

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Analytische Chemie
Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie

**Nachweis von *Legionella pneumophila* in Luft und Wasser
mittels Antikörper-Mikroarrays**

Veronika Langer

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. Michael Groll
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.-Prof. Dr. Reinhard Nießner
2. Univ.-Prof. Dr. Michael Schuster

Die Dissertation wurde am 15.10.2012 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Chemie am 05.12.2012 angenommen.

Danksagung

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Juli 2009 bis Juni 2012 am Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie der Technischen Universität München unter der Leitung von Prof. Dr. R. Nießner angefertigt. Ein Teil der Arbeit wurde durch ein Projekt (SE 1722/1-2) der Deutschen Forschungsgemeinschaft finanziell gefördert.

Besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Reinhard Nießner für die interessante Aufgabenstellung und die freundliche Aufnahme in sein Institut.

Besonders möchte ich mich auch bei Herrn Dr. Michael Seidel für die Betreuung meiner Arbeit, die fachliche Unterstützung und die stete Hilfsbereitschaft bedanken.

Bei Herrn Dr. Lück der TU Dresden möchte ich mich herzlich für die Bereitstellung der zahlreichen Antikörper gegen *L. pneumophila* sowie der inaktivierten Bakteriensuspensionen bedanken. Bei Herrn Dr. Schubert und Kirsten Weinert vom Max von Pettenkofer-Institut bedanke ich mich für die Bereitstellung inaktivierter *L. pneumophila* Serogruppe 1. Gedankt sei außerdem Herrn Dr. Brenner vom Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit für die interessante Zusammenarbeit im Rahmen von Bioaerosol-Probenahmen.

Allen Kolleginnen und Kollegen am Institut möchte ich für die Hilfsbereitschaft, die gute Zusammenarbeit und die herzliche Arbeitsatmosphäre danken. Den ehemaligen und derzeitigen Kollegen meiner Arbeitsgruppe - Simon Donhauser, Georg Hartmann, Maria Hübner, Dr. Gerhard Pappert, Lu Pei, Dr. Martin Rieger, Klaus Wutz und ganz besonders Sandra Lengger, Sonja Ott und Agathe Szkola - danke ich für die gute Zusammenarbeit und die schöne gemeinsame Zeit auch außerhalb des Instituts. Insbesondere möchte ich mich bei Lu Pei und Dr. Martin Rieger für die gemeinsamen Versuche der Bakterienanreicherung sowie bei Georg Hartmann für die Zusammenarbeit im Rahmen der Bioaerosol-Untersuchungen bedanken. Maria Hübner, Sandra Lengger und Agathe Szkola danke ich sehr für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ein ganz herzliches Dankeschön richtet sich schließlich an meine Familie und meinen Freund Michael für die uneingeschränkte Unterstützung und Geduld während der gesamten Zeit sowie für die Aufmunterungen, die gelegentlich notwendig waren.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits in Fachzeitschriften veröffentlicht:

V. Langer, R. Nießner, M. Seidel, *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**.

V. Langer, G. Hartmann, R. Nießner, M. Seidel, *Rapid quantification of bioaerosols containing L. pneumophila by Coriolis[®] μ air sampler and chemiluminescence antibody microarrays*. Journal of Aerosol Science, 48, 46-55, **2012**.

Inhaltsverzeichnis

1 EINLEITUNG UND PROBLEMSTELLUNG	1
2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN	5
2.1 LEGIONELLEN - UMWELT- UND GESUNDHEITSRELEVANTE ASPEKTE	5
2.1.1 <i>Vorkommen und Pathogenität</i>	5
2.1.2 <i>Morphologie und Eigenschaften</i>	7
2.1.3 <i>Krankheitsbilder und Therapie</i>	8
2.2 NACHWEIS VON LEGIONELLEN	10
2.2.1 <i>Kulturverfahren</i>	10
2.2.2 <i>Kulturunabhängige Verfahren</i>	13
2.2.2.1 <i>Prinzipielle Detektionsmethoden</i>	13
2.2.2.1.1 <i>Fluoreszenz</i>	13
2.2.2.1.2 <i>Chemilumineszenz</i>	13
2.2.2.1.3 <i>Elektrochemische Detektion</i>	14
2.2.2.1.4 <i>Markierungsfreie Detektion</i>	15
2.2.2.2 <i>Analyseplattformen</i>	15
2.2.2.2.1 <i>Durchflusszytometrie</i>	15
2.2.2.2.2 <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>	19
2.2.2.2.3 <i>ELISA</i>	21
2.2.2.2.4 <i>Biosensor</i>	23
2.2.2.2.5 <i>Mikroarray</i>	24
2.2.2.2.6 <i>Mikroskopie</i>	25
2.2.2.2.7 <i>Spektroskopische Methoden</i>	25
2.2.3 <i>Nachweisverfahren im Vergleich</i>	26
2.3 MIKROARRAY-TECHNOLOGIE.....	27
2.3.1 <i>Oberflächenchemie</i>	28
2.3.2 <i>Immobilisierung von Fängermolekülen</i>	32
2.3.3 <i>Durchfluss-Mikroarrays</i>	34
2.4 ANREICHERUNGSVERFAHREN.....	37
2.4.1 <i>Anreicherung aus Wasser</i>	37
2.4.1.1 <i>Zentrifugation</i>	38
2.4.1.2 <i>Koagulation und Flokkulation</i>	38
2.4.1.3 <i>Filtrationsverfahren</i>	39

2.4.1.4 Methoden nach dem Prinzip der Adsorption/Desorption.....	41
2.4.1.5 Affinitätschromatographie	41
2.4.1.6 Immunomagnetische Separation	43
2.4.2 Anreicherung aus Luft.....	44
2.4.2.1 Impaktor	44
2.4.2.2 Impinger	45
2.4.2.3 Zyklonabscheider	46
2.4.2.4 Filtration	47
3 ERGEBNISSE UND DISKUSSION	49
3.1 STOPPED-FLOW-SANDWICH-IMMUNOASSAY.....	49
3.1.1 Interaktionszeit.....	52
3.1.2 Interaktionszeit mit Vorinkubation.....	54
3.1.3 Anzahl der 20 µL-Interaktionsschritte	57
3.1.4 Optimierter Stopped-Flow-Mikroarray-Immunoassay	58
3.1.5 Vergleich Stopped-Flow-Zugabe und kontinuierliche Zugabe	59
3.1.6 Mikroarray-Kalibrierung von <i>E. coli</i>	60
3.2 MIKROARRAY-DETEKTION VON <i>L. PNEUMOPHILA</i> SEROGRUPPE 1	63
3.2.1 Auswahl geeigneter Antikörper.....	63
3.2.2 Kalibrierung von <i>L. pneumophila</i> Serogruppe 1	67
3.2.3 Reproduzierbarkeit.....	68
3.3 DETEKTION VON <i>L. PNEUMOPHILA</i> SEROGRUPPE 1 IN KOMBINATION MIT ANREICHERUNGSVERFAHREN.....	73
3.3.1 Zweistufige Anreicherung mittels Cross-Flow-Mikrofiltration und monolithischer Säule.....	73
3.3.1.1 pH-Wert-Abhängigkeit der Cross-Flow-Filtration.....	78
3.3.1.2 Kalibrierung des Verbundverfahrens	79
3.3.2 Anreicherung mittels monolithischer Säule	81
3.3.2.1 Optimierung des Elutionspuffers	81
3.3.2.2 Elutionsrichtung	82
3.3.2.3 Probengeschwindigkeit und Elutionsvolumen	84
3.4 DETEKTION VON <i>L. PNEUMOPHILA</i> SEROGRUPPE 1 IN BIOAEROSOLEN.....	86
3.4.1 Modellaufbau zur Bioaerosol-Analytik	86
3.4.2 Bioaerosol-Messungen.....	88

3.4.3 Realproben-Messungen.....	97
3.5 MIKROARRAY-DETEKTION VON <i>L. PNEUMOPHILA</i> SEROGRUPPEN	99
3.5.1 Antikörper-Screening mittels Zell-Mikroarrays.....	100
3.5.2 Antikörper-Mikroarray zur Detektion von <i>L. pneumophila</i> Serogruppe 1 - 15....	104
3.5.2.1 Vergleich unterschiedlicher Fängerantikörper	104
3.5.2.2 Monoklonale Antikörper im Vergleich mit polyklonalem Detektionsantikörper	107
3.5.2.3 Kalibrierung <i>L. pneumophila</i> Serogruppe 1 - 15.....	110
4 ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK.....	116
5 SUMMARY AND OUTLOOK	120
6 EXPERIMENTELLER TEIL.....	124
6.1 VERWENDETE MATERIALIEN.....	124
6.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien.....	124
6.1.2 Software.....	125
6.1.3 Chemikalien und Reagenzien	125
6.1.4 Antigene.....	126
6.1.5 Antikörper.....	127
6.1.6 Puffer.....	127
6.2 STANDARDVERFAHREN	129
6.2.1 Herstellung DAPEG-beschichteter Mikroarrays	129
6.2.1.1 Vorbehandlung der Glasobjektträger	129
6.2.1.2 Silanisierung.....	129
6.2.1.3 Belegung mit Diamino-Polyethylenglykol.....	130
6.2.2 Aktivierung Polyethylenglykol-modifizierter Glasobjektträger	130
6.2.2.1 Aktivierung zur Immobilisierung von Antikörpern	130
6.2.2.2 Aktivierung zur Immobilisierung von Bakterien	131
6.2.3 Immobilisierung von Antikörpern und Bakterien.....	131
6.2.4 Mikroarray-Auslesesystem.....	132
6.2.5 Auswertung der Mikroarray-Messdaten	133
6.2.6 Bestimmung der Bakterienkonzentration mittels Durchflusszytometrie	135
6.3 MIKROARRAY-MESSUNGEN MITTELS STOPPED-FLOW-PRINZIP.....	136

6.3.1 Optimiertes Stopped-Flow Messprogramm	136
6.3.2 Einfluss der Interaktionszeit.....	137
6.3.3 Vorinkubation.....	137
6.3.4 Anzahl an Interaktionsschritten	138
6.3.5 Vergleich Stopped-Flow-Prinzip und kontinuierliche Zugabe.....	138
6.3.6 Kultivierung von <i>E. coli</i>	138
6.4 MIKROARRAY-DETEKTION VON <i>L. PNEUMOPHILA</i> SEROGRUPPE 1	139
6.5 MIKROARRAY-DETEKTION IN KOMBINATION MIT ANREICHERUNGSVERFAHREN	139
6.6 BIOAEROSOL-UNTERSUCHUNGEN	140
6.6.1 Bioaerosol-Erzeugung.....	140
6.6.2 Aerosolkammer.....	141
6.6.3 Bioaerosol-Sammler Coriolis μ	141
6.6.4 Bioaerosol-Sammler AGI-30.....	142
6.6.5 Berechnung der Bakterienwiederfindung.....	143
6.6.6 Untersuchung von Realproben.....	143
6.7 DETEKTION DER 15 SEROGRUPPEN VON <i>L. PNEUMOPHILA</i>	144
6.7.1 Screening der Zellkulturüberstände	144
6.7.2 Aufreinigung von Antikörpern aus Zellkulturüberständen mittels Protein A-Säulen	144
6.7.3 Biotin-Markierung von Antikörpern.....	145
6.7.4 Mikroarray-Sandwich-Immunoassay zur Detektion der Serogruppen	145
7 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	147
8 LITERATUR	149

1 Einleitung und Problemstellung

„Legionellen-Alarm: Duschverbot im Olympiadorf“, so hieß es Ende Juni 2012 in der Münchner Abendzeitung [1]. Eine Untersuchung des Trinkwassers hatte eine Grenzüberschreitung der Legionellenkonzentration ergeben, und dieses Beispiel ist kein Einzelfall.

Die Überwachung der Legionellenkonzentration hat im öffentlichen Gesundheitswesen zunehmend an Bedeutung gewonnen und zu entscheidenden gesetzlichen Veränderungen geführt. Legionellen sind Bakterien, die ubiquitär in natürlichen und künstlichen Wassersystemen vorkommen [2]. Unter bestimmten Bedingungen (z. B. Wasserstagnation) können sich Legionellen vermehren und Infektionen beim Menschen auslösen. Dabei können zwei Krankheitsbilder auftreten. Zum einen das grippeähnliche Pontiac-Fieber und zum anderen die Legionärskrankheit, eine schwere Form von Lungenentzündung [3]. Die Sterblichkeit bei Auftreten der Legionärskrankheit liegt mit 10 - 15 % relativ hoch [4]. Bezüglich der Infektionsgefahr ist *Legionella pneumophila* die wichtigste Spezies und wird mit etwa 90 % der Infektionsfälle in Verbindung gebracht [3]. Die Infektion erfolgt durch das Einatmen kontaminierter Aerosole [5]. Quellen für dieses Bioaerosol sind zum Beispiel Kühltürme [6, 7], Duschwasser [8, 9] oder Klimaanlage [10]. Gelegentlich kommt es zu Krankheitsausbrüchen in Form einer Epidemie, wobei freigesetzte Legionellen-haltige Aerosole über weite Entfernungen von etwa 10 km übertragen werden können [11-13]. So auch in der Region Ulm und Neu-Ulm im Winter 2010, dem bisher größten Ausbruch in Deutschland [14, 15]. 65 Personen in dieser Region erkrankten an einer Infektion von *L. pneumophila*, 5 der erkrankten Personen verstarben [14]. Als Infektionsquelle wurde ein Kühlturm einer Klimaanlage im Zentrum von Ulm identifiziert, durch welchen die kontaminierten Aerosole freigesetzt wurden [16]. Die meisten Fälle treten jedoch als sporadische Einzelinfektionen auf [17, 18]. In Deutschland werden jährlich rund 500 Fälle der Legionärskrankheit gemeldet, wobei das private Umfeld den größten Anteil der Infektionsquellen darstellt [19].

Diese Beispiele verdeutlichen die Wichtigkeit einer regelmäßigen Überwachung der Legionellenkonzentration in wasserführenden Systemen. Im technischen Regelwerk für raumluftechnische Anlagen sind Richtwerte von < 10.000 koloniebildende Einheiten pro mL (Gesamtkeimzahl) und < 1000 *Legionella* spp. pro 100 mL bezüglich Umlaufwasser in

offenen Rückkühlwerken festgelegt, deren Einhaltung regelmäßig zu überprüfen ist [20]. 2011 wurde die Untersuchung bezüglich Legionellen in die Trinkwasserverordnung eingeführt. In der Neuerung der Trinkwasserverordnung wird ein technischer Maßnahmenwert von 100 *Legionella* spp. pro 100 mL Trinkwasser vorgeschrieben [21]. Die Einhaltung dieses Wertes muss regelmäßig überprüft werden. Jeder Betreiber einer Trinkwasserinstallation, der Wasser für die Öffentlichkeit zur Verfügung stellt, ist verpflichtet eine jährliche Untersuchung des Wassers bezüglich Legionellen durchzuführen, falls der Trinkwasserspeicher größer als 400 L ist. Wie das genannte Beispiel der Legionellen im Olympiadorf zeigt, können auf diese Weise erhöhte Legionellenkonzentrationen frühzeitig erkannt und so das Auftreten von Erkrankungen verhindert werden. Aufgrund der gesetzlich vorgeschriebenen, regelmäßigen Wasseruntersuchungen verschiedener wasserführender Systeme ergibt sich ein großer Bedarf an Methoden, um die zahlreichen Proben bezüglich der Legionellenkonzentration zu untersuchen. Aufgrund des Übertragungsweges ist aber auch die Analyse von freigesetzten Aerosolen von Interesse. Zum Nachweis von Legionellen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die derzeitige Standardmethode, Koloniezählbestimmung in Selektivmedien, ist zwar sensitiv, jedoch auch arbeits- und zeitintensiv. Wünschenswert wäre ein schnelles, sensitives und insbesondere Multianalyt-fähiges Verfahren. Hinsichtlich dieser Anforderungen stellt die Mikroarray-Technologie ein vielversprechendes Verfahren dar, da sie einen schnellen und parallelen Nachweis verschiedener Analyten mit geringem Zeitaufwand ermöglicht.

Das Ziel dieser Arbeit bestand in der Entwicklung eines Antikörper-Mikroarrays zum parallelen Nachweis der 15 Serogruppen von *L. pneumophila*. Serogruppe 1 wird als wichtigste Serogruppe von *L. pneumophila* beschrieben, welche mit 80 % für den Hauptanteil der Erkrankungsfälle in Nordamerika und Europa identifiziert wurde [3, 22]. Dieser Wert ist aber vermutlich deutlich zu hoch geschätzt [3]. Vor allem das am häufigsten eingesetzte Diagnoseverfahren, der Urin-Antigennachweis, erreicht nur für Serogruppe 1 eine ausreichende Sensitivität [23]. Somit besteht bei der Diagnose oft nicht die Möglichkeit weitere Serogruppen nachzuweisen [24]. Dies ist problematisch, da andere Serogruppen ebenfalls eine beträchtliche Anzahl an Fällen verursachen und es so zu einer Unterbestimmung kommt. In Dänemark und Kanada zeigten Studien unter Verwendung des Kulturnachweises, dass etwa 40 % der Erkrankungsfälle von Legionärskrankheit auf die anderen Serogruppen von *L. pneumophila* zurückzuführen sind [22, 25, 26]. Die am weitesten verbreiteten Serogruppen von *L. pneumophila* sind Serogruppe 1, 3 und 6 bezogen auf

Erkrankungen in Europa [25]. Für die Diagnostik sind deshalb schnelle Methoden zum Nachweis verschiedener Serogruppen von besonderem Interesse. Durch eine Serogruppen-spezifische Messung von Umweltproben könnten außerdem wichtige Informationen für epidemiologische Studien, besonders zur Rückverfolgung von Infektionsquellen, gewonnen werden. Ein Multiplex-Mikroarray könnte eine Möglichkeit hierfür darstellen.

Das Prinzip des eingesetzten Mikroarray-Nachweises basierte auf einem Sandwich-ELISA, der auf eine am Institut etablierte Mikroarray-Plattform mittels Durchfluss-Auslesesystem übertragen wurde [27, 28]. Antikörper gegen *L. pneumophila* dienten dabei als Fängermoleküle, die auf einer Polyethylenglykol-modifizierten Glasoberfläche immobilisiert wurden. Der Einsatz eines Biotin-markierten Detektionsantikörpers ermöglichte die Ausbildung eines Sandwich-Immunoassays an den Stellen, wo Bakterien auf dem Mikroarray gebunden worden sind. Die Signalerzeugung erfolgte unter Verwendung eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats. Die Photonen einer Peroxidase-katalysierten Chemilumineszenzreaktion von Luminol und H_2O_2 wurden mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet. Das sich ergebende Signal ist proportional zur Konzentration der gebundenen Bakterien.

Für das gegebene Nachweissystem sollte die Detektion von *L. pneumophila* in Wasser- und in Bioaerosolproben etabliert werden. Die erste Aufgabe diesbezüglich bestand in der Optimierung der Messbedingungen, um eine möglichst hohe Nachweisstärke des Assays für die Detektion von Bakterien zu erreichen. Für die Messungen wurde ein lebender, nicht-pathogener *E. coli*-Stamm als Modellorganismus verwendet. Im Anschluss daran wurde das optimierte Messprogramm für inaktivierte *L. pneumophila* getestet und charakterisiert.

Da für *L. pneumophila* Serogruppe 1 eine Vielzahl an Antikörpern kommerziell erhältlich war, sollte zunächst ein Assay für diese Serogruppe entwickelt und charakterisiert werden. Hierzu wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Antikörper getestet und die vielversprechendsten Antikörper für nachfolgende Messungen ausgewählt. Anhand der Messung von *L. pneumophila* Serogruppe 1 sollte der Mikroarray-Immunoassay für die Messung von Wasser- und Bioaerosolproben untersucht werden.

Für die Analyse von Wasser liegt die Nachweisgrenze immunologischer Verfahren, so auch des Mikroarray-Immunoassays, oberhalb geforderter Grenzwerte, weshalb diese mit vorgeschalteten Anreicherungstechniken kombiniert werden müssen. Im Rahmen eines DFG-geförderten Projekts wurde der Mikroarray-Nachweis in Kombination eines zweistufigen

Anreicherungsverfahrens untersucht. Nach einer Cross-Flow-Mikrofiltration folgte in der zweiten Stufe eine Anreicherung mit Hilfe makroporöser Epoxy-polymer-basierter monolithischer Affinitätsfiltration.

Für die Bioaerosol-Messungen sollte zunächst die generelle Anwendbarkeit der Mikroarrays untersucht werden. Anschließend sollte die Messung in Kombination verschiedener Bioaerosol-Sammelgeräte bewertet und schließlich für Realproben-Messungen eingesetzt werden, welche in Zusammenarbeit mit dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit durchgeführt wurden.

Die letzte Herausforderung bestand in der Erweiterung des Mikroarrays zum Nachweis der 14 weiteren Serogruppen von *L. pneumophila*. Hier galt es, geeignete Antikörper zu finden. Es sollten sowohl kommerziell erhältliche Antikörper als auch Antikörper von Dr. Lück, einem Kooperationspartner vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der TU Dresden, getestet werden. Zell-Mikroarrays, bei denen die 15 Serogruppen von *L. pneumophila* immobilisiert waren, stellten eine Möglichkeit dar, die Antikörper direkt bezüglich ihrer Affinität zu charakterisieren. Bei der anschließenden Anwendung im Mikroarray-Sandwich-Immunoassay sollten die relevanten Antikörper schließlich für die Messung der 15 Serogruppen anhand ihrer Selektivität und Sensitivität charakterisiert werden.

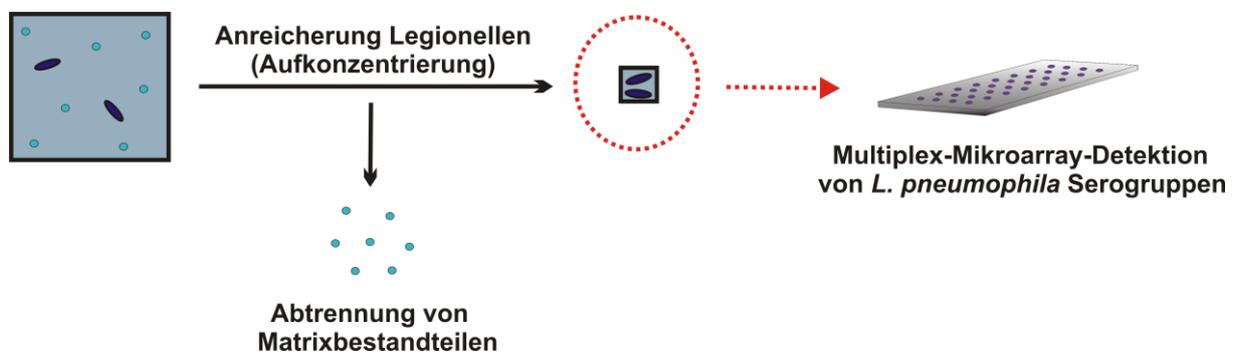


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Zielsetzung dieser Arbeit. Multiplex-Mikroarray-Messung der 15 Serogruppen von *L. pneumophila* nach vorhergehender Anreicherung der Bakterien.

Zusammengefasst bestand die endgültige Zielsetzung dieser Arbeit (Abbildung 1.1) in der Entwicklung und Charakterisierung eines Antikörper-Mikroarrays zum Nachweis der 15 Serogruppen von *L. pneumophila* in Kombination mit geeigneten Anreicherungstechniken zur Anwendung für Wasser- und Luftproben.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Legionellen - umwelt- und gesundheitsrelevante Aspekte

2.1.1 Vorkommen und Pathogenität

Bei Legionellen handelt es sich um Bakterien, die ubiquitär in natürlichen und künstlichen Wassersystemen weltweit vorkommen und ein breites Spektrum an Umweltbedingungen überleben [29]. Ihr primäres Reservoir ist Süßwasser; allerdings konnten Legionellen in vielfältigen Umweltproben nachgewiesen werden. Die Bakterien wurden unter anderem aus Wasser auf Pflanzen des Regenwaldes, Grundwasser oder Meerwasser isoliert [30-32]. Als natürlicher Bestandteil von Oberflächengewässern und Grundwasser kommen Legionellen in der Regel in geringen Konzentrationen vor und stellen keine hygienische Gefahr dar [19]. Gelangen sie allerdings in technische Wasserleitungssysteme, können sich die Bakterien dort unter bestimmten Bedingungen vermehren. Vor allem große Wassersysteme mit umfangreichen Rohrleitungen (Hotels, Krankenhäuser...) sind anfällig für Kontaminationen [19]. Ältere und schlecht gewartete Leitungssysteme bieten durch das Vorhandensein von Ablagerungen und Biofilmen eine optimale Lebensgrundlage für Legionellen. Eine stagnierende Wasserzirkulation kann ebenfalls eine Erhöhung der Keimzahlen bedingen. Bei Warmwasserspeichern ist die Erhitzung unterhalb 60 °C ein Risikofaktor. Ideale Vermehrungsbedingungen finden Legionellen bei Temperaturen zwischen 25 °C und 45 °C [19]. Oberhalb von 55 °C wird das Bakterienwachstum wirksam gehemmt, ab 60 °C kommt es zum Absterben der Keime [19]. In kaltem Wasser können Legionellen zwar vorkommen, eine Vermehrung ist jedoch für Temperaturen unterhalb von 20 °C nicht bekannt. Legionellen besitzen die Fähigkeit, sich in Amöben und anderen im Wasser lebenden Protozoen zu vermehren. Studien zeigen, dass Legionellen in Biofilmen vorkommen und bestehen können, für die Vermehrung der Bakterien ist jedoch das Vorhandensein entsprechender Protozoen im Biofilm notwendig [3]. Auch in Gewässern ist für Legionellen eine extrazelluläre Vermehrung nicht möglich und sie sind auf Protozoen als Wirtszellen angewiesen [33]. Das Wachstum von Legionellen konnte in Verbindung mehrerer Amöbenspezies und Protozoen sowie einer Schleimpilzspezies nachgewiesen werden [3, 34-36]. In Warmwassersystemen wurden zum Beispiel die Protozoen *Hartmannella* und *Saccamoeba* als Wirtszellen für Legionellen gefunden [37]. In Wasser von Wellnessanlagen wurden unter anderem *Hartmannella*, *Vexillifera*, *Naegleria*, *Platyamoeba* und *Acanthamoeba* als Wirtszellen

nachgewiesen [38]. In Leitungswasser wurde das intrazelluläre Wachstum in den Wimperntierchen *Tetrahymena pyriformis* und in Kühlturmwater in Zusammenhang mit Amöben sowie *Tetrahymena* gezeigt [39, 40]. Durch ihre parasitische Lebensweise in Einzellern bzw. in Biofilmen sind sie gut gegen ungünstige Umwelteinflüsse oder Desinfektionsmaßnahmen geschützt [19].

Die Aufnahme der Bakterien in die Wirtszelle erfolgt über konventionelle Phagozytose oder über eine spezielle Form der Phagozytose, der *coiling* Phagozytose [41, 42]. Etwa vier Stunden nach Invasion der Wirtszelle beginnt die Replikationsphase der intrazellulären Legionellen, in der sich die Legionellen mit einer Generationszeit von zwei Stunden vermehren. Sie füllen schließlich die gesamte Zelle aus und werden daraufhin beweglich [23]. Abschließend erfolgt die Lyse der Wirtszelle, was deren Zelltod bedeutet.

Die Infektion beim Menschen erfolgt durch Inhalation keimhaltiger Aerosole aus wasserführenden Systemen, die zum Beispiel beim Duschen [9], über Warmwassersysteme [43], Luftbefeuchter [44], Kompostieranlagen [45], Verdunstungskühler [46] oder Kühltürme [47, 48] ausgebracht werden können. Als potentielle Infektionsquellen in kleinem Maßstab wurden auch Nebelmaschinen in Supermärkten [49] oder Scheibenwischwasser in Fahrzeugen [50] identifiziert. Legionellen vermehren sich bei einer Infektion in Makrophagen der Lunge entsprechend dem oben beschriebenen Infektionszyklus und lysieren anschließend die Makrophagen. Eine direkte Infektionsübertragung von Mensch zu Mensch wurde bisher nicht beobachtet [19]. In Bezug auf den gesundheitsrelevanten Aspekt ist der Nachweis von Legionellen in wasserführenden Systemen, aber auch in Bioaerosolen von Bedeutung. Eine erhöhte Legionellenkonzentration in einem wasserführenden System zeigt die Gefahr an, dass diese Kontamination in Form von Aerosolen freigesetzt werden kann und damit eine Gesundheitsgefahr für den Menschen darstellt.

Die Familie der *Legionellaceae* umfasst die Gattung *Legionella* mit 51 Spezies und insgesamt 73 Serogruppen [19], was durch die Entdeckung neuer Spezies stetig erweitert wird. Die Spezies *Legionella pneumophila* ist als wichtigste Spezies bekannt, da sie etwa 90 % der berichteten Fälle einer Legionelleninfektion verursacht [3]. Diese Angabe ist vermutlich zu hoch abgeschätzt, da die meisten Diagnoseverfahren spezifisch für *L. pneumophila* Serogruppe 1 sind [3]. Die Spezies *L. pneumophila* kann in 15 Serogruppen unterteilt werden, wobei etwa 80 % der Erkrankungen als von Serogruppe 1 verursacht angegeben werden [3]. Ungefähr die Hälfte der *Legionella*-Spezies wurde mit Erkrankungen in Verbindung gebracht. Es ist allerdings wahrscheinlich, dass auch die übrigen Spezies unter bestimmten

Bedingungen Krankheiten beim Menschen auslösen können [34]. Infektionen durch diese Stämme werden weniger häufig berichtet, zum einen wegen ihrem seltenen Vorkommen und zum anderen wegen fehlenden Diagnosemöglichkeiten. Die am häufigsten vorkommende *Legionella*-Spezies neben *L. pneumophila* ist *L. micdadei* [4].

2.1.2 Morphologie und Eigenschaften

Bei Legionellen handelt es sich um eine einzigartige und lange Zeit unerkannte Bakterienart [51]. Ultrastrukturell weisen *Legionella* spp. Eigenschaften auf wie die von gramnegativen Bakterien mit einer typischen äußeren Membran, einer dünnen Peptidoglykanschicht im periplasmatischen Raum und einer Zytoplasmamembran [4]. Legionellen zeigen allerdings anhand taxonomischer Untersuchungen mit keiner anderen Gruppe von Bakterien eine enge Verwandtschaft [4]. Legionellen kommen als Stäbchenbakterien mit einer Breite von 0,5 - 0,7 µm und einer Länge von 2 - 20 µm vor und zeigen abgerundete Enden [4]. In Kultur wurden auch längere, fadenförmige Bakterien gefunden, in Gewebe- oder Umweltproben dagegen selten [51]. Abgesehen von vereinzelt Ribosomen, einzelnen Vakuolen und fadenförmigen Kernelementen wurden im Zytoplasma keine weiteren Einschlüsse oder Organellen wie bei gramnegativen Bakterien gefunden [52]. Es können polare, subpolare oder laterale Flagellen vorliegen. Die meisten *Legionella*-Spezies sind beweglich [4]. Die Produktion eines typischen Endotoxins ist nicht nachgewiesen, allerdings wurde die Produktion anderer Toxine und Substanzen mit toxinähnlicher Aktivität gezeigt [51].

Das Wachstum von Legionellen erfordert spezielle Medien, welche verschiedene Aminosäuren, L-Cystein bzw. L-Glutathion und eine Quelle von Eisenionen (z. B. Hämoglobin oder lösliches Eisenphosphat) enthalten. Optimales Wachstum erfolgt auf entsprechendem Medium unter aeroben Bedingungen bei 35 °C. Kolonien entwickeln sich innerhalb von 2 bis 5 Tagen [4].

Die Identifizierung und Klassifizierung erfolgt vorrangig mittels Antigen-Eigenschaften, chromatographischer Analyse des zellulären Fettsäuregehalts und DNA-Homologietests [4]. Das chromatographische Profil der zellulären verzweigten und unverzweigten Fettsäuren ist einzigartig und unterscheidet sich von dem anderer gramnegativer Bakterien durch das Vorhandensein von mehr als 80 % verzweigt-kettiger Fettsäuren [51].

2.1.3 Krankheitsbilder und Therapie

Als Folge einer Legionelleninfektion können beim Menschen zwei unterschiedliche Krankheitsbilder auftreten. Die sogenannte Legionärskrankheit, eine schwerwiegende Multisystemerkrankung einschließlich Lungenentzündung, und Pontiac-Fieber, eine selbstlimitierende, grippeähnliche Erkrankung.

Bei der Legionärskrankheit handelt es sich um eine schwere, lebensbedrohliche Lungenentzündung (Pneumonie) mit einer Inkubationsperiode von 2 bis 10 Tagen [4]. Erste Symptome sind Kopfschmerzen, Unwohlsein, Muskelschmerzen, oft begleitet von einem starken Temperaturanstieg innerhalb weniger Stunden [51]. Das vorherrschende klinische Krankheitsbild ist das einer akuten, eitrigen, fibrinösen, lobulären Lungenentzündung [5]. Anhand von Röntgenaufnahmen ist es nicht möglich Patienten mit Legionärskrankheit klinisch von Patienten mit anderen Typen von Lungenentzündung zu unterscheiden. Allerdings sind dort häufiger Infiltrationen in den Alveolen zu finden [3]. Daneben tritt bei der Legionärskrankheit ein breites Spektrum an weiteren Symptomen auf, welche sich bei den einzelnen Patienten unterscheiden. Die Erkrankten leiden meist an trockenem oder produktivem Husten. Häufige Symptome sind außerdem Schüttelfrost, Brustschmerzen, Bauchschmerzen, Erbrechen und Durchfall. Ein Teil der Patienten zeigt neurologische Befunde wie mentale Verwirrtheit, Fieberwahn und gelegentlich Ataxie. Bei vielen Patienten kommt es zu einer beeinträchtigten Nierenfunktion. In ernsteren Fällen verschlechtert sich der Gesundheitszustand der Patienten innerhalb der ersten 3 bis 6 Tage drastisch und die Krankheit endet mit einem Schock und/oder Lungenversagen, was zum Tod führt [4]. Die Sterblichkeit infizierter Personen liegt bei 10 - 15 %, ist allerdings deutlich höher bei Patienten mit einer ernsthaften Erkrankung oder Immunsuppression [4].

Charakteristisch für das weit weniger schwerwiegende Pontiac-Fieber ist eine kurze Inkubationszeit von 20 - 48 Stunden [4]. Es handelt sich um eine nichtpneumonische, fieberhafte Erkrankung, welche ohne therapeutische Maßnahmen zum Erliegen kommt. Pontiac-Fieber wird nicht mit dokumentierten Todesfällen in Verbindung gebracht. Als typische Symptome sind Fieber, Kopfschmerzen, Muskelschmerzen und trockener Husten zu nennen. Der klinische und radiographische Befund liefert keine Anzeichen einer Lungenentzündung [51].

Beide Krankheitssyndrome können in sporadischer Form oder als Epidemie auftreten [4]. Die Erkrankungsrate der Legionärskrankheit nach einer Exposition mit *L. pneumophila* ist relativ gering. Bei etwa 0,1 - 5 % der exponierten Personen treten klinische Symptome auf [53]. Ältere Menschen, Männer, Raucher und Patienten mit chronischen Lungenerkrankungen oder systemischer Immunsuppression sind stärker gefährdet [53]. Bei Krankheitsausbrüchen des Pontiac-Fiebers kam es dagegen bei über 90 % der exponierten Personen zur klinischen Erkrankung [4]. Es sind Krankheitsausbrüche beschrieben, bei denen ein Teil der Patienten an der Legionärskrankheit erkrankte und ein Teil an Pontiac-Fieber [54].

Mit der Einführung des Infektionsschutzgesetzes sind Legionelleninfektionen seit 2001 in Deutschland meldepflichtig. Die Anzahl gemeldeter Erkrankungen in Deutschland hat sich auf einen Wert von ca. 500 Fällen (Legionärskrankheit) pro Jahr stabilisiert [19]. Zur Diagnostik wird verschiedenstes Untersuchungsmaterial, wie Urin, Blut, Sputum oder Lungengewebe herangezogen, wobei antigene Komponenten von Legionellen oder im Körper gebildete Antikörper gegen die Bakterien nachgewiesen werden. Bei der angegebenen Anzahl an Erkrankungsfällen ist jedoch von einer erheblichen Untererfassung auszugehen, da nicht alle Fälle der Legionärskrankheit erkannt werden. Zur Diagnostizierung und Abgrenzung gegenüber anderen Pneumonien ist eine gezielte Laboruntersuchung erforderlich, welche zu selten durch den behandelnden Arzt veranlasst wird [19]. Nach Schätzungen des Netzwerkes für ambulant erworbene Legionellen (CAPNETZ) muss von jährlich rund 20.000 Erkrankungsfällen in Deutschland ausgegangen werden [55]. Bei den gemeldeten Erkrankungsfällen (Abbildung 2.1) ist das private Umfeld, wie Sportanlagen, Wohnung oder Schwimmbad als häufigste Infektionsquelle identifiziert, gefolgt von Hotels oder ähnlichen Reiseunterkünften. Am dritthäufigsten sind Erkrankungen aufgeführt, die mit einem stationären Aufenthalt in einem Krankenhaus oder einer Pflegeeinrichtung in Verbindung standen.

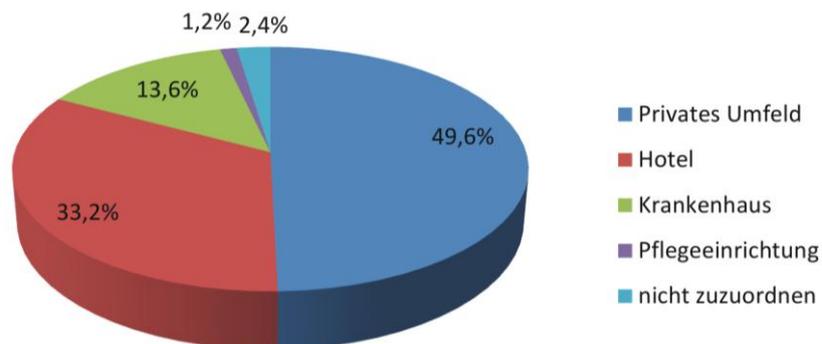


Abbildung 2.1: Übermittelte Fälle von Legionärskrankheit in Deutschland (2009) nach angegebenem Expositionsort [in Anlehnung an 19].

Wird eine Legionellen-Pneumonie nicht schnellstmöglich behandelt, steigt die Sterblichkeitswahrscheinlichkeit erheblich [56]. Zur Therapie dieser intrazellulären Erreger werden intrazellulär wirksame Antibiotika eingesetzt. Historisch gesehen ist Erythromycin das Mittel der Wahl, bei komplizierten Verläufen sollte zusätzlich Rifampicin verabreicht werden [5, 23]. Diese beiden Antibiotika bewirken jedoch nur eine reversible Hemmung der intrazellulären Legionellen, weshalb die Abwehrkräfte des Patienten eine wichtige Rolle bezüglich der erfolgreichen Behandlung spielen. Neuere Makrolidantibiotika, wie Roxithromycin oder Azithromycin, haben an Bedeutung gewonnen [23]. Diese Makrolide weisen eine verbesserte Pharmakokinetik auf, verursachen weniger Nebenwirkungen und bewirken eine irreversible Hemmung der Legionellen. Die Dauer der Therapie umfasst insgesamt 10 - 14 Tage [57], bei abwehrgeschwächten Patienten sollte die Therapie über einen Zeitraum von 21 Tagen angewendet werden [58].

2.2 Nachweis von Legionellen

Die Infektionsgefahr mit Legionellen geht von kontaminiertem Wasser technischer Systeme bzw. des in Form von keimhaltigen Aerosolen ausgebrachten Wassers aus. Deshalb ist der Nachweis von Legionellen in Wasser und Bioaerosol entscheidend. Zudem ist der Nachweis in klinischen Proben (z. B. Urin, Blut) zur Diagnostik von Legionelleninfektionen von Bedeutung. Für den Nachweis von Legionellen gibt es verschiedene Ansatzpunkte. Legionellen können durch ihr Wachstum in bestimmten Nährmedien identifiziert werden. Mit diesen Methoden werden ausschließlich lebende Zellen nachgewiesen. Anders ist dies beim Nachweis durch intra- bzw. extrazelluläre Antigene der Bakterien. Erfolgt die Detektion durch Zielstrukturen auf der Zelloberfläche (Membranproteine, Lipopolysaccharide), werden sowohl intakte Zellen als auch Bruchstücke der Zellen erfasst. Daneben können Legionellen außerdem durch Verfahren bestimmt werden, die auf der Erkennung von Molekülen im Inneren der Zellen basieren. Beispiele für diese Zielmoleküle aus dem Zellinneren sind Nukleinsäuren (DNA, RNA), Proteine oder ATP. Für diese Nachweisverfahren ist in der Regel die Durchführung einer Zellyse erforderlich.

2.2.1 Kulturverfahren

Zu den derzeit am häufigsten angewandten Methoden zur Identifizierung von Bakterien gehören die Kultivierung und Auszählung der Zellen. Die Auszählung der Bakterien erfolgt

mittels optischer Methoden und lässt einen Rückschluss auf die ursprünglich enthaltene Zellzahl zu. Die lebenden Keime werden bei kulturellen Verfahren über feste oder flüssige Nährmedien, Mangel- oder Spezialnährböden nachgewiesen, denen teilweise selektive Substanzen zugesetzt werden [59, 60]. Bei der Kultivierung können Informationen über charakteristische Stoffwechselleistungen der Bakterien erhalten werden, was deren Identifizierung und Differenzierung ermöglicht. Beispiele für Stoffwechselleistungen, die typischerweise untersucht werden, sind die Säure- und Gasbildung aus Lactose, die Fähigkeit, bei erhöhten Inkubationstemperaturen zu wachsen sowie die Indolbildung aus Tryptophan. Kulturverfahren sind generell zwar zuverlässig, selektiv und sensitiv, der entscheidende Nachteil besteht aber in dem hohen Zeitaufwand bis zum Vorliegen des Ergebnisses. Bis eine quantitative Aussage getroffen werden kann, können mehrere Tage oder Wochen vergehen [61].

Legionellen wachsen nicht bzw. reagieren nicht positiv bei einem Großteil taxonomischer Untersuchungen, welche typischerweise zur Klassifizierung von Bakterien herangezogen werden. Die Kultivierung von Legionellen kann nicht auf den gewöhnlich verwendeten Nährmedien erfolgen, sondern erfordert eine spezielle Zusammensetzung des Mediums. Neben zahlreichen Aminosäuren ist das Vorhandensein von L-Cystein und Eisenionen notwendig. Die derzeit standardmäßig durchgeführte Quantifizierung von Legionellen in Wasserproben erfolgt nach einer Empfehlung des Umweltbundesamtes [62]. Dabei erfolgt die Kultivierung der Probe sowohl im Direktansatz als auch nach Durchführung einer Membranfiltration von 100 mL über Cellulosenitrat-Membranfilter. Ein Spülschritt mit Säurepuffer führt zur Reduzierung von Begleitflora. Die Kultivierung erfolgt bei 36 ± 2 °C auf GVPC-Medium (*Buffered Charcoal Yeast Extract* Medium mit Selektivsupplementen). Die Bestandteile des GVPC-Mediums sind Hefeextrakt, Agar, Aktivkohle, Puffer, α -Ketoglutarat, L-Cystein, Eisen(III)-pyrophosphat, Glycin und Antibiotika zur Verminderung von Begleitflora. Die Inkubationszeit beträgt sieben bis zehn Tage. Verdächtige Kolonien werden anschließend auf einem Cystein-freien Medium einer Subkultivierung unterzogen. Kolonien, die auf GVPC-Medium wachsen, auf Cystein-freiem Medium jedoch kein Wachstum zeigen, werden als Legionellen betrachtet [62]. Mit diesem Verfahren kann theoretisch 1 koloniebildende Einheit pro 100 mL nachgewiesen werden.

Zur Diagnostik einer Legionelleninfektion ist der kulturelle Nachweis eine Standardmethode. Der kulturelle Nachweis wird für Sputum, Lungengewebe und Blut durchgeführt [63-65].

Dieser erfordert allerdings sehr spezielle Kulturbedingungen und gelingt nur in 20 - 70 % der Legionellosefälle [66, 67], die Anzuchttrate von Nicht-*pneumophila*-Spezies liegt noch niedriger [23]. Bis zum Vorliegen des Ergebnisses vergehen außerdem mehrere Tage, weshalb das Verfahren seit einigen Jahren eine untergeordnete Stellung in der Diagnostik einnimmt. Der Kulturnachweis erlaubt jedoch eine umfassende Identifizierung der Legionellenspezies [19]. In nachfolgenden epidemiologischen Untersuchungen können Bakterienstämme von Patienten und aus der Umwelt verglichen werden, um Infektionsquellen nachzuweisen bzw. auszuschließen [19, 23].

Zur Identifizierung von *Legionella*-Spezies und Serogruppen nach vorangegangener Kultivierung werden verschiedene immunologische Schnelltests eingesetzt. Ein Beispiel ist der Latex-Agglutinationstest zur Untersuchung klinischer Proben und Umweltproben [68-70]. Das Prinzip dieses Tests beruht auf der Agglutination von Antikörper-gekoppelten, blauen Latexpartikeln mit Zellwand-Antigenen der Legionellen. Die Agglutination ist optisch erkennbar. Je nach Anbieter ist der Nachweis unterschiedlicher Spezies und Serogruppen möglich. Der Nachweis der Bakterien mit diesem Testverfahren liefert allerdings keine quantitativen Informationen, sondern dient nur zur Identifizierung. Für den positiven Nachweis sind hohe Bakterienkonzentrationen notwendig, weshalb der Test immer mit einer vorhergehenden Kultivierung der Bakterien kombiniert werden muss.

Auch ein kommerziell erhältlicher immunchromatographischer Schnelltest ist beschrieben [68]. Das Prinzip beruht auf der Erkennung der Bakterien mittels selektiver, Gold-markierter Antikörper, welche auf einem Teststreifen immobilisiert sind. Die Bildung der Antigen-Antikörper-Komplexe ist anhand einer Färbung des Teststreifens optisch zu erkennen. Antikörper gegen *Legionella* spp. bzw. *L. pneumophila* befinden sich auf verschiedenen Bereichen des Teststreifens. Auch mit diesem Schnelltest ist nur ein qualitativer Nachweis von Legionellen möglich.

2.2.2 Kulturunabhängige Verfahren

2.2.2.1 Prinzipielle Detektionsmethoden

2.2.2.1.1 Fluoreszenz

Fluoreszenz stellt eine Detektionsmöglichkeit dar. Es handelt sich dabei um das kurzzeitige, spontane Aussenden von Licht beim Übergang eines elektronisch angeregten Systems in einen Zustand niedrigerer Energie. Das Auslesen erfolgt häufig über einen Fluoreszenzmarkierten Analyten. Zur Anregung werden derzeit Laser für hoch sensitive Fluoreszenz-Auslesesysteme eingesetzt [71]. Neue Diodenlaser mit Anregungswellenlängen vom UV- bis hin zum sichtbaren Bereich ermöglichen die Anwendung neuer Fluorophore, wie *quantum dots* oder anderen Fluoreszenz-Nanopartikeln [72]. Eine weitere Fluoreszenz-basierte Auslesetechnik basiert auf Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) in Kombination mit Fluoreszenz [73, 74]. Oberflächenplasmonen können in Edelmetallen mit Hilfe eines Laserstrahls angeregt werden. Diese Anregung wird auf oberflächengebundene Fluorophore übertragen. Fluoreszenztechniken, wie die Interne Totalreflexions-Fluoreszenz (TIRF) stellen neue Alternativen dar. Die Fluoreszenzanregung wird bei TIRF durch ein evaneszentes elektromagnetisches Feld erreicht, wobei zur Erzeugung des evaneszenten Feldes Licht an der Grenzfläche des Probensträgers zur Probe totalreflektiert wird. Ausgehend vom Probensträger fällt die Intensität des Feldes mit steigender Entfernung exponentiell ab. Das Eindringen in die Probe ist auf einige hundert Nanometer beschränkt, was ausgenutzt werden kann, um ausschließlich Fluorophore auf der Oberfläche anzuregen.

2.2.2.1.2 Chemilumineszenz

Eine weitere Detektionsmethode stellt die Chemilumineszenz dar, welche im Rahmen dieser Arbeit eingesetzt wurde. Als Chemilumineszenz (CL) wird das Aussenden elektromagnetischer Strahlung infolge einer chemischen Reaktion bezeichnet. Die auf Chemilumineszenz basierende Detektion hat breite Anwendung in verschiedenen Bereichen der Analytik gefunden [75-77]. Affinitätsreaktionen können mit Hilfe einer CL-Markierung, die nahe dem Analytmolekül lokalisiert ist, detektiert werden. Die Lichtemission findet dabei in direkter Umgebung des Reaktionskatalysators nach Inkubation mit den CL-Reagenzien statt [73]. Da keine externe Lichtquelle benötigt wird, ist der optische Aufbau relativ einfach,

und es muss nicht mit Instabilität der externen Lichtquelle gerechnet werden. Es tritt außerdem kein störendes Streulicht auf, wodurch das Hintergrundsignal gering gehalten wird. Die Messung des emittierten Lichts erfolgt mit CCD-Kameras, die geringe Lichtintensitäten aufnehmen können und somit eine hohe Sensitivität ermöglichen. Die Oxidation von Luminol ist eines der bekanntesten Beispiele einer Chemilumineszenzreaktion. Als Oxidationsmittel werden unter anderem Permanganat, Hypochlorit und Wasserstoffperoxid eingesetzt; katalysiert wird die Reaktion zum Beispiel von Metallionen, Eisencyanid, Metallkomplexen oder Enzymen [78]. Die Chemilumineszenzreaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid ist in Abbildung 2.2 schematisch dargestellt.

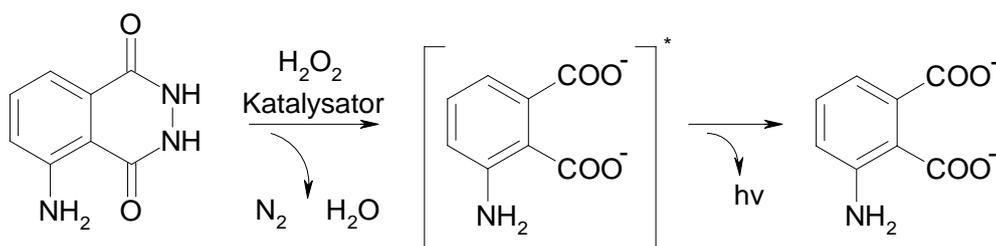


Abbildung 2.2: Chemilumineszenzreaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid [gemäß 79].

Das Emissionsspektrum für die Reaktion von Luminol weist ein Maximum bei 425 nm auf, die Quantenausbeute für diese Reaktion ist mit 1 % gering [79]. Die wesentlichen Schritte, die zur Photonenemission führen, sind in Abbildung 2.2 gezeigt. Luminol (5-Amino-2,3-dihydrophthalazin-1,4-dion) wird oxidiert, was zur Bildung eines angeregten Aminophthalat-Ions führt, das bei dem Übergang in den Grundzustand Licht aussendet.

Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Detektion mit Hilfe der Chemilumineszenzreaktion von Luminol und Wasserstoffperoxid. Katalysiert wurde die Reaktion durch das Enzym Meerrettichperoxidase.

2.2.2.1.3 Elektrochemische Detektion

Bei elektrochemischen Detektionsmethoden wird ein elektrochemisches Signal gemessen, welches elektronisch weiterverarbeitet werden kann. Elektrochemische Verfahren sind zum Beispiel nach dem Prinzip der Coulometrie, Amperometrie und Impedimetrie beschrieben [80-82]. Bei der Amperometrie erfolgt die Messung eines Elektrolysestromes an einer Arbeitselektrode, welcher der Konzentration eines gezielt umgesetzten, elektroaktiven Stoffes proportional ist. Während der Messung liegt ein zeitlich konstantes elektrochemisches Potential an. Bei der impedimetrischen Detektion wird der Widerstand für die Umwandlung eines Redoxsystems an einer Elektrode bestimmt. Die Coulometrie bestimmt elektrische

Ladungen zwischen zwei Elektroden, welche durch Oxidation bzw. Reduktion chemischer Verbindungen erzeugt werden.

2.2.2.1.4 Markierungsfreie Detektion

Auch das markierungsfreie Auslesen findet zunehmend mehr Interesse. Die Detektion kann mittels Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) [83], oberflächenverstärkter Raman-Streuung (SERS), Interferometrie [84, 85], Reflektometrie [86] oder Ellipsometrie [87] erfolgen, wobei Änderungen von sensitiven Schichten (z. B. Brechungsindex, Schichtdicke) beobachtet werden. SPR stellt die häufigste Methode dar. Bei der SPR erfolgt der Nachweis von Analyten an Metall/Luft- oder Metall/Flüssigkeitsgrenzflächen durch Änderung des Brechungsindex von sensitiven Schichten (z. B. Antikörper) nahe der Metalloberfläche. Durch Totalreflexion von parallel polarisiertem Licht an der Metallschicht werden die Oberflächenplasmonen an der Grenzfläche angeregt und wellenlängenabhängig detektiert. In Abhängigkeit des Brechungsindex ändert sich die Resonanzwellenlänge der Plasmonen. Mit Hilfe von SERS kann ein Raman-Signal deutlich verstärkt werden, indem sich die Analytmoleküle nahe einer metallischen Oberfläche (Silber, Gold) befinden.

Das markierungsfreie Auslesen kann neben der Detektion in Echtzeit außerdem kinetische Informationen über Affinitätskonstanten liefern [73]. Außerdem bedarf es nicht der Einführung einer Markierung, was Kosten spart und die Bioaktivität von Proteinen unverändert erhält. Eine Schwierigkeit besteht jedoch darin, die biologischen Schichten frei von Verschmutzungen zu halten [73].

2.2.2.2 Analyseplattformen

2.2.2.2.1 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um ein optisches Messverfahren von Zellen und mikroskopischen Partikeln, die mit fluoreszierenden Reagenzien angefärbt sind. Eine Suspension der zu analysierenden Zellen wird mit DNA-interkalierenden oder Antikörpergekoppelten Fluoreszenzfarbstoffen markiert und anschließend der Messung zugeführt. Die Probensuspension wird unter laminaren Flussbedingungen in den sogenannten Hüllstrom, eine Elektrolytlösung, geleitet und auf diese Weise stark verdünnt. Die unterschiedlichen

Volumenströme des Proben- und Hüllstromes führen zur Verjüngung des Probenstromes und damit zu einer Vereinzelung der Zellen. Die Probe kann nun in einer Sequenz von einzelnen Zellen durch die Flusszelle geleitet werden. Hierbei handelt es sich in der Regel um eine hochpräzise Durchflussküvette aus Quarzglas mit einem sehr feinen Kanal, welcher die Stabilität des strömungstechnischen Systems gewährleistet und so die präzise Analyse einzelner Zellen erlaubt. Die einzelnen Zellen der Probe treten im Mikrokanal der Küvette nacheinander durch den Messbereich, in welchem die Anregung der Fluorophore mit Hilfe von Lasern und die Messung der Emission oder Streuung über Photomultiplier erfolgen. Die Flusszelle des während dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometers weist eine spezielle Geometrie auf. Es handelt sich um eine trianguläre Einheit, welche das Auftreten starker hydrodynamischer Kräfte bedingt und zur Fokussierung des Probenstroms im Zentrum der Einheit führt (Abbildung 2.3).

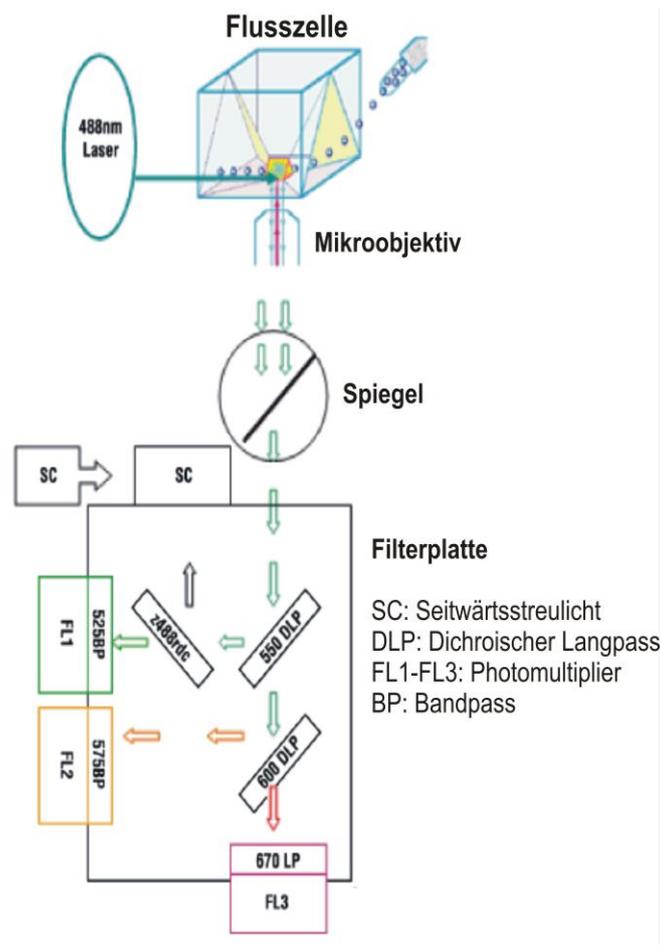


Abbildung 2.3: Flusszelle mit vereinzelt Zellen, Strahlengang und optischer Aufbau des in dieser Arbeit verwendeten Durchflusszytometers Cell Lab Quanta SC (Beckman Coulter) [88].

Durch die Vereinzelung der Zellen passiert nur eine Zelle pro Zeiteinheit den Laser mit einer optimalen Geschwindigkeit von etwa 400 Ereignissen/s. Über einen Spiegel und Filter wird das emittierte Fluoreszenzlicht zum Photomultiplier gelenkt und aufgezeichnet (Abbildung 2.3). Zur Detektion stehen bei dem verwendeten Gerät drei Photomultiplier zur Verfügung, welche nur jeweils einen bestimmten Wellenlängenbereich detektieren können (FL 1: 525 nm, FL 2: 575 nm und FL 3: > 670 nm). Die Photomultiplier erzeugen Spannungsimpulse, die proportional zur Fluoreszenzintensität sind. Um festzulegen, wann das System einen Datensatz der Messsignale anlegt, wird ein Trigger-Parameter (z. B. definierte Fluoreszenzintensität) festgelegt. Nur bei Erreichen des festgelegten Schwellenwertes werden die Daten für dieses Ereignis aufgezeichnet.

Neben der Quantifizierung können mit Hilfe der Durchflusszytometrie auch Informationen bezüglich molekularer Eigenschaften erhalten werden. Bei Durchtritt durch den Messbereich können die Lichtstreuung der Zellen in einem engen Winkel zum Anregungslicht als Vorwärtsstreulicht und die Lichtstreuung in einem Winkel von 90° als Seitwärtsstreulicht aufgezeichnet werden. Über das Vorwärtsstreulicht kann die Größe der Zellen abgeschätzt werden. Das Seitwärtsstreulicht hängt von der komplexen Mehrfachstreuung durch intrazelluläre Kompartimente ab und ist somit ein Maß für die Granularität der Zellen. Eine präzisere Untersuchung der Zellgröße ist durch die Aufnahme des Coulter-Volumens möglich. Das Coulter-Prinzip stellt in der Durchflusszytometrie eine Möglichkeit dar, Zellen bezüglich ihrer Größe zu charakterisieren. Das Messprinzip basiert auf einer Änderung des elektrischen Widerstandes beim Durchtritt der in einem Elektrolyten enthaltenen Zellen durch den Messkanal. Der dem Teilchenvolumen proportionale elektrische Impuls kann zur Quantifizierung der Zellen herangezogen werden.

Die graphische Darstellung der Messdaten kann als Häufigkeitsverteilung (Histogramm) oder als Punktwolkendarstellung (*Dot plot*) erfolgen. Im Histogramm wird die Häufigkeit der Ereignisse im jeweiligen Messbereich gegen den Messwert (Fluoreszenzintensität) aufgetragen. Mit Hilfe der zweidimensionalen Punktwolkendarstellung wird die Intensität zweier Messparameter für ein Ereignis auf den beiden Achsen des Diagramms aufgetragen. Die Datenpunkte für Zellen desselben Typs erscheinen damit in derselben Region des Diagramms. Ereignisse, die in einer Diagrammregion auftreten und eine Punktwolke bilden, können damit einem Zelltyp zugeordnet werden.

Zur Anfärbung der Zielmoleküle ist eine Vielzahl an Fluoreszenzfarbstoffen [89] bzw. Fluoreszenz-markierten Antikörpern [90, 91] erhältlich. Im Rahmen dieser Arbeit wurde der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff SYTO 9 eingesetzt. Dieser Farbstoff besitzt die Fähigkeit Zellmembranen zu durchdringen. Die DNA von Zellen kann so für die Fluoreszenzdetektion markiert werden. Das Absorptionsmaximum des DNA-gebundenen SYTO 9 liegt bei 480 nm, das Emissionsmaximum liegt bei 500 nm. SYTO 9-positive Zellen können im Bereich des FL 1 aufgezeichnet werden. Angefärbte Zellen weisen eine deutlich höhere Fluoreszenzintensität auf als unspezifisch gefärbte Partikel, da die Quantenausbeute des Farbstoffs durch die DNA-Interkalation ansteigt [92]. Durch gleichzeitige Verwendung des Farbstoffes Propidiumiodid ist eine Vitalitätsuntersuchung der gemessenen Zellen möglich [93]. Bei Propidiumiodid handelt es sich ebenfalls um einen Farbstoff, der Nukleinsäuren anfärbt. Dieser kann im Gegensatz zu SYTO 9 nur in Zellen eindringen, deren Zellmembran beschädigt ist [94]. Aufgrund einer höheren Affinität zu Nukleinsäuren wird SYTO 9 von Propidiumiodid verdrängt. So kann mit SYTO 9 die absolute Zellzahl und über Gegenfärben mit Propidiumiodid die Anzahl intakter (lebender) Zellen ermittelt werden.

