 7211-7215, **2006**.
- [144] Driskell, J. D.; Shanmukh, S.; Liu, Y.-J.; Hennigan, S.; Jones, L.; Zhao, Y.-P.; Dluhy, R. A.; Krause, D. C.; Tripp, R. A., *Infectious agent detection with SERS-active silver nanorod arrays prepared by oblique angle deposition*, IEEE Sensors Journal, 8, 863-870, **2008**.
- [145] Tetala, K. K. R.; Van Beek, T. A., *Bioaffinity chromatography on monolithic supports*, Journal of Separation Science, 33, 422-438, **2010**.
- [146] Mallik, R.; Hage, D. S., *Affinity monolith chromatography*, Journal of Separation Science, 29, 1686-1704, **2006**.

- [147] Grunow, R.; Miethe, P.; Conlan, W.; Finke, E.-J.; Friedewald, S.; Porsch-Özcürümez, M., *Rapid detection of Francisella Tularensis by the immunoaffinity assay ABICAP in environmental and human samples*, Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology, 16, 30-54, **2008**.
- [148] Hage, D. S.: *Handbook of Affinity Chromatography*, Taylor & Francis Group, Oxford **2006**.
- [149] Tscheliessnig, A.; Jungbauer, A., *High-performance monolith affinity chromatography for fast quantitation of immunoglobulin G*, Journal of Chromatography A, 1216, 2676-2682, **2009**.
- [150] Ralla, K.; Anton, F.; Scheper, T.; Kasper, C., *Application of conjoint liquid chromatography with monolithic disks for the simultaneous determination of immunoglobulin G and other proteins present in a cell culture medium*, Journal of Chromatography A, 1216, 2671-2675, **2009**.
- [151] Feng, S.; Yang, N.; Pennathur, S.; Goodison, S.; Lubman, D. M., *Enrichment of glycoproteins using nanoscale chelating concanavalin A monolithic capillary chromatography*, Analytical Chemistry, 81, 3776-3783, **2009**.
- [152] Dainiak, M. B.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B., *Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells*, Journal of Chromatography A, 1123, 145-150, **2006**.
- [153] Tetala, K. K. R.; Chen, B.; Visser, G. M.; Maruska, A.; Kornysova, O.; Van Beek, T. A.; Sudhölter, E. J. R., *Preparation of a monolithic capillary column with immobilized  $\alpha$ -mannose for affinity chromatography of lectins*, Journal of Biochemical and Biophysical Methods, 70, 63-69, **2007**.
- [154] Delmotte, N.; Kobold, U.; Meier, T.; Gallusser, A.; Strancar, A.; Huber, C. G., *Miniaturized monolithic disks for immunoabsorption of cardiac biomarkers from serum*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 389, 1065-1074, **2007**.
- [155] Sun, X. H.; Yang, W. C.; Pan, T.; Woolley, A. T., *Affinity monolith integrated poly(methyl methacrylate) microchips for on-line protein extraction and capillary electrophoresis*, Analytical Chemistry, 80, 5126-5130, **2008**.

- 
- [156] Mallik, R.; Tao, J.; Hage, D. S., *High-performance affinity monolith chromatography: development and evaluation of human serum albumin columns*, *Analytical Chemistry*, **76**, 7013-7022, **2004**.
- [157] Roming, T. S.; Bell, C.; Drolet, D. W., *Aptamer affinity chromatography: combinatorial chemistry applied to protein purification*, *Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications*, **731**, 275–284, **1999**.
- [158] Deng, Q. L.; Watson, C. J.; Kennedy, R. T., *Aptamer affinity chromatography for rapid assay of adenosine in microdialysis samples collected in vivo*, *Journal of Chromatography A*, **1005**, 123-130, **2003**.
- [159] Dainiak, M. B.; Plieva, F. M.; Galaev, I. Y.; Hatti-Kaul, R.; Mattiasson, B., *Cell chromatography: Separation of different microbial cells using IMAC supermacroporous monolithic columns*, *Biotechnology Progress*, **21**, 644-649, **2005**.