Die Anwendung der Durchflusszytometrie zum Nachweis von Legionellen wurde bereits mehrfach beschrieben. Sowohl Fluoreszenz-markierte Antikörper als auch SYTO 9 konnten erfolgreich zum Nachweis von *Legionella* spp. eingesetzt werden [95-97]. Der Nachweis war in verschiedenen Umweltproben, wie Leitungswasser [98] oder Kühlturmwasser [97] möglich. Weiterhin wurde eine Methode beschrieben, bei der ein Immunfluoreszenz-Assay mit Festphasen-Zytometrie kombiniert wurde [98]. Die Wasserproben wurden filtriert und die Zellen auf dem Filter mittels Immunfluoreszenz-Assay angefärbt. Der Filter wurde anschließend in das Zytometer überführt und dort mittels Fluoreszenzscanner angeregt und ausgelesen. Sowohl Serogruppe 1 von *L. pneumophila* als auch 12 weitere Serogruppen konnten mit Nachweisgrenzen von 10 - 100 Zellen pro Liter nachgewiesen werden. Ein weiteres sensitives Verfahren zum Nachweis von *L. pneumophila* Serogruppe 1 wurde durch eine Kombination einer zweistufigen Anreicherung (Filtration und immunomagnetische Separation) und anschließender Zytometer-Detektion realisiert [99]. Die Nachweisgrenze des kompletten Verfahrens lag bei etwa 500 Zellen pro Liter.

2.2.2.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Das grundlegende Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR) ist die Hybridisierung komplementärer Nukleinsäuresequenzen. Durch die Polymerasekettenreaktion kann ein in Länge und Sequenz definierter Nukleinsäureabschnitt aus einem Nukleinsäuregemisch vervielfältigt werden, was auch zur Erhöhung der Sensitivität des Detektionsverfahrens genutzt werden kann. Der Primer, ein Oligonukleotid, flankiert die zu amplifizierende DNA-Region und dient dem DNA-replizierenden Enzym (DNA-Polymerase) als Startpunkt. Die zu amplifizierende DNA liegt dabei als Einzelstrang vor, was durch Erhitzen erreicht wird. Die DNA-Polymerase katalysiert die Anlagerung von neuen, komplementären DNA-Sequenzen. Die Vervielfältigung der Zielsequenz geschieht durch die zyklische Wiederholung von Denaturierung doppelsträngiger zu einzelsträngiger DNA und der Anlagerung komplementärer Sequenzen. Es wurden mehrere Varianten der Standard-PCR entwickelt, darunter die Multiplex- und *real-time*-PCR. Die Multiplex-PCR ermöglicht die parallele Detektion mehrerer Organismen, indem mehrere Primer zur gezielten Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte eingesetzt werden. Bei der *real-time*-PCR kann die Vervielfältigung des gesuchten Nukleinsäureabschnitts mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen in Echtzeit verfolgt werden.

Mit PCR-basierten Methoden können niedrige Nachweisgrenzen für den Nachweis von Bakterien erzielt werden, die Probenvorbereitung und DNA-Extraktion sind allerdings sehr aufwändig.

Sowohl die Standard-PCR als auch deren Varianten (*real-time*-PCR, Multiplex-PCR) sind vielfach zur Detektion von Legionellen in Wasser- und Bioaerosolproben beschrieben.

Für die Detektion von Legionellen mittels PCR wurde die Norm AFNOR NF T90-471 [100] zur Standardisierung und Normierung eingeführt. Diese Norm beschreibt die Anforderungen von PCR-Kits für den Nachweis von *Legionella* spp. und *Legionella pneumophila* in Bezug auf Zusammensetzung, Durchführung und Bewertung.

Einige der üblicherweise verwendeten Gene für den Nachweis von Legionellen sind *rpoB*, 16S rRNA, 23S rRNA, *dotA* und *mip* [9, 101-104].

Untersuchungen auf Grundlage der 16S-ribosomalen RNA (rRNA) haben an Bedeutung gewonnen und sind für den Nachweis von Legionellen beschrieben [105, 106]. Die 16S rRNA ist in allen Bakterienzellen enthalten und erfüllt in allen Organismen die gleiche Funktion. Zusammen mit ribosomalen Proteinen ist sie am Aufbau und der enzymatischen Aktivität von

Ribosomen beteiligt. Die hohe Anzahl an Ribosomen in einer Zelle lässt eine hohe Sensitivität von RNA-basierten Assays erwarten. In einer Zelle sind mehrere Tausend Kopien der 16S rRNA vorhanden [107]. Da diese neben hochkonservierten auch variable Bereiche aufweist, ist die Unterscheidung unterschiedlicher Bakterienstämme bzw. Spezies möglich.

Für den Nachweis von *L. pneumophila* und 24 weiteren *Legionella*-Spezies wurde eine Multiplex-*real-time*-PCR entwickelt [108]. Um selektiv *Legionella* spp. nachzuweisen, wurde eine Sequenz des 16S rRNA-Gens charakteristisch für *Legionella*-Spezies eingesetzt. Zum gezielten Nachweis von *L. pneumophila* wurde eine Sequenz des *mip* (*macrophage infectivity potentiator*)-Gens verwendet, welches spezifisch für *L. pneumophila* ist [106]. Durch Verwendung unterschiedlicher Fluoreszenzmarkierungen (6-Carboxyfluorescein bzw. Hexachlorfluorescein) konnten die beiden Gensonden voneinander unterschieden werden.

Unter Verwendung des *dotA*-Gens wurde die *real-time*-PCR zum quantitativen Nachweis von *L. pneumophila* angewendet [109]. Das *dotA* (*defective organelle trafficking*)-Gen steht in Zusammenhang mit der Virulenz von *L. pneumophila*. *DotA* und *mip* haben Anteil an dem Mechanismus, der die Invasion von Einzellern und die intrazelluläre Vermehrung bedingt [110]. Um störende Matrixbestandteile zu entfernen, wurde die PCR mit einer immunomagnetischen Aufreinigung der Wasserproben kombiniert.

Eine PCR-basierte Methode zur Quantifizierung lebender *L. pneumophila* stellt die *viability*-PCR dar. Hier wurde die Anfärbung von Nukleinsäuren mit dem Farbstoff Ethidiummonoazidbromid mit der quantitativen *real-time*-PCR kombiniert [111]. Ethidiummonoazidbromid kann nur in Bakterien mit beschädigter Zellmembran eindringen und kovalent an die DNA binden. Ethidiummonoazidbromid-gebundene DNA wird nicht amplifiziert. In intakte Zellen kann der Farbstoff dagegen nicht eindringen. Die DNA von intakten Bakterien kann somit amplifiziert und quantifiziert werden.

Auch die Diagnostik von Legionellen wird die Anwendung der PCR in Zukunft bereichern können [23]. Der Legionellen-Nachweis mittels PCR ist für verschiedenstes Probenmaterial, wie Sputum, Lungengewebe und Urin, möglich [112-116]. Das Ergebnis wird innerhalb weniger Stunden erhalten und es ist ein Spezies-spezifischer oder Gattungsspezifischer Legionellen-Nachweis möglich. Die Sensitivität bezüglich klinischer Proben ist vergleichbar mit dem Kulturnachweis, in vielen Fällen sogar besser [66, 108, 117, 118].

2.2.2.2.3 ELISA

Der enzymgekoppelte Immunoassay (ELISA) basiert auf der selektiven Antigen-Antikörper-Wechselwirkung. Antigene oder Antikörper sind auf einer Festphase (Mikrotiterplatte) immobilisiert und dienen als Fänger-moleküle bezüglich der Analyten in der Probe. Das Auslesen erfolgt über eine enzymkatalysierte Farb- oder Chemilumineszenzreaktion. Als Antigene können zum Nachweis von Bakterien Strukturen der Zelloberfläche, aber auch Moleküle aus dem Zellinneren dienen.

Die zum Nachweis von Mikroorganismen am häufigsten eingesetzte Methode ist das Sandwich-Assay-Format. Bei diesem ELISA sind Antikörper als Fänger-moleküle immobilisiert. Neben den immobilisierten Fängerantikörpern, kommen markierte Detektionsantikörper zur Signalerzeugung zum Einsatz. Da die Antigene beim Sandwich-ELISA mindestens zwei Epitope aufweisen müssen, können nur Moleküle mit einer gewissen Mindestgröße nachgewiesen werden. Es handelt sich bei einem Sandwich-ELISA um einen nichtkompetitiven Assay. Das nichtkompetitive ELISA-Format zeichnet sich durch einen Überschuss an Antikörperbindungsstellen gegenüber den Analytmolekülen aus. Die im Überschuss zugegebenen, an das Antigen gebundenen Antikörper dienen als Messgröße. In Abbildung 2.4 ist das Prinzip des Sandwich-ELISAs schematisch dargestellt.

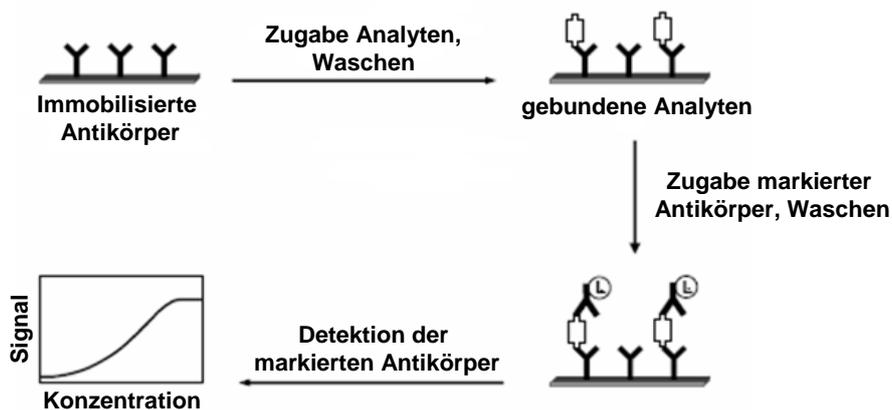


Abbildung 2.4: Prinzip des Sandwich-ELISAs [in Anlehnung an 119].

In einem ersten Schritt werden die Analyten mit den immobilisierten Antikörpern inkubiert, und es erfolgt die selektive Antigen-Antikörper-Wechselwirkung. Nach einem Waschschrift erfolgt die Zugabe des zweiten Antikörpers, welcher an ein weiteres Epitop des Analyten bindet. Die Chemilumineszenz- oder Farbdetektion erfolgt über den Substratumsatz eines

Antikörper-gekoppelten Enzyms. Hierbei besteht zum einen die Möglichkeit, dass der zweite Analyt-spezifische Antikörper direkt mit dem Enzym markiert ist (markierter Primärantikörper). Die andere Möglichkeit ist der Einsatz eines Enzym-markierten Sekundärantikörpers. Dieser ist gegen eine bestimmte Tierart gerichtet und bindet an den Analyt-spezifischen, unmarkierten Primärantikörper. Wurde dieser zum Beispiel aus Maus gewonnen, wird als Sekundärantikörper ein anti-Maus-Antikörper eingesetzt. Der Vorteil beim Einsatz eines Sekundärantikörpers ist, dass für den Nachweis unterschiedlicher Analyten derselbe markierte Sekundärantikörper verwendet werden kann, sofern die Analyt-spezifischen Antikörper aus dem gleichen Tier stammen. Weiterhin kann bei der direkten Markierung des Analyt-spezifischen Antikörpers die Antigenbindungsaktivität reduziert werden. Stammen jedoch die immobilisierten und zugegebenen Antikörper vom gleichen Tier, können beim Einsatz eines Sekundärantikörpers Probleme auftreten, da dieser ebenfalls an die immobilisierten Antikörper bindet. Zur Markierung der Antikörper häufig verwendete Enzyme sind Meerrettichperoxidase, alkalische Phosphatase und β -Galaktosidase.

Nachweisgrenzen von Sandwich-ELISAs liegen im Bereich von 10^3 - 10^5 Zellen/mL, was zum Nachweis geringerer Bakterienkonzentrationen die Kombination mit Anreicherungstechniken erforderlich macht.

Die ELISA-Detektion hat vor allem im Bereich der Legionellendiagnostik vielfach Anwendung gefunden [120-124]. Der direkte Antigennachweis im Urin wird aufgrund der einfachen Materialgewinnung zunehmend häufiger eingesetzt. Dieses Verfahren ermöglicht außerdem eine frühzeitige Diagnose, welche bereits 1 bis 3 Tage nach Auftreten klinischer Symptome positive Befunde liefern kann [23]. Bei diesem Verfahren werden Antikörper eingesetzt, die das Lipopolysaccharid (LPS) erkennen, welches eine bei Legionellen einzigartige Struktur aufweist. Das LPS wird in infizierten Zellen in großen Mengen von Legionellen gebildet und hauptsächlich mit dem Urin ausgeschieden. Mit kommerziellen Testkits ist in der Regel nur der Nachweis von *L. pneumophila* Serogruppe 1 mit ausreichender Sensitivität möglich. Für andere Serogruppen oder Legionellen-Spezies ist der Nachweis wenig sensitiv und daher nicht geeignet [19]. Die Nachweisstärke kann durch eine Konzentrierung der Urinprobe gesteigert werden [122], was jedoch für die Routine zu aufwändig ist und nur bei begründetem Verdacht durchgeführt wird [23].

Die Sensitivität des ELISA-Nachweises wird entscheidend durch die Qualität der eingesetzten Antikörper beeinflusst. An der Entwicklung geeigneter Antikörper gegen Legionellen wird

deshalb fortlaufend gearbeitet. Kommerziell wird nur eine begrenzte Auswahl an Antikörpern angeboten, die nicht alle Spezies bzw. Serogruppen umfasst. Nur wenige Labore verfügen deshalb über Antikörper, die alle Spezies erkennen [3]. Antiseren, die alle Spezies und Serogruppen erkennen, wurden entwickelt und in einem Agglutinationstest eingesetzt [3, 125]. Diese Antiseren sind allerdings nicht kommerziell erhältlich. Monoklonale Antikörper wurden gegen das *Legionella*-Hitzeschockprotein und das Mip-Protein hergestellt [126, 127]. Zur Erkennung aller Serogruppen von *L. pneumophila* wurden monoklonale Antikörper hergestellt [128], die allerdings ebenfalls nicht kommerziell erhältlich sind. Auch ein Antikörper gegen *Legionella*-Flagellen wurde entwickelt [129]. Derzeit gibt es aber kein Antiserum bzw. Antikörper zur Detektion aller Legionellen, die routinemäßig eingesetzt und bereitgestellt werden.

2.2.2.2.4 Biosensor

Die Anwendung der Biosensor-Technologie ist beim Nachweis von Mikroorganismen ebenfalls gebräuchlich. Bei Biosensoren wird ein biologisch aktives Erkennungselement (Enzym, Antikörper, Nukleinsäure) räumlich direkt an einen Signalwandler und einen elektronischen Verstärker gekoppelt [130]. Die Wechselwirkung der immobilisierten biologischen Komponente mit dem Analyten erzeugt eine physikochemische Veränderung, wie zum Beispiel der Lichtabsorption. Diese Veränderung kann in Abhängigkeit der vorhandenen Analytkonzentration von dem Signalwandler erfasst werden. Die Einteilung unterschiedlicher Biosensoren kann anhand der Art der Signalvermittlung (optisch, elektrochemisch) und bezüglich der direkten bzw. indirekten Detektion von Analyten erfolgen [131]. Bei der direkten Detektion wird die biospezifische Reaktion direkt über Veränderungen bestimmt, welche durch die Komplexbildung von Analyt und biologischer Komponente hervorgerufen werden. Bei der indirekten Biosensor-Detektion werden die Reaktionsprodukte der vorausgehenden biochemischen Reaktion gemessen.

Für die parallele Detektion von Legionellen und *E. coli* wurde ein Oberflächenwellensensor beschrieben [132]. Dabei wurden die Bakterien auf die Oberfläche aufgebracht, bevor anschließend ein selektiver Antikörper zugegeben wurde. Die Bindung des Antikörpers an die Zellen bewirkte eine Änderung der Oberfläche und damit eine Änderung der Resonanzfrequenz, welche aufgezeichnet wurde.

2.2.2.2.5 Mikroarray

Bei Mikroarrays handelt es sich dem Begriff entsprechend (*micro*: klein, *array*: Anordnung) um planare Träger, auf denen molekulare Erkennungseinheiten als Fängermoleküle in Form mikroskopisch kleiner Spots in hochgeordneter Weise in Reihen und Spalten immobilisiert sind. Als Fängermoleküle werden eine Vielzahl unterschiedlicher biologischer Moleküle, wie zum Beispiel Antikörper, Antigene, Haptene, Enzyme, DNA und RNA, eingesetzt. Der Nachweis erfolgt über die selektive Affinitätsreaktion von Fänger- und Analytmolekül. Die Detektion der gebundenen Analytmoleküle kann über Chemilumineszenz-, Fluoreszenz-, elektrochemische Messungen oder markierungsfrei erfolgen.

Für den Nachweis von Legionellen stellt die Mikroarray-Technologie eine vielversprechende Technik dar. In der Literatur sind sowohl DNA-Mikroarrays als auch Antikörper-Mikroarrays beschrieben [28, 106, 133].

Zur parallelen Bestimmung von *L. pneumophila* und 10 weiteren Pathogenen wurde ein PCR-basiertes Mikroarray-Nachweisverfahren entwickelt [106]. Zur Identifizierung der Bakterien wurden Sequenzen der sogenannten 16S-23S rRNA *internal transcribed spacer* (ITS)-Region und des Enzyms Gyrase (*gyrB*) herangezogen. Die Region zwischen 16S und 23S rRNAs variiert in Sequenz und Länge je nach Bakterienstamm, -art und -gattung. Der Genabschnitt *gyrB* kodiert die Untereinheit B des Gyrase-Enzyms und kommt im Genom nahezu aller Bakterienarten vor [106]. Die Mikroarray-Detektion erfolgte nach der gezielten Vervielfältigung der Ziel-DNA unter Verwendung spezifischer Primer mittels PCR. Die gebundenen Fluoreszenz-markierten PCR-Produkte wurden nach Anregung mit einem Laser ausgelesen.

Ein weiteres interessantes Beispiel ist die Detektion von *L. pneumophila* mittels Antikörper-Mikroarrays über oberflächenverstärkte Raman-Streuung (SERS). Der Immunoassay wurde mittels Raman-Spektroskopie ausgelesen, wobei die Sensitivität mit Hilfe synthetischer Nanopartikel erhöht wurde [133]. Die Metallpartikel erzeugten den SERS-Effekt und führten bei Zugabe zum Analyten unter Bestrahlung mit dem Laser zu einer Signalverstärkung. Die geringe Raman-Streuung wurde erhöht und es konnten charakteristische Fingerprintspektren aufgenommen werden.

Weiterhin wurde ein sensitiver Nachweis von *L. pneumophila* mit Hilfe einer Immunochip-Plattform beschrieben [22]. Antikörper gegen *L. pneumophila* wurden kovalent auf

Goldträgern immobilisiert. Die selektive Bindung der Bakterien wurde über elektrochemische Impedanzspektroskopie detektiert.

2.2.2.2.6 Mikroskopie

Mit Hilfe der Mikroskopie können Objekte, deren Größe geringer ist als das Auflösungsvermögen des menschlichen Auges, angesehen bzw. abgebildet werden. Durch den Einsatz hochauflösender optischer Geräte ist eine vielfache Vergrößerung möglich. Die fluoreszenzmikroskopische Detektion findet häufig Anwendung bei der Diagnostik von Legionelleninfektionen [134, 135]. Fluoreszenzmarkierte Objekte können nach Anregung unter dem Mikroskop sichtbar gemacht werden.

Der Antigennachweis in respiratorischen Materialien erfolgt mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Spezies-selektiver Antikörper gegen ein Membranprotein von *L. pneumophila*. Mit diesem Test ist der Nachweis aller Serogruppen von *L. pneumophila* möglich. Der Nachteil dieses Verfahrens liegt in der geringeren Sensitivität [66, 67].

Der Antikörpernachweis mittels indirekter Immunfluoreszenz wird eingesetzt, um beim Patienten einen Anstieg des Antikörperspiegels festzustellen. Dieser erfolgt jedoch oft erst in der 6. bis 8. Krankheitswoche; bei etwa 30 % aller Patienten tritt keine Antikörperbildung auf [23]. Damit kann man aufgrund eines negativen Antikörpernachweises eine Legionellose nicht ausschließen [23]. Der Antikörpernachweis wird zurzeit noch häufig eingesetzt, wird aber zunehmend seltener.

2.2.2.2.7 Spektroskopische Methoden

Die Infrarot (IR)- und Ramanspektroskopie werden ebenfalls zum Nachweis von Bakterien eingesetzt [136]. Bei der Infrarotspektroskopie erfolgt die Schwingungsanregung von Molekülbindungen mit Hilfe infraroter Strahlung. In den Schwingungsspektren können funktionelle Gruppen wie OH-, NH-, CO-Gruppen nachgewiesen werden. Zudem werden Schwingungsbanden erhalten, die das gesamte Molekül charakterisieren (Gerüstschwingungen). Diese werden als sogenannte *fingerprint*-Region bezeichnet und erlauben die Identifizierung von Analyten aufgrund geringster Unterschiede in Struktur und Zusammensetzung. Anhand der IR-Spektren konnten *L. pneumophila*, *Aeromonades*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* und *Salmonella typhimurium* identifiziert und unterschieden werden [137].

Bei der Ramanspektroskopie erfolgt die Untersuchung der inelastischen Streuung von Licht an Molekülen. Moleküle werden mit monochromatischem Licht bestrahlt, wodurch es zur Streuung des eingestrahnten Lichts kommt. Neben der Spektrallinie des Streulichts treten zusätzliche Spektrallinien auf, die gegenüber der Frequenz der Lichtquelle verschoben sind. Diese werden als Raman-Banden bezeichnet und können zur Identifizierung von Molekülen herangezogen werden. Die Untersuchung und Identifizierung von Bakterien anhand charakteristischer Raman-Spektren ist für Suspensionen, getrockneten Probenfilm und Kulturmedium beschrieben [136]. Auch die Messung geringer Bakterienzahlen (1 - 50 Zellen), die auf einem Quarzträger immobilisiert wurden, ist beschrieben [138].

2.2.3 Nachweisverfahren im Vergleich

Beispiele der in den Kapiteln 2.2.1 und 2.2.2 beschriebenen Verfahren zum Nachweis von Legionellen sind anhand der wichtigsten Kenngrößen in Tabelle 2.1 aufgeführt.

Tabelle 2.1: Vergleich verschiedener Verfahren zum Nachweis von Legionellen

Methoden	Analyt	Matrix	Analysezeit	Nachweisgrenze	Literatur
Kultivierung	<i>Legionella</i> spp.	Wasser	7 - 10 d	1 Z/100 mL	[62]
Kultivierung	<i>Legionella</i> spp.	Bioaerosol	> 7 d	< 23 CFU/m ³	[139]
Filtration - IMS - Zytometrie	<i>L. pneumophila</i>	Leitungswasser	3 h	500 Z/L	[99]
Festphasenzytometrie	<i>L. pneumophila</i> Sg 1 - 15	Leitungswasser	3 - 4 h	10 - 100 Z/L	[95]
Multiplex-PCR	25 <i>Legionella</i> -Spezies	Puffer	~ 2 h	2,5 CFU/mL	[108]
<i>real-time</i> -PCR	<i>L. pneumophila</i>	Bioaerosol	6 - 8 h	-	[140]
<i>real-time</i> -PCR	<i>L. pneumophila</i>	Wasser	3 h	7,5 CFU/mL	[141]
ELISA	<i>L. pneumophila</i> Sg 1	Urin	~ 4 h	-	[121]
Biosensor	<i>Legionella</i>	Puffer	3 h	~ 10 ⁶ Z/mL	[132]
Antikörper-Mikroarray	<i>L. pneumophila</i> Sg 1	Puffer	13 min	10 ⁵ Z/mL	[28]
Antikörper-Mikroarray	<i>L. pneumophila</i> Sg 1	Reinstwasser	67 min	1·10 ³ Z/mL	[142]
Antikörper-Mikroarray	<i>L. pneumophila</i> Sg 1	Puffer	1 h	2·10 ² Z/mL	[22]
DNA-Mikroarray	<i>L. pneumophila</i>	Wasser	-	10 ⁴ CFU/mL	[106]

Im direkten Vergleich wird deutlich, dass die modernen Verfahren gegenüber dem konventionellen Kulturverfahren mit Analysezeiten von mehreren Tagen vor allem den Vorteil des geringeren Zeitaufwands aufweisen. Für die PCR-Technik liegt die Analysezeit bei wenigen Stunden. Auch Biosensoren, ELISA und Mikroarrays liefern das Analyseergebnis innerhalb weniger Stunden. Allerdings ist bei den drei zuletzt genannten Methoden eine Voranreicherung der Mikroorganismen erforderlich. Es ist außerdem bekannt, dass Zellkonzentrationen mit Kulturverfahren um 10 - 60 % unterbestimmt werden [143]. Aktive, aber nicht kultivierbare Zellen werden bei der Anwendung von Kulturverfahren nicht erfasst, haben aber dennoch das Potential Infektionen auszulösen. Dieser Aspekt ist besonders bei vorhergehender Anreicherung von Bedeutung, da zum Beispiel der Bioaerosol-Sammelprozess die Kultivierbarkeit einschränken kann [144].

Die Multiplex-PCR und Mikroarrays zeichnen sich durch einen weiteren entscheidenden Vorteil aus, sie ermöglichen die parallele Messung verschiedener Spezies und Serogruppen. Damit stellen diese Verfahren vielversprechende Techniken zum Nachweis von Mikroorganismen dar.

2.3 Mikroarray-Technologie

Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete und untersuchte Nachweisverfahren der Mikroarray-Technologie ist in den folgenden Kapiteln genauer beschrieben.

Abhängig von der Information, die erzielt werden soll, können analytische und funktionelle Mikroarrays unterschieden werden [145]. Funktionelle Mikroarrays werden genutzt, um biochemische Aktivitäten oder biologische Interaktionen zu untersuchen. Beispiele hierfür sind die Aktivität und Bindung von Proteinen oder Substrat- bzw. Inhibitorbindung an Enzyme. Weiterhin können Informationen über Genexpression oder zur Identifizierung von Antikörpern in Serumproben gewonnen werden [73]. Bei analytischen Mikroarrays liegt der Fokus auf der Gewinnung quantitativer Aussagen. Analytische Mikroarrays machen sich die selektive Affinitätsreaktion zwischen Rezeptormolekülen und den Analytmolekülen zu Nutze. Die immobilisierten Fängermoleküle binden während eines Assays die Zielmoleküle (Analyten) über selektive Wechselwirkungen. Quantitative Ergebnisse sind wichtig, um die Einhaltung festgelegter Grenzwerte zu überprüfen. Die Quantifizierung mehrerer Analyten basiert dabei auf den vielfachen Affinitätsreaktionen, wobei eine Kalibrierung aller Analyten

notwendig ist. Die Affinitätsreaktionen hängen von der Konzentration der Analyten ab, da sowohl das Fängermolekül als auch die übrigen Assayreagenzien in konstanten Konzentrationen vorliegen [73]. Die Mikroarray-Technologie erfüllt die Anforderungen einer effizienten Analysemethode, da eine schnelle, parallele Bestimmung einer Vielzahl an Analyten in einem Experiment möglich ist [73]. Bei Mikroarrays besteht außerdem die Möglichkeit der vollständigen Automatisierung. Aufgrund dieser Vorteile stellen Mikroarrays wichtige Systeme zum Monitoring im Bereich der Lebensmittel-, Wasser- und Umweltanalytik und der Medizin dar [146-149]. Die Bandbreite nachzuweisender Zielmoleküle ist vielfältig. Mit Hilfe eines indirekt kompetitiven Assayformats können kleine Moleküle, wie zum Beispiel Toxine, Pestizide oder Pharmazeutika quantifiziert werden [150-153]. Der Einsatz des Sandwich-Immunoassay-Formats ermöglicht den Nachweis von Proteinen, Bakterien und Viren [28, 154, 155]. Die DNA bzw. RNA von Bakterienzellen oder Viren kann analog einem Sandwich-Immunoassay über einen Sandwich-Hybridisierungsassay quantitativ bestimmt werden [156, 157]. Um die Sensitivität von DNA-Mikroarrays zu erhöhen, wird die Mikroarray-Detektion nach vorhergehender Amplifizierung eines definierten DNA-Abschnittes, zum Beispiel mittels PCR, angewendet [158, 159].

2.3.1 Oberflächenchemie

Die Oberflächenchemie ist der entscheidende Faktor für die Herstellung reproduzierbarer Mikroarrays und damit der Durchführung präziser Analysen mittels Mikroarray-Technologie. Die grundlegende Anforderung an die Oberfläche ist eine effiziente Immobilisierung der Fängermoleküle, gleichzeitig aber eine möglichst geringe unspezifische Adsorption anderer Moleküle, um ein hohes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis zu erhalten. Die erzeugte Oberfläche sollte eben bzw. uniform sein, um eine einheitliche Immobilisierung und Verteilung der Fängermoleküle zu gewährleisten. Protein-Mikroarrays sollten ohne Verlust an spezifischer Aktivität der immobilisierten Proteine aufzubewahren sein. Damit ergeben sich hohe Anforderungen bei der Herstellung von Mikroarrays, wobei Materialien und Bedingungen je nach Einsatzgebiet, Erfordernissen, Detektionsprinzip und der zu untersuchenden Probe gewählt werden müssen.

Es finden verschiedene Trägermaterialien und Methoden zur Immobilisierung der Fängermoleküle Anwendung. Ein einfacher Weg der Immobilisierung ist die direkte, nicht kovalente Wechselwirkung mit hydrophoben Oberflächen. Für das nicht kovalente

Aufbringen von Antikörpern eignen sich Materialien wie zum Beispiel Polystyrol [148], Acrylnitril-Butadien-Styrol [160], Polyvinylidendifluorid [161] oder Nitrocellulose [162, 163]. Die Trägeroberfläche muss zwar zur Immobilisierung nicht chemisch modifiziert werden, es treten allerdings hohe Hintergrundsignale auf, und die erforderliche Reproduzierbarkeit wird oft nicht erfüllt [73]. Eine weitere Möglichkeit der Immobilisierung ist die kovalente Anbindung. Diese weist eine besonders hohe Stabilität auf und ist deshalb gerade bei regenerierbaren Durchfluss-Mikroarrays notwendig, um die Desorption von Fängermolekülen zu verhindern. Die kovalente Anbindung ist allerdings nur möglich, wenn sowohl die Trägeroberfläche als auch die Fängermoleküle aktive funktionelle Gruppen aufweisen, die miteinander reagieren können. Andernfalls müssen terminale Gruppen in geeigneter Weise modifiziert bzw. aktiviert werden. Ein oft verwendetes Trägermaterial zur kovalenten Immobilisierung von Fängermolekülen ist Glas [164]. Glasoberflächen zeichnen sich durch eine hohe chemische und physikalische Stabilität aus; außerdem wird durch ihre Transparenz das Messsignal nicht beeinflusst. Die Silangruppen der Glasoberflächen ermöglichen eine relativ einfache Oberflächenmodifizierung und damit Aktivierung für weitere Reaktionen. Modifiziert werden Glassubstrate in der Regel mit Silanen, welche endständige funktionelle Gruppen, wie Amin-, Epoxid-, Thiol oder Aldehydgruppen tragen. Die so eingeführten funktionellen Gruppen können zur Immobilisierung von Proteinen [165] oder anderen Molekülen verwendet werden, wenn diese eine Aminogruppe aufweisen. Auch für Gold- und Plastikmikroarrays ist eine kovalente Beschichtung ähnlich einfach durchführbar wie über die Silanchemie [73]. Unter Verwendung schwefelhaltiger Verbindungen, die eine hohe Affinität zu Edelmetalloberflächen aufweisen, können auf Goldoberflächen reproduzierbar Monoschichten (*self-assembled monolayers*) erzeugt werden [166, 167]. Es können zum Beispiel Verbindungen wie Alkanthiole, Dialkylsulfide und Dialkyldisulfide eingesetzt werden. Amin- bzw. Thiol- modifizierte Fängermoleküle können z. B. unter Ausbildung einer Amid- bzw. Schwefel-Kohlenstoff- oder Schwefel-Schwefel-Bindung kovalent auf der Monoschicht gebunden werden [168, 169]. Eine geeignete Methode um Fängermoleküle auf inerten Polymeroberflächen wie Polystyrol oder Polymethylmethacrylat zu immobilisieren ist der Einsatz von Photolinkern [170-173]. Bei Photolinkern handelt es sich um heterobifunktionale Moleküle. Diese besitzen eine funktionelle Gruppe zum Auslösen einer photoinduzierten radikalischen Reaktion und außerdem eine funktionelle Gruppe zum Anbinden der Fängermoleküle. Als Beispiele für Photolinker sind unter anderem Anthrachinone, Phenylazide, Benzophenone, Diazirin- und Diazoverbindungen zu nennen [170]. Fängermoleküle können über die funktionelle Gruppe

an den Photolinker gekoppelt werden. Das so modifizierte Fängermolekül kann auf die Substratoberfläche aufgebracht werden. Durch Lichteinwirkung kommt es zur radikalischen Reaktion der photoreaktiven Einheit des Photolinkers mit der Oberfläche und zur Ausbildung einer kovalenten Bindung. Die Möglichkeit, das Fängermolekül erst nach vorhergehender kovalenter Immobilisierung des Photolinkers zu koppeln, besteht ebenfalls.

Mit dem Ziel, Struktur und Aktivität der immobilisierten Fängermoleküle zu erhalten, wurden zahlreiche Beschichtungen für Mikroarray-Substrate entwickelt. Polyethylenglykol (PEG) stellt zum Beispiel eine ideale Möglichkeit zur Beschichtung von Mikroarray-Oberflächen dar [163]. Die PEG-modifizierte Oberfläche bildet zum einen eine Schutzschicht gegenüber unspezifischer Bindung von Proteinen und hat als weiteren Vorteil einen stabilisierenden Effekt bzgl. immobilisierter Proteine oder Antikörper auf Glaträgern [174]. Durch geeignete Modifizierung von Polyethylenglykol können außerdem reaktive Gruppen zur kovalenten Immobilisierung von Fängermolekülen eingeführt werden. Um zusätzlich die verfügbare Oberfläche zur Immobilisierung von Fängermolekülen zu vergrößern, wurden zahlreiche Hydrogele (z. B. Aminodextran-, Carboxydextran- oder Polyethylenglykol) zur Beschichtung entwickelt [175-177]. Bei Hydrogelen handelt es sich um dreidimensionale Beschichtungen, in deren Poren die Fängermoleküle gebunden werden können. Mikroarray-Beschichtungen mit einem Copolymer aus den Monomeren *N,N*-Dimethylacrylamid, *N,N*-Acryloyloxysuccinimid und 3-Trimethoxysilylpropylmethacrylat mit aktiven Estergruppen in der Polymerkette zeigten eine ähnliche Sensitivität wie kommerziell erhältliche Produkte, allerdings mit deutlich geringeren Hintergrundsignalen [178]. Die Entwicklung eines Galactosid-modifizierten Hydrogels zeigte sich aufgrund größerer Porendimensionen und damit geringerer Diffusionslimitierung als vielversprechend bezüglich hoher Assay-Sensitivität [163, 179]. Eine Alternative zu Polymerbeschichtungen stellen Dendrimere oder definierte Dendrimereinheiten (Dendrone) dar [163, 180, 181]. Dabei handelt es sich um stark verzweigte Polymere, die sphärische Strukturen ähnlich der Größe von Proteinen bilden. Auch Dendrimere bieten die Möglichkeit, Struktur und Funktionalität von Fängermolekülen zu erhalten und als Schutzschicht gegenüber unspezifischer Bindung zu dienen. Darüber hinaus weisen sie eine Vielzahl von Polymerkettenenden auf, über die eine Funktionalisierung und Immobilisierung erfolgen kann.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine am Institut entwickelte stufenweise Oberflächenchemie verwendet, die sich bei der Herstellung von Protein-Mikroarrays mit einer gleichmäßigen

Verteilung terminaler funktioneller Gruppen bewährt hat [27]. Dabei wird eine Diamino-Polyethylenglykol (DAPEG)-Beschichtung auf silanisierten Glasoberflächen erzeugt und anschließend für die kovalente Bindung von Antikörpern aktiviert.

Zunächst erfolgen die Reinigung des Glaträgers mittels Lauge und anschließend die Hydroxylierung in HCl/Methanol und konzentrierter Schwefelsäure. Dadurch wird eine Hydroxylgruppen-reiche Glasoberfläche, frei von Schlieren und Glasstaub, erhalten. Dies ist wichtig für den nächsten Schritt, die Silanisierung, da eine verunreinigte Glasoberfläche zu einer teilweisen Inaktivierung der Silanisierung und damit zu uneinheitlicher PEG-Beschichtung führen kann. Für die Silanisierung (Abbildung 2.5) wird 3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan (GOPTS) verwendet.

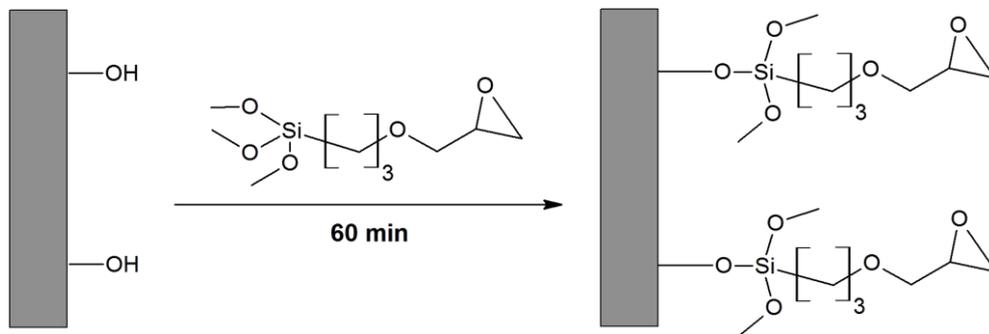


Abbildung 2.5: Silanisierung eines aktivierten Glasobjekträgers mit GOPTS [gemäß 27].

Hierbei ist auf den Ausschluss von Wasser zu achten, da es sonst zur Polymerisation von GOPTS an der Oberfläche kommen kann, was wiederum eine uneinheitliche PEG-Beschichtung nach sich zieht. Die mit GOPTS beschichtete Glasoberfläche weist nun aktive Epoxy-Gruppen auf, welche mit DAPEG unter Bildung eines sekundären Amins reagieren (Abbildung 2.6).

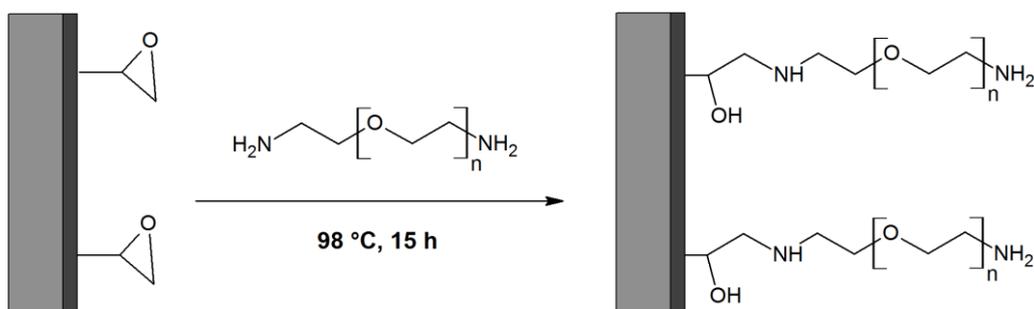


Abbildung 2.6: Beschichtung eines silanisierten Glaträgers mit DAPEG [gemäß 27].

Die PEG-modifizierte Oberfläche weist die beschriebenen Vorteile geringer unspezifischer Bindungen und dem stabilisierenden Effekt bzgl. immobilisierter Proteine oder Antikörper

auf. Die Beschichtung mit DAPEG erfolgt in der Schmelze, wodurch sehr hohe Dichten erreicht werden. Der DAPEG-beschichtete Glsträger wird durch Reaktion mit Di(*N*-succinimidyl)carbonat (DSC) aktiviert (Abbildung 2.7).

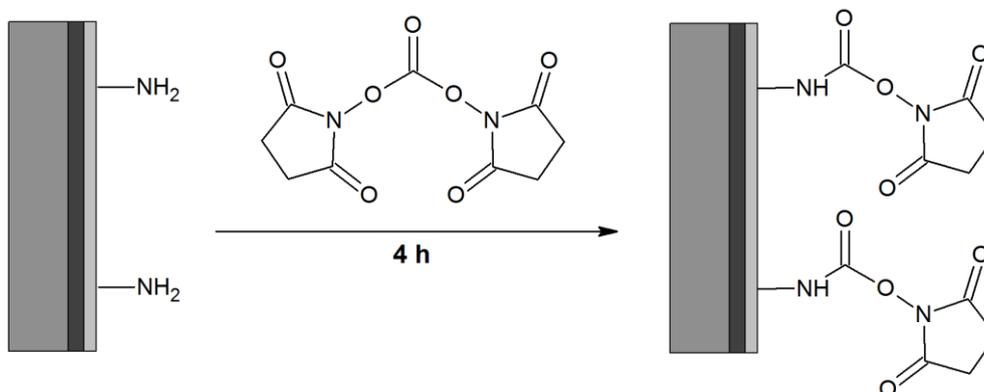


Abbildung 2.7: Aktivierung eines DAPEG-beschichteten Glsträgers mit DSC [gemäß 27].

Bei DSC handelt es sich um einen homobifunktionalen Linker, welcher über zwei identische reaktive Gruppen an den Enden verfügt. DSC reagiert mit auf der PEG-beschichteten Oberfläche verfügbaren Aminogruppen unter Ausbildung einer Amidbindung. Auf diese Weise entsteht eine Monoschicht reaktiver Estergruppen auf der PEG-modifizierten Oberfläche, an die Antikörper über Lysinreste kovalent gebunden werden können.

2.3.2 Immobilisierung von Fängermolekülen

Das Aufbringen der Fängermoleküle auf das Trägermaterial erfolgt über Mikrodosierverfahren. Bei einem Mikrodosiersystem handelt es sich im Wesentlichen um eine Computer-gesteuerte Einheit, die in der Lage ist, mit Hilfe einer Nadel geringe Volumina aus einem Reservoir auf die Oberfläche des Mikroarray-Trägermaterials zu übertragen. Die Nadel kann durch Elektromotoren in unterschiedliche Richtungen bewegt werden, sodass jede Position des Geräts (Reservoir, Trägermaterial und Waschstation) angesteuert werden kann. Prinzipiell wird zwischen Kontakt-Mikrodosierverfahren und kontaktlosen Verfahren unterschieden. Bei Kontakt-Mikrodosierverfahren werden die Fängermoleküle mittels kapillarer Kräfte einer Lösung auf die Mikroarray-Oberfläche übertragen. Dies erfolgt durch Eintauchen einer entsprechend geformten Nadel in die Moleküllösung und das anschließende Absetzen der aufgenommenen Flüssigkeit durch den direkten Kontakt mit der Mikroarray-Oberfläche (Abbildung 2.8).

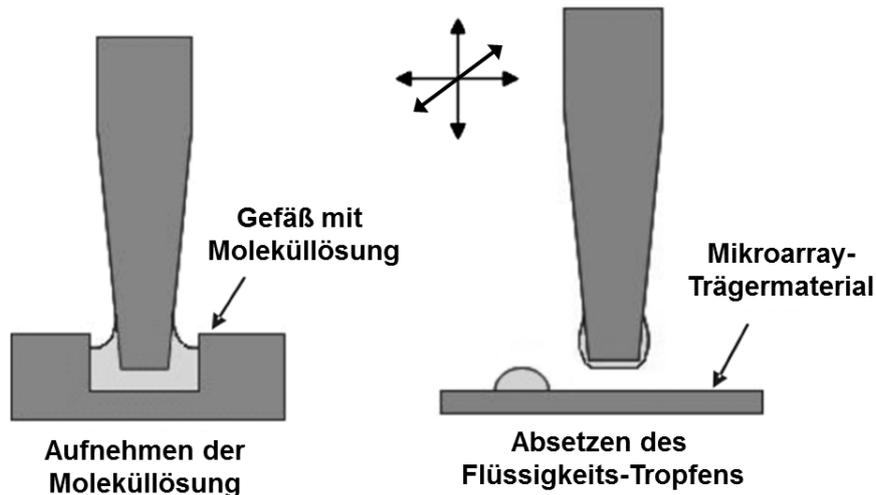


Abbildung 2.8: Schematische Darstellung des Kontakt-Mikrodosierverfahrens. Links: Aufnehmen der aufzubringenden Fängermoleküllösung aus dem Reservoir, rechts: Absetzen des Flüssigkeitstropfens auf dem Mikroarray-Trägermaterial [182].

Die Art der Aufnahme bzw. Auftragung der Moleküllösung ist abhängig von der verwendeten Nadel. Bei Kontakt-Mikrodosierverfahren finden unter anderem das *solid-pin*-System, das *splitted-pin*-System und das *ring-and-pin*-System Anwendung. Beim *solid-pin*-System wird die Nadel in die Lösung eingetaucht, woraufhin Flüssigkeit anhaftet und anschließend ein Flüssigkeitstropfen abgesetzt werden kann. Das Volumen beträgt wenige nL. Die Moleküle in Lösung reagieren mit der aktivierten Oberfläche. Es entstehen funktionalisierte Bereiche auf der Oberfläche, welche *Spots* genannt werden. Für jeden weiteren Tropfen muss die Nadel erneut in die Moleküllösung getaucht werden, was dieses Verfahren relativ zeitaufwendig macht. Unter Verwendung von *splitted-pins* ist dagegen eine mehrmalige sukzessive Auftragung möglich. Die Spitze der Nadel ist hierbei mit einer Spalte versehen, in die aufgrund der Adhäsion Flüssigkeit hineingezogen wird und einen Flüssigkeitsvorrat bildet. Beim *ring-and-pin*-System wird Flüssigkeit von einer Öse aufgenommen und liegt anschließend in Form eines Films vor. Eine Nadel stößt durch den Film und führt Flüssigkeit mit, um sie auf die Trägeroberfläche aufzubringen.

Bei kontaktlosen Mikrodosierverfahren erfolgt das Aufbringen der Moleküllösung nicht durch direkten Kontakt mit der Trägeroberfläche, sondern es werden einzelne Tröpfchen erzeugt, die auf eine definierte Position der Oberfläche herunterfallen. Die Erzeugung der Tröpfchen erfolgt zum Beispiel mittels Magnet-, piezoelektrischer oder thermischer Pumpen. Die Prozessdauer ist im Vergleich zu Kontakt-Verfahren geringer, das kontaktlose Aufbringen ist aber mit erheblich höherem technischem Aufwand verbunden. Weiterhin besteht die Gefahr, dass Düsen verstopfen, da häufig mit salzhaltigen Spottinglösungen gearbeitet wird.

2.3.3 Durchfluss-Mikroarrays

Bei Mikroarrays ist eine Unterscheidung zwischen Passiv- und Durchfluss-Mikroarrays möglich. Bei einem Durchfluss-Mikroarray-System sind Mikroarray und Flusszelle Bestandteile eines fluidischen Systems, über das die Zufuhr der Assay-Reagenzien realisiert wird. Der Messablauf erfolgt automatisch über computergesteuerte Pumpen und Ventile. Durch die Vermeidung manueller Einzelschritte sind Analysezeiten von Durchfluss-Mikroarrays bedeutend kürzer als die von Passiv-Mikroarrays. Dies erlaubt höhere Probendurchsätze. Der automatisierte Messablauf erhöht zudem die Reproduzierbarkeit der Messungen. Ein entscheidender Vorteil von Durchfluss-Mikroarrays ist, dass die Bindungsreaktion an der Festphase nicht auf passive Diffusion beschränkt ist. Der Analyt wird mittels Konvektion aktiv zu den Fängermolekülen auf der Festphase geführt, was den Einfluss der Massentransportlimitierung auf die Bindungsreaktion erniedrigt [183]. Einschränkungen der Sensitivität bei dem Nachweis von Bakterien unter stationären Bedingungen werden in der Massentransportlimitierung vermutet. Bakterien zeigen kleine Diffusionskoeffizienten von etwa $2 \cdot 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}$ und geringe Driftgeschwindigkeiten von $0,52 \text{ } \mu\text{m}/\text{s}$, betrachtet man Bakterien im Größenbereich von *E. coli* [184]. In einem stationären System kann nur ein geringer Teil der Bakterien über Selbstdiffusion zu den immobilisierten Fängermolekülen gelangen. Proteine weisen dagegen höhere Diffusionskonstanten auf [185]. In flachen Kanälen kann eine maximale Oberflächenbelegung der Antikörper in kürzerer Zeit erreicht werden [186]. Der Einsatz von Durchfluss-Analysesystemen ermöglicht das Erreichen einer höheren Assay-Sensitivität in kürzerer Zeit [187]. In Abbildung 2.9 sind die Transport- und Wechselwirkungsprozesse im Fließkanal am Beispiel eines Antikörper-Mikroarrays zum Nachweis von Bakterien schematisch dargestellt und werden im Folgenden genauer erläutert.

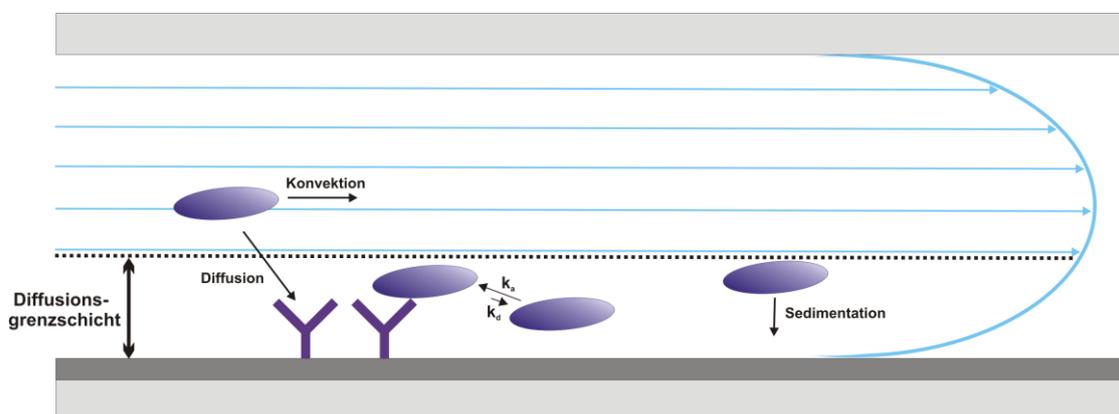


Abbildung 2.9: Transport und Wechselwirkungsprozesse im Fließkanal eines Durchfluss-Antikörper-Mikroarrays zum Nachweis von Bakterien.

In einem mikrofluidischen System kann generell von laminaren Strömungen und damit von parabolischen Strömungsprofilen ausgegangen werden. Die Laminarität wird über die Reynoldszahl R_e ausgedrückt, wobei im laminaren Strömungsbereich (Strömungen in einem Kanal) $R_e < 1000 - 1500$ gilt.

$$R_e = \frac{\rho \cdot v \cdot 4 \cdot A}{\eta \cdot U} \quad (\text{Gleichung 2.1})$$

ρ Dichte

A Fläche des Kanals

v mittlere Fließgeschwindigkeit

U Umfang des Kanalquerschnitts

η Viskosität

In einer Flusszelle kann der Umfang gemäß $U = 2 \cdot (h + b)$ über die Höhe (h) und Breite (b) der Flusszelle berechnet werden.

Bei einem Durchfluss-Antikörper-Mikroarray sind Fängerantikörper auf einem planaren Trägermaterial immobilisiert. Die Bakterienprobe wird bei der Messung im Fließkanal der Flusszelle über die Mikroarray-Oberfläche gepumpt. Die Bakterien werden dabei durch Konvektions- und Diffusionsprozesse in der Flusszelle verteilt. Über der Mikroarray-Oberfläche bildet sich eine Diffusionsgrenzschicht aus, in welcher keine Strömung stattfindet. Die Bakterien müssen durch diese Schicht zur Oberfläche diffundieren, um an die Fängerantikörper binden zu können. Diese Diffusionsgrenzschicht bildet sich aus, unabhängig davon, ob die Lösung fließt oder steht. Die Bindungsreaktion verläuft nach einer charakteristischen Kinetik und kann gemäß Gleichung 2.2 beschrieben werden [188].

$$\frac{dc}{dt} = k_a \cdot c_{Ak} \cdot c_{Zelle} - k_d \cdot c_{Ak-Zelle} \quad (\text{Gleichung 2.2})$$

c_{Ak} Oberflächenkonzentration freier Antikörper

k_a Assoziationskonstante

c_{Zelle} lokale Bakterienkonzentration

k_d Dissoziationskonstante

$c_{Ak-Zelle}$ Konzentration gebildeter Antikörper-Bakterien-Komplexe

Die Bindungsreaktion ist damit abhängig von der Assoziations- und Dissoziationskonstante und den Konzentrationen der verfügbaren Antikörper, der Bakterien in direkter Umgebung der Oberfläche und der Konzentration gebildeter Antikörper-Bakterien-Komplexe. Aufgrund der Bindungsreaktion wird die Konzentration an freien Bakterien nahe der Oberfläche

verringert und diese müssen durch Diffusion nachgeliefert werden. Bei einem konstanten Durchfluss erfolgt der Massentransport gemäß dem 1. Fick'schen Gesetz (Gleichung 2.3).

$$J = -D \cdot \frac{\Delta c}{\delta} \quad (\text{Gleichung 2.3})$$

J Massentransport

δ Dicke der Grenzschicht

D Diffusionskonstante

Δc Konzentrationsgradient der Bakterien im Fluss und an der Oberfläche

Damit hängt die Diffusion vom Diffusionskoeffizienten, der Dicke der Grenzschicht und dem Konzentrationsgradienten der Bakterien im Fluss und an der Oberfläche ab. Mit steigendem Molekulargewicht nimmt der Diffusionskoeffizient zu [189] und die Teilchen diffundieren langsamer.

Handelt es sich bei der Bindungsreaktion um den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, so verläuft die Bildung der Antikörper-Bakterien-Komplexe kinetisch kontrolliert [190]. Ist dagegen der Massentransport an die Oberfläche der geschwindigkeitsbestimmende Schritt, verläuft die Komplexbildung diffusionskontrolliert bzw. massentransportlimitiert. Werden geringe Fließgeschwindigkeiten verwendet, ist die Bindung an die Fängerantikörper massentransportlimitiert. Eine Erhöhung der Fließgeschwindigkeit kann die Dicke der Diffusionsgrenzschicht reduzieren und somit generell die Sensitivität steigern [190, 191]. Allerdings wird die Scherrate in der Flusszelle mit steigendem Volumenstrom erhöht [192], was Zellen stark beansprucht und zu deren Aufplatzen führen kann [193]. Die Sensitivitätssteigerung über Erhöhung der Fließgeschwindigkeit kann im Fall von Proteinen, nicht jedoch für Zellen angewendet werden. Bei Zell-Assays sind kleine Fließgeschwindigkeiten notwendig, um hohe Sensitivitäten zu erzielen [194]. Partikel und Zellen in schmalen Flusszellen werden wie oben beschrieben in einem laminaren Strom transportiert, wobei starke Widerstandskräfte auf sie wirken [195]. Die Geschwindigkeit im Abstand zum Rand der Flusszelle analog zum Partikelradius kann mit Hilfe von Gleichung 2.4 beschrieben werden [196].

$$v_f = \frac{6 \cdot Q \cdot r}{w \cdot h^2} \quad (\text{Gleichung 2.4})$$

v_f Geschwindigkeit Partikel/Zelle

w Breite der Flusszelle

Q Fließgeschwindigkeit

h Höhe der Flusszelle

r Radius Partikel/Zelle

Eine Reduktion der Fließgeschwindigkeit führt damit zu einer geringeren Partikelgeschwindigkeit und begünstigt die Sedimentation der Partikel zur Oberfläche. Die Reduzierung der Fließgeschwindigkeit kann auf dieser Grundlage genutzt werden, um die Sensitivität bei der Detektion von Bakterien zu verbessern [196].

2.4 Anreicherungsverfahren

2.4.1 Anreicherung aus Wasser

Aufgrund des ubiquitären Vorkommens von Legionellen in Wasser ist der Nachweis bezüglich Wasser aus verschiedenen technischen Systemen und Anlagen von Bedeutung. Grundsätzlich besteht das Ziel mikrobiologischer Wasseruntersuchungen in einer möglichst frühzeitigen Erfassung relevanter Kontaminationen und der erste Schritt zur Erfassung wasserassoziierter Krankheitserreger ist üblicherweise eine Anreicherung der Bakterien [197]. Dies ist notwendig, da Krankheitserreger in der Regel in Konzentrationen vorkommen, die unterhalb der Nachweisgrenze von Analyseverfahren liegen. Gerade die Nachweisgrenzen bioanalytischer Nachweisverfahren liegen in der Regel oberhalb definierter Grenzwerte und sind somit für die Überprüfung der geforderten Bakterienkonzentrationen nur in Kombination mit Anreicherungstechniken geeignet. Auch für Legionellen ist die regelmäßige Überprüfung gesetzlich vorgeschriebener Grenzwerte erforderlich. Für raumluftechnische Anlagen ist ein Richtwert von < 1000 *Legionella* spp. pro 100 mL bezüglich Umlaufwasser in offenen Rückkühlwerken festgelegt [20]. In der Trinkwasserverordnung ist ein technischer Maßnahmenwert von 100 *Legionella* spp. pro 100 mL Trinkwasser festgelegt [21]. Die vorgeschriebenen Grenzwerte für Legionellen können oftmals nur mit Hilfe einer vorgeschalteten Anreicherung erreicht werden. Die Anreicherung großer Probenvolumina gewährleistet außerdem den Erhalt repräsentativer Proben, da örtliche und zeitliche Schwankungen in der Probenzusammensetzung ausgeglichen werden [197].

Durch eine Anreicherung wird das Probenvolumen verringert und die Bakterien werden möglichst vollständig in diesem Volumen wiedererhalten. Auf diese Weise kann die Bakterienkonzentration in der Probe erhöht und die Sensitivität des Nachweisverfahrens verbessert werden. Einige Techniken dienen vorrangig der Aufreinigung ausgewählter Bakterien aus einer komplexen Matrix. Dies ist zum Beispiel für die Detektion mittels PCR von Bedeutung, da diese sehr anfällig gegenüber Matrixbestandteilen ist. Idealerweise wird

die Probe nach der Anreicherung bzw. Aufreinigung in einem möglichst kleinen Volumen, mit einer hohen Wiederfindung unbeschädigter Zielorganismen unter Entfernung störender Matrixbestandteile erhalten. Zur Anreicherung und Aufreinigung von Bakterien sind verschiedene Methoden wie Filtration, Zentrifugation, Immunseparation, Verfahren nach dem Prinzip der Adsorption/Desorption und Kultivierungsverfahren beschrieben [198, 199].

2.4.1.1 Zentrifugation

Zur Anreicherung von Bakterien kann die Zentrifugalkraft ausgenutzt werden, welche die Sedimentation suspendierter Partikel in einer Flüssigkeit bewirkt. Die Sedimentation der Bakterien in einem Zentrifugalfeld ist abhängig vom Partikeldurchmesser, der Partikeldichte, der Dichte der Flüssigkeit, dem Volumen sowie Rotationswinkel und -geschwindigkeit. Die Sedimentationsrate steigt dabei mit abnehmender Viskosität der Flüssigkeit und mit Erhöhung der Gravitationskraft. Werden Gravitationskräfte von 1000 - 8000 x g angewendet, kommt es zur Sedimentation von Bakterien und anderen Partikeln mit gleicher oder höherer Dichte [199]. Unter Anwendung der klassischen Zentrifugation wurde *L. pneumophila* mit Wiederfindungen von 14 % (3800 x g, 30 min) und 32 % (8150 x g, 15 min) aus Leitungswasser angereichert [200].

Durch gezielte Veränderung von Partikelgröße oder Flüssigkeitsdichte wurden alternative Zentrifugationsmethoden, wie zum Beispiel die Dichtegradientenzentrifugation oder die Differentialzentrifugation, entwickelt. Zur Anreicherung großer Probenmengen wurde die kontinuierliche Durchflusszentrifugation entwickelt [201, 202]. Bei dieser Technik wird die Probe kontinuierlich zugeführt, während der Rotor auf gewünschter Drehzahl läuft. Die Trennung erfolgt, während die Probe den Rotor durchläuft. Sedimentierte Bakterien verbleiben im Rotor, der Überstand wird kontinuierlich aus dem Rotor herausgepumpt.

2.4.1.2 Koagulation und Flokkulation

Mit Hilfe der Koagulation oder Flokkulation kann die Effizienz der Zentrifugation erhöht werden, indem der Partikeldurchmesser vergrößert wird. Bei der Koagulation kommt es zum Aneinanderhaften der Partikel durch eine Aufhebung elektrostatischer Ladungen, meist durch pH-Wert-Änderung. Bei der Flokkulation werden nach Zugabe von kationischen Polymeren oder anorganischen Verbindungen Agglomerate gebildet [203, 204]. Unter Zugabe von Säure oder Base kann das Flockungsmittel nach Zentrifugation oder Filtration wieder aufgelöst

werden. Die biologische Aktivität von Bakterien kann jedoch durch pH-Wert-Änderung oder das zugegebene Flockungsmittel beeinträchtigt werden. Die Wiederfindungen mit diesen Methoden sind vergleichsweise gering [198].

2.4.1.3 Filtrationsverfahren

Verfahren auf der Basis von Membran- oder Kartuschenfiltern werden am häufigsten zur Anreicherung von Bakterien in Wasserproben angewendet. Die Probe wird über den Filter gegeben und die Bakterien werden auf dem Filtermaterial, welches als Barriere fungiert, zurückgehalten. Es wird eine größenabhängige Abtrennung bzw. unspezifische Aufkonzentrierung definierter Inhaltsstoffe aus einer Flüssigkeit im Retentat (Konzentrat) erreicht [205]. Die anschließende Quantifizierung der Bakterien kann direkt auf dem Filter oder nach der Elution vom Filtermaterial erfolgen.

Zur Anreicherung großer Probenvolumina (100 - 1000 L) mit hohen Filtrationsgeschwindigkeiten von 1 - 5 L/min wurden Kartuschenfilter aus thermisch versponnenen Polypropylen-Mikrofasern erfolgreich eingesetzt [198, 206].

Die Membranverfahren mit der weitesten Verbreitung sind druckgetriebene Membranverfahren, bei denen die Druckdifferenz über der Membran die Triebkraft für den Trennprozess bedingt [205]. Diese Verfahren werden häufig zur primären Anreicherung von Mikroorganismen aus großen Probenvolumina angewendet. Abhängig von der Größe der abtrennbaren Inhaltsstoffe werden die Mikrofiltration, Ultrafiltration, Nanofiltration und Umkehrosiose unterschieden. In den letzten Jahrzehnten wurde die Anwendung der Mikro- und Ultrafiltration in der Trinkwasseraufbereitung stark vorangetrieben [205]. Als Modulvarianten können organische oder anorganische Membranen auf der Basis von Kapillar-, Multikanal- und Hohlfasermembranen, Membrankissen oder Membranplatten verwendet werden [205, 207-209].

L. pneumophila konnte mit Hilfe von flachen Polycarbonatmembranfiltern (Porengröße: 0,2 µm) mit einer Wiederfindung von 53 % angereichert werden [200]. Die Wiederfindung lag deutlich höher als die der zum Vergleich charakterisierten Zentrifugation.

Die Betriebsweise druckgetriebener Membranverfahren kann statisch (*Dead-End*) oder dynamisch (*Cross-Flow* oder Querstromfiltration) erfolgen [210]. Die *Dead-End*-Filtration zeigt aber ähnlich wie die klassische kuchenbildende statische Filtration mit zunehmender

Deckschichtdicke eine abnehmende Filtrationsleistung. In Kombination mit einer effizienten Rückspültechnik kann diese Betriebsweise, die sich durch einen geringen Energiebedarf auszeichnet, erfolgreich zur großtechnischen Anwendung der Mikro- und Ultrafiltration eingesetzt werden [205]. Nachteilig bei der *Dead-End*-Betriebsweise ist das häufige Eindringen der Bakterien in die dreidimensionale Filterstruktur. Eine vollständige und reproduzierbare Elution der Bakterien ist schwierig; Wiederfindungen liegen üblicherweise zwischen 30 und 60 % [200]. Diese Nachteile können durch die *Cross-Flow*-Betriebsweise vermieden werden. Bei der Querstromfiltration wird durch die tangentielle Anströmung der retentatseitigen Membranoberfläche die Deckschichtbildung auf der Membran kontrolliert, um den Permeatfluss auf einem möglichst hohen Niveau konstant zu halten [205]. Ablagerungen auf der Membran treten so nur in geringem Maße auf. Eine nicht reproduzierbare Rückspülung ist nicht erforderlich, da die Bakterien während der Anreicherung in Suspension bleiben [211, 212].

An unserem Institut wurde eine *Cross-Flow*-Mikrofiltration zur schnellen Anreicherung von Bakterien in Wasser entwickelt (Abbildung 2.10) [209].

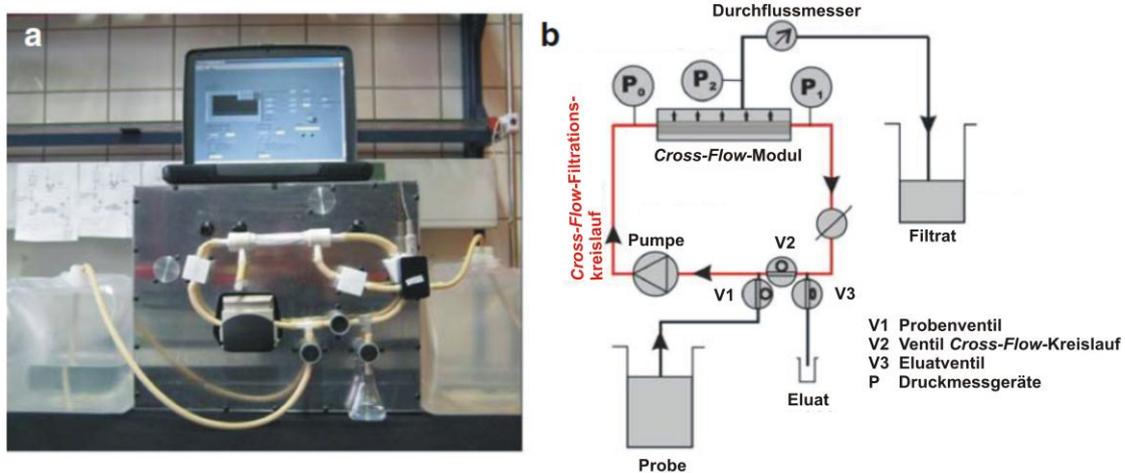


Abbildung 2.10: Versuchsaufbau der *Cross-Flow*-Mikrofiltration (a) und schematische Darstellung des fluidischen Aufbaus (b) [209].

Zur Anreicherung kam ein Polyethersulfon-Hohlfasermembranmodul mit einer Porengröße von $0,5 \mu\text{m}$ zum Einsatz. Lebende *E. coli* konnten aus 10-L-Leitungswasserproben mit einer Wiederfindung von $91 \pm 5 \%$ angereichert werden.

Alternativ zu den bisher beschriebenen nichtselektiven Filtrationsmethoden kann das Filtermaterial auch in modifizierter Form vorliegen. Bei der Immunfiltration werden Antikörper durch Adsorption auf dem Filter immobilisiert, um Bakterien selektiv aus der

filtrierten Probe zurückzuhalten. Die Porengröße des Filters ist dabei in der Regel größer als die Bakterien. Die Quantifizierung erfolgt direkt auf dem Filtermaterial [213, 214].

2.4.1.4 Methoden nach dem Prinzip der Adsorption/Desorption

Werden gelöste Bestandteile über nichtspezifische, reversible physikalisch-chemische Wechselwirkungen wie Van-der-Waals-Kräfte, elektrostatische Wechselwirkungen, hydrophobe Wechselwirkungen oder Wasserstoffbrückenbindungen an ein festes Material gebunden, spricht man von Adsorption [199, 215]. Die Adsorption von Bakterien erfolgt aufgrund ihrer Zellwandbestandteile, wie Lipopolysaccharide, Proteine und Phospholipide. Die meisten Bakterien tragen bei pH-Werten ≥ 5 eine geringe negative Ladung und können auf positiv geladenen Materialien adsorbiert werden [216, 217]. Durch pH-Wert-Änderung oder durch Zugabe hoher Salzkonzentrationen kann die Desorption der Zellen erfolgen. Die Ionenaustauschchromatographie ist eine häufig angewendete Methode auf Basis dieses Prinzips. Sie kommt vor allem zur Wasseraufbereitung oder zur Aufreinigung von Proteinen zum Einsatz [199]. Die Ionenaustauschersäule besteht aus kleinen Teilchen eines porösen organischen oder anorganischen Materials, dessen Oberfläche geladene Gruppen aufweist.

2.4.1.5 Affinitätschromatographie

Ähnlich der Ionenaustauschchromatographie werden auch bei der Affinitätschromatographie Analyten durch Wechselwirkung an einer festen Phase angereichert. Bei der Affinitätschromatographie findet allerdings eine biospezifische, reversible Wechselwirkung mit Liganden statt, die kovalent auf dem Säulenmaterial immobilisiert sind. Beispiele für mögliche Reaktionspartner sind unter anderem Antigen und Antikörper, Enzym und Substrat und Nukleinsäuren und Bindungsprotein. Auf Grundlage ihrer individuellen chemischen Strukturen gelingt es mittels Affinitätschromatographie, nahezu alle Biomoleküle aus komplexen Gemischen zu isolieren [218, 219]. Der Analyt wird selektiv auf dem Säulenmaterial gebunden, Matrixbestandteile durchlaufen die Säule. Gebundene Analyten können entweder unspezifisch (Änderung von Temperatur, pH-Wert, Ionenstärke, Puffer, chaotrope Reagenzien) oder spezifisch (Haptenkompetition, Co-Substrat-Elution) eluiert werden [218].

Klassische Säulenmaterialien in der Affinitätschromatographie sind u. a. Agarose, Cellulose oder Sepharose. Diese Materialien eignen sich für die Anreicherung von Bakterien allerdings nur bedingt, da häufig ein hoher Rückdruck auftritt, welcher die Zellen zerstören kann. Sie besitzen auch häufig zu kleine Poren und einen zu geringen Massentransfer für Zellen. In der Literatur sind zwar Systeme zur Trennung von Zellen auf Basis dieser Materialien beschrieben [220-222], es werden aber immer häufiger Monolithe eingesetzt. Bei Monolithen handelt es sich um zusammenhängende stationäre Phasen, die in einem Stück als homogene Säulen in unterschiedlichen Größen hergestellt werden können.

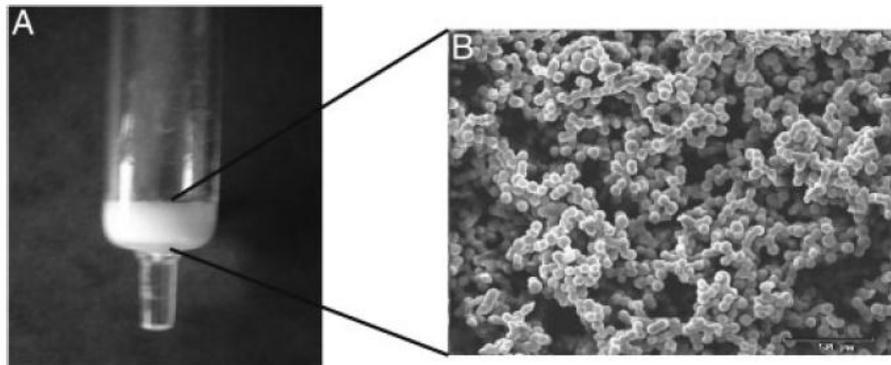


Abbildung 2.11: Monolithische Säule in Glaskörper (A) und Rasterelektronenmikroskopieaufnahme des monolithischen Materials mit 500-facher Vergrößerung (B) [223].

Über die Herstellung der agglomerierten, fibrösen Mikrostrukturen kann die Porengröße eingestellt werden. Monolithe besitzen ein zusammenhängendes Netzwerk aus Durchflusskanälen mit ausreichend großen Weiten, um den Mikroorganismen ein ungehindertes Durchströmen zu ermöglichen. Die gesamte mobile Phase fließt durch die Poren, wo eine schnelle Wechselwirkung der Bakterien mit der Oberfläche erfolgt. Die Wegstrecke für den Massentransfer zwischen den Poren ist damit viel kürzer als in porösen Partikeln. Aufgrund dieses minimierten diffusionskontrollierten Massentransfers wird die Effizienz von Biopolymertrennungen verbessert. Monolithe werden daher vorrangig zur Trennung von Makromolekülen, Proteinen und Viren eingesetzt [224, 225]. Der geringe auftretende Rückdruck bei monolithischen Säulen erlaubt hohe Fließgeschwindigkeiten und den Einsatz in Hochdurchsatzverfahren.

Für die Anreicherung von Bakterien sind monolithische Säulen unter Verwendung verschiedener Affinitätsliganden beschrieben [226-229]. Auch am Institut wurde eine Epoxid-basierte monolithische Säule zur Anreicherung von Bakterien entwickelt [223, 230]. Antikörper konnten als Affinitätsliganden über eine stufenweise Oberflächenmodifizierung

auf dem Säulenmaterial immobilisiert und zur effizienten Anreicherung von *Staphylococcus aureus* angewendet werden [223].

2.4.1.6 Immunomagnetische Separation

Bei der immunomagnetischen Separation (IMS) handelt es sich um eine selektive Methode zur Anreicherung von Bakterien, welche zwei Trennprinzipien kombiniert [231, 232]. Zur Anreicherung werden paramagnetische Nano- oder Mikropartikel eingesetzt, an die Antikörper gegen die Zielmoleküle gekoppelt sind. Die Bakterien können durch Inkubation mit den Partikeln über die selektive Antigen-Antikörper-Wechselwirkung gebunden werden. Mit Hilfe eines äußeren Magnetfeldes können die magnetischen Partikel mit den gebundenen Bakterien zurückgehalten und der Zielorganismus aus der Probe abgetrennt werden. Nicht-gebundene Bestandteile können durch Waschschrte entfernt werden. Die paramagnetischen Partikel zeigen nur bei Anlegen eines äußeren Magnetfeldes ein messbares magnetisches Moment. Wird dieses entfernt, liegen die Partikel monodispers und homogen verteilt in Lösung vor. So können die Bakterien-beladenen Partikel durch Entfernen des Magnetfeldes eluiert und in einem beliebigen Puffer resuspendiert werden. Die IMS kann daher in Kombination mit zahlreichen Analysemethoden verwendet werden [233-236].

Die Effektivität der immunomagnetischen Separation ist insbesondere abhängig von der Spezifität und Affinität der Antikörper. Daneben spielen außerdem die Größe und Oberfläche der Antikörper-beschichteten Partikel, der Elutionsprozess und die Probenmatrix eine Rolle [237].

Zur Anreicherung von Bakterien sind zahlreiche IMS-Systeme beschrieben [238-240] und auch kommerziell erhältlich. Auch für Legionellen konnte die IMS erfolgreich eingesetzt werden [99, 241, 242]. Gerade für Proben mit einer hohen Konzentration weiterer Bakterien konnte der Vorteil der IMS zur Abtrennung von *L. pneumophila* deutlich gemacht werden [242]. Die IMS eignet sich somit für die Anreicherung komplexer Proben, wie zum Beispiel von Biofilmen oder Kühlturmwasser. Allerdings stellt das geringe, einsetzbare Probenvolumen einen Nachteil der IMS dar [199]. In der Regel wird ein Probenvolumen von ≤ 10 mL eingesetzt [238-243]. Der volumetrische Anreicherungsfaktor liegt damit bei etwa 10 und hat nur begrenzt Potential zur Steigerung der Nachweissensitivität. Für die IMS sind daher Proben mit hoher Zellkonzentration notwendig, weshalb eine Voranreicherung der nachzuweisenden Bakterien über Kulturverfahren meist nicht vermieden werden kann [199].

Als weiterer Aspekt des geringen Probenvolumens ist die Repräsentation der Probenzusammensetzung zu bedenken, welche nur mit Hilfe möglichst großer Probenvolumina erhalten werden kann [197].

2.4.2 Anreicherung aus Luft

Da die Infektion mit Legionellen über kontaminierte Aerosole erfolgt, ist auch die Detektion in Bioaerosolen wichtig. Bei Bioaerosolen handelt es sich um luftgetragene Teilchen biologischer Herkunft, was Mikroorganismen, Pilze oder Pollen sowie deren Stoffwechselprodukte (z. B. Endotoxine, Mykotoxine) oder Bruchstücke beinhaltet. Über die Aktivität der biologischen Komponenten wird in dieser Definition keine Aussage gemacht [244]. Durch Dispersion fester oder flüssiger Materie in Luft werden Bioaerosole erzeugt. Eine Quelle Legionellen-haltiger Bioaerosole sind kontaminierte Wasserreservoirs, bei denen durch Vernebeln kontaminiertes Wasser in Form von Bioaerosolen freigesetzt wird. Luftgetragene biologische Partikel weisen aerodynamische Durchmesser in einem Bereich von 0,01 bis 100 µm auf und liegen häufig als lungengängige Partikel vor (< 10 µm), die tief in die Lunge eindringen und eine Infektion bedingen können [244]. Derzeit liegen kaum Informationen vor über die Korrelation der Legionellen-Konzentration in der flüssigen Phase und Gasphase bzw. über das Dosis-Wirkungs-Verhalten von *Legionella*-Aerosolen. Deshalb existieren bisher keine Vorschriften über Grenzwerte der Legionellen-Konzentration in Aerosolen. Um Exposition und Auswirkung Legionellen-haltiger Bioaerosole zu untersuchen, ist es wichtig luftgetragene Legionellen zu quantifizieren. Sowohl im Bereich der Bioaerosolprobenahme als auch der -analytik gibt es deshalb vielzählige Entwicklungen und Untersuchungen mit dem Ziel einer verbesserten Bioaerosol-Überwachung. Die Bioaerosol-Probenahme ist ein erster entscheidender Schritt zum Nachweis luftgetragener Bakterien. Dafür stehen verschiedene Geräte zur Verfügung, wobei der Sammelprozess auf unterschiedlichen physikalischen Prinzipien beruht. Je nach Anforderungen beim Sammelprozess und der anschließenden Analysemethode sollte ein geeignetes Sammelgerät ausgewählt werden.

2.4.2.1 Impaktor

Impaktoren machen den größten Anteil beschriebener Luftkeimsammler aus. Bei Impaktoren werden Partikel des Bioaerosols in einem Düsenstrahl beschleunigt, der senkrecht auf eine

Abscheideplatte gerichtet ist. Unmittelbar oberhalb der Abscheideplatte erfolgt eine Richtungsänderung des beschleunigten Luftstroms im Sammler. Partikel gewisser Größe können aufgrund ihrer Massenträgheit dieser Richtungsänderung nicht folgen und treffen auf die Abscheideplatte. Der Trenndurchmesser, der aerodynamische Durchmesser, bei dem das Sammelgerät eine Abscheideeffizienz von 50 % besitzt, wird unter anderem von der Strömungsgeschwindigkeit und Sammlergeometrie beeinflusst.

Zur Untersuchung von Mikroorganismen wird unter anderem der sechsstufige Andersen-Kaskaden-Impaktor eingesetzt [245, 246]. Bei diesem Sammler wird das Prinzip der mehrstufigen Impaktion angewendet. Durch eine stufenweise Änderung des Durchmessers der Einlassöffnung wird die Gasstromgeschwindigkeit variiert. Auf diese Weise können Aerosolpartikel in Abhängigkeit ihres aerodynamischen Durchmessers getrennt werden.

Die Abscheideoberfläche von Impaktoren besteht meistens aus einem mikrobiologischen Nähragar zur anschließenden Quantifizierung über einen Kulturnachweis. Der Nachteil dieses Sammelgerätes besteht demzufolge in der Limitierung der anwendbaren Analysemethoden. Bei einer längeren Sammeldauer kann es durch den Luftstrom zum Austrocknen der Agaroberfläche kommen, was die Kultivierbarkeit der Bakterien verringern und damit eine Unterbestimmung nach sich ziehen kann. Impaktoren zeichnen sich aber durch eine einfache Handhabung aus und erlauben die Probenahme an nahezu allen Orten.

2.4.2.2 Impinger

Bei Impingern handelt es sich um Impaktoren, bei denen die aus einer Düse austretenden Partikel mit hoher Geschwindigkeit senkrecht auf die Oberfläche einer Sammelflüssigkeit auftreffen. Die in die Flüssigkeit eintretende Trägerluft verdrängt die Flüssigkeit und entweicht in Form von Luftblasen aus dem Impinger. Im Gasstrom mitgeführte Partikel verbleiben dagegen in der Sammelflüssigkeit. Die Abscheidung hängt auch hier von der Partikelgröße und der Luftgeschwindigkeit beim Auftreffen ab.

Gegenüber Impaktoren weisen Impinger jedoch den Vorteil des frei wählbaren Sammelmediums auf. So können die Bedingungen den jeweiligen Anforderungen angepasst werden und es ist die Kombination mit beliebigen Quantifizierungsmethoden möglich.

Der Impinger AGI-30 (*all-glass impinger*) wurde schon früh als Referenzgerät vorgeschlagen [247], was sich in den darauffolgenden Jahrzehnten durchsetzte. Bei dem

AGI-30-Sammler (Abbildung 2.12) befindet sich das gewünschte Sammelmedium in einer Glasflasche. Die Sammelluft tritt durch ein Einlassrohr ein, welches sich nach unten hin zu einer Kapillare verjüngt und kurz oberhalb des Flaschenbodens endet.

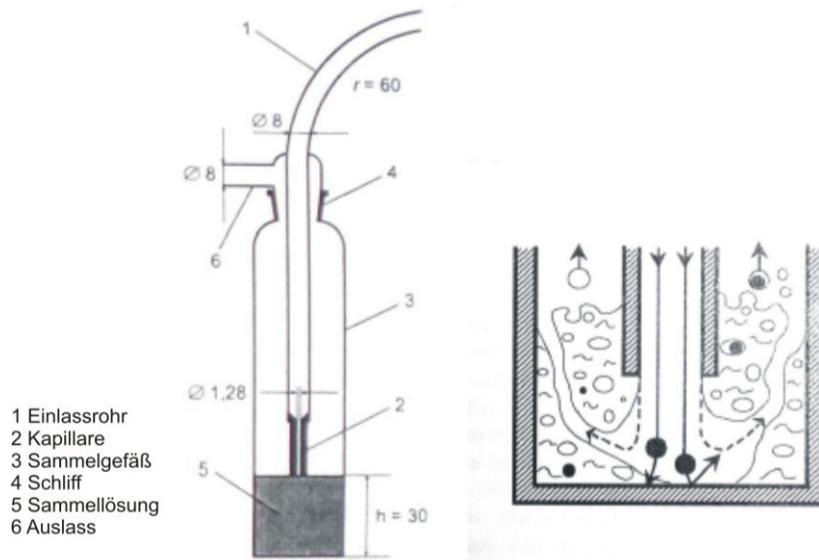


Abbildung 2.12: Skizze des AGI-30 [248] (links) und Prinzip der Abscheidung bei Impingern [249] (rechts).

Die Impinger-Sammelgeräte müssen nach jeder Probenahme gut gereinigt und keimfrei gemacht werden, um eine Kontamination darauffolgender Proben zu verhindern. Abgesehen davon ist die Handhabung relativ einfach. Weitere Nachteile sind eine relativ geringe Rückhalterate insbesondere für Partikel mit einem Durchmesser kleiner als $1 \mu\text{m}$ und ein bauartbedingter geringer maximaler Volumenstrom.

2.4.2.3 Zyklonabscheider

Bei Zyklonsammlern wird eintretende Luft beschleunigt und beim Durchströmen des Sammlers in eine immer enger werdende spiralförmige Bahn gezwungen. Gemäß ihrer Massenträgheit können die mitgeführten Partikel diesen Richtungsänderungen nicht standhalten und werden an der Innenwand des Sammelgefäßes abgeschieden.

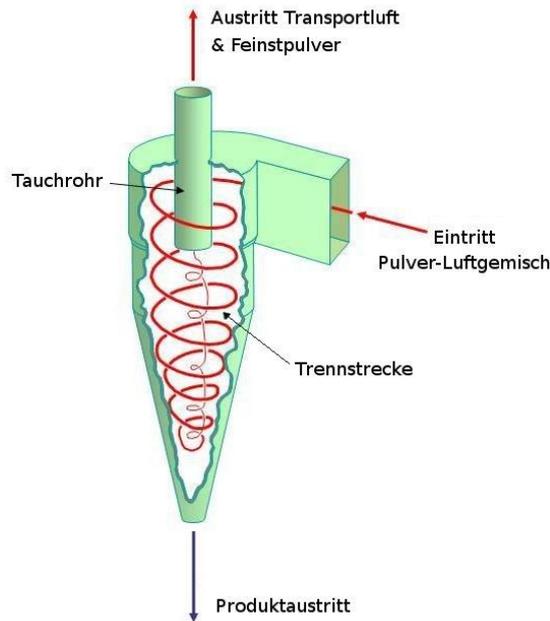


Abbildung 2.13: Prinzip bei der Abscheidung von Partikeln im Sammelgefäß eines Zyklonabscheiders [250].

Die Abscheidung der Partikel kann entweder auf einer trockenen oder feuchten Oberfläche erfolgen. Nach dem Sammeln auf trockener Oberfläche ist die Quantifizierung mittels Kultivierung allerdings ungeeignet, da sich eine hohe mechanische Belastung und ein kontinuierliches Austrocknen negativ auf die biologische Aktivität von Mikroorganismen auswirken. Bei der Abscheidung auf feuchter Oberfläche wird eine Flüssigkeit in das Sammelgefäß gegeben. Während des Sammelprozesses überträgt sich die starke Kreisbewegung der Luft durch Reibung auf die Sammelflüssigkeit und versetzt auch diese in eine schnelle Drehbewegung. Aufgrund starker Fliehkräfte benetzt die Flüssigkeit die Oberfläche des Sammelgefäßes als feiner Film. Ein Beispiel dieses Sammlertyps stellt der Sammler Coriolis μ dar. Auf der nassen Oberfläche wird zum einen die physikalische Belastung reduziert, zum anderen kann die Probe durch entsprechende Wahl der Sammelflüssigkeit beliebigen Quantifizierungsmethoden zugeführt werden. Bei Zyklonsammlern können außerdem sehr hohe Volumenströme von mehreren Hundert Litern pro Minute eingesetzt werden. Die Sammeleffizienz liegt jedoch deutlich unter 100 %.

2.4.2.4 Filtration

Bei der Sammlung mittels Filtration wird eine definierte Luftmenge durch einen Schwebstofffilter gesaugt, auf welchem die mitgeführten Partikel abgeschieden werden. Für

die Partikelabscheidung sind dabei Prozesse wie Diffusion, Impaktion, Interzeption und elektrostatische Kräfte verantwortlich. Zur Abscheidung von Mikroorganismen werden Oberflächen- oder Tiefenfilter aus Materialien wie Cellulosemischester, Polycarbonat oder Gelatine eingesetzt [251, 252]. Unter Verwendung der Filtrationssammlung kann eine hohe Abscheideeffizienz von über 90 % erzielt werden [253]. Allerdings kommt es beim Sammelprozess zum Austrocknen, was die Aktivität von Mikroorganismen deutlich beeinflussen kann [251]. An Standorten mit hoher Luftfeuchtigkeit ist die Verwendung von Filtrationssammlern nicht oder nur für kurze Sammelzeiten möglich, da es zur Kondensation auf dem Filter oder zum Auflösen des Filtermaterials kommen kann.

3 Ergebnisse und Diskussion

3.1 Stopped-Flow-Sandwich-Immunoassay

Bei dem im Rahmen dieser Arbeit angewendeten Nachweisverfahren für Bakterien handelt es sich um einen Sandwich-Immunoassay, der auf eine Durchfluss-Mikroarray-Plattform übertragen wurde (Abbildung 3.1).

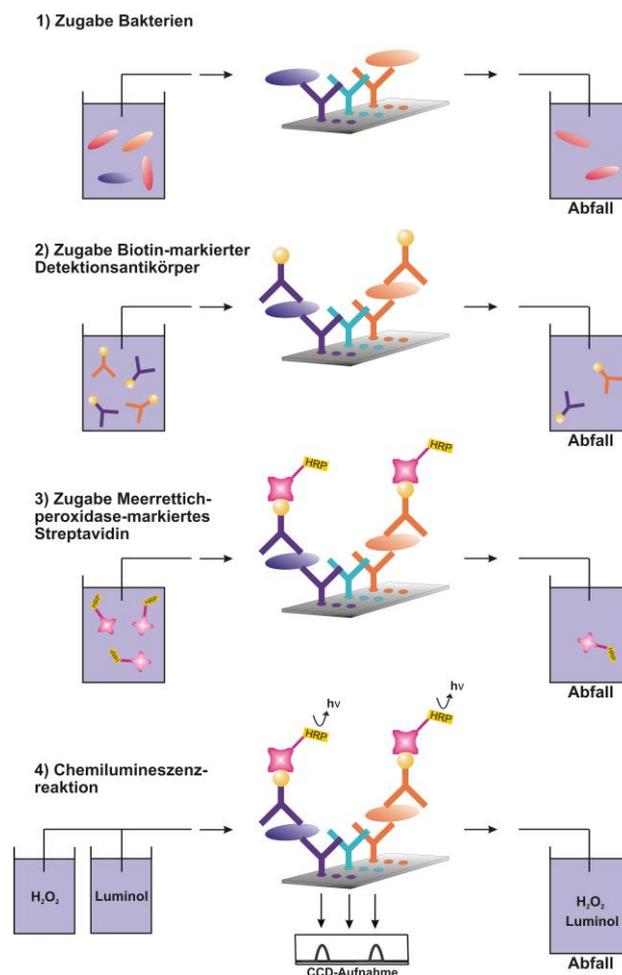


Abbildung 3.1: Nachweisprinzip von Bakterien mittels Antikörper-Mikroarrays und Durchfluss-Auslesesystem.

Antikörper wurden auf Polyethylenglykol-modifizierten Glasobjektträgern immobilisiert und dienten als selektive Fängermoleküle für Bakterien. Die Zugabe eines zweiten Antikörpers (Biotin-markierter Detektionsantikörper) ermöglichte die Ausbildung eines Sandwich-Immunoassays an den Stellen des Mikroarrays, an denen Bakterien durch die Fängermoleküle gebunden worden sind. Die Signalerzeugung erfolgte unter Verwendung eines Streptavidin-Peroxidase(HRP)-Konjugats, welches mit hoher Affinität an das Biotin-Molekül der

Detektionsantikörper bindet. Die Photonen der HRP-katalysierten Chemilumineszenzreaktion von Luminol und H₂O₂ wurden mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet.

Das beschriebene Nachweisverfahren wurde in vorhergehenden Arbeiten bereits erfolgreich zur Detektion von Bakterien eingesetzt [28] und im Rahmen dieser Arbeit verwendet. In vorhergehenden Arbeiten konnten inaktivierte *L. pneumophila* mit einer Nachweisgrenze von $1 \cdot 10^5$ Z/mL und einem Arbeitsbereich von $3 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^8$ Z/mL gemessen werden (Tabelle 3.1). Im Rahmen dieser Arbeit wurden mit dem bestehenden Messprogramm sowohl lebende als auch inaktivierte Zellen des *E. coli*-Wildtyps K12 detektiert. Die ermittelte Nachweisgrenze für lebende Bakterien lag bei $5 \cdot 10^7$ Z/mL, der Arbeitsbereich betrug $5 \cdot 10^7 - 5 \cdot 10^8$ Z/mL. Für inaktivierte *E. coli* wurden eine Nachweisgrenze von $7 \cdot 10^6$ Z/mL und ein Arbeitsbereich von $5 \cdot 10^7 - 5 \cdot 10^8$ Z/mL erhalten (Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Mikroarray-interne Nachweisgrenzen und Arbeitsbereiche für die Messung von *E. coli* und *L. pneumophila* mittels Antikörper-Mikroarrays vor Optimierung der Messbedingungen.

	Nachweisgrenze [Z/mL]	Arbeitsbereich [Z/mL]	Literatur
<i>E. coli</i> inaktiviert	$7 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^7 - 5 \cdot 10^8$	
<i>E. coli</i> lebend	$5 \cdot 10^7$	$5 \cdot 10^7 - 5 \cdot 10^8$	
<i>L. pneumophila</i> inaktiviert	$1 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^8$	[28]

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Anwendung des Antikörper-Mikroarrays für Wasser- und Luftproben. Das bestehende Assayprogramm bot nicht die Möglichkeit, die für Umweltproben relevanten Bakterienkonzentrationen nachzuweisen. Ein weiterer Aspekt war die Anwendbarkeit des Messprogramms für lebende Bakterien, welche für weiterführende Arbeiten angestrebt war. Der Messablauf sollte für lebende Bakterien anwendbar sein und durch Variation verschiedener Parameter bezüglich der Nachweisstärke für lebende und inaktivierte Bakterien optimiert werden.

Für die Mikroarray-Messung gelten die in Kapitel 2.3.3 beschriebenen Massentransport-limitierungen. Die verwendeten Durchfluss-Mikroarrays besitzen mehrere aktive Antikörper-Spots auf der Oberfläche. Das aktive Volumen zur Bindung der Bakterien ist gegenüber dem Volumen der Flusszelle allerdings begrenzt. Der Durchmesser eines Antikörper-Spots beträgt durchschnittlich 450 µm. Dieser macht nur einen geringen Anteil bezüglich der Abmessungen der Flusszelle (6,4 cm x 0,8 cm x 0,01 cm) aus. Bakterienzellen, die sich im Volumenelement in der direkten Umgebung eines Spots befinden, haben die Möglichkeit durch Diffusion zu

den immobilisierten Antikörpern zu gelangen und daran zu binden. Die Konzentration nicht gebundener Bakterienzellen in der Umgebung des Spots wird verringert. Weiter entfernte Bakterien haben aufgrund von Massentransportlimitierungen keine Möglichkeit zur Bindung. Mit Hilfe des Durchflusssystems können Bakterienzellen durch Konvektion in die unmittelbare Umgebung der Fängerantikörper transportiert werden. Zur Optimierung der Durchflussbedingungen wurde bei der Zugabe der Bakterienprobe das Stopped-Flow-Prinzip eingeführt (Abbildung 3.2).

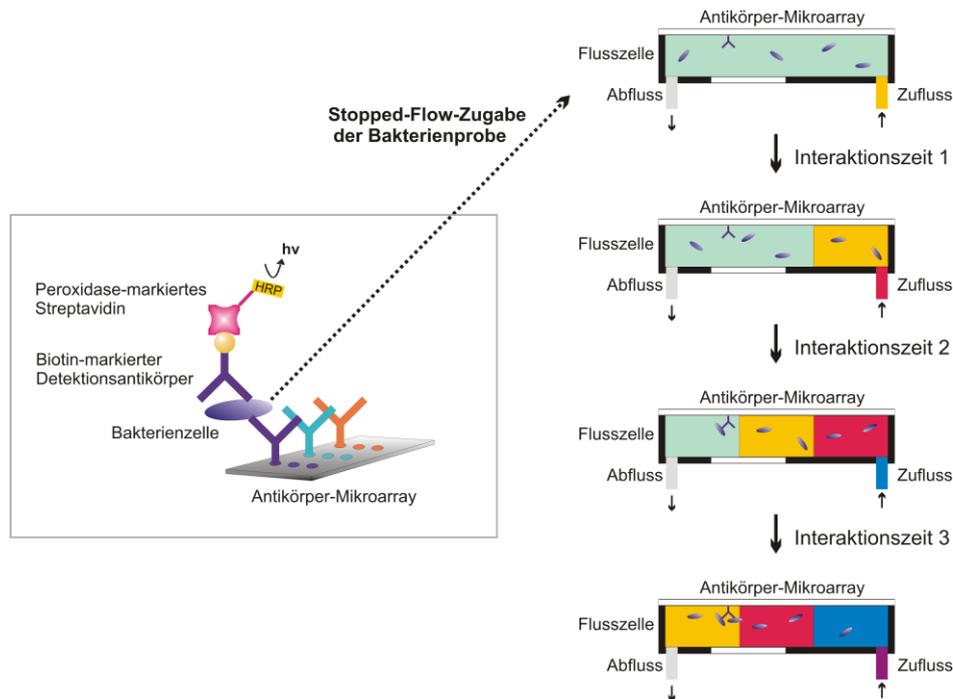


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des Stopped-Flow-Prinzips zur Messung von Bakterien. Verschieden farbige Rechtecke symbolisieren 20- μ L-Volumeneinheiten der Bakterienprobe.

Das Gesamtvolumen der Bakterienprobe wird in Volumenelementen von 20 μ L über den Mikroarray gegeben, wobei sich diese abwechselnd ruhend im System befinden bzw. weitergepumpt werden. Mit dieser Technik haben Bakterien in einem Volumenelement der Probe eine ausreichend hohe Interaktionszeit mit den immobilisierten Antikörpern auf der Mikroarray-Oberfläche. Anschließend wird die Flüssigkeit weitergeleitet und das nächste Volumenelement gelangt in die direkte Umgebung eines Antikörper-Spots. Mittels Konvektion werden so wiederholt Bakterien-reiche Volumenelemente nachgeliefert. Es kann eine höhere Anzahl an Bakterien auf der Mikroarray-Oberfläche gebunden werden, indem wiederholt Bakterien-reiche Volumenelemente in die Nähe der immobilisierten Antikörper gebracht werden und dort eine ausreichende Inkubationszeit haben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Stopped-Flow-Methode für Antikörper-Mikroarrays zur Detektion lebender *E. coli* optimiert. Der nicht pathogene *E. coli*-Stamm diente als Modellorganismus für lebende Bakterien. Anschließend erfolgte ebenfalls die Messung inaktivierter *L. pneumophila* unter Verwendung des optimierten Stopped-Flow-Immunoassays. Um die Stopped-Flow-Methode zu optimieren, wurden verschiedene Parameter untersucht.

3.1.1 Interaktionszeit

Der Einfluss der Interaktionszeit der einzelnen Volumenelemente bei der Stopped-Flow-Zugabe auf die Signalintensität wurde für die Messung von *E. coli*-Zellen untersucht. Die verwendete *E. coli*-Konzentration war $2 \cdot 10^8$ Z/mL und das Probenvolumen betrug 1,2 mL. Die Interaktionszeiten und Assayzeiten, die sich aus den Interaktionszeiten für insgesamt 30 Volumenelemente ergaben, sind in Tabelle 3.2 wiedergegeben.

Tabelle 3.2: Unterschiedliche Interaktionszeiten bei der Stopped-Flow-Zugabe der Bakterien und sich ergebende Assayzeiten für die Zugabe von 30 Volumenelementen.

Interaktionszeit der einzelnen Volumenelemente [s]	Assaydauer [min]
1,2	13
12	19
36	31
54	40
108	67
300	163
480	253
940	483

Die *E. coli*-Suspension wurde mit einer Geschwindigkeit von 20 $\mu\text{L/s}$ durch die Flusszelle gepumpt. Die Bakterien, Detektionsantikörper und Streptavidin-HRP wurden nacheinander über den Mikroarray gegeben. In Abbildung 3.3 sind das CL-Signal und das Mikroarray-Hintergrundsignal gegen die Interaktionszeit der einzelnen 20- μL -Volumenelemente aufgetragen.

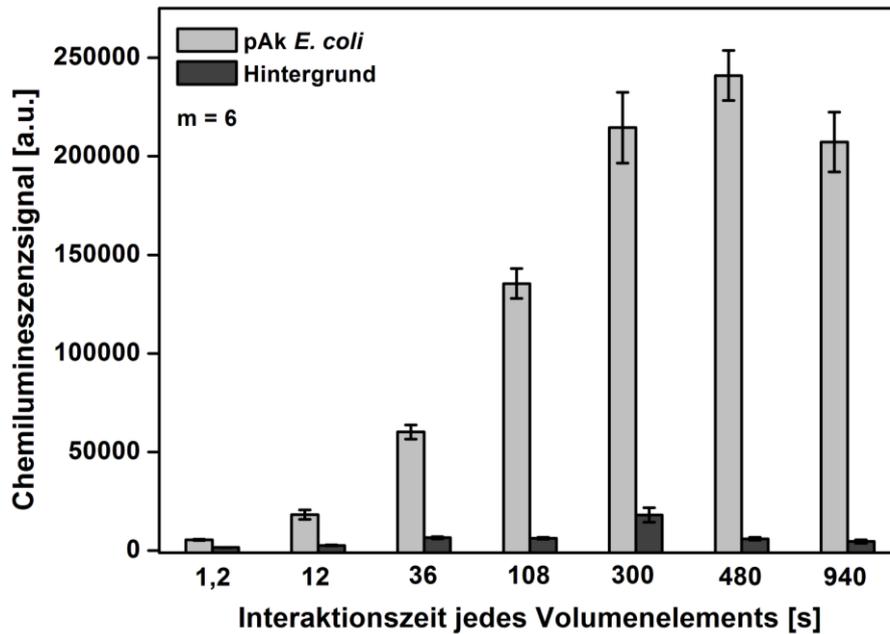


Abbildung 3.3: Chemilumineszenz- und Hintergrundsignale in Abhängigkeit der Interaktionszeit jedes Volumenelements bei der Stopped-Flow-Zugabe von $2 \cdot 10^8$ *E. coli*-Zellen pro mL.

Für die kürzeste Interaktionszeit von 1,2 s wurde lediglich ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von 3 erhalten. Das Signal konnte somit kaum vom Mikroarray-Hintergrund unterschieden werden. Die Erhöhung der Interaktionszeit bewirkte eine deutliche Steigerung des Messsignals. Für Interaktionszeiten oberhalb von 300 s wurden unter Berücksichtigung der Standardabweichungen ähnliche Signale erhalten. Für das Hintergrundsignal der Mikroarray-Oberfläche konnte der Trend der Signalerhöhung nicht festgestellt werden. Das Hintergrundsignal blieb bei Veränderung der Interaktionszeit im Rahmen geringer Schwankungen konstant. Die höchsten CL-Signale wurden für 480 s Interaktionszeit erhalten. Das maximal erreichte Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis betrug 45. Die maximal erreichbare Beladung immobilisierter Antikörper mit Bakterien führte zu einem Signalanstieg um den Faktor 60. In einem flachen Kanal von 100 μm Höhe sollte es für *E. coli* mit einer Sedimentationsgeschwindigkeit von 0,52 $\mu\text{m/s}$ [184] innerhalb von 200 s zur Sedimentation der Bakterien kommen. Da sich der Mikroarray oberhalb der Flusszelle befindet, sollte dies zu einer Limitierung des Messsignals führen. Das Messsignal sollte auch für längere Inkubationszeiten nicht mehr ansteigen. Allerdings wird eine längere Inkubationszeit benötigt, um eine Sättigung des Signalanstiegs zu erhalten. Dies deutet darauf hin, dass die Beweglichkeit lebender *E. coli* durch Flagellen/Geißeln nicht zu vernachlässigen ist. Lebende *E. coli* können sich mit Geschwindigkeiten von etwa 30 - 40 $\mu\text{m/s}$ bewegen [254] und so vermutlich dem Absinken der Bakterien nach unten entgegenwirken. Bei der Interaktionszeit

gilt es, den optimalen Wert zu wählen, bei dem eine ausreichende Inkubationszeit die Diffusion und Bindung der Bakterien an die Antikörper ermöglicht, bevor die Sedimentation erfolgt. Für einen Versuchsaufbau, bei dem der Mikroarray auf der Unterseite platziert ist, könnte der Effekt der Sedimentation genutzt werden, um die Sensitivität weiter zu erhöhen.

In vorangegangenen Arbeiten [28] wurde für die Quantifizierung Hitze-inaktivierter pathogener Bakterien eine Inkubationszeit von 1,2 s eingesetzt. Unter Verwendung der Stopped-Flow-Methode könnte hierbei die Sensitivität weiter verbessert werden. Der Vorteil der kürzeren Inkubationszeit von 1,2 s liegt in einer kürzeren Assayzeit, wobei Hitze-inaktivierte Bakterien innerhalb von 15 min gemessen wurden. Da die Analysezeit für die Quantifizierung von Bakterien eine wichtige Größe ist, wurde eine vertretbare Inkubationszeit von 108 s festgelegt, woraus sich eine Messdauer von 67 min ergab. Im Vergleich zu der Inkubationszeit von 1,2 s wird dabei das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis um den Faktor 7 verbessert.

3.1.2 Interaktionszeit mit Vorinkubation

Die Signalabhängigkeit von der Stopped-Flow-Interaktionszeit wurde außerdem für eine Vorinkubation von Bakterien und Detektionsantikörpern vor der Messung untersucht. Die Gleichgewichtsreaktion erfolgte in homogener Phase mit einer Inkubationszeit von einer Stunde. Die Reagenzienkonzentrationen entsprachen denjenigen, wie sie für die Messungen ohne Vorinkubation eingesetzt wurden, $2 \cdot 10^8$ *E. coli*/mL und 10 µg/mL für die Detektionsantikörper. In Abbildung 3.4 werden Messsignale und Hintergrundsignale in Abhängigkeit von der Interaktionszeit für die Durchführung einer Vorinkubation dargestellt.

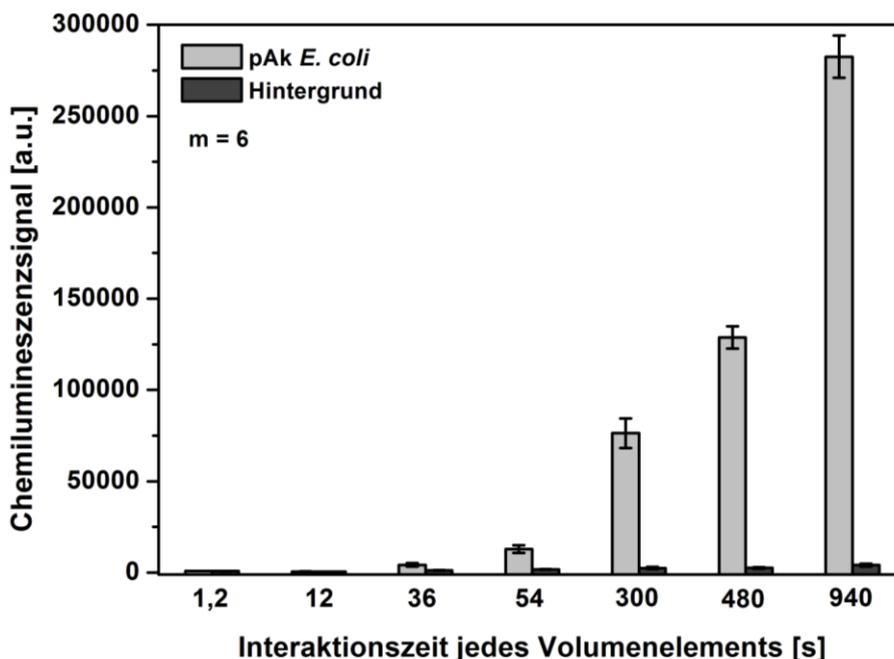


Abbildung 3.4: Chemilumineszenz- und Hintergrundsignale in Abhängigkeit der Interaktionszeit jedes Volumenelements bei der Stopped-Flow-Zugabe von $2 \cdot 10^8$ *E. coli*-Zellen/mL nach Vorinkubation mit Detektionsantikörpern.

Der grundlegende Trend stimmte mit den Messungen ohne Vorinkubation überein. Es wurde ebenfalls ein Anstieg des Messsignals mit Erhöhung der Interaktionszeit beobachtet. Bezüglich des Hintergrundsignals konnte lediglich eine minimale Zunahme mit Erhöhung der Interaktionszeit festgestellt werden. Für die kürzeste getestete Interaktionszeit lag das Messsignal im Bereich des Mikroarray-Hintergrunds. Bei einer Interaktionszeit von 480 s konnte ein Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von 50 erzielt werden. Im Gegensatz zu den Messungen ohne Vorinkubation trat nach Vorinkubation für Interaktionszeiten von 300, 480 und 940 s weiterhin ein linearer Signalanstieg auf. Um Unterschiede der Ergebnisse mit bzw. ohne Vorinkubation deutlicher darzustellen, wurden die Datensätze in Abbildung 3.5 verglichen und im Folgenden diskutiert.

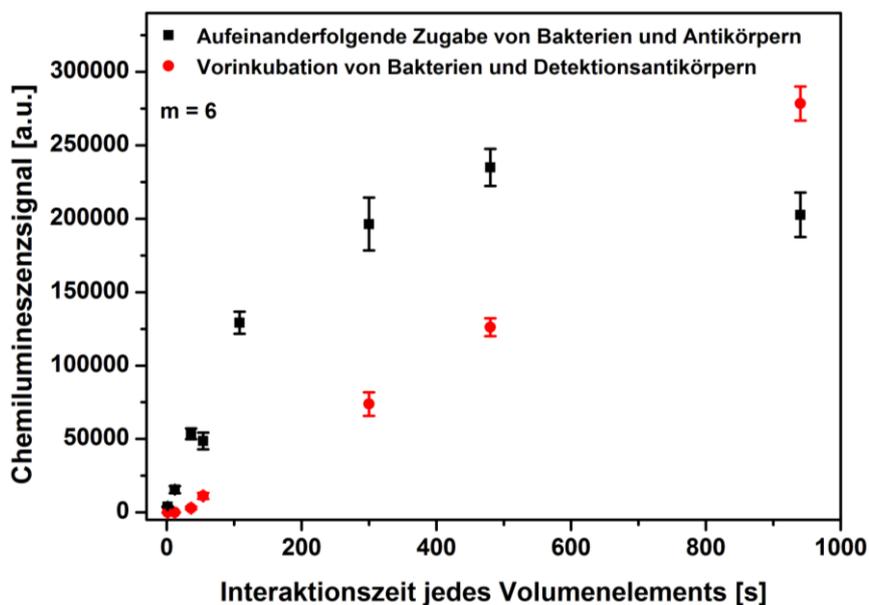


Abbildung 3.5: Chemilumineszenzsignal in Abhängigkeit der Interaktionszeit jedes Volumenelements bei der Stopped-Flow-Zugabe von $2 \cdot 10^8$ *E. coli*-Zellen pro mL.

Ein Vergleich der Messung mit bzw. ohne Vorinkubation (Abbildung 3.5) zeigt, dass die CL-Signale für vorinkubierte Bakterien mit Interaktionszeiten im Bereich von 36 bis 480 s zu etwa 50 % geringeren Signalen führten. Das höchste Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von 69 wurde für die vorinkubierte Bakteriensuspension nach einer Interaktionszeit von 940 s erreicht. Im Gegensatz zu den Messungen ohne Vorinkubation wurde nach Vorinkubation für längere Interaktionszeiten als 300 s weiterhin ein linearer Signalanstieg erhalten. Das maximal erzielte Signal lag für die Messungen mit vorinkubierten Reagenzien höher. Ohne Vorinkubation wurde für Interaktionszeiten > 300 s eine Sättigung des Signals erhalten. Mit Vorinkubation dagegen wurde im gesamten Bereich von 1,2 bis 940 s ein linearer Signalanstieg beobachtet. Der Signalanstieg im Bereich der kürzeren, für die Anwendung relevanten Interaktionszeiten verlief allerdings wesentlich flacher. Die Signalsättigung, welche die maximal mögliche Beladung der Mikroarrayoberfläche mit Bakterien widerspiegelt, konnte ohne Vorinkubation bereits bei geringeren Interaktionszeiten erreicht werden. Dieser Unterschied kann auf zwei Ursachen zurückgeführt werden. Zum einen können die Detektionsantikörper aufgrund der Vorinkubation an die gesamte Oberfläche der Bakterienzellen binden und damit die Bindungsstellen für die Fängerantikörper verringern oder sterisch behindern. Ohne Vorinkubation steht den Fängerantikörpern dagegen die maximale Anzahl an Bindungsstellen zu Verfügung. Zum anderen wird die Größe der Bakterienzellen durch die Bindung an die Detektionsantikörper weiterhin erhöht, was wiederum deren Diffusionskoeffizienten erniedrigt.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die nacheinander erfolgende Zugabe von Bakterien und Detektionsantikörpern in Bezug auf Nachweisstärke und eine möglichst kurze Messdauer effektiver war.

3.1.3 Anzahl der 20- μ L-Interaktionsschritte

Um das Binden einer möglichst hohen Bakterienzahl an die immobilisierten Antikörper weiter zu optimieren, wurde der Einfluss der Anzahl zugegebener 20- μ L-Volumenelemente mittels Stopped-Flow-Prinzip untersucht. Es wurden *E. coli* mit einer Konzentration von $2 \cdot 10^8$ Z/mL eingesetzt. Die Interaktionszeit der einzelnen Volumenintervalle betrug 54 s. Die Anzahl an Stopped-Flow-Volumenelementen und somit das Gesamtvolumen der Bakterienprobe wurden variiert. Die Zugabe des gesamten Probenvolumens erfolgte in zwei Schritten. Zunächst wurden 0,6 mL mit einer Geschwindigkeit von 20 μ L/s kontinuierlich über den Mikroarray gegeben, welches der langsamsten Geschwindigkeit entspricht, die für das Auslesesystem anwendbar war. Das restliche Probenvolumen wurde gemäß dem Stopped-Flow-Prinzip in 20- μ L-Volumenelementen zugegeben. Aus der Anzahl an Volumenelementen ergab sich das Gesamtvolumen der Bakteriensuspension. Es wurden 20, 30, 60, 100 und 250 Interaktionsschritte verwendet. Daraus ergaben sich Gesamtprobenvolumina von 1,0, 1,2, 1,8, 2,6 und 5,6 mL. Das CL-Signal, abhängig von der Anzahl an Volumenelementen, ist in Abbildung 3.6 dargestellt.

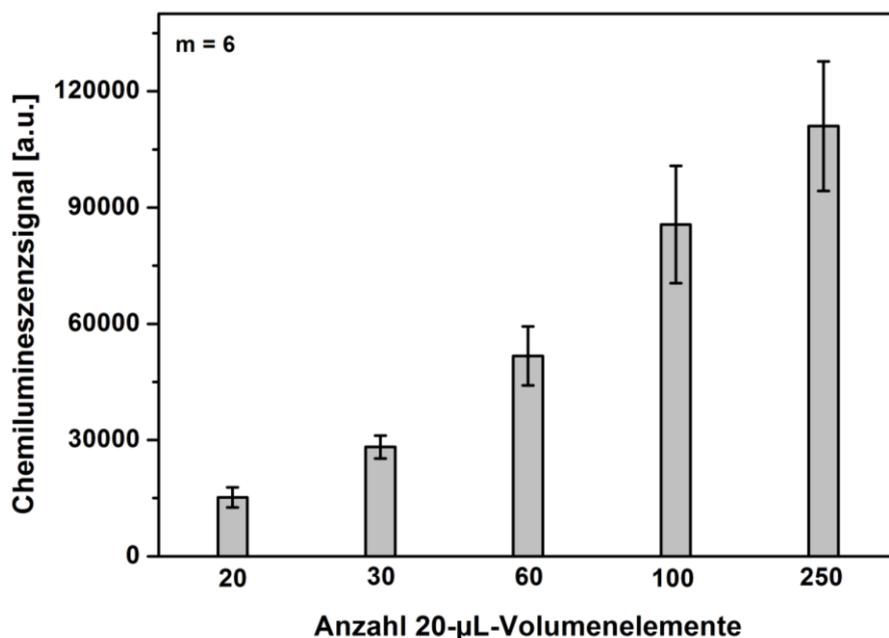


Abbildung 3.6: Chemilumineszenzsignal in Abhängigkeit der Anzahl an zugegebenen 20- μ L-Volumenelementen für die Messung von $2 \cdot 10^8$ Z/mL.

Insgesamt stieg das Messsignal für die maximal verwendete Anzahl an Volumeneinheiten (250) um das Siebenfache gegenüber der geringsten Anzahl (20). Bei der Verwendung von bis zu 100 Volumeneinheiten wurde ein starker Signalanstieg erhalten. Für die ersten drei Messpunkte führte eine Erhöhung um 30 Volumeneinheiten zu einem 1,8-fachen Signalanstieg. Bei einer weiteren Erhöhung der Volumenelemente flachte der Trend der Signalsteigerung etwas ab. Um eine gleichwertige Signalsteigerung zu erreichen, war eine Erhöhung um 40 Volumenelemente notwendig. Bei der Verwendung von bis zu 100 Stopped-Flow-Volumeneinheiten war für die Bindung der Bakterien an die Antikörper noch keine Absättigung erreicht. Diese wurde erst bei einer höheren Anzahl an Volumeneinheiten erhalten. Der Signalanstieg verlief deutlich flacher. Eine weitere Signalsteigerung um das 1,3-fache wurde erst bei einer Erhöhung um 150 Volumeneinheiten erreicht. Die Signalsättigung wurde bei der Zugabe von 250 Volumeneinheiten und damit einer Assayzeit von fast vier Stunden erhalten. Es konnte ebenfalls beobachtet werden, dass das Hintergrundsignal und die Standardabweichung der Spot-Replikate mit Erhöhung der Anzahl an Volumenelementen anstiegen. Aufgrund der höheren eingesetzten Zellzahl konnten zwar mehr Bakterien von den immobilisierten Antikörpern gebunden werden, die unspezifische Adsorption von Bakterien auf der Mikroarray-Oberfläche wurde allerdings ebenfalls erhöht. Hinsichtlich eines hohen Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses und einer möglichst kurzen Analysezeit wurde die Verwendung von 30 Stopped-Flow-Volumeneinheiten als optimale Bedingung festgelegt. Gegenüber der Zugabe von 20 Volumeneinheiten ergaben sich bei Zugabe von 30 Einheiten eine Verdopplung der Signalintensität und ein verbessertes Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis von 14 (Faktor 1,5).

3.1.4 Optimierter Stopped-Flow-Mikroarray-Immunoassay

Unter Berücksichtigung aller Ergebnisse erwies sich die Stopped-Flow-Methode als optimaler Messablauf für die Zugabe der Bakterien mit einer Interaktionszeit von 108 s für jedes der 30 Volumenelemente. Die Reagenzien sollten für die Messung nacheinander über den Mikroarray geleitet werden. Mit diesem Messprogramm ergab sich eine Analysezeit von 67 Minuten.

3.1.5 Vergleich Stopped-Flow-Zugabe und kontinuierliche Zugabe

Die Anwendung der optimierten Stopped-Flow-Methode wurde für die Messung von *E. coli* ($8 \cdot 10^8$ Z/mL) mit einer kontinuierlichen Zugabe verglichen. Bei der kontinuierlichen Zugabe wurde das gesamte Probenvolumen von 1,2 mL über den Mikroarray gepumpt, wobei vier unterschiedliche Fließgeschwindigkeiten (20, 5, 1 und $0,5 \mu\text{L/s}$) verwendet wurden. Eine Verringerung der Fließgeschwindigkeit, und damit eine längere Zeit der Wechselwirkung von Bakterien und Antikörpern, führten zu einer Erhöhung des Signals bei gleichbleibender Bakterienkonzentration. Allerdings konnten auch mit den niedrigsten eingesetzten Fließgeschwindigkeiten nur schwache Signale erhalten werden. Mit Fließgeschwindigkeiten von $20 \mu\text{L/s}$ und $5 \mu\text{L/s}$ waren die Signale nicht bzw. kaum vom Mikroarray-Hintergrund zu unterscheiden. Während für das Hintergrundsignal ein Summenwert von etwa 500 a.u. ermittelt wurde, lagen die Signale der Antikörper-Spots bei 517 a.u. ($20 \mu\text{L/s}$) und 675 a.u. ($5 \mu\text{L/s}$). Die Messung der gleichen *E. coli*-Konzentration mit dem Stopped-Flow-Prinzip (108 s Interaktionszeit, $20 \mu\text{L/s}$ Fließgeschwindigkeit der Volumenelemente, Probenvolumen 1,2 mL) führte zu deutlich intensiveren Signalen (100.783 a.u.). In Abbildung 3.7 und 3.8 wird dies verdeutlicht.

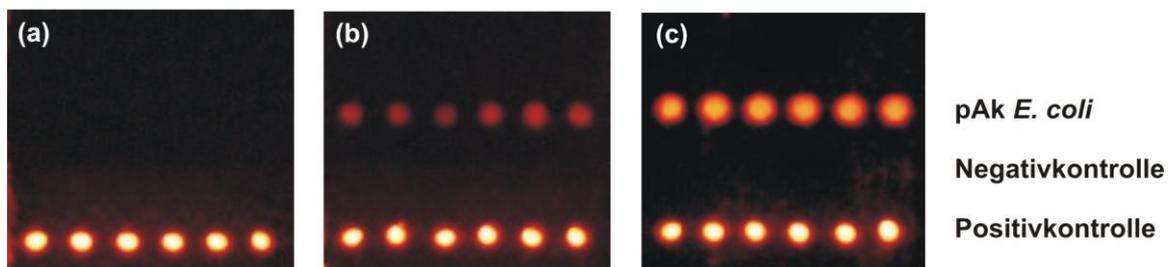


Abbildung 3.7: Chemilumineszenzsignale für die Messung von $8 \cdot 10^8$ *E. coli*/mL bei Bakterienzugabe mit einem kontinuierlichen Fluss von $20 \mu\text{L/s}$ (a) bzw. $0,5 \mu\text{L/s}$ (b) und unter Anwendung des Stopped-Flow-Prinzips (c). Die auf dem Mikroarray immobilisierten Antikörper sind seitlich der Messbilder aufgeführt.

Vergleicht man die kontinuierliche Bakterienzugabe mit dem Stopped-Flow-Prinzip für die gleiche Fließgeschwindigkeit von $20 \mu\text{L/s}$, zeigt sich ein bedeutender Unterschied der beiden Methoden. Das Signal bei kontinuierlichem Fluss lag im Bereich des Mikroarray-Hintergrundsignals. Das Signal mit der Stopped-Flow-Methode war in etwa 600-fach höher. Durch die eingeführten Interaktionszeiten ergibt sich allerdings für die Stopped-Flow-Zugabe eine längere Assaydauer von 67 Minuten im Vergleich zu 14 Minuten bei kontinuierlicher Zugabe. Durch die Wahl niedriger kontinuierlicher Fließgeschwindigkeiten (5; 1 und $0,5 \mu\text{L/s}$; Assaydauer: 17; 33 und 53 min) konnte das Signal um das 100-fache erhöht werden.

Die Signalintensität für die Stopped-Flow-Zugabe konnte aber auch bei ähnlicher Assaydauer nicht erreicht werden.

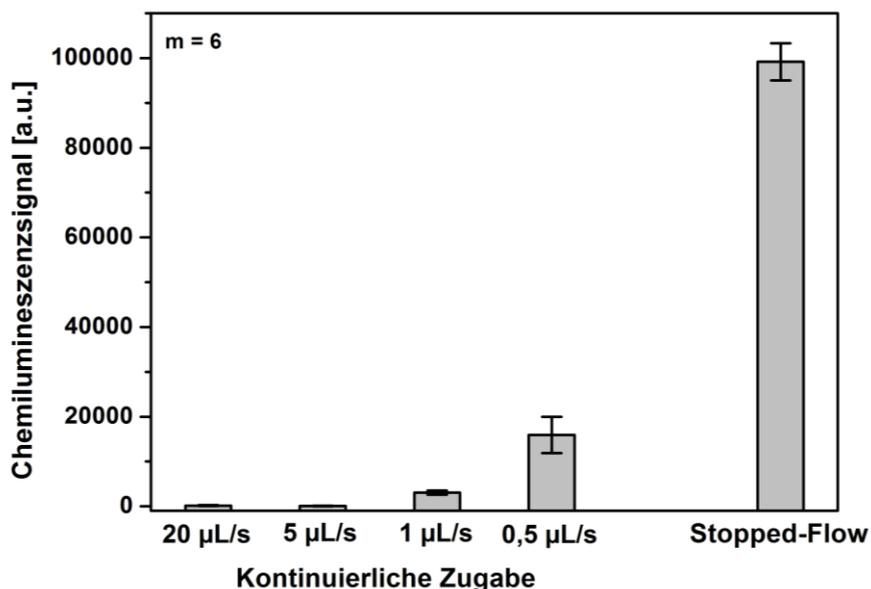


Abbildung 3.8: Chemilumineszenzsignale für die Messung von *E. coli* ($8 \cdot 10^8$ Z/mL) im Vergleich von kontinuierlicher Bakterienzugabe und dem Stopped-Flow-Prinzip.

Die verfügbare Reaktionszeit der Bakterien mit den immobilisierten Antikörpern war bei der kontinuierlichen Zugabe vermutlich zu gering. Bei der Stopped-Flow-Zugabe wurde die Probe in Portionen in die Flusszelle geleitet. Jedes Volumenelement hatte eine gewisse Zeit zur Wechselwirkung, bevor das Weiterpumpen erfolgte. Diese Methode, bei dem Volumenelemente abwechselnd im Bereich des Mikroarrays inkubiert und weitergepumpt werden, liefert bessere Bedingungen zur Wechselwirkung und damit höhere Signale bei vergleichbarer Assaydauer. Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass das Stopped-Flow-Prinzip eine geeignete Methode für den Nachweis lebender Bakterien ist. Für die Messung von $2 \cdot 10^8$ *E. coli*/mL konnte das Signal im Vergleich zur Detektion mit dem zuvor angewendeten Messprogramm [28] um ein Vielfaches (Faktor 33) erhöht werden. Für eine weitere Bewertung wurde eine Kalibrierung durchgeführt. Das optimierte Messprogramm sollte zunächst für die Kalibrierung lebender *E. coli* und anschließend für *L. pneumophila* angewendet und bewertet werden.

3.1.6 Mikroarray-Kalibrierung von *E. coli*

Vor der Erstellung einer Kalibrierkurve wurden für das optimierte Messprogramm die Konzentrationen der Assayreagenzien variiert. Ein Vorteil des verwendeten Assaysystems ist,

dass sowohl für die Detektionsantikörper als auch für das signalerzeugende Streptavidin-HRP-Konjugat die optimale Konzentration gewählt werden kann. In Abbildung 3.9 und 3.10 sind die Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisse für die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen des Detektionsantikörpers bzw. von Streptavidin-HRP aufgetragen.