- [160] Green, N. M.; Toms, E. J., *Properties of subunits of avidin coupled to sepharose*, *Biochemical Journal*, **133**, 687-698, **1973**.
- [161] Ernst-Cabrera, K.; Wilchek, M., *Silica containing primary hydroxyl groups for high-performance affinity chromatography*, *Analytical Biochemistry*, **159**, 267-272, **1986**.
- [162] Gritti, F.; Piatkowski, W.; Guiochon, G., *Study of the mass transfer kinetics in a monolithic column*, *Journal of Chromatography A*, **983**, 51-71, **2003**.
- [163] Eeltink, S.; Svec, F., *Recent advances in the control of morphology and surface chemistry of porous polymer-based monolithic stationary phases and their application in CEC*, *Electrophoresis*, **28**, 137-147, **2007**.
- [164] Josic, D.; Buchacher, A., *Application of monoliths as supports for affinity chromatography and fast enzymatic conversion*, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, **49**, 153-174, **2001**.
- [165] Josic, D.; Buchacher, A.; Jungbauer, A., *Monoliths as stationary phases for separation of proteins and polynucleotides and enzymatic conversion*, *Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, **752**, 191-205, **2001**.
- [166] Urban, J.; Jandera, P., *Polymethacrylate monolithic columns for capillary liquid chromatography*, *Journal of Separation Science*, **31**, 2521-2540, **2008**.

- [167] Peters, E. C.; Svec, F.; Frechet, J. M. J., *Rigid macroporous polymer monoliths*, *Advanced Materials*, *11*, 1169-1181, **1999**.
- [168] Kobayashi, H.; Ikegami, T.; Kimura, H.; Hara, T.; Tokuda, D.; Tanaka, N., *Properties of monolithic silica columns for HPLC*, *Analytical Sciences*, *22*, 491-501, **2006**.
- [169] Nordborg, A.; Hilder, E. F., *Recent advances in polymer monoliths for ion-exchange chromatography*, *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, *394*, 71-84, **2009**.
- [170] Li, Y.; Tolley, H. D.; Lee, M. L., *Size-exclusion separation of proteins using a biocompatible polymeric monolithic capillary column with mesoporosity*, *Journal of Chromatography A*, *1217*, 8181-8185, **2010**.
- [171] Haginaka, J., *Molecularly imprinted polymers as affinity-based separation media for sample preparation*, *Journal of Separation Science*, *32*, 1548-1565, **2009**.
- [172] Zhang, Z.; Wu, R.; Wu, M.; Zou, H., *Recent progress of chiral monolithic stationary phases in CEC and capillary LC*, *Electrophoresis*, *31*, 1457-1466, **2010**.
- [173] Wu, R. A.; Hu, L.; Wang, F.; Ye, M.; Zou, H., *Recent development of monolithic stationary phases with emphasis on microscale chromatographic separation*, *Journal of Chromatography A*, *1184*, 369-392, **2008**.
- [174] Guiochon, G., *Monolithic columns in high-performance liquid chromatography*, *Journal of Chromatography A*, *1168*, 101-168, **2007**.
- [175] Svec, F., *Porous polymer monoliths: Amazingly wide variety of techniques enabling their preparation*, *Journal of Chromatography A*, *1217*, 902-924, **2010**.
- [176] Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N., *Octadecylsilylated porous silica rods as separation media for reversed-phase liquid chromatography*, *Analytical Chemistry*, *68*, 3498-3501, **1996**.
- [177] Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Ishizuka, N.; Tanaka, N., *Effect of domain size on the performance of octadecylsilylated continuous porous silica columns in reversed-phase liquid chromatography*, *Journal of Chromatography A*, *797*, 121-131, **1998**.

- 
- [178] Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Hosoya, K.; Tanaka, N., *Chromatographic properties of miniaturized silica rod columns*, Journal of High Resolution Chromatography, 21, 477-479, **1998**.
- [179] Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Soga, N.; Tanaka, N., *Designing monolithic double-pore silica for high-speed liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, 797, 133-137, **1998**.