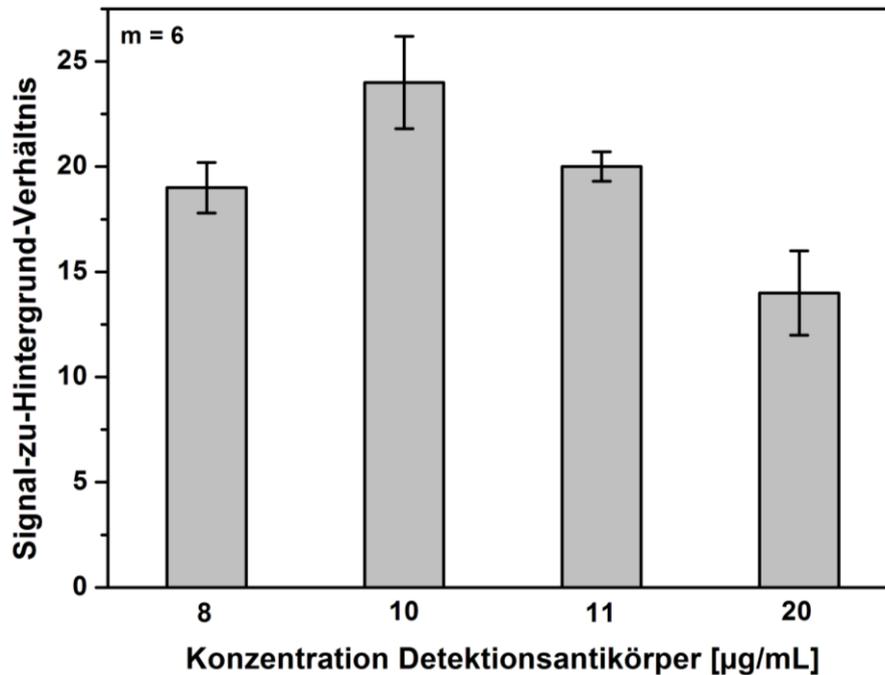


Abbildung 3.9: Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis bei der Messung von *E. coli* ($5 \cdot 10^7$ Z/mL) in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration der Detektionsantikörper.

Die Betrachtung des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses ist bei der Variation von Assayreagenzien besonders wichtig, da eine Konzentrationserhöhung neben der Steigerung des Messsignals häufig auch einen deutlichen Anstieg des Hintergrundsignals durch unspezifische Adsorption auf der Oberfläche nach sich zieht. Dies konnte auch bei der Optimierung der Antikörperkonzentration beobachtet werden. Eine Erhöhung auf 10 µg Antikörper/mL steigerte das Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Eine weitere Erhöhung der Antikörperkonzentration führte allerdings zu einer kontinuierlichen Abnahme des Signal-zu-Hintergrund-Verhältnisses. Mit dem Messsignal stieg auch das Hintergrundsignal stark an. Das beste Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis (24) wurde für eine Antikörperkonzentration von 10 µg/mL erhalten.

Bei Streptavidin-HRP wurde für eine Konzentration von 0,2 µg/mL das höchste Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis erhalten. Die Erhöhung der Konzentration führte zu einer Verstärkung des Hintergrundsignals und damit zu einer deutlichen Verschlechterung des Signal-zu-

Hintergrund-Verhältnisses. Für weiterführende Messungen wurde eine Antikörperkonzentration von 10 µg/mL und 0,2 µg/mL Streptavidin-HRP festgelegt.

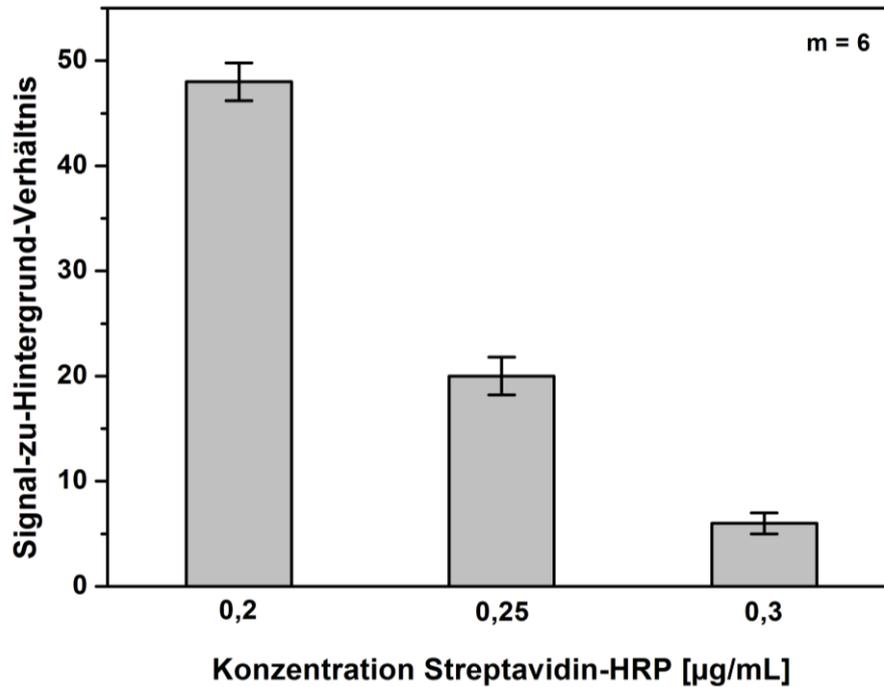


Abbildung 3.10: Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis bei der Messung von *E. coli* ($5 \cdot 10^7$ Z/mL) in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentration von Streptavidin-HRP.

Unter Verwendung des optimierten Stopped-Flow-Messprogramms wurde eine Kalibrierkurve lebender *E. coli*-Zellen aufgenommen. Die gemessenen *E. coli*-Konzentrationen betragen 0 bis $5 \cdot 10^8$ Zellen/mL. Durch einfach- bzw. doppellogarithmische Auftragung der CL-Signale gegen die gemessenen Konzentrationen wurde die Kalibrierfunktion bzw. der lineare Bereich der Kalibrierfunktion erhalten (Abbildung 3.11).

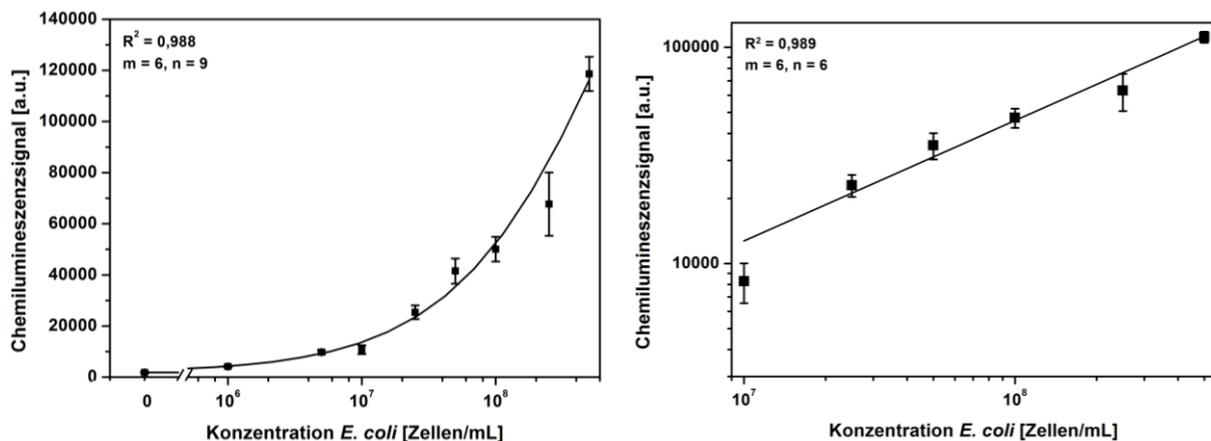


Abbildung 3.11: Kalibrierfunktion und Arbeitsbereich für die Detektion lebender *E. coli* mittels Stopped-Flow-Mikroarray-Immunoassay.

Der Arbeitsbereich für den Nachweis von *E. coli* wurde als der Bereich definiert, in welchem bei der doppellogarithmischen Auftragung ein linearer Anstieg des Messsignals erhalten wurde und welcher damit die lineare Fitfunktion mit dem höchsten Bestimmtheitsmaß erfüllt. Er umfasste einen Konzentrationsbereich von $1 \cdot 10^7$ bis $5 \cdot 10^8$ Z/mL. Die Geradensteigung im linearen Bereich betrug 0,52. Die Mikroarray-interne Nachweisgrenze lag bei $4 \cdot 10^5$ Z/mL. Verglichen mit der Messung lebender *E. coli* ohne optimiertes Stopped-Flow-Programm (Kapitel 3.1) konnten sowohl die Mikroarray-interne Nachweisgrenze als auch der Arbeitsbereich des Assays verbessert werden. Die Nachweisgrenze lag mit $4 \cdot 10^5$ Z/mL deutlich niedriger als die zuvor erhaltenen $5 \cdot 10^7$ Z/mL. Der Arbeitsbereich lag in einem ähnlichen Bereich, konnte allerdings mittels Stopped-Flow-Programm für niedrigere Konzentrationen von $5 \cdot 10^7$ Z/mL auf $1 \cdot 10^7$ Z/mL erweitert werden. Zwar ist der Unterschied für den linearen Bereich zur Quantifizierung von Proben eher gering, die Verbesserung bezogen auf die Mikroarray-interne Nachweisgrenze ist dagegen bedeutend. Die Einführung der Stopped-Flow-Technik und die Optimierung verschiedener Messparameter ermöglichten beim Nachweis lebender *E. coli* die Detektion niedrigerer Bakterienkonzentrationen.

3.2 Mikroarray-Detektion von *L. pneumophila* Serogruppe 1

Bei der Entwicklung des Legionellen-Mikroarrays wurde zunächst mit dem Nachweis von *L. pneumophila* Serogruppe 1 begonnen, da die Detektion dieser Serogruppe von besonderer Bedeutung ist. Serogruppe 1 wird als wichtigste Serogruppe von *L. pneumophila* beschrieben, welche mit 80 % für den Hauptanteil der Erkrankungsfälle in Nordamerika und Europa identifiziert wurde [3, 22]. Die humanpathogene Spezies *L. pneumophila* konnte aufgrund von Sicherheitsvorschriften in den zur Verfügung stehenden Räumlichkeiten ausschließlich in inaktivierter Form eingesetzt werden. Alle Versuche dieser Arbeit sind folglich für inaktivierte *L. pneumophila* beschrieben.

3.2.1 Auswahl geeigneter Antikörper

Für Serogruppe 1 sind zahlreiche monoklonale und polyklonale Antikörper kommerziell erhältlich. Der erste Schritt zum Aufbau des Mikroarrays war die Wahl geeigneter Antikörper. Dazu wurden mehrere Fängerantikörper und verschiedene Biotin-konjugierte Detektionsantikörper getestet.

Außerdem wurde die Anwendung des Stopped-Flow-Messprinzips für die Messung von *L. pneumophila* untersucht. Auf dem Mikroarray waren drei verschiedene Antikörper gegen *L. pneumophila* in gleicher Konzentration immobilisiert. Dabei handelte es sich um einen monoklonalen Antikörper (mAk) und zwei polyklonale Antikörper der Firmen *Senova* (pAk^S) und *Biodesign* (pAk^B). Die Fängerantikörper wurden jeweils in der maximal verfügbaren Konzentration von 2,5 mg/mL eingesetzt. Der Detektionsantikörper der Firma *Senova* wurde in einer Konzentration von 3,7 µg/mL eingesetzt. Aufgrund einer begrenzt zur Verfügung stehenden Antikörpermenge, wurden keine höheren Detektionsantikörperkonzentrationen getestet. Eine geringere Detektionsantikörperkonzentration lieferte ein kleineres Signal-zu-Hintergrund-Verhältnis. Abbildung 3.12 zeigt einen Vergleich der Messsignale für die Verwendung des optimierten Stopped-Flow-Programms und von zwei kürzeren Stopped-Flow-Programmen. Die unterschiedlichen Assayzeiten resultierten analog Kapitel 3.1.1 aus der Verwendung verschiedener Interaktionszeiten für jedes der 30 Volumenelemente.

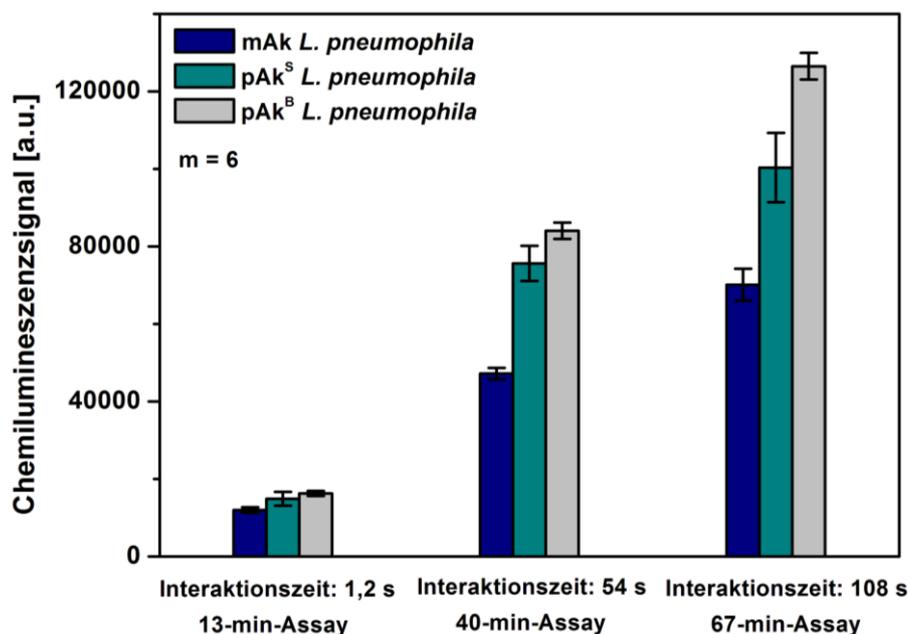


Abbildung 3.12: Detektion von *L. pneumophila* ($5 \cdot 10^5$ Z/mL) unter Verwendung verschiedener Fängerantikörper. Vergleich unterschiedlich langer Stopped-Flow-Messprogramme.

Für alle drei Fängerantikörper wurde der gleiche Trend hinsichtlich der Stopped-Flow-Messprogramme beobachtet. In sehr guter Übereinstimmung mit den Ergebnissen lebender *E. coli*-Bakterien folgte aus der Erhöhung der Interaktionszeit bzw. der Assaydauer eine Signalsteigerung. Verglichen mit dem 13-min-Assay konnte das CL-Signal für den optimierten 67-min-Assay etwa um das Sechsfache (mAk) bzw. Siebenfache (pAk) erhöht werden. Der zuvor optimierte Stopped-Flow-Assay konnte somit auch für die Messung

inaktivierter Legionellen als optimale Methode bestätigt werden. Dieses Messprogramm wurde für alle restlichen Messungen festgelegt. Werden die Signale der unterschiedlichen Fängerantikörper betrachtet, wurden für den monoklonalen Antikörper bei dem kurzen Assay etwas geringere Signale erhalten. Für die beiden längeren Assays lag die Signalintensität des pAk^B annähernd doppelt so hoch wie die des monoklonalen Antikörpers und etwas höher als für den polyklonalen Antikörper von *Senova*. Für den 67-min-Assay, welcher für weitere Messungen ausgewählt wurde, wurde bei Einsatz der jeweils maximal verfügbaren Konzentration das höchste Signal für den Fängerantikörper von *Biodesign* erreicht.

Die drei Fängerantikörper wurden unter Verwendung des optimierten Stopped-Flow-Programms weiterhin für die Messung verschiedener Konzentrationen von *L. pneumophila* charakterisiert (Abbildung 3.13).

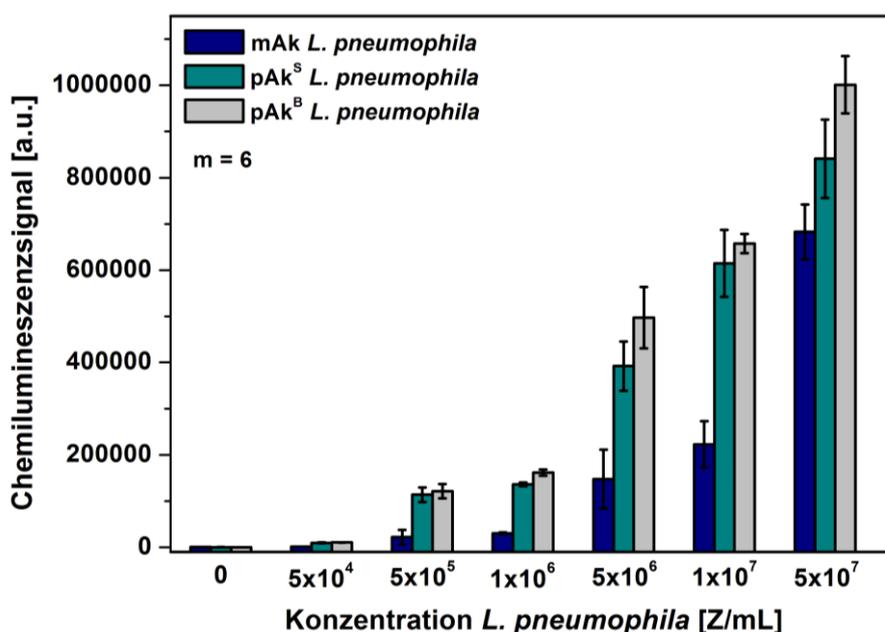


Abbildung 3.13: Vergleich verschiedener Fängerantikörper für die Messung unterschiedlicher Konzentrationen von *L. pneumophila* in Reinstwasser.

Für die Nullprobenmessung (Reinstwasser) lagen die Signale aller Fängerantikörper im Bereich des Mikroarray-Hintergrunds, dessen Summenwert etwa 400 a.u. betrug. Damit traten für keinen Antikörper unspezifische Bindungen auf, welche zum Beispiel durch die Detektionsantikörper oder Streptavidin-HRP erzeugt werden könnten. Die Signale der polyklonalen Antikörper lagen für alle gemessenen Legionellenkonzentrationen mindestens doppelt so hoch wie bei den monoklonalen Antikörpern. Lediglich für die höchste gemessene Bakterienkonzentration war der Unterschied zwischen mono- und polyklonalen Antikörpern

reduziert. Eine Ursache könnte in einer beginnenden Absättigung freier Bindungsstellen der polyklonalen Antikörper für die höchste gemessene Bakterienkonzentration zu finden sein.

Für den monoklonalen Antikörper ist ein linearer Signalanstieg für Konzentrationen im Bereich von $1 \cdot 10^6$ Z/mL bis $1 \cdot 10^7$ Z/mL zu erkennen. Für die polyklonalen Antikörper trat ein stärkerer linearer Signalanstieg auf und dieser umfasste den Bereich $1 \cdot 10^6$ Z/mL bis $5 \cdot 10^7$ Z/mL. Dies bedeutet, dass für den monoklonalen Antikörper ein schmalere Arbeitsbereich zu erwarten ist als für die polyklonalen Antikörper. Die Signale der beiden polyklonalen Antikörper lagen in einem ähnlichen Bereich, wobei der Antikörper von *Biodesign* für jede Messung etwas höhere Signale lieferte. Mit den polyklonalen Antikörpern konnten für niedrigere Bakterienkonzentrationen bereits positive Messsignale erhalten werden. Dies bedeutet, dass mit den verwendeten polyklonalen Antikörpern eine höhere Nachweisstärke erreicht werden kann als mit dem monoklonalen Fängerantikörper. Dies kann man begründen, da monoklonale Antikörper lediglich ein Epitop des Antigens erkennen. Im Gegensatz zu polyklonalen Antikörpern, die mehrere Epitope eines Antigens erkennen, ist die Anzahl potentieller Bindungsstellen für monoklonale Antikörper geringer. Dies bedeutet aber wiederum auch, dass für monoklonale Antikörper geringere Kreuzreaktivitäten zu erwarten sind, was für eine Multiplex-Messung oder die Messung komplexer Bakteriengemische von Bedeutung ist.

Im Rahmen dieser Arbeit war die Detektion von *L. pneumophila* für grundlegende Untersuchungen mit einer möglichst hohen Nachweisstärke vorrangig. Deshalb wurde für weitere Messungen der polyklonale Antikörper der Firma *Biodesign* als Fängerantikörper gewählt.

Neben dem in bisherigen Versuchen verwendeten Detektionsantikörper der Firma *Senova* wurde ein weiterer Detektionsantikörper der Firma *Abcam* untersucht, um auch bezüglich der Detektion eine Alternative zu testen. Abbildung 3.14 zeigt die Chemilumineszenzsignale für die Messung vier unterschiedlicher Konzentrationen ($8 \cdot 10^3$ Z/mL, $4 \cdot 10^4$ Z/mL, $4 \cdot 10^5$ Z/mL und $8 \cdot 10^5$ Z/mL) von *L. pneumophila* in Reinstwasser. Die beiden Detektionsantikörper wurden in der gleichen Konzentration ($3,7 \mu\text{g/mL}$) eingesetzt.

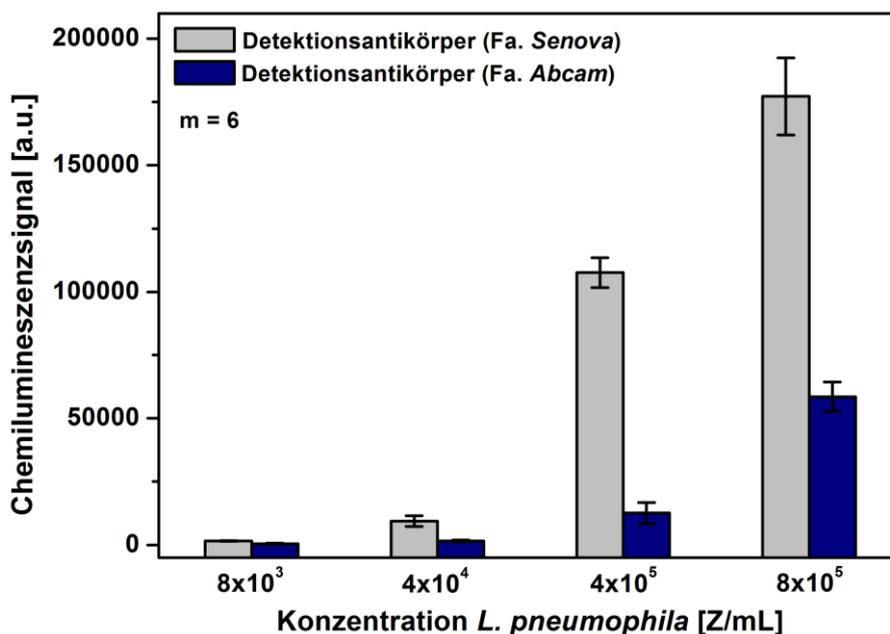


Abbildung 3.14: Vergleich zweier unterschiedlicher Detektionsantikörper für die Messung mehrerer Konzentrationen von *L. pneumophila* in Reinstwasser.

Der Detektionsantikörper von *Senova* lieferte für alle gemessenen Konzentrationen ein höheres Signal. Je nach Bakterienkonzentration lag die Signalintensität um den Faktor 3 bis 10 höher. Ein konzentrationsabhängiger Trend der Signalunterschiede konnte nicht beobachtet werden. Aufgrund der höheren Steigung für den Signalanstieg, kann mit dem Detektionsantikörper von *Senova* eine höhere Nachweissensitivität erreicht werden. Dieser wurde somit für alle weiteren Messungen von *L. pneumophila* Sg 1 eingesetzt.

3.2.2 Kalibrierung von *L. pneumophila* Serogruppe 1

Zur Charakterisierung des Mikroarray-Immunoassays wurde eine Kalibrierung von *L. pneumophila* in Reinstwasser aufgenommen. Die Bestimmung der Bakterienkonzentrationen der eingesetzten Kalibriersuspensionen erfolgte mittels Durchflusszytometrie. Die so ermittelten Konzentrationen der mittels Mikroarray gemessenen Kalibriersuspensionen waren 0 Z/mL, $4 \cdot 10^3$ Z/mL, $8 \cdot 10^3$ Z/mL, $4 \cdot 10^4$ Z/mL, $4 \cdot 10^5$ Z/mL, $8 \cdot 10^5$ Z/mL, $4 \cdot 10^6$ Z/mL, $8 \cdot 10^6$ Z/mL und $4 \cdot 10^7$ Z/mL. Durch doppellogarithmische Auftragung der Chemilumineszenzsignale gegen die Bakterienkonzentrationen wurde der lineare Bereich der Kalibrierfunktion erhalten (Abbildung 3.15).

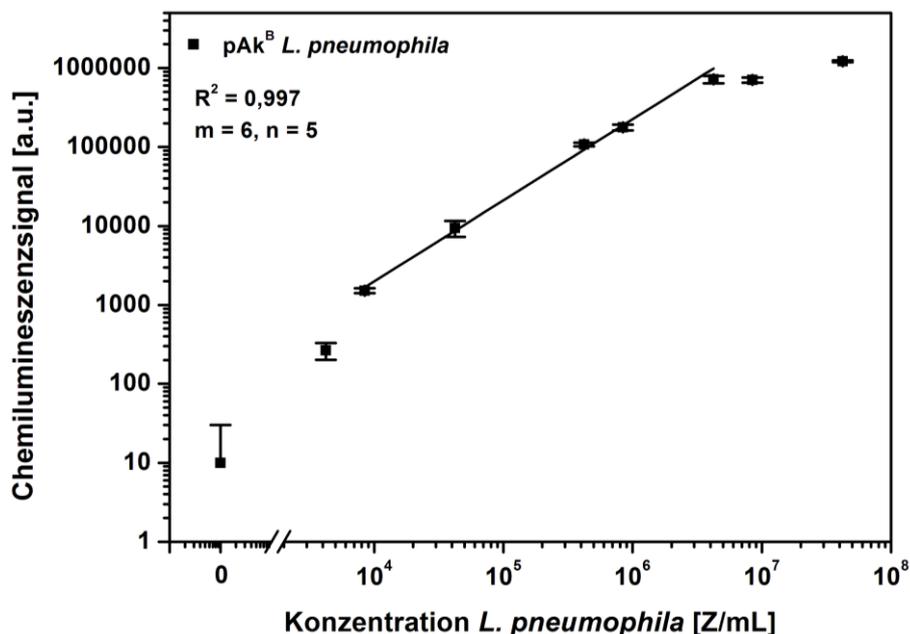


Abbildung 3.15: Linearer Bereich der Kalibrierung von *L. pneumophila* in Reinstwasser.

Der Arbeitsbereich für den Nachweis von *L. pneumophila* wurde als der Bereich definiert, in welchem bei der doppellogarithmischen Auftragung ein linearer Anstieg des Messsignals erhalten wurde und welcher damit die lineare Fitfunktion mit dem höchsten Bestimmtheitsmaß erfüllt. Er umfasste einen Konzentrationsbereich von $8 \cdot 10^3$ bis $4 \cdot 10^6$ Zellen/mL. Die Steigung im linearen Bereich betrug 1,13. Für die Mikroarray-interne Nachweisgrenze wurden $1 \cdot 10^3$ Zellen/mL ermittelt. In vorhergehenden Arbeiten wurden wie bereits in Kapitel 3.1 aufgeführt eine Nachweisgrenze von $1 \cdot 10^5$ Z/mL und ein Arbeitsbereich von $3 \cdot 10^5$ - $1 \cdot 10^8$ Z/mL erhalten [28]. Durch die Optimierung des Messprogramms und der Assayreagenzien konnte die Nachweisgrenze deutlich verbessert werden. Es wurde ein vergleichbar weiter Arbeitsbereich erhalten, der jedoch im Vergleich zu den vorhergehenden Arbeiten in den Bereich niedrigerer Konzentrationen verschoben war.

3.2.3 Reproduzierbarkeit

Die Kalibrierung von *L. pneumophila* wurde unter gleichen Bedingungen an zwei aufeinanderfolgenden Tagen durchgeführt, um zu überprüfen, wie reproduzierbar die Messungen waren. In Abbildung 3.16 sind neben der in Kapitel 3.2.2 beschriebenen Kalibrierung (Tag 1) die Daten einer weiteren Kalibriermessung (Tag 2) dargestellt. Die Chemilumineszenzsignale wurden halblogarithmisch gegen die Bakterienkonzentrationen aufgetragen.

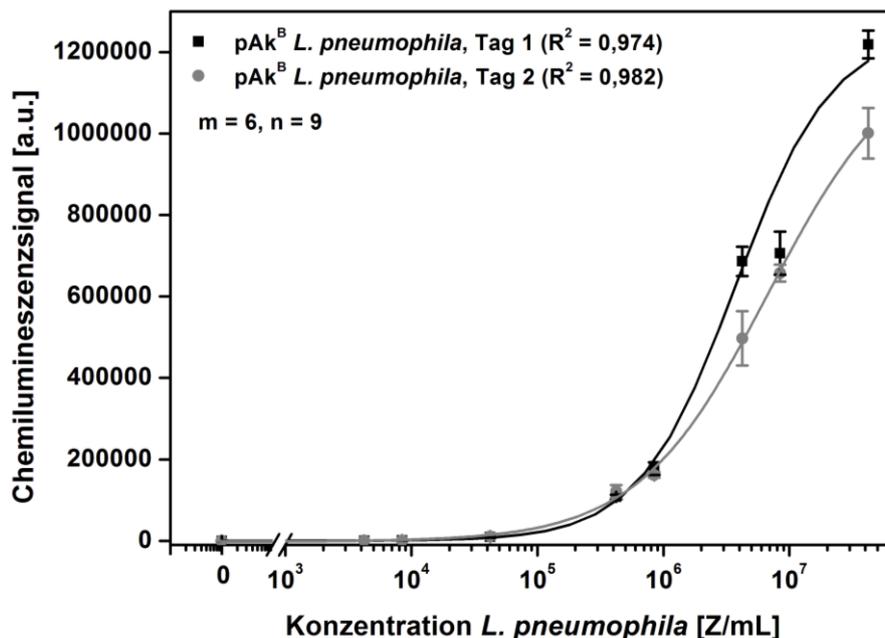


Abbildung 3.16: Vergleichbarkeit von zwei Kalibrierkurven von *L. pneumophila* in Reinstwasser gemessen an unterschiedlichen Tagen.

Für die beiden Kalibriermessungen ergab sich eine gute Übereinstimmung im niedrigeren Konzentrationsbereich. Bis zu einer Bakterienkonzentration von $8 \cdot 10^5$ Z/mL waren die Messwerte gut reproduzierbar. Für die größeren Bakterienkonzentrationen lagen die Signale der ersten Kalibrierung 20 bzw. 35 % höher. Der dazwischenliegende Messwert stimmte an beiden Messtagen wieder sehr gut überein. Da der Signalverlauf von Tag 1 für höhere Konzentrationen der sigmoidalen Fitfunktion weniger gut entsprach, ist es wahrscheinlich, dass diese Messwerte aufgrund von Chip-zu-Chip-Schwankungen etwas zu hoch lagen. Für Tag 1 ergaben sich insgesamt ein höheres maximales Signal und ein etwas steilerer Kurvenverlauf für Bakterienkonzentrationen größer als 10^6 Z/mL. In Tabelle 3.3 sind die Daten der beiden Kalibrierfunktionen aufgelistet.

Tabelle 3.3: Mikroarray-interne Nachweisgrenze, Steigung im linearen Bereich und Arbeitsbereich zweier Kalibrierfunktionen für den Nachweis von *L. pneumophila* Serogruppe 1 in Reinstwasser.

	Tag 1	Tag 2
Nachweisgrenze [Z/mL]	$1,4 \cdot 10^3$	$1,0 \cdot 10^3$
Arbeitsbereich [Z/mL]	$8 \cdot 10^3 - 4 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^3 - 4 \cdot 10^6$
Steigung	1,13	0,84

In der doppellogarithmischen Auftragung ergab sich für beide Kalibrierungen ein Arbeitsbereich von $8 \cdot 10^3 - 4 \cdot 10^6$ Z/mL. Für die Kalibrierung an Tag 1 wurde allerdings eine

höhere Steigung im linearen Bereich erhalten. Betrachtet man die Messpunkte der Kalibrierung von Tag 2 anhand der Wiederfindung bezogen auf Tag 1, sind deutliche Abweichungen der eingesetzten und bestimmten Bakterienkonzentration zu erkennen. In Tabelle 3.4 sind die Wiederfindungen für Konzentrationen im Arbeitsbereich der Kalibrierung aufgeführt.

Tabelle 3.4: Wiederfindungen der Kalibriersuspensionen (Tag 2) bezogen auf die Kalibrierung von Tag 1 und Abweichungen der eingesetzten und gefundenen Bakterienkonzentrationen bezogen auf die eingesetzte Konzentration ($m = 6, n = 1$).

Eingesetzt [Z/mL]	Gefunden [Z/mL]	Abweichung [%]
$8 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^3$	38
$4 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^4$	25
$4 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5$	25
$8 \cdot 10^5$	$7 \cdot 10^5$	13
$4 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$	25
$8 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^6$	50

Die anhand der Kalibrierung von Tag 1 ermittelten Bakterienkonzentrationen wichen um 13 - 50 % von der eingesetzten Konzentration ab. Bezogen auf die Wiederfindungen kann festgestellt werden, dass teilweise hohe tagesabhängige Schwankungen auftreten. Um die Reproduzierbarkeit an unterschiedlichen Tagen weiter zu untersuchen, wurde wiederholt eine Suspension von *L. pneumophila* mit einer Konzentration von 10^6 Z/mL hergestellt und innerhalb eines Zeitraumes von etwa eineinhalb Jahren gemessen (Abbildung 3.17).

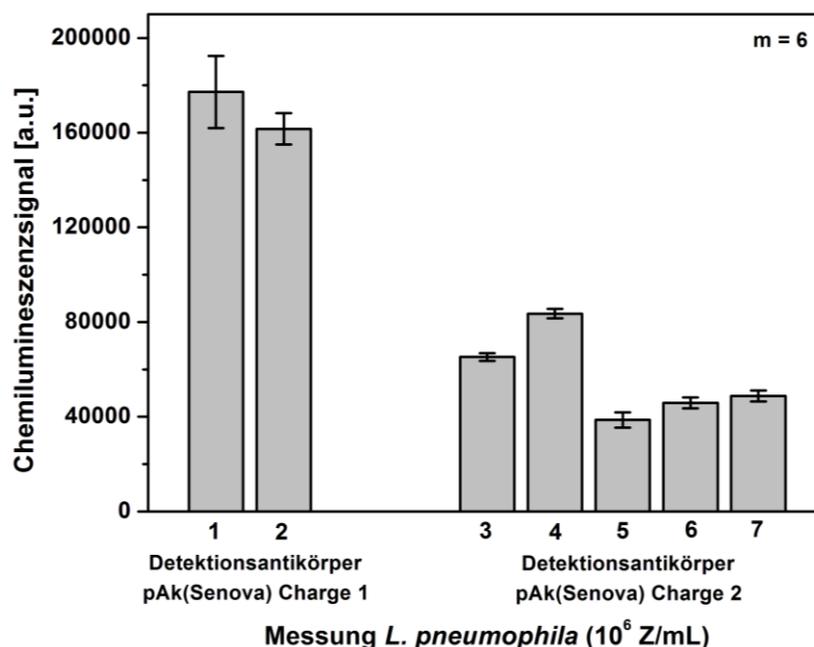


Abbildung 3.17: Reproduzierbarkeit der Messung von *L. pneumophila* (10^6 Z/mL) innerhalb eines Zeitraumes von etwa eineinhalb Jahren.

Alle Messungen aus Abbildung 3.17 wurden an unterschiedlichen Tagen durchgeführt. Es mussten über den Zeitraum dieser Arbeit außerdem verschiedene Chargen des Detektionsantikörpers verwendet werden. Durch den Wechsel der Antikörper-Charge konnten trotz Verwendung der gleichen Antikörperkonzentration die zuvor erhaltenen Signalintensitäten nicht mehr reproduziert werden. Für die gezeigten Beispiele lagen die Signale mit der neuen Antikörper-Charge etwa bei der Hälfte des zuvor erreichten Signals. Der Unterschied lässt sich durch das Vorliegen einer geringeren Konzentration aktiver Antikörper bei der neuen Charge begründen. Für die Quantifizierung von Proben muss somit bei Verwendung neuer Antikörper eine neue Kalibrierung durchgeführt werden.

Bezieht man auch für die sieben Proben die Messsignale auf die Kalibrierung (Tag 1) aus Abbildung 3.16, können die Wiederfindungen ermittelt werden (Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Wiederfindungen von *Legionella*-Suspensionen bezogen auf die Kalibrierung von Tag 1 (Abbildung 3.16) und Abweichungen der eingesetzten und gefundenen Bakterienkonzentrationen bezogen auf die eingesetzte Konzentration (m = 6, n = 1).

Probe	Eingesetzt [Z/mL]	Gefunden [Z/mL]	Abweichung [%]
1	$1 \cdot 10^6$	$8 \cdot 10^5$	20
2	$1 \cdot 10^6$	$7 \cdot 10^5$	30
3	$1 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^5$	70
4	$1 \cdot 10^6$	$4 \cdot 10^5$	60
5	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$	80
6	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$	80
7	$1 \cdot 10^6$	$2 \cdot 10^5$	80

Die sehr hohen Abweichungen von 60 - 80 % zwischen eingesetzter und ermittelter Bakterienkonzentration für die Proben 3 bis 7 lassen sich durch den Wechsel der Antikörpercharge erklären. Dies verdeutlicht die Notwendigkeit einer erneuten Kalibrierung bei Änderung der Assayreagenzien. Es treten allerdings auch signifikante tagesabhängige Schwankungen bei Verwendung der gleichen Reagenzien auf. Unter Betrachtung der beispielhaft gezeigten Messungen und mit den Kenntnissen aller durchgeführten Messungen konnte über den Zeitraum dieser Arbeit festgestellt werden, dass an unterschiedlichen Tagen die Reproduzierbarkeit der Messungen nicht gewährleistet war. Für die Anwendung zur Routineanalytik wäre dieses System nicht stabil genug. Für die Quantifizierung unbekannter Proben ist in diesem Fall stets eine Kalibrierung erforderlich, was einen erheblichen Aufwand bedeutet.

Die Reproduzierbarkeit der Messungen innerhalb eines Tages wurde im Folgenden untersucht. Abbildung 3.18 zeigt die Messung von drei Proben mit unterschiedlichen Bakterienkonzentrationen mit jeweils zwei Mikroarrays.

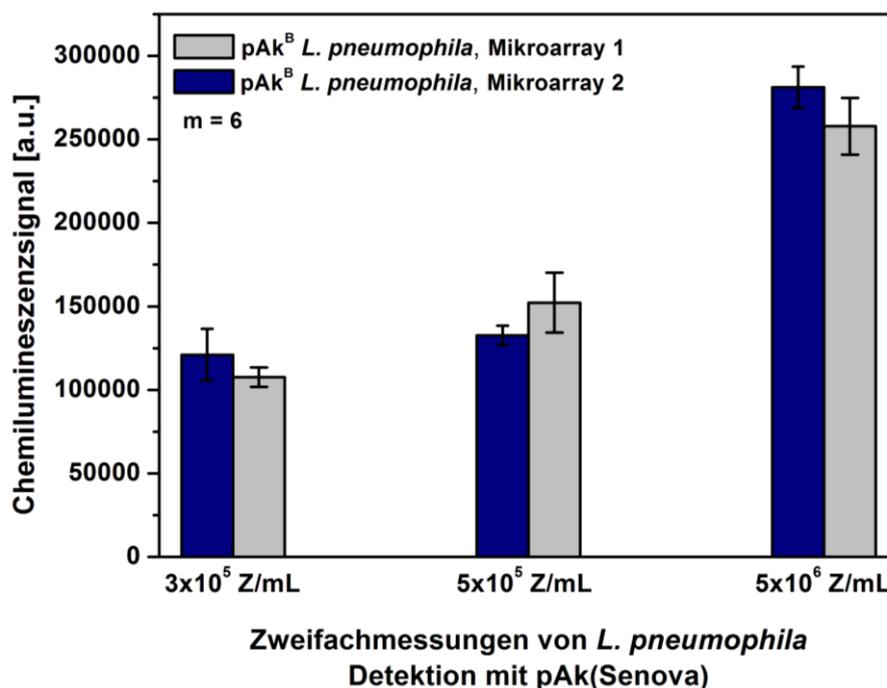


Abbildung 3.18: Messung von drei *L. pneumophila*-Proben innerhalb eines Tages mit je zwei Mikroarrays.

Innerhalb eines Tages wurde eine gute Reproduzierbarkeit für die Zweifachbestimmung einer Probe gefunden. Die Abweichung lag bei einem akzeptablen Wert von unter 15 %. Dies ist wichtig, da für jede Messung ein neuer Mikroarray verwendet wird und nur so Messdaten miteinander verglichen und bewertet werden können. Im Rahmen dieser Arbeit wurden stets Trends innerhalb eines Tages betrachtet und zur Bewertung unterschiedlicher Bedingungen herangezogen. Wurden unbekannte Proben bestimmt, wurde außerdem jeweils eine Bakterienprobe bekannter Konzentration mitbestimmt. Diese diente als Referenzprobe, welche die Übereinstimmung mit einer zuvor erstellten Kalibrierung beurteilen ließ. Bei einer deutlichen Abweichung wurden die Proben nicht zur Auswertung herangezogen. Für die Untersuchungen während dieser Arbeit war die Reproduzierbarkeit des Mikroarray-Nachweises demnach ausreichend.

Für *L. pneumophila* Serogruppe 1 konnte unter Anwendung optimierter Assayreagenzien und des Stopped-Flow-Messprogramms die Mikroarray-Detektion mit guter Nachweisstärke und ausreichender Reproduzierbarkeit innerhalb eines Tages für die Messung in Reinstwasser

etabliert werden. Dieser Assay sollte im Anschluss für relevante Anwendungsbereiche untersucht werden.

3.3 Detektion von *L. pneumophila* Serogruppe 1 in Kombination mit Anreicherungsverfahren

Für den Nachweis von *L. pneumophila* Serogruppe (Sg) 1 konnten mit Hilfe des optimierten Messprogramms gute Ergebnisse erzielt werden (Kapitel 3.2). Wie für den Nachweis von Bakterien und Viren bekannt, liegen Nachweisgrenzen oftmals oberhalb geforderter Grenzwerte. Eine geeignete Anwendung für Wasserproben ist nur in Kombination mit vorausgehenden Anreicherungstechniken möglich. Durch diese Kombination wird eine Erniedrigung der Nachweisgrenze in den relevanten Konzentrationsbereich angestrebt. Dies kann durch Anreicherung mit einer möglichst hohen Bakterienwiederfindung in einem geringen Endvolumen erreicht werden, für den Fall, dass der Anreicherungsprozess keinen Einfluss auf die Messbarkeit der Bakterien nimmt. Mit dem Ziel, eine geeignete Anreicherung für den Mikroarray-Nachweis von Legionellen zu finden, wurden verschiedene Methoden in Kombination mit dem Mikroarray-Immunoassay für *L. pneumophila* Sg 1 untersucht.

3.3.1 Zweistufige Anreicherung mittels Cross-Flow-Mikrofiltration und monolithischer Säule

Der Mikroarray-Nachweis von *L. pneumophila* wurde in Kombination mit einem mehrstufigen Anreicherungsverfahren angewendet. Im Rahmen eines DFG-geförderten Projekts sollte ein „Verbundverfahren zur Detektion von Mikroorganismen im Trinkwasser“ entwickelt werden. In diesem Projekt war ein 2-stufiger Anreicherungsprozess mittels Cross-Flow-Mikrofiltration und anschließender Anreicherung durch eine makroporöse Epoxypolymer-basierte monolithische Affinitätsfiltration in Kombination mit der Antikörper-Mikroarray-Detektion vorgesehen. Die Cross-Flow-Filtration ermöglicht eine größenabhängige Anreicherung von Bakterien mittels einer Hohlfasermembran. Mit Hilfe der monolithischen Affinitätsfiltrationssäule können Bakterien angereichert und von Matrixbestandteilen abgetrennt werden. Durch Ansäuern der Probe werden die Bakterien durch elektrostatische Wechselwirkung auf dem monolithischen Material zurückgehalten und können durch eine Änderung des pH-Werts eluiert werden. Die Versuche wurden in

Zusammenarbeit mit Lu Pei und Martin Rieger realisiert, wobei Lu Pei die Anreicherung mittels monolithischer Affinitätsfiltrationssäule und Martin Rieger die Cross-Flow-Filtration durchführte.

10-L-Leitungswasserproben wurden mit *L. pneumophila* versetzt und gemäß den am Institut optimierten Bedingungen [209] mittels Cross-Flow-Filtration auf 100 mL eingengt. Das Konzentrat wurde auf pH 3 angesäuert und nachfolgend bei einer Geschwindigkeit von 10 mL/min über die Epoxy-funktionalisierte monolithische Affinitätsfiltrationssäule geleitet. Die gebundenen Zellen wurden zunächst mit 1 mL Carbonatpuffer (pH 8,2) von oben nach unten entlang der Säule (\Rightarrow E1) und anschließend mit 1 mL in Gegenrichtung (\Rightarrow E2) eluiert. Durch den zweiten Elutionsschritt (E2) wurden auch die Zellen eluiert, die von dem ersten Elutionsschritt nicht erfasst wurden und sich noch weiter oben innerhalb des Säulenmaterials befanden. Allerdings wurden so auch Zellen und andere Partikel im Eluat erhalten, welche durch Filtereffekte vom Säulenmaterial zurückgehalten wurden.

In einem ersten Versuch wurde *L. pneumophila* aus einer dotierten 10-L-Leitungswasserprobe mit einer Konzentration von 10^4 Z/mL angereichert. Die Proben wurden vor der Anreicherung und nach den einzelnen Anreicherungsschritten mittels Mikroarrays gemessen. Anhand der Messsignale sollte die generelle Anwendbarkeit der Mikroarray-Messung nach den einzelnen Anreicherungsschritten untersucht werden. In Abbildung 3.19 ist das Messsignal der Antikörper-Mikroarrays im Verlauf des Anreicherungsprozesses dargestellt.

In der Ausgangsprobe vor der Anreicherung konnte nur ein geringes Signal (380 a.u.) erhalten werden, welches minimal über dem Wert des Hintergrundsignals (270 a.u.) lag. Nach der Cross-Flow-Filtration konnte das Messsignal deutlich erhöht werden (Faktor 10). Nach dem zweiten Elutionsschritt mittels monolithischer Säule (Summe E1 und E2) wurde weiterhin eine deutliche Signalsteigerung erhalten. Bezogen auf die Ausgangsprobe wurde durch die Aufkonzentrierung der kombinierten Anreicherung eine Signalerhöhung um den Faktor 60 erzielt. Damit konnte eine Signalsteigerung durch die beiden Anreicherungsschritte gezeigt werden.

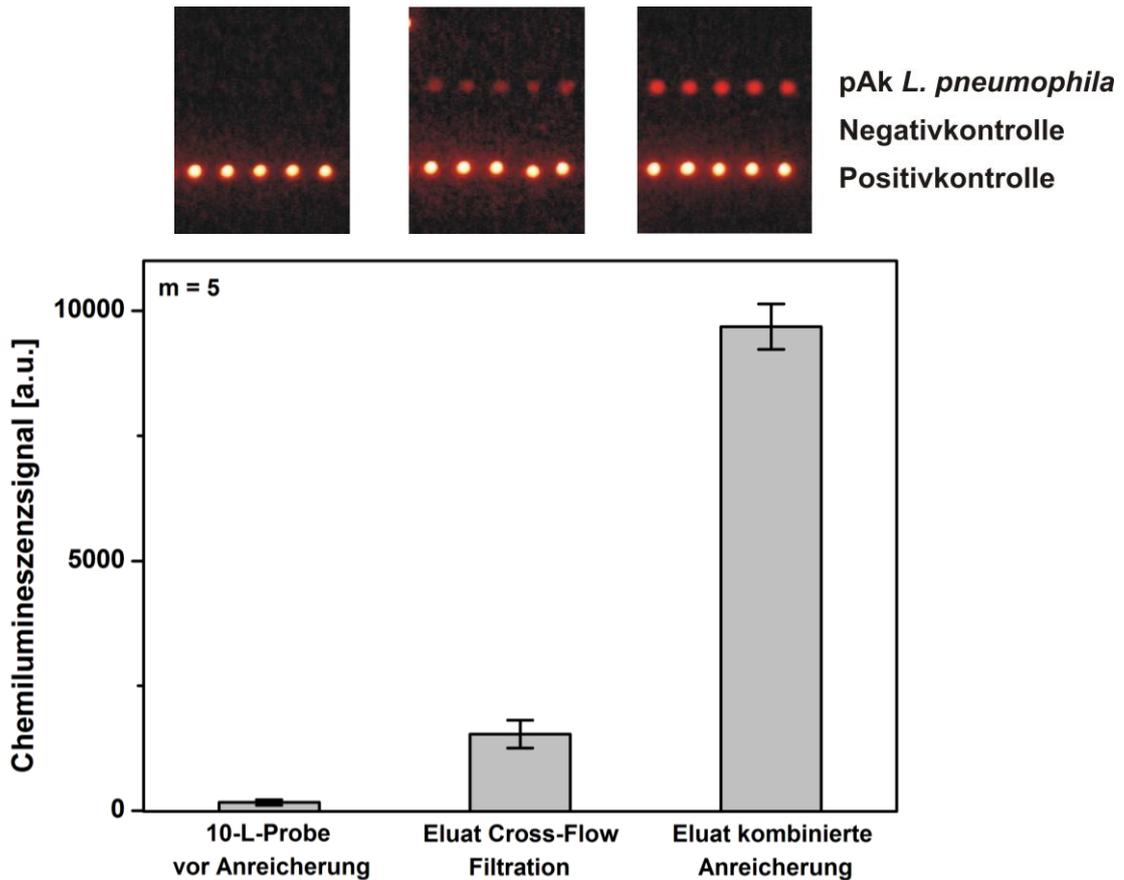


Abbildung 3.19: Anstieg des Mikroarray-Messsignals infolge der 2-stufigen Anreicherung mittels Cross-Flow-Filtration und monolithischer Säule für eine 10-L-Leitungswasserprobe dotiert mit *L. pneumophila* (10^4 Z/mL).

Weitere Aussagen bezüglich der Aufkonzentrierung konnten allerdings nur mit Hilfe der Bakterienkonzentrationen getroffen werden. Für die zur Quantifizierung notwendige Kalibrierung von *L. pneumophila* in Leitungswasser ergab sich eine Mikroarray-interne Nachweisgrenze von $8 \cdot 10^3$ Z/mL. Der Arbeitsbereich lag zwischen $5 \cdot 10^4$ Z/mL und $1 \cdot 10^8$ Z/mL. Die Steigung im linearen Bereich betrug 0,39. Die gesamten Messungen dieses Kapitels wurden mit der in Kapitel 3.2.3 genannten neuen Charge des Detektionsantikörpers durchgeführt. Die Nachweissensitivität war deshalb geringer als für die Messungen in Kapitel 3.2 beschrieben.

Mit Hilfe der Kalibrierung konnten die Bakterienkonzentrationen der drei Proben ermittelt werden. In Tabelle 3.6 sind die erhaltenen Konzentrationen aufgeführt. Im Vergleich dazu sind die Konzentrationen angegeben, die theoretisch unter Berücksichtigung des volumetrischen Anreicherungs-faktors bei vollständiger Wiederfindung der Bakterien im Eluat zu erwarten wären.

Tabelle 3.6: Bestimmte und theoretisch mögliche Bakterienkonzentrationen für Ausgangsprobe und Eluate des 2-stufigen Anreicherungsprozesses ($m = 5$).

Probe	Gefundene Konzentration [Z/mL]	Theoretisch mögliche Konzentration [Z/mL]
10-L-Probe	$1 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^4$
Eluat Cross-Flow	$2 \cdot 10^4$	$1 \cdot 10^6$
Eluat Monolith	$3 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^7$

Die Anfangskonzentration wurde durch die Anreicherung insgesamt erhöht (ca. Faktor 10). Im Vergleich zu den theoretisch erzielbaren Konzentrationen macht der erhaltene Wert nach der kombinierten Anreicherung allerdings nur etwa 1 % aus. Eine Berechnung der Wiederfindungen war wegen fehlender Kenntnis der genauen Probenvolumina an dieser Stelle nicht möglich. Diese Ergebnisse deuten an, dass eine Anreicherung erfolgt, ein Großteil der Bakterien jedoch nicht im Eluat erhalten werden kann. Um dies anhand von Wiederfindungen genauer zu untersuchen, wurde der im Folgenden beschriebene Versuch durchgeführt.

In einem weiterführenden Versuch wurden die beiden Anreicherungsverfahren und die Kombinierbarkeit mit Antikörper-Mikroarrays anhand Bakterienwiederfindungen in den Proben charakterisiert. Dazu wurde eine 10-L-Leitungswasserprobe mit $9 \cdot 10^8$ Zellen (Zytometer) versetzt, was einer Ausgangskonzentration von $9 \cdot 10^4$ Z/mL entsprach. Die Bakterienkonzentration wurde sowohl von der Ausgangsprobe als auch nach den einzelnen Anreicherungsschritten mittels Antikörper-Mikroarrays und Durchflusszytometrie als Referenzmethode bestimmt. Die absoluten Zellzahlen und die unter Berücksichtigung der genauen Volumina bestimmten Wiederfindungen sind in Tabelle 3.7 wiedergegeben.

Tabelle 3.7: Absolute Zellzahlen und Wiederfindungen für die 10-L-Probe vor Anreicherung, im Eluat der Cross-Flow-Filtration und den Eluaten der monolithischen Säule, bestimmt mittels Mikroarray und Durchflusszytometrie. Die Standardabweichungen der Mikroarray-Messungen ergaben sich aus den Spot-Replikaten ($m = 6$), die des Zytometers wurden durch Mehrfachmessungen ($m = 3$) erhalten.

Nachweismethode	Probe	Absolute Zellzahl	Wiederfindung
Mikroarray	10-L-Probe	$5 \cdot 10^8 \pm 1 \cdot 10^8$	
	Eluat Cross-Flow	$8 \cdot 10^6 \pm 4 \cdot 10^5$	$2 \pm 0,1 \%$
	Eluat 1 Monolith	$4 \cdot 10^7 \pm 1 \cdot 10^6$	$7 \pm 0,2 \%$
	Eluat 2 Monolith	$7 \cdot 10^5 \pm 5 \cdot 10^4$	$0,1 \%$
Durchflusszytometrie	10-L-Probe	$9 \cdot 10^8 \pm 1 \cdot 10^8$	
	Eluat Cross-Flow	$3 \cdot 10^8 \pm 3 \cdot 10^7$	$31 \pm 4 \%$
	Eluat 1 Monolith	$6 \cdot 10^6 \pm 8 \cdot 10^5$	$1 \pm 0,1 \%$
	Eluat 2 Monolith	$5 \cdot 10^7 \pm 4 \cdot 10^6$	$5 \pm 0,4 \%$

Die ermittelten Bakterienzellzahlen der 10-L-Ausgangprobe lagen für beide Nachweismethoden in der gleichen Größenordnung. Mittels Mikroarrays wurde jedoch eine etwa 40 % geringere Bakterienzellzahl ermittelt. Nach der Anreicherung mittels Cross-Flow-Filtration wurden mit dem Zytometer 31 % der Legionellen im Eluat wiedergefunden. Bei der Mikroarray-Messung wurde dagegen nur eine Wiederfindung von 2 % ermittelt. Die Ergebnisse der beiden Detektionsverfahren wichen somit stark voneinander ab. Nach dem zweiten Anreicherungsschritt mittels monolithischer Affinitätsfiltrationssäule wurde für die Eluate (vorwärts und rückwärts) ebenfalls ein unterschiedlicher Trend erhalten. Mit dem Mikroarray wurde für das Vorwärtseluat eine deutlich höhere Zellzahl erhalten als für die Elution in Gegenrichtung. Die Wiederfindung im ersten Eluat betrug 7 %, die Wiederfindung im zweiten Eluat war dagegen mit 0,1 % vernachlässigbar. Die Durchflusszytometrie zeigte im Gegensatz dazu eine höhere Wiederfindung von 5 % im zweiten Eluat.

Zum einen zeigte sich an diesen Ergebnissen, dass nach der Anreicherung die Messergebnisse von Zytometer und Mikroarray stark variierten. Als Ursache wird das Vorhandensein hoher Partikelkonzentrationen im Leitungswasser angenommen. Partikel, die in der Regel in jedem Leitungswasser vorhanden sind, werden durch die Cross-Flow-Filtration stark aufkonzentriert, falls sie größer sind als der Porendurchmesser des Filtermoduls. Diese erhöhte Partikelkonzentration kann die Mikroarray-Messung beeinflussen und zu einer Erniedrigung des Signals und damit zu einer Unterbestimmung der Zellzahl im Eluat führen. Durch die monolithische Säule können die Bakterien von Matrixbestandteilen abgetrennt und

im Vorwärtseluat erhalten werden. Die mit dem Mikroarray erhaltene Zellzahl lag höher als der im vorherigen Schritt bestimmte Wert. Dies deutet an, dass der störende Effekt der hohen Partikelbelastung reduziert bzw. entfernt wurde und das Messsignal nicht mehr beeinträchtigte. Für die Zytometer-Messung mit SYTO 9 kann eine hohe Partikelbelastung allerdings unspezifische Signale nach sich ziehen. Bei der mittels Zytometer bestimmten Bakterienkonzentration nach der Cross-Flow-Filtration und im Rückwärtseluat der monolithischen Säule ist damit von einer Überbestimmung auszugehen. Besonders deutlich ist der Unterschied für die ermittelten Wiederfindungen nach der Cross-Flow-Filtration und für Eluat 2 (rückwärts). In diesen Proben ist eine hohe Partikelkonzentration zu erwarten, was wie oben beschrieben eine Erniedrigung der Mikroarray-Wiederfindung und eine Überbestimmung mittels Zytometer bedingen kann. Ein weiterer Aspekt, den es zu bedenken gilt, ist die Bestimmung der Wiederfindungen mittels Mikroarray anhand der Kalibrierung in Leitungswasser. Theoretisch wäre es für eine präzise Quantifizierung notwendig, für jede vorliegende Probenmatrix jeweils eine entsprechende Kalibrierung durchzuführen. Da aber die genaue Matrixzusammensetzung in Wasserproben stark variiert und zuerst ermittelt werden muss, ist diese Vorgehensweise nicht praxisrelevant. Die Konzentrationsbestimmung über eine Kalibrierung in anderer Matrix führt somit zu Ungenauigkeiten und kann verfälschte Wiederfindungen bedingen.

Diese Ergebnisse deuten an, dass die Mikroarray-Messung nach Cross-Flow-Filtration wegen der vorliegenden, aufkonzentrierten Partikel im Eluat problematisch zu sehen ist und unterstreichen die Wichtigkeit der Abtrennung von Matrixbestandteilen für die Analyse mit Antikörper-Mikroarrays.

3.3.1.1 pH-Wert-Abhängigkeit der Cross-Flow-Filtration

Für die Cross-Flow-Filtration wurde der Einfluss des pH-Werts der 10-L-Leitungswasserproben vor der Anreicherung untersucht. In der Literatur beschriebene Untersuchungen wiesen darauf hin, dass der pH-Wert die Wiederfindung der Anreicherung an einer Filter-Membran beeinflusst [255]. Es sollte geprüft werden, ob die Einstellung unterschiedlicher pH-Werte zu Unterschieden für das Mikroarray-Messsignal führt. Dazu wurden drei Proben mit der gleichen Konzentration ($2 \cdot 10^4$ Z/mL) von *L. pneumophila* versetzt und unterschiedliche pH-Werte eingestellt. Zusätzlich zu dem üblicherweise verwendeten pH-Wert (7,7) wurden ein leicht saurer pH-Wert (5) und ein alkalischer pH-Wert (9) eingestellt.

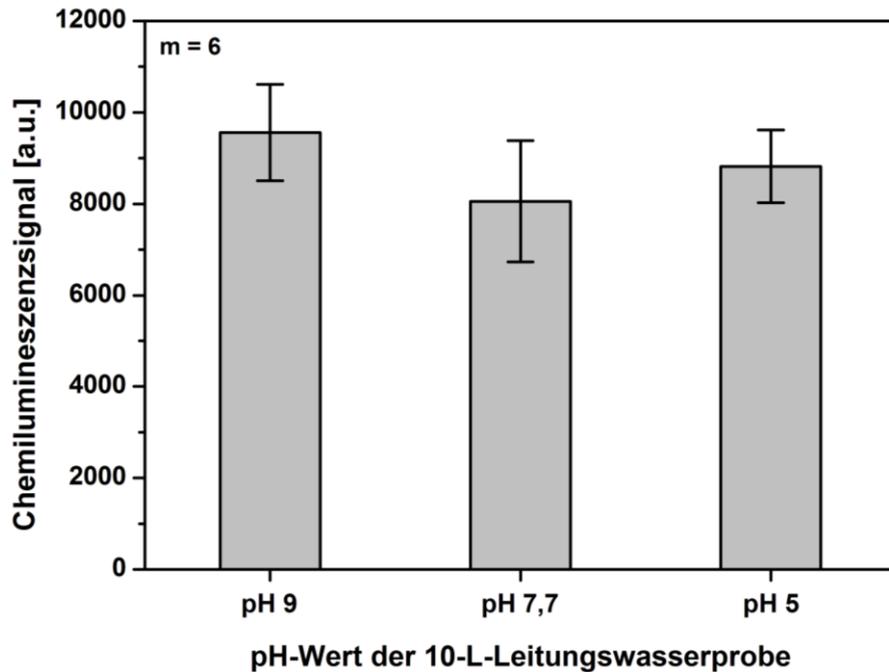


Abbildung 3.20: CL-Signale der Eluate nach Cross-Flow-Filtration für 10-L-Leitungswasserproben unterschiedlicher pH-Werte.

Für alle drei Eluate wurden unter Berücksichtigung der Standardabweichungen ähnliche Messsignale erhalten (Abbildung 3.20). Weder durch eine Erniedrigung, noch durch eine Erhöhung des pH-Werts wurde das Mikroarray-Messsignal bedeutend verändert. Der pH-Wert der Ausgangsprobe nimmt somit keinen Einfluss auf das mittels Mikroarray erhaltene Messergebnis. Die Einstellung eines gewünschten pH-Werts kann folglich vor der Cross-Flow-Filtration durchgeführt werden.