- [180] Nunez, O.; Nakanishi, K.; Tanaka, N., *Preparation of monolithic silica columns for high-performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, 1191, 231-252, **2008**.
- [181] Spross, J.; Sinz, A., *Monolithic media for applications in affinity chromatography*, Journal of Separation Science, 34, 1958-1973, **2011**.
- [182] Lin, Z.; Yang, F.; He, X.; Zhao, X.; Zhang, Y., *Preparation and evaluation of a macroporous molecularly imprinted hybrid silica monolithic column for recognition of proteins by high performance liquid chromatography*, Journal of Chromatography A, 1216, 8612-8622, **2009**.
- [183] Jin, W.; Brennan, J. D., *Properties and applications of proteins encapsulated within sol-gel derived materials*, Analytica Chimica Acta, 461, 1-36, **2002**.
- [184] Sakai-Kato, K.; Kato, M.; Toyo'oka, T., *On-line trypsin-encapsulated enzyme reactor by the sol-gel method integrated into capillary electrophoresis*, Analytical Chemistry, 74, 2943-2949, **2002**.
- [185] Cabrera, K., *Applications of silica-based monolithic HPLC columns*, Journal of Separation Science, 27, 843-852, **2004**.
- [186] Koal, T.; Asperger, A.; Efer, J.; Engewald, W., *Simultaneous determination of a wide spectrum of pesticides in water by means of fast on-line SPE-HPLC-MS-MS - a novel approach*, Chromatographia, 57, S-93-S-101, **2003**.
- [187] Kimura, H.; Tanigawa, T.; Morisaka, H.; Ikegami, T.; Hosoya, K.; Ishizuka, N.; Minakuchi, H.; Nakanishi, K.; Ueda, M.; Cabrera, K.; Tanaka, N., *Simple 2D-HPLC using a monolithic silica column for peptide separation*, Journal of Separation Science, 27, 897-904, **2004**.

- [188] Svec, F.; Frechet, J. M. J., *Continuous rods of macroporous polymer as high-performance liquid chromatography separation media*, *Analytical Chemistry*, **64**, 820-822, **1992**.
- [189] Krenkova, J.; Svec, F., *Less common applications of monoliths: IV. Recent developments in immobilized enzyme reactors for proteomics and biotechnology*, *Journal of Separation Science*, **32**, 706-718, **2009**.
- [190] Wang, Q. C.; Svec, F.; Frechet, J. M. J., *Reversed-phase chromatography of small molecules and peptides on a continuous rod of macroporous poly(styrene-co-divinylbenzene)*, *Journal of Chromatography A*, **669**, 230-235, **1994**.
- [191] Svec, F.; Frechet, J. M. J., *Modified poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) continuous rod columns for preparative-scale ion-exchange chromatography of proteins*, *Journal of Chromatography A*, **702**, 89-95, **1995**.
- [192] Svec, F.; Frechet, J. M. J., *New designs of macroporous polymers and supports: from separation to biocatalysis*, *Science*, **273**, 205-211, **1996**.
- [193] Svec, F.; Frechet, J. M. J., *Molded rigid monolithic porous polymers: an inexpensive, efficient, and versatile alternative to beads for the design of materials for numerous applications*, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, **38**, 34-48, **1999**.
- [194] Wang, Q. C.; Svec, F.; Frechet, J. M. J., *Macroporous polymeric stationary-phase rod as continuous separation medium for reversed-phase chromatography*, *Analytical Chemistry*, **65**, 2243-2248, **1993**.
- [195] Yang, W.; Yu, M.; Sun, X. H.; Woolley, A. T., *Microdevices integrating affinity columns and capillary electrophoresis for multibiomarker analysis in human serum*, *Lab on a Chip*, **10**, 2527-2533, **2010**.
- [196] Lozinsky, V. I.; Galaev, I. Y.; Plieva, F. M.; Savinal, I. N.; Jungvid, H.; Mattiasson, B., *Polymeric cryogels as promising materials of biotechnological interest*, *Trends in Biotechnology*, **21**, 445-451, **2003**.
- [197] Dainiak, M. B.; Kumar, A.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B., *Detachment of affinity-captured bioparticles by elastic deformation of a macroporous hydrogel*, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 849-854, **2006**.

- 
- [198] Tennikova, T. B.; Freitag, R., *An introduction to monolithic disks as stationary phases for high performance biochromatography*, Journal of High Resolution Chromatography, 23, 27-38, **2000**.
- [199] Chen, H.-X.; Huang, T.; Zhang, X.-X., *Immunoaffinity extraction of testosterone by antibody immobilized monolithic capillary with on-line laser-induced fluorescence detection*, Talanta, 78, 259-264, **2009**.
- [200] Rohr, T.; Hilder, E. F.; Donovan, J. J.; Svec, F.; Frechet, J. M. J., *Photografting and the control of surface chemistry in three-dimensional porous polymer monoliths*, Macromolecules, 36, 1677-1684, **2003**.
- [201] Ren, L.; Liu, Z.; Liu, Y.; Dou, P.; Chen, H.-Y., *Ring-opening polymerization with synergistic co-monomers: access to a boronate-functionalized polymeric monolith for the specific capture of cis-diol-containing biomolecules under neutral conditions*, Angewandte Chemie - International Edition, 48, 6704-6707, **2009**.
- [202] Tetala, K. K. R.; Chen, B.; Visser, G. M.; Van Beek, T. A., *Single step synthesis of carbohydrate monolithic capillary columns for affinity chromatography of lectins*, Journal of Separation Science, 30, 2828-2835, **2007**.
- [203] Wilchek, M.; Miron, T., *Thirty years of affinity chromatography*, Reactive and Functional Polymers, 41, 263-268, **1999**.
- [204] Barut, M.; Podgornik, A.; Urbas, L.; Gabor, B.; Brne, P.; Vidic, J.; Plevcak, S.; Strancar, A., *Methacrylate-based short monolithic columns: Enabling tools for rapid and efficient analyses of biomolecules and nanoparticles*, Journal of Separation Science, 31, 1867-1880, **2008**.
- [205] Ostryanina, N. D.; Vlasov, G. P.; Tennikova, T. B., *Multifunctional fractionation of polyclonal antibodies by immunoaffinity high-performance monolithic disk chromatography*, Journal of Chromatography A, 949, 163-171, **2002**.
- [206] Lim, Y.-P.; Josic, D.; Callanan, H.; Brown, J.; Hixson, D. C., *Affinity purification and enzymatic cleavage of inter- $\alpha$  inhibitor proteins using antibody and elastase immobilized on CIM monolithic disks*, Journal of Chromatography A, 1065, 39-43, **2005**.
- [207] Arvidsson, P.; Plieva, F. M.; Savina, I. N.; Lozinsky, V. I.; Fexby, S.; Bülow, L.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B., *Chromatography of microbial cells using continuous*

- supermacroporous affinity and ion-exchange columns*, Journal of Chromatography A, 977, 27-38, **2002**.
- [208] Plieva, F. M.; Galaev, I. Y.; Mattiasson, B., *Macroporous gels prepared at subzero temperatures as novel materials for chromatography of particulate-containing fluids and cell culture applications*, Journal of Separation Science, 30, 1657-1671, **2007**.
- [209] Kumar, A.; Srivastava, A., *Cell separation using cryogel-based affinity chromatography*, Nature Protocols, 5, 1737-1747, **2010**.
- [210] Peskoller, C.; Niessner, R.; Seidel, M., *Development of an epoxy-based monolith used for the affinity capturing of Escherichia coli bacteria*, Journal of Chromatography A, 1216, 3794-3801, **2009**.
- [211] Jiang, T.; Mallik, R.; Hage, D. S., *Affinity monoliths for ultrafast immunoextraction*, Analytical Chemistry, 77, 2362-2372, **2005**.
- [212] Berruex, L. G.; Freitag, R.; Tennikova, T. B., *Comparison of antibody binding to immobilized group specific affinity ligands in high performance monolith affinity chromatography*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 24, 95-104, **2000**.