3.3.1.2 Kalibrierung des Verbundverfahrens

Zur weiteren Charakterisierung des Verbundverfahrens wurde eine Kalibrierung erstellt. Dazu wurden 10-L-Leitungswasserproben mit unterschiedlichen Konzentrationen an *L. pneumophila* versetzt und wie oben beschrieben der Cross-Flow-Filtration und anschließend der monolithischen Affinitätsfiltration unterzogen. Die Probe wurde wie in Kapitel 3.3.1 beschrieben im Anschluss an die Cross-Flow-Filtration angesäuert. Die Eluate nach der kombinierten Anreicherung wurden mittels Antikörper-Mikroarrays gemessen. Die CL-Signale der Eluate sind in Abbildung 3.21 gegen die Zellzahlen in den 10-L-Proben aufgetragen, welche mittels Zytometer bestimmt wurden.

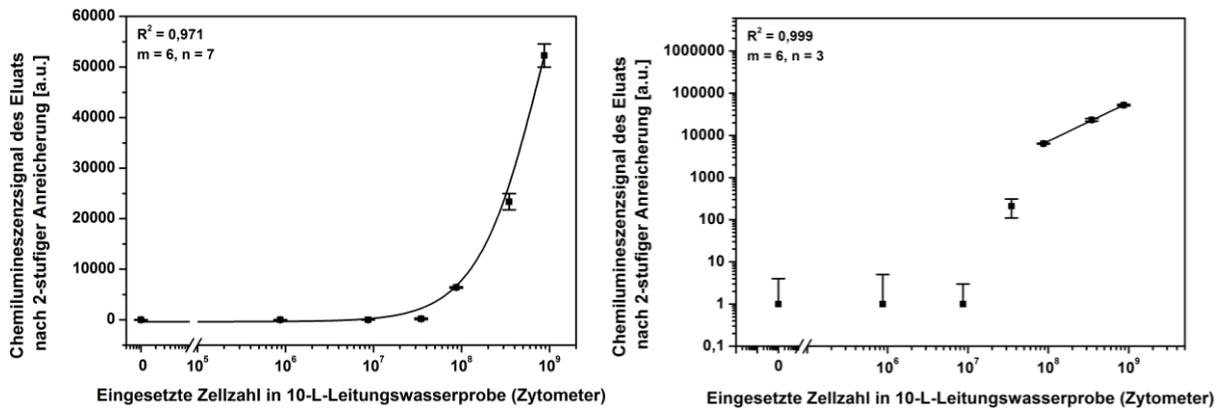


Abbildung 3.21: Kalibrierfunktion (links) und Arbeitsbereich (rechts) der Kalibrierung nach kombinierter Anreicherung mittels Cross-Flow-Filtration und monolithischer Affinitätsfiltration von *L. pneumophila* in 10-L-Leitungswasserproben.

Durch das halblogarithmische Auftragen der Signale gegen die Zellzahlen der Wasserproben konnte eine sigmoide Fitfunktion erhalten werden. Für die Kalibrierung des Verbundverfahrens wurde eine Mikroarray-interne Nachweisgrenze von 10^7 Zellen in 10 L Leitungswasser bzw. 10^3 Z/mL ermittelt. Bei der Kalibrierung von *L. pneumophila* in Leitungswasser ohne eine zuvor durchgeführte Anreicherung wurde eine Mikroarray-interne Nachweisgrenze von $8 \cdot 10^3$ Z/mL ermittelt. Mit dem Verbundverfahren konnte die Nachweisgrenze mit einem Faktor von 8 etwas verbessert werden. Der theoretisch mögliche volumetrische Anreicherungsfaktor von $\sim 10^4$ konnte aber weitaus nicht erreicht werden. Der Arbeitsbereich, bei welchem für die doppellogarithmische Auftragung ein linearer Anstieg des Messsignals erhalten wurde, ist in Abbildung 3.21 anhand der linearen Fitfunktion gekennzeichnet. Er umfasste einen Konzentrationsbereich von $9 \cdot 10^3$ Z/mL ($9 \cdot 10^7$ Z/10 L) bis $9 \cdot 10^4$ Z/mL ($9 \cdot 10^8$ Z/10 L). Die Geradensteigung im linearen Bereich betrug 0,40. Verglichen mit der Kalibrierung ohne Voranreicherung (Arbeitsbereich: $5 \cdot 10^4 - 10^8$ Z/mL) wurde der Arbeitsbereich durch die kombinierte Anreicherung zu niedrigeren Konzentrationen verschoben.

Aufgrund der sehr kleinen Gesamtwiederfindung nach der 2-stufigen Anreicherung und der negativen Auswirkung hoher Partikelkonzentrationen auf die Mikroarray-Messung, konnte mit dem Verbundverfahren nur eine geringfügige Verbesserung bezüglich der nachweisbaren Konzentrationen erreicht werden.

3.3.2 Anreicherung mittels monolithischer Säule

Die Versuche mit der 2-stufigen Anreicherung zeigten, dass die Mikroarray-Messung nach der Cross-Flow-Filtration problematisch war. Aufgrund im Eluat angereicherter hoher Partikelkonzentrationen wurden mittels Mikroarrays geringfügige Wiederfindungen von 2 % ermittelt. Für den Anreicherungsschritt mittels monolithischer Affinitätsfiltration konnte *L. pneumophila* dagegen erfolgversprechend angereichert und nach Entfernung störender Matrixbestandteile mittels Mikroarray gemessen werden. Die verwendete Affinitätsfiltrationssäule war allerdings auf ein Probenvolumen von etwa 100 mL beschränkt, wodurch maximal ein volumetrischer Anreicherungsfaktor von 100 erreicht werden kann. Für die Anreicherung größerer Probenvolumina von mindestens 10 L wurde von Lu Pei eine größere monolithische Affinitätsfiltrationssäule entwickelt. Verglichen mit der bisher verwendeten Säule wurde die Länge des monolithischen Materials um den Faktor 1,5 erhöht. Der Durchmesser des Monoliths wurde um das 8-fache vergrößert. Der Ablauf der Anreicherung wurde analog zu der Durchführung mit der kleineren monolithischen Säule realisiert. Mehrere Parameter, wie die Probengeschwindigkeit und die Elution, mussten für die größere Säule und das höhere Probenvolumen optimiert werden. Die im Folgenden gezeigten Ergebnisse wurden ausschließlich mit Mikroarrays bestimmt.

3.3.2.1 Optimierung des Elutionspuffers

Zunächst wurden für den bereits etablierten Anreicherungsprozess mit der kleineren monolithischen Affinitätsfiltrationssäule verschiedene Elutionspuffer untersucht. Neben dem in vorhergehenden Arbeiten optimierten Puffer (Carbonatpuffer 1 : 50, pH 8,2) wurden zwei weitere Varianten auf der Basis von Carbonatpuffer mit abweichender Zusammensetzung bzw. anderem pH-Wert eingesetzt. Es wurden jeweils 10 mL Leitungswasser angereichert, das mit 10^7 Z/mL *L. pneumophila* versetzt wurde.

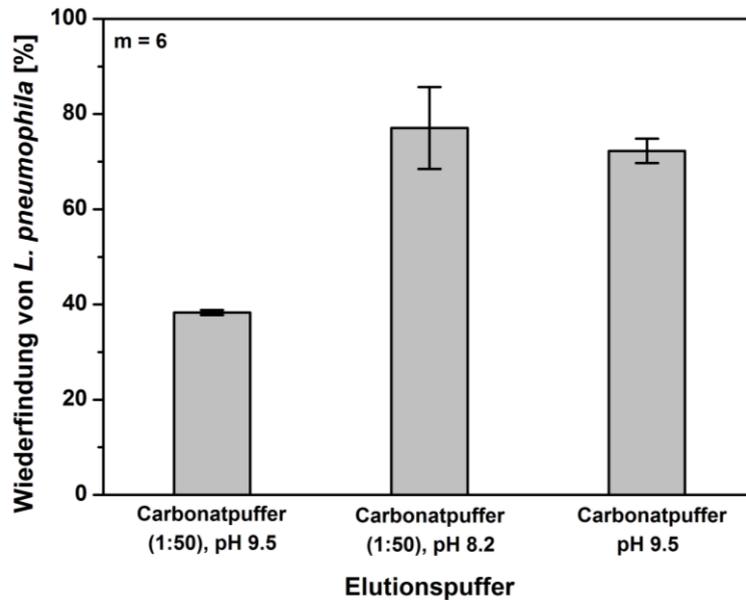


Abbildung 3.22: Wiederfindung für 10-mL-Leitungswasserproben dotiert mit 10^7 Z/mL *L. pneumophila* nach Anreicherung mittels monolithischer Säule.

In Abbildung 3.22 ist zu erkennen, dass für die Elution mit dem Carbonatpuffer in der Verdünnung 1 : 50 (pH 8,2) die beste Wiederfindung (77 %) erreicht wurde. Der unverdünnte Carbonatpuffer lieferte mit 72 % ein ähnliches Ergebnis, eine Erhöhung der Wiederfindung konnte jedoch nicht erzielt werden. Unter Verwendung des verdünnten Carbonatpuffers mit pH 9,5 konnten nur 38 % der Legionellen angereichert werden, was etwa der Hälfte der Wiederfindungen mit den beiden anderen Puffern entspricht. Somit konnte der beschriebene Elutionspuffer [230] auch für die Anreicherung von *L. pneumophila* als optimaler Puffer bestätigt werden und wurde für alle weiteren Anreicherungsversuche verwendet.

3.3.2.2 Elutionsrichtung

Die vergrößerte monolithische Affinitätsfiltrationssäule wurde anhand verschiedener Parameter charakterisiert. Zunächst wurde der Einfluss der Elutionsrichtung untersucht. Die Elution erfolgte dabei entweder in Pumprichtung der Probe (vorwärts) oder in Gegenrichtung (rückwärts) mit 20 mL Elutionspuffer. 10 L Leitungswasser wurden mit einer absoluten Zellzahl von 10^8 *L. pneumophila* versetzt und mit einer Geschwindigkeit von 20 mL/min über das monolithische Material gepumpt. Sowohl die eingesetzten Proben als auch die Eluate wurden mittels Mikroarray quantifiziert, womit unter Berücksichtigung der exakten Volumina die Wiederfindungen für Vorwärts- bzw. Rückwärtselution bestimmt wurden.

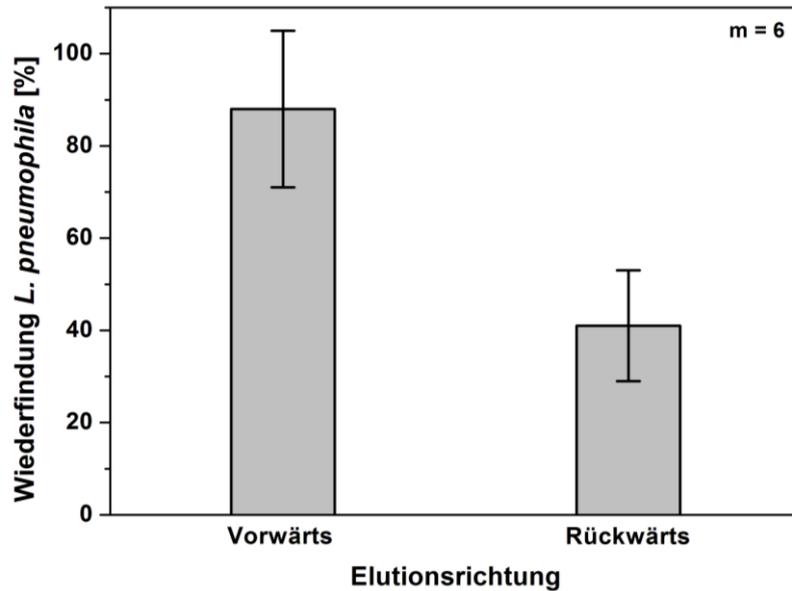


Abbildung 3.23: Wiederfindung von *L. pneumophila* in Abhängigkeit der Elutionsrichtung für die Anreicherung einer mit Legionellen versetzten Leitungswasserprobe (10^8 Zellen).

Für die Elution in Vorwärtsrichtung wurde eine Wiederfindung von 88 % erhalten, die Wiederfindung für die Elution in Gegenrichtung betrug 41 %. Mit der Vorwärtselektion konnte somit der Großteil der Bakterien im Eluat erhalten werden. Mit der Elution in die Gegenrichtung konnte dagegen nur die Hälfte der Bakterien wiedergefunden werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Bakterien ungehindert die Säule passieren können und auch den weiter unten liegenden Teil des monolithischen Materials erreichen. Würde es zu einer Verblockung der Poren kommen, würden sich die Bakterien wie bei einem Filter im oberen Bereich des Monolithen sammeln. Diese könnten anschließend nicht in Vorwärtsrichtung, sondern nur in die Gegenrichtung eluiert werden, was an einer Verminderung der Vorwärtswiederfindung und einer hohen Wiederfindung bei Rückwärtselektion erkennbar wäre. Dass die Bakterien in Vorwärtsrichtung fast vollständig eluiert werden können, ist sehr vorteilhaft, da sich dieser Ablauf leichter automatisieren lässt. Für eine Rückwärtselektion würde außerdem der Effekt der Probenaufreinigung verloren gehen. Auf der Oberfläche des monolithischen Materials zurückgehaltene Matrixbestandteile würden ebenfalls in das Eluat gelangen. Für alle folgenden Versuche wurde deswegen ausschließlich die Elution vorwärts entlang der Säule eingesetzt.

3.3.2.3 Probengeschwindigkeit und Elutionsvolumen

Bei der Anreicherung mit der kleineren Affinitätsfiltrationssäule wurde die Probe mit einer Geschwindigkeit von 10 mL/min über das Material gepumpt. Dies konnte für die Anreicherung im größeren Maßstab nicht übertragen werden. Für 10-L-Proben würde eine Anreicherung bei dieser Geschwindigkeit länger als 16 Stunden dauern, was für die Anwendung nicht geeignet ist. Für die Anreicherung von 10 L Leitungswasser (10^8 Zellen) wurden drei Geschwindigkeiten untersucht, mit denen die Probe über die Säule gegeben wurde. Für jede Probe wurden außerdem nacheinander zwei Elutionsschritte (vorwärts) mit jeweils 20 mL Elutionspuffer durchgeführt, um die Vollständigkeit der Elution zu prüfen. Die Bestimmung der Wiederfindung erfolgte wie oben beschrieben anhand der Mikroarray-Messungen.

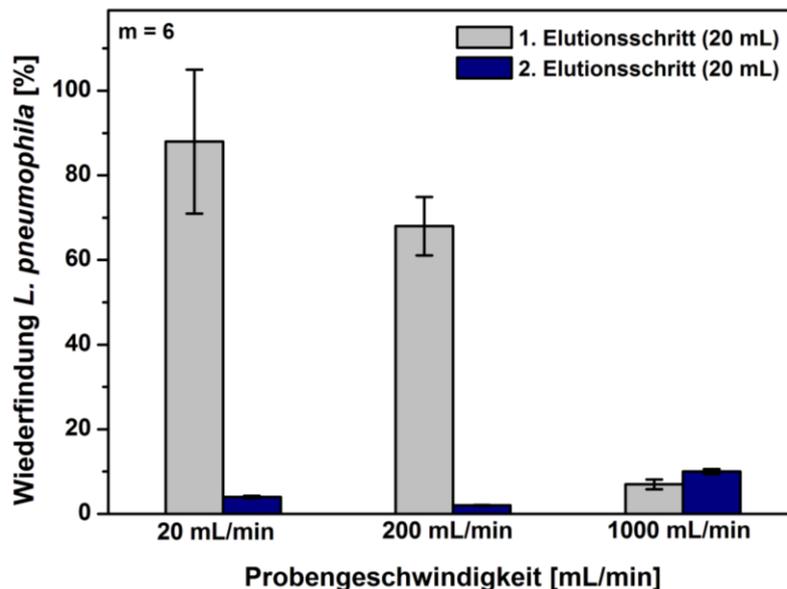


Abbildung 3.24: Wiederfindung von *L. pneumophila* in dotierten 10-L-Leitungswasserproben (10^8 Zellen) nach Anreicherung mit großen monolithischen Affinitätsfiltrationssäulen.

Aus Abbildung 3.24 wird ersichtlich, dass die Wiederfindung mit steigender Geschwindigkeit der Probe abnimmt. Bei einer zu hohen Geschwindigkeit haben die Bakterien keine Möglichkeit der Wechselwirkung mit dem monolithischen Material und werden somit nicht in der Säule zurückgehalten. Wurde die Probe mit 1000 mL/min durch die Säule geleitet, wurden nur 7 % im Eluat wiedererhalten. Durch die Erniedrigung der Geschwindigkeit auf 200 mL/min konnte die Wiederfindung um den Faktor 10 gesteigert werden. Mit der langsamsten Fließgeschwindigkeit von 20 mL/min konnte *L. pneumophila* fast vollständig (88 %) eluiert werden. Neben der Wiederfindung muss aber auch die Dauer der Anreicherung

in Betracht gezogen werden. In Tabelle 3.8 ist ein Überblick der Wiederfindungen in Abhängigkeit der Probengeschwindigkeit und der daraus resultierenden Dauer für die Anreicherung aufgezeigt.

Tabelle 3.8: Probengeschwindigkeit bei der Anreicherung von 10-L-Proben und die daraus resultierende Gesamtdauer des Anreicherungsprozesses (m = 6).

Probengeschwindigkeit [mL/min]	Wiederfindung [%]	Dauer der Anreicherung einer 10-L-Probe
20	88 ± 17	> 8 h
200	68 ± 7	50 min
1000	7 ± 1	10 min

Die Anreicherung mit 1000 mL/min kann innerhalb weniger Minuten erfolgen, lieferte aber nur eine geringe Wiederfindung und ist damit ungeeignet. Mit 20 mL/min konnten die Bakterien mit einer hohen Wiederfindung von 88 % wiedergefunden werden, wobei allerdings eine hohe Standardabweichung von 17 % erhalten wurde. Die Anreicherung mit dieser Geschwindigkeit dauert länger als 8 Stunden, was in dieser Form nicht anwendbar ist. Mit einer Geschwindigkeit von 200 mL/min konnte eine gute Wiederfindung von etwa 70 % erzielt werden und die Anreicherung kann in einer akzeptablen Zeit von unter einer Stunde durchgeführt werden.

Alle bisherigen Aussagen bezogen sich auf die erste erhaltene Eluatfraktion. Im zweiten 20 mL-Eluat wurden für alle Geschwindigkeiten nur einige Prozent der Legionellen wiedergefunden. Bei der optimalen Probengeschwindigkeit (200 mL/min) betrug die Wiederfindung im zweiten Eluat lediglich 2 %. Ein Elutionsvolumen von 20 mL ist folglich ausreichend für die verwendeten Säulendimensionen. Hier ist es wichtig das Elutionsvolumen so zu wählen, dass eine hohe Wiederfindung in einem möglichst kleinen Endvolumen und damit ein hoher Anreicherungsfaktor erzielt wird.

Um zu untersuchen, ob das eingesetzte Probenvolumen Einfluss auf die Bakterienwiederfindung hat, wurden eine 1-L- und eine 10-L-Leitungswasserprobe angereichert, die jeweils eine absolute Zellzahl von 10^8 Zellen enthielten. Die Proben wurden mit einer Geschwindigkeit von 200 mL/min über die monolithische Affinitätsfiltrationssäule gegeben. Die Wiederfindungen wurden mittels Mikroarray-Messung anhand der eingesetzten Proben und der entsprechenden Eluate ermittelt.

Tabelle 3.9: Wiederfindungen von *L. pneumophila* in 1 L beziehungsweise 10 L dotiertem Leitungswasser (m = 6).

Probenvolumen	Wiederfindung
1 L	66 ± 17 %
10 L	68 ± 7 %

Die in Tabelle 3.9 aufgeführten Wiederfindungen deuten darauf hin, dass das Probenvolumen die erhaltene Wiederfindung nicht beeinflusst. Für die 1-L-Probe wurde eine vergleichbare Wiederfindung erhalten wie für die 10-L-Probe. Unabhängig vom Probenvolumen konnte somit eine konstante Wiederfindung erzielt werden, was die Anwendung für unterschiedliche Proben erlaubt.

Insgesamt hat sich die größer dimensionierte monolithische Affinitätsfiltrationssäule als effektive Anreicherungsmethode in Kombination mit Mikroarrays erwiesen. Durch die Optimierung verschiedener Parameter hinsichtlich des Anreicherungsprozesses konnte eine konstante Wiederfindung von etwa 70 % erzielt werden, wobei die Dauer der Anreicherung für 10 L 50 Minuten beträgt. Durch diese Versuche wurden wichtige Ergebnisse hinsichtlich der Auswahl eines Anreicherungsverfahrens erzielt, welches mit Mikroarray-Messungen kombinierbar ist. Eine weitere Charakterisierung für inaktivierte und auch lebende Legionellen soll in weiterführenden Arbeiten realisiert werden.

3.4 Detektion von *L. pneumophila* Serogruppe 1 in Bioaerosolen

Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, ist die Detektion von Legionellen in Bioaerosolen von großem Interesse. Die optimierte und gut charakterisierte Mikroarray-Messung von *L. pneumophila* Serogruppe 1 wurde für die Anwendung von Bioaerosol-Messungen untersucht.

3.4.1 Modellaufbau zur Bioaerosol-Analytik

Für die Bioaerosol-Untersuchungen wurde ein Modellaufbau zur gezielten Bioaerosol-Erzeugung und zum anschließenden Sammeln entwickelt und mit der Probenanalyse mittels Antikörper-Mikroarrays kombiniert (Abbildung 3.25).

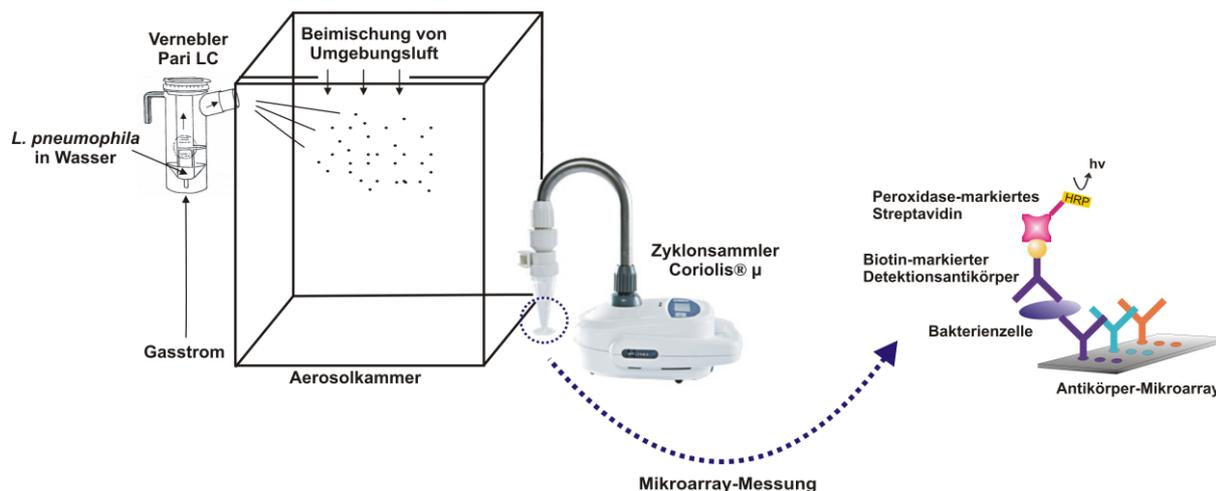


Abbildung 3.25: Schematische Darstellung des Modellaufbaus zur Erzeugung, Probenahme und Messung von Bioaerosolproben.

Der Bioaerosol-Aufbau beinhaltete einen Vernebler vom Typ Pari LC zur Erzeugung und Freisetzung der bakterienhaltigen Aerosole in eine Plastikkammer mit einem Volumen von 75 L. An einer Öffnung der Kammer war der Zyklon-Sammler Coriolis µ zur Probenahme angebracht. Die Bioaerosol-Erzeugung wurde zur gleichen Zeit gestartet wie der Sammelvorgang. Partikel aus dem Bioaerosol wurden dabei in der Sammelflüssigkeit (sterilem Reinstwasser) abgeschieden und konnten direkt zur Mikroarray-Messung eingesetzt werden. Der Vernebler wurde über eine leicht geöffnete Vorrichtung der Kammer angebracht, so dass es bei der Freisetzung zu keiner sichtbaren Abscheidung an der Kammer kam. Durch die Öffnung konnte Umgebungsluft ins Innere der Kammer gelangen, um den Unterschied der Volumenströme von Vernebler (9,2 L/min) und Sammler (300 L/min) auszugleichen.

Bei dem verwendeten Vernebler Pari LC [256] handelte es sich um einen Zerstäuber, der bei der Therapie von Atemwegserkrankungen gebräuchlich ist. Mit Hilfe eines expandierenden Gases wird das Aerosol aus der eingesetzten Suspension erzeugt. Dieser Vernebler erzeugt Partikel im Größenbereich von 1 - 5 µm [257]. Der für den Modellaufbau verwendete Vernebler stellt eine günstige und interessante Alternative zu den üblicherweise verwendeten Cross-Flow-Zerstäubern dar und wurde in dieser Arbeit zum ersten Mal zur Bioaerosol-Erzeugung eingesetzt.

Bei dem Coriolis µ-Sammler handelte es sich um ein Gerät, das speziell für das Sammeln von Bioaerosolen entwickelt wurde. Verglichen mit anderen Sammelmethode, wird mit dem Zyklonsammler die physikalische Beanspruchung der Bakterien während des

Sammelprozesses reduziert [258]. Da das Standardverfahren zur Quantifizierung (Kulturnachweis) auf der Messung lebender Bakterien beruht, ist es wichtig, nach dem Sammelprozess einen möglichst großen Anteil an aktiven Zellen zu erhalten. Als weiterer Vorteil kann hier die flexible Wahl der Sammelflüssigkeit ausgenutzt werden, welche den direkten Einsatz der Probe für die Mikroarray-Messung ermöglicht.

Dieser Bioaerosol-Aufbau wurde von Georg Hartmann realisiert und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass reproduzierbare Bioaerosol-Messungen für unterschiedliche Konzentrationen und an unterschiedlichen Tagen durchgeführt werden konnten [142]. Die Bakterienwiederfindung in der gesammelten Probe diente als Parameter zur Charakterisierung und Bewertung. Mit Hilfe eines nichtpathogenen *E. coli*-Stammes wurde in der Arbeit von Georg Hartmann außerdem die Quantifizierung lebender und inaktivierter Bioaerosolproben untersucht. Für die inaktivierten *E. coli*-Zellen wurden Wiederfindungen im gleichen Bereich erhalten wie für lebende *E. coli* [142]. Die Verwendung inaktivierter Bakterien zeigte sich somit für Bioaerosol-Untersuchungen geeignet.

3.4.2 Bioaerosol-Messungen

Für die Bioaerosol-Messungen wurde *L. pneumophila* Serogruppe 1 eingesetzt. Wie bereits in Kapitel 3.2.2 beschrieben, war hier die Mikroarray-Messung mit einer Nachweisgrenze von $1 \cdot 10^3$ Z/mL und einem weiten Arbeitsbereich von $8 \cdot 10^3$ Z/mL bis $4 \cdot 10^6$ Z/mL möglich. Alle Messungen dieses Kapitels wurden mit der ersten Charge des Detektionsantikörpers durchgeführt (vgl. Kapitel 3.2.3).

Vor der Messung von *Legionella*-Bioaerosolproben musste sichergestellt werden, dass bei der Messung von Bioaerosolproben keine unspezifischen Messsignale auf dem Mikroarray erhalten wurden. Dies war wichtig, da beim Sammelprozess nicht nur gezielt Legionellen abgeschieden wurden, sondern alle Partikel eines bestimmten Größenbereichs, welche sich in der Aerosolkammer beziehungsweise der Umgebungsluft befanden. Um dies zu untersuchen, wurde analog der beschriebenen Bedingungen steriles Reinstwasser vernebelt, gesammelt und mittels Mikroarray gemessen. Auf dem erhaltenen Bild der Mikroarray-Messung waren auf der gesamten Oberfläche des Messbereichs keine unspezifischen Signale zu erkennen. Auch im Bereich der immobilisierten Fängerantikörper kam es zu keinen unspezifischen Bindungen (siehe Abbildung 3.26). Eine Erhöhung des Hintergrundsignals konnte ebenfalls nicht

beobachtet werden. Damit war eine grundlegende Voraussetzung für die Messung von Bioaerosolproben erfüllt.

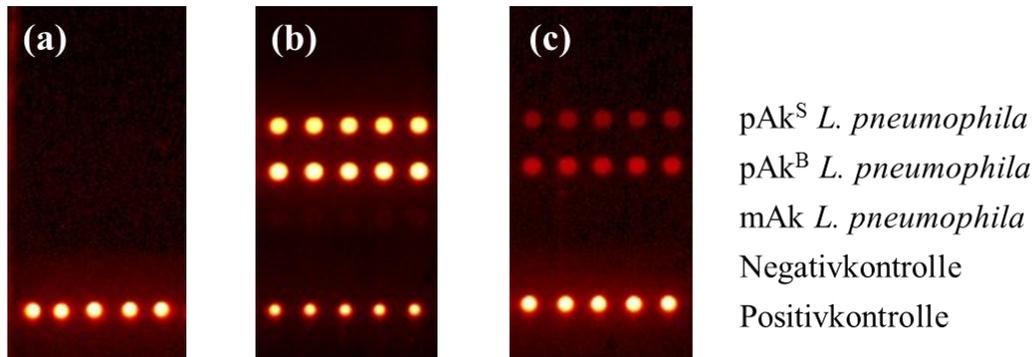


Abbildung 3.26: Chemilumineszenzsignale für die Messung einer nichtbakterienhaltigen Bioaerosolprobe (a), einer zum Vernebeln eingesetzten *Legionella*-Suspension (b) und der zugehörigen Bioaerosolprobe (c).

Zur Charakterisierung der Bioaerosol-Messungen wurden mehrere Proben erzeugt, gesammelt und quantifiziert. Neben den Mikroarray-Messungen wurden die Proben zusätzlich mittels Durchflusszytometer gemessen, was als Referenzverfahren diente. Abbildung 3.27 zeigt einen Überblick der untersuchten Bioaerosolproben, wobei für jede Probe die Wiederfindungen, ermittelt mittels Mikroarray und Zytometrie, aufgetragen sind.

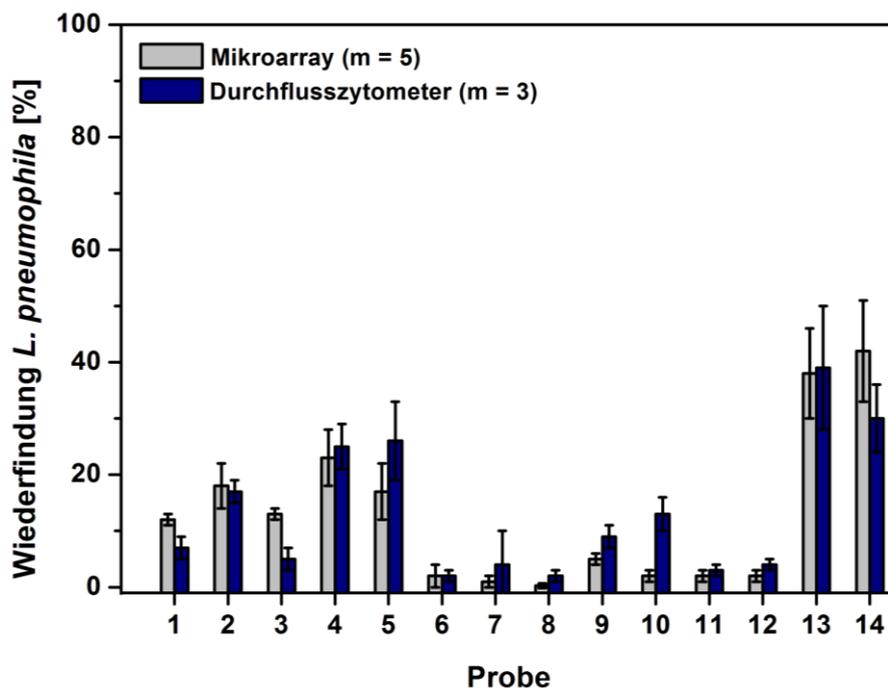


Abbildung 3.27: Wiederfindung von *L. pneumophila* in unterschiedlichen Bioaerosolproben, erhalten mit Mikroarrays und Durchflusszytometrie. Die Standardabweichungen der Mikroarray-Messungen ergaben sich aus den Spot-Replikaten, die des Zytometers wurden durch Mehrfachmessungen erhalten.

Die Unterschiede in den Wiederfindungen sind durch die unterschiedlichen Bedingungen bei der Bioaerosol-Erzeugung und -Sammlung zu begründen. Dies wurde in der Arbeit von Georg Hartmann bereits ausführlich beschrieben und soll an dieser Stelle nicht näher diskutiert werden. Der Fokus liegt hier auf dem Vergleich der beiden Detektionsmethoden. Es ist zu erkennen, dass für alle Proben mit Mikroarrays im Vergleich zur Zytometerbestimmung der gleiche Trend bezüglich der Bakterienwiederfindung erhalten wurde. Für die meisten Proben stimmten unter Berücksichtigung der Standardabweichungen die Wiederfindungen sehr gut überein. Dies lässt darauf schließen, dass die Mikroarray-Messung erfolgreich für die Messung von Bioaerosolproben eingesetzt werden kann.

Die bisher gezeigten Untersuchungen wurden ausschließlich mit dem beschriebenen Modellsystem durchgeführt. Der dort eingesetzte Zyklonsammler wurde mit einem weiteren Sammelgerät (AGI-30) verglichen, welches anstelle des Coriolis-Sammlers in den Modellaufbau integriert wurde. Es wurden vier Proben mit einer Ausgangskonzentration von $8 \cdot 10^6$ Z/mL vernebelt und mit dem Coriolis-Sammler bzw. dem AGI-30 gesammelt. Die Legionellen-Konzentration wurde mittels Mikroarray und Zytometer bestimmt. Für jeden Sammler wurden zwei unterschiedliche Sammelmethoden angewendet. Die erste Methode entsprach dem in Kapitel 3.4.1 beschriebenen Modellaufbau. Bei der zweiten Sammelvariante wurde die Aerosolkammer aus dem Aufbau entfernt und der Sammler auf gleicher Höhe mit dem Vernebler in einem Abstand von etwa 10 cm positioniert. Anhand dieses direkten Volumenstroms des Verneblers zum Sammler sollte die Effizienz der Sammler ohne den Einfluss von potentiellen Bakterienverlusten an der Plastikkammer verglichen werden. Die Bakterienwiederfindungen, die für die vier Proben erhalten wurden, sind in Abbildung 3.28 aufgeführt.

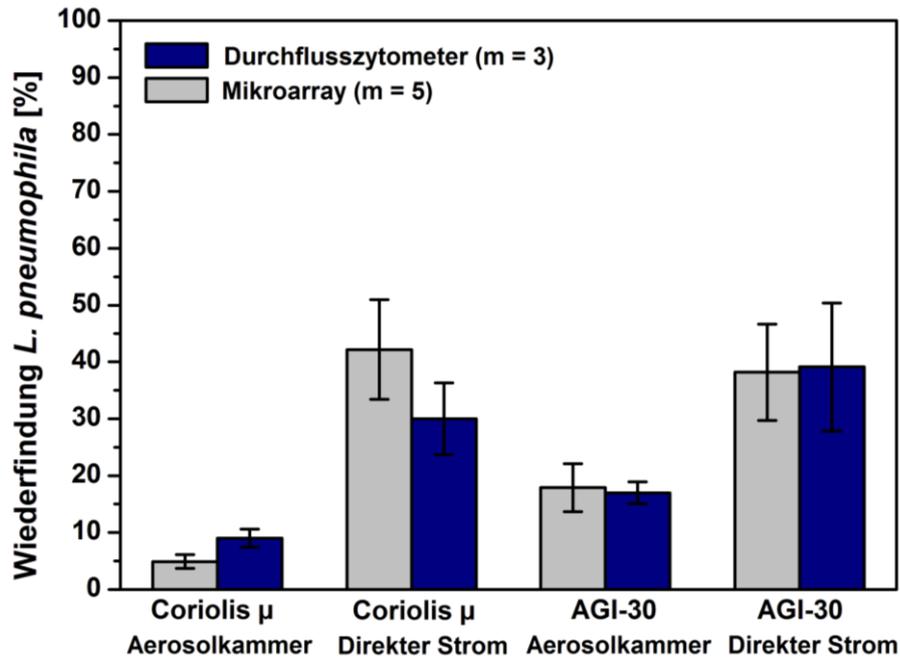


Abbildung 3.28: Wiederfindung von *L. pneumophila* mittels Coriolis μ und AGI-30 beim Sammeln aus der Aerosolkammer bzw. mit direktem Volumenstrom zum Sammler. Die Standardabweichung der Mikroarray-Messungen ergab sich aus den Spot-Replikaten, die Standardabweichung des Zytometers wurde durch Mehrfachmessungen erhalten.

Beim Sammeln aus der Aerosolkammer wurden Wiederfindungen von 17 ± 2 % (Zytometer) und 18 ± 4 % (Mikroarray) für den AGI-30 und 9 ± 2 % (Zytometer) beziehungsweise 5 ± 1 % (Mikroarray) für den Coriolis-Sammler erhalten. Der gerichtete Volumenstrom ergab Wiederfindungen von 39 ± 11 % (Zytometer) beziehungsweise 38 ± 9 % (Mikroarray) für den AGI-30 und 30 ± 6 % (Zytometer) und 42 ± 9 % (Mikroarray) für den Coriolis μ . Unter Berücksichtigung der Standardabweichungen zeigten auch diese Messungen eine gute Übereinstimmung beim Vergleich der beiden Detektionsmethoden. Für den AGI-30 war die Übereinstimmung sehr gut. Die Messung der Proben des Coriolis-Sammlers wies etwas höhere Unterschiede zwischen den Detektionsmethoden auf. Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass die Mikroarray-Messung in Kombination mit beiden verwendeten Sammelgeräten geeignet ist.

Vergleicht man die unterschiedlichen Sammelmethode, wurden beim Sammeln aus der Aerosolkammer für beide Sammler geringere Wiederfindungen erhalten als mit dem direkten Aerosolstrom. Dieses Ergebnis weist darauf hin, dass unter Verwendung der Aerosolkammer ein bedeutender Teil der Bakterien auf dem Weg von Vernebler zu Sammler verloren geht. Die Ursache liegt vermutlich in der Deposition oberflächengeladener Bakterien an die Plastikoberfläche der Kammer. Um dies zu vermeiden, könnte zum Beispiel eine radioaktive Quelle (Kr-85) als Partikel-Neutralisator nach dem Vernebeln eingesetzt werden.

Die Wiederfindung mit der Aerosolkammer war für den AGI-30 etwa doppelt so hoch wie für den Coriolis-Sammler. Für das direkte Sammeln des Bioaerosols wurden für die beiden Sammler ähnliche Wiederfindungen im Bereich von 40 % erhalten. Zum Vergleich der Sammlereffizienzen ist der direkte Volumenstrom vermutlich besser geeignet, da der Verlust von Bakterien an der Kammer vermieden wird und somit die Effizienz ausschließlich auf den verwendeten Sammler zurückzuführen ist.

Für die Anwendung einer Methode zur Messung von Bioaerosol-Realproben ist die Nachweisgrenze bezogen auf Bakterien in der Luft eine entscheidende Kenngröße. Wie in Gleichung 3.1 wiedergegeben, nehmen neben der Effizienz des Sammlers weitere Größen Einfluss auf die Nachweisgrenze. Die Nachweisgrenze für Bakterien, die als Bioaerosol vorliegen (LOD_{aer}), kann unter Verwendung von Gleichung 3.1 berechnet werden.

$$LOD_{aer} = \frac{LOD_{detection} \cdot V_{end}}{Q \cdot t} \cdot \frac{1}{\eta} \quad \text{(Gleichung 3.1)}$$

$LOD_{detection}$ = Nachweisgrenze Mikroarray

V_{end} = Endvolumen der Sammelflüssigkeit

Q = Volumenstrom des Sammlers

t = Sammelzeit

η = Aerosol-Hydrosol-Sammeleffizienz

Für den Coriolis μ ergeben sich ein Endvolumen von 5 mL, ein Volumenstrom von 300 L/min und eine Sammelzeit von 10 min. Für den AGI-30 liegen die Parameter bei einem Endvolumen von 18 mL, einem Volumenstrom von 10,5 L/min und einer Sammelzeit von ebenfalls 10 min. Die Nachweisgrenze des Mikroarray-Detektionsverfahrens lag bei $1 \cdot 10^3$ Z/mL. Die experimentell erhaltene Sammeleffizienz beim Sammeln ohne Aerosolkammer betrug 42 % für Coriolis μ und 38 % für den AGI-30. In der Literatur wurde eine maximale Sammeleffizienz des Coriolis μ für Partikel im Größenbereich von Bakterien von 49 % bestimmt [259]. Für den AGI-30 wurde für *L. pneumophila* eine Sammeleffizienz von 70 % beschrieben [260]. Für den Coriolis-Sammler stimmt die experimentell gefundene Wiederfindung gut mit dem Literaturwert überein. Die Ursache für die geringere bestimmte Effizienz des AGI-30 wird in der Verwendung Hitze-inaktivierter Legionellen in dieser Arbeit vermutet.

Die Konzentrierungsrate (R), welche flüssigkeitsbasierte Bioaerosol-Sammler charakterisiert, ist definiert als Verhältnis der Partikelkonzentration in der Sammelflüssigkeit zu der im

Bioaerosol vorliegenden Partikelkonzentration pro Zeiteinheit und kann mit Hilfe von Gleichung 3.2 erhalten werden [261].

$$R = \frac{Q}{V_{end}} \cdot \eta \quad (\text{Gleichung 3.2})$$

Unter Einbeziehung der experimentell erhaltenen Effizienz und der Literaturwerte sind in Tabelle 3.10 die Konzentrierungsraten der Sammler und die Nachweisgrenzen für die beiden Sammler in Kombination mit dem Mikroarray-Immunoassay aufgelistet.

Tabelle 3.10: Konzentrierungsraten und Nachweisgrenzen für Coriolis μ und AGI-30 in Kombination mit Mikroarray-Detektion für experimentell erhaltene und in der Literatur beschriebene Sammlereffizienzen.

	Coriolis μ	AGI-30
η Experiment	0,42	0,38
Konzentrierungsrate [1/min]	25200	222
LOD [Z/m³]	$4 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^5$
η Literatur	0,49	0,70
Konzentrierungsrate [1/min]	29400	408
LOD [Z/m³]	$3 \cdot 10^3$	$2 \cdot 10^5$

Tabelle 3.10 gibt den Konzentrationsbereich wieder, in dem *L. pneumophila* Serogruppe 1 in definiert erzeugten Bioaerosolen nachgewiesen werden kann. Mit dem Coriolis-Sammler können in Kombination mit dem Mikroarray-Immunoassay Konzentrationen von $4 \cdot 10^3$ Zellen pro m³ Luft nachgewiesen werden, wenn die experimentell bestimmte Sammeleffizienz von 42 % vorausgesetzt wird. Für eine ähnliche Effizienz kann mittels AGI-30 nur eine bedeutend höhere Nachweisgrenze erreicht werden. Wegen des höheren Endvolumens und des geringeren Volumenstromes ist der AGI-30 dem Coriolis μ bzgl. der Nachweisgrenze klar unterlegen. Sogar mit dem Literaturwert, einer Effizienz von 70 % für den AGI-30 und den erhaltenen 42 % für den Coriolis μ , wird für den Coriolis-Sammler eine Nachweisgrenze erhalten, die fast um den Faktor 100 niedriger ist. Der ausschlaggebende Parameter für diesen Unterschied ist die beim Coriolis μ wesentlich höhere Durchflussrate. Die sich daraus ergebende Konzentrierungsrate des Coriolis μ ist etwa um den Faktor 100 höher, selbst wenn die Effizienzen aus der Literatur betrachtet werden (Tabelle 3.10). Weist ein Sammler eine hohe Konzentrierungsrate auf, ermöglicht dies den Nachweis geringerer Partikelkonzentrationen beziehungsweise verringert dies die benötigte Sammelzeit zur

Detektion luftgetragener Partikel [261]. Die geringe Konzentrierungsrate des AGI-30 bedingt somit die geringere Nachweissensitivität und macht deutlich längere Sammelzeiten notwendig.

Die experimentell erreichte Nachweisgrenze für *L. pneumophila* Sg 1 mittels Mikroarrays und dem Sammler Coriolis μ betrug 4×10^3 Zellen/m³. Dieses Nachweissystem ist in Tabelle 3.11 anderen Systemen und in der Umwelt ermittelten Legionellenkonzentrationen gegenübergestellt.

Tabelle 3.11: Vergleich des entwickelten Bioaerosol-Messsystems mit weiteren beschriebenen Methoden und in der Umwelt gefundenen Legionellenkonzentrationen.

Quelle	Sammel- methode	Nachweis- verfahren	Dauer	Konzentration [Zellen/m ³]	Literatur
Wasser - Kühlturm	Impaktor	Kultivierung	> 7 d	23	[139]
Wasser - Kühlturm	Zyklon	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung	48 h	$\leq 5 \cdot 10^3$	[12]
Biologische Kläranlage	Impaktor/Zyklon	real-time PCR	6 - 8 h	$\leq 3 \cdot 10^3$	[140]
Verdunstungskühler	Impaktor	Kultivierung	> 7 d	$2 \cdot 10^3$	[46]
Dusche	AGI-30	Fluoreszenz- mikroskopie	~ 2 h	$3 \cdot 10^4$	[262]
	Coriolis μ	Mikroarray	< 2 h	$4 \cdot 10^3$	

Außer dem in dieser Arbeit entwickelten Mikroarray-Immunoassay ist bisher keine vergleichbare Analysemethode für Legionellen in der Literatur beschrieben. Mit den meisten anderen Nachweismethoden kann das Ergebnis der Bioaerosol-Untersuchung erst nach mehreren Stunden bzw. Tagen (vgl. Tabelle 3.11) erhalten werden. Diese Methoden sind deshalb für das Monitoring von Bioaerosolen nur bedingt geeignet. Mit der Mikroarray-Messung können die Bioaerosol-Probenahme und -messung in weniger als 2 Stunden erfolgen. Betrachtet man die Legionellen-Konzentrationen, die tatsächlich in der Umwelt vorkamen, liegt die Nachweisgrenze des entwickelten Systems teilweise in einem relevanten Bereich. Es gilt allerdings zu berücksichtigen, dass sich die ermittelte Nachweisgrenze auf die Untersuchungen mittels Modellaufbau bezieht, was nicht unmittelbar auf die Messung von Realproben übertragen werden kann. Durch eine leichte Verbesserung der Sensitivität, z. B. über eine längere Sammelzeit, hat die Methode aber Potential zur Anwendung für Bioaerosol-Untersuchungen. Die Mikroarray-Messung erlaubt außerdem die parallele Bestimmung verschiedener Organismen oder Spezies in einer Probe. So kann die analytische Information

für eine Bioaerosolprobe erhöht werden, was für die Rückverfolgbarkeit von Infektionsquellen entscheidend ist.

Um die Selektivität des Mikroarray-Immunoassays zu testen, wurden Bioaerosole erzeugt und gemessen, welche *L. pneumophila* und *E. coli* enthielten. Dabei sollte *L. pneumophila* in Anwesenheit einer hohen *E. coli*-Konzentration quantifiziert werden.

Vor der Messung von Bioaerosolproben war es wichtig die Kreuzreaktivität auf dem Mikroarray zu bestimmen. Dazu wurde zum einen eine Mischung beider Bakterien ($2 \cdot 10^8$ *E. coli*/mL und $7 \cdot 10^5$ *L. pneumophila*/mL) gemessen und zum anderen jeweils nur eine Bakterienart in entsprechender Konzentration mit einer Mischung beider Detektionsantikörper (siehe Abbildung 3.29).

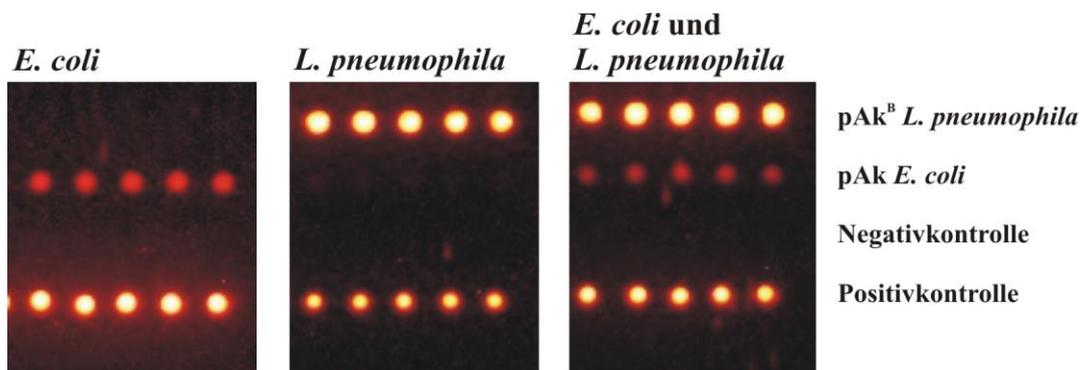


Abbildung 3.29: Chemilumineszenzsignale für die Messung von *E. coli*, *L. pneumophila* und einer Mischung beider Bakterienspezies.

Bei Vorliegen einer Bakterienspezies wurden auf dem Mikroarray Signale spezifisch für die eingesetzte Spezies detektiert. Für die Bakterienmischung wurden Signale für *E. coli* und *L. pneumophila* erhalten. Die Messsignale der Bakterienmischung und der einzeln eingesetzten Bakterien stimmten gut überein (Abbildung 3.30). Aufgrund der geringeren Assay-Sensitivität von *E. coli* wurden für die deutlich höhere Bakterienkonzentration jedoch vergleichsweise geringe Signale erhalten.

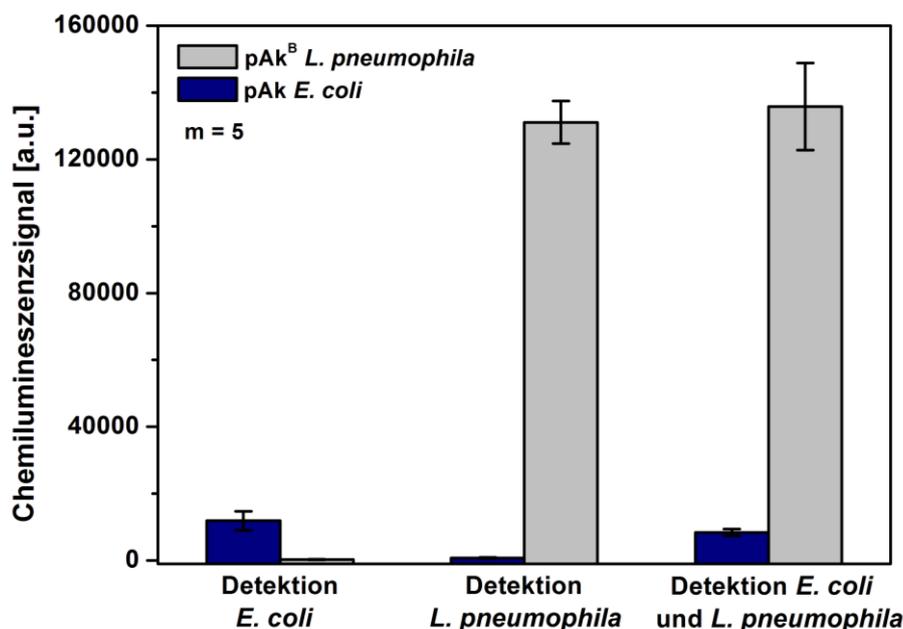


Abbildung 3.30: Chemilumineszenzsignale der Messung von *E. coli* ($2 \cdot 10^8$ Z/mL), *L. pneumophila* ($7 \cdot 10^5$ Z/mL) sowie einer Mischung der Bakterien mit entsprechenden Konzentrationen.

Die Kreuzreaktivität wurde berechnet, indem das Verhältnis der CL-Signale der unspezifischen Antikörper und dem der spezifischen Antikörper gebildet wurde [28]. Dabei ergaben sich Kreuzreaktivitäten von weniger als 3 %. Diese geringe Kreuzreaktivität sollte das Messergebnis von *L. pneumophila* nicht negativ beeinflussen und bildet die Grundlage für den Nachweis der Bakterienmischung.

Nachdem gezeigt wurde, dass bei der gleichzeitigen Bestimmung von *E. coli* der Einfluss von Kreuzreaktivität auf das Messergebnis für *L. pneumophila* zu vernachlässigen ist, wurden gemischte Bioaerosole unter Verwendung des Modellaufbaus (Kapitel 3.4.1) untersucht. Es wurden mehrere Proben analysiert, die in der Zusammensetzung den Kreuzreaktivitätsuntersuchungen entsprachen. *L. pneumophila* lag folglich mit unter 1 % der Gesamtbakterienzahl vor. Die Suspensionen wurden vernebelt und die Bioaerosole gemäß Kapitel 3.4.1 gesammelt und quantifiziert. Die Wiederfindungen für *L. pneumophila* in den einzelnen Proben sind in Abbildung 3.31 dargestellt.

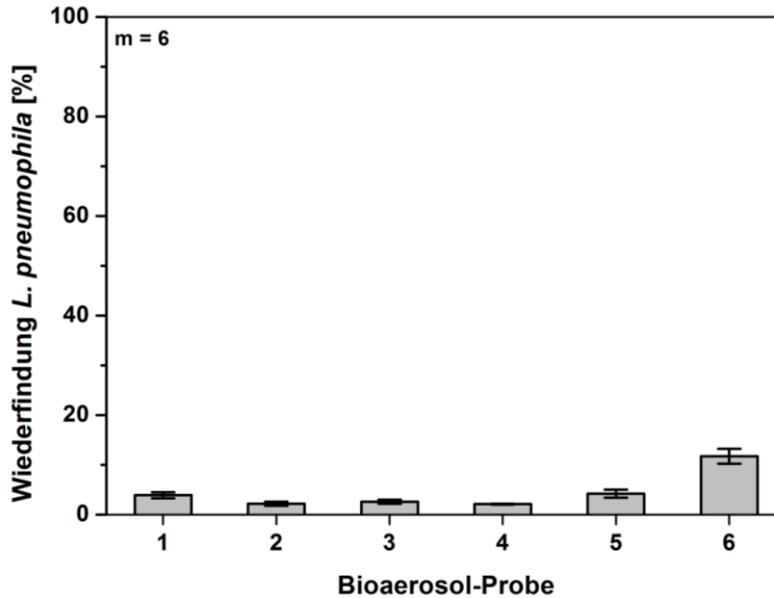


Abbildung 3.31: Wiederfindung von *L. pneumophila* in Bioaerosolen, welche *E. coli* ($2 \cdot 10^8$ Z/mL) und *L. pneumophila* ($7 \cdot 10^5$ Z/mL) enthielten.

Die Messungen waren relativ gut reproduzierbar und ergaben eine gemittelte Wiederfindung von 5 ± 3 %. Der erhaltene Wert stimmte gut mit Messungen reiner *Legionella*-Aerosole unter gleichen Bedingungen überein. Es kann also davon ausgegangen werden, dass es durch die Anwesenheit weiterer Bakterien zu keiner Verfälschung der Messung kommt und *L. pneumophila* auch in einer bakterienhaltigen Matrix quantifiziert werden kann. Ein Vergleich mit dem Durchflusszytometer war nicht möglich, da mit SYTO 9 keine Differenzierung unterschiedlicher Bakterien möglich war, sondern nur die Gesamtbakterienzahl bestimmt werden konnte.

Insgesamt konnte der Mikroarray-Immunoassay in den Untersuchungen mit der geringen Dauer, der Selektivität und dem Potential der Multiplex-Messung für die Analyse von Bioaerosolen überzeugen.

3.4.3 Realproben-Messungen

Das entwickelte System des Coriolis μ zur Probenahme und den Mikroarrays zur Messung sollte nach der Charakterisierung mittels Modellaufbau zur Untersuchung von Realproben angewendet werden. Die Versuche fanden in Zusammenarbeit mit dem Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) München statt. Es fand eine Probenahme in einer Dusche am Institut (IWC) und einer Dusche am LGL Oberschleißheim statt. Außerdem

wurden Bioaerosolproben von einer Rückkühlanlage des LGL Oberschleißheim untersucht. Vom LGL wurde ein weiterer Luftkeimsammler auf dem Prinzip der Filtration (*Sartorius*) bereitgestellt. Die Sammler wurden zur Probenahme direkt nebeneinander positioniert und parallel eingesetzt. Die Sammelzeit betrug 10 min. Vor Beginn der Probenahme mit laufender Rückkühlanlage bzw. aufgedrehtem Duschwasser wurden Referenzproben der Umgebungsluft mit entsprechender Sammelzeit und -position genommen. Zum Vergleich mit den Mikroarray-Messungen wurden die Proben am LGL mittels Kultivierung quantifiziert und anschließend eine Serogruppen-Bestimmung mittels *Legionella* Latex Test durchgeführt.

Tabelle 3.12: Untersuchungen von Wasser- und Bioaerosolproben aus zwei Duschen und einer Rückkühlanlage. Die Messungen erfolgten mittels Kultivierung und Mikroarrays.

Probe	Kultivierung + <i>Legionella</i> Latex Test	Mikroarray (Sg 1)
Dusche (IWC)		
Referenz Coriolis μ	-	kein Signal
Bioaerosol - Coriolis μ	negativ	$3 \cdot 10^6$ Z/m ³
Bioaerosol - <i>Sartorius</i>	negativ	kein Signal
Wasser	600 Z/100 mL (Sg1 und Sg 2 - 14)	kein Signal
Dusche (LGL)		
Referenz Coriolis μ	-	kein Signal
Bioaerosol - Coriolis μ	~ 10 Z/m ³ (Sg 1)	kein Signal
Bioaerosol - <i>Sartorius</i>	negativ	kein Signal
Wasser	6600 Z/100 mL (Sg 1)	kein Signal
Rückkühlanlage (LGL)		
Referenz Coriolis μ	negativ	kein Signal
Bioaerosol - Coriolis μ	negativ	$4 \cdot 10^3$ Z/m ³
Bioaerosol - <i>Sartorius</i>	negativ	kein Signal

In Tabelle 3.12 ist zu erkennen, dass mittels Kultivierung in beiden Duschwasserproben *L. pneumophila* gefunden wurde. Die bestimmten Konzentrationen lagen allerdings unter der Nachweisgrenze des Mikroarray-Immunoassays, weshalb *L. pneumophila* dort nicht detektiert werden konnte. Für die Bioaerosolprobe der Dusche am LGL mittels Coriolis μ wurde über Kultivierung eine Bioaerosol-Konzentration von ~ 10 Z/m³ *L. pneumophila* Sg 1 ermittelt. Auch diese Konzentration lag unterhalb der Nachweisgrenze des Mikroarrays. Für die Probe des *Sartorius*-Sammlers konnten keine Legionellen nachgewiesen werden. Aufgrund eines 6-fach geringeren Volumenstroms war die Bakterienzahl vermutlich zu gering. Für die Bioaerosolproben der IWC-Dusche konnten mittels Kultivierung keine Legionellen detektiert werden. Hier wurden allerdings mittels Mikroarrays Signale für die Probe des Coriolis μ

erhalten. Dieses Ergebnis konnte auch in einer zweiten unabhängigen Messung bestätigt werden. Es ist bekannt, dass die Kultivierung für Bioaerosolproben wesentlich geringere Bakterienkonzentrationen liefert als andere Nachweisverfahren und Bakterienkontaminationen unterbestimmt werden [144]. Mit dem Kulturnachweis werden ausschließlich lebende Bakterien erfasst, wohingegen mittels Mikroarray sowohl lebende als auch aktive, nicht kultivierbare (VBNC) Bakterien bestimmt werden. In der zugehörigen Wasserprobe wurde mittels Kultivierung eine erhöhte Konzentration von *L. pneumophila* Sg 1 nachgewiesen, was eine Kontamination des Aerosols plausibel macht. Durch die zunächst durchgeführte Referenzmessung, die keine Signale zeigte, kann eine Kontamination ausgeschlossen werden. Auch für die Bioaerosolproben der Rückkühlanlage waren die Ergebnisse ähnlich. Nur mittels Mikroarrays wurde *L. pneumophila* in der Bioaerosolprobe des Coriolis μ gemessen. Die Ergebnisse sind als Hinweis zu sehen, dass Antigene in der Luft vorhanden waren. Aufgrund eines nicht kultivierbaren Zustandes konnten diese mittels Kulturnachweis jedoch nicht detektiert werden. Der Kulturnachweis als momentane Standardmethode ist daher kritisch zu sehen, da die Konzentration potentiell infektiöser Bakterien unterbestimmt werden kann. Für verlässliche Informationen ist die zusätzliche Anwendung weiterer Nachweismethoden notwendig. Geeignet wären selektive, kulturunabhängige Verfahren, wie zum Beispiel PCR oder Immunfluoreszenz.

3.5 Mikroarray-Detektion von *L. pneumophila* Serogruppen

Nach der Charakterisierung für Serogruppe 1 war es nun das Ziel, den Antikörper-Mikroarray für den Nachweis der 14 weiteren Serogruppen zu erweitern. Die Herausforderung bestand hierbei in der Auswahl geeigneter Antikörper. Nur bei wenigen Firmen sind Antikörper erhältlich, die gegen die Serogruppen 2 - 15 gerichtet sind. Während dieser Arbeit wurden Antikörper gegen *L. pneumophila* Sg 3 und Sg 6 der Firma *Abcam* untersucht. Es konnten allerdings in keiner der Messungen von *L. pneumophila* dieser Serogruppen Signale erhalten werden. Auch eine Durchführung des klassischen Sandwich-ELISAs in der Mikrotiterplatte bestätigte dieses Ergebnis und zeigte somit, dass die verwendeten Antikörper nicht zur Erkennung von *L. pneumophila* geeignet waren. Vielfach in der Literatur beschrieben ist die erfolgreiche Anwendung der Antikörper der Arbeitsgruppe von Dr. Lück (TU Dresden) [128, 263, 264]. In dieser Arbeitsgruppe wurden Antikörper gegen alle Serogruppen von *L. pneumophila* hergestellt. Von fast allen dieser Antikörper wurde eine Probe zum Einsatz

für die Mikroarray-Entwicklung bereitgestellt. Es handelte sich um monoklonale Antikörper, die in Form von Zellkulturüberständen zur Verfügung gestellt wurden. Zur Immunisierung wurden lebende Bakterien der 15 Serogruppen von *L. pneumophila* verwendet [128].

3.5.1 Antikörper-Screening mittels Zell-Mikroarrays

Um Informationen zur Bakterienerkennung zu erhalten, wurden die Zellkulturüberstände direkt zur Mikroarray-Messung eingesetzt. Auf den Mikroarrays wurden die 15 Serogruppen von *L. pneumophila* in einer Konzentration von 10^8 Z/mL immobilisiert (Abbildung 3.32).