- [213] Gupalova, T. V.; Lojkina, O. V.; Palagnuk, V. G.; Totolian, A. A.; Tennikova, T. B., *Quantitative investigation of the affinity properties of different recombinant forms of protein G by means of high-performance monolithic chromatography*, Journal of Chromatography A, 949, 185-193, **2002**.
- [214] Luo, Q. Z.; Zou, H. F.; Zhang, Q.; Xiao, X. Z.; Ni, J. Y., *High-performance affinity chromatography with immobilization of protein A and L-histidine on molded monolith*, Biotechnology and Bioengineering, 80, 481-489, **2002**.
- [215] Pan, Z.; Zou, H.; Mo, W.; Huang, X.; Wu, R., *Protein A immobilized monolithic capillary column for affinity chromatography*, Analytica Chimica Acta, 46, 141-150, **2002**.
- [216] Petro, M.; Svec, F.; Frechet, J. M. J., *Immobilization of trypsin onto "molded" macroporous poly(glycidyl methacrylate-co-ethylene dimethacrylate) rods and use of the conjugates as bioreactors and for affinity chromatography*, Biotechnology and Bioengineering, 49, 355-363, **1996**.

- 
- [217] Calleri, E.; Marrubini, G.; Massolini, G.; Lubda, D.; De Fazio, S. S.; Furlanetto, S.; Wainer, I. W.; Manzo, L.; Caccialanza, G., *Development of a chromatographic bioreactor based on immobilized  $\beta$ -glucuronidase on monolithic support for the determination of dextromethorphan and dextrorphan in human urine*, Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 35, 1179-1189, **2004**.
- [218] Gustavsson, P. E.; Larsson, P. O., *Continuous superporous agarose beds for chromatography and electrophoresis*, Journal of Chromatography A, 832, 29-39, **1999**.
- [219] Hermanson, G. T.: *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, Oxford **1996**.
- [220] Ruhn, P. F.; Garver, S.; Hage, D. S., *Development of dihydrazide-activated silica supports for high-performance affinity chromatography*, Journal of Chromatography A, 669, 9-19, **1994**.
- [221] Xuan, H.; Hage, D. S., *Immobilization of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein for chromatographic studies of drug-protein binding*, Analytical Biochemistry, 346, 300-310, **2005**.
- [222] Kohn, J.; Wilchek, M., *The use of cyanogen bromide and other novel cyanylating agents for the activation of polysaccharide resins*, Applied Biochemistry and Biotechnology, 9, 285-305, **1984**.
- [223] Wakeman, R. J.; Tarleton, E. S.: *Filtration - Equipment selection, modelling and process simulation*, Elsevier, Oxford **1999**.
- [224] Dickenson, T. C.: *Filtration and Filtration Handbook*, Elsevier, Oxford **1997**.
- [225] Meyers, J. J.; Liapis, A. I., *Network modeling of the convective flow and diffusion of molecules adsorbing in monoliths and in porous particles packed in a chromatographic column*, Journal of Chromatography A, 852, 3-23, **1999**.
- [226] Stevens, K. A.; Jaykus, L.-A., *Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: a review*, Critical Reviews in Microbiology, 30, 7-24, **2004**.
- [227] Payne, M. J.; Kroll, R. G., *Methods for the separation and concentration of bacteria from foods*, Trends in Food Science & Technology, 2, 315-319, **1991**.
- [228] Lindahl, V.; Bakken, L. R., *Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil*, FEMS Microbiology Ecology, 16, 135-142, **1995**.

- [229] Jacobsen, C. S.; Rasmussen, O. F., *Development and application of a new method to extract bacterial DNA from soil based on separation of bacteria from soil with cation-exchange resin*, Applied and Environmental Microbiology, 58, 2458-2462, **1992**.
- [230] Gascoyne, P. R. C.; Huang, Y.; Pethig, R.; Vykoukal, J.; Becker, F. F., *Dielectrophoretic separation of mammalian cells studied by computerized image analysis*, Measurement Science and Technology, 3, 439-445, **1992**.
- [231] Coakley, W. T., *Ultrasonic separations in analytical biotechnology*, Trends in Biotechnology, 15, 506-511, **1997**.
- [232] Markx, G. H.; Dyda, P. A.; Pethig, R., *Dielectrophoretic separation of bacteria using a conductivity gradient*, Journal of Biotechnology, 51, 175-180, **1996**.
- [233] Mattiasson, B., *Applications of aqueous two-phase systems in biotechnology*, Trends in Biotechnology, 1, 16-20, **1983**.
- [234] Pedersen, L. H.; Skouboe, P.; Rossen, L.; Rasmussen, O. F., *Separation of Listeria monocytogenes and Salmonella berta from a complex food matrix by aqueous polymer two-phase partitioning*, Letters in Applied Microbiology, 26, 47-50, **1998**.
- [235] Lantz, P.-G.; Tjerneld, F.; Borch, E.; Hahn-Hägerdal, B.; Radström, P., *Enhanced sensitivity in PCR detection of Listeria monocytogenes in soft cheese through use of an aqueous two-phase system as a sample preparation method*, Applied and Environmental Microbiology, 60, 3416-3418, **1994**.
- [236] Darby, G. K.; Jones, A. S.; Kennedy, J. F.; Walker, R. T., *Isolation and analysis of the nucleic acids and polysaccharides from Clostridium welchii*, Journal of Bacteriology, 103, 159-165, **1970**.
- [237] Niederhauser, C.; Candrian, U.; Höfelein, C.; Jermini, M.; Bühler, H.-P.; Lüthy, J., *Use of polymerase chain reaction for detection of Listeria monocytogenes in food*, Applied and Environmental Microbiology, 58, 1564-1568, **1992**.
- [238] Wegmüller, B.; Lüthy, J.; Candrian, U., *Direct polymerase chain reaction detection of Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in raw milk and dairy products*, Applied and Environmental Microbiology, 59, 2161-2165, **1993**.

- 
- [239] Lindqvist, R., *Preparation of PCR samples from food by a rapid and simple centrifugation technique evaluated by detection of Escherichia coli O157:H7*, International Journal of Food Microbiology, 37, 73-82, **1997**.
- [240] Hutten, I. M.: *Handbook of Non-Woven Filter Media*, Elsevier, Oxford **2007**.
- [241] Goedecke, R.: *Fluidverfahrenstechnik: Grundlagen, Methodik, Technik, Praxis*, Wiley-VCH, Weinheim **2011**.
- [242] Pettipher, G. L.; Rodrigues, U. M., *Rapid enumeration of microorganisms in foods by the direct epifluorescent filter technique*, Applied and Environmental Microbiology, 44, 809-813, **1982**.
- [243] Pettipher, G. L.; Mansell, R.; Mc Kinnon, C. H.; Cousins, C. M., *Rapid membrane filtration-epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk*, Applied and Environmental Microbiology, 39, 423-429, **1980**.
- [244] Amann, R.; Fuchs, B. M.; Behrens, S., *The identification of microorganisms by fluorescence in situ hybridisation*, Current Opinion in Microbiology, 12, 231-236, **2001**.
- [245] Kroll, R. G., *Electropositively charged filters for the concentration of bacteria from foods*, Food Microbiology, 2, 183-186, **1985**.
- [246] Oyofu, B. A.; Rollins, D. M., *Efficacy of filter types for detecting Campylobacter jejuni and Campylobacter coli in environmental water samples by polymerase chain reaction*, Applied and Environmental Microbiology, 59, 4090-4095, **1993**.
- [247] Peskoller, C.; Niessner, R.; Seidel, M., *Cross-flow microfiltration system for rapid enrichment of bacteria in water*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 393, 399-404, **2009**.
- [248] Ibrahim, G. F.; Lyons, M. J.; Walker, R. A.; Fleet, G. H., *Immobilization of microorganisms for detection by solid-phase immunoassays*, Journal of Clinical Microbiology, 22, 361-365, **1985**.