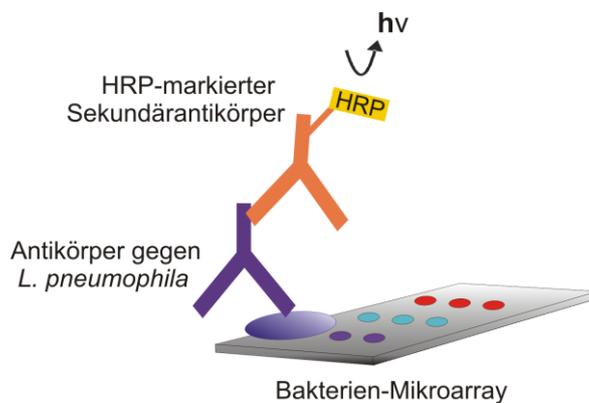


Abbildung 3.32: Schematische Darstellung des Antikörper-Screenings mittels Zell-Mikroarray.

Die Zellkulturüberstände wurden jeweils über einen Mikroarray geleitet. Die Detektion der auf dem Mikroarray gebundenen Antikörper erfolgte über einen Peroxidase-markierten Sekundärantikörper (anti-Maus) und die üblicherweise angewendete Chemilumineszenzreaktion. Die optimalen Konzentrationen der Assayreagenzien wurden nicht titriert, die Messungen dienten somit lediglich als Prinzipstudie.

In den Abbildungen 3.33 bis 3.35 sind beispielhaft die Messungen von drei Zellkulturüberständen gezeigt. Es sind die Messbilder und die zugehörigen Chemilumineszenzsignale für alle immobilisierten Serogruppen graphisch dargestellt. Die experimentell erhaltenen Reaktivitäten aller Antikörper sind in Tabelle 3.13 zusammengefasst und den Angaben von Dr. Lück gegenübergestellt.

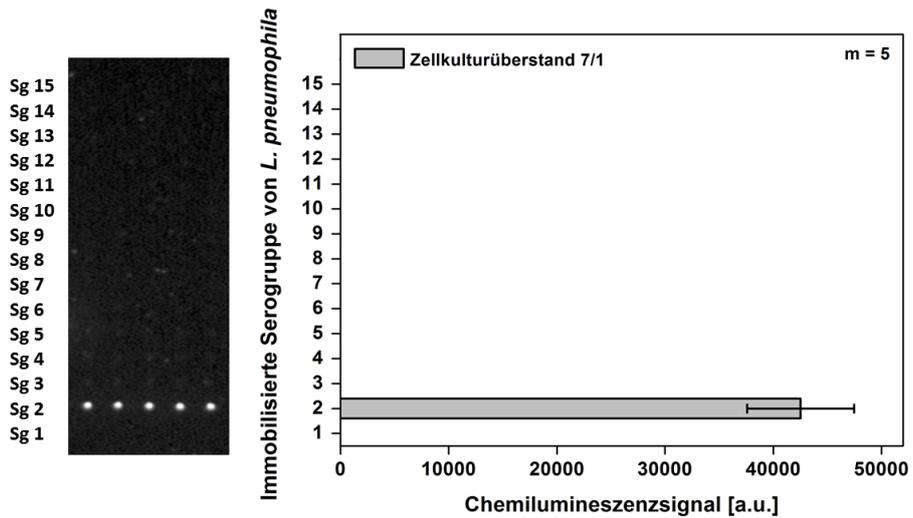


Abbildung 3.33: Messbild und graphische Auswertung des CL-Signals für die Messung des Zellkulturüberstands 7/1 mittels Bakterien-Mikroarray.

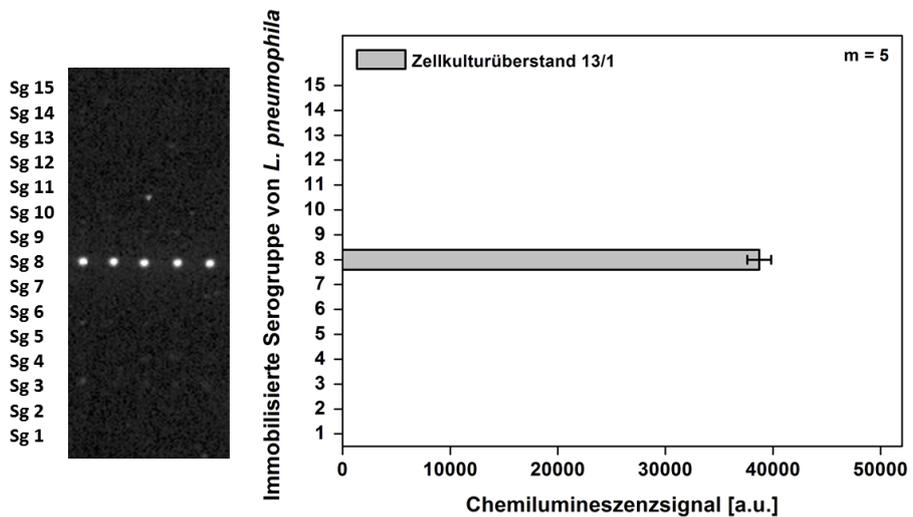


Abbildung 3.34: Messbild und graphische Auswertung des CL-Signals für die Messung des Zellkulturüberstands 13/1 mittels Bakterien-Mikroarray.

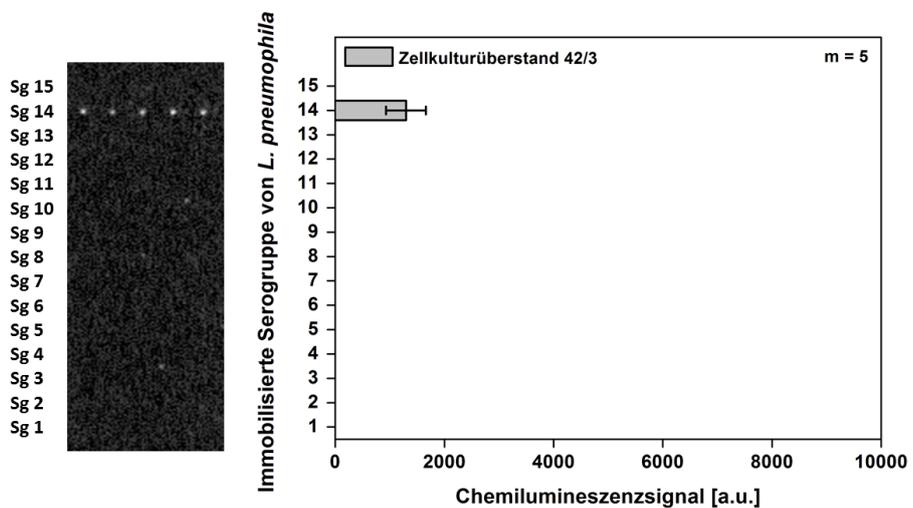


Abbildung 3.35: Messbild und graphische Auswertung des CL-Signals für die Messung des Zellkulturüberstands 42/3 mittels Bakterien-Mikroarray.

Für die Mikroarray-Messung der Zellkulturüberstände konnten gute Signale erhalten werden. Lediglich die Messungen der Zellkulturüberstände 37/2 und 27/1 ergaben auf dem gesamten Bereich des Mikroarrays kein Messsignal. Für alle übrigen gemessenen Zellkulturüberstände wurden jeweils Signale für ausschließlich eine der immobilisierten Serogruppen erhalten. Die Reaktivität der Antikörper wurde als positiv definiert (+), wenn auf dem Mikroarray-Messbild optisch ein Signal zu erkennen war. Für die erhaltenen Ergebnisse lag das Signal dabei mindestens 800 a.u. höher als das Hintergrundsignal.

Die Ergebnisse der gesamten Messungen sind in Tabelle 3.13 mit den Angaben von Dr. Lück verglichen. Hier ist eine sehr gute Übereinstimmung zu erkennen. Mit Ausnahme von Zellkulturüberstand 37/2 und 27/1 stimmte die experimentell erhaltene Reaktivität der Antikörper exakt mit den Angaben überein. Der monoklonale Antikörper (37/2) sollte gemäß den Angaben Serogruppe 9 erkennen. Die Messungen lassen vermuten, dass Serogruppe 9 von keinem Antikörper erkannt wird bzw. deutlich schlechter erkannt wird als die anderen Serogruppen. Bei der Messung von Zellkulturüberstand 27/1 wurde kein Signal erhalten, obwohl der enthaltene Antikörper laut Angabe Serogruppe 5 erkennen sollte. Dieser Antikörper besitzt vermutlich eine geringere Reaktivität als der Antikörper (5/2), welcher Serogruppe 5 erkannte.

Die Signale der Mikroarray-Messungen zeigten zum Teil deutliche Unterschiede in der Intensität. Dies veranschaulichen auch die gezeigten Beispiele. Während die immobilisierten Serogruppen 2 und 8 bei Messung der entsprechenden Zellkulturüberstände vergleichbare Signale lieferten, ist das Signal von Serogruppe 14 etwa um den Faktor 30 geringer. Da aber die Antikörperkonzentration in den Zellkulturüberständen nicht bekannt ist, werden die Signalunterschiede weitgehend auf unterschiedliche Antikörperkonzentrationen zurückzuführen sein.

3 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 3.13: Reaktivität monoklonaler Antikörper mit *L. pneumophila* Serogruppe 1 bis 15. Angaben von Dr. Lück [128] im Vergleich zu experimentell erhaltener Erkennung der Bakterien. (+) positive Reaktivität, (o) negative Reaktivität, (-) Antikörper nicht verfügbar. Für jeden Zellkulturüberstand ist zunächst die Angabe von Dr. Lück und jeweils unterhalb das Ergebnis der Mikroarray-Messung (exp) aufgeführt.

mAk	Serogruppe <i>L. pneumophila</i>														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
8/4	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
8/4 exp	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
3/1	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
3/1 exp	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
7/1	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
7/1 exp	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
4/7	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
4/7 exp	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
7/4	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
7/4 exp	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
40/4	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
40/4 exp	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
27/1	o	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
27/1 exp	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
5/2	o	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
5/2 exp	o	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
9/2	o	o	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o
9/2 exp	o	o	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o
32/3	o	o	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o
32/3 exp	o	o	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o	o
6/3	o	o	o	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o	o
6/3 exp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13/1	o	o	o	o	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o
13/1 exp	o	o	o	o	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o	o
37/2	o	o	o	o	o	o	o	o	+	o	o	o	o	o	o
37/2 exp	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o
17/2	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+	o	o	o	o	o
17/2 exp	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+	o	o	o	o	o
32/1	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+	o	o	o	o
32/1 exp	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33/3	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+	o	o	o
33/3 exp	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+	o	o	o
41/3	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+	o	o
41/3 exp	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+	o	o
42/3	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+	o
42/3 exp	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+	o
51/1	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+
51/1 exp	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	o	+

Das Screening der Zellkulturüberstände stellt eine gute Möglichkeit dar, eine Vielzahl an Antikörpern bezüglich ihrer Reaktivität zu untersuchen. Auch für Antikörper vor der Aufreinigung war die Charakterisierung möglich und lieferte vielversprechende Ergebnisse

für die Anwendung des Sandwich-Immunoassays. Nach der Aufreinigung der Zellkulturüberstände sollten die Antikörper gemäß der ermittelten Reaktivität zur Detektion der 15 Serogruppen mittels Antikörper-Mikroarrays eingesetzt werden.

3.5.2 Antikörper-Mikroarray zur Detektion von *L. pneumophila* Serogruppe 1 - 15

Für den Einsatz der monoklonalen Antikörper im Sandwich-Immunoassay wurden alle Zellkulturüberstände mittels Protein A-Säulen gereinigt. Unkonjugierte Antikörper wurden als Fängerantikörper verwendet. Für die Anwendung der Antikörper zur Detektion wurde für jede Serogruppe ein Teil der gereinigten Antikörper mit Biotin markiert. Für jede Messung wurden Mikroarrays eingesetzt, auf denen alle verfügbaren monoklonalen Antikörper immobilisiert waren. Die Spezifitäten der verfügbaren Fängerantikörper umfassten die Serogruppen 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14 und 15.

3.5.2.1 Vergleich unterschiedlicher Fängerantikörper

Für die Serogruppen 1, 4, 5 und 6 standen jeweils zwei unterschiedliche monoklonale Antikörper zur Verfügung. Abbildung 3.36 zeigt die Messung von Serogruppe 1 mit zwei monoklonalen Fängerantikörpern im Vergleich mit dem polyklonalen Antikörper von *BioDesign*. Die monoklonalen Antikörper konnten aufgrund begrenzter Verfügbarkeit nur in geringerer Konzentration (etwa Faktor 3) eingesetzt werden. Die Untersuchungen sollten zeigen, ob die monoklonalen Antikörper in der verfügbaren Konzentration bessere Ergebnisse liefern konnten als der bisher eingesetzte Fängerantikörper. Zur Detektion diente der zuvor in dieser Arbeit verwendete polyklonale Antikörper von *Senova*.

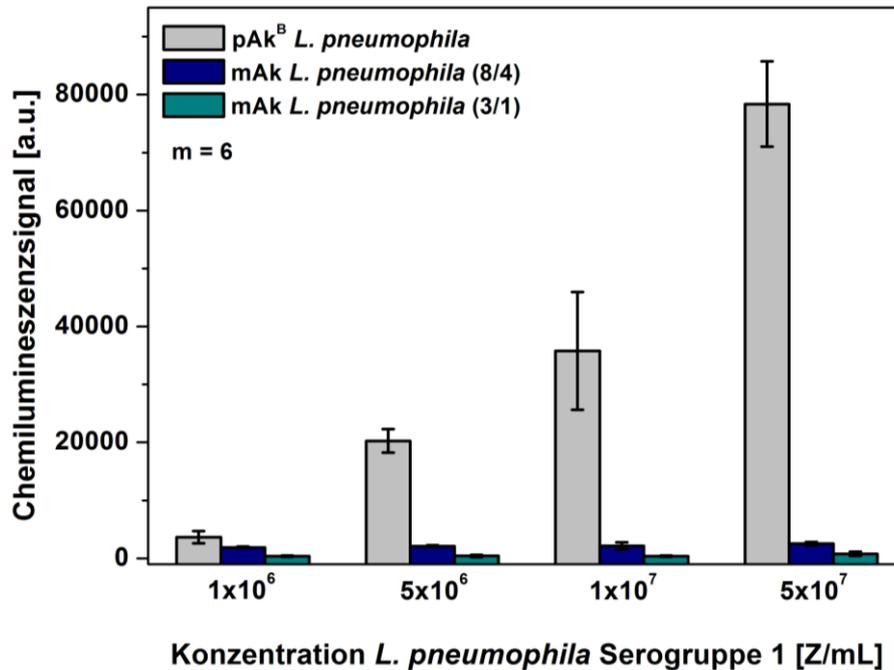


Abbildung 3.36: Vergleich verschiedener Fängerantikörper zur Detektion von *L. pneumophila* Serogruppe 1.

Die monoklonalen Fängerantikörper lieferten für alle gemessenen Bakterienkonzentrationen geringere Signale, was wohl auch auf die geringere Antikörperkonzentration zurückzuführen ist. Mit steigender Bakterienkonzentration ist für die monoklonalen Antikörper kaum ein Signalanstieg erkennbar. Für eine Kalibrierung oder die Quantifizierung von Proben sind diese Antikörper in der verwendeten Konzentration deutlich schlechter geeignet als der polyklonale Antikörper. Für die Detektion von Serogruppe 1 stellten die monoklonalen Antikörper somit keine vielversprechende Alternative dar.

Auch für Serogruppe 4, 5 und 6 wurden jeweils die beiden monoklonalen Antikörper verglichen. Der Nachweis von Serogruppe 5 war nur mit einem Antikörper (mAk 5/2) möglich. Der andere Antikörper konnte weder als Fänger-, noch als Detektionsantikörper Signale erzielen. Für Serogruppe 4 und 6 war der Nachweis mit beiden Antikörpern möglich. Die Ergebnisse des Vergleichs als Fängerantikörper sind in den Abbildungen 3.37 und 3.38 aufgezeigt.

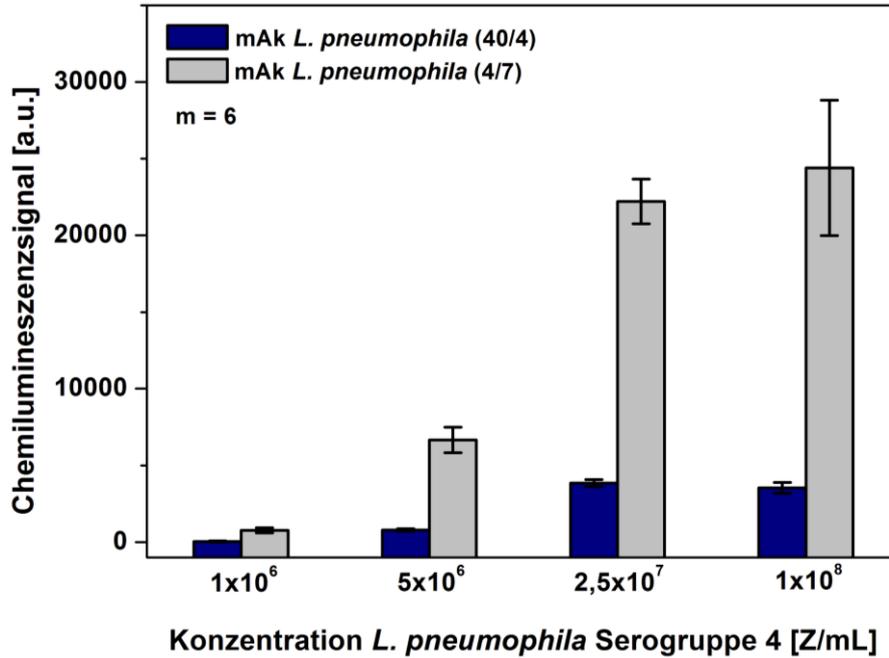


Abbildung 3.37: Vergleich zweier monoklonaler Fängerantikörper zur Detektion von *L. pneumophila* Serogruppe 4.

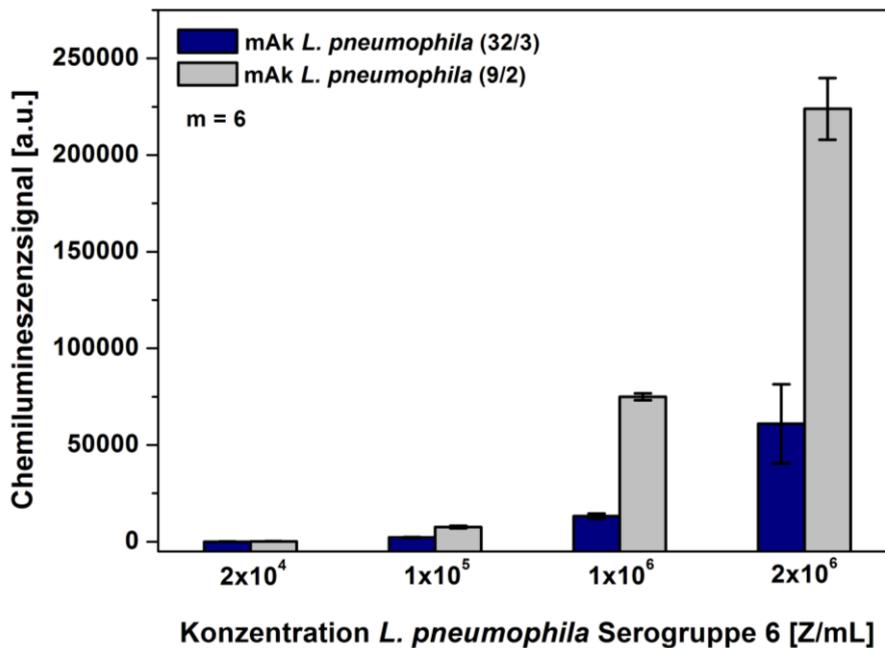


Abbildung 3.38: Vergleich zweier monoklonaler Fängerantikörper zur Detektion von *L. pneumophila* Serogruppe 6.

Auf dem Mikroarray wurde von jedem Antikörper die maximal verfügbare Konzentration immobilisiert. Dabei wurden die Antikörper mAk (9/2) in etwa dreifacher Konzentration aufgebracht wie mAk (32/3). Die Antikörper gegen Serogruppe 4 wurden in gleicher

Konzentration immobilisiert. Die Zielsetzung dieser Untersuchungen war es, unter begrenzten Antikörperverfügbarkeiten die besten Bedingungen für den Bakteriennachweis auszuwählen. Höhere Sensitivität für die Detektion ließen die Antikörper mAk (4/7) für Serogruppe 4 und mAk (9/2) für Serogruppe 6 erwarten, da höhere Signale erhalten wurden. Die mAk (4/7) lieferten für alle gemessenen Konzentrationen höhere Signale und zeigten im Gegensatz zu den mAk (40/4) einen klaren Signalanstieg bei Erhöhung der Bakterienkonzentration. Die Unterschiede für Serogruppe 6 sind vermutlich hauptsächlich auf die Verwendung verschiedener Antikörperkonzentrationen zurückzuführen. Aussagen über Unterschiede in der Antikörperreaktivität können an dieser Stelle nicht getroffen werden.

Für die Detektion wurden die Biotin-markierten Antikörper (4/7 und 9/2) eingesetzt. Da für die beiden anderen Antikörper nach der Aufreinigung nur geringe Mengen erhalten wurden, waren die Biotin-Markierung und die anschließende Anwendung zur Detektion nicht möglich. Die Untersuchungen lieferten somit außerdem die Information, dass die Verwendung des gleichen monoklonalen Antikörpers als Fängermolekül und zur Detektion möglich ist. Da die Antikörper nur ein bestimmtes Epitop erkennen, muss dieses in ausreichender Anzahl durch die Bakterien repräsentiert sein. Für alle weiteren Messungen wurde jeweils der gleiche monoklonale Antikörper immobilisiert und zur Detektion eingesetzt.

3.5.2.2 Monoklonale Antikörper im Vergleich mit polyklonalem Detektionsantikörper

Der bisher für Serogruppe 1 verwendete Detektionsantikörper erkennt laut Herstellerangaben alle Serogruppen von *L. pneumophila*. Um dies zu testen, wurde eine Mischung aller Serogruppen (jeweils 10^7 Z/mL) gemessen. Auf dem Mikroarray wurde der polyklonale Antikörper (*Biodesign*) zur Detektion von Serogruppe 1 und monoklonale Antikörper für die Erkennung der restlichen Serogruppen immobilisiert. Das Messbild sowie die Auftragung der Signale für die einzelnen Serogruppen zeigen die Reaktivität des polyklonalen Detektionsantikörpers (Abbildung 3.39).

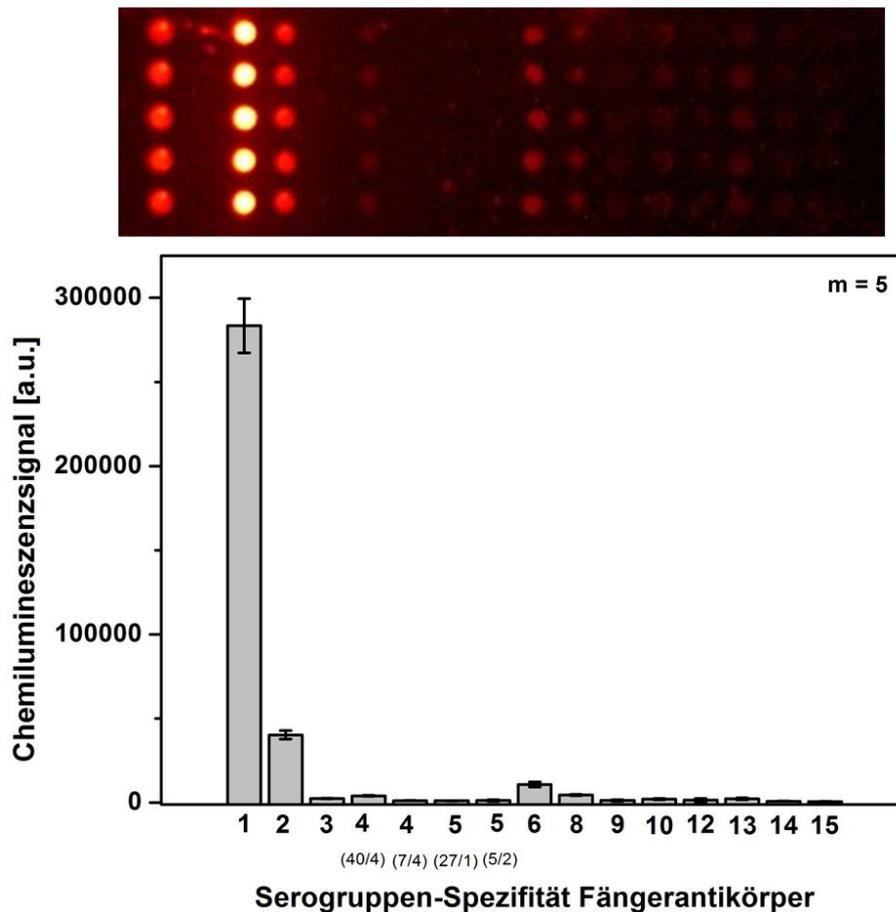


Abbildung 3.39: Messbild und graphische Auswertung der Chemilumineszenzsignale der parallelen Messung von *L. pneumophila* Serogruppe 1 - 15.

Für Serogruppe 1 lieferte die Messung hohe Signale. Auch für Serogruppe 2 wurde ein gutes Signal erhalten, das allerdings um den Faktor 7 geringer ausfiel. Die meisten Serogruppen konnten mit schwachem Signal detektiert werden. Serogruppen 3 und 5 waren nicht nachweisbar. Der Detektionsantikörper erkannte also Serogruppe 1 wesentlich besser als die restlichen Serogruppen. Für den Nachweis von Serogruppe 2 könnte dieser Detektionsantikörper eventuell auch verwendet werden. Für alle restlichen Serogruppen ist dieser Detektionsantikörper hingegen nicht geeignet. Sogar die eingesetzten, relativ hohen Bakterienkonzentrationen konnten nur mit schwachen Signalen nachgewiesen werden, welche nicht bedeutend höher waren als das Hintergrundsignal.

Im Vergleich dazu zeigte die Verwendung der Biotin-markierten monoklonalen Antikörper trotz einer deutlich geringeren Antikörperkonzentration für die Messung der gleichen Bakterienkonzentration für fast alle Serogruppen höhere Signale (Abbildung 3.40).

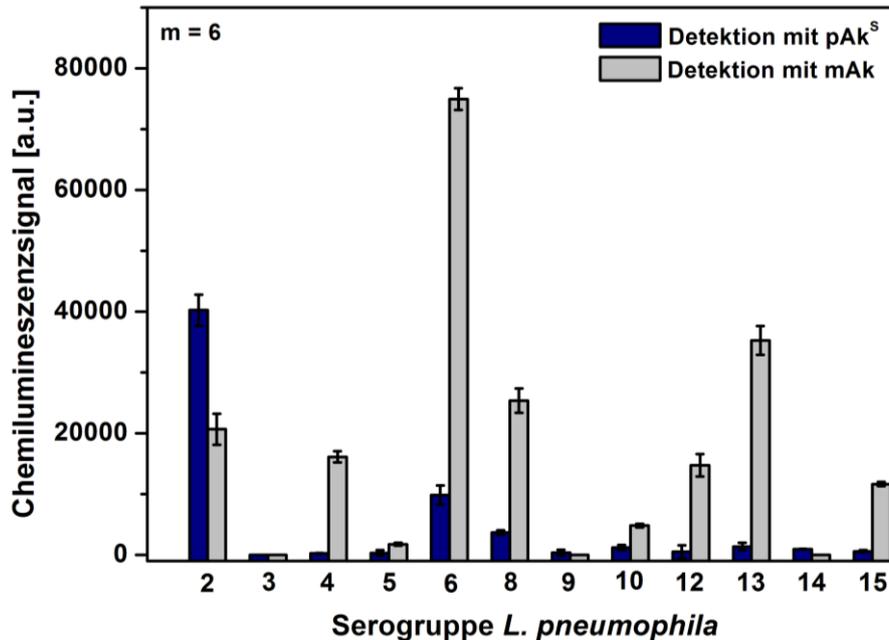


Abbildung 3.40: Vergleich der Signalintensitäten für die Detektion von *L. pneumophila* Serogruppen 1 - 15 (10^7 Z/mL) mit dem polyklonalen Detektionsantikörper von *Senova* bzw. den in dieser Arbeit Biotin-markierten monoklonalen Antikörpern.

Mit Ausnahme von Serogruppe 2 waren die mit den monoklonalen Detektionsantikörpern erzielten Signale um ein Vielfaches höher und lassen eine höhere Nachweisstärke erwarten. Für Serogruppe 3, 9 und 14 konnten bei der Messung mit den Biotin-markierten monoklonalen Antikörpern keine Signale erzielt werden. Dieses wurde durch mehrfache Wiederholungen bestätigt. Serogruppe 3 konnte auch mit dem Detektionsantikörper von *Senova* nicht detektiert werden, für Serogruppe 9 und 14 wurden minimale Signale erhalten. Für Serogruppe 9 war bereits die Messung des entsprechenden Zellkulturüberstands nicht erfolgreich. Dies ließ vermuten, dass die Erkennung von Serogruppe 9 nicht möglich ist, was sich an dieser Stelle bestätigte. Für Serogruppe 3 und 14 wurden zwar bei der Messung der Zellkulturüberstände Signale erhalten, im Sandwich-Immunoassay war jedoch die Detektion der Bakterien nicht möglich. Möglicherweise liegt die Ursache in der Verwendung des gleichen Antikörpers als Fänger- und Detektionsmolekül. Die monoklonalen Antikörper sind gegen das gleiche Epitop gerichtet und haben eventuell nicht genug Bindungsmöglichkeiten zur Ausbildung des Sandwich-Immunoassays. Das Screening von Antikörpern liefert somit gute Informationen über Antikörperreaktivitäten. Es können aber nicht zwangsläufig Aussagen über den erfolgreichen Einsatz im Sandwich-Format getroffen werden.

3.5.2.3 Kalibrierung *L. pneumophila* Serogruppe 1 - 15

Zur Charakterisierung des Mikroarray-Immunoassays wurden Kalibrierungen der Serogruppen 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 und 15 aufgenommen. Für Serogruppe 7 und 11 standen keine Antikörper zur Verfügung. Für den Nachweis der Serogruppen 3, 9 und 14 konnten im Sandwich-Immunoassay keine Signale erzielt werden. Auf den Mikroarrays wurden die gereinigten monoklonalen Antikörper gegen alle verfügbaren Serogruppen immobilisiert. Jede Kalibrierung erfolgte durch die Messung einer Serogruppe und die Detektion mit dem entsprechenden Biotin-markierten Detektionsantikörper. Abbildung 3.41 zeigt die erhaltenen Messbilder der Detektion von 10^7 Z/mL jeder Serogruppe.

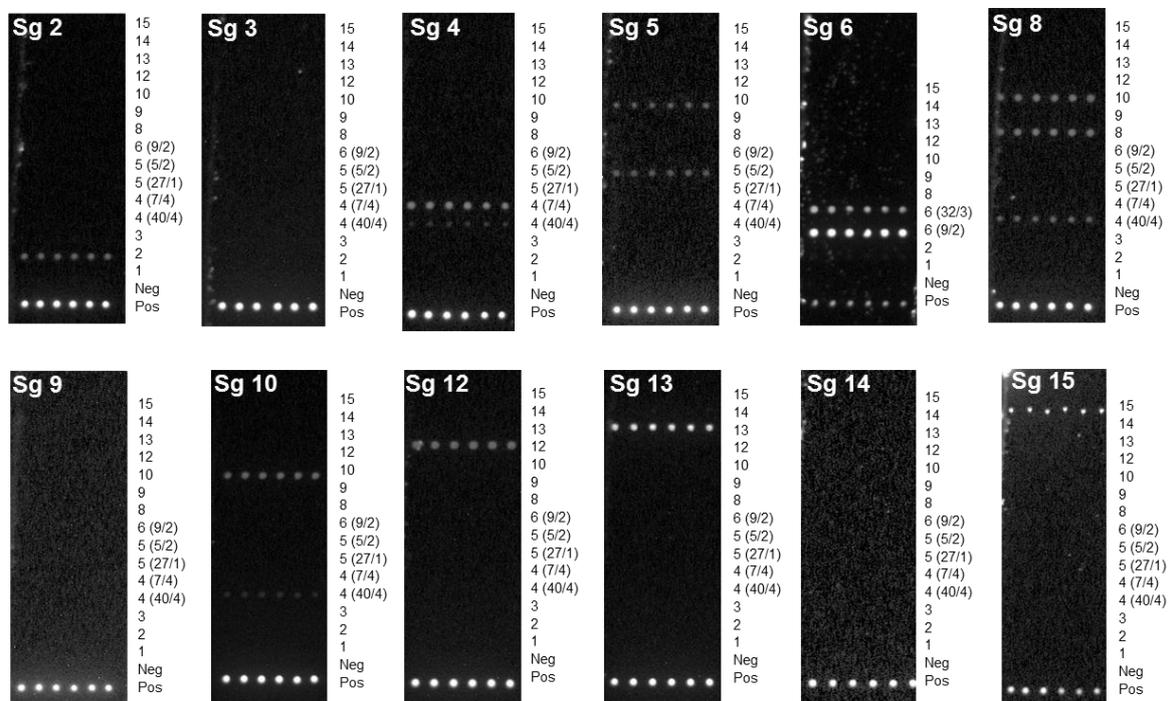


Abbildung 3.41: Mikroarray-Aufnahmen der Detektion von *L. pneumophila* Serogruppe 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14 und 15 (10^7 Z/mL). Die Spezifität der immobilisierten Antikörper ist seitlich der Mikroarrays aufgeführt. Die gemessene Serogruppe ist auf den Mikroarrays angegeben.

Neben den Signalen der gewünschten Serogruppe wurden teilweise auch Signale der Fängerantikörper anderer Spezifität erhalten. Mit Hilfe der Messungen konnten somit ebenfalls Informationen über Kreuzreaktivitäten der Antikörper erlangt werden (Vgl. Tabelle 3.14).

Durch halblogarithmisches Auftragen der Chemilumineszenzsignale gegen die Bakterienkonzentrationen wurden die Kalibrierfunktionen erhalten. Die doppellogarithmische Auftragung lieferte die linearen Bereiche der Kalibrierungen. Der Arbeitsbereich wurde als

der Bereich definiert, in welchem bei der doppellogarithmischen Auftragung ein linearer Anstieg des Messsignals erhalten wurde und ist anhand der linearen Fitfunktion gekennzeichnet. Die Bakterienkonzentrationen der Kalibriersuspensionen wurden mittels Durchflusszytometrie bestimmt. In den Abbildungen 3.42 bis 3.44 sind beispielhaft die Kalibrierfunktionen und linearen Bereiche der Kalibrierungen für Serogruppe 4, 13 und 15 dargestellt.

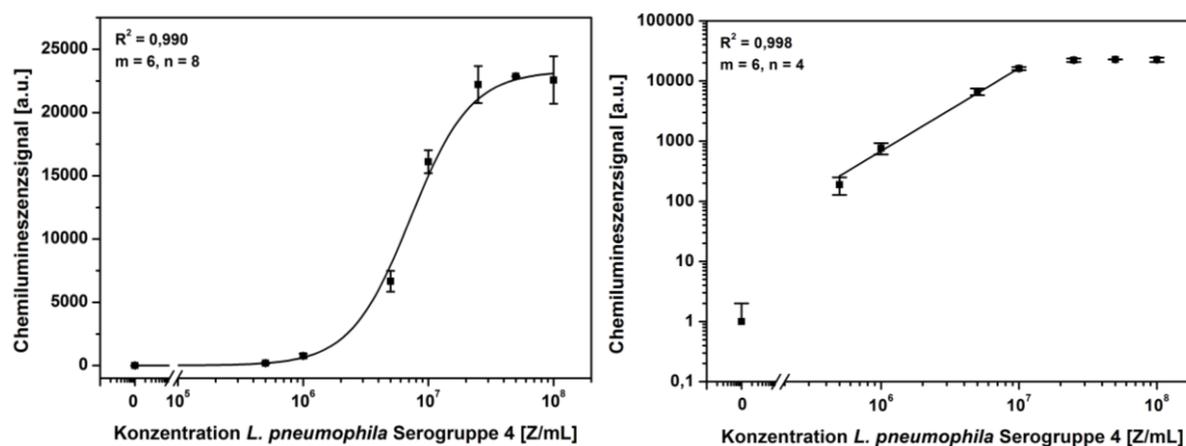


Abbildung 3.42: Kalibrierfunktion (links) und linearer Bereich der Kalibrierung (rechts) von *L. pneumophila* Serogruppe 4.

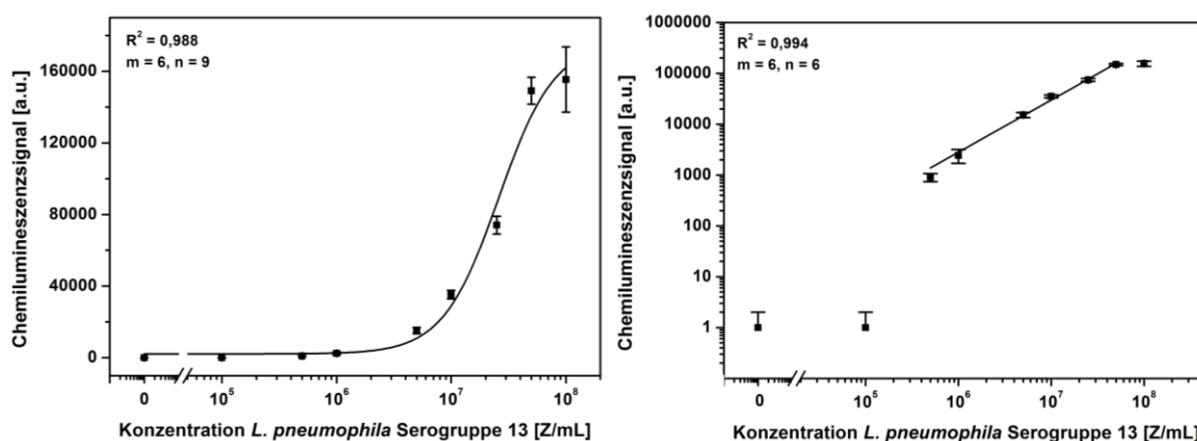


Abbildung 3.43: Kalibrierfunktion (links) und linearer Bereich der Kalibrierung (rechts) von *L. pneumophila* Serogruppe 13.

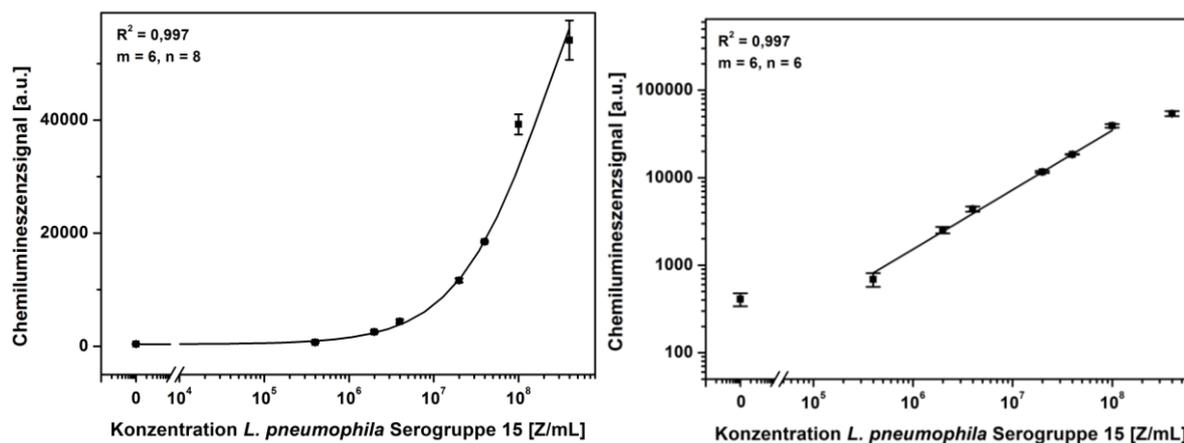


Abbildung 3.44: Kalibrierfunktion (links) und linearer Bereich der Kalibrierung (rechts) von *L. pneumophila* Serogruppe 15.

Bei allen Kalibrierungen konnte eine Signalsteigerung mit Erhöhung der Konzentration beobachtet werden. Die erhaltenen Signalintensitäten und Assay-Sensitivitäten unterschieden sich je nach Serogruppe. In Tabelle 3.14 sind für alle Serogruppen die Kalibrierparameter sowie Kreuzreaktivitäten der Fängerantikörper zusammengefasst.

Die Detektionsantikörper konnten für die Messungen der Serogruppen aufgrund begrenzter Verfügbarkeit nur in einer Konzentration von 1 µg/mL eingesetzt werden. Dies ist eine vierfach geringere Konzentration als für den polyklonalen Antikörper zur Detektion von Serogruppe 1 verwendet wurde. Für Serogruppe 4 konnte nach der Aufreinigung eine etwas größere Antikörpermenge erhalten werden, was für ein Experiment den Einsatz in höheren Konzentrationen ermöglichte. Um die Auswirkung der geringen Konzentration des Detektionsantikörpers bewerten zu können, wurde Serogruppe 4 ($5 \cdot 10^7$ Z/mL) mit drei unterschiedlichen Detektionsantikörperkonzentrationen (1, 2 und 4 µg/mL) gemessen (Abbildung 3.45).

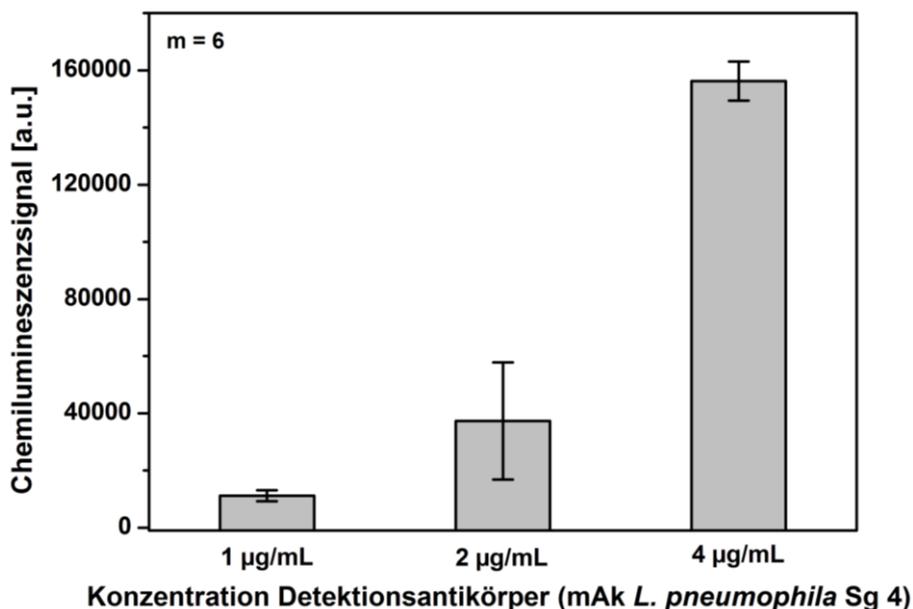


Abbildung 3.45: Chemilumineszenzsignal für die Messung von *L. pneumophila* Serogruppe 4 ($5 \cdot 10^7$ Z/mL) mit verschiedenen Konzentrationen des Detektionsantikörpers.

Es ist klar erkennbar, dass die Erhöhung der Antikörperkonzentration einen Signalanstieg bewirkte. Die Verdopplung der Antikörperkonzentration auf 2 µg/mL führte zu einer Signalsteigerung um das Dreifache. Durch eine weitere Verdopplung der Konzentration konnte ein weiterer Signalanstieg um den Faktor 4 erzielt werden. Vergleicht man das Signal, das mit 4 µg/mL erhalten wurde mit dem der niedrigsten Antikörperkonzentration, konnte insgesamt eine 14-fache Steigerung des Messsignals erreicht werden. Mit 1 µg/mL liegt der Detektionsantikörper offensichtlich nicht in ausreichender Konzentration vor, um optimale Messergebnisse zu erhalten. Die während dieser Arbeit beschriebenen Messungen wurden damit mit deutlich limitierten Bedingungen bezüglich der Antikörperkonzentration ausgeführt. Unter Einsatz höherer Antikörperkonzentrationen kann die Nachweisstärke der Serogruppen-Detektion vermutlich bedeutend gesteigert werden. Trotz dieser Erkenntnisse wurde der Nachweis mit den zur Verfügung stehenden Mitteln durchgeführt und in Tabelle 3.14 bezüglich Nachweisstärke und Kreuzreaktivität charakterisiert. Zur vollständigen Darstellung der Nachweismöglichkeiten mit dem Mikroarray ist auch die Detektion von Serogruppe 1 mit kommerziell erhältlichen polyklonalen Antikörpern aufgeführt.

Tabelle 3.14: Parameter der Kalibrierfunktionen und Kreuzreaktivitäten für die Mikroarray-Detektion von *L. pneumophila* Serogruppe 1 - 15.

Serogruppe	Nachweisgrenze [Z/mL]	Arbeitsbereich [Z/mL]	Steigung im linearen Bereich	Kreuzreaktivität
1	$1 \cdot 10^3$	$8 \cdot 10^3 - 8 \cdot 10^6$	1,13	-
2	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^7$	0,98	-
3	Detektion nicht möglich			
4	$4 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^7$	1,38	mAk Sg 10
5	$1 \cdot 10^7$	$4 \cdot 10^7 - 1 \cdot 10^8$	$2,16 \cdot 10^{-4}$	mAk Sg 10
6	$1 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^5 - 1 \cdot 10^6$	0,53	-
7	-	-	-	-
8	$5 \cdot 10^5$	$8 \cdot 10^5 - 2 \cdot 10^7$	0,001	mAk Sg 4, Sg 10
9	Detektion nicht möglich			
10	$5 \cdot 10^6$	$5 \cdot 10^6 - 5 \cdot 10^7$	1,76	mAk Sg 4
11	-	-	-	-
12	$7 \cdot 10^5$	$1 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^8$	0,65	-
13	$2 \cdot 10^5$	$5 \cdot 10^5 - 5 \cdot 10^7$	1,03	-
14	Detektion nicht möglich			
15	$2 \cdot 10^5$	$2 \cdot 10^6 - 1 \cdot 10^8$	0,68	-

Insgesamt ermöglicht der Antikörper-Mikroarray somit den parallelen Nachweis der Serogruppen 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 und 15 von *L. pneumophila*. Die erhaltenen Nachweisgrenzen liegen für die Serogruppen 2 bis 15 im Bereich von $1 \cdot 10^5$ Z/mL - $1 \cdot 10^7$ Z/mL. Bezüglich der Anwendung des Verfahrens für Realproben ist die erhaltene Nachweisstärke vermutlich auch in Kombination mit Anreicherungstechniken nicht ausreichend. Hierbei ist allerdings die Limitierung in der verwendeten Antikörperkonzentration zu berücksichtigen. Durch Erhöhung der Konzentration besteht Potential zur deutlichen Verbesserung der Nachweisstärke.

Die monoklonalen Antikörper zeigten teilweise Kreuzreaktivität. Die Antikörper mit der Spezifität gegen Serogruppe 4 lieferten auch für die Messung höherer Konzentrationen der Serogruppen 8 und 10 Signale mit etwa 50 % bzw. 15 % der Signalintensität der spezifischen Antikörper. Die Serogruppen 4, 5 und 8 wurden ebenfalls von Antikörpern mit der Spezifität gegen Serogruppe 10 erkannt (10 %, 100 % und 50 %). Dies ist eine wichtige Information, die es bei der Quantifizierung unbekannter Proben zu berücksichtigen gilt, um Überbestimmungen oder falschpositive Ergebnisse zu vermeiden.

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Verwendung der monoklonalen Antikörper von Dr. Lück die Erweiterung des Antikörper-Mikroarrays möglich gemacht hat. Nun besteht die Möglichkeit zum parallelen Nachweis von 10 Serogruppen von *L. pneumophila* mit Potential die erreichte Nachweisstärke weiter zu verbessern. Auf diese Weise konnte und

kann der Vorteil der Multiplex-Mikroarray-Messung ausgenutzt werden. In einem Experiment ist die Bestimmung und Differenzierung einzelner Serogruppen von *L. pneumophila* möglich.

Genetische Methoden haben in Bezug auf die Differenzierung von Legionellen an Bedeutung gewonnen. Dies ist allerdings zeitaufwändig und die Ergebnisinterpretation ist nicht immer einfach [128]. Für den Nachweis unterschiedlicher Serogruppen von *L. pneumophila* sind außerdem mehrere Immunoassays kommerziell erhältlich. Die Sensitivität für die Serogruppen 2 - 15 ist aber als deutlich schlechter beschrieben als für Serogruppe 1. So lieferten Untersuchungen für Serogruppe 3 und 6 zum Beispiel eine Sensitivität von $5 \cdot 10^6$ Z/mL [265]. Im Vergleich mit den in der Literatur beschriebenen immunologischen Verfahren konnte mit dem entwickelten Antikörper-Mikroarray eine vergleichbare Nachweisstärke erzielt werden. Die parallele Detektion verschiedener Serogruppen ist aber nur mittels Mikroarrays möglich.

4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Überwachung der Legionellenkonzentration gewinnt im öffentlichen Gesundheitswesen zunehmend an Bedeutung. *Legionella* spp. sind Bakterien, die ubiquitär in natürlichen und künstlichen Wassersystemen vorkommen und Infektionen beim Menschen auslösen können. Risikofaktoren für das Wachstum von Legionellen in Leitungswassersystemen sind Wasserstagnation oder die Anwesenheit von Biofilmen. Weitere Faktoren sind eine unzureichende Desinfektion oder Wassertemperaturen im Bereich von 25 - 42 °C; bei Warmwasserspeichern ist die Erhitzung unterhalb von 60 °C ein Risikofaktor.

Bei *L. pneumophila* handelt es sich um die wichtigste Spezies, welche mit etwa 90 % der Infektionsfälle in Verbindung gebracht wird. 80 % davon konnten Serogruppe 1 von *L. pneumophila* zugeordnet werden. Auch andere Serogruppen verursachen eine beträchtliche Anzahl an Erkrankungsfällen, es besteht allerdings oftmals nicht die Möglichkeit die weiteren 14 Serogruppen nachzuweisen. Die Infektion mit Legionellen erfolgt durch das Einatmen kontaminierter Aerosole. Diese können zum Beispiel beim Duschen, von Kühltürmen oder Klimaanlage ausgebracht werden.

Aufgrund gesetzlich vorgeschriebener, regelmäßiger Wasseruntersuchungen verschiedener wasserführender Systeme ergibt sich ein großer Bedarf an Methoden, um die zahlreichen Proben bezüglich der Legionellenkonzentration zu untersuchen. Wegen des Übertragungsweges ist auch die Analyse freigesetzter Aerosole von Interesse. Zum Nachweis von Legionellen stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Die derzeitige Standardmethode, Koloniezahlbestimmung in Selektivmedien, ist zwar sensitiv, jedoch auch arbeits- und zeitintensiv. Wünschenswert wäre ein schnelles, sensitives und insbesondere Multianalyt-fähiges Verfahren. Hinsichtlich dieser Anforderungen stellt die Mikroarray-Technologie ein vielversprechendes Verfahren dar, da sie einen schnellen und parallelen Nachweis verschiedener Analyten mit geringem Zeitaufwand ermöglicht.

Die Zielsetzung dieser Arbeit bestand in der Entwicklung und Charakterisierung eines Antikörper-Mikroarrays zum Nachweis der 15 Serogruppen von *L. pneumophila* in Kombination mit geeigneten Anreicherungstechniken zur Anwendung für Wasser- und Luftproben.

Das Prinzip des eingesetzten Mikroarray-Nachweises basierte auf einem Sandwich-ELISA, der auf eine Mikroarray-Plattform übertragen wurde. Antikörper gegen *L. pneumophila* dienten dabei als Fängeroleküle, die auf einer Polyethylenglykol-modifizierten Glasoberfläche immobilisiert wurden. Der Einsatz eines Biotin-markierten Detektionsantikörpers ermöglichte die Ausbildung eines Sandwich-Immunoassays an den Stellen, wo Bakterien auf dem Mikroarray gebunden worden sind. Die Signalerzeugung erfolgte unter Verwendung eines Streptavidin-Peroxidase-Konjugats. Die Photonen der Peroxidase-katalysierten Chemilumineszenzreaktion von Luminol und H₂O₂ wurden mit einer CCD-Kamera aufgezeichnet.

Die erste Aufgabenstellung bestand in der Optimierung der Messbedingungen, um eine möglichst hohe Nachweisstärke des Assays für den Nachweis von Bakterien zu erreichen. Für die Messungen wurde ein lebender, nichtpathogener *E. coli*-Stamm als Modellorganismus verwendet. Die besten Ergebnisse wurden durch Einführung des Stopped-Flow-Prinzips erhalten. Die Bakterienprobe wurde dabei dem Mikroarray in Volumenelementen von jeweils 20 µL zugeführt. Jedes Volumenelement hatte eine optimale Interaktionszeit von 108 s in der direkten Umgebung der Fängerantikörper. Die Zugabe 30 solcher Volumenelemente zeigte sich als optimal. Eine Vorinkubation von Bakterien und Detektionsantikörpern erwies sich als nicht geeignet. Die Gesamtdauer der optimierten Stopped-Flow-Messung lag bei 67 Minuten. Durch den Einsatz des optimierten Stopped-Flow-Assays konnte die Sensitivität für die Messung von *E. coli* deutlich gesteigert und eine Mikroarray-interne Nachweisgrenze von 4·10⁵ Z/mL erhalten werden. Auch für die Messung inaktivierter *L. pneumophila* konnte die Nachweisstärke im Vergleich zu vorhergehenden Arbeiten etwa um den Faktor 100 verbessert werden.

Da für *L. pneumophila* Serogruppe 1 eine Vielzahl an Antikörpern kommerziell erhältlich war, wurde zunächst ein Assay für diese Serogruppe entwickelt und charakterisiert. Es wurden sowohl monoklonale als auch polyklonale Fängerantikörper und unterschiedliche Detektionsantikörper getestet und verglichen. Aufgrund ihres Bindungsverhaltens wurden die vielversprechendsten Antikörper für nachfolgende Messungen ausgewählt. Für die Kalibrierung von *L. pneumophila* Serogruppe 1 in Reinstwasser ergab sich eine Mikroarray-interne Nachweisgrenze von 1·10³ Z/mL und ein linearer Bereich von 8·10³ Z/mL bis 4·10⁶ Z/mL. Dieses Nachweissystem eignete sich für die Untersuchung von Wasser- und Bioaerosolproben, was im Folgenden getestet wurde.

Für die Analyse von Wasser lag die Nachweisgrenze des Mikroarray-Immunoassays oberhalb geforderter Grenzwerte und musste deshalb mit vorgeschalteten Anreicherungstechniken kombiniert werden. Im Rahmen eines DFG-geförderten Projekts wurde der Mikroarray-Nachweis in Kombination mit einem zweistufigen Anreicherungsverfahren untersucht. Nach einer Cross-Flow-Mikrofiltration folgte in der zweiten Stufe eine Anreicherung mittels Epoxypolymer-basierter monolithischer Affinitätsfiltration. Die Kombination von Mikroarray-Messung und Cross-Flow-Filtration erwies sich allerdings als problematisch. Nach dem zweistufigen Anreicherungsprozess lag die Wiederfindung nur bei 7 %. Die ausschließliche Verwendung der monolithischen Affinitätsfiltration erwies sich als geeigneter. Nach Optimierung der Elutionsrichtung, der Probengeschwindigkeit und des Elutionsvolumens konnte *L. pneumophila* mit konstanten Wiederfindungen von etwa 70 % aus 10-L-Wasserproben angereichert werden.

Für die Bioaerosol-Messungen sollte zunächst die generelle Anwendbarkeit der Mikroarrays untersucht werden. Dazu diente ein Modellaufbau zur gezielten Bioaerosolerzeugung und Probenahme. Das Bioaerosol wurde durch den Vernebler Pari LC durch Zerstäuben einer Bakteriensuspension erzeugt. Zur Sammlung des Bioaerosols diente der Zyklonseparator Coriolis μ , bei dem die Bakterien in der Sammelflüssigkeit (Reinstwasser) abgeschieden wurden und so direkt der Mikroarray-Messung zugeführt werden konnten. Die Mikroarray-Messungen der Bioaerosolproben zeigten gute Übereinstimmung mit den Messungen der Referenzmethode Durchflusszytometrie, was darauf schließen ließ, dass der Mikroarray erfolgreich für die Messung von Bioaerosolproben eingesetzt werden konnte. Der Sammler Coriolis μ sollte mit dem AGI-30 verglichen werden, welcher als Referenzsammelgerät für Bioaerosole gilt. Trotz vergleichbarer Sammeleffizienz konnte mit dem Coriolis μ aufgrund eines höheren Luftdurchsatzes eine bedeutend niedrigere Nachweisgrenze für *L. pneumophila* bezogen auf Luft erzielt werden. In Kombination mit den Antikörper-Mikroarrays betrug die Nachweisgrenze im Modellsystem $4 \cdot 10^3 \text{ Z/m}^3$ und lag damit für in der Umwelt vorkommende Konzentrationen teilweise in einem relevanten Bereich. Der Coriolis μ in Kombination mit Mikroarrays wurde in Zusammenarbeit mit dem Bayerischen Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit für Realproben-Messungen (Dusche, Rückkühlanlage) eingesetzt. Als weitere Detektionsmethode wurde der Kulturnachweis verwendet. Aufgrund der unterschiedlichen Nachweisprinzipien zeigten sich deutliche Unterschiede bezüglich der Messergebnisse. Die Messungen deuteten an, dass in der Luft vorhandene, nicht kultivierbare

Bakterien über das häufig verwendete Kulturverfahren nicht erfasst werden können und deshalb alternative Methoden benötigt werden.

Nach der Charakterisierung für Serogruppe 1, bestand die letzte Herausforderung in der Erweiterung des Mikroarrays zum Nachweis der 14 weiteren Serogruppen von *L. pneumophila*. Hier galt es, geeignete Antikörper zu finden. Es wurden sowohl kommerziell erhältliche Antikörper als auch Antikörper von Dr. Lück, einem Kooperationspartner vom Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene der TU Dresden, getestet. Mit den kommerziell erhältlichen Antikörpern war der spezifische Nachweis der weiteren Serogruppen nicht möglich. Die monoklonalen Antikörper von Dr. Lück wurden in Form von Zellkulturüberständen erhalten. Ein Screening dieser Zellkulturüberstände mittels Bakterien-Mikroarrays stellte eine Möglichkeit dar, die Antikörper direkt bezüglich ihrer Spezifität zu charakterisieren. Hier wurde eine sehr gute Übereinstimmung mit den Angaben von Dr. Lück erhalten. Bei der anschließenden Anwendung im Mikroarray-Sandwich-Immunoassay sollten die relevanten Antikörper schließlich für die Messung der 15 Serogruppen anhand ihrer Selektivität und Sensitivität charakterisiert werden. Alle Antikörper wurden aufgereinigt und zur Detektion mit Biotin markiert. Der so erhaltene Antikörper-Mikroarray ermöglichte den parallelen Nachweis der Serogruppen 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 und 15 von *L. pneumophila*. Die Nachweisgrenzen unter Verwendung der monoklonalen Antikörper lagen im Bereich von 10^5 Z/mL bis 10^7 Z/mL. Eine Erhöhung der Antikörperkonzentration, die während dieser Arbeit aufgrund begrenzter Verfügbarkeit limitiert war, bietet das Potential zur deutlichen Verbesserung der Nachweisstärke.

In weiterführenden Arbeiten wäre eine erneute Aufreinigung monoklonaler Antikörper von Interesse. Bei ausreichender Verfügbarkeit könnte der Nachweis der Serogruppen unter Verwendung höherer Antikörperkonzentrationen durchgeführt werden. Durch eine Verbesserung der Nachweisstärke könnte der Antikörper-Mikroarray einen großen Erfolg und Fortschritt bezüglich der Serogruppen-Detektion darstellen. Wünschenswert wäre auch eine weitere Optimierung der Kombination mit der monolithischen Säule zur Anreicherung. Hier gilt es herauszufinden, welches Probenvolumen angereichert werden muss, um geforderte Konzentrationen nachweisen zu können. Die Untersuchungen sollten zunächst für inaktivierte Legionellen durchgeführt und anschließend mit der Messung lebender Bakterien verglichen werden. Abschließend wäre eine Bewertung zur Anwendbarkeit des Verfahrens für Realproben anzustreben.

5 Summary and outlook

Monitoring *Legionella* concentrations is of high importance for the public health care system. *Legionella* bacteria occur ubiquitously in natural and artificial water environments and can cause human infections. Risk factors for the growth of *Legionella* in water systems are water stagnation, the presence of biofilms, insufficient disinfection or water temperatures of 25 - 42 °C. Heating the system up to temperatures below 60 °C is a further risk factor for hot water tanks. *L. pneumophila* as the most important species is responsible for about 90 % of the infections. 80 % of these cases could be associated with serogroup 1. Also other serogroups of *L. pneumophila* cause a considerable number of cases but there is often no possibility of detecting the other 14 serogroups. *Legionella* infections are caused by inhaling contaminated aerosols. These aerosols can be released by cooling towers, air conditioners or while showering.

Due to a legally prescribed regular water analysis for water-conducting systems, rapid methods for the detection of *Legionella* concentrations in the numerous samples are required. Regarding the transmission path, the analysis of aerosols is also of interest. Different methods are available for the detection of *Legionella*. The standard method (colony count) is sensitive but labor-intensive and time consuming. A fast, sensitive and especially multiplexed detection method would be preferable. Concerning these requirements, the microarray technology represents a promising tool allowing fast and parallel detection of different analytes.

The aim of this work was the development and characterization of an antibody microarray for the detection of the 15 serogroups of *L. pneumophila* combined with suitable enrichment techniques and the application for water and air samples.

The principle of the used microarray detection was based on a sandwich ELISA which was transferred to a microarray platform. Antibodies against *L. pneumophila* served as capture molecules, being immobilized on a polyethyleneglycol modified glass surface. The use of a biotin labeled detection antibody enabled the formation of the sandwich immunoassay where bacteria have been captured on the microarray. The signal was generated by means of a streptavidin peroxidase conjugate. The photons of the peroxidase catalyzed chemiluminescence reaction of luminol and H₂O₂ were recorded by a CCD camera.