- [249] Lucre, L. A.; Cullison, M. A.; Jaykus, L.-A., *Immobilization with metal hydroxides as a means to concentrate food-borne bacteria for detection by cultural and molecular methods*, Applied and Environmental Microbiology, 66, 1769-1776, **2000**.

- [250] Cullison, M. A.; Jaykus, L. A., *Magnetized carbonyl iron and insoluble zirconium hydroxide mixture facilitates bacterial concentration and separation from nonfat dry milk*, Journal of Food Protection, 65, 1806-1810, **2002**.
- [251] Lea, T.; Vartdal, F.; Davies, C.; Ugelstad, J., *Magnetic monosized polymer particles for fast and specific fractionation of human mononuclear cells*, Scandinavian Journal of Immunology, 22, 207-216, **1985**.
- [252] Gaudernack, G.; Leivestad, T.; Ugelstad, J.; Throsby, E., *Isolation of pure functionally active CD8+ T cells. Positive selection with monoclonal antibodies directly conjugated to monosized magnetic microspheres*, Journal of Immunological Methods, 90, 179-187, **1986**.
- [253] Johne, B.; Jarp, J.; Haaheim, L. R., *Staphylococcus aureus exopolysaccharide in vivo demonstrated by immunomagnetic separation and electron microscopy*, Journal of Clinical Microbiology, 27, 1631-1635, **1989**.
- [254] Skjerve, E.; Rorvik, L. M.; Olsvik, O., *Detection of Listeria monocytogenes in foods by immunomagnetic separation*, Applied and Environmental Microbiology, 56, 3478-3481, **1990**.
- [255] Cudjoe, K. S.; Thorsen, L. I.; Sorensen, T.; Reseland, J.; Olsvik, O.; Granum, P. E., *Detection of Clostridium perfringens type A enterotoxin in faecal and food samples using immunomagnetic separation (IMS)-ELISA*, International Journal of Food Microbiology, 12, 313-321, **1991**.
- [256] Pappert, G.; Rieger, M.; Niessner, R.; Seidel, M., *Immunomagnetic nanoparticle-based sandwich chemiluminescence-ELISA for the enrichment and quantification of E. coli*, Microchimica Acta, 168, 1-8, **2010**.
- [257] Hibi, K.; Mitsubayashi, K.; Fukuda, H.; Ushio, H.; Hayashi, T.; Ren, H.; Endo, H., *Rapid direct determination using combined separation by prepared immunomagnetic and flow cytometry of Flavobacterium psychrophilum*, Biosensors and Bioelectronics, 22, 1916-1919, **2007**.
- [258] Hibi, K.; Ushio, H.; Fukuda, H.; Mitsubayashi, K.; Hayashi, T.; Ren, H.; Endo, H., *Immunomagnetic separation using carbonyl iron powder and flow cytometry for rapid detection of Flavobacterium psychrophilum*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 1147-1152, **2008**.

- 
- [259] Hoffman, R. M.; Wolk, D. M.; Spencer, S. K.; Borchardt, M. A., *Development of a method for the detection of waterborne microsporidia*, Journal of Microbiological Methods, 70, 312-318, **2007**.
- [260] Dübel, S.; Rohrbach, P.; Schmiedl, A.: *Werkzeuge gegen Krebs, Infektionen und Autoimmunerkrankungen? Rekombinante Antikörper*, in: Biologie in unserer Zeit, 372-379, Wiley-VCH Verlag, Weinheim, **2004**.
- [261] Singer, S. J.; Doolittle, R. F., *Antibody active sites and immunoglobulin molecules*, Science, 153, 13-25, **1966**.
- [262] Luttmann, W.; Bratke, K.; Küpper, M.; Myrtek, D.: *Der Experimentator - Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2006**.
- [263] Breitling, F.; Dübel, S.: *Rekombinante Antikörper*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **1997**.
- [264] Schütt, C.; Bröker, B.: *Grundwissen Immunologie*, Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg **2011**.
- [265] Heizmann, W. R.; Döllner, P. C.; Kropp, S.; Bleich, S.: *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Immunologie*, Schattauer, Stuttgart **2011**.
- [266] Mikkelsen, S. R.; Corton, E.: *Bioanalytical Chemistry*, John Wiley & Sons, Weinheim **2004**.
- [267] Vollmar, A.; Dingermann, T.: *Immunologie - Grundlagen und Wirkstoffe*, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, Stuttgart **2005**.
- [268] Urban, J.; Svec, F.; Frechet, J. M. J., *Hypercrosslinking: new approach to porous polymer monolithic capillary columns with large surface area for the highly efficient separation of small molecules*, Journal of Chromatography A, 1217, 8212-8221, **2010**.
- [269] Wolter, A.; Niessner, R.; Seidel, M., *Preparation and characterization of functional poly(ethylene glycol) surfaces for the use of antibody microarrays*, Analytical Chemistry, 79, 4529-4537, **2007**.

- [270] Tang, D.; Yu, Y.; Niessner, R.; Miro, M.; Knopp, D., *Magnetic bead-based fluorescence immunoassay for aflatoxin B<sub>1</sub> in food using biofunctionalized rhodamine B-doped silica nanoparticles*, *Analyst*, *135*, 2661-2667, **2010**.
- [271] Piehler, J.; Brecht, A.; Valiokas, R.; Liedberg, B.; Gauglitz, G., *A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces*, *Biosensors and Bioelectronics*, *15*, 473-481, **2000**.
- [272] Schalkhammer, T. G. M.: *Analytical Biotechnology*, Birkhäuser Verlag, Basel **2002**.
- [273] Josephy, P. D.; Eling, T.; Mason, R. P., *The horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine - Free-radical and charge-transfer complex intermediates*, *Journal of Biological Chemistry*, *257*, 3669-3675, **1982**.
- [274] Smith, P. K.; Krohn, R. I.; Hermanson, G. T.; Mallia, A. K.; Gartner, F. H.; Provenzano, M. D.; Fujimoto, E. K.; Goeke, N. M.; Olson, B. J.; Klenk, D. C., *Measurement of protein using bicinchoninic acid*, *Analytical Biochemistry*, *150*, 76-85, **1985**.
- [275] Clarke, W.; Beckwith, J. D.; Jackson, A.; Reynolds, B.; Karle, E. M.; Hage, D. S., *Antibody immobilization to high-performance liquid chromatography supports - Characterization of maximum loading capacity for intact immunoglobulin G and Fab fragments*, *Journal of Chromatography A*, *888*, 13-22, **2000**.
- [276] Billakanti, J. M.; Fee, C. J., *Characterization of cryogel monoliths for extraction of minor proteins from milk by cation exchange*, *Biotechnology and Bioengineering*, *6*, 1155-1163, **2009**.
- [277] Fee, C. J.; Chand, A., *Capture of lactoferrin and lactoperoxidase from raw whole milk by cation exchange chromatography*, *Separation and Purification Technology*, *48*, 143-149, **2006**.
- [278] Holleman, A. F.; Wiberg, E.: *Lehrbuch der Anorganischen Chemie*, deGruyter, Berlin **1995**.
- [279] Porotec - Vertrieb von wissenschaftlichen Geräten GmbH,  
<http://www.porotec.de/index.htm?/Produkte/PAS/main.htm>, **(08.07.2012)**.

- [280] Abell, A. B.; Willis, K. L.; Lange, D. A., *Mercury intrusion porosimetry and image analysis of cement-based materials*, Journal of Colloid and Interface Science, 211, 39-44, **1999**.
- [281] Throckmorton, D. J.; Shepodd, T. J.; Singh, A. K., *Electrochromatography in microchips: reversed-phase separation of peptides and amino acids using photopatterned rigid polymer monoliths*, Analytical Chemistry, 74, 784-789, **2002**.
- [282] Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften, *Entscheidung der Kommission vom 12. August 2002 zur Umsetzung der Richtlinie 96/23/EG des Rates betreffend die Durchführung von Analysemethoden und die Auswertung von Ergebnissen*, **2002**.