The first aim was to optimize the conditions in order to reach high assay sensitivity for the detection of bacteria. For the measurements, living non-pathogenic *Escherichia coli* were used as model organism. The best results were obtained by the introduction of the stopped-flow principle: the bacteria sample was pumped over the microarray in volume elements of 20 μL . Every volume element stayed in the direct surrounding area of the capture antibodies for an optimal interaction time of 108 s. The addition of 30 of these volume elements was optimal. A pre-incubation of bacteria and detection antibodies was not suitable. The total assay time of the optimized assay protocol was 67 min. The optimized stopped-flow assay resulted in an increased sensitivity for the measurement of *E. coli*. The obtained microarray internal detection limit was $4 \cdot 10^5$ cells/mL. For the detection of inactivated *L. pneumophila*, the sensitivity could be increased by a factor of about 100 in comparison with previous works.

As a variety of antibodies is commercially available for *L. pneumophila* serogroup 1, an assay was developed and characterized for this serogroup first. Monoclonal and polyclonal capture antibodies as well as different detection antibodies were tested and compared. The most promising antibodies were selected for subsequent measurements. For the calibration of *L. pneumophila* serogroup 1 in ultrapure water, a microarray internal detection limit of $1 \cdot 10^3$ cells/mL and a linear range of $8 \cdot 10^3$ cells/mL - $4 \cdot 10^6$ cells/mL were obtained. This detection system was suitable for the measurement of water and bioaerosol samples which was tested in the following sections.

For water samples the detection limit of the microarray immunoassay was higher than defined threshold values and had to be combined with preceding enrichment techniques. Within a DFG funded project the microarray measurement was combined with a two stage enrichment process. A cross-flow filtration was followed by an enrichment step by means of a macroporous epoxy polymer based affinity filtration. Combining microarray measurement and cross-flow filtration was problematic as the recovery for the two stage enrichment process was only 7 %. The exclusive use of the monolithic affinity filtration was more convenient. After optimizing the elution direction, the sample flow rate and the elution volume, the enrichment of *L. pneumophila* from 10-L water samples was possible with constant recoveries of around 70 %.

The general applicability of antibody microarrays was determined for bioaerosol measurements. A model setup for defined aerosol generation and sampling was used for this

reason. The bioaerosol was generated with the nebulizer Pari LC by nebulizing a bacteria suspension. The cyclone separator Coriolis μ was used for collecting the bioaerosol. The bacteria were deposited in the collection liquid (ultrapure water) and could directly be transferred to the microarray measurement. The microarray measurements of bioaerosol samples were in good correlation with flow cytometry, serving as reference method. This indicated the successful application of microarrays for bioaerosol measurements. The sampler Coriolis μ was compared to the reference bioaerosol sampler AGI-30. Despite comparable collection efficiencies, a higher concentration rate and considerably lower detection limit concerning air was obtained with Coriolis μ . In combination with antibody microarrays the detection limit referring to the model setup was $4 \cdot 10^3$ cells/m³, lying in a relevant range for concentrations occurring in environment. The sampler Coriolis μ combined with microarray detection was applied for real samples (shower, recooling system) in cooperation with the Bavarian Health and Food Safety Authority. Cultivation was used as further detection method. Due to the different detection principles, significantly different results were obtained. The measurements indicated that non-culturable bacteria occurring in the air cannot be detected by means of cultivation. Consequently, alternative detection methods are required.

After the characterization for serogroup 1, the last challenge was the extension of the microarray for the detection of the other 14 serogroups of *L. pneumophila*. Suitable antibodies had to be found. Commercially available antibodies as well as antibodies from Dr. Lück, a cooperation partner (TU Dresden) were tested. Using the commercially available antibodies, the detection of other serogroups was not possible. The monoclonal antibodies from Dr. Lück were obtained as cell culture supernatants. Screening these cell culture supernatants with bacteria microarrays presented a possibility to directly characterize the antibodies concerning their specificity. A very good correlation was obtained with the data from Dr. Lück. The relevant antibodies were characterized concerning selectivity and sensitivity for the measurement of the 15 serogroups in the microarray sandwich immunoassay. The antibodies were purified and labeled with biotin for the detection. The developed microarray enabled the parallel detection of *L. pneumophila* serogroup 1, 2, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 13 and 15. The detection limits with monoclonal antibodies were in the range of $10^5 - 10^7$ cells/mL. Increasing the antibody concentration, which was limited during this work, offers the possibility to considerably increase assay sensitivity.

For continuing works, further purification of monoclonal antibodies would be of interest. With sufficient availability the detection of serogroups could be carried out using higher antibody concentrations. With an improved sensitivity the antibody microarray could offer a good success and progress regarding serogroup detection. Optimizing the combination with the monolithic affinity enrichment is also desirable. It is important to determine the required sample volume to reach defined concentrations. The measurements should be carried out for inactivated *Legionella* first and subsequently be compared with the measurement of living bacteria. Finally, the evaluation for the application of real samples is to be intended.

6 Experimenteller Teil

6.1 Verwendete Materialien

6.1.1 Geräte und Verbrauchsmaterialien

Bioaerosol-Sammelgerät Coriolis μ (*Bertin Technologies*, Montigny le Bretonneux, Frankreich)

Bioaerosol-Sammelgerät AGI-30 (*Zinsser Analytik*, Frankfurt, Deutschland)

BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer (*Bio-Rad Laboratories*, München, Deutschland)

Durchflusszytometer Cell Lab Quanta SC (*Beckman Coulter*, Brea, CA, USA)

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

Gasstrom-Messgerät Gilibrator 2 (*Gilian*, Irvine, CA, USA)

Graviergerät mit Diamantstift (*Proxxon*, Niersbach, Deutschland)

Laborwaage AT 261 Delta Range (*Mettler*, Giessen, Deutschland)

Magnetrührer mit Heizung, RCT basic (*IKA Labortechnik*, Staufen, Deutschland)

Mikrotiterplatte, BD Falcon TM, Polypropylen, 384-well, F-Boden (353265, *BD Biosciences*, Franklin Lakes, NJ, USA)

Mikroarray-Auslesesystem (*Atto-tec GmbH*, Siegen, Deutschland)

NAb Protein A Plus Spin Columns, 1 mL (89956, *Thermo Fisher Scientific*, Rockford, Illinois, USA)

NanoPhotometer[®] (*IMPLEN GmbH*, München, Deutschland)

Reinstwasseranlage MilliQ plus 185 (*Millipore*, Bedford, USA)

Schüttler, Refrigerated Incubator Shaker C24KC (*New Brunswick Scientific Corp.*, Edison, NJ, USA)

Spotternadel Stealth Solid Pin SNS9 (*ArrayIt*, Sunnyvale, USA)

Standardobjektträger, Kalk-Natronglas, 76×26×1 mm (0656.1, *Carl Roth*, Karlsruhe, Deutschland)

Trockenschrank (*Memmert*, Büchenbach, Deutschland)

Ultraschallbad Sonorex RK510S (*Bandelin*, Berlin, Deutschland)

UV-VIS Spektrometer (UV- DU650, *Beckman Coulter Inc.*, Fullerton, CA, USA)

Vernebler Pari LC Plus (*Pari*, Starnberg, Deutschland)

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

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

Zentrifugenfilter, 0,5 mL, MWCO: 30kDa (UFC503024, *Millipore*, Billerica, Massachusetts, USA)

6.1.2 Software

Avis FITS Viewer (*MSB di F. Cavicchio*, Ravenna, Italien)

BioOdyssey Calligrapher 2.0 (*Bio-Rad Laboratories GmbH*, München, Deutschland)

Corel Draw Graphics Suite 12 (*Corel Corporation*, Ottawa, ON, Kanada)

Origin 7G (*OriginLab Corporation.*, Northampton, USA)

Software V7 Mikroarray-Auslesesystem (*Atto-tec GmbH*, Siegen, Deutschland)

SCL-Auswertesoftware: Bildanalysesoftware (Institut für Wasserchemie, TU München, Deutschland)

6.1.3 Chemikalien und Reagenzien

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

Di-Kaliumhydrogenphosphat, $\geq 99,0\%$ (04248, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

4-Dimethylaminopyridin (29224, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Dimethylformamid, $\geq 99,8\%$ (40248, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Di(*N*-succinimidyl)carbonat, $\geq 95,0\%$ (43720, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Ethanol absolut, Reinheit: $\geq 99,8\%$ (32205, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

EZ-Link[®] Sulfo-NHS-LC-Biotin (10538723, *Fisher Scientific*, Schwerte, Germany)

3-Glycidyloxypropyltrimethoxysilan, $\geq 97,0\%$ (50040, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Glycin, 99,7 – 101 % (33226, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Hellmanex (320.000, *Hellma GmbH*, Müllheim, Deutschland)

Kaliumhydrogenphosphat, $\geq 99,0\%$ (60230, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

LB-Medium Lennox, für die Molekularbiologie (X964.1, *Carl Roth*, Karlsruhe, Deutschland)

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

Natriumcarbonat wasserfrei, $\geq 99,0\%$ (71351, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Natriumchlorid, $\geq 99,5\%$ (71381, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Natriumhydrogencarbonat, $\geq 99,5\%$ (71627, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Pluronic F127, Zellkultur getestet (P2443, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Polyethylenglykoldiamin 2000 Da (XTJ-502, *Huntsman*, Salt Lake City, USA)

Polyethylenglykoldiglycidylether (475696, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Salzsäure rauchend, 37 % (84422, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Schwefelsäure, 95 - 97 % (84720, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Streptavidin, Peroxidase-markiert (1 mg/mL, SA-5004, *Vector Laboratories*, Burlingame, USA)

SYTO 9 (Bestandteil des LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kits, L7012, *Life Technologies GmbH*, Darmstadt, Deutschland)

Trehalose-D(+) Dihydrat, $\geq 99,5$ % (90208, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Triethylamin, $\geq 99,5$ % (90340, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, $\geq 99,0$ % (T1378, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

WESTAR SUPERNOVA ELISA Luminol solution (XLSE2L,0250, *Cyanagen*, Bologna, Italien)

WESTAR SUPERNOVA ELISA Peroxide solution (XLSE2P,0250, *Cyanagen*, Bologna, Italien)

6.1.4 Antigene

Escherichia coli, K 12 Wildtyp (DSM 498, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, Braunschweig, Deutschland)

Legionella pneumophila Serogruppe 1 (DSM 7513, *Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH*, Braunschweig, Deutschland) kultiviert und Hitze-inaktiviert vom Max von Pettenkofer-Institut, München)

Legionella pneumophila Serogruppe 3 (ATCC 33155, *American Type Culture Collection*, Manassas (Virginia), USA) kultiviert und Hitze-inaktiviert vom Max von Pettenkofer-Institut, München)

Legionella pneumophila Serogruppe 6 (*American Type Culture Collection*, Manassas (Virginia), USA) kultiviert und Hitze-inaktiviert vom Max von Pettenkofer-Institut, München)

Legionella pneumophila Serogruppe 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 und 15 kultiviert und inaktiviert von Dr. Christian Lück (TU Dresden)

6.1.5 Antikörper

mAk anti-*Legionella pneumophila*, unkonjugiert, (Maus), 5,2 mg/mL (2.1.016.004, *Senova GmbH*, Jena, Deutschland)

mAk anti-*Legionella pneumophila* Serogruppe 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 12, 13, 14 und 15, Zellkulturüberstände (Maus), zur Verfügung gestellt von Dr. Christian Lück, TU Dresden

pAk anti-*E. coli*, Biotin-konjugiert (Hase), 4 - 5 mg/mL (1007, *ViroStat*, Portland, Maine, USA)

pAk anti-*E. coli*, unkonjugiert (Ziege), 2 mg/mL (ab25823, *Abcam*, Cambridge, UK)

pAk anti-*Legionella pneumophila*, Biotin-markiert, (Hase) (*Senova GmbH*, Jena, Deutschland)

pAk anti-*Legionella pneumophila*, Biotin-markiert, (Hase), 4 mg/mL (ab20527, *Abcam*, Cambridge, UK)

pAk anti-*Legionella pneumophila*, unkonjugiert, (Hase), 5 mg/mL (2.1.016.001, *Senova GmbH*, Jena, Deutschland)

pAk anti-*Legionella pneumophila*, unkonjugiert, (Hase), 4 - 5 mg/mL (B65051G, *Biodesign*, Saco, ME, USA)

pAk anti-*Legionella pneumophila* Serogruppe 3, Serum (Hase) (ab79446, *Abcam*, Cambridge, UK)

pAk anti-*Legionella pneumophila* Serogruppe 6, Serum (Hase) (ab79457, *Abcam*, Cambridge, UK)

pAk anti-Maus, HRP-markiert (Pferd), 1 mg/mL (VC-PI-2000, *AXXORA Deutschland GmbH*, Lörrach, Deutschland)

pAk anti-Peroxidase (Hase), (P7899, *Sigma-Aldrich*, Taufkirchen, Deutschland)

6.1.6 Puffer

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die im Folgenden aufgeführten Puffer verwendet, wobei zur Herstellung stets Wasser der Reinstwasseranlage MilliQ plus 185 eingesetzt wurde.

Phosphatpuffer (PBS) pH 7,6

12,2 g (70 mmol) K_2HPO_4

1,36 g (10 mmol) KH_2PO_4

8,50 g (145 mmol) NaCl

Ad 1000 mL Wasser

Spottingpuffer

0,05 mg Pluronic F127

100 mg Trehalose-D(+) Dihydrat

Ad 1 mL PBS

Carbonatpuffer

1,59 g Na_2CO_3 (15 mmol)

2,94 g $NaHCO_3$ (35 mmol)

Ad 1000 mL Wasser

Bindepuffer zur Antikörperaufreinigung pH 7,2

15 g (86 mmol) K_2HPO_4

1,94 g (14 mmol) KH_2PO_4

8,76 g (150 mmol) NaCl

Ad 1000 mL Wasser

Elutionspuffer zur Antikörperaufreinigung pH 2 - 3

75,07 mg Glycin (0,1 M)

Ad 10 mL Wasser

Neutralisationspuffer zur Antikörperaufreinigung pH 8 - 9

1,211 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (1 M)

Ad 10 mL Wasser

6.2 Standardverfahren

6.2.1 Herstellung DAPEG-beschichteter Mikroarrays

Im Folgenden ist die Herstellung von Antikörper-Mikroarrays beschrieben, wobei sich die Angaben auf die Durchführung für 20 Glasobjektträger beziehen.

6.2.1.1 Vorbehandlung der Glasobjektträger

Da nur eine Seite der Glasobjektträger modifiziert wurde, wurde zur Unterscheidung auf einer Seite mit einem Glasdiamantstift eine Ziffer eingraviert. Die markierte Seite kennzeichnete in den folgenden Schritten der Herstellung und Verwendung der Mikroarrays die unbeschichtete Seite der Glasobjektträger.

Um Verunreinigungen zu entfernen, wurden die Glasobjektträger in einer Färbeschale mit 200 mL einer 2 %-igen Hellmanexlösung für 1 Stunde in ein Ultraschallbad, 18 Stunden bei Raumtemperatur bei leichter Schüttelbewegung auf den Schüttler und anschließend erneut 1 Stunde lang in das Ultraschallbad gestellt. Die Glaschips wurden mit 1,5 L Reinstwasser gespült und anschließend im Stickstoffstrom vollständig getrocknet und visuell kontrolliert. Der nächste Schritt diente der Anätzung der Glasoberfläche. Dazu wurden die Glaschips in der Färbeschale in 200 mL einer frisch vorbereiteten Mischung von 37 % HCl und Methanol (1:1) 1 Stunde lang bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Glaschips wurden mit 1,5 L Reinstwasser gespült und anschließend 1 Stunde in der Färbeschale mit 200 mL konzentrierter Schwefelsäure bei Raumtemperatur geschüttelt. Die Glaschips wurden mit 1,5 L Reinstwasser gründlich gespült und im Stickstoffstrom vollständig getrocknet und visuell kontrolliert.

6.2.1.2 Silanisierung

Die vorbehandelten Objektträger wurden mittels Sandwich-Technik mit GOPTS silanisiert. Dazu wurde die Hälfte der Objektträger in Petrischalen gelegt, 600 µL GOPTS auf jeden Glasträger pipettiert und jeweils ein weiterer Glaschip darauf gelegt. Die Sandwiches wurden in verschlossenen Petrischalen 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Die Glaschips wurden in Ethanol getrennt, sofort in eine Färbeschale mit 200 mL Ethanol überführt und 15 Minuten im Ultraschallbad gereinigt. Ethanol wurde durch 200 mL Methanol ersetzt, 15 Minuten im

Ultraschallbad gereinigt und wiederum mit 200 mL Ethanol 15 Minuten lang im Ultraschallbad gereinigt. Die Chips wurden zunächst im Stickstoffstrom und anschließend 30 Minuten im Trockenschrank bei 85 °C vollständig getrocknet und visuell kontrolliert.

6.2.1.3 Belegung mit Diamino-Polyethylenglykol

Diamino-PEG wurde in einem auf 98 °C vorgeheizten Trockenschrank geschmolzen. Die Belegung mit PEG erfolgte erneut mittels Sandwich-Technik. Es wurden 600 µL flüssiges PEG auf einen Objektträger pipettiert und jeweils ein weiterer Glaschip darauf gelegt. Die Sandwiches wurden in verschlossenen Petrischalen für 15 Stunden bei 98 °C im Trockenschrank inkubiert. Die heißen Chips wurden in Reinstwasser getrennt, in Färbeschalen mit Reinstwasser gegeben und 15 Minuten bei Raumtemperatur im Ultraschallbad gereinigt. Die Glaschips wurden mit 1,5 L Reinstwasser gespült, im Stickstoffstrom vollständig getrocknet und visuell kontrolliert. Die DAPEG-belegten Glaschips wurden in Aufbewahrungsschachteln im Exsikkator gelagert.

6.2.2 Aktivierung Polyethylenglykol-modifizierter Glasobjektträger

6.2.2.1 Aktivierung zur Immobilisierung von Antikörpern

Bei der Aktivierung mit Di(*N*-succinimidyl)carbonat (DSC) wurde ebenfalls die Sandwich-Technik angewendet. Es wurden jeweils 600 µL einer Lösung aus 36 mg DSC, 2 mg DMAP und 45 µL Triethylamin in 0,6 mL trockenem DMF auf einen Diamino-PEG-belegten Glaschip pipettiert und mit einem weiteren Diamino-PEG-belegten Glaschip bedeckt. Es folgte eine vierstündige Inkubation bei Raumtemperatur in geschlossenen Petrischalen. Die Sandwiches wurden in Methanol getrennt, sofort in eine Färbeschale mit 200 mL Methanol überführt und 5 Minuten im Ultraschallbad gereinigt. Anschließend erfolgte eine zweite Reinigung mit Methanol im Ultraschallbad (5 Minuten). Die Chips wurden im Stickstoffstrom vollständig getrocknet, visuell kontrolliert und zur Immobilisierung von Antikörpern verwendet.

6.2.2.2 Aktivierung zur Immobilisierung von Bakterien

Bei der Epoxy-Aktivierung wurden 600 μL Polyethylenglykoldiglycidylether auf einen DAPEG-beschichteten Objektträger pipettiert und mit einem weiteren belegt. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Trockenschrank bei 100 °C. Anschließend wurden die Sandwiches in Methanol getrennt, und zweimal je fünf Minuten in Methanol im Ultraschallbad gereinigt. Die Chips wurden im Stickstoffstrom vollständig getrocknet, visuell kontrolliert und zur Immobilisierung von Bakterien verwendet.

6.2.3 Immobilisierung von Antikörpern und Bakterien

Zur Herstellung von Antikörper- oder Zellmikroarrays wurden die Fängermoleküle kovalent auf den aktivierten DAPEG-funktionalisierten Glsträgern immobilisiert. In der vorliegenden Arbeit wurde für die Immobilisierung der Kontaktpotter BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer von *Bio-Rad Laboratories* verwendet. Es handelt sich um ein vollautomatisches Spottersystem, wobei die Bedingungen während des Spottens mit Hilfe der zugehörigen Software individuell eingestellt werden konnten. Abbildung 6.1 zeigt das verwendete Spottersystem.

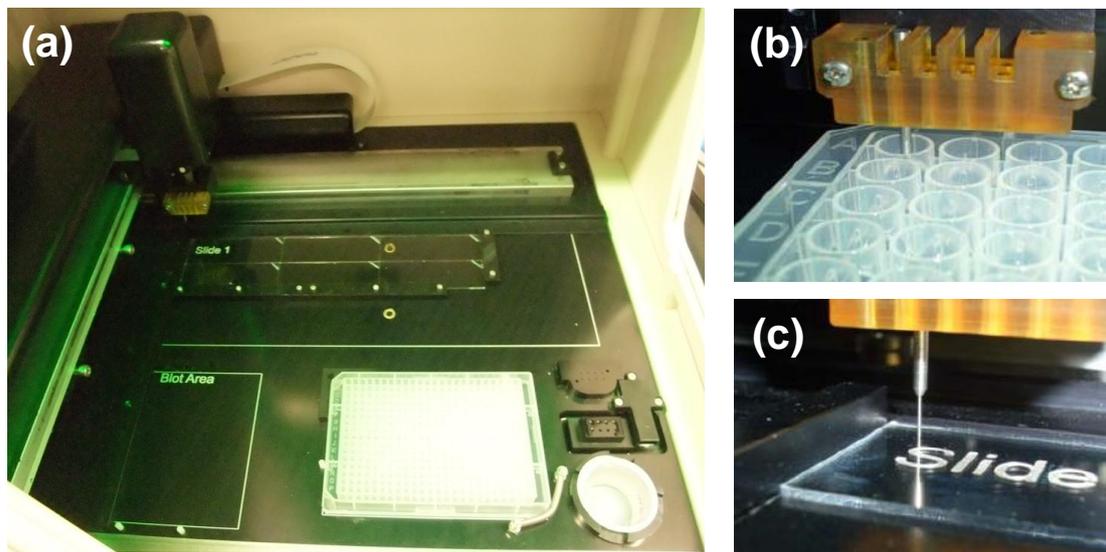


Abbildung 6.1: Bilder des Kontaktpotters BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer.

(a) Gesamtübersicht der Spottingkammer mit Mikrotiterplatte als Reservoir der Spottinglösung, den einzelnen Waschstationen der Nadel (vorne rechts) und der Auflagefläche mit Mikroarray-Glasobjektträgern.

(b) Eintauchen der Nadel in die Spottinglösung.

(c) Immobilisierung der Spottinglösung durch Kontakt mit dem Mikroarray-Glaschip.

Die Luftfeuchtigkeit in der Kammer wurde auf 50 % eingestellt, um das Verdunsten der Spots zu reduzieren. Die Kühlung der Auflagefläche der Glasträger wurde auf 15 °C eingestellt. Die Fänger-moleküllösungen in Spottingpuffer wurden vorbereitet und Aliquots von 35 µL in eine 384-well Mikrotiterplatte überführt. Diese wurde in der Kammer des BioOdyssey Calligrapher MiniArrayer platziert. Mit Hilfe einer *solid pin*-Spotternadel wurden die Fänger-moleküllösungen auf die aktivierten DAPEG-Oberflächen aufgebracht. Dabei wurde pro Spot ein Volumen von etwa 1 nL übertragen.

Als Positivkontrolle auf den Mikroarrays diene anti-Peroxidase in einer Konzentration von 100 µg/mL in Spottingpuffer. Als Negativkontrolle wurde Spottingpuffer auf die Mikroarrays aufgebracht. Die immobilisierten Antikörper- bzw. Bakterienkonzentrationen und deren Anordnung sind an entsprechender Stelle im Ergebnisteil aufgeführt. In der Regel wurden je sechs Replikate einer Spottinglösung aufgetragen. Der Abstand zwischen den einzelnen Replikaten betrug 1100 µm; die einzelnen Spottinglösungen wurden in einem Abstand von 1500 µm aufgebracht. Für die Untersuchungen der 15 Serogruppen wurde für die unterschiedlichen Lösungen ein Abstand von 1100 µm eingestellt.

6.2.4 Mikroarray-Auslesesystem

Bei dem während dieser Arbeit verwendeten Chemilumineszenz-Mikroarray-Auslesesystem handelte es sich um eine Modifikation des am Institut entwickelten Systems [152]. Im Unterschied zu dem beschriebenen System war bei dem verwendeten Gerät die Flusszelle auswechselbar.

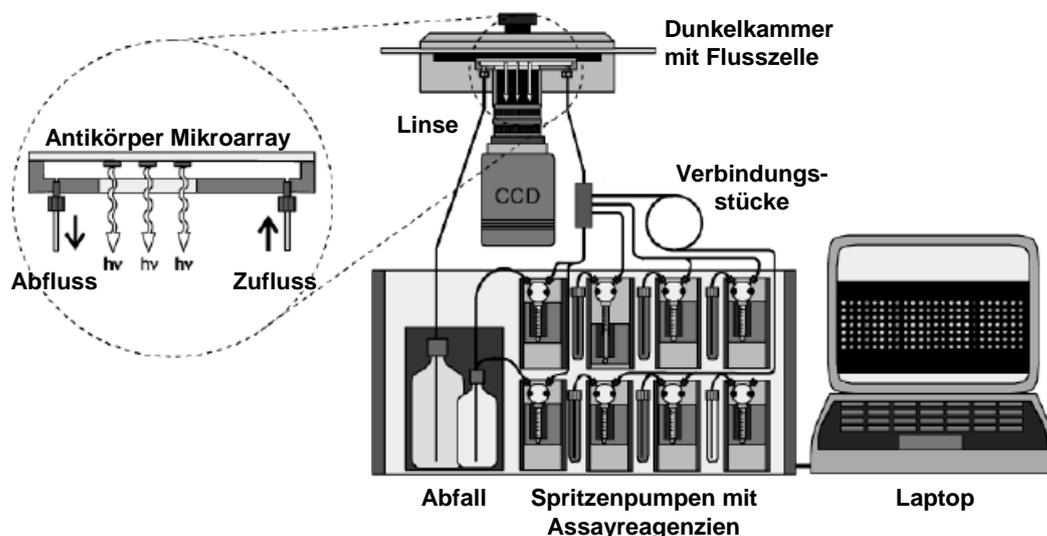


Abbildung 6.2: Schematische Abbildung des Mikroarray-Auslesesystems [152].

Die Flusszelle wurde aus einer Silikonfolie ausgeschnitten und auf einen transparenten Polycarbonatträger mit zwei Löchern als Fluidein- und auslass aufgeklebt. Die Maße der Flusszelle wiesen eine Länge von 6,4 cm, eine Breite (im aktiven Bereich) von 0,8 cm, eine Höhe von 0,01 cm und ein Volumen von 60 μL auf.



Abbildung 6.3: Schematische Darstellung der Flusszelle von oben.

Der Mikroarray wurde für die Messung auf die Flusszelle aufgelegt und durch Schließen des Deckels mittels Druck an das fluidische System angeschlossen. Für jede Messung wurde ein neuer Mikroarray verwendet, da eine Regeneration nicht möglich war. Die CCD-Kamera befand sich unterhalb der Flusszelle mit Mikroarray. Über den angeschlossenen Laptop wurde das Mikroarray-Auslesegerät mittels gerätespezifischer Software angesteuert. Die Assay-Reagenzien wurden mit Hilfe von Pumpen über ein fluidisches System durch die Flusszelle geleitet. Die Software erlaubte die Erstellung individueller Assay-Programme, wobei für jede Pumpe Flüssigkeitsvolumina, Pumpgeschwindigkeiten und -intervalle einzeln festgelegt werden konnten.

6.2.5 Auswertung der Mikroarray-Messdaten

Nach jeder Messung wurde ein Bild erhalten, auf dem die Signalintensitäten des Mikroarrays im Bereich der Flusszelle aufgezeichnet waren. Von diesen Bildern wurde mit Hilfe der Software des Auslesesystems das Hintergrundbild der CCD-Kamera abgezogen. Die Signalintensitäten der einzelnen Spots wurden anhand dieser Bilder mittels CL-Auswertesoftware ausgewertet. Die Berechnung der Chemilumineszenzintensitäten erfolgte durch Integration über ein Quadrat von 7 x 7 Pixel, das den Spot umgibt. Die Angabe der Rechtecksummengröße, der Position und Anzahl der einzelnen Spots erfolgte durch manuelle Eingabe in die Auswertesoftware. Koordinaten und Durchmesser der einzelnen Spots konnten mit Hilfe des Avis FITS Viewers bestimmt werden. Für die aufgetragenen Spotreplikate wurden Mittelwert und Standardabweichung ermittelt. Mit Pixeln auf dem Mikroarray-Hintergrund wurde entsprechend verfahren. Das Hintergrundsignal wurde in einem definierten Abstand zum Spot (1000 μm) ebenfalls über 7 x 7 Pixel aufsummiert. Dieses

Hintergrundsignal in der direkten Umgebung eines Antikörper-Spots wurde bei jeder Messung ermittelt und von dem Signal der Bakterien-spezifischen Antikörper subtrahiert. Dieses Vorgehen der lokalen Hintergrundkorrektur wird standardmäßig zur Auswertung von Mikroarray-Messungen eingesetzt [266]. Die Hintergrundkorrektur ist wichtig, um das absolute Signal der gebundenen Analyten korrekt wiederzugeben und um das Signal unspezifischer Bindungen zu korrigieren [266, 267]. Problematisch bei der angewendeten lokalen Hintergrundkorrektur kann das Vorhandensein von Fehlpixeln oder eines inhomogenen Hintergrundes sein. Um daraus resultierende Ungenauigkeiten zu vermeiden, wurde der relevante Hintergrundbereich auf jedem Mikroarray-Messbild anhand der Signalintensitäten manuell überprüft. Fehlpixel wurden somit bei der Auswertung des Hintergrundes vernachlässigt, um die Korrektur nicht zu verfälschen. Für die graphische Auswertung mittels Origin wurden diese Hintergrund-korrigierten Signale herangezogen. Die Standardabweichungen der Signale sind in den Graphen als Fehlerbalken angezeigt. Die Standardabweichungen der Mikroarray-Messungen spiegeln die Varianzen der Chemilumineszenzsignale des untersuchten Analyten wider. Diese stellen somit ein Maß für die Qualität und Reproduzierbarkeit der Mikroarray-Herstellung dar.

Bei der Kalibrierung von Enzymimmunoassays wird eine sigmoidale Regression verwendet, um den Kurvenverlauf korrekt wiederzugeben. Bei einem Sandwich-ELISA ergibt sich durch halblogarithmisches Auftragen der relativen Signalintensitäten gegen die Analytkonzentrationen eine sigmoidale Fitfunktion nach Gleichung 6.1 [268-270]:

$$Y = \frac{(D - A)}{\left[1 + \left(\frac{X}{C} \right)^B \right]} + A \quad \text{(Gleichung 6.1)}$$

X Analytkonzentration

Y relative Signalintensität

A maximale relative Signalintensität

B Steigung am Testmittelpunkt

C Testmittelpunkt oder IC₅₀-Wert

D minimale relative Signalintensität

Die Steigung im linearen Bereich liefert Informationen über die Affinität des Fängerantikörpers zum Analyten. Eine hohe Steigung resultiert aus einer hohen Affinität zum Analyten. Für einen Immunoassay ist eine möglichst hohe Steigung anzustreben, da dies eine

präzisere Quantifizierung erlaubt. Zur Bestimmung einer unbekanntes Analytkonzentration kann Gleichung 6.1 nach X aufgelöst werden:

$$X = \sqrt[B]{\left(\frac{D-A}{Y-A} - 1\right)} \cdot C \quad (\text{Gleichung 6.2})$$

Die Mikroarray-interne Nachweisgrenze wurde durch Addition der dreifachen Standardabweichung des Nullprobenmesswerts auf den Signalmittelwert der Nullproben-Messung berechnet [271] (Gleichung 6.3):

$$LOD = MW(Y_{Nullprobe}) + 3 \cdot STABW(Y_{Nullprobe}) \quad (\text{Gleichung 6.3})$$

LOD Nachweisgrenze	$Y_{Nullprobe}$ Signalintensität der Nullproben-Messung
MW Mittelwert	STABW Standardabweichung

Der lineare Bereich zur Bestimmung des Arbeitsbereichs wurde durch eine doppellogarithmische Auftragung der CL-Signalwerte gegen die Analytkonzentrationen erhalten [28, 268]. Der Arbeitsbereich der Kalibrierung wurde anhand des Konzentrationsbereichs definiert, welcher die lineare Gleichung $y = m \cdot x + b$ mit dem höchsten Bestimmtheitsmaß erfüllte [28].

6.2.6 Bestimmung der Bakterienkonzentration mittels Durchflusszytometrie

Dem Arbeitsbereich des Zytometers entsprechend wurde die Bakteriensuspension mit Reinstwasser verdünnt. Die Bakterienprobe wurde mit dem grünen Fluoreszenzfarbstoff SYTO 9 angefärbt. 3 µL SYTO 9 (1:10-Verdünnung der Stammlösung aus dem LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit in Reinstwasser) wurden zu 500 µL der Bakteriensuspension gegeben. Die Mischung wurde 20 min unter Ausschluss von Licht inkubiert und anschließend für die Messung eingesetzt.

Die Zytometermessungen dienen im Rahmen dieser Arbeit zur Referenzierung der Bakterienkonzentrationen. Alle Konzentrationsangaben eingesetzter Bakteriensuspensionen

(*E. coli* und *L. pneumophila*) beziehen sich auf die zuvor durchgeführte Bestimmung mittels Zytometer.

In Abbildung 6.4 ist beispielhaft die Zytometermessung von *L. pneumophila* Serogruppe 1 in Reinstwasser mit einer Konzentration von $8 \cdot 10^5$ Zellen/mL gezeigt.

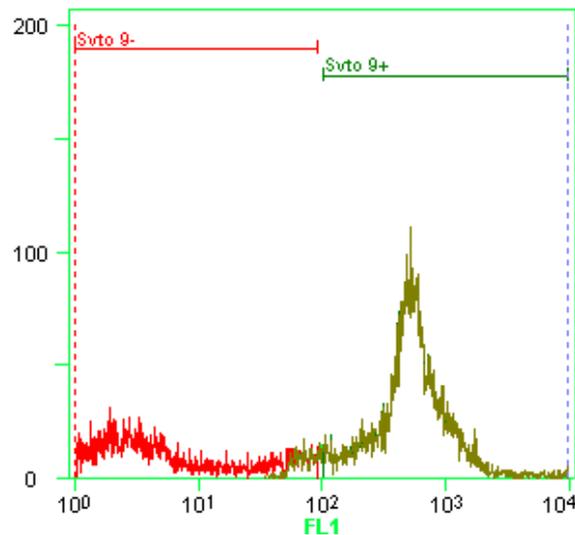


Abbildung 6.4: Zytometermessung einer Suspension von $8 \cdot 10^5$ Z/mL *L. pneumophila* Sg 1 in Reinstwasser. Legionellen im Bereich Syto 9+ (grün). Hintergrundrauschen im Bereich Syto 9- (rot).

In der Histogrammdarstellung der Zytometermessung ist die Anzahl an normierten Ereignissen gegen die Fluoreszenzintensität aufgetragen. Die Signale der Syto 9-markierten Bakterienzellen sind bei einer Fluoreszenzintensität im Bereich von $10^2 - 10^4$ zu finden. Deutlich davon abgetrennt ist das Hintergrundrauschen im Bereich von $10^0 - 10^1$.

6.3 Mikroarray-Messungen mittels Stopped-Flow-Prinzip

6.3.1 Optimiertes Stopped-Flow Messprogramm

Das Messprogramm mit optimierten Bedingungen ist im Folgenden beschrieben. Zunächst wurde die Flusszelle mit 2 mL Laufpuffer (0,5 % Casein in PBS) mit einer Fließgeschwindigkeit von $100 \mu\text{L/s}$ gespült. Anschließend wurden 1,2 mL der Bakterienprobe über den Mikroarray geleitet. Die ersten 0,6 mL wurden kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von $20 \mu\text{L/s}$ zugegeben. Die restlichen 0,6 mL wurden in Volumenintervallen von $20 \mu\text{L}$ mit einer Geschwindigkeit von $20 \mu\text{L/s}$ und einer Interaktionszeit von 108 s pro Intervall über den Mikroarray gepumpt. Nach einem weiteren

Waschschritt mit Laufpuffer (4 mL, 100 $\mu\text{L/s}$) wurden 1,2 mL der Detektionsantikörperlösung zugegeben. Die Zugabe erfolgte analog der Bakterienzugabe, allerdings mit einer kürzeren Interaktionszeit von 1,2 s pro Volumeneinheit. Anschließend wurde mit 6 mL Laufpuffer (100 $\mu\text{L/s}$) gespült. Nach dem Waschschritt wurden 1,2 mL HRP-markiertes Streptavidin in gleicher Weise über den Mikroarray geleitet wie die Detektionsantikörperlösung. Anschließend wurde die Flusszelle mit 8 mL Laufpuffer gespült (100 $\mu\text{L/s}$). 600 μL Luminol und 600 μL H_2O_2 wurden gleichzeitig mit einer Fließgeschwindigkeit von 100 $\mu\text{L/s}$ in die Flusszelle geleitet und das Signal 60 s lang mit der CCD-Kamera aufgezeichnet.

Die zur Messung von *E. coli* verwendeten Reagenzienkonzentrationen sind in Tabelle 6.1 angegeben. Davon abweichende Bedingungen sind an entsprechender Stelle aufgeführt.

Tabelle 6.1: Verwendete Reagenzien zur Messung von *E. coli*.

Detektion <i>E. coli</i>	
Fängerantikörper	0,5 mg/mL in Spottingpuffer
Streptavidin-HRP	0,2 $\mu\text{g/mL}$ in 0,5 % Casein
Detektionsantikörper	10 $\mu\text{g/mL}$ in PBS

6.3.2 Einfluss der Interaktionszeit

Für die Variation der Interaktionszeit der Bakteriensuspension mit dem Mikroarray wurde das in Kapitel 6.3.1 beschriebene optimierte Stopped-Flow Messprogramm angewendet. An Stelle der dort beschriebenen Interaktionszeit von 108 s wurde dieser Parameter für die Messung von *E. coli* ($2 \cdot 10^8$ Zellen/mL) variiert. Die gemessenen Interaktionszeiten waren 1,2, 12, 36, 108, 300, 480 und 940 s.

6.3.3 Vorinkubation

Im Gegensatz zu der Untersuchung der Interaktionszeit ohne Vorinkubation wurden hier die Bakteriensuspension ($2 \cdot 10^8$ Zellen/mL) und die Detektionsantikörper nicht nacheinander über den Mikroarray geleitet. Vor der Messung wurden Bakterien und Antikörper in ein Reaktionsgefäß pipettiert und für 1 Stunde bei Raumtemperatur geschüttelt. Die in den Lösungen vorliegenden Konzentrationen entsprachen denen aus dem Versuch ohne

Vorinkubation, $2 \cdot 10^8$ *E. coli*-Zellen/mL und 10 µg/mL für die Detektionsantikörper. Die vorinkubierten Suspensionen wurden direkt mit Hilfe des Stopped-Flow-Prinzips mit Inkubationszeiten von 1,2, 12, 36, 300, 480 und 940 s gemessen.

6.3.4 Anzahl an Interaktionsschritten

Bei der Untersuchung der Anzahl an Interaktionsschritten wurde das optimierte Stopped-Flow Messprogramm verwendet. Die Anzahl an Interaktionsschritten ergab sich aus der Anzahl an zugegebenen 20-µL-Volumenelementen. An Stelle der in Kapitel 6.3.1 eingesetzten 1,2 mL Bakteriensuspension wurde die Anzahl an 20-µL-Volumenelementen und damit das Gesamtvolumen der Bakteriensuspension verändert. Bei jeder Messung wurden zunächst 0,6 mL kontinuierlich (20 µL/s) in die Flusszelle geleitet und anschließend eine unterschiedliche Anzahl (20, 30, 60, 100 und 250) an 20-µL-Volumenelementen zugegeben. Die sich daraus ergebenden Gesamtvolumina betragen 1,0, 1,2, 1,8, 2,6 und 5,6 mL. Die gemessene *E. coli*-Konzentration war $2 \cdot 10^8$ Zellen/mL und die Interaktionszeit betrug 54 s.

6.3.5 Vergleich Stopped-Flow-Prinzip und kontinuierliche Zugabe

Zum Vergleich des Stopped-Flow-Prinzips mit einer kontinuierlichen Zugabe der Bakteriensuspension wurde eine Bakterienkonzentration von $8 \cdot 10^8$ *E. coli*/mL eingesetzt. Die Assayreagenzien wurden wie in Kapitel 6.3.1 vorbereitet. Für die Messung gemäß dem Stopped-Flow Prinzip wurde das optimierte Messprogramm (Kapitel 6.3.1) verwendet. Bei der kontinuierlichen Zugabe wurden Fließgeschwindigkeiten von 20, 5, 1 und 0,5 µL/s verwendet. Da die kleinstmögliche Geschwindigkeit des Auslesesystems 20 µL/s betrug, wurde zur kontinuierlichen Zugabe der Bakteriensuspension eine Spritzenpumpe an das Auslesesystem angeschlossen.

6.3.6 Kultivierung von *E. coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte durch Schütteln in 100 mL LB-Medium bei 37 °C für 14 Stunden. Die Zellkultur wurde 10 Minuten lang zentrifugiert (4500 rpm, 4 °C) und der Überstand vollständig entfernt. Die Pellets wurden in PBS resuspendiert und die Zellkonzentration mittels UV-Vis-Spektroskopie abgeschätzt. Die Zellkonzentration wurde nach Gleichung 6.4 aus der OD-Messung bestimmt:

$$\text{OD} (\lambda = 578 \text{ nm}) = 1 \hat{=} 1 \cdot 10^9 \text{ Zellen} \quad (\text{Gleichung 6.4})$$

Eine genauere Konzentrationsbestimmung der für die Messungen eingesetzten Suspensionen erfolgte mittels Durchflusszytometrie.

6.4 Mikroarray-Detektion von *L. pneumophila* Serogruppe 1

Alle Messungen von *L. pneumophila* erfolgten mit inaktivierten Bakterien. Es wurde stets das in Kapitel 6.3.1 optimierte Stopped-Flow-Programm angewendet. Alle getesteten Fängerantikörper gegen *L. pneumophila* Serogruppe 1 wurden in einer Konzentration von 2,5 mg/mL in Spottingpuffer auf dem Mikroarray immobilisiert. Die Detektionsantikörper wurden mit einer Konzentration von 3,7 µg/mL in PBS eingesetzt.

Nach der Optimierung wurden für alle Messungen von *L. pneumophila* Serogruppe 1 folgende Assayreagenzien verwendet. Der Fängerantikörper (pAk von *Biodesign*) wurde in einer Konzentration von 2,5 mg/mL in Spottingpuffer eingesetzt. Die Konzentration des Detektionsantikörpers (pAk von *Senova*) betrug 3,7 µg/mL in PBS. Für Streptavidin-HRP wurde eine Konzentration von 0,2 µg/mL in 0,5 % Casein verwendet.

6.5 Mikroarray-Detektion in Kombination mit Anreicherungsverfahren

Die Anreicherung mittels Cross-Flow-Filtration und monolithischer Säule wurde gemäß in der Literatur beschriebener Bedingungen durchgeführt [209, 230].

Die von Lu Pei durchgeführte Anreicherung mit Hilfe der vergrößerten monolithischen Säule ist im Folgenden beschrieben; der Aufbau ist in Abbildung 6.5 gezeigt. Vor Beginn der Anreicherung wurde durch Zugabe von 1 M Salzsäure der pH-Wert der Wasserprobe auf pH 3 eingestellt. Die monolithische Säule wurde zunächst mit Wasser (pH 3) gespült, bevor anschließend die gesamte Wasserprobe über die Säule gepumpt wurde.

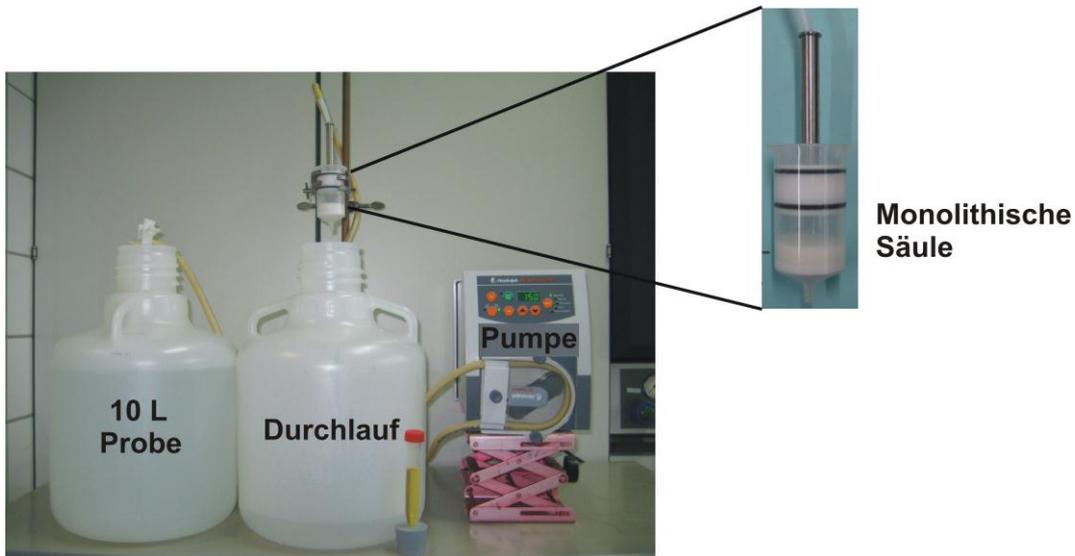


Abbildung 6.5: Aufbau bei der Anreicherung einer 10-L-Wasserprobe mittels monolithischer Säule und Detailansicht der monolithischen Säule. Das Foto wurde von Lu Pei zur Verfügung gestellt.

Die Elution erfolgte mit Carbonatpuffer. Das Volumen des Carbonatpuffers wurde zunächst etwa zur Hälfte über das monolithische Material gepumpt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten wurde der restliche Carbonatpuffer über die monolithische Säule gegeben.

Die Bakterienwiederfindung wurde für alle Anreicherungsexperimente durch das Verhältnis der Zellzahl im Eluat (N_{Eluat}) zu der Zellzahl in der eingesetzten Probe (N_{Probe}) berechnet (Gleichung 6.5). Die Zellzahl ergab sich aus dem Volumen der jeweiligen Suspension und der ermittelten Bakterienkonzentration.

$$\text{Wiederfindung} = \frac{N_{\text{Eluat}}}{N_{\text{Probe}}} = \frac{c_{\text{Eluat}} \cdot V_{\text{Eluat}}}{c_{\text{Probe}} \cdot V_{\text{Probe}}} \quad (\text{Gleichung 6.5})$$

6.6 Bioaerosol-Untersuchungen

Der Bioaerosol-Aufbau setzte sich im Wesentlichen aus drei Komponenten zusammen, einem Vernebler, einer Aerosolkammer und einem Bioaerosol-Sammler.

6.6.1 Bioaerosol-Erzeugung

Zur Erzeugung des Bioaerosols wurde der Vernebler Pari LC Plus entsprechend der Gebrauchsanweisung eingesetzt.

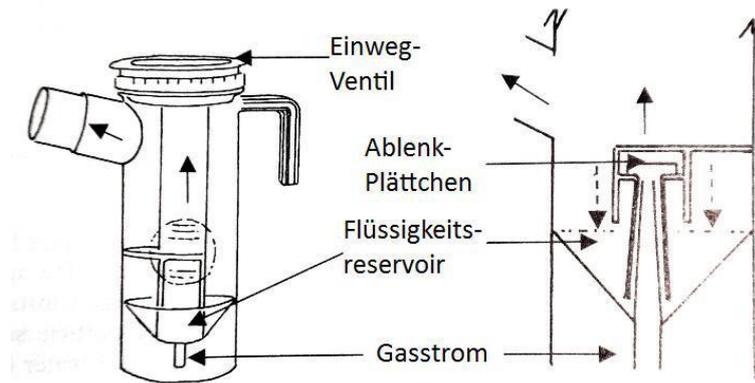


Abbildung 6.6: Schematische Abbildung des Verneblers Pari LC [272].

Stickstoff wurde während des Verneblungsprozesses als komprimiertes Gas zugeführt. Die Stickstoffleitung und der Vernebler wurden mit Hilfe einer Düse verbunden. Der Druckminderer der Gasleitung wurde so eingestellt, dass an der Düse ein Relativdruck von etwa 2,5 bar anlag. Der Volumenstrom wurde mittels Gasstrom-Messgerät bestimmt, was einen Messwert von $9,2 \pm 0,1$ L/min ergab.

6.6.2 Aerosolkammer

Zwischen Vernebler und Aerosolsammler wurde eine transparente Aerosolkammer aus Kunststoff eingebaut. Die Abmessungen der Kammer betragen 46 cm Breite, 58 cm Höhe und 28 cm Tiefe. Der Boden der Kammer war offen. Auf der Vorderseite und auf der Oberseite konnte die Kammer mittels einer Klappe geöffnet werden. An der Stirnseite der Kammer befand sich außerdem eine kleine Öffnung.

6.6.3 Bioaerosol-Sammler Coriolis μ

Der Zyklonsammler Coriolis μ wurde für die Untersuchungen des Bioaerosol-Testaufbaus verwendet. Vor jedem Sammelexperiment wurden 10 mL steriles Reinstwasser in das Sammelgefäß des Sammlers pipettiert. Für alle Versuche wurden ein Volumenstrom von 300 mL/min und eine Sammelzeit von 10 min eingestellt. Nach dem Sammelprozess wurde das Endvolumen der Sammelflüssigkeit bestimmt. Dies konnte anhand der Massendifferenz des leeren Sammelgefäßes und des Gefäßes mit der restlichen Flüssigkeit nach dem Sammeln errechnet werden. Die Sammelflüssigkeit wurde in ein steriles Gefäß überführt und direkt zur Messung eingesetzt. Anhand des berechneten Volumens an vernebelter und gesammelter Bakteriensuspension und der gemessenen Konzentration konnten die entsprechenden

Zellzahlen bestimmt werden. Nach der Verwendung wurden die Sammelgefäße mit 70 % Ethanol gereinigt.



Abbildung 6.7: Zyklonsammler Coriolis μ [273].

6.6.4 Bioaerosol-Sammler AGI-30

Für das Bioaerosol-Sammeln wurde außerdem der Impinger AGI-30 eingesetzt.



Abbildung 6.8: Bioaerosol-Sammelgerät AGI-30 [274].

Vor der Verwendung wurden 20 mL steriles Reinstwasser in das Sammelgefäß pipettiert, welches mit einem Tauchrohr verschlossen wurde. Mit Hilfe einer Membranpumpe, die an den Sammler angeschlossen wurde, konnte der Sammelprozess gestartet und beendet werden. Für die Versuche wurde der maximal mögliche Volumenstrom verwendet. Dieser wurde mittels Gasstrom-Messgerät bestimmt und betrug $10,5 \pm 0,4$ L/min. Als Sammelzeit wurden 10 min definiert. Die Bestimmung der vernebelten und gesammelten Zellzahlen und die Reinigung des Sammelgefäßes erfolgten entsprechend der Vorgehensweise mit dem Coriolis μ Sammler.

6.6.5 Berechnung der Bakterienwiederfindung

Die Bakterienwiederfindung im Bioaerosol wurde über das Verhältnis von freigesetzten zu gesammelten Zellen ermittelt (Gleichung 6.6).

$$\text{Wiederfindung} = \frac{N_{\text{gesammelt}}}{N_{\text{freigesetzt}}} = \frac{c_{\text{Sammler}} \cdot V_{\text{end}}}{c_0 \cdot V_{\text{freigesetzt}}} \quad (\text{Gleichung 6.6})$$

$N_{\text{gesammelt}}$ Zellzahl gesammelter Bakterien

$N_{\text{freigesetzt}}$ Zellzahl freigesetzter Bakterien

V_{end} Endvolumen der Sammelflüssigkeit

c_0 Bakterienkonzentration im Vernebler

$V_{\text{freigesetzt}}$ beim Vernebeln freigesetztes Volumen

c_{Sammler} Bakterienkonzentration im Sammelgefäß nach Ende des Sammelvorgangs

Die Volumina wurden über die Massendifferenz vor und nach der Bioaerosolerzeugung bzw. dem Bioaerosolsammelprozess bestimmt.

6.6.6 Untersuchung von Realproben

In Zusammenarbeit mit dem Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit (LGL) München erfolgte die Untersuchung von Bioaerosol-Realproben. Es fand eine Probenahme in einer Dusche am Institut (IWC) und einer Dusche am LGL Oberschleißheim statt. Außerdem wurden Bioaerosolproben von einer Rückkühlanlage des LGL Oberschleißheim untersucht. In Abbildung 6.9 sind Aufnahmen der Probenahme in der Dusche des IWC und der Rückkühlanlage in Oberschleißheim gezeigt.



Abbildung 6.9: Versuchsanordnung zur Bioaerosol-Probenahme in einer Dusche des IWC (links) und einer Rückkühlanlage des LGL in Oberschleißheim (rechts).

Die Bioaerosol-Probenahme erfolgte mit dem Coriolis μ -Sammler und einem *Sartorius*-Sammler, welche nebeneinander positioniert und gleichzeitig betrieben wurden. Die Sammelzeit betrug 10 Minuten. Für den Volumenstrom des Coriolis μ wurden 300 L/min eingestellt. Der *Sartorius*-Sammler wurde mit der maximal einstellbaren Sammelrate von 50 L/min betrieben.

Für die Probenahme in der Dusche wurde das Duschwasser aufgedreht und gleichzeitig der Sammelvorgang gestartet. Die Wasserproben wurden über den gleichen Zeitraum hinweg genommen wie die Aerosolprobe. Auf dem Boden der Duschkabine befanden sich sterile Gefäße, in denen das Duschwasser aufgefangen wurde.

6.7 Detektion der 15 Serogruppen von *L. pneumophila*

6.7.1 Screening der Zellkulturüberstände

Das Mikroarray-Messprogramm zum Screening der Zellkulturüberstände ist im Folgenden beschrieben. Zunächst wurde die Flusszelle mit 2 mL Laufpuffer (0,5 % Casein in PBS) mit einer Fließgeschwindigkeit von 100 μ L/s gespült. Anschließend wurden 1,2 mL des Zellkulturüberstands (Verdünnung 1:17 in PBS) über den Mikroarray geleitet. Die ersten 0,6 mL wurden kontinuierlich mit einer Geschwindigkeit von 20 μ L/s zugegeben. Die restlichen 0,6 mL wurden in Volumenintervallen von 20 μ L mit einer Geschwindigkeit von 20 μ L/s und einer Interaktionszeit von 1,2 s pro Intervall über den Mikroarray gepumpt. Nach einem weiteren Waschschrift mit Laufpuffer (4 mL, 100 μ L/s) wurden 1,2 mL der Sekundärantikörperlösung (anti-Maus-HRP, 2 μ g/mL in PBS) zugegeben. Die Zugabe erfolgte analog zu dem beschriebenen Ablauf bei der Zugabe des Zellkulturüberstandes. Anschließend wurde die Flusszelle mit 6 mL Laufpuffer (100 μ L/s) gespült. 600 μ L Luminol und 600 μ L H₂O₂ wurden gleichzeitig mit einer Fließgeschwindigkeit von 100 μ L/s in die Flusszelle geleitet und das Signal 60 s lang mit der CCD-Kamera aufgezeichnet.

6.7.2 Aufreinigung von Antikörpern aus Zellkulturüberständen mittels Protein A-Säulen

Die aufzureinigende Probe (Zellkulturüberstand) wurde mit Bindepuffer auf ein Volumen von 2 mL verdünnt. Die Protein A-Säule wurde mittels Zentrifugation (1 min, 1000 rpm) zweimal

mit je 2 mL Bindepuffer gewaschen. Anschließend wurde die Probe auf die Säule pipettiert, diese verschlossen und 10 min mit gleichmäßiger Überkopf-Drehbewegung inkubiert. Die Säule wurde durch Zentrifugation (1 min, 1000 rpm) dreimal mit Bindepuffer gewaschen. 1 mL Elutionspuffer wurde auf die Säule pipettiert und mittels Zentrifugation in ein Reaktionsgefäß mit 100 µL Neutralisationspuffer eluiert. Durch zweimalige Zugabe von je 1 mL Elutionspuffer wurden zwei weitere Eluatfraktionen in Reaktionsgefäßen mit Neutralisationspuffer erhalten. Die Eluatfraktionen wurden mittels Zentrifugenfiltern (30 kDa) aufkonzentriert und umgepuffert (PBS). Die Proteinkonzentration der aufgereinigten Antikörperlösung wurde durch Absorptionsmessung bei 280 nm ermittelt.

6.7.3 Biotin-Markierung von Antikörpern

Die Biotin-Markierung der gereinigten Antikörper erfolgte unter Verwendung eines 50-fachen molaren Überschusses an Biotin und wurde der eingesetzten Antikörperkonzentration entsprechend eingestellt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde eine 10 mM Lösung des Biotinreagenzes (Sulfo-NHS-LC-Biotin) vorbereitet und das entsprechende Volumen zu der Antikörperlösung pipettiert. Unter Rühren wurde die Reaktion auf Eis zwei Stunden inkubiert. Überschüssiges Biotinreagenz wurde anschließend mittels Zentrifugation abgetrennt.

6.7.4 Mikroarray-Sandwich-Immunoassay zur Detektion der Serogruppen

Zur Detektion wurde ebenfalls das Stopped-Flow-Messprogramm (Kapitel 6.3.1) angewendet. Alle Serogruppen von *L. pneumophila* wurden in inaktivierter Form eingesetzt. Zur Detektion wurden jeweils Serogruppen-spezifische Biotin-markierte monoklonale Antikörper in einer Konzentration von 1 µg/mL verwendet. Die monoklonalen Fängerantikörper wurden in maximal verfügbarer Konzentration immobilisiert. Die verwendeten Konzentrationen sind im Folgenden aufgelistet.

- mAk 7/1 (Sg 2) 0,2 mg/mL
- mAk 4/7 (Sg 3) 0,4 mg/mL
- mAk 40/4 (Sg 4) 0,3 mg/mL
- mAk 7/4 (Sg 4) 0,3 mg/mL
- mAk 27/1 (Sg 5) 0,1 mg/mL

- mAk 5/2 (Sg 5) 0,3 mg/mL
- mAk 9/2 (Sg 6) 0,3 mg/mL
- mAk 32/3 (Sg 6) 0,1 mg/mL
- mAk 13/1 (Sg 8) 0,3 mg/mL
- mAk 37/2 (Sg 9) 0,3 mg/mL
- mAk 17/2 (Sg 10) 0,3 mg/mL
- mAk 33/3 (Sg 12) 0,3 mg/mL
- mAk 41/3 (Sg 13) 0,3 mg/mL
- mAk 42/3 (Sg 14) 0,2 mg/mL
- mAk 51/1 (Sg 15) 0,4 mg/mL

7 Abkürzungsverzeichnis

AGI	<i>all-glass impinger</i>
ATP	Adenosintriphosphat
a.u.	willkürliche Einheit (arbitrary unit)
CFU	koloniebildende Einheit (colony forming unit)
CL	Chemilumineszenz
DAPEG	Diamino-Polyethylenglykol
DMAP	Dimethylaminopyridin
DMF	Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSC	Di(<i>N</i> -succinimidyl)carbonat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	enzymgekoppelter Immunoassay (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
GOPTS	3-Glycidylxypropyltrimethoxysilan
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horseradish peroxidase</i>)
IMS	Immunomagnetische Separation
IR	Infrarot
ITS	interner transkribierter Spacer (<i>internal transcribed spacer</i>)
IWC	Institut für Wasserchemie und Chemische Balneologie
LB	<i>lysogeny broth</i> -Nährmedium
LGL	Landesamt für Gesundheit und Lebensmittelsicherheit
<i>L. pneumophila</i>	<i>Legionella pneumophila</i>
mAk	monoklonaler Antikörper
MWCO	Molekulargewichtsgrenzwert (<i>molecular weight cut off</i>)
OD	optische Dichte
pAk	polyklonaler Antikörper
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
PEG	Polyethylenglykol
RNA	Ribonukleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>revolutions per minute</i>)
RT	Raumtemperatur

SERS	oberflächenverstärkte Raman-Streuung (<i>surface-enhanced raman scattering</i>)
Sg	Serogruppe
spp.	species pluralis
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz (<i>surface plasmon resonance</i>)
TIRF	Interne Totalreflexions-Fluoreszenz (<i>total internal reflection fluorescence</i>)
UV	Ultraviolett
VBNC	lebend, aber nicht kultivierbar (<i>viable but non-culturable</i>)
Vis	sichtbar (<i>visible</i>)
Z	Zellen

8 Literatur

- [1] <http://www.abendzeitung-muenchen.de/inhalt.bakterien-in-den-rohren-legionellen-alarm:-duschverbot-im-olympiadorf.f8db9c1f-3a9d-40ea-9b66-a0290ffff2b9.html>, **2012**.
- [2] B. M. Hsu, R. Martin, B. B. Wentworth, *Isolation of Legionella species from drinking water*. Applied and Environmental Microbiology, *48*, 830-832, **1984**.
- [3] B. S. Fields, R. F. Benson, R. E. Besser, *Legionella and Legionnaires' disease: 25 years of investigation*. Clinical Microbiology Reviews, *15*, 506-526, **2002**.
- [4] J. C. Sherris: *Medical Microbiology*, Elsevier, New York **1990**.
- [5] J. E. Stout, V. L. Yu, *Legionellosis*. New England Journal of Medicine, *337*, 682-687, **1997**.
- [6] V. A. Mouchtouri, G. Goutziana, J. Kremastinou, C. Hadjichristodoulou, *Legionella species colonization in cooling towers: risk factors and assessment of control measures*. American Journal of Infection Control, *38*, 50-55, **2010**.
- [7] T. M. N. Nguyen, D. Ilef, S. Jarraud, L. Rouil, C. Campese, D. Che, S. Haeghebaert, F. O. Ganiayre, F. Marcel, J. Etienne, J. C. Desenclos, *A community-wide outbreak of Legionnaires' disease linked to industrial cooling towers - how far can contaminated aerosols spread?* Journal of Infectious Diseases, *193*, 102-111, **2006**.
- [8] G. E. Bollin, J. F. Plouffe, M. F. Para, B. Hackman, *Aerosols containing Legionella pneumophila generated by shower heads and hot-water faucets*. Applied and Environmental Microbiology, *50*, 1128-1131, **1985**.
- [9] M. Bauer, L. Mathieu, M. Deloge-Abarkan, T. Remen, P. Tossa, P. Hartemann, D. Zmirou-Navier, *Legionella bacteria in shower aerosols increase the risk of Pontiac fever among older people in retirement homes*. Journal of Epidemiology and Community Health, *62*, 913-920, **2008**.
- [10] D. W. Fraser, T. R. Tsai, W. Orenstein, W. E. Parkin, H. J. Beecham, R. G. Sharrar, J. Harris, G. F. Mallison, S. M. Martin, J. E. McDade, C. C. Shepard, P. S. Brachman,

- Legionnaires' disease. Description of an epidemic of pneumonia.* New England Journal of Medicine, 297, 1189-1197, **1977**.
- [11] A. Garcia-Fulgueiras, C. Navarro, D. Fenoll, J. Garcia, P. Gonzalez-Diego, T. Jimenez-Bunuales, T. Jimenez-Bunuales, M. Rodriguez, R. Lopez, F. Pacheco, J. Ruiz, M. Segovia, B. Baladron, C. Pelaz, *Legionnaires' disease outbreak in Murcia, Spain.* Emerging Infectious Diseases, 9, 915-921, **2003**.
- [12] L. Mathieu, E. Robine, M. Deloge-Abarkan, S. Ritoux, D. Pauly, P. Hartemann, D. Zmirou-Navier, *Legionella bacteria in aerosols: sampling and analytical approaches used during the Legionnaires' disease outbreak in Pas-de-Calais.* Journal of Infectious Diseases, 193, 1333-1335, **2006**.
- [13] K. Nygard, O. Werner-Johansen, S. Ronsen, D. A. Caugant, O. Simonsen, A. Kanestrom, E. Ask, J. Ringstad, R. Odegard, T. Jensen, T. Krogh, E. A. Hoiby, E. Ragnhildstveit, I. S. Aaberge, P. Aavitsland, *An outbreak of Legionnaires' disease caused by long-distance spread from an industrial air scrubber in Sarpsborg, Norway.* Clinical Infectious Diseases, 46, 61-69, **2008**.
- [14] H. v. Baum, G. Härter, A. Essig, C. Lück, T. Gonser, A. Embacher, S. Brockmann, *Preliminary report: outbreak of Legionnaires' disease in the cities of Ulm and Neu-Ulm in Germany, December 2009 - January 2010.* Eurosurveillance, 15, 1-2, **2010**.
- [15] M. Exner, R. Suchenwirth, S. Pleischl, A. Kramer, T. Eikmann, W. Nissing, P. Hartemann, C. Koch, U. Teichert-Barthel, U. Heudorf, S. Engelhart, *Memorandum zu dem Legionellen-Ausbruch in Ulm 2010 aus Sicht von Hygiene und Öffentlicher Gesundheit.* Umweltmedizin in Forschung und Praxis, 15, 43-57, **2010**.
- [16] M. Freudenmann, S. Kurz, H. v. Baum, D. Reick, A. M. Schreff, A. Essig, C. Lück, T. Gonser, S. O. Brockmann, G. Härter, B. Eberhardt, A. Embacher, C. Höller, *Interdisciplinary management of a large Legionella outbreak in Germany.* Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz, 54, 1161-1169, **2011**.
- [17] *Fallbericht: Reiseassoziierte Legionella-Pneumonie nach Aufenthalt in einem deutschen Hotel.* Robert-Koch-Institut - Epidemiologisches Bulletin, 41, 405-410, **2010**.

- [18] C. A. Joseph, K. D. Ricketts, *Legionnaires' disease in Europe 2007 - 2008*. *Eurosurveillance*, 15, 19493, **2010**.
- [19] B. Brodhun, U. Buchholz, *Epidemiology of Legionnaires' disease in Germany*. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 54, 680-687, **2011**.
- [20] *Raumlufttechnik. Zentrale raumluftechnische Anlagen. Bauliche und technische Anforderungen*. Verein Deutscher Ingenieure: VDI Richtlinie 3803, **2010**.
- [21] *Erste Verordnung zur Änderung der Trinkwasserverordnung*. *Bundesgesetzblatt Jahrgang 2011 Teil I Nr. 21*, **2011**.
- [22] N. Li, A. Brahmendra, A. J. Veloso, A. Prashar, X. R. Cheng, V. W. S. Hung, C. Guyard, M. Terebiznik, K. Kerman, *Disposable immunochips for the detection of Legionella pneumophila using electrochemical impedance spectroscopy*. *Analytical Chemistry*, 84, 3485-3488, **2012**.
- [23] P. C. Lück, M. Steinert, *Pathogenesis, diagnosis and therapy of Legionella infections*. *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz*, 49, **2006**.
- [24] *A review of the epidemiology and control of legionellosis in Singapore, 2000 - 2010*. *Epidemiological News Bulletin, Ministry of Health, Singapore*, 37, 50-70, **2011**.
- [25] P. L. Elverdal, C. W. Svarrer, C. S. Jørgensen, I. C. Skovsted, S. A. Uldum, *Development and validation of ELISA for detection of antibodies to Legionella pneumophila serogroup 1, 3 and 6 in human sera*. *Journal of Microbiological Methods*, 86, 298-303, **2011**.
- [26] V. Ng, P. Tang, F. Jamieson, C. Guyard, D. E. Low, D. N. Fisman, *Laboratory-based evaluation of legionellosis epidemiology in Ontario, Canada, 1978 to 2006*. *BMC Infectious Diseases*, 9, 68-77, **2009**.
- [27] A. Wolter, R. Niessner, M. Seidel, *Preparation and characterization of functional poly(ethylene glycol) surfaces for the use of antibody microarrays*. *Analytical Chemistry*, 79, 4529-4537, **2007**.
- [28] A. Wolter, R. Niessner, M. Seidel, *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**.
- [29] C. B. Fliermans, W. B. Cherry, L. H. Orrison, S. J. Smith, D. L. Tison, D. H. Pope, *Ecological distribution of Legionella pneumophila*. *Applied and Environmental Microbiology*, *41*, 9-16, **1981**.
- [30] S. Riffard, S. Douglass, T. Brooks, S. Springthorpe, L. G. Filion, S. A. Sattar, *Occurrence of Legionella in groundwater: an ecological study*. *Water Science and Technology*, *43*, 99-102, **2001**.
- [31] T. Brooks, R. A. Osicki, V. S. Springthorpe, S. A. Sattar, L. Filion, D. Abrial, S. Riffard, *Detection and identification of Legionella species from groundwaters*. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *67*, 1845-1859, **2004**.
- [32] C. M. Ortiz-Roque, T. C. Hazen, *Abundance and distribution of Legionellaceae in Puerto Rican waters*. *Applied and Environmental Microbiology*, *53*, 2231-2236, **1987**.
- [33] Y. Abu Kwaik, L. Y. Gag, B. J. Stone, C. Venkataraman, O. S. Harb, *Invasion of protozoa by Legionella pneumophila and its role in bacterial ecology and pathogenesis*. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 3127-3133, **1998**.
- [34] B. S. Fields, *The molecular ecology of legionellae*. *Trends in Microbiology*, *4*, 286-290, **1996**.
- [35] S. Hägele, R. Köhler, H. Merkert, M. Schleicher, J. Hacker, M. Steinert, *Dictyostelium discoideum: a new host model system for intracellular pathogens of the genus Legionella*. *Cellular Microbiology*, *2*, 165-171, **2000**.
- [36] J. M. Solomon, A. Rupper, J. A. Cardelli, R. R. Isberg, *Intracellular growth of Legionella pneumophila in Dictyostelium discoideum, a system for genetic analysis of host-pathogen interactions*. *Infection and Immunity*, *68*, 2939-2947, **2000**.
- [37] U. Rohr, S. Weber, R. Michel, F. Selenka, M. Wilhelm, *Comparison of free-living amoebae in hot water systems of hospitals with isolates from moist sanitary areas by identifying genera and determining temperature tolerance*. *Applied and Environmental Microbiology*, *64*, 1822-1824, **1998**.

- [38] R. M. Atlas, *Legionella: from environmental habitats to disease pathology, detection and control*. Environmental Microbiology, 1, 283-293, **1999**.
- [39] B. S. Fields, E. B. Shotts Jr, J. C. Feeley, G. W. Gorman, W. T. Martin, *Proliferation of Legionella pneumophila as an intracellular parasite of the ciliated protozoan Tetrahymena pyriformis*. Applied and Environmental Microbiology, 47, 467, **1984**.
- [40] J. M. Barbaree, B. S. Fields, J. C. Feeley, G. W. Gorman, W. T. Martin, *Isolation of protozoa from water associated with a legionellosis outbreak and demonstration of intracellular multiplication of Legionella pneumophila*. Applied and Environmental Microbiology, 51, 422-424, **1986**.
- [41] J. D. Cirillo, S. L. Cirillo, L. Yan, L. E. Bermudez, S. Falkow, L. S. Tompkins, *Intracellular growth in Acanthamoeba castellanii affects monocyte entry mechanism and enhances virulence of Legionella pneumophila*. Infection and Immunity, 67, 4427-4434, **1999**.
- [42] L. A. Wiater, K. Dunn, F. R. Maxfield, H. A. Shuman, *Early events in phagosome establishment are required for intracellular survival of Legionella pneumophila*. Infection and Immunity, 66, 4450-4460, **1998**.
- [43] R. M. Wadowsky, R. B. Yee, L. Mezmar, E. J. Wing, J. N. Dowling, *Hot water systems as sources of Legionella pneumophila in hospital and non-hospital plumbing fixtures*. Applied and Environmental Microbiology, 43, 1104-1110, **1982**.
- [44] F. S. Rhame, A. Streifel, C. McComb, M. Boyle, *Bubbling humidifiers produce microaerosols which can carry bacteria*. Infection Control, 7, 403-407, **1986**.
- [45] S. Casati, L. Conza, J. Bruin, V. Gaia, *Compost facilities as a reservoir of Legionella pneumophila and other Legionella species*. Clinical Microbiology and Infection, 16, 945-947, **2010**.
- [46] R. F. Breiman, W. Cozen, B. S. Fields, T. D. Mastro, S. J. Carr, J. S. Spika, L. Mascola, *Role of air sampling in investigation of an outbreak of Legionnaires' disease associated with exposure to aerosols from an evaporative condenser*. Journal of Infectious Diseases, 161, 1257-1261, **1990**.

- [47] M. R. S. Ferré, C. Arias, J. M. Oliva, A. Pedrol, M. Garcia, T. Pellicer, P. Roura, A. Dominguez, *A community outbreak of Legionnaires' disease associated with a cooling tower in Vic and Gurb, Catalonia (Spain) in 2005*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 28, 153-159, **2009**.
- [48] M. Sabria, A. J. Alvarez, A. Dominguez, A. Pedrol, G. Sauca, L. Salleras, A. Lopez, M. A. Garcia-Nunez, I. Parron, M. P. Barrufet, *A community outbreak of Legionnaires' disease: evidence of a cooling tower as the source*. Clinical Microbiology and Infection, 12, 642-647, **2006**.
- [49] F. J. Mahoney, C. W. Hoge, T. A. Farley, J. M. Barbaree, R. F. Breiman, R. F. Benson, L. M. McFarland, *Communitywide outbreak of Legionnaires' disease associated with a grocery store mist machine*. Journal of Infectious Diseases, 165, 736-739, **1992**.
- [50] A. Wallensten, I. Oliver, K. Ricketts, G. Kafatos, J. M. Stuart, C. Joseph, *Windscreen wiper fluid without added screenwash in motor vehicles: a newly identified risk factor for Legionnaires' disease*. European Journal of Epidemiology, 25, 661-665, **2010**.
- [51] S. Baron: *Medical Microbiology*, Menlo Park **1986**.
- [52] F. G. Rodgers, *Ultrastructure of Legionella pneumophila*. Journal of Clinical Pathology, 32, 1195-1202, **1979**.
- [53] H. C. Boshuizen, S. E. Neppelenbroek, H. van Vliet, J. F. P. Schellekens, J. W. den Boer, M. F. Peeters, M. A. E. Conyn-Van-Spaendonck, *Subclinical Legionella infection in workers near the source of a large outbreak of Legionnaires' disease*. Journal of Infectious Diseases, 184, 515-518, **2001**.
- [54] A. L. Benin, R. F. Benson, K. E. Arnold, A. E. Fiore, P. G. Cook, L. K. Williams, B. Fields, R. E. Besser, *An outbreak of travel associated Legionnaires' disease and Pontiac fever: the need for enhanced surveillance of travel associated legionellosis in the United States*. Journal of Infectious Diseases, 185, 237-243, **2002**.
- [55] H. v. Baum, S. Ewig, R. Marre, N. Suttorp, S. Gonschior, T. Welte, C. Lück, *Community-acquired Legionella pneumonia: new insights from the German competence network for community acquired pneumonia*. Clinical Infectious Diseases, 46, 1356-1364, **2008**.

- [56] C. H. Heath, D. I. Grove, D. F. M. Looke, *Delay in appropriate therapy of Legionella pneumonia associated with increased mortality*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 15, 286-290, **1996**.
- [57] I. Kuzman, I. Soldo, S. Schonwald, J. Culig, *Azithromycin for treatment of community acquired pneumonia caused by Legionella pneumophila: a retrospective study*. Scandinavian Journal of Infectious Diseases, 27, 503-505, **1995**.
- [58] S. Ewig, P. Tuschy, G. Fätkenheuer, *Diagnosis and treatment of Legionella pneumonia*. Pneumologie, 56, 695-703, **2002**.
- [59] P. J. Packer, C. W. Mackerness, M. Riches, C. W. Keevil, *Comparison of selective agars for the isolation and identification of Klebsiella oxytoca and Escherichia coli from environmental drinking water samples*. Letters in Applied Microbiology, 20, 303-307, **1995**.
- [60] G. A. McFeters, S. C. Cameron, M. W. Lechevallier, *Influence of diluents, media, and membrane filters on detection of injured waterborne coliform bacteria*. Applied and Environmental Microbiology, 43, 97-103, **1982**.
- [61] A. K. Deisingh, M. Thompson, *Detection of infectious and toxigenic bacteria*. The Analyst, 127, 567-581, **2002**.
- [62] *Nachweis von Legionellen in Trinkwasser und Badebeckenwasser - Empfehlung des Umweltbundesamtes nach Anhörung der Trink- und Badewasserkommission des Umweltbundesamtes*. Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz, 43, 911-915, **2000**.
- [63] G. D. Fang, M. Fine, J. Orloff, D. Arisumi, V. L. Yu, W. Kapoor, J. T. Grayston, S. P. Wang, R. Kohler, R. R. Muder, Y. C. Yee, J. D. Rihs, R. M. Vickers, *New and emerging etiologies for community-acquired pneumonia with implications for therapy - a prospective multicenter study of 359 cases*. Medicine, 69, 307-316, **1990**.
- [64] J. Blanquer, R. Blanquer, R. Borrás, D. Nauffal, P. Morales, R. Menéndez, I. Subías, L. Herrero, J. Redón, J. Pascual, *Etiology of community acquired pneumonia in Valencia, Spain - a multicenter prospective study*. Thorax, 46, 508-511, **1991**.

- [65] J. H. Bates, G. D. Campbell, A. L. Barron, G. A. McCracken, P. N. Morgan, E. B. Moses, C. M. Davis, *Microbial etiology of acute pneumonia in hospitalized-patients*. *Chest*, 101, 1005-1012, **1992**.
- [66] R. T. Hayden, J. R. Uhl, X. Qian, M. K. Hopkins, M. C. Aubry, A. H. Limper, R. V. Lloyd, F. R. Cockerill, *Direct detection of Legionella species from bronchoalveolar lavage and open lung biopsy specimens: comparison of LightCycler PCR, in situ hybridization, direct fluorescence antigen detection, and culture*. *Journal of Clinical Microbiology*, 39, 2618-2626, **2001**.
- [67] D. S. J. Lindsay, W. H. Abraham, W. Findlay, P. Christie, F. Johnston, G. F. S. Edwards, *Laboratory diagnosis of Legionnaires' disease due to Legionella pneumophila serogroup 1: comparison of phenotypic and genotypic methods*. *Journal of Medical Microbiology*, 53, 183-187, **2004**.
- [68] J. H. Helbig, P. C. Lück, B. Kunz, A. Bubert, *Evaluation of the Duopath Legionella lateral flow assay for identification of Legionella pneumophila and Legionella species culture isolates*. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 4489-4491, **2006**.
- [69] E. Leoni, G. D. Luca, P. P. Legnani, R. Sacchetti, S. Stampi, F. Zanetti, *Legionella waterline colonization: detection of Legionella species in domestic, hotel and hospital hot water systems*. *Journal of Applied Microbiology*, 98, 373-379, **2005**.
- [70] J. W. DenBoer, E. P. F. Yzerman, J. Schellekens, K. D. Lettinga, H. C. Boshuizen, J. E. V. Steenbergen, A. Bosman, S. V. d. Hof, H. A. V. Vliet, M. F. Peeters, R. J. V. Ketel, P. Speelman, J. L. Kool, M. A. E. Conyn-Van-Spaendonck, *A large outbreak of Legionnaires' disease at a flower show, the Netherlands, 1999*. *Emerging Infectious Diseases*, 8, 37-43, **2002**.
- [71] F. Yu, D. F. Yao, W. Knoll, *Surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy studies of the interaction between an antibody and its surface-coupled antigen*. *Analytical Chemistry*, 75, 2610-2617, **2003**.
- [72] M. Nichkova, D. Dosev, S. J. Gee, B. D. Hammock, I. M. Kennedy, *Microarray immunoassay for phenoxybenzoic acid using polymer encapsulated Eu:Gd₂O₃ nanoparticles as fluorescent labels*. *Analytical Chemistry*, 77, 6864-6873, **2005**.

- [73] M. Seidel, R. Niessner, *Automated analytical microarrays: a critical review*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 1521-1544, **2008**.
- [74] T. Liebermann, W. Knoll, *Parallel multispot detection of target hybridization to surface-bound probe oligonucleotides of different base mismatch by surface-plasmon field-enhanced fluorescence microscopy*. Langmuir, 19, 1567-1572, **2003**.
- [75] D. Hu, H. Han, R. Zhou, F. Dong, W. Bei, F. Jia, H. Chen, *Gold(III) enhanced chemiluminescence immunoassay for detection of antibody against ApxIV of Actinobacillus pleuropneumoniae*. The Analyst, 133, 768-773, **2008**.
- [76] Z. Li, W. Li, Y. Cheng, L. Hao, *Chemiluminescent detection of DNA hybridization and single-nucleotide polymorphisms on a solid surface using target-primed rolling circle amplification*. The Analyst, 133, 1164-1168, **2008**.
- [77] K. A. Heyries, M. G. Loughran, D. Hoffmann, A. Homsy, L. J. Blum, C. A. Marquette, *Microfluidic biochip for chemiluminescent detection of allergen-specific antibodies*. Biosensors and Bioelectronics, 23, 1812-1818, **2008**.
- [78] A. M. Garcia-Campana, F. J. Lara, *Trends in the analytical applications of chemiluminescence in the liquid phase*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 387, 165-169, **2007**.
- [79] C. A. Marquette, L. J. Blum, *Applications of the luminol chemiluminescent reaction in analytical chemistry*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 385, 546-554, **2006**.
- [80] C. Ercole, M. D. Gallo, M. Pantalone, S. Santucci, L. Mosiello, C. Laconi, A. Lepidi, *A biosensor for Escherichia coli based on a potentiometric alternation biosensing (PAB) transducer*. Sensors and Actuators B - Chemical, 83, 48-52, **2002**.
- [81] P. Silley, S. Forsythe, *Impedance microbiology: a rapid change for microbiologists*. Journal of Applied Bacteriology, 80, 233-243, **1996**.
- [82] M. Pohanka, P. Skladal, *Electrochemical biosensors - principles and applications*. Journal of Applied Biomedicine, 6, 57-64, **2008**.
- [83] C. E. H. Berger, T. A. M. Beumer, R. P. H. Kooyman, J. Greve, *Surface plasmon resonance multisensing*. Analytical Chemistry, 70, 703-706, **1998**.

- [84] G. Gauglitz, *Direct optical sensors: principles and selected applications*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 381, 141-155, **2005**.
- [85] P. I. Nikitin, B. G. Gorshkov, E. P. Nikitin, T. I. Ksenevich, *Picoscope, a new label-free biosensor*. Sensors and Actuators B - Chemical, 111, 500-504, **2005**.
- [86] T. Gao, L. J. Rothberg, *Label-free sensing of binding to microarrays using Brewster angle straddle interferometry*. Analytical Chemistry, 79, 7589-7595, **2007**.
- [87] S. Venkatasubbarao, N. Beaudry, Y. M. Zhao, R. Chipman, *Evanescent imaging ellipsometry based microarray reader*. Journal of Biomedical Optics, 11, **2006**.
- [88] *Cell Lab Quanta(TM) - Instructions for Use*. Beckman Coulter Company, **2005**.
- [89] H. M. Davey, D. B. Kell, *Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses*. Microbiological Reviews, 60, 641-696, **1996**.
- [90] N. Yamaguchi, M. Sasada, M. Yamanaka, M. Nasu, *Rapid detection of respiring Escherichia coli O157:H7 in apple juice, milk, and ground beef by flow cytometry*. Cytometry Part A, 54A, 27-35, **2003**.
- [91] A. S. Waggoner, L. A. Ernst, C. H. Chen, D. J. Rechtenwald, *PE-CY5 - a new fluorescent antibody label for 3 color flow cytometry with a single laser*. Annals of the New York Academy of Sciences, 677, 185-193, **1993**.
- [92] S. M. Stocks, *Mechanism and use of the commercially available viability stain, BacLight*. Cytometry Part A, 61A, 189-195, **2004**.
- [93] K. Ben-Amor, H. Heilig, H. Smidt, E. E. Vaughan, T. Abee, W. M. de Vos, *Genetic diversity of viable, injured, and dead fecal bacteria assessed by fluorescence-activated cell sorting and 16S rRNA gene analysis*. Applied and Environmental Microbiology, 71, 4679-4689, **2005**.
- [94] M. Berney, F. Hammes, F. Bosshard, H.-U. Weilenmann, T. Egli, *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**.

- [95] M. Ingram, T. J. Cleary, B. J. Price, R. L. Price, A. Castro, *Rapid detection of Legionella pneumophila by flow cytometry*. Cytometry, 3, 134-137, **1982**.
- [96] M. S. Giao, S. A. Wilks, N. F. Azevedo, M. J. Vieira, C. W. Keevil, *Validation of SYTO 9/propidium iodide uptake for rapid detection of viable but noncultivable Legionella pneumophila*. Microbial Ecology, 58, 56-62, **2009**.
- [97] R. L. Tyndall, R. E. Hand, R. C. Mann, C. Evans, R. Jernigan, *Application of flow cytometry to detection and characterization of Legionella spp.* Applied and Environmental Microbiology, 49, 852-857, **1985**.
- [98] H. Aurell, P. Catala, P. Farge, F. Wallet, M. Le Brun, J. H. Helbig, S. Jarraud, P. Lebaron, *Rapid detection and enumeration of Legionella pneumophila in hot water systems by solid-phase cytometry*. Applied and Environmental Microbiology, 70, 1651-1657, **2004**.
- [99] H. P. Föchlin, S. Kötzsch, H.-A. Keserue, T. Egli, *Rapid and quantitative detection of Legionella pneumophila applying immunomagnetic separation and flow cytometry*. Cytometry Part A, 77A, 264-274, **2010**.
- [100] *Detection and quantification of Legionella and/or Legionella pneumophila by concentration and gene amplification by polymerase chain reaction (PCR)*. AFNOR Norme XP T 90-471, **2006**.
- [101] A. Haroon, M. Koide, F. Higa, M. Tateyama, J. Fujita, *Identification of Legionella pneumophila serogroups and other species by mip gene sequencing*. Journal of Chemotherapy, 18, 276-281, **2012**.
- [102] N.-T. Chen, C.-W. Chang, *Rapid quantification of viable legionellae in water and biofilm using ethidium monoazide coupled with real-time quantitative PCR*. Journal of Applied Microbiology, 109, 623-634, **2010**.
- [103] M. A. Yanez, A. Nocker, E. Soria-Soria, R. Murtula, L. Martinez, V. Catalan, *Quantification of viable Legionella pneumophila cells using propidium monoazide combined with quantitative PCR*. Journal of Microbiological Methods, 85, 124-130, **2011**.

- [104] S.-W. Huang, B.-M. Hsu, C.-C. Huang, J.-S. Chen, *Utilization of polymerase chain reaction and selective media cultivation to identify Legionella in Taiwan spring water samples*. Environmental Monitoring and Assessment, 174, 427-437, **2011**.
- [105] H. Miyamoto, H. Yamamoto, K. Arima, J. Fujii, K. Maruta, K. Izu, T. Shiomori, S. Yoshida, *Development of a new seminested PCR method for detection of Legionella species and its application to surveillance of legionellae in hospital cooling tower water*. Applied and Environmental Microbiology, 63, 2489-2494, **1997**.
- [106] G. Zhou, S. Wen, Y. Liu, R. Li, X. Zhong, L. Feng, L. Wang, B. Cao, *Development of a DNA microarray for detection and identification of Legionella pneumophila and ten other pathogens in drinking water*. International Journal of Food Microbiology, 145, 293-300, **2011**.
- [107] B. Elsholz, R. Wörl, L. Blohm, J. Albers, H. Feucht, T. Grunwald, B. Jürgen, T. Schweder, R. Hintsche, *Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays*. Analytical Chemistry, 78, 4794-4802, **2006**.
- [108] K. E. Templeton, S. A. Scheltinga, P. Sillekens, J. W. Crielaard, A. P. v. Dam, H. Goossens, E. C. J. Claas, *Development and clinical evaluation of an internally controlled, single-tube multiplexed real-time PCR assay for detection of Legionella pneumophila and other Legionella species*. Journal of Clinical Microbiology, 41, 4016-4021, **2003**.
- [109] M. A. Yanez, C. Carrasco-Serrano, V. M. Barbera, V. Catalan, *Quantitative detection of Legionella pneumophila in water samples by immunomagnetic purification and real-time PCR amplification of the dotA gene*. Applied and Environmental Microbiology, 71, 3433-3441, **2005**.
- [110] A. C. Bumbaugh, E. A. McGraw, K. L. Page, R. K. Selander, T. S. Whittam, *Sequence polymorphism of dotA and mip alleles mediating invasion and intracellular replication of Legionella pneumophila*. Current Microbiology, 44, 314-322, **2002**.
- [111] P. Delgado-Viscogliosi, L. Solognac, J.-M. Delattre, *Viability-PCR, a culture independent method for rapid and selective quantification of viable Legionella pneumophila cells in environmental water samples*. Applied and Environmental Microbiology, 75, 3502-3512, **2009**.

- [112] D. R. Murdoch, E. J. Walford, L. C. Jennings, G. J. Light, M. I. Schousboe, A. Y. Cheresky, S. T. Chambers, G. I. Town, *Use of the polymerase chain reaction to detect Legionella DNA in urine and serum samples from patients with pneumonia*. Clinical Infectious Diseases, 23, 475-480, **1996**.
- [113] J. A. Ramirez, S. Ahkee, A. Tolentino, R. D. Miller, J. T. Summersgill, *Diagnosis of Legionella pneumophila, Mycoplasma pneumoniae, or Chlamydia pneumoniae lower respiratory infection using the polymerase chain reaction on a single throat swab specimen*. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, 24, 7-14, **1996**.
- [114] M. Maiwald, M. Schill, C. Stockinger, J. H. Helbig, P. C. Lück, W. Witzleb, H. G. Sonntag, *Detection of Legionella DNA in human and guinea pig urine samples by the polymerase chain reaction*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 14, 25-33, **1995**.
- [115] P. Matsiota-Bernard, E. Pitsouni, N. Legakis, C. Nauciel, *Evaluation of commercial amplification kit for detection of Legionella pneumophila in clinical specimens*. Journal of Clinical Microbiology, 32, 1503-1505, **1994**.
- [116] M. Koide, A. Saito, *Diagnosis of Legionella pneumophila infection by polymerase chain reaction*. Clinical Infectious Diseases, 21, 199-201, **1995**.
- [117] J. L. Cloud, K. C. Carroll, P. Pixton, M. Erali, D. R. Hillyard, *Detection of Legionella species in respiratory specimens using PCR with sequencing confirmation*. Journal of Clinical Microbiology, 38, 1709-1712, **2000**.
- [118] K. Rantakokko-Jalava, J. Jalava, *Development of conventional and real-time PCR assays for detection of Legionella DNA in respiratory specimens*. Journal of Clinical Microbiology, 39, 2904-2910, **2001**.
- [119] I. A. Darwish, *Immunoassay methods and their applications in pharmaceutical analysis: basic methodology and recent advances*. International Journal of Biomedical Science, 2, 217-135, **2006**.
- [120] B. Sathapatayavongs, R. B. Kohler, L. J. Wheat, A. White, *Rapid diagnosis of Legionnaires' disease by urinary antigen detection: comparison of ELISA and radioimmunoassay*. The American Journal of Medicine, 72, 576-582, **1982**.

- [121] R. J. Birtles, T. G. Harrison, D. Samuel, A. G. Taylor, *Evaluation of urinary antigen ELISA for diagnosing Legionella pneumophila serogroup 1 infection*. Journal of Clinical Pathology, 43, 685-690, **1990**.
- [122] J. A. Dominguez, N. Gali, P. Pedroso, A. Fargas, E. Padilla, J. M. Manterola, L. Matas, *Comparison of the Binax Legionella urinary antigen enzyme immunoassay (EIA) with the Biotest Legionella urin antigen EIA for detection of Legionella antigen in both concentrated and nonconcentrated urine samples*. Journal of Clinical Microbiology, 36, 2718-2722, **1998**.
- [123] R. B. Kohler, W. C. Winn, L. J. Wheat, *Onset and duration of urinary antigen excretion in Legionnaires disease*. Journal of Clinical Microbiology, 20, 605-607, **1984**.
- [124] J. A. Dominguez, J. M. Manterola, R. Blavia, N. Sopena, F. J. Belda, E. Padilla, M. Gimenez, M. Sabria, J. Morera, V. Ausina, *Detection of Legionella pneumophila serogroup 1 antigen in nonconcentrated urine and urine concentrated by selective ultrafiltration*. Journal of Clinical Microbiology, 34, 2334-2336, **1996**.
- [125] W. L. Thacker, B. B. Plikaytis, H. W. Wilkinson, *Identification of 22 Legionella species and 33 serogroups with the slide agglutination test*. Journal of Clinical Microbiology, 21, 779-782, **1985**.
- [126] J. H. Helbig, B. Ludwig, P. C. Lück, A. Groh, W. Witzleb, J. Hacker, *Monoclonal antibodies to Legionella mip proteins recognize genus- and species-specific epitopes*. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 2, 160-165, **1995**.
- [127] J. S. Sampson, B. B. Plikaytis, C. H. Aloisio, G. M. Carlone, C. P. Pau, A. R. Stinson, *Immunologic characterization and specificity of three monoclonal antibodies against the 58-kiloDalton protein of Legionella pneumophila*. Journal of Clinical Microbiology, 29, 836-841, **1991**.
- [128] J. H. Helbig, J. B. Kurtz, M. C. Pastoris, C. Pelaz, P. C. Lück, *Antigenic lipopolysaccharide components of Legionella pneumophila recognized by monoclonal antibodies: possibilities and limitations for division of the species into serogroups*. Journal of Clinical Microbiology, 35, 2841-2845, **1997**.

- [129] N. Bornstein, D. Marmet, M. H. Dumaine, M. Surgot, J. Fleurette, *Detection of flagella in 278 Legionella strains by latex reagent sensitized with anti-flagellum immunoglobulins*. Journal of Clinical Microbiology, 29, 953-956, **1991**.
- [130] D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, *Electrochemical biosensors: recommended definitions and classification*. Analytical Letters, 34, 635-659, **2001**.
- [131] D. Ivnitski, I. Abdel-Hamid, P. Atanasov, E. Wilkins, *Biosensors for detection of pathogenic bacteria*. Biosensors and Bioelectronics, 14, 599-624, **1999**.
- [132] E. Howe, G. Harding, *A comparison of protocols for the optimization of detection of bacteria using a surface acoustic wave (SAW) biosensor*. Biosensors and Bioelectronics, 15, 641-649, **2000**.
- [133] M. Knauer, N. P. Ivleva, X. Liu, R. Niessner, C. Haisch, *Surface-enhanced Raman scattering-based label-free microarray readout for the detection of microorganisms*. Analytical Chemistry, 82, 2766-2772, **2010**.
- [134] R. L. Ristagno, L. D. Saravolatz, *A pseudoepidemic of Legionella infections*. Chest, 88, 466-467, **1985**.
- [135] J. J. Zuravleff, V. L. Yu, J. W. Shonnard, B. K. Davis, J. D. Rihs, *Diagnosis of Legionnaires disease - an update of laboratory methods with new emphasis on isolation by culture*. JAMA - Journal of the American Medical Association, 250, 1981-1985, **1983**.
- [136] H. Yang, J. Irudayaraj, *Rapid detection of foodborne microorganisms on food surface using Fourier transform Raman spectroscopy*. Journal of Molecular Structure, 646, 35-43, **2003**.
- [137] D. Naumann, V. Fijala, H. Labischinski, P. Giesbrecht, *The rapid differentiation and identification of pathogenic bacteria using Fourier transform infrared spectroscopic and multivariate statistical analysis*. Journal of Molecular Structure, 174, 165-170, **1988**.
- [138] S. Chadha, W. H. Nelson, J. F. Sperry, *Ultraviolet microRaman spectrograph for the detection of small numbers of bacterial cells*. Review of Scientific Instruments, 64, 3088-3093, **1993**.

- [139] A. Carducci, M. Verani, R. Battistini, *Legionella in industrial cooling towers: monitoring and control strategies*. Letters in Applied Microbiology, 50, 24-29, **2010**.
- [140] J. M. Blatny, B. A. P. Reif, G. Skogan, O. Andreassen, E. A. Hoiby, E. Ask, V. Waagen, D. Aanonsen, I. S. Aaberge, D. A. Caugant, *Tracking airborne Legionella and Legionella pneumophila at a biological treatment plant*. Environmental Science & Technology, 42, 7360-7367, **2008**.
- [141] G. Yang, R. Benson, T. Pelish, E. Brown, J. M. Winchell, B. Fields, *Dual detection of Legionella pneumophila and Legionella species by real-time PCR targeting the 23S-5S rRNA gene spacer region*. Clinical Microbiology and Infection, 16, 266-261, **2010**.
- [142] V. Langer, G. Hartmann, R. Niessner, M. Seidel, *Rapid quantification of bioaerosols containing L. pneumophila by Coriolis[®] μ air sampler and chemiluminescence antibody microarrays*. Journal of Aerosol Science, 48, 46-55, **2012**.
- [143] H. Y. Buse, M. E. Schoen, N. J. Ashbolt, *Legionellae in engineered systems and use of quantitative microbial risk assessment to predict exposure*. Water Research, 46, 921-933, **2012**.
- [144] C. S. Li, T. Y. Huang, *Fluorochrome in monitoring indoor bioaerosols*. Aerosol Science and Technology, 40, 237-241, **2006**.
- [145] D. A. Hall, J. Ptacek, M. Snyder, *Protein microarray technology*. Mechanisms of Ageing and Development, 128, 161-167, **2007**.
- [146] S. Rodriguez-Mozaz, M. J. Lopez de Alda, D. Barcelo, *Biosensors as useful tools for environmental analysis and monitoring*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 386, 1025-1041, **2006**.
- [147] R. P. Ekins, *Ligand assays: from electrophoresis to miniaturized microarrays*. Clinical Chemistry, 44, 2015-2030, **1998**.
- [148] Y. F. Feng, X. Ke, R. S. Ma, P. Chen, G. G. Hu, F. Z. Liu, *Parallel detection of autoantibodies with microarrays in rheumatoid diseases*. Clinical Chemistry, 50, 416-422, **2004**.

- [149] V. I. Rich, K. Konstantinidis, E. F. DeLong, *Design and testing of 'genome-proxy' microarrays to profile marine microbial communities*. Environmental Microbiology, *10*, 506-521, **2008**.
- [150] A. J. Schuetz, M. Winklmeier, M. G. Weller, R. Niessner, *Selection of hapten structures for indirect immunosensor arrays*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, *363*, 625-631, **1999**.
- [151] E. Belleville, M. Dufva, J. Aamand, L. Bruun, C. B. V. Christensen, *Quantitative assessment of factors affecting the sensitivity of a competitive immunomicroarray for pesticide detection*. BioTechniques, *35*, 1044-1051, **2003**.
- [152] B. G. Knecht, A. Strasser, R. Dietrich, E. Märklbauer, R. Niessner, M. G. Weller, *Automated microarray system for the simultaneous detection of antibiotics in milk*. Analytical Chemistry, *76*, 646-654, **2004**.
- [153] M. Z. Zheng, J. L. Richard, J. Binder, *A review of rapid methods for the analysis of mycotoxins*. Mycopathologia, *161*, 261-273, **2006**.
- [154] B. B. Haab, M. J. Dunham, P. O. Brown, *Protein microarrays for highly parallel detection and quantitation of specific proteins and antibodies in complex solutions*. Genome Biology, *2*, 1-13, **2001**.
- [155] G. MacBeath, S. L. Schreiber, *Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination*. Science, *289*, 1760-1763, **2000**.
- [156] S. G. Bavykin, J. P. Akowski, V. M. Zakhariyev, V. E. Barsky, A. N. Perov, A. D. Mirzabekov, *Portable system for microbial sample preparation and oligonucleotide microarray analysis*. Applied and Environmental Microbiology, *67*, 922-928, **2001**.
- [157] D. M. Dankbar, E. D. Dawson, M. Mehlmann, C. L. Moore, J. A. Smagala, M. W. Shaw, N. J. Cox, R. D. Kuchta, K. L. Rowlen, *Diagnostic microarray for influenza B viruses*. Analytical Chemistry, *79*, 2084-2090, **2007**.
- [158] S. C. Donhauser, R. Niessner, M. Seidel, *Quantification of E. coli DNA on a flow-through chemiluminescence microarray readout system after PCR amplification*. Analytical Sciences, *25*, 669-674, **2009**.

- [159] G. J. Vora, C. E. Meador, D. A. Stenger, J. D. Andreades, *Nucleic acid amplification strategies for DNA microarray-based pathogen detection*. Applied and Environmental Microbiology, 70, 3047-3054, **2004**.
- [160] M. Seidel, G. Gauglitz, *Miniaturization and parallelization of fluorescence immunoassays in nanotiter plates*. Trends in Analytical Chemistry, 22, 385-394, **2003**.
- [161] L. J. Holt, K. Bussow, G. Walter, I. M. Tomlinson, *By-passing selection: direct screening for antibody-antigen interactions using protein arrays*. Nucleic Acids Research, 28, E72, **2000**.
- [162] H. Zhu, M. Snyder, *Protein chip technology*. Current Opinion in Chemical Biology, 7, 55-63, **2003**.
- [163] S. L. Seurynck-Servoss, C. L. Baird, K. D. Rodland, R. C. Zangar, *Surface chemistries for antibody microarrays*. Frontiers in Bioscience, 12, 3956-3964, **2007**.
- [164] F. Diehl, S. Grahlmann, M. Beier, J. D. Hoheisel, *Manufacturing DNA microarrays of high spot homogeneity and reduced background signal*. Nucleic Acids Research, 29, **2001**.
- [165] P. Angenendt, *Progress in protein and antibody microarray technology*. Drug Discovery Today, 10, 503-511, **2005**.
- [166] S. Ferretti, S. Paynter, D. A. Russell, K. E. Sapsford, D. J. Richardson, *Self-assembled monolayers: a versatile tool for the formulation of bio-surfaces*. TrAC - Trends in Analytical Chemistry, 19, 530-540, **2000**.
- [167] T. M. Herne, M. J. Tarlov, *Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces*. Journal of the American Chemical Society, 119, 8916-8920, **1997**.
- [168] E. A. Smith, M. J. Wanat, Y. Cheng, S. V. P. Barreira, A. G. Frutos, R. M. Corn, *Formation, spectroscopic characterization, and application of sulfhydryl-terminated alkanethiol monolayers for the chemical attachment of DNA onto gold surfaces*. Langmuir, 17, 2502-2507, **2001**.
- [169] J. M. Brockman, A. G. Frutos, R. M. Corn, *A multistep chemical modification procedure to create DNA arrays on gold surfaces for the study of protein-DNA*

- interactions with surface plasmon resonance imaging*. Journal of the American Chemical Society, *121*, 8044-8051, **1999**.
- [170] D. M. Dankbar, G. Gauglitz, *A study on photolinkers used for biomolecule attachment to polymer surfaces*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, *386*, 1967-1974, **2006**.
- [171] Y. Ito, *Photoimmobilization for microarrays*. Biotechnology Progress, *22*, 924-932, **2006**.
- [172] N. Barie, M. Rapp, H. Sigrist, H. J. Ache, *Covalent photolinker-mediated immobilization of an intermediate dextran layer to polymer-coated surfaces for biosensing applications*. Biosensors and Bioelectronics, *13*, 855-860, **1998**.
- [173] T. Matsuda, T. Sugawara, *Photochemical protein fixation on polymer surfaces via derivatized phenyl azido group*. Langmuir, *11*, 2272-2276, **1995**.
- [174] C. S. Lee, B. G. Kim, *Improvement of protein stability in protein microarrays*. Biotechnology Letters, *24*, 839-844, **2002**.
- [175] A. Jung, I. Stemmler, A. Brecht, G. Gauglitz, *Covalent strategy for immobilization of DNA-microspots suitable for microarrays with label-free and time-resolved optical detection of hybridization*. Fresenius Journal of Analytical Chemistry, *371*, 128-136, **2001**.
- [176] J. F. Masson, T. M. Battaglia, M. J. Davidson, Y. C. Kim, A. M. C. Prakash, S. Beaudoin, K. S. Booksh, *Biocompatible polymers for antibody support on gold surfaces*. Talanta, *67*, 918-925, **2005**.
- [177] J. Piehler, A. Brecht, R. Valiokas, B. Liedberg, G. Gauglitz, *A high-density poly(ethylene glycol) polymer brush for immobilization on glass-type surfaces*. Biosensors and Bioelectronics, *15*, 473-481, **2000**.
- [178] M. Cretich, G. Pirri, F. Damin, I. Solinas, M. Chiari, *A new polymeric coating for protein microarrays*. Analytical Biochemistry, *332*, 67-74, **2004**.
- [179] E. R. Goldman, T. J. O'Shaughnessy, C. M. Soto, C. H. Patterson, C. R. Taitt, M. S. Spector, P. T. Charles, *Detection of proteins cross-linked within galactoside polyacrylate-based hydrogels by means of a quantum dot fluororeagent*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, *380*, 880-886, **2004**.

- [180] S. Pathak, A. K. Singh, J. R. McElhanon, P. M. Dentinger, *Dendrimer-activated surfaces for high density and high activity protein chip applications*. *Langmuir*, 20, 6075-6079, **2004**.
- [181] B. J. Hong, S. J. Oh, T. O. Youn, S. H. Kwon, J. W. Park, *Nanoscale-controlled spacing provides DNA microarrays with the SNP discrimination efficiency in solution phase*. *Langmuir*, 21, 4257-4261, **2005**.
- [182] I. Barbulovic-Nad, M. Lucente, Y. Sun, M. Zhang, A. R. Wheeler, M. Bussmann, *Bio-microarray fabrication techniques - a review*. *Critical Reviews in Biotechnology*, 26, 237-259, **2006**.
- [183] R. Puchades, A. Maquieira, *Recent developments in flow injection immunoanalysis*. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 26, 195-218, **1996**.
- [184] R. M. Ford, B. R. Phillips, J. A. Quinn, D. A. Lauffenburger, *Measurement of bacterial random motility and chemotaxis coefficients: I. stopped-flow diffusion chamber assay*. *Biotechnology and Bioengineering*, 37, 647-660, **1991**.
- [185] M. Stenberg, M. Werthen, S. Theander, H. Nygren, *A diffusion limited reaction theory for a microtiter plate assay*. *Journal of Immunological Methods*, 112, 23-29, **1988**.
- [186] M. J. Eddowes, *Direct immunochemical sensing - basic chemical principles and fundamental limitations*. *Biosensors*, 3, 1-15, **1987**.
- [187] E. Fu, K. E. Nelson, S. A. Ramsey, J. O. Foley, K. Helton, P. Yager, *Modeling of a competitive microfluidic heterogeneous immunoassay: sensitivity of the assay response to varying system parameters*. *Analytical Chemistry*, 81, 3407-3413, **2009**.
- [188] J. Klein, *Immunologie*. VCH Verlagsgesellschaft, **1991**.
- [189] R. M. Murphy, M. L. Yarmush, C. K. Colton, *Determining molecular weight distributions of antigen-antibody complexes by quasi-electric light scattering*. *Biopolymers*, 31, 1289-1295, **1991**.
- [190] R. W. Glaser, *Antigen-antibody binding and mass-transport by convection and diffusion to a surface - a 2-dimensional computer-model of binding and dissociation kinetics*. *Analytical Biochemistry*, 213, 152-161, **1993**.

- [191] K. Sigmundsson, G. Masson, R. H. Rice, N. Beauchemin, B. Obrink, *Determination of active concentrations and association and dissociation rate constants of interacting biomolecules: an analytical solution to the theory for kinetic and mass transport limitations in biosensor technology and its experimental verification*. *Biochemistry*, 41, 8263-8276, **2002**.
- [192] T. Y. Morozova, V. N. Morozov, *Force differentiation in recognition of cross-reactive antigens by magnetic beads*. *Analytical Biochemistry*, 374, 263-271, **2008**.
- [193] U. Schürch, H. Kramer, A. Einsele, F. Widmer, H. M. Eppenberger, *Experimental evaluation of laminar shear stress on the behaviour of hybridoma mass cell cultures, producing monoclonal antibodies against mitochondrial creatine kinase*. *Journal of Biotechnology*, 7, 179-184, **1988**.
- [194] B. X. Li, J. Chen, M. Long, *Quantifying cell binding kinetics mediated by surface-bound blood type B antigen to immobilized antibodies*. *Chinese Science Bulletin*, 53, 3634-3641, **2008**.
- [195] M. Andersson, K. Elihn, K. Fromell, K. D. Caldwell, *Surface attachment of nanoparticles using oligonucleotides*. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 34, 165-171, **2004**.
- [196] M. Bally, R. Dhumpa, J. Voros, *Particle flow assays for fluorescent protein microarray applications*. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 1195-1200, **2009**.
- [197] S. Rotem, N. Raz, Y. Kashi, A. Mor, *Bacterial capture by peptide-mimetic oligoacyllysine surfaces*. *Applied and Environmental Microbiology*, 76, 3301-3307, **2010**.
- [198] D. S. Zarlenga, J. M. Trout, *Concentrating, purifying and detecting waterborne parasites*. *Veterinary Parasitology*, 126, 195-217, **2004**.
- [199] K. A. Stevens, L.-A. Jaykus, *Bacterial separation and concentration from complex sample matrices: a review*. *Critical Reviews in Microbiology*, 30, 7-24, **2004**.
- [200] C. A. Boulanger, P. H. Edelstein, *Precision and accuracy of recovery of Legionella pneumophila from seeded tap water by filtration and centrifugation*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1805-1809, **1995**.

- [201] T. N. Whitmore, E. G. Carrington, *Comparison of methods for recovery of Cryptosporidium from water*. Water Science and Technology, 27, 69-76, **1993**.
- [202] J. A. Higgins, J. M. Trout, R. Fayer, D. Shelton, M. C. Jenkins, *Recovery and detection of Cryptosporidium parvum oocysts from water samples using continuous flow centrifugation*. Water Research, 37, 3551-3560, **2003**.
- [203] R. H. Harris, R. Mitchell, *Role of polymers in microbial aggregation*. Annual Review of Microbiology, 27, 27-50, **1973**.
- [204] A. L. Buttice, J. M. Stroot, D. V. Lim, P. G. Stroot, N. A. Alcantar, *Removal of sediment and bacteria from water using green chemistry*. Environmental Science & Technology, 44, 3514-3519, **2010**.
- [205] T. Peters, M. Kraume, *Developments and perspectives of pressure driven membrane processes*. Chemie Ingenieur Technik, 77, 473-485, **2005**.
- [206] C. E. Musial, M. J. Arrowood, C. R. Sterling, C. P. Gerba, *Detection of Cryptosporidium in water by using polypropylene cartridge filters*. Applied and Environmental Microbiology, 53, 687-692, **1987**.
- [207] J. E. Ongerth, H. H. Stibbs, *Identification of Cryptosporidium oocysts in river water*. Applied and Environmental Microbiology, 53, 672-676, **1987**.
- [208] H. A. Morales-Morales, G. Vidal, J. Olszewski, C. M. Rock, D. Dasgupta, K. H. Oshima, G. B. Smith, *Optimization of a reusable hollow-fiber ultrafilter for simultaneous concentration of enteric bacteria, protozoa, and viruses from water*. Applied and Environmental Microbiology, 69, 4098-4102, **2003**.
- [209] C. Peskoller, R. Niessner, M. Seidel, *Cross-flow microfiltration system for rapid enrichment of bacteria in water*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 393, 399-404, **2009**.
- [210] S. Ripperger, J. Altmann, *Crossflow microfiltration - state of the art*. Separation and Purification Technology, 26, 19-31, **2002**.
- [211] O. D. Simmons, M. D. Sobsey, C. D. Heaney, F. W. Schaefer, D. S. Francy, *Concentration and detection of Cryptosporidium oocysts in surface water samples by*

- method 1622 using ultrafiltration and capsule filtration*. Applied and Environmental Microbiology, 67, 1123-1127, **2001**.
- [212] L. J. Winona, A. W. Ommani, J. Olszewski, J. B. Nuzzo, K. H. Oshima, *Efficient and predictable recovery of viruses from water by small scale ultrafiltration systems*. Canadian Journal of Microbiology, 47, 1033-1041, **2001**.
- [213] S. M. Paffard, R. J. Miles, C. R. Clark, R. G. Price, *A rapid and sensitive enzyme linked immunofilter assay (ELIFA) for whole bacterial cells*. Journal of Immunological Methods, 192, 133-136, **1996**.
- [214] R. Grunow, P. Miethe, W. Conlan, E. J. Finke, S. Friedewald, M. Porsch-Ozcurumez, *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**.
- [215] P. J. Glantz, T. Arnebrant, T. Nylander, R. E. Baier, *Bioadhesion - a phenomenon with multiple dimensions*. Acta Odontologica Scandinavica, 57, 238-241, **1999**.
- [216] M. J. Payne, R. G. Kroll, *Methods for the separation and concentration of bacteria from foods*. Trends in Food Science and Technology, 2, 315-319, **1991**.
- [217] J. F. Kennedy, S. A. Barker, J. D. Humphreys, *Microbial cells living immobilised on metal hydroxides*. Nature, 261, 242-244, **1976**.
- [218] D. R. Absolom, *Affinity chromatography*. Separation and Purification Methods, 10, 239-286, **1981**.
- [219] R. R. Walters, *Affinity chromatography*. Analytical Chemistry, 57, 1099-1114, **1985**.
- [220] J. D. Brewster, *Isolation and concentration of Salmonella with an immunoaffinity column*. Journal of Microbiological Methods, 55, 287-293, **2003**.
- [221] S. K. Sharma, P. P. Mahendroo, *Affinity chromatography of cells and cell membranes*. Journal of Chromatography, 184, 471-499, **1980**.
- [222] K. Wang, M. K. Marshall, G. Garza, D. Pappas, *Open-tubular capillary cell affinity chromatography: single and tandem blood cell separation*. Analytical Chemistry, 80, 2118-2124, **2008**.

- [223] S. Ott, R. Niessner, M. Seidel, *Preparation of epoxy-based macroporous monolithic columns for the fast and efficient immunofiltration of Staphylococcus aureus*. Journal of Separation Science, *34*, 2181-2192, **2011**.
- [224] A. Jungbauer, *Chromatographic media for bioseparation*. Journal of Chromatography A, *1065*, 3-12, **2005**.
- [225] K. Branovic, D. Forcic, R. Mazuran, *Application of short monolithic columns for improved detection of viruses*. Journal of Virological Methods, *110*, 163-171, **2003**.
- [226] M. B. Dainiak, F. M. Plieva, I. Y. Galaev, R. Hatti-Kaul, B. Mattiasson, *Cell chromatography: separation of different microbial cells using IMAC supermacroporous monolithic columns*. Biotechnology Progress, *21*, 644-649, **2005**.
- [227] P. Arvidsson, F. M. Plieva, I. N. Savina, V. I. Lozinsky, S. Fexby, L. Bulow, I. Y. Galaev, B. Mattiasson, *Chromatography of microbial cells using continuous supermacroporous affinity and ion-exchange columns*. Journal of Chromatography A, *977*, 27-38, **2002**.
- [228] H. W. Gu, P. L. Ho, K. W. T. Tsang, C. W. Yu, B. Xu, *Using biofunctional magnetic nanoparticles to capture Gram-negative bacteria at an ultra-low concentration*. Chemical Communications, 1966-1967, **2003**.
- [229] M. B. Dainiak, I. Y. Galaev, B. Mattiasson, *Affinity cryogel monoliths for screening for optimal separation conditions and chromatographic separation of cells*. Journal of Chromatography A, *1123*, 145-150, **2006**.
- [230] C. Peskoller, R. Niessner, M. Seidel, *Development of an epoxy-based monolith used for the affinity capturing of Escherichia coli bacteria*. Journal of Chromatography A, *1216*, 3794-3801, **2009**.
- [231] I. Safarik, M. Safarikova, *Use of magnetic techniques for the isolation of cells*. Journal of Chromatography B, *722*, 33-53, **1999**.
- [232] E. Boschke, J. Steingroewer, T. Bley, *Application of biomagnetic separation to the microbiological quality control of foods*. Chemie Ingenieur Technik, *77*, 912-919, **2005**.

- [233] R. N. Bushon, A. M. Brady, C. A. Likirdopulos, J. V. Cireddu, *Rapid detection of Escherichia coli and enterococci in recreational water using an immunomagnetic separation/adenosine triphosphate technique*. Journal of Applied Microbiology, 106, 432-441, **2009**.
- [234] K. Hibi, H. Ushio, H. Fukada, K. Mitsubayashi, T. Hayashi, H. Ren, H. Endo, *Immunomagnetic separation using carbonyl iron powder and flow cytometry for rapid detection of Flavobacterium psychrophilum*. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 391, 1147-1152, **2008**.
- [235] R. Hoffman, D. Wolk, S. Spencer, M. Borchardt, *Development of a method for the detection of waterborne microsporidia*. Journal of Microbiological Methods, 70, 312-318, **2007**.
- [236] E. Kuczynska, D. G. Boyer, D. R. Shelton, *Comparison of immunofluorescence assay and immunomagnetic electrochemiluminescence in detection of Cryptosporidium parvum oocysts in karst water samples*. Journal of Microbiological Methods, 53, 17-26, **2003**.
- [237] P. A. Rochelle, R. DeLeon, A. Johnson, M. H. Stewart, R. L. Wolfe, *Evaluation of immunomagnetic separation for recovery of infectious Cryptosporidium parvum oocysts from environmental samples*. Applied and Environmental Microbiology, 65, 841-845, **1999**.
- [238] J. Y. Lee, R. A. Deininger, *Detection of E. coli in beach water within 1 hour using immunomagnetic separation and ATP bioluminescence*. Luminescence, 19, 31-36, **2004**.
- [239] G. Pappert, M. Rieger, R. Niessner, M. Seidel, *Immunomagnetic nanoparticle-based sandwich chemiluminescence-ELISA for the enrichment and quantification of E. coli*. Microchimica Acta, 168, 1-8, **2010**.
- [240] F. G. Perez, M. Mascini, I. E. Tothill, A. P. F. Turner, *Immunomagnetic separation with mediated flow injection analysis amperometric detection of viable Escherichia coli O157*. Analytical Chemistry, 70, 2380-2386, **1998**.
- [241] U. Reidt, B. Geisberger, C. Heller, A. Friedberger, *Automated immunomagnetic processing and separation of Legionella pneumophila with manual detection by*

- sandwich ELISA and PCR amplification of the ompS gene*. Journal of Laboratory Automation, *16*, 157-164, **2011**.
- [242] S. Allegra, F. Girardot, F. Grattard, P. Berthelot, J. H. Helbig, B. Pozzetto, S. Riffard, *Evaluation of an immunomagnetic separation assay in combination with cultivation to improve Legionella pneumophila serogroup 1 recovery from environmental samples*. Journal of Applied Microbiology, *110*, 952-961, **2011**.
- [243] L. P. Mansfield, S. J. Forsythe, *Immunomagnetic separation as an alternative to enrichment broths for Salmonella detection*. Letters in Applied Microbiology, *16*, 122-125, **1993**.
- [244] M. P. Fabian, S. L. Miller, T. Reponen, M. T. Hernandez, *Ambient bioaerosol indices or indoor air quality assessments of flood reclamation*. Journal of Aerosol Science, *36*, 763-783, **2005**.
- [245] W. D. Griffiths, G. A. L. Decosemo, *The assessment of bioaerosols - a critical review*. Journal of Aerosol Science, *25*, 1425-1458, **1994**.
- [246] A. A. Andersen, *New sampler for the collection, sizing, and enumeration of viable airborne particles*. Journal of Bacteriology, *76*, 471-484, **1958**.
- [247] P. S. Brachman, V. J. Gabelli, T. W. Kethley, R. Ehrlich, J. R. Maltman, S. H. Madin, E. K. Wolfe, J. D. Morton, G. Middlebrook, H. F. Eichenwald, I. H. Silver, *Standard sampler for assay of airborne microorganisms*. Science, *144*, 1295, **1964**.
- [248] *Erfassen luftgetragener Mikroorganismen und Viren in der Außenluft. Aktive Probenahme von Bioaerosolen. Abscheidung von luftgetragenen Bakterien mit Impingern nach dem Prinzip der kritischen Düse*. Verein Deutscher Ingenieure: VDI Richtlinie 4252, **2008**.
- [249] P. A. Baron, K. Willeke, *Aerosol measurement: principles, techniques, and applications*. John Wiley & Sons **2005**.
- [250] http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/4/4b/Cyclone_Separator_german.jpg, **2012**.

- [251] J. M. Macher, M. W. First, *Personal airsamplers for measuring occupational exposure to biological hazards*. American Industrial Hygiene Association Journal, 45, 76-83, **1984**.
- [252] G. Blomquist, U. Palmgren, G. Ström, *Improved techniques for sampling airborne fungal particles in highly contaminated environments*. Scandinavian Journal of Work, Environment and Health, 10, 252-258, **1984**.
- [253] W. Eduard, D. Heederik, *Methods for quantitative assessment of airborne levels of noninfectious microorganisms in highly contaminated work environments*. American Industrial Hygiene Association Journal, 59, 113-127, **1998**.
- [254] H. C. Berg, L. Turner, *Chemotaxis of bacteria in glass-capillary arrays - Escherichia coli, motility, microchannel plate, and light-scattering*. Biophysical Journal, 58, 919-930, **1990**.
- [255] M. Y. Chen, M. J. Sailor, *Charge-gated transport of proteins in nanostructured optical films of mesoporous silica*. Analytical Chemistry, 83, 7186-7193, **2011**.
- [256] C. O'Callaghan, P. W. Barry, *The science of nebulised drug delivery*. Thorax, 52, S31-S44, **1997**.
- [257] D. T. Loffert, D. Ikle, H. S. Nelson, *A comparison of commercial jet nebulizers*. Chest, 106, 1788-1792, **1994**.
- [258] W. D. Griffiths, I. W. Stewart, S. J. Futter, S. L. Upton, D. Mark, *The development of sampling methods for the assessment of indoor bioaerosols*. Journal of Aerosol Science, 28, 437-457, **1997**.
- [259] E. Carvalho, C. Sindt, A. Verdier, C. Galan, L. O'Donoghue, S. Parks, M. Thibaudon, *Performance of the Coriolis air sampler, a high-volume aerosol-collection system for quantification of airborne spores and pollen grains*. Aerobiologia, 24, 191-201, **2008**.
- [260] C. W. Chang, F. C. Chou, *Methodologies for quantifying culturable, viable, and total Legionella pneumophila in indoor air*. Indoor Air, 21, 291-299, **2011**.
- [261] T. Han, G. Mainelis, *Design and development of an electrostatic sampler for bioaerosols with high concentration rate*. Journal of Aerosol Science, 39, 1066-1078, **2008**.

- [262] S. D. Perkins, J. Mayfield, V. Fraser, L. T. Angenent, *Potentially pathogenic bacteria in shower water and air of stem cell transplant unit*. Applied and Environmental Microbiology, 75, 5363-5372, **2009**.
- [263] S. Bernander, K. Jacobson, E. H. Helbig, P. C. Lück, M. Lundhohn, *A hospital-associated outbreak of Legionnaires' disease caused by Legionella pneumophila serogroup 1 is characterized by stable genetic fingerprinting but variable monoclonal antibody patterns*. Journal of Clinical Microbiology, 41, 2503-2508, **2003**.
- [264] K. Pannier, K. Heuner, C. Lück, *Variable genetic element typing: a quick method for epidemiological subtyping of Legionella pneumophila*. European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases, 29, 481-487, **2010**.
- [265] J. H. Helbig, S. A. Uldum, P. C. Lück, T. G. Harrison, *Detection of Legionella pneumophila antigen in urine samples by the BinaxNOW immunchromatographic assay and comparison with both Binax Legionella Urinary Enzyme Immunoassay (EIA) and Biotest Legionella Urin Antigen (EIA)*. Journal of Medical Microbiology, 50, 509-516, **2001**.
- [266] M. E. Ritchie, J. Silver, A. Oshlack, M. Holmes, D. Diyagama, A. Holloway, G. K. Smyth, *A comparison of background correction methods for two-colour microarrays*. Bioinformatics, 23, 2700-2707, **2007**.
- [267] W. Yin, T. Chen, X. S. Zhou, A. Chakraborty, *Background correction for cDNA microarray images using the TV+L¹ model*. Bioinformatics, 21, 2410-2416, **2005**.
- [268] J. W. A. Findlay, R. F. Dillard, *Appropriate calibration curve fitting in ligand binding assays*. The AAPS Journal, 9, E260-E267, **2007**.
- [269] R. A. Dudley, P. Edwards, R. P. Ekins, D. J. Finney, I. G. M. McKenzie, G. M. Raab, D. Rodbard, R. P. C. Rodgers, *Guidelines for immunoassay data processing*. Clinical Chemistry, 31, 1264-1271, **1985**.
- [270] B. D. Plikaytis, S. H. Turner, L. L. Gheesling, G. M. Carlone, *Comparisons of standard curve-fitting methods to quantitate Neisseria meningitidis group A polysaccharide antibody levels by enzyme-linked immunosorbent assay*. Journal of Clinical Microbiology, 29, 1439-1446, **1991**.

- [271] G. L. Long, J. D. Winefordner, *Limit of detection - a closer look at the IUPAC definition*. Analytical Chemistry, 55, 712-724, **1983**.
- [272] P. A. Baron, K. Willeke, *Aerosol measurement: principles, techniques, and applications*. John Wiley & Sons **2005**.
- [273] http://bioamerica-inc.com/v3/index.php?main_page=product_info&cPath=66_70&products_id=215, **2012**.
- [274] <http://www.skinc.com/impingers.asp>, **2012**